

# 南瓜籽 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰及分离鉴定

胡田媛<sup>1</sup>, 杨晨<sup>1</sup>, 陈哲<sup>2,3</sup>, 郑竟成<sup>1,3</sup>, 何东平<sup>1,3</sup>, 杨永<sup>2,3</sup>, 雷芬芬<sup>1,3</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 武汉食品化妆品检验所, 武汉 430040; 3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430040)

**摘要:**为进一步提升南瓜籽多肽的 ACE 抑制活性, 利用 Plastein 反应对南瓜籽 ACE 抑制肽进行修饰, 探究底物质量分数、反应温度、反应时间以及 3 种外源氨基酸添加量对 ACE 抑制率的影响。采用超滤和 Sephadex G-25 柱层析等分离修饰产物, 并利用 LC-MS/MS 鉴定肽序列。结果表明: Plastein 反应修饰的最佳条件为底物质量分数 45%, 反应温度 20℃, 反应时间 3 h; 分别添加亮氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸均能显著提升修饰产物的 ACE 抑制率, 其中添加 0.5 mmol/g 亮氨酸时, 修饰产物的 ACE 抑制率最高, 比修饰前提高了 24.50 个百分点; 经超滤和 Sephadex G-25 柱层析分离, 获得 ACE 抑制率达 89.61% 的组分, 经 LC-MS/MS 鉴定出 76 个肽段, 固相合成其中 4 种多肽 IFH、IFF、LAAF、DFHPR, 其抑制 ACE 的 IC<sub>50</sub> 分别为 1.55、2.24、3.79 mmol/L 和 7.86 mmol/L。综上所述, Plastein 反应修饰可显著改善南瓜籽 ACE 抑制肽的 ACE 抑制活性, 经超滤和 Sephadex G-25 柱层析分离, 可获得高 ACE 抑制活性的南瓜籽 ACE 抑制肽。

**关键词:**南瓜籽; ACE 抑制肽; Plastein 反应; 分离鉴定

中图分类号: TS222+.1; TS229 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)02-0029-07

## Plastein reaction modification of pumpkin seed ACE inhibitory peptide and its isolation and identification

HU Tianyuan<sup>1</sup>, YANG Chen<sup>1</sup>, CHEN Zhe<sup>2,3</sup>, ZHENG Jingcheng<sup>1,3</sup>, HE Dongping<sup>1,3</sup>, YANG Yong<sup>2,3</sup>, LEI Fenfen<sup>1,3</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430040, China; 3. Key Laboratory of Edible Oil Quality and Safety for State Market Regulation, Wuhan 430040, China)

**Abstract:** Plastein reaction was applied to modify pumpkin seed polypeptide to further enhance its ACE inhibitory activity. The effects of substrate mass fraction, reaction temperature, reaction time, and the addition of three exogenous amino acids on the inhibition rate of ACE inhibitory peptides were studied. The modified products were separated by ultrafiltration and Sephadex G-25 column chromatography, and were identified by LC-MS/MS. The results showed that the optimal conditions for Plastein reaction modification were substrate mass fraction 45%, reaction temperature 20℃, and reaction time 3 h. Adding leucine, phenylalanine or glycine respectively could significantly increase the ACE inhibition rate of the modified products. When 0.5 mmol/g leucine was added, the ACE inhibition rate of the modified product was up to 24.50 percentage points higher than that before the modification. After ultrafiltration and Sephadex G-25 column chromatography separation, the fraction with 89.61% ACE inhibition rate

was obtained. A total of 76 peptides was identified by LC-MS/MS, and 4 of them with IFH, IFF, LAAF and DFHPR were synthesized by solid phase, and their IC<sub>50</sub> for ACE inhibition were 1.55, 2.24, 3.79 mmol/L and 7.86 mmol/L, respectively. In summary, Plastein reaction can

收稿日期: 2021-11-24; 修回日期: 2022-10-10

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20191603)

作者简介: 胡田媛(2000), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白(E-mail)461032682@qq.com。

通信作者: 雷芬芬, 讲师, 博士(E-mail)fiona\_lei@126.com。

significantly improve the ACE inhibitory activity of pumpkin seed ACE inhibitory peptide, and the pumpkin seed ACE inhibitory peptide with high ACE inhibitory activity can be separated by ultrafiltration and Sephadex G-25 column chromatography.

**Key words:** pumpkin seed; ACE inhibitory peptide; Plastein reaction; isolation and identification

南瓜(*Cucurbita* spp.)属葫芦科南瓜属中的一年生蔓性草本植物,种植范围广,具有降血糖、降血脂、抗氧化、抗癌等作用<sup>[1]</sup>。南瓜籽中含有丰富的营养物质,包括脂类、蛋白质、粗纤维、维生素等<sup>[2-3]</sup>,其中蛋白质含量约为30%。近些年来,我国南瓜籽的加工利用主要是制作炒货瓜子及制备南瓜籽油<sup>[4]</sup>,而南瓜籽饼粕是南瓜籽油加工副产物,其产量也逐年提高。南瓜籽饼粕经处理后得到的南瓜籽蛋白粉中蛋白质含量可达60%左右,南瓜籽蛋白不仅含有人体生命活动所必需的氨基酸<sup>[5]</sup>,而且具有很好的安全性。在目前饼粕蛋白资源的综合开发利用日益广泛的大背景下,加快南瓜籽蛋白的开发利用可丰富优质植物蛋白资源的供给。

血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)又称为肽基二肽酶A,可导致机体血压升高,现已在多种饼粕蛋白源中成功分离出具有ACE抑制活性的多肽。Plastein反应又称类蛋白反应或塑蛋白反应,可改善蛋白质的功能性质、营养价值,还可用于生物活性肽的修饰,提高蛋白质水解物的ACE抑制活性、抗氧化能力等,显示出新的应用价值。目前,Plastein反应已用于改善海地瓜<sup>[6]</sup>、马铃薯<sup>[7]</sup>、牡蛎<sup>[8]</sup>等酶解产物的ACE抑制活性。根据何海艳<sup>[9]</sup>、Vastag<sup>[10]</sup>等的报道,南瓜籽多肽的研究主要集中于活性肽的制备工艺及抗氧化、ACE抑制活性等方面,而关于南瓜籽多肽修饰的研究相对较少,应用Plastein反应修饰南瓜籽多肽的研究未见报道。

本研究通过Plastein反应修饰南瓜籽ACE抑制肽,考察底物质量分数、反应温度、反应时间和3种外源氨基酸(亮氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸)对Plastein反应的影响,以期进一步提升南瓜籽多肽的ACE抑制活性。同时,对修饰产物进行分离纯化、鉴定,并合成部分多肽验证其ACE抑制活性,以期为南瓜籽蛋白资源的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

脱脂南瓜籽粕(蛋白质含量56.10%),宝得瑞(湖北)健康产业有限公司提供;碱性蛋白酶(酶活

力 $2 \times 10^5$  U/g),江苏锐阳公司;N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酰-甘氨酸-甘氨酸(FAPGG)、ACE、乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、二硫苏糖醇(DTT,分析纯)、碘乙酰胺(IAA,分析纯),美国Sigma公司;HPS-3超滤膜(3 kDa),上海摩速公司;Sephadex G-25葡聚糖凝胶,美国GE公司;其他均为分析纯试剂。

#### 1.1.2 仪器与设备

LB941酶标仪,德国Berthold公司;TDZ5-WS台式离心机;HH-6型数显恒温水浴锅;层析柱( $\phi 1.6 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ );CBS-B全自动部分收集器、DHL电脑恒流泵,上海嘉鹏公司;Ultimate 3000毛细管高效液相色谱仪、Q Exactive<sup>TM</sup> Hybrid Quadrupole-Orbitrap<sup>TM</sup> Mass Spectrometer电喷雾-组合型离子阱Orbitrap质谱仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;UV-2450紫外分光光度计,日本岛津公司;FD-8型冷冻干燥机。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 南瓜籽ACE抑制肽的制备

参考杨晨等<sup>[11]</sup>的方法提取南瓜籽蛋白并制备ACE抑制肽。称取球磨处理6 min后的南瓜籽蛋白,用蒸馏水溶解,调节底物质量浓度为0.08 g/mL, pH为8.5,加入南瓜籽蛋白质量2%的碱性蛋白酶,在55℃水浴锅中酶解10 h。酶解结束后,沸水浴15 min灭酶。冷却后离心,取上清液冷冻干燥即为南瓜籽ACE抑制肽。

### 1.2.2 南瓜籽ACE抑制肽的Plastein反应修饰

称取一定量的南瓜籽ACE抑制肽,用蒸馏水溶解,调节底物质量分数, pH为8.5,加入南瓜籽ACE抑制肽质量2%的碱性蛋白酶,在一定温度水浴锅中反应一定时间。反应结束后,沸水浴15 min灭酶。冷却后离心15 min,取上清液即为Plastein反应修饰产物。

### 1.2.3 南瓜籽ACE抑制肽Plastein反应修饰产物的分离

超滤分离:将南瓜籽ACE抑制肽Plastein反应修饰产物加适量蒸馏水进行稀释,然后选取截留分子质量为3 kDa的超滤膜配合超滤设备对酶解液进行分离,得到分子质量大于或等于3 kDa和小于

3 kDa 的超滤液。

Sephadex G-25 柱层析分离:用 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶对分子质量小于 3 kDa 的超滤液进一步分离。利用 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶使其充分溶胀,溶胀完成后,倒入抽滤瓶中进行抽滤,重复 3 次,脱气后,再通过层析柱进行洗脱。用酶标仪在 280 nm 波长处检测每管的吸光度,并绘制洗脱曲线,将不同洗脱峰组合并收集起来,进行旋蒸和冷冻干燥得到各组分样品,再测定各组分的 ACE 抑制活性。

#### 1.2.4 ACE 抑制率的体外检测

用 0.1 mol/L 的硼酸缓冲液配制 0.1 mol/L 的 FAPGG 溶液和 0.1 U/mL 的 ACE 溶液<sup>[12]</sup>,固体样品稀释成质量浓度为 1 mg/mL。按照表 1 在 96 孔板上添加各溶液,在 340 nm 波长处借助酶标仪测定样品孔和空白孔的吸光度  $A_1$  和  $B_1$ ,于 37 °C 恒温反应 30 min 后再次测定吸光度  $A_2$  和  $B_2$ 。ACE 抑制率 ( $Y$ ) 按公式(1)计算。

$$Y = \left( 1 - \frac{A_1 - A_2}{B_1 - B_2} \right) \times 100\% \quad (1)$$

表 1 ACE 抑制率的测定  $\mu\text{L}$

添加物	样品孔	空白孔
ACE	20	20
FAPGG	100	100
样品	40	0
硼酸缓冲液	0	40

#### 1.2.5 游离氨基酸含量的测定

游离氨基酸含量的测定采用邻苯二甲醛 (*o*-phthalaldehyde, OPA) 法<sup>[13-14]</sup>,并略有改动。配制质量浓度分别为 0、10、20、30、40、50  $\mu\text{g/mL}$  的 *L*-亮氨酸溶液,取 2 mL 不同质量浓度的 *L*-亮氨酸溶液与 4 mL OPA 试剂混合,混匀后在室温下准确反应 5 min,于 340 nm 处测其吸光度,以 *L*-亮氨酸质量浓度 ( $x$ ) 为横坐标,吸光度 ( $y$ ) 为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程  $y = 0.0188x + 0.0538$ ,  $R^2 = 0.9979$ 。将待测样品稀释后,在相同条件下测定吸光度,用蒸馏水作空白,通过标准曲线回归方程计算样品中的游离氨基酸含量。

#### 1.2.6 LC-MS/MS 鉴定南瓜籽 ACE 抑制肽序列

采用 LC-MS/MS 对 1.2.3 中分离纯化后的高活性组分进行分离鉴定。将样品进行 66 min 梯度洗脱,流速为 600 nL/min。MS 条件:ESI<sup>+</sup> 模式,分离出的前 20 个肽信号 (电荷态  $\geq +1$ ) 母离子通过高能碰撞 (HCD) 破碎;标准化碰撞能 (NCE) 28.0;

毛细管温度 320 °C;喷雾电压 2 300 V;子离子在分辨率为 17 500 (AGC 1e5) 的轨道上测量。利用 Byonic 软件对样品中的多肽进行序列分析。分析得到的多肽序列由上海楚肽科技有限公司进行固相合成,多肽纯度大于或等于 98%,并对合成后多肽的 ACE 抑制活性进行检测。

#### 1.2.7 数据处理

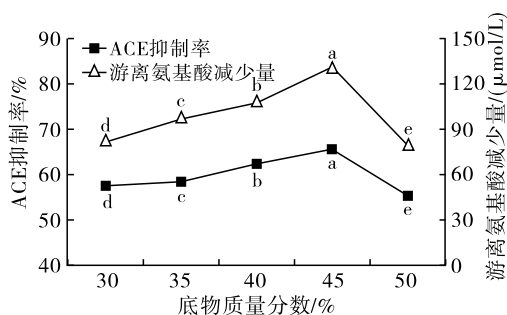
运用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析 (ANOVA),不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。应用 Origin 8.5 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 南瓜籽 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰单因素实验

#### 2.1.1 底物质量分数的影响

在反应温度 30 °C、反应时间 2 h 条件下,考察底物质量分数对 Plastein 反应修饰产物的影响,结果见图 1。



注:游离氨基酸减少量为 Plastein 反应前后游离氨基酸含量差值;同一指标不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。下同

图 1 底物质量分数对 Plastein 反应修饰产物的影响

由图 1 可以看出,南瓜籽 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰产物的 ACE 抑制率和游离氨基酸减少量都呈先上升后下降的趋势,均在底物质量分数为 45% 时最大。已有研究表明,Plastein 反应修饰产物产率最大的底物质量分数在 20% ~ 50%<sup>[15]</sup>。底物质量分数过大时,具有黏性的反应混合物可能会阻碍蛋白酶催化合成的效率,蛋白酶更容易催化修饰产物重新发生水解反应<sup>[7]</sup>,导致修饰产物的生成量减少,从而使得 ACE 抑制率和游离氨基酸减少量降低。底物质量分数过低时,Plastein 反应修饰产物的 ACE 抑制率和游离氨基酸减少量处于较低水平。因此,本研究选择最佳的底物质量分数为 45%。

#### 2.1.2 反应温度的影响

在底物质量分数 30%、反应时间 2 h 条件下,考察反应温度对 Plastein 反应修饰产物的影响,结果见图 2。

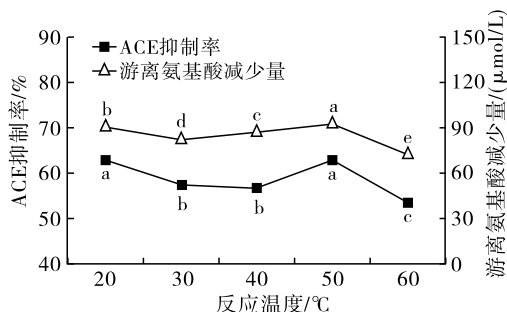


图2 反应温度对 Plastein 反应修饰产物的影响

Plastein 反应是放热反应,因而较低的温度有利于反应的进行。由图 2 可以看出,在反应温度为 20 °C 和 50 °C 时,南瓜籽 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰产物的 ACE 抑制率和游离氨基酸减少量都呈现较高水平,且此时 ACE 抑制率无显著差异 ( $p > 0.05$ )。高丹丹等<sup>[16]</sup>研究的泥鳅蛋白 ACE 抑制肽 Plastein 反应的最适温度为 35 °C,马铃薯蛋白 ACE 抑制肽 Plastein 反应的最适温度为 42 °C<sup>[7]</sup>,张可佳<sup>[14]</sup>研究的牡蛎 ACE 抑制肽 Plastein 反应的最适温度为 60 °C。考虑到碱性蛋白酶的热稳定性和 Plastein 反应的速率,本研究选择最佳的反应温度为 20 °C。

### 2.1.3 反应时间的影响

在底物质量分数 30%、反应温度 30 °C 条件下,考察反应时间对 Plastein 反应修饰产物的影响,结果见图 3。

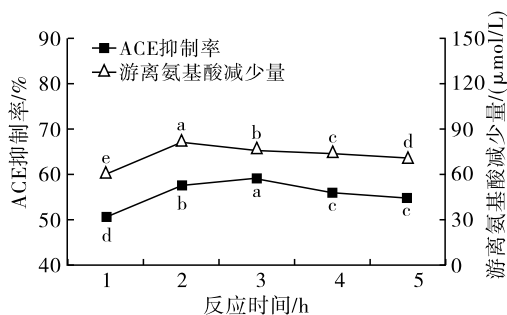


图3 反应时间对 Plastein 反应修饰产物的影响

由图 3 可以看出:当反应时间从 1 h 延长到 3 h 时,南瓜籽 ACE 抑制肽 Plastein 反应修饰产物的 ACE 抑制率显著增大,在 3 h 时达到最大值 (59.10%),当反应时间继续延长时,ACE 抑制率呈下降趋势;南瓜籽 ACE 抑制肽 Plastein 反应修饰产物的游离氨基酸减少量随反应时间的变化趋势与 ACE 抑制率相同,都呈现先增加后减少的趋势,在反应时间为 2 h 时,游离氨基酸减少量最大,为 81.55  $\mu\text{mol/L}$ 。在高丹丹<sup>[7]</sup>、张可佳<sup>[14]</sup>、石晓梅<sup>[17]</sup>等的研究中,反应时间对 Plastein 反应修饰产物 ACE 抑制率和游离氨基酸减少量的影响与本研究

结果一致,均呈先增加后降低的趋势。这表明反应时间过长将使修饰产物分子变大,从而影响其 ACE 抑制活性。因此,本研究选择最佳的反应时间为 3 h。

### 2.2 添加外源氨基酸对 Plastein 反应修饰产物的影响

ACE 抑制肽的结构、肽链长度、氨基酸组成等都会影响其活性,ACE 抑制肽与 ACE 活性部位的结合受 ACE 抑制肽 C 端氨基酸的影响<sup>[18]</sup>。研究表明,N 端为疏水性的异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、甘氨酸 (Gly) 或碱性氨基酸的肽与 ACE 结合能力较强,对 ACE 的抑制活性相对较高,但是脯氨酸 (Pro) 除外;而 C 端为含有芳香环的氨基酸苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 的 ACE 抑制肽具有较强的 ACE 抑制活性<sup>[19-20]</sup>。因此,本实验选取了亮氨酸 (Leu)、苯丙氨酸 (Phe) 和甘氨酸 (Gly) 这 3 种氨基酸,在底物质量分数 45%、反应温度 20 °C、反应时间 3 h 的条件下,通过添加上述 3 种外源氨基酸进行 Plastein 反应,考察亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸的添加量对 Plastein 反应修饰产物 ACE 抑制活性的影响,结果如图 4 所示。

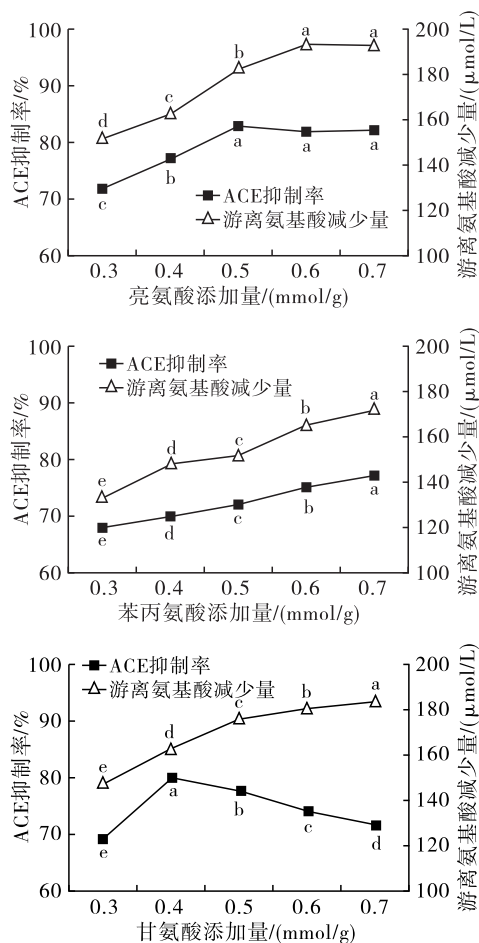


图4 外源氨基酸的添加量对 Plastein 反应修饰产物的影响

由图4可以看出,加入3种外源氨基酸后,南瓜籽ACE抑制肽的Plastein反应修饰产物的游离氨基酸减少量都显著增大( $p < 0.05$ )。随着亮氨酸添加量的增大,修饰产物的ACE抑制率呈现先增大后平缓的趋势,添加量为0.5 mmol/g时达到最大值。随着苯丙氨酸添加量的增大,修饰产物的ACE抑制率显著增大,添加量为0.7 mmol/g时达到最大值。随着甘氨酸添加量的增大,修饰产物的ACE抑制率先增大后减小,添加量为0.4 mmol/g时达到最大值。这是由于外源氨基酸添加量过少时,反应程度不够,影响反应效果;加入比例过高时,则可能造成Plastein反应修饰产物的合成量增大并聚合成大分子颗粒物质,从而降低了修饰产物的ACE抑制活性。Yue等<sup>[21]</sup>的研究中,外源氨基酸添加量对Plastein反应修饰产物的影响及变化趋势与本研究结果相似。因此,本研究选择亮氨酸添加量为0.5 mmol/g,苯丙氨酸添加量为0.7 mmol/g,甘氨酸添加量为0.4 mmol/g。

### 2.3 Plastein反应验证实验

将未进行Plastein反应修饰的南瓜籽ACE抑制肽设为第1组,经Plastein反应修饰但不添加外源氨基酸的修饰产物设为第2组,添加0.5 mmol/g亮氨酸、0.7 mmol/g苯丙氨酸及0.4 mmol/g甘氨酸的Plastein反应修饰产物分别设为第3、4、5组,将5组修饰产物进行冷冻干燥,测定5组冻干样品的ACE抑制率,结果如图5所示。

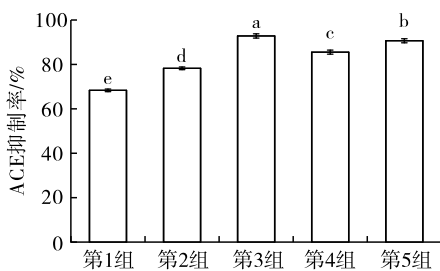
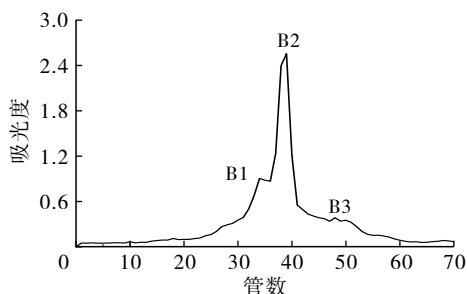


图5 Plastein反应验证实验



a) Sephadex G-25凝胶色谱洗脱图

由图5可以看出,南瓜籽ACE抑制肽经过Plastein反应修饰后其ACE抑制率都显著增大( $p < 0.05$ ),这表明Plastein反应能够有效提高修饰产物的ACE抑制活性。在Plastein反应体系中添加外源氨基酸(亮氨酸、苯丙氨酸和甘氨酸)进一步提升了修饰产物的ACE抑制活性( $p < 0.05$ ),其中添加亮氨酸的Plastein反应修饰产物的ACE抑制率最高,为92.82%,比未经Plastein反应修饰的南瓜籽ACE抑制肽提高了24.50个百分点,比在相同制备条件下不添加氨基酸的修饰产物提高了14.57个百分点。

### 2.4 南瓜籽ACE抑制肽Plastein反应修饰产物的分离

将2.3中第2组实验得到的Plastein反应修饰产物按1.2.3方法进行超滤分离得到2个组分A1(小于3 kDa)和A2(大于或等于3 kDa),测定其ACE抑制率,结果如图6所示。

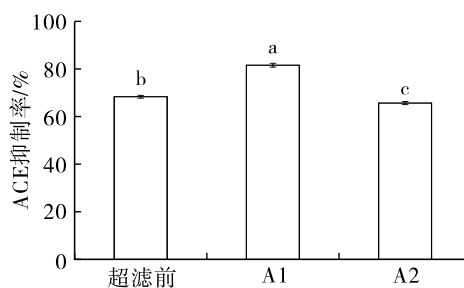
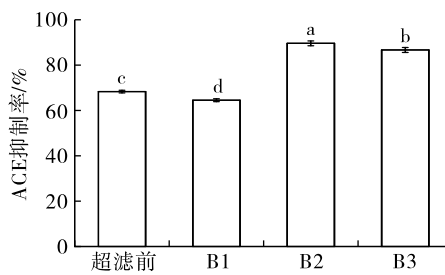


图6 超滤前后不同组分的ACE抑制活性

由图6可以看出,组分A1展现出最大的ACE抑制活性,ACE抑制率达到81.57%,显著高于粗酶解液和组分A2( $p < 0.05$ )。这也初步说明酶解液中ACE抑制活性较强的肽段分子质量集中在3 kDa以下。因此,选择A1组分进行下一步的分离纯化。

通过Sephadex G-25凝胶柱进一步分离分子质量小于3 kDa的超滤液,得到3个组分B1、B2、B3,测定其ACE抑制率,结果如图7所示。



b) 不同组分的ACE抑制活性

图7 Sephadex G-25柱层析分离纯化

由图7可以看出,组分B2具有最高的ACE抑制活性,ACE抑制率达到89.61%,显著高于其他组

分( $p < 0.05$ )。上述结果表明高活性的ACE抑制肽集中在分子质量较小(分子质量越大的物质洗脱时

间越短<sup>[22]</sup>)的组分中,经过 Sephadex G-25 柱层析分离纯化后,修饰产物的 ACE 抑制活性得到大幅度提升,但 ACE 抑制活性不只与分子质量有关,氨基酸组成和肽的空间结构等均对肽活性有所影响。因此,收集组分 B2 进行下一步的结构鉴定。

## 2.5 LC-MS/MS 测定肽序列

对 B2 组分进行 LC-MS/MS 鉴定,共获得 76 个肽段,如表 2 所示。

表 2 南瓜籽 ACE 抑制肽的序列鉴定

序号	肽段序列
1~5	VFH,LGF,YII,ITF,YTL
6~10	IYS,EFT,LYK,IFH,IHF
11~15	IYE,LFP,INY,FIR,IFN
16~20	VNF,FYS,SFY,FLY,PHL
21~25	DWL,LFH,NLH, YTNAPRL,AHWTY
26~30	DFHPR,DFHPRAF,NYHNLPF,YHNLPLF,HNLPLF
31~35	VYV,VLY,LYQ,YMV,IFF
36~40	VYL,TFR,YET,LFY,VPH
41~45	FIH,LFHGVLP,LWIPA,NFYPA,LAMLSSAF
46~50	LYPPIDR,TYGQPR,LLPIYLFATPA,NAPVAVLY,VYIDHFPF
51~55	LNLPF,WEVPRSRSM [+ 15.995] PRGESGGHT,SDQGHWR,TYTTLVH,TYFRRY
56~60	LAQIHQELLF,WEVMLAVWMGTQADESF, LFD,ITW,IFM [+ 15.995]
61~65	YFS,IGY,IAW,LIGF,IFC [+ 57.021]
66~70	EEH,TFF,LHY,FGH,FGNI
71~75	LAAF,IFPPS,VC [+ 57.021]GVW,LDF,LFKYEIT
76	FTPC [+ 57.021]FR

固相合成的 4 种多肽氨基酸序列分别为 IFH、IFF、LAAF、DFHPR,它们的分子质量分别为 416.23、426.24、421.25 Da 和 671.33 Da。选择这 4 种肽的原因有以下 4 点:①质谱仪对鉴定出来的肽段序列打分中,这 4 种肽段的打分相对较高,具有较高的可信度。②体外 ACE 抑制活性的肽序列常常表现出以下两种特征,N 端为疏水性氨基酸,尤其是包含有脂链的氨基酸(Gly、Ile、Leu)或碱性氨基酸[精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)];C 端包含有芳香环的氨基酸(Phe、Tyr、Trp)或脯氨酸(Pro)<sup>[23]</sup>,而且食源性 ACE 抑制肽多为含 2~12 个氨基酸残基的寡肽。而这 4 种氨基酸序列的结构特征表现为 N 端含有 Gly、Ile、Leu 等疏水性氨基酸,C 端含有芳香环的氨基酸或 Pro,因此可能表现出高的 ACE 抑制活性。③碱性蛋白酶能够对 Phe、Leu、Trp 和 Tyr 链接肽键的 C 末端进行酶切,其酶解产物的 C 末端通

常带有疏水性氨基酸,该结构是很多高活性 ACE 抑制肽的特征结构<sup>[24]</sup>。这 4 种氨基酸不属于碱性氨基酸,都属于含非极性和疏水基团的氨基酸,其酶解产物通常带有疏水基团,是高活性 ACE 抑制肽的结构。④南瓜籽蛋白中 Arg 含量较高,因而选择了含 Arg 的多肽 DFHPR,南瓜籽蛋白中还包括 Ala、Val、蛋氨酸(Met)、Phe、Ile、Leu、Pro 等疏水性氨基酸<sup>[25]</sup>,因此选择的 4 种多肽段中所含氨基酸都是南瓜籽蛋白中含量较高的。将这 4 种多肽的序列输入多个活性肽数据库(例如:BioPepDB, <http://bis.zju.edu.cn/biopepdr/index.php>; EROP - Moscow, <http://erop.inbi.ras.ru/index.html>; Plant Peptide Database, <http://14.139.61.8/PlantPepDB/index.php>),均未发现与其相同的降压肽序列,表明是新的南瓜籽 ACE 抑制肽。

## 2.6 南瓜籽多肽的合成及 ACE 抑制活性的测定

通过固相合成技术获得的 4 种多肽 IFH、IFF、LAAF、DFHPR,最终目标肽的纯度都达到 98% 以上。对这 4 种多肽的 ACE 抑制活性进行测定,结果见表 3。

表 3 合成肽的 ACE 抑制活性 mmol/L

肽序列	IC <sub>50</sub>	肽序列	IC <sub>50</sub>
IFH	1.55	LAAF	3.79
IFF	2.24	DFHPR	7.86

由表 3 可以看出,4 种多肽均有 ACE 抑制活性,其中 IFH 的 ACE 抑制活性最高,IC<sub>50</sub>为 1.55 mmol/L,此结果与何海艳等<sup>[9]</sup>研究的 ACE 抑制肽功效关系高度一致,其从南瓜籽蛋白水解物中得到的 9 种 ACE 抑制肽 IC<sub>50</sub> 范围在 0.17~16.57 mmol/L。Zhang 等<sup>[26]</sup>从小麦面筋蛋白水解物得到的 2 种 ACE 抑制肽 SAGGYIW 和 APATPSFW,IC<sub>50</sub> 分别为 0.002 mg/mL 和 0.036 mg/mL; Bhaskar 等<sup>[27]</sup>从马豆粉中得到的 ACE 抑制肽 TVGMTAKF 和 QLLLQQ,IC<sub>50</sub> 分别为 30.3 μmol/L 和 75.0 μmol/L。对比表明,从南瓜籽多肽中合成的 4 种多肽的 ACE 抑制活性属于中等水平,后续可继续加强南瓜籽 ACE 抑制肽的鉴定与研究。

## 3 结论

碱性蛋白酶催化的 Plastein 修饰反应可显著改善南瓜籽 ACE 抑制肽的 ACE 抑制活性。分别添加 0.5 mmol/g 亮氨酸、0.7 mmol/g 苯丙氨酸或 0.4 mmol/g 甘氨酸均可进一步提高 Plastein 反应修饰产物的 ACE 抑制活性,在最优反应条件下添加亮氨酸的 Plastein 反应修饰产物的 ACE 抑制率最高,可达

92.82%。Plastein 反应修饰产物经超滤及 Sephadex G-25 柱层析分离后,通过 LC-MS/MS 分析鉴定活性最高的组分氨基酸序列,从固相中合成了 4 种新的南瓜籽 ACE 抑制肽即 IFH、IFF、LAAF、DFHPR,其 IC<sub>50</sub>分别为 1.55、2.24、3.79、7.86 mmol/L。

#### 参考文献:

- [1] 贾晓军,王和平,岳青,等. 鲜食南瓜组合农艺性状与产量的相关性分析[J]. 北方园艺,2019(3):22-28.
- [2] 王丽波,程龙,徐雅琴,等. 南瓜籽多糖热水提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 农业工程学报,2016,32(9):284-290.
- [3] 李晓宁,薛雅琳,郭咪咪,等. 南瓜籽制油工艺研究进展[J]. 粮油食品科技,2018,26(4):17-21.
- [4] 唐蔚,宁奇,孙培冬. 南瓜籽抗氧化肽的制备及分离纯化[J]. 中国油脂,2016,41(2):20-24.
- [5] 张妮. 南瓜籽蛋白及多肽制备的研究[D]. 武汉:武汉轻工大学,2019.
- [6] 沈晴晴,曾名湧,赵元晖. 类蛋白反应修饰海地瓜酶解物及 ACE 抑制肽的制备[J]. 高等学校化学学报,2014,35(5):965-970.
- [7] 高丹丹,马忠仁,热孜万古力·赛买提,等. 马铃薯蛋白 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰研究[J]. 食品与机械,2018,34(2):6-10,82.
- [8] 韩青,周丽杰,李智博,等. 酶法制备联合 Plastein 反应修饰牡蛎 ACE 抑制肽工艺优化[J]. 食品科学,2017,38(6):104-110.
- [9] 何海艳,刘梦婷,杨爱萍,等. 南瓜籽蛋白源血管紧张素转化酶抑制肽的制备及其降血压活性[J]. 食品科学,2021,42(23):214-220.
- [10] VASTAG Z, POPOVIC L, POPOVIC S, et al. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate[J]. Food Chem, 2011, 124(4):1316-1321.
- [11] 杨晨,孔凡,雷芬芬,等. 球磨辅助酶解制备南瓜籽 ACE 抑制肽[J]. 中国油脂,2021,46(9):22-27.
- [12] 罗鹏. 葵花籽 ACE 抑制肽的分离纯化、结构分析与稳态化研究[D]. 武汉:华中农业大学,2018.
- [13] 周丽杰. 牡蛎 ACE 抑制肽的分离鉴定及性质研究[D]. 辽宁大连:大连海洋大学,2017.
- [14] 张可佳. 牡蛎 ACE 抑制肽的制备工艺及活性研究[D]. 辽宁大连:大连海洋大学,2019.
- [15] 苏亚文,魏婉璐,赵前程,等. 类蛋白反应研究进展[J]. 广州化工,2019,47(15):25-27,37.
- [16] 高丹丹,程浩,马忠仁,等. 泥鳅蛋白抗氧化肽的 Plastein 反应修饰研究[J]. 浙江农业学报,2018,30(8):1312-1320.
- [17] 石晓梅,车丽辉,董秀芳,等. 沙蚕蛋白酶解物类蛋白反应修饰及其生物活性[J]. 大连工业大学学报,2016,35(6):403-406.
- [18] 车丽辉. 沙蚕蛋白酶解肽的制备及其生物活性研究[D]. 辽宁大连:大连工业大学,2015.
- [19] TOOPCHAM T, MES J J, WICHERS H T, et al. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins[J]. Food Chem,2017,220:190-197.
- [20] 刁静静,王凯凯,张丽萍,等. 模拟移动床色谱分离纯化绿豆 ACE 抑制肽[J]. 中国食品学报,2017,17(9):142-150.
- [21] YUE N, LI T J, ZHAO X H. The impact of extrinsic amino acids and solvent fractionation on the in vitro antioxidant activity of plastein reaction-stressed casein hydrolysates[J]. Food Technol Biotech, 2013, 51(2):224-232.
- [22] 邹基豪. 绿豆 ACE 抑制肽的纯化及功能特性研究[D]. 吉林吉林:吉林农业大学,2018.
- [23] 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.
- [24] 侯成杰,聂彩清,王彦茜,等.  $\alpha$ -乳白蛋白源 ACE 抑制肽快速筛选及验证[J]. 食品科学,2021,42(24):100-107.
- [25] 王培宇. 南瓜籽多肽制备及其抗衰老作用研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2020.
- [26] ZHANG P, CHANG C, LIU H J, et al. Identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate by the protease of *Pseudomonas aeruginosa* [J/OL]. J Funct Foods, 2020, 65: 103751 [2021-11-24]. <https://doi.org/10.1016/j.jft.2019.103751>.
- [27] 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]. LWT - Food Sci Technol, 2019,103:155-161.