

## 酶解法制备绵羊乳酪蛋白 ACE 抑制肽的工艺优化及其抑制机制

汤海霞<sup>1</sup>, 张艳<sup>2</sup>, 葛武鹏<sup>1\*</sup>, 宋宇轩<sup>3</sup>, 王海燕<sup>1</sup>, 王爽爽<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西杨凌 712100

<sup>2</sup>富平县检验检测中心 陕西省羊乳产品质量监督检验中心 陕西富平 711700

<sup>3</sup>西北农林科技大学动物科技学院 陕西杨凌 712100

**摘要** 为优化酶解法制备绵羊乳酪蛋白 ACE 抑制肽的工艺条件以及筛选和鉴定一种新的 ACE 抑制肽, 选用 5 种蛋白酶水解酪蛋白, 以水解度、分子量分布和 ACE 抑制率为指标筛选最适蛋白酶, 采用单因素和响应面法优化工艺, 采用三合一质谱仪(Orbitrap Fusion Lumos Tribrid MS)方法鉴定分子量小于 3 ku 组分的氨基酸序列, 筛选潜在 ACE 抑制肽, 进行人工合成, 测定其 IC<sub>50</sub> 值。采用 Lineweaver-Burk 作图确定酶抑制动力学, 结合分子对接解析肽段的抑制机制。结果表明: 碱性蛋白酶水解酪蛋白的最佳条件为 pH 6、底物含量 8%、酶添加量 4%、温度 55 °C、水解时间 90 min, 此时酪蛋白水解液 ACE 抑制率为 99.1%。验证具有 ACE 抑制活性的肽段 10 条, 筛选出一条新颖的降血压肽——LFRQFY(源自  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白), 其 ACE 抑制活性的 IC<sub>50</sub> 为 (7.9±1.7)  $\mu\text{mol/L}$ , 酶抑制动力学为混合抑制模式。分子对接结果表明: LFRQFY 能与 ACE 的氨基酸残基 Ala354(活性口袋 S1)、His353(活性口袋 S2) 形成氢键, 具有显著的体外降血压活性。

**关键词** ACE 抑制肽; 绵羊乳; 分子量分布; 分子对接; 响应面

**文章编号** 1009-7848(2022)06-0220-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.023

高血压是常见的慢性病之一, 以动脉血压持续升高作为主要特征, 也是我国心脑血管(cardiovascular)病人死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。控制高血压是心脑血管病预防的切入点和关键措施, 而血管紧张素转化酶(Angiotensin-I-converting enzyme, ACE)可将肾素-血管紧张素系统(Renin-angiotensin-system, RAS)的血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II(血管收缩剂), 使激肽释放酶-激肽系统(Kallikrein-kininsystem, KKS)中血管舒缓激肽 C 失活, 从而失去降血压的功能<sup>[2]</sup>。通过抑制 ACE 酶活性, 降血压肽在降低血压中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

酪蛋白是活性肽的良好来源, 很多研究已验证牛奶、驼奶、山羊奶和牦牛奶来源的酪蛋白具有降血压功能<sup>[4-7]</sup>。目前对于绵羊奶的研究主要集中在理化特性、营养成分、微生物检测、酸奶和奶酪制作等方面<sup>[8-11]</sup>, 关于绵羊奶活性肽方面的研究相对较少。Tagliazucchi 等<sup>[12]</sup>通过体外模拟胃肠道环境消化牛奶、驼奶、山羊奶和绵羊乳, 比较 4 种乳源制备的 ACE 抑制活性肽, 结果表明绵羊奶水解

物的降血压效果明显高于其它 3 种奶。Hernández-Ledesma 等<sup>[13]</sup>使用不同蛋白酶水解绵羊奶和山羊奶乳清中分离的  $\beta$ -乳球蛋白, 得到高抑制率的 ACE 活性肽, 而关于酶法制备绵羊奶酪蛋白 ACE 抑制肽的研究鲜见报道。研究表明 ACE 抑制肽 C-末端常含有 Phe、Trp 等疏水性氨基酸<sup>[14]</sup>, N-末端含有亮氨酸或碱性氨基酸等特点<sup>[15]</sup>, 结合蛋白酶的酶切位点, 试验选择 5 种蛋白酶(碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 和中性蛋白酶)水解酪蛋白。

本研究的目的是确定绵羊乳酪蛋白最佳酶解工艺, 并从酪蛋白水解物中筛选和鉴定一种新的 ACE 抑制肽, 阐明其活性机制。利用 LC-MS 鉴定酪蛋白水解物中的肽并合成一种新的 ACE 抑制肽, 测定其 IC<sub>50</sub> 值和 ACE 抑制动力学, 使用分子对接解释肽段对 ACE 的抑制机制, 为绵羊乳产品的开发和降血压肽产品的研究提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

绵羊乳, 采自金昌奶绵羊试验示范基地; 酪蛋白, 实验室制备; 碱性蛋白酶(2.4LFG)、中性蛋白酶(0.8 L), 诺维信公司提供; 胰蛋白酶(2 500 U/

收稿日期: 2021-06-19

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2021ZDLNY02-09)

作者简介: 汤海霞(1994—), 女, 硕士生

通信作者: 葛武鹏 E-mail: josephge@nwfau.edu.cn

mg), 上海源叶有限公司; 蛋白酶 K, 德国 Meker 公司; 胃蛋白酶 ( $\geq 250$  U/mg)、邻苯二甲醛 (OPA)、L-丝氨酸, 北京索莱宝有限公司; 马尿酸-组氨酸-亮氨酸 (HHL), 上海麦克林有限公司; 血管紧张素转换酶 (ACE)、色谱级乙腈, 美国 Sigma 公司; 其它试剂均为国产分析纯级。

## 1.2 仪器与设备

Orbitrap Fusion Lumos Tribid MS 三合一质谱仪, 美国 ThermoFisher 公司; ÄKTA 蛋白纯化系统, 美国 GE 公司; 高速冷冻离心机, 安徽中科公司; 真空冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂有限公司; 1100 型高效液相色谱, 美国 Agilent 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 蛋白酶筛选** 将酪蛋白配成底物质量分数为 5% 的溶液, 在各酶的最适条件下酶解 (见表 1), 并以 1 mol/L NaOH 维持酶解体系的 pH 值不变, 90 min 后水浴灭活 (95 °C, 15 min), 冷却至室温后调 pH 值为 7, 离心 (10 000×g 15 min, 4 °C) 取上清液, 测定样品的水解度和 ACE 抑制率。

**1.3.2 单因素试验** 选择碱性蛋白酶作为酪蛋白最佳水解酶, 保持其它条件不变, 考察酶解时间 (60, 90, 120, 150, 180 min)、pH (6, 7, 8, 9, 10)、温度 (45, 50, 55, 60, 65 °C)、酶添加量 E/S (1%, 2%, 3%, 4%, 5%)、底物含量 (4%, 6%, 8%, 10%, 12%) 对酪蛋白水解物 ACE 抑制率的影响。

**1.3.3 响应面优化** 基于单因素试验确定 pH 值为 6, 底物含量为 8%, 在此条件下选择酶解温度、酶添加量、酶解时间 3 个因素, 以水解液 ACE 抑制率为指标, 设计三因素三水平试验优化酶解条件, 试验因素及水平见表 2。

**1.3.4 ACE 抑制率的测定** ACE 抑制率的测定采用高效液相色谱法<sup>[16]</sup>。向离心管中加入 10  $\mu$ L 样品和 30  $\mu$ L 2.5 mmol/L HHL, 37 °C 培养 5 min, 加入 20  $\mu$ L 0.1 U/mL ACE 后 37 °C 振荡培养 60 min, 最后加入 60  $\mu$ L 的 1 mol/L HCL 终止反应。ACE 酶解释放的 HA (马尿酸) 峰面积通过 HPLC 测定。

测定马尿酸标准曲线: 将马尿酸标准溶液 (1 mg/mL) 稀释为: 25, 50, 80, 100, 300 和 400  $\mu$ g/mL, 上样量 5  $\mu$ L, 以峰面积为纵坐标, 马尿酸浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

表 1 不同蛋白酶最适水解条件

Table 1 The optimum enzyme hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶	pH 值	温度/°C	酶添加量/%	酶解时间/min
碱性蛋白酶	7.0	55	2	90
胰蛋白酶	8.0	37	2	90
胃蛋白酶	3.0	37	2	90
蛋白酶 K	7.5	37	2	90
中性蛋白酶	7.0	55	2	90

表 2 响应面试验设计因素与水平

Table 2 Factors and levels of response surface experiment

水平	A (温度/°C)	B (酶添加量/%)	C (时间/min)
-1	45	2	60
0	50	3	90
+1	55	4	120

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = (\Delta A_{\text{Control}} - \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{Control}}) \times 100$$

式中:  $\Delta A_{\text{Control}}$  和  $\Delta A_{\text{sample}}$  分别代表空白 (缓冲液) 和样品中 HA 的峰面积。

**1.3.5 酪蛋白水解度的测定** 水解度 (Degree of hydrolysis, DH) 的测定采用 OPA 法<sup>[17]</sup>。

**1.3.6 酪蛋白水解液分子质量的测定** 分子质量的测定采用凝胶色谱法 (gel filtration chromatography, GFC)<sup>[18]</sup>。试验选择牛乳白蛋白 (6 800 u)、 $\alpha$ -乳白蛋白 (14 186 u)、维生素 B<sub>12</sub> (1 355 u)、氧化型谷胱甘肽 (612.63 u)、甘氨酸 (75 u) 为标准品, 以出峰时间为横坐标, 分子质量的对数值为纵坐标绘制标准曲线。

**1.3.7 ACE 抑制肽的结构鉴定** 采用 Orbitrap Fusion Lumos Tribid MS 三合一质谱仪对小于 3 ku 的组分进行多肽的结构鉴定, 色谱柱: 预柱 C18-(2 cm×100  $\mu$ m)、分析柱 C18-(15 cm×75  $\mu$ m, 5  $\mu$ m 120A); 流动相 A: 0.1% 甲酸的水, 流动相 B: 0.1% 甲酸的乙腈; 梯度洗脱程序为 0~2 min, 8%~18% B; 2~32 min, 18%~35% B; 32~34 min, 35%~100% B; 34~42 min, 100% B; 进样量: 5  $\mu$ L; 流速: 300 nL/min。质谱条件参考刘静波的方法<sup>[19]</sup>, 其中质量扫描范围调整为 350~1 600 (m/z),

比对软件:ThermoproteomeDiscover。

1.3.8 ACE抑制肽的合成及 $IC_{50}$ 的测定 采用固相合成方法对挑选的肽段进行合成(纯度 $\geq 98\%$ ),此步骤由上海生工生物工程股份有限公司完成,后对合成肽的ACE抑制率的 $IC_{50}$ 进行测定。

1.3.9 ACE抑制肽动力学研究 肽段对ACE酶抑制模式参考Bhaskar等<sup>[20]</sup>方法并稍加修改。将LFRQFY(0,3,9  $\mu\text{mol/L}$ )和不同浓度的HHL(0.5, 2,2.5,3.5  $\text{mmol/L}$ )与ACE按1.3.5节方法混合测定马尿酸的含量,使用双倒数做图分析抑制动力学。

1.3.10 分子对接 分析抑制肽和ACE酶之间的分子水平相互作用,使用Discovery Studio 2019软件模拟分子对接。多肽的分子结构由软件的Macromolecules模块中Build and Edit Protein生成,再用Small Molecules中的Full Minimization进行结构优化。ACE晶体结构(代码:1O8A)从RCSB蛋白质数据库下载PDB格式。使用软件的Macromolecules模块中的Clean Protein对ACE分子进行清洗、制备、除水和加氢处理,然后以 $Zn^{2+}$ 原子为活性中心,定义活性坐标为(X:38.977,Y:38.645,Z:50.183),对接半径为15Å。选择程序CDOCKER进行半柔性分子对接<sup>[21]</sup>,基于CDOCKER能量分数、相互作用位点和与ACE的相互作

用力类型来评估分子对接的结果。

1.3.11 数据分析 通过Design-Expert 11.0软件进行响应面分析,Origin 2018分析软件数据处理和作图。

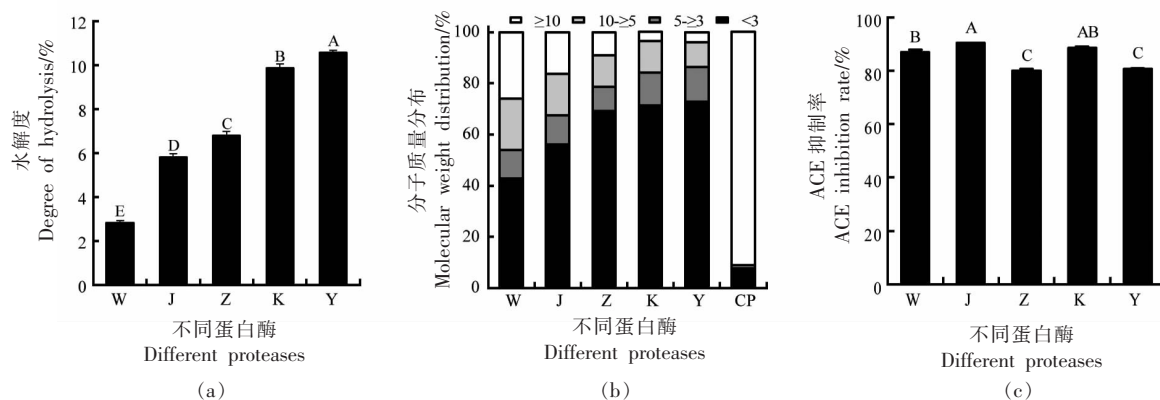
## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶的筛选

在相同酶解条件下,比较5种蛋白酶对酪蛋白的水解能力。由图1a所示,5种蛋白酶中胃蛋白酶的水解度最小为 $(2.8\pm 0.12)\%$ ,胰蛋白酶的水解度最大为 $(10.58\pm 0.09)\%$ ,5种蛋白酶水解液的水解度存在显著性差异( $P<0.05$ )。在本试验中,5种蛋白酶水解液的水解度排序为:Y>K>Z>J>W。这可能与蛋白酶的酶切位点以及酶活有关。

为了进一步了解5种蛋白酶对酪蛋白的酶解和多肽释放的影响,酶解前后使用GFC比较蛋白/肽的分子质量大小分布(图1b)。酶解前,酪蛋白(CP)溶液主要含有分子质量大于10 ku的物质。这与报道的酪蛋白中主要蛋白质的分子质量一致<sup>[22]</sup>。与酪蛋白原液相比,水解后的酪蛋白水解物中(>10 ku)蛋白质的比例显著降低,小分子质量的组分(<3 ku)增多,并且随着水解的增大其所占比例逐渐增加。

酪蛋白水解液的ACE抑制率结果如图1c所示,5种蛋白酶水解液中,ACE抑制率最高的是碱性



注: CP、W、J、Z、K、Y 分别代表酪蛋白、胃蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、蛋白酶 K 和胰蛋白酶; 不同字母表示各数值之间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图1 不同蛋白酶酶解对酪蛋白水解液的水解度(a)、分子质量分布(b)和ACE抑制率(c)的影响

Fig.1 Effects of different proteases on degree of hydrolysis (a), molecular weight distribution (b) and ACE inhibition rate (c) of casein hydrolysate

蛋白酶(90%±0.07%),和蛋白酶 K 没有显著差异( $P>0.05$ ),中性蛋白酶水解液 ACE 抑制率最低(79.8%±0.78%),并与胰蛋白酶水解液无显著差异( $P<0.05$ )。在研究中,绵羊乳酪蛋白水解产物的 ACE 抑制率高于 Ugwu 等<sup>[23]</sup>用胃蛋白酶和胰蛋白酶水解驼奶和马奶来源的酪蛋白及 Xu 等<sup>[24]</sup>用中性蛋白酶处理牛乳酪蛋白获得水解产物的 ACE 抑制率,原因可能与不同乳源的酪蛋白结构存在差异以及酶添加量有关。综合考虑,选择碱性蛋白酶进行单因素试验。

## 2.2 单因素试验结果

**2.2.1 酶解时间对酪蛋白水解液的影响** 图 2 显示,在 60 min 至 120 min,酪蛋白水解度迅速增加,120 min 之后,酪蛋白水解度趋于稳定。ACE 抑制率随着酶解时间的延长呈先增加后稳定下降的趋势,酪蛋白水解液在 90 min 抑制率最高。这一结论与 Kim 等<sup>[25]</sup>研究一致,随着水解时间的延长,ACE 抑制率先增加后降低,最初产生的 ACE 抑制肽随后被降解。

**2.2.2 酶解 pH 值对酪蛋白水解液的影响** 图 3 显示,随着 pH 值的增加,酪蛋白水解度显著性增大( $P<0.05$ ),而 ACE 抑制率则缓慢降低。这是因为随着水解度增大酪蛋白被过度水解,产生的 ACE 抑制肽被酶解更小分子的多肽和氨基酸从而失去降血压作用<sup>[26]</sup>。因此选择 pH 6 为最适酶解条件。

**2.2.3 酶解温度对酪蛋白水解液的影响** 图 4 显示,酪蛋白水解度随着酶温度升高而增大。在一定温度范围内,升高温度能够加快化学反应的速度,提高底物和酶的结合几率,使酪蛋白水解度增加<sup>[27]</sup>。ACE 抑制率随着温度的上升呈现出先增加后下降的趋势,在 50 °C 得到最大值。结合水解度分析,适当水解可以提高酪蛋白水解物的 ACE 抑制率,但过度水解则会破坏短肽段的分子结构使其失去活性。试验选择 50 °C 作为最佳酶解温度。

**2.2.4 酶添加量对酪蛋白水解液的影响** 图 4 显示,当酶添加量从 1% 增加 4% 时,水解度显著性增加( $P<0.05$ ),但当酶添加量增加到 5% 时,水解度无显著性变化( $P>0.05$ )。这是因为当酶添加量增加到一定程度,酶与底物已充分结合,加大酶用量对于酶解效果的影响越来越小。而 ACE 抑制率则

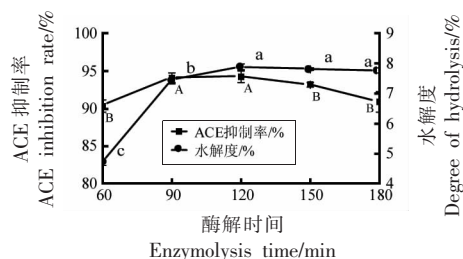


图 2 酶解时间对 ACE 抑制率和水解度的影响

Fig. 2 Effect of enzymolysis time on ACE inhibition rate and degree of hydrolysis

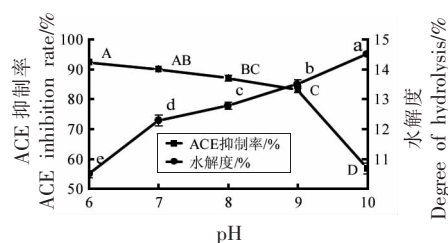


图 3 酶解 pH 值对 ACE 抑制率和水解度的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis pH on ACE inhibition rate and degree of hydrolysis

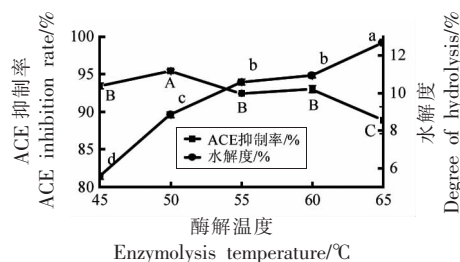


图 4 酶解温度对 ACE 抑制率和水解度的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis temperature on ACE inhibition rate and degree of hydrolysis

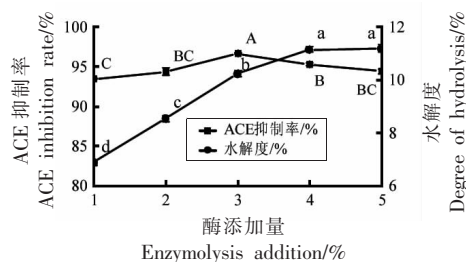


图 5 酶添加量对 ACE 抑制率和水解度的影响

Fig.5 Effect of enzyme addition on ACE inhibition rate and degree of hydrolysis

先升高后下降,在 3% 有最大值。试验中水解度和 ACE 抑制率随酶添加量的变化趋势与 Guo 等<sup>[28]</sup>使用蛋白酶水解乳清蛋白的结果相似。

2.2.5 底物含量对酪蛋白水解液的影响 图6显示,随着底物含量的增加,酪蛋白水解度先降低后处于稳定。当底物含量过高时,会减弱反应体系的流动性,限制了酶与底物的接触,导致水解度降低;水解物的ACE抑制率则先上升后下降,在底物含量8%时达到最大值,因此选择底物含量8%作为最佳水解条件。

## 2.3 响应面优化

2.3.1 响应面试验结果及分析 按 Box - Behnken 原理进行响应面分析,试验结果见表3。

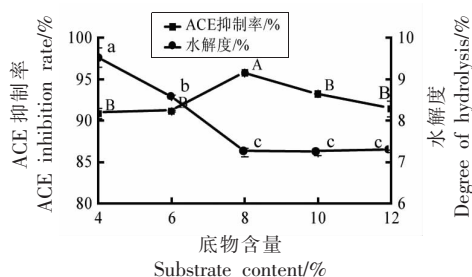


图6 底物浓度对ACE抑制率和水解度的影响  
Fig.6 Effect of substrate concentrations on ACE inhibition rate and degree of hydrolysis

表3 响应面试验设计及结果

Table 3 Experimental design and results for response surface analysis

序号	A(温度/℃)	B(酶添加量/%)	C(时间/min)	ACE抑制率/%	序号	A(温度/℃)	B(酶添加量/%)	C(时间/min)	ACE抑制率/%
1	-1	-1	0	91.1	9	+1	0	-1	95.7
2	-1	0	+1	91.8	10	0	-1	+1	97.0
3	0	+1	+1	95.5	11	0	-1	-1	93.0
4	+1	+1	0	97.4	12	-1	0	-1	91.4
5	+1	-1	0	96.2	13	-1	+1	0	89.8
6	+1	0	+1	97.7	14	0	0	0	92.6
7	0	0	0	93.1	15	0	0	0	93.6
8	0	0	0	92.3	16	0	+1	-1	96.3

利用 Design-Expert 软件获得的 ACE 抑制率的二次回归模型为:  $Y=92.9+2.86A+0.21B+0.7C+0.63AB+0.4AC-1.2BC-0.29A^2+1.01B^2+1.54C^2$ 。

方差分析结果如表4所示。模型的回归系数  $R^2=0.9756$ , 说明方程对试验拟合度良好;  $R^2_{Adj}=0.9390$ , 说明表明该模型能解释 93.9% 响应值变化。模型  $P=0.0004<0.001$  极显著; 失拟项  $P=$

$0.408>0.05$  不显著, 表明模型拟合度很好, 可用此模型预测酶解温度、酶添加量和酶解时间对酪蛋白水解物的 ACE 抑制率影响。模型中一次项 A 影响极显著, 二次项  $C^2$  和交互项 BC 影响高度显著, 一次项 C 和二次项  $B^2$  影响显著, 根据 F 值可知各因素对绵羊乳酪蛋白的影响顺序为酶解温度>酶解时间>酶添加量。

表4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	91.68	9	10.19	26.66	0.0004***
A(酶解温度)	65.55	1	65.55	171.56	<0.0001***
B(酶添加量)	0.36	1	0.36	0.95	0.3684
C(酶解时间)	3.92	1	3.92	10.26	0.0185*
AB	1.56	1	1.56	4.09	0.0896
AC	0.64	1	0.64	1.68	0.2432
BC	5.76	1	5.76	15.08	0.0081**
$A^2$	0.33	1	0.33	0.87	0.3881

(续表 4)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
$B^2$	4.10	1	4.10	10.73	0.0169*
$C^2$	9.46	1	9.46	24.75	0.0025**
残差	2.29	6	0.38		
失拟	1.31	3	0.44	1.34	0.4080
纯误差	0.98	3	0.33		
总和	93.97	15			

注:\*\*\*.表示影响极显著( $P<0.001$ );\*\*.表示影响高度显著( $P<0.01$ );\*.表示影响显著( $P<0.05$ )。 $R^2=0.9756$ , $R^2_{Adj}=0.9390$ 。

2.3.2 最佳酶解绵羊乳酪蛋白工艺条件的确定及验证 碱性蛋白酶水解绵羊乳酪蛋白最佳工艺参数为 pH 6、底物含量为 8%、酶解温度 55 °C、酶添加量 4%、酶解时间 120 min。酪蛋白水解物的 ACE 抑制率预测值为 99.4%。在此条件下 3 次验证试验测得平均值为 99.1%，实际值与模型预测值吻合度为 99.7%，表明此模型可以用于实际生产。

## 2.4 响应面优化后酪蛋白水解液的分子质量分布

使用响应面优化后的条件水解酪蛋白得到的水解液的分子质量分布如表 5 所示,与优化前 90 min 相比,优化后的酪蛋白水解液的水解度增加,水解液中大于 10 ku 和 3~10 ku 的蛋白含量降低,小于 1 ku 的多肽含量增加,特别是  $0.2 \leq -0.5$  ku 和  $0.1 \leq -0.2$  ku 分子质量之间的肽段。在 BIOPEP 数据库中搜索降血压肽得到 992 个肽段并对其相对分子质量进行分析,其中分子质量在 0.1~0.2 ku 的肽段比例为 2.2%,0.2~0.5 ku 肽段比例为 43.9%,0.5~1 ku 肽段比例为 41.9%,1~1.5 ku 肽段比例为 10.4%,1.5~2 ku 肽段比例为 1.6%,降血压肽的相对分子质量主要集中在 0.2~1.5 ku。上述结果在一定程度上解释了优化后酪蛋白水解液的 ACE 抑制率升高的原因。

## 2.5 ACE 抑制肽鉴定结果

经质谱鉴定出来的结果与 UniProt sheeppasin 数据库中进行比对,共鉴定出 484 条肽段,其中源自  $\alpha_1$ -酪蛋白有 165 条、源自  $\alpha_2$ -酪蛋白有 122 条、源自  $\beta$ -酪蛋白 165 条,源自  $\kappa$ -酪蛋白 68 条,将鉴定出来的肽段在数据库中(BIOPEP、AHT-PDB、SwePep、EROPMoscow 和 PeptideDB)进行搜索比对,发现酪蛋白酶解液中已经验证具有 ACE

表 5 酪蛋白水解液的分子质量分布

Table 5 The molecular weight distribution of casein hydrolysates

分子质量/ku	优化前	优化后
$\geq 10$	16.2	4.1
$3 \leq -10$	27.7	23.1
$2 \leq -3$	8.91	8.73
$1.5 \leq -2$	6.66	6.58
$1 \leq -1.5$	10.36	9.56
$0.5 \leq -1$	15.7	17.9
$0.2 \leq -0.5$	9.7	17.7
$0.1 \leq -0.2$	2.47	8.7
$< 0.1$	2.29	3.7

抑制活性的肽段 10 条(表 7),这也解释了酪蛋白酶解液高 ACE 抑制率的原因。同时利用网站 PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>)对肽段进行打分,选择评分大于 0.80 的肽段为潜在的生物活性肽,同时选择 ToxinPred (<http://web.expasy.org/protparam/>)网站进行毒性预测、网站 Expasy-Compute 的 pI/Mw ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/))预测肽段的分子质量及等电点,并结合已验证 ACE 抑制肽的氨基酸序列结构,在鉴定结果中筛选出一条新的生物活性肽段 LFRQFY。

## 2.6 肽段合成与活性验证

将肽段 LFRQFY 进行固相合成法合成,纯度都大于 98%。对合成的肽段进行体外 ACE 抑制活性验证,其  $IC_{50}$  值( $7.9 \pm 1.7$ ) $\mu\text{mol/L}$ 。这肽段氨基酸序列与封梅<sup>[15]</sup>的报道相一致:氨基酸序列 C 末端含有酪氨酸,N-末端含有亮氨酸或碱性氨基酸,对该肽的 ACE 抑制活性起到积极的影响。同时 Soleymanzadeh 等<sup>[29]</sup>从驼奶  $\beta$ -酪蛋白分离得到的 7

表6 酪蛋白水解液中具有ACE抑制活性的肽段

Table 6 Peptides with ACE inhibitory activity in casein hydrolysate

序列	来源	长度/个	分子量/u	IC <sub>50</sub>
KYIPIQ	$\kappa$ -casein	6	761.5	7.28 $\mu$ mol/L
KFAWPQ	$\alpha_2$ -casein	6	776.4	(177.1 $\pm$ 14.9) $\mu$ mol/L
KEDVPSE	$\alpha_{s1}$ -casein	7	803.4	ACE
VVAPFPE	$\alpha_{s1}$ -casein	7	758.4	(100.0 $\pm$ 0.1) $\mu$ mol/L
NENLLRF	$\alpha_{s1}$ -casein	7	905.5	ACE
RPKHPIKHQ	$\alpha_{s1}$ -casein	9	1 140.7	13 $\mu$ mol/L
DKIHPF	$\beta$ -casein	6	756.4	2 419.4 $\mu$ mol/L
RDMPIQAF	$\beta$ -casein	8	977.5	209 $\mu$ mol/L
TQTPVVVPPF	$\beta$ -casein	10	1 084.6	ACE
GVPKVKETMVPK	$\beta$ -casein	12	1 312.8	(376.1 $\pm$ 36.9) $\mu$ mol/L

表7 潜在的ACE抑制肽

Table 7 The potential ACE inhibitory peptides

序列	来源	长度/个	分子量/u	毒性	pI	PeptideRanker
LFRQFY	$\alpha_{s1}$ -casein	6	873.5	无毒	8.75	8.75

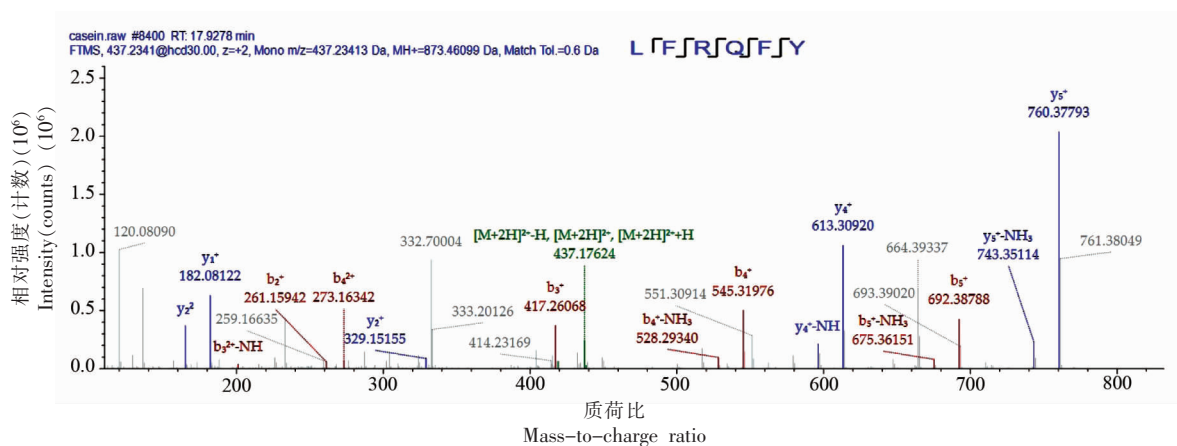


图7 LFRQFY的二级质谱图

Fig.7 Secondary mass spectra of LFRQFY

肽 MVPYPQR (IC<sub>50</sub>=30  $\mu$ mol/L); Villadóniga 等<sup>[30]</sup>从 $\alpha$ -乳白蛋白鉴定的两个 ACE 抑制肽: TTFHTS-GY (IC<sub>50</sub>=142  $\mu$ mol/L) 和 GYDTQAI VQ (IC<sub>50</sub>=1.0 mmol/L)。

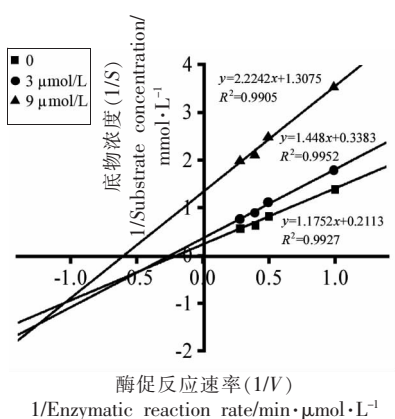
## 2.7 LFRQFY 对 ACE 的抑制模式分析

为了评价新的 ACE 抑制肽的活性机制, 通过使用 Lineweaver-Burk 图研究抑制肽 LFRQFY 对 ACE 的抑制模式。有研究表明 Lineweaver-Burk 的双倒数作图, 若随着抑制物浓度的增加, 其  $V_{max}$  减小,  $K_m$  增大或减小, 说明该抑制类型属于混合型

抑制<sup>[31]</sup>。如图 8 所示,  $V_m$  和  $K_m$  值都随着抑制肽浓度的增加而降低, 表明抑制肽可以与酶的活性和非活性位点的位置结合, 从而降低了血管紧张素转换酶的催化活性。相似的, Sangsawad 等<sup>[32]</sup>从熟鸡胸肉中分离得到的 KPLL 和 KP 以及 Forghani 等<sup>[33]</sup>从刺参中分离得到的 EVSQGRP、VSRHFAS-YAN 和 SAAVGSP 也显示出对 ACE 的混合抑制模式。

## 2.8 LFRQFY 与 ACE 的分子对接分析

使用 Discovery Studio 2019 软件将 LFRQFY



	0	3 μmol·L <sup>-1</sup>	9 μmol·L <sup>-1</sup>
$V_{max}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	4.73	2.96	0.76
$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.56	4.28	1.7

图 8 肽段 LFRQFY 对 ACE 的 Lineweaver-Burk 图

Fig.8 Lineweaver-Burk plot of ACE inhibition by the peptide LFRQFY

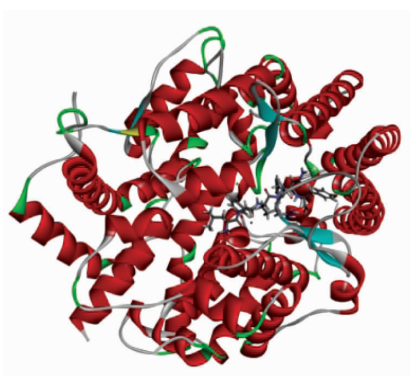


图 9 ACE-LFRQFY 复合体的 3D 结构图

Fig.9 3D structure diagram of ACE-LFRQFY

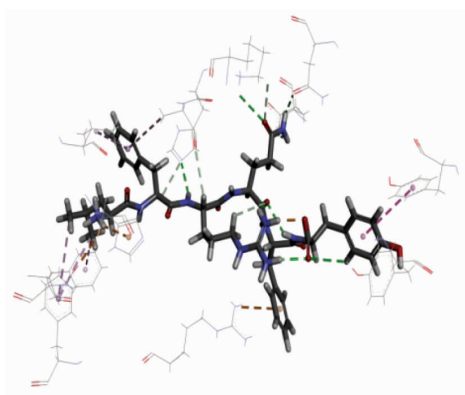


图 10 ACE-LFRQFY 复合体的局部图

Fig.10 Partial graph of ACE-LFRQFY

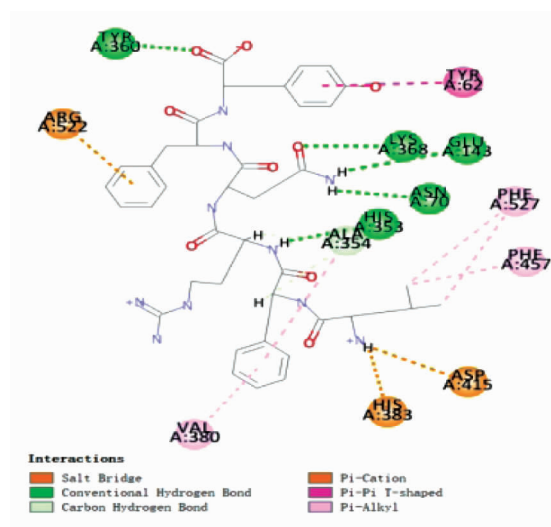


图 11 ACE-LFRQFY 复合体的 2D 结构图

Fig.11 2D structure diagram of ACE-LFRQFY

表 8 ACE-LFRQFY 复合物在最佳构象中观察到的氢键以及静电和疏水相互作用

Table 8 Hydrogen bonds and electrostatic and hydrophobic interactions observed in the best peptide poses based on the ACE-peptide complex

作用基团	键长 (Å)	类型
LFRQFY:H2-A:ASP415:OD1	3.29829	氢键;静电力
LFRQFY:H60-LFRQFY:O124	1.9474	氢键;静电力
A:TYR360:HH-LFRQFY:O123	2.82352	氢键
A:LYS368:HZ1-LFRQFY:O77	2.9128	氢键
LFRQFY:H43-A:HIS353:NE2	2.69281	氢键
LFRQFY:H59-LFRQFY:O82	2.01062	氢键
LFRQFY:H63-LFRQFY:O123	2.05461	氢键
LFRQFY:H79-A:GLU143:OE1	2.87801	氢键
LFRQFY:H80-A:ASN70:OD1	2.29365	氢键
LFRQFY:H104-LFRQFY:O82	2.40614	氢键
A:LYS368:HE1-LFRQFY:O77	2.84054	氢键
LFRQFY:H25-A:HIS353:NE2	2.93048	氢键
LFRQFY:H45-A:ALA354:O	2.97238	氢键
LFRQFY:H53-LFRQFY:O82	2.88458	氢键
A:ARG522:NH1-LFRQFY	3.49908	氢键;氢键
LFRQFY:H2-A:HIS383	2.38482	氢键;静电力
A:TYR62-LFRQFY	5.25144	疏水作用力
A:PHE457-LFRQFY:C12	3.82468	疏水作用力
A:PHE527-LFRQFY:C12	4.67027	疏水作用力
A:PHE527-LFRQFY:C16	5.19319	疏水作用力
LFRQFY-A:ALA354	5.24589	疏水作用力
LFRQFY-A:VAL380	4.84468	疏水作用力



与 ACE 进行半柔性对接,分析 LFRQFY 与 ACE 的分子水平的相互作用机制。分子对接结果中的“-CDOCKER Energy”和“-CDOCKER Interaction Energy”值可以评价受体与配体亲和力,其相对值越高,表明肽段与 ACE 结合越紧密<sup>[34]</sup>。ACE-LFRQFY 复合物的“-CDOCKER Energy”值和“-CDOCKER Interaction Energy”值分别为 114.404 和 97.433,表明肽段 LFRQFY 对 ACE 具有很强的结合亲和力。图 10 和表 8 显示,肽段 LFRQFY 与 ACE 残基 Asp 415、Tyr360、His353、Glu143、Asn70、Ala354、Arg522 和 His383 形成 8 个氢键,研究表明氢键是维持 ACE-LFRQFY 复合物稳定的主要作用力<sup>[35]</sup>,与残基 Phe457、Ala354、TYR62、Val380 形成的疏水相互作用也有助于 LFRQFY-ACE 复合物的稳定性。其中与 ACE 催化活性位点上氨基酸残基 Ala354 (活性口袋 S1) 形成氢键和疏水相互作用、His353 (活性口袋 S2) 形成的 2 个氢键,表明了 LFRQFY 能够与 ACE 催化位点 S1 和 S2 口袋紧密结合。Fan 等<sup>[36]</sup>从大黄鱼中鉴定出具有显著降血压作用的 ACE 抑制肽 WAR 和 WQR 也与 ACE 活性残基 Ala354、His353 形成氢键。因此,肽 LFRQFY 是一种新型有效的酪蛋白源 ACE 抑制肽。

### 3 结论

通过蛋白酶筛选,单因素和响应面试验确定了绵羊乳酪蛋白 ACE 抑制肽最佳水解条件,优化后的绵羊乳酪蛋白水解液 ACE 抑制率达到 99.1%,表现出极佳的降血压潜力。小于 3 ku 组分经过质谱鉴定氨基酸序列,在质谱结果中发现了 10 条已报道的具有 ACE 抑制活性的肽段,这解释了酪蛋白酶解液高 ACE 抑制率的原因。同时,发现了一条新颖的肽段 LFRQFY,其  $IC_{50}$  值为  $(7.9 \pm 1.7) \mu\text{mol/L}$ ,酶抑制动力学为混合抑制模式;分子对接结果表明,LFRQFY 能够与 ACE 的氨基酸残基 Ala354(活性口袋 S1)、His353(活性口袋 S2)形成氢键相互作用,而展现出显著的体外降血压活性。本研究建立了酶解法制备高 ACE 抑制活性的绵羊乳酪蛋白肽工艺,为后续绵羊乳精深加工及高值化利用提供一定理论参考依据。

### 参 考 文 献

- [1] DEOLIVEIRA M R, SILVA T J, BARROS E, et al. Anti-hypertensive peptides derived from caseins: Mechanism of physiological action, production bio-processes, and challenges for food applications [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 185(4): 884-908.
  - [2] YANG H Y, ERDOS E G, LEVIN Y A. dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1970, 214(2): 374-376.
  - [3] PUCHALSKA P, MARINA ALEGRE M L, GARCIA LOPEZ M C. Isolation and characterization of peptides with antihypertensive activity in foodstuffs [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(4): 521-551.
  - [4] DE OLIVEIRA T V, POLETO M D, DE OLIVEIRA M R, et al. Casein-derived peptides with antihypertensive potential: Production, identification and assessment of complex formation with angiotensin I-converting enzyme (ACE) through molecular docking studies [J]. *Food Biophysics*, 2020, 15(2): 162-172.
  - [5] LIN K, ZHANG L W, HAN X, et al. Yak milk casein as potential precursor of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides based on in silico proteolysis [J]. *Food Chemistry*, 2018, 254(1): 340-347.
  - [6] GAMMOH S, ALU'DATT M H, TRANCHANT C C, et al. Modification of the functactobacillus delbruional and bioactive properties of camel milk casein and whey proteins by ultrasonication and fermentation with *Leckii* subsp. *lactis* [J]. *LWT*, 2020, 129: 109501.
  - [7] ESPEJO-CARPIO F J, DE GOBBA C, GUADIX A, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 32(2): 175-183.
  - [8] PARK Y W, JUÁREZ M, RAMOS M, et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk [J]. *Small Ruminant Research*, 2007, 68(1/2): 88-113.
  - [9] 王海燕, 葛武鹏, 马筱怡, 等. 绵羊乳脂肪酸组成分析与评价 [J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 14-15.
- WANG H Y, GE W P, MA X Y, et al. Analysis

- and evaluation of fatty acid composition of sheep milk[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 14–15.
- [10] DORE M A R, OSATO M, REALDI G, et al. *Helicobacter pylori* in sheep milk (letter)[J]. *The Lancet*, 1999, 354(9173): 132.
- [11] RETTEDAL E A, ALTERMANN E, ROY N C, et al. The effects of unfermented and fermented cow and sheep milk on the gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(458): 1–12.
- [12] TAGLIAZUCCHI D, MARTINI S, SHAMSIA S, et al. Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk[J]. *International Dairy Journal*, 2018, 81(1): 19–27.
- [13] HERNANDEZ-LEDESMA B, RECIO I, RAMOS M, et al. Preparation of ovine and caprine beta-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine beta-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin[J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12(10): 805–812.
- [14] GÓMEZ-GUILLÉN M C, GIMÉNEZ B, LÓPEZ-CABALLERO M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(8): 1813–1827.
- [15] 封梅, 王慧溪, 汪芳安. 酶解蛋白质制备降血压肽的研究进展[J]. *武汉工业学院学报*, 2007(3): 25–27, 38.
- FENG M, WANG H X, WANG F A, et al. Anti-hypertensive peptides derived from food proteins by enzymatic hydrolysis and its research advances [J]. *Journal of Wuhan Polytechnic University*, 2007(3): 25–27, 38.
- [16] FAN H, WANG J, LIAO W, et al. Identification and characterization of gastrointestinal-resistant angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(25): 7147–7156.
- [17] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642–646.
- [18] 任娇艳, 李宇娟, 张婷, 等. 鳕鱼蛋白肽谱效关系研究[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(3): 271–280.
- REN J Y, LI Y J, ZHANG T, et al. Studies on the correction of spectrum and activities of protein hydrolysates of bonito[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(3): 271–280.
- [19] 刘静波, 王子秦, 于一丁, 等. 豆粕血管紧张素转化酶抑制肽的结构鉴定及作用机制解析[J]. *食品科学*, 2021, 42(12): 123–129.
- LIU J B, WANG Z Q, YU Y D, et al. Identification and mechanism analysis of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from soybean meal[J]. *Food Science*, 2021, 42(12): 123–129.
- [20] BHASKAR B, ANANTHANARAYAN L, JAMDAR S. Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 103(1): 105–161.
- [21] FU Y, ALASHI A M, YOUNG J F, et al. Enzyme inhibition kinetics and molecular interactions of patatin peptides with angiotensin I-converting enzyme and renin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101(1): 207–213.
- [22] 李文斐, 张磊, 宋宇轩, 等. 绵羊, 山羊和牛乳的营养成分比较分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 294–299.
- LI W F, ZHANG L, SONG Y X, et al. Comparative analysis of nutrients in sheep, goat and cow milk[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(24): 294–299.
- [23] UGWU C P, ABARSHI M M, MADA S B, et al. Camel and horse milk casein hydrolysates exhibit angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidative effects in vitro and in silico[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2019, 25(4): 1595–1604.
- [24] XU W, KONG B H, ZHAO X H. Optimization of some conditions of Neutrased-catalyzed plastein reaction to mediate ACE-inhibitory activity in vitro of casein hydrolysate prepared by Neutrased[J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(2): 276–284.
- [25] KIM S K, BYUN H G, PARK P J, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6): 2992–2997.
- [26] 邱娟, 沈建东, 翁凌, 等. 利用牡蛎制备ACE抑制肽的工艺优化[J]. *食品科学*, 2017, 38(16): 165–172.

- QIU J, SHEN J D, WENG L, et al. Optimization of preparation of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Food Science, 2017, 38(16): 165-172.
- [27] 吕小京, 操德群, 徐年军. 响应面试验优化酶解法制备海洋微藻微拟球藻抗氧化肽工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 183-188.
- LÜ X J, CAO D Q, XU N J. Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from protein hydrolysate of the marine microalgae nanochloropsis by response surface methodolog[J]. Food Science, 2018, 39(6): 183-188.
- [28] GUO Y X, PAN D D, TANOKURA M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2009, 114(1): 328-333.
- [29] SOLEYMANZADEH N, MIRDAMADI S, MIRZAEI M, et al. Novel  $\beta$ -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899: Identification and molecular docking [J]. International Dairy Journal, 2019, 97(1): 201-208.
- [30] VILLADONIGA C, CANTERA A M B. New ACE-inhibitory peptides derived from alpha-lactalbumin produced by hydrolysis with *Bromelia antiacantha* peptidases[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 20(c): 101258-101258.
- [31] 杨荣武. 生物化学原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 132-149.
- YANG R W. Principles of biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2012: 132-149.
- [32] SANGSAWAD P, CHOOWONGKOMON K, DAVID D, et al. Transepithelial transport and structural changes of chicken angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides through Caco-2 cell monolayers[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45(1): 401-408.
- [33] FORGHANI B, ZAREI M, EBRAHIMPOUR A, et al. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from *Stichopus horrens*: Stability study against the ACE and inhibition kinetics [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20(1): 276-290.
- [34] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白 ACE 抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 129-135.
- YU Z P, FAN Y, ZHAO W Z, et al. Identification and mechanism of action of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from hen egg proteins[J]. Food Science, 2020, 41(12): 129-135.
- [35] YU Z, FAN Y, ZHAO W, et al. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from *oncorhynchus mykiss* nebulin: Virtual screening and in silico molecular docking study[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(9): 2375-2383.
- [36] FAN Y, YU Z, ZHAO W, et al. Identification and molecular mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Larimichthys crocea* titin [J]. Food Science and Human Wellness, 2020, 9(3): 257-263.

### Optimization of Enzymatic Preparation of ACE Inhibitory Peptide from Sheep Milk Casein and Its Inhibition Mechanism

Tang Haixia<sup>1</sup>, Zhang Yan<sup>2</sup>, Ge Wupeng<sup>1\*</sup>, Song Yuxuan<sup>3</sup>, Wang Haiyan<sup>1</sup>, Wang Shuangshuang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi

<sup>2</sup>Fuping County Inspection and Testing Center, Shaanxi Goat Milk Product Quality Supervision and Inspection Center, Fuping 711700, Shaanxi

<sup>3</sup>College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi)

**Abstract** In order to optimize the technological conditions for preparing ACE inhibitory peptide of sheep casein by enzymatic hydrolysis, and a new ACE inhibitory peptide was screened and identified from casein hydrolysate. ACE inhibitory peptide was prepared from sheep cheese protein by five proteases enzymatic hydrolysis, and taking molecular weight distribution, degree of hydrolysis and inhibition rate of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) as indicators to

screening the most suitable protease. The single factor and response tests were used to optimize enzymatic hydrolysis conditions. The amino acid sequences of components less than 3 ku were identified by Orbitrap Fusion Lumos Tribrid MS, and the potential ACE inhibitory peptides were screened and determining their  $IC_{50}$  values after synthesis. The inhibition kinetics of enzyme was determined by Lineweaver–Burk mapping, and molecular docking was used to explain the mechanism of peptides inhibition of ACE. The results showed that alkaline protease was the most suitable protease, the optimal enzymolysis conditions were as follows: pH 6, substrate concentration of 8%, enzyme/substrate ratio (E/S) of 4%, temperature at 55 °C and enzymatic hydrolysis time for 90 min. The ACE inhibition rate of casein antihypertensive peptide prepared under this condition was 99.1%. A total of 484 peptides were identified in the fraction less than 3 ku, among which 10 peptides had been verified to have ACE inhibitory activity. A novel peptide LFRQFY (derived from  $\alpha_{s1}$ -casein) were found to have highly inhibition potency with  $IC_{50}$  values of  $(7.9\pm 1.7)$   $\mu\text{mol/L}$  and exhibiting mixed inhibition patterns. The molecular docking results revealed that LFRQFY were mainly attributed to forming very strong hydrogen bonds with ACE amino acid residues Ala354 (S1 pocket) and His353 (S2 pocket), and showed significant antihypertensive activity *in vitro*.

**Keywords** ACE inhibitory peptide; sheep milk; the molecular weight distribution; molecular docking; response surface methodology