

基于定量构效关系制备大麻仁蛋白 ACE 抑制肽

刘梦琪^{1,2}, 刘畅^{1,2}, 刘博浩^{1,2}, 阴雨奇^{1,2}, 张瀚林^{1,2}, 张英华^{1,2*}, 董艳^{3*}

¹东北农业大学乳品科学教育部重点实验室 哈尔滨 150030

²东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

³黑龙江省科学院大庆分院 黑龙江大庆 163319

摘要 高血压是引发心血管疾病的主要因素,经常服用降压的药物会产生副作用,因而安全、高效的食源性降压肽成为关注点。本研究建立了血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽的定量构效关系(QSAR)模型,确定 ACE 抑制肽的结构与其活性间的关系。将模型结果辅以计算机虚拟酶切精确掌握蛋白水解位点,筛选合适的蛋白酶水解大麻仁蛋白定向制备 ACE 抑制肽,并测定最终水解物的抑制效果。结果表明:基于二肽建立的 SVM-AAindex 模型具有最佳的预测性能(R^2 为 0.81, RMSE 为 0.53),且当二肽 C 端氨基酸为疏水性和芳香族氨基酸时具有较强的 ACE 抑制效果。蛋白质组分分析发现大麻仁蛋白含有 34.60% 的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸是制备 ACE 抑制肽的良好来源。选择虚拟酶切产生较多短肽和生物活性肽的碱性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶对大麻仁蛋白进行定向水解,获得的最终水解液的 ACE 抑制 IC_{50} 值分别为 1.89 和 2.30 mg/mL。本研究建立了一种高效精准的制备大麻仁蛋白 ACE 抑制肽的方法,在降血压药物上具有很好的应用前景。

关键词 大麻仁蛋白; ACE 抑制肽; QSAR 模型; 定向制备

文章编号 1009-7848(2023)12-0143-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.12.016

近年来,心血管疾病的发病率越来越高,而高血压被认为引发心血管疾病的主要因素^[1-3]。高血压疾病每年影响超过 10 亿人,从 2005 年到 2015 年,由于高血压而死亡的实际人数增加了 37.5%^[4]。最近的研究表明,若不加以控制,在 2025 年全球估计有 15.6 亿人患有高血压疾病^[5]。经调查,我国 18 岁以上人群高血压患病率约为 23.2%^[6]。一些国家在检测和治疗高血压方面已取得进步,然而全世界的控制率还远远不够。目前市面上用于高血压的初始治疗药物有五大类,一般根据患者身体状况选择单药或者联合治疗^[7]。药物治疗通常会伴随一些副作用,如:咳嗽、血钾升高、头痛等不良反应^[8]。血管紧张素转化酶抑制剂由于耐药性低,不仅在治疗高血压的同时对肾脏起到保护作用,还可以减少心血管并发症,因此成为当今治疗高血压药物发展较快的一类^[9]。

近年来,随着高血压疾病患病率的上升,有着

降压作用且来源于食物的生物活性肽因来源广泛及高安全性,在食品及保健品等领域引起广泛关注,这类生物活性肽通常也被称为血管紧张素转换酶抑制肽^[10-13]。血管紧张素转换酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE)是一种含有二价锌离子的外肽酶^[14]。人体中许多系统参与调节血压,其中最关键的升压和降压系统为:肾素-血管紧张素系统(Renal-Angiotensin System, RAS)和激肽释放酶-激肽系统(Kallikrein-Kinin System, KKS)。在这两个系统中,ACE 均起到关键的调节作用^[15]。若要降低高血压,抑制 ACE 的活性是一种有效的手段,ACE 抑制肽也因此逐渐发展起来^[16]。近年来健康成为人们关注的热点。如何高效治疗高血压,减少治疗副作用,为研究人员亟待解决的问题。从古至今,“药食同源”一直广受关注。目前有研究利用团扇鲙^[17]、海蜇^[18]、草鱼^[19]、海虾^[20]、牡蛎^[21]、贻贝蛋白^[22]、鲑鱼^[23]、藜豆蛋白^[24]等食源性蛋白水解获取 ACE 抑制肽。将来源于食物中的血管紧张素转化酶抑制肽开发成保健食品,必将有广阔前景^[25]。

当前研究中 ACE 抑制肽的制备方法多为利用蛋白酶对食源性蛋白进行水解并纯化得到,未对蛋白酶和蛋白进行前期筛选,具有一定的盲目

收稿日期: 2022-12-10

基金项目: 黑龙江省现代农业产业技术协同创新推广体系麻类(工业)(SCXTI(MLGY)2019)

第一作者: 刘梦琪,女,博士生

通信作者: 张英华 E-mail: yinghuazhang@neau.edu.cn
董艳 E-mail: dy0770@126.com

性。如果在制备 ACE 抑制肽前对选择的蛋白酶和蛋白进行预测会提高制备的效率,增加得肽率^[26]。目前有研究通过建立定量构效关系(QSAR)模型来确定 ACE 抑制肽的结构与其活性间的关系,从而指导食源性降压药物的合成^[27]。本研究通过建立血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽的定量构效关系(QSAR)模型,结合模型结果并辅以计算机虚拟酶切,精确掌握蛋白水解位点,筛选适合的蛋白酶来水解火麻仁蛋白,进行定向制备。本研究所建立的方法不仅提高了酶法制备降压肽的速率,也表明基于机器学习算法的建模策略来揭示食源性蛋白质开发新生物活性肽的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

火麻仁蛋白,江西省富之源生物科技有限公司;碱性蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶,索莱宝科技有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS),Sigma Aldrich 公司;邻苯二甲醛(OPA),天津市光复精细化工研究所;无水乙醇、硼酸、氯化钠、浓盐酸,天津市天力化学试剂有限公司; β -巯基乙醇,阿拉丁生化科技股份有限公司;血管紧张素转换酶(ACE)、马尿酸-组氨酰-亮氨酸(HHL)、马尿酸(HA),Sigma Aldrich 公司;十水合四硼酸钠、氢氧化钠,西陇科学有限公司;甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级),上海安谱实验科技股份有限公司;三氟乙酸(色谱级),阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;pH 计,赛多利斯仪器有限公司;高速冷冻离心机,Sigma Aldrich 公司;数显恒温磁力搅拌器,金坛市双捷实验仪器厂;数显恒温磁力搅拌水浴锅,常州赛普实验仪器厂;电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医疗器械厂;高效液相色谱仪,日本岛津公司;漩涡振荡混合器,艾卡仪器设备有限公司;紫外分光光度计,南京菲勒仪器有限公司;冷冻干燥机,德国 Martin Christ 公司;超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 建模方法 ACE 抑制肽 QSAR 模型的建立采用 4 种机器学习算法,分别是随机森林(Ran-

dom Forest Regression, RFR)、支持向量机(Support Vector Regression, SVR)、K 最邻近算法(K-Nearest Neighbor Regression, KNNR)、偏最小二乘法(Partial Least Squares Regression, PLSR)。这 4 种算法分别利用 R 语言的 randomForest、e1071、caret、pls 4 个包来建立,模型结果根据决定系数(R^2)和均方根误差(RMSE)来评价^[28]。

$$R^2=1-\frac{\sum (y_i-\hat{y}_i)^2}{\sum \sum (-\bar{y}_i)^2} \quad (1)$$

$$\text{RMSE}=\sqrt{\frac{\sum (y_i-y_0)^2}{n_s}} \quad (2)$$

式中 y_i 、 \hat{y}_i 、 \bar{y} ——分别为实际值、预测和平均值; y_0 ——模型预测值; n_s ——样本数量。

1.3.2 虚拟酶切 在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得火麻仁蛋白的 3 条麻仁球蛋白和 1 条麻仁白蛋白序列(GenBank: SNQ451591,SNQ451561,SNQ451581,SNQ451511)。利用 ExPASy Prot Param tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)计算蛋白的氨基酸组成。由该工具自动计算包括分子质量、氨基酸组成、原子组成、脂肪族指数和亲水性的均值等参数。通过 BIOPEP-UWM(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/>)预测蛋白的生物潜力,提交蛋白序列至服务器。得出结果:A 代表中生物活性片段的出现频率;B 代表的潜在生物活性。利用 ExPASy Peptide Cutter(https://web.expasy.org/peptide_cutter/)、BIOPEP-UWN 对蛋白进行虚拟酶切。结合 QSAR 建模结果及每种酶的酶切位点筛选出合适的蛋白酶进行酶切,碱性蛋白酶通过已报道过的文献中的活性位点来切割。虚拟酶切后,将氨基酸残基数小于 6 的肽段进行整理,最后利用 Peptide Ranker(<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>)对所得肽段进行潜在生物活性预测^[29]。本研究中肽段的氨基酸残基为 2~6 个,使用的是短肽预测值。提高阈值会降低真实的阳性率,因此将 Peptide Ranker 训练在 0.5 的阈值上,即任何预测超过 0.5 阈值的肽都被标记为具有生物活性。

1.3.3 ACE 抑制肽活性测定 将 2 mg 马尿酸(HA)标品溶于 10 mL 硼酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH 8.3, 含 0.3 mol/L NaCl)中配置 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的

HA 标准液,并梯度稀释 2,4,8,16,32,64,128 倍。

HPLC 检测条件为:色谱柱选用 Waters C-18 (4.6 mm×250 mm,粒径为 5 μm);流动相由 75%的含有 0.05%三氟乙酸的超纯水和 25%的色谱级乙腈组成;柱温设为 30 ℃;流速为 1 mL/min;进样量:10 μL;检测器为紫外检测器,检测波长设为 228 nm。

体外测定 ACE 抑制肽活性:ACE 能催化 HHL,生成 HA,而在加入抑制肽后产生的 HA 的量减少。将 HHL 作为反应底物,在温度为 37 ℃,pH 为 8.3 条件下,通过测定 HA 的变化量即可得出 ACE 抑制活性的大小^[30]。由于在 228 nm 的波长检测下 HA 有特征吸收峰,采用 HPLC 法检测 HA 的变化量,从而计算抑制肽的活性^[31]。样品溶解于硼酸盐缓冲液(100 mmol/L,pH 8.3,含 0.3 mol/L NaCl)中,取 20 μL 样品与 200 μL 的 HHL 充分混合,在 37 ℃水浴锅中温育 5 min 后加入 20 μL ACE 启动反应,在 37 ℃条件下继续温育 60 min,最后加入 70 μL 的 HCl(1 mol/L)终止反应。反应后的液体经过 0.45 μm 的滤膜过滤,在 Waters C-18 色谱柱上测定生成的 HA。空白组用 20 μL 的硼酸盐缓冲液代替抑制剂采用相同的处理。ACE 抑制活性(%)利用以下公式计算:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{空白}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中: $\Delta A_{\text{样品}}$ ——加入样品后的 HA 的峰面积; $\Delta A_{\text{空白}}$ ——加入抑制剂的 HA 的峰面积。

1.3.4 水解产物的制备 分别采用碱性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶对火麻仁蛋白溶液进行水解,水解时以 0.5 mol/L NaOH 维持反应体系的 pH 值,水解 240 min,每隔一段时间取 1 mL 水解液置于沸水浴中 5 min 灭酶。水解条件如表 1 所示。

表 1 蛋白酶水解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions		
蛋白酶	最适 pH 值	最适温度/℃
碱性蛋白酶	9	55
枯草杆菌蛋白酶	7	37

1.3.5 水解度的测定 水解度的测定及计算方法采用邻苯二甲醛(OPA)法。

1.3.5.1 标准曲线的制作 配制亮氨酸标准液,

稀释至不同梯度,取稀释后的标准溶液各 3 mL 与同体积的 OPA 试剂振荡混匀后计时反应 5 min,于 340 nm 测定其 OD 值,以亮氨酸浓度为横坐标,OD 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.5.2 样品水解度测定 将样品用去离子水按照一定倍数进行稀释,按照上述步骤测定其 OD 值,并依照标曲计算样品中游离氨基含量。

$$Y = \frac{A \times N}{1.317 \times X} \quad (4)$$

式中:Y——游离氨基含量,mmol/g;A——标曲中得到的亮氨酸的含量,μg/mL;N——稀释倍数;1.317——亮氨酸摩尔质量,g/mol;X——样品的蛋白含量,g/L。

水解度的计算:根据公式计算水解产物的水解度。

$$\text{DH}(\%) = \frac{Y_1 - Y_2}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (5)$$

式中:Y₁——样品水解后的游离氨基含量,mmol/g;Y₂——样品水解前的游离氨基含量,mmol/g;h_{tot}——蛋白的肽键含量。

1.4 数据统计

描述符用 WPS Office11.1.0 计算生成,并用 R(version4.1.0)进行模型的优化。试验所有测定数据均为 3 次平行试验数据。使用 Microsoft Office 2010、Origin 8.0 软件对数据进行整理和作图。

2 结果与分析

2.1 模型的选择

本试验选取 AHTPDB 数据库和已发表文献中的数据,构建了 ACE 抑制肽的数据集,每条数据包含肽段的氨基酸序列及其抑制活性。通过数据筛选,选择了 728 个独特的肽序列进行建模。将数据集随机分为两个集:训练集(75%)和测试集(25%),训练集用来计算模型,测试集作为额外的样本来验证模型的独立性和可靠性。建模过程中,选取 3 个描述符(包括 SVREW,AA index 和 VHESH-VSTPV),以及随机森林(RF)、支持向量机(SVM)、K 最邻近算法(KNN)、偏最小二乘法(PLS)4 种算法,并通过十折交叉验证建立 12 个模型。为了很好地表征肽和功能关系,采用近零方差、共线性分析、主成分分析的方法对描述符进行

过滤和筛选。由于数据的限制和肽结构的灵活性,最后2个子集(六肽及以上)的结果相对较差。其余4个子集的结果如图1所示,模型结果用决定系数(R^2)和均方根误差(RMSE)来评价。

图1a中横坐标代表3种描述符,纵坐标为决定系数(R^2)的数量值,每个描述符的4种机器学习方法用不同颜色的箱子表示。每个图代表该肽序列长度中每个描述符的4种算法性能。图1b为

每个长度肽序列的最优模型的散点图结果。由图可知在所有模型中,二肽模型在交叉验证程序中显示出最佳性能(R^2 范围从0.18到0.81);二肽的SVM-AAindex模型为最优模型,其 R^2 为0.81, RMSE为0.53。通过分析模型数据可以发现:较短的肽段比较长的肽段具有更好的模型性能,此外,rfr和svr模型均优于knnr和plsr模型。

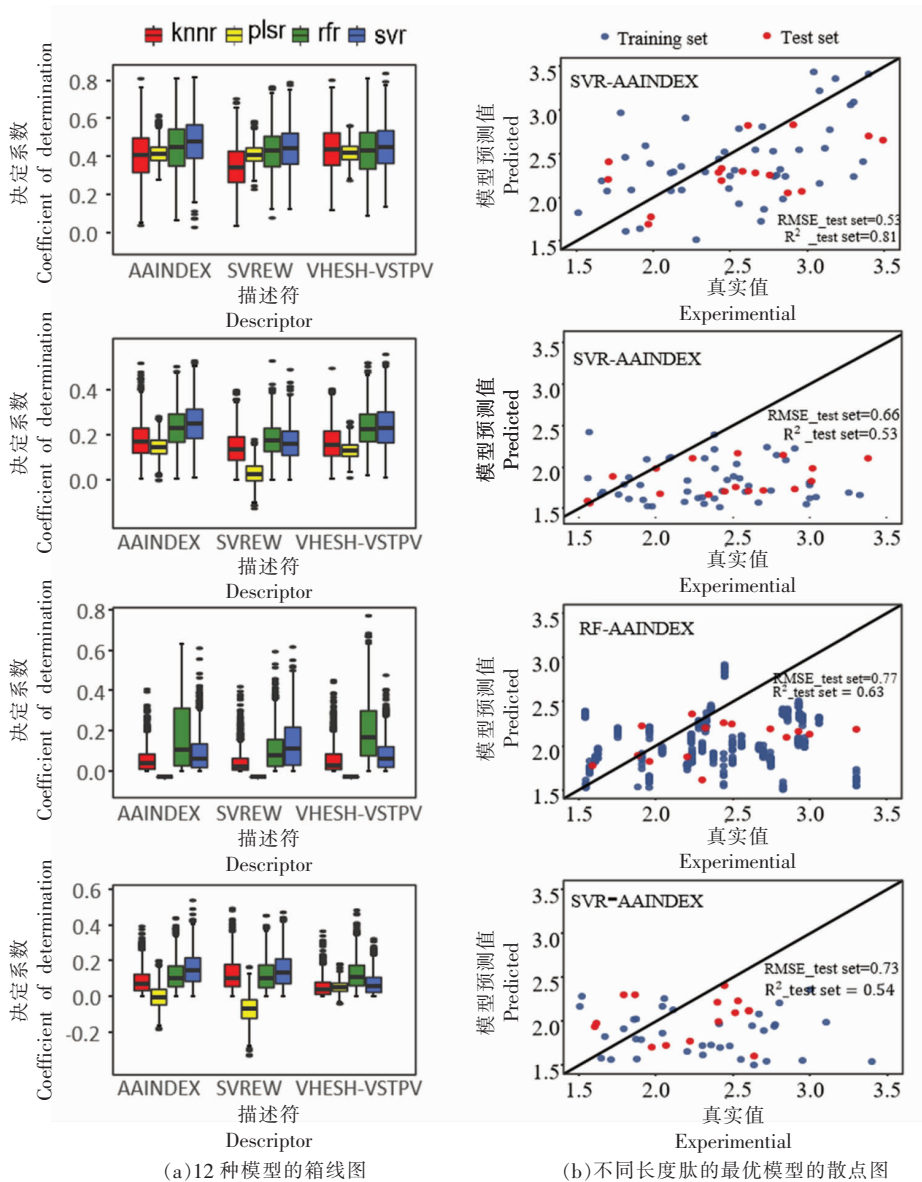


图1 模型结果图

Fig.1 Histogram of model result

2.2 模型预测结果

根据SVM-AAindex模型结果分析得出二肽

的结构与其抑制性的关系,结果如图2所示。箱线图用于显示一些重要的数据特征,通过3个四分

位数可以显示中心趋势，离散度以及最小和最大观测值。本文在箱线图中显示了二肽第二个氨基酸的平均 $\lg(\text{IC}_{50})$ 值，不同颜色代表不同类型的氨基酸(绿色表示芳香族氨基酸,红色表示脂肪族氨基酸,橙色表示酸性氨基酸,蓝色表示碱性氨基酸,粉色表示含羟基氨基酸,黄色表示含硫氨基酸,紫色表示氨基酰胺)。由图 2 可知,二肽 C 端氨基酸为疏水性氨基酸和芳香族氨基酸时 $\lg(\text{IC}_{50})$ 值较小即有较强的 ACE 抑制作用。

模型预测结果表明：二肽 C 末端的 Trp, Tyr,

Phe 对 ACE 抑制活性有很大贡献，这 3 个氨基酸属于芳香族氨基酸并且具有庞大的侧链基团。二肽 C 端氨基酸为疏水性氨基酸和芳香族氨基酸时有较强的 ACE 抑制作用。Wu 等^[30]的研究证实了在 C 末端带有 Trp, Tyr 和 Phe 的二肽会表现出高活性。一些研究报告也表明,靠近 C 末端位置的氨基酸侧链大小增加会影响 ACE 抑制潜能^[32],上述结果与本文的结论一致。本文的 QSAR 模型证实二肽 C 端氨基酸为疏水性氨基酸和芳香族氨基酸时有较强的 ACE 抑制作用。

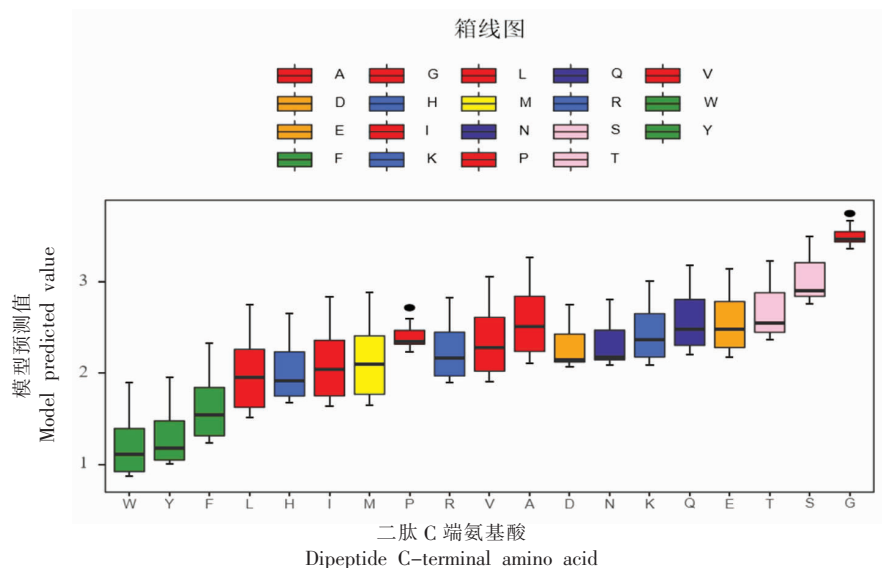


图 2 影响二肽抑制性分析图

Fig.2 Analysis of factors affecting dipeptide inhibition

2.3 蛋白组成分析

QSAR 模型结果表明蛋白中疏水性氨基酸和芳香族氨基酸的含量影响 ACE 抑制肽的制备。本

文选择近年来成为热点的火麻仁蛋白进行蛋白质的氨基酸组成分析。将蛋白序列输入 ExPASy ProtParam 中进行在线分析,结果见表 2。

表 2 蛋白质氨基酸组成分析

Table 2 Analysis of amino acid composition of proteins

氨基酸	火麻仁蛋白氨基酸组成/%	氨基酸	火麻仁蛋白氨基酸组成/%
Ala (A)	6.70	Lys (K)	2.30
Arg (R)	10.50	Met (M)	2.60
Asn (N)	6.20	Phe (F)	4.00
Asp (D)	4.30	Pro (P)	3.70
Cys (C)	2.00	Ser (S)	7.50
Gln (Q)	8.00	Thr (T)	4.10
Glu (E)	7.90	Trp (W)	0.70
Gly (G)	6.50	Tyr (Y)	2.70
His (H)	2.30	Val (V)	5.90
Ile (I)	4.60	Pyl (O)	0.00
Leu (L)	7.40	Sec (U)	0.00

根据表2统计数据可知,芳香族氨基酸和疏水性氨基酸占组成大麻仁蛋白的34.60%,根据QSAR模型中结果可知,ACE抑制活性与上述两类氨基酸含量呈正相关,从氨基酸组成分析可得大麻仁蛋白的芳香族及疏水性氨基酸占比较高,且相比于玉米醇溶蛋白等蛋白相比,大麻仁蛋白水溶性更高,更易制备水解样品,因此可以作为ACE抑制肽的蛋白源进行水解制备。

2.4 蛋白生物潜力分析

对大麻仁蛋白进行生物活性潜力分析,将蛋白序列输入BIOPEP-UWM在线软件中进行预测,结果表明大麻仁蛋白ACE抑制肽活性片段出现频率0.3995,潜在生物活性为0.01269,表明大麻仁蛋白作为ACE抑制肽蛋白来源具生物活性潜力。

2.5 蛋白酶的选择

利用ExPASy Peptide Cutter和BIOPEP-UWM在线软件对大麻仁蛋白进行虚拟酶切,ExPASy Peptide Cutter中共有29种蛋白酶可进行选择,BIOPEP-UWM有34种蛋白酶可选择,除去重复蛋白酶并根据QSAR模型结果选取了8种蛋白酶对大麻仁蛋白进行虚拟酶切。ACE抑制肽氨基酸残基数多数小于六肽,因此将每个蛋白虚拟酶切后产生的二~六肽整理统计,结果见图3。

由图3所示,每组柱状图代表肽段总数(包含单个氨基酸)及二至六肽个数,经统计,在蛋白虚拟酶切过程中,碱性蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶和木瓜蛋白酶均在8种蛋白酶中得到总肽段数和二至六肽数最多。以此为基础,本研究将上述所得的所有二至六肽在Peptide Ranker软件中进行潜在生物活性预测。输入肽段序列,得到生物活性阈值,将预测超过0.5阈值的肽都标记为具有生物活性。对具有生物活性的肽段数进行统计计算,得到表3。

由表3可得,大麻仁蛋白均能够得到较高活性的生物肽,且得率较高;胰凝乳蛋白酶水解蛋白得到生物活性肽比例最高,但因其酶切位点较少,产生肽段数较少因此不适合进行定向制备ACE抑制肽。木瓜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶水解蛋白过程中产生活性肽得率相近。为了横向对比不同蛋白在同种蛋白酶水解产生的ACE抑制肽的活

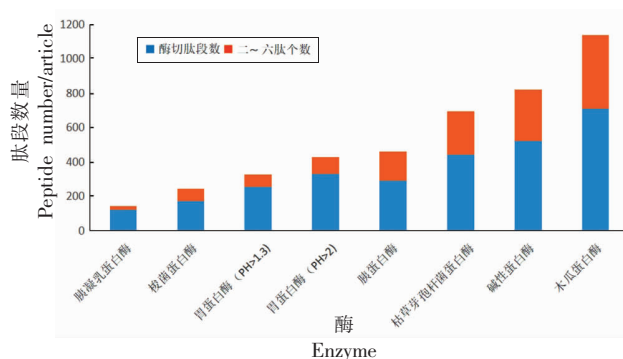


图3 虚拟酶切肽段数统计图

Fig.3 Statistics of virtual digested peptides

表3 具有生物活性肽段统计表

Table 3 Statistical table of bioactive peptides

蛋白酶种类	大麻仁蛋白生物活性肽段占比/%
胰凝乳蛋白酶	30.00
梭菌蛋白酶	19.18
胃蛋白酶(pH>1.3)	27.94
胃蛋白酶(pH>2)	21.87
胰蛋白酶	22.55
枯草杆菌蛋白酶	23.05
碱性蛋白酶	21.81
木瓜蛋白酶	23.41

性,结合实际生产中经济价格问题和已有文献报道碱性蛋白酶酶解大麻仁蛋白产物生物活性较高,本研究选择枯草杆菌蛋白酶和碱性蛋白酶进行定向制备ACE抑制肽的试验。

2.6 蛋白水解样的制备

分别选用碱性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶对大麻仁蛋白进行水解,测定水解度(DH)并绘制水解曲线,水解曲线结果见图4。由水解曲线可知,随着水解时间的增加,蛋白质的水解度逐渐增大。在水解初期,蛋白水解度增加趋势较快,随着时间推移,水解趋势逐渐变缓,到水解后期,水解度不再增加。这表明此水解条件对于这两种蛋白酶是可行的。水解度越高代表蛋白质分子中肽键断裂的数量越多,由于不同类型的蛋白酶的酶切位点不同,同种蛋白虽然所表现的水解趋势相似,但是水解程度却有差异,这是由于特异性酶的作用位点决定了水解过程中蛋白质分子肽键断裂的数量,

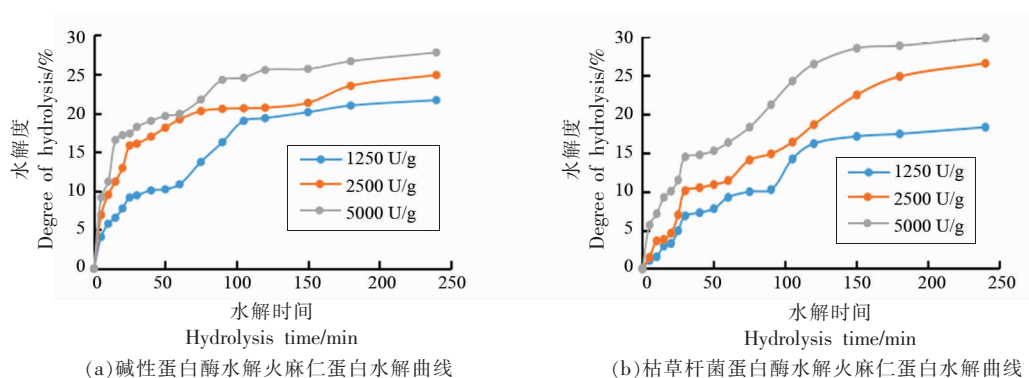


图 4 水解曲线

Fig.4 Hydrolysis curve

进一步影响水解度。根据上述水解曲线制备不同水解度的水解样品用于测定 ACE 抑制率,以便进一步研究。

2.7 火麻仁蛋白制备 ACE 抑制肽活性的测定

将碱性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶水解的火麻仁蛋白样品进行冻干。选取不同水解度的冻干样配制为质量浓度为 1 mg/mL 的样品,测定水解样的 ACE 抑制率,结果如图 5 所示。由图 5 可知,水解度为 0 的火麻仁蛋白其抑制率为 5.50%,说明未被水解的火麻仁蛋白具有 ACE 抑制活性;随着水解度的逐渐上升,火麻仁蛋白的水解样 ACE 抑制率逐渐升高。火麻仁蛋白在碱性蛋白酶的水解样在水解度为 21.94% 时 ACE 抑制率达到 33.75%;在枯草杆菌蛋白酶水解样水解度为 19.26% 时,水解样的 ACE 抑制率为 32.65%。将抑制率最高的两种水解样测定其 IC_{50} ,结果见图 6。根据图 6 中的拟合曲线计算可以得到蛋白酶水解火麻仁蛋白

制备的水解样的 IC_{50} ,具体结果见表 4。由表 4 可得:火麻仁蛋白水解样的 ACE 抑制性较低,这可能是由于火麻仁蛋白在水中溶解度较低所致。而在两种蛋白酶中,碱性蛋白酶水解火麻仁蛋白得到的样品水解度高,得到的样品能够有效抑制 ACE 的活性。

碱性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶水解位点无特异性,蛋白水解较为彻底,蛋白产生肽段较多,尤其是短肽数量多,使得产生的 ACE 抑制肽活性较强。卫萍等^[33]通过对火麻仁蛋白制备 ACE 抑制肽的条件进行探索,表明当采用碱性蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶分步酶解火麻仁蛋白时,酶解产物表现出较高的生物活性。Orio 等^[34]利用脱脂火麻仁蛋白制备 ACE 抑制肽,得到 3 条具有抑制活性的肽段,通过固相合成并测试 ACE 抑制活性得到其 IC_{50} 值为 16,145 $\mu\text{mol/L}$ 和 526 $\mu\text{mol/L}$,证实火麻仁可能是降压肽的重要来源。本试验最后将水解

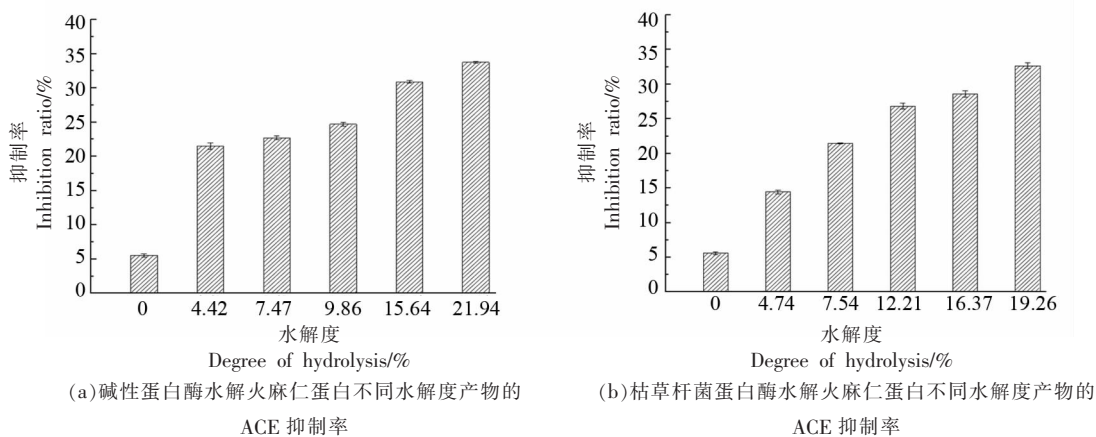
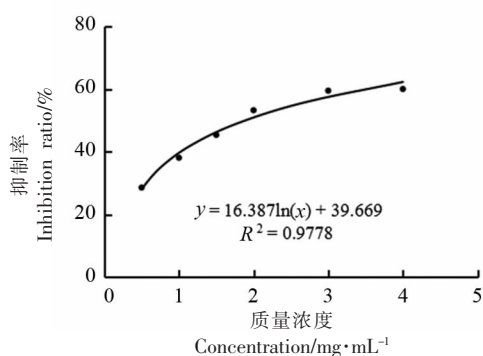
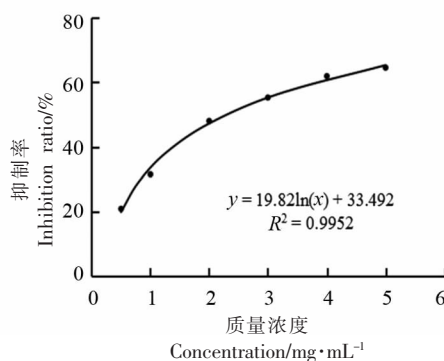


图 5 火麻仁蛋白水解产物的 ACE 抑制率

Fig.5 ACE inhibition rate of of hydrolysate of hemp seed protein



(a)碱性蛋白酶水解大麻仁蛋白产物的抑制曲线



(b)枯草杆菌蛋白酶水解大麻仁蛋白产物的抑制曲线

图6 大麻仁蛋白水解产物的抑制曲线

Fig.6 Inhibition curve of hemp seed protein hydrolysate

表4 大麻仁蛋白水解样的 IC₅₀ 值Table 4 IC₅₀ value of hemp seed protein hydrolysis sample

蛋白酶	水解度/%	IC ₅₀ /mg·mL ⁻¹
碱性蛋白酶	21.94	1.89
枯草杆菌蛋白酶	19.26	2.30

样中 ACE 抑制率最高的样品进行冻干并测定其 IC₅₀, 经试验测定得到碱性蛋白酶在水解大麻仁蛋白的过程中能够断裂较多肽键, 使得蛋白内部集团暴露, 得到较多具有生物活性的短肽, 因而 ACE 抑制性较强。

3 结论

蛋白酶水解蛋白其位点不是随机的, 而是具有一定选择性的。本文基于 QSAR 模型探究大麻仁蛋白作为 ACE 抑制肽的蛋白源的可能性, 并结合计算机虚拟酶切选择合适的蛋白酶, 对酶切后的肽段进行评估, 最终选择恰当的酶进行定向水解试验。传统酶水解制备 ACE 抑制肽过程中, 蛋白酶的选择有一定的盲目性, 而本文以 QSAR 模型结果为基础结合计算机虚拟酶切, 为制备 ACE 抑制肽做前期基础及指导, 节约时间及成本。本文证明了基于机器学习算法的建模策略用于未来天然产品开发新 ACE 抑制肽的可行性。

参 考 文 献

[1] BHAGANI S, KAPIL V, LOBO M D. Hypertension [J]. *Medicine*, 2018, 46(9): 509-515.

- [2] ANUGERAH D P, ROBERT J D, CHI-I C, et al. Screening, discovery, and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from proteolytic hydrolysate of bitter melon seed proteins[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 128(14): 424-435.
- [3] CARLENE M L, STEPHEN V H, ANTHONY R. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001[J]. *The Lancet*, 2008, 371(9623): 1513-1518.
- [4] OMOTOSO A B, KOLO P M, OLANREWAJU T O, et al. Relationship between retinopathy and renal abnormalities in black hypertensive patients[J]. *Clinical Hypertension*, 2016, 22: 19.
- [5] KEARNEY P M, WHELTON M, REYNOLDS K, et al. Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data[J]. *Lancet*, 2005, 365(9455): 217-223.
- [6] WANG Z W, CHEN Z, ZHANG L F, et al. Status of hypertension in china: Results from the china hypertension survey, 2012-2015[J]. *Circulation*, 2018, 137(22): 2344-2356.
- [7] 邢小喜. 高血压治疗药物及其方法的研究进展[J]. *保健文汇*, 2021, 22(1): 154-155.
- XING X X. Research progress of drugs and methods for the treatment of hypertension[J]. *Health Literature*, 2021, 22(1): 154-155.
- [8] PAIVA L, LIMA E, MARCONE M, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition and biological activities of green and black tea samples from Azorean *Camellia sinensis*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 107: 105701.
- [9] 余智祥, 纪佳伯, 易甫. 血管紧张素受体拮抗剂对

- 于心房颤动防治的研究进展[J]. 心脏杂志, 2019, 31(6): 714-717.
- YU Z X, JI J B, YI F. Effect of angiotensin-receptor blockers on atrial fibrillation[J]. Chinese Heart Journal, 2019, 31(6): 714-717.
- [10] CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, PIOVESANA S, et al. Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408 (11): 2677-2685.
- [11] FILIPA B P, RITA C A, PÁDRAIGÍN A H, et al. Macroalgal-derived protein hydrolysates and bioactive peptides: Enzymatic release and potential health enhancing properties[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 93(C): 106-124.
- [12] TU M L, CHENG S Z, LU W H, et al. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2018, 105(2018): 7-17.
- [13] MANIKKAM V, VASILJEVIC T, DONKOR O N, et al. A review of potential marine-derived hypotensive and anti-obesity peptides[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(1): 92-112.
- [14] THATCHER S E. A brief introduction into the Renin-Angiotensin-Aldosterone system: New and old techniques[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1614: 1-19.
- [15] LI G H, LE G W, SHI Y H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 469-486.
- [16] MIRZAPOUR M, REZAEI K, SENTANDREU M A. Identification of potent ACE inhibitory peptides from wild almond proteins[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(10): 2421-2431.
- [17] IMEN L, LETICIA M, RIM N, et al. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle[J]. Journal of Proteomics, 2015, 128(14): 458-468.
- [18] XIN L, MIANSONG Z, AIRONG J, et al. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from jellyfish *Rhopilema esculentum*[J]. Food Research International, 2013, 50(1): 339-343.
- [19] WANG S, LIN L M, WU Y N, et al. Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effects of grass carp peptides[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23 (5): 1661-1666.
- [20] HATANAKA A, MIYAHARA H, SUZUKI K I, et al. Isolation and identification of antihypertensive peptides from antarctic krill tail meat hydrolysate[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(4): 116-120.
- [21] WANG J P, HU J N, CUI J Z, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302-308.
- [22] JAE-YOUNG J, PYO-JAM P, HEE-GUK B, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(14): 1624-1629.
- [23] ALEMÁN A, GIMÉNEZ B, PÉREZ-SANTIN E, et al. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2010, 125(2): 334-341.
- [24] FRANCISCO G H C, JORGE C R R, JUAN J A F, et al. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(10): 1691-1698.
- [25] 何嘉敏, 于新, 刘学云, 等. 10 种降血压药食同源原料研究进展及展望[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2020, 33(1): 66-71.
- HE J M, YU X, LIU X Y, et al. Research progress and prospect of 10 blood pressure lowering and medicinal homologous raw materials[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2020, 33(1): 66-71.
- [26] 田娟, 李侃, 仓义鹏. 食物蛋白制备生物活性肽的酶解工艺及发展趋势[J]. 江苏食品与发酵, 2008, (4): 11-13.
- TIAN J, LI K, CANG Y P. Enzymatic hydrolysis of bioactive peptides from food protein and its development trend[J]. Jiangsu Food and Fermentation, 2008 (4): 11-13.
- [27] 杨琦, 杨许花, 杨雪妍, 等. 血管紧张素转换酶抑制肽定量构效关系研究进展[J]. 中国酿造, 2021,

- 40(6): 23–27.
- YANG Q, YANG X H, YANG X Y, et al. Research progress on quantitative structure–activity relationship of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide[J]. *China Brewing*, 2021, 40(6): 23–27.
- [28] IZADPANAH E, RIAHI S, ABBASI –RADMOGHADDAM Z, et al. A simple and robust model to predict the inhibitory activity of α –glucosidase inhibitors through combined QSAR modeling and molecular docking techniques[J]. *Molecular Diversity*, 2021, 25(3): 1811–1825.
- [29] TOMAS L, PAULA O C, MARIA H. Identification of novel dipeptidyl peptidase–IV and angiotensin–I–converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis[J]. *Peptides*, 2014, 59(2014): 53–62.
- [30] WU Q, JIA J, YAN H, et al. A novel angiotensin–I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study[J]. *Peptides*, 2015, 68: 17–24.
- [31] FELICIA H, ANDREA L. Effect of microwave–assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllosid sigillatus*) protein on ACE and DPP–IV inhibition and tropomyosin –IgG binding [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64(C): 103634.
- [32] ARE H P, TOMAS I, LESZEK S, et al. Quantitative structure–activity relationship modelling of ACE–inhibitory peptides derived from milk proteins[J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 219(6): 579–583.
- [33] 卫萍, 游向荣, 张雅媛, 等. 酶法制备大麻肽及其血管紧张素转化酶抑制活性研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(18): 127–132.
- WEI P, YOU X R, ZHANG Y Y, et al. Preparation of *Cannabis sativa* L. peptides by enzyme method and their activities of inhibiting angiotensin converting enzyme [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(18): 127–132.
- [34] ORIO L P, BOSCHIN G, RECCA T, et al. New ACE–inhibitory peptides from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(48): 10482–10488.

Preparation of ACE Inhibitory Peptide of Hemp Seed Protein Based on Quantitative Structure–Activity Relationship

Liu Mengqi^{1,2}, Liu Chang^{1,2}, Liu Bohao^{1,2}, Yin Yuqi^{1,2}, Zhang Hanlin^{1,2}, Zhang Yinghua^{1,2*}, Dong Yan^{3*}

(¹Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

²College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

³Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319, Heilongjiang)

Abstract High blood pressure is a major risk factor for cardiovascular disease, and frequent use of blood pressure medications can have side effects. Therefore, safe and efficient food–borne antihypertensive peptides have become the focus of attention. In this study, a quantitative structure–activity relationship (QSAR) model of angiotensin–converting enzyme (ACE) inhibitory peptide was established to determine the relationship between the structure and activity of ACE inhibitory peptide. The model results were combined with computer virtual enzyme digestion to determine proteolytic sites accurately. Suitable proteases were selected to hydrolyze hemp seed protein to prepare ACE inhibitory peptide, and the inhibitory effect of the final hydrolysate was determined. The results showed that the SVM–AAindex model based on dipeptide had the best predictive performance (R^2 0.81, RMSE 0.53), and had a strong ACE inhibition effect when the C–terminal amino acids of dipeptide were hydrophobic and aromatic amino acids. The analysis of protein components showed that hemp seed protein contains 34.60% hydrophobic amino acids and aromatic amino acids, which is a good source for preparing ACE inhibitory peptides. The alkaline and subtilisin, which produced more short peptides and bioactive peptides by virtual enzyme digestion, were selected for directed hydrolysis of hemp seed protein. The ACE inhibition values of the final hydrolysates were 1.89 and 2.30 mg/mL, respectively. In this study, an efficient and accurate method for preparing ACE inhibitory peptide from hemp seed protein was established, which has a good application prospect in antihypertensive drugs.

Keywords hemp seed protein; ACE inhibitory peptide; QSAR model; directed preparation