

羊乳清蛋白 ACE 及 DPP-IV 抑制肽的分离纯化与鉴定

张宇琪¹ 高嵩¹ 李倩¹ 张岩春² 戴智勇² 罗永康^{1*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;

2. 澳优乳业(中国)有限公司,长沙 410200)

摘要 使用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶对羊乳清蛋白进行水解,分别在不同时间取样,体外测定其 ACE 抑制活性和 DPP-IV 抑制活性。通过中空纤维膜超滤、凝胶过滤层析和反向高效液相色谱(RP-HPLC)的手段对酶解产物进行逐步分离和纯化,评价各级分离产物的生物活性;通过液质联用(LC-MS/MS)的方法鉴定多肽的氨基酸组成,根据质谱结果合成多肽。结果表明:中性蛋白酶水解物具有一定的生物活性,双重活性多肽 Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro 对 ACE 和 DPP-IV 均有抑制作用,其 IC₅₀ 值分别是 573.32 ± 4.63 和 2 065.35 ± 22.30 μmol/L。Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp 具有较好的 DPP-IV 抑制活性,其 IC₅₀ 值为 964.14 ± 4.09 μmol/L。羊乳清蛋白水解物可以作为食源性材料用于管理伴有高血压的 II 型糖尿病患者的饮食。

关键词 羊乳清蛋白; ACE 抑制活性; DPP-IV 抑制活性; 双重活性多肽

中图分类号 TS252.9

文章编号 1007-4333(2018)12-0097-09

文献标志码 A

Purification and identification of angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from goat whey protein hydrolysates

ZHANG Yuqi¹, GAO Song¹, LI Qian¹, ZHANG Yanchun², DAI Zhiyong², LUO Yongkang^{1*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Ausnutria Dairy (China) Co. Ltd., Changsha 410200, China)

Abstract Goat whey protein was hydrolyzed with neutrase, alcalase, trypsin, flavourzyme and papain. The hydrolysates were sampled at different time points. ACE and DPP-IV inhibitory activities were measured at the concentration of 5 mg/mL. The neutrase-generated hydrolysate was isolated by ultrafiltration, gel filtration chromatography, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and then identified via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The peptides were synthesized and assayed for bioactivities. The results showed that the hydrolysate treated with neutrase showed certain bioactivities. The dual bioactive peptide Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro showed inhibition against ACE and DPP-IV with IC₅₀ values of 573.32 ± 4.63 and 2 065.35 ± 22.30 μmol/L, respectively. Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp had better DPP-IV inhibitory activity with an IC₅₀ value of 964.14 ± 4.09 μmol/L. In conclusion, the goat whey protein hydrolysates can be used as a food-derived material for managing the diet of type 2 diabetes mellitus patients with hypertension.

Keywords goat whey protein; angiotensin-converting enzyme; dipeptidyl peptidase IV; dual bioactive peptide

II 型糖尿病(T2DM)合并高血压被称作“双重危险因素”,近年来,随着我国人口老龄化问题的加剧,糖尿病和高血压的发病率显著增加^[1]。这 2 种

病的机理紧密相关并有共同的危险因素,如肥胖,炎症,氧化应激,胰岛素抵抗等。世界卫生组织(WHO)的一项分析显示,死于糖尿病的患者中有

收稿日期:2018-04-16

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0400200)

第一作者:张宇琪,硕士研究生,E-mail:zyq53375178@163.com

通讯作者:罗永康,教授,主要从事农产品加工研究,E-mail:luoyongkang@263.net

44%同时患有高血压,表明2种病存在共同易感性^[2]。血管紧张素转换酶(ACE)在肾素-血管紧张素系统中起关键作用,可以通过抑制它来控制高血压^[3];二肽基肽酶-IV(DPP-IV)抑制剂能够延长肠促胰岛素的寿命,是一种治疗T2DM的新方法^[4]。然而,一些化学合成的抑制剂可能存在副作用,因此,目前的研究致力于从食物蛋白质中获得较为安全有效的生物活性抑制肽^[5]。

乳清是干酪生产过程中的副产物,其主要成分乳清蛋白是一种具有较高营养价值的食物蛋白源,经酶法改性后,乳清蛋白的加工特性得到改善,同时其水解物还可能产生抗氧化、降血糖、降胆固醇等作用^[6]。张媛媛等^[7]以羊乳清蛋白为原料,探究了其酶解的工艺条件,结果发现双酶复合水解的效果较好。Osman等^[8]应用碱性蛋白酶水解羊乳清蛋白,水解物经分离鉴定后得到抗菌肽。许多乳源生物活性肽显示出多功能特性,例如,来自于 β -酪蛋白的YFPGPPI具有阿片样作用,免疫调节作用和ACE抑制活性^[9]。Nongonierma等^[10]从乳蛋白序列中发现几种短肽对ACE及DPP-IV均有抑制作用,然而这些肽不是通过酶解产生的,而是经化学合成后测定其生物活性。目前,从乳清蛋白水解物中分离纯化具有双重抑制活性多肽的研究较少,本研究旨在对具有ACE和DPP-IV抑制活性的羊乳清蛋白水解产物进行分离纯化并对纯化得到的肽进行鉴定,以期对乳清蛋白酶解物作为功能性原料的商业化开发提供相关科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

蛋白质质量分数为60%的羊乳清蛋白粉由澳优乳业提供;中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶,购于丹麦Novozymes公司;胰蛋白酶、猪源二肽基肽酶-IV(DPP-IV)、甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺酸盐、马尿酸-组氨酸-亮氨酸(HHL)、血管紧张素转换酶(ACE)、邻苯二甲醛(OPA),购于美国Sigma公司;色谱级的乙腈、三氟乙酸,购于美国Fisher公司;Sephadex G-15,购于北京拜尔迪生物技术有限公司;BCA试剂盒,购于北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

主要仪器包括:FD-1PF型冷冻干燥机,北京德天佑科技发展有限公司;FE20型pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV-2800A型紫外分光

光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;Multiskan MK3型酶标仪,美国Thermo Electron公司;中空纤维超滤膜10、5和3 ku,北京旭邦膜设备有限公司;BS-100A型自动部分收集器、HL-2B型恒流泵,上海青浦沪西仪器厂;KQ-50E型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;600型高效液相色谱(HPLC),美国Waters公司;Q Exactive质谱仪,美国Thermo Fisher公司。

1.2 试验方法

1.2.1 羊乳清蛋白的酶解

参照孙骞等^[11]的方法。将羊乳清蛋白粉配成蛋白质质量浓度为5 g/mL的蛋白溶液并搅拌均匀,调节其温度至各种酶适合的温度,并用2 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调节至各种酶适合的pH,酶与底物的质量比为1:50,将不同时间点取出的酶解液在90℃水浴中加热20 min后离心10 min,离心力为10 000 g。取离心后的上清液进行冷冻干燥,并将冻干粉在-20℃下冻藏备用。

1.2.2 羊乳清蛋白酶解产物水解度的测定

参考Nielsen等^[12]的方法,采用邻苯二甲醛法(OPA法)测定酶解产物的水解度。150 μ L样品或L-苯丙氨酸标准液和3 mL OPA反应液混匀后在室温下反应3 min,于340 nm下测定吸光度,以去离子水替代样品做空白对照,酶解产物的水解度计算公式:

$$\text{水解度}/\% = (N - N_0) / (\rho \times h_{\text{tot}}) \times 100$$

式中: N 为羊乳清蛋白酶解液氨基氮的物质的量浓度,mmol/mL; N_0 为羊乳清蛋白氨基氮的物质的量浓度,mmol/mL; N 、 N_0 根据标准曲线的回归方程计算得到; ρ 为样品质量浓度,g/mL; h_{tot} 为羊乳清蛋白所含肽键的质量摩尔浓度,8.3 mmol/g。

1.2.3 ACE抑制活性的测定

参考张晓峰^[13]的方法并作改进。在试管中加入pH8.5的HHL硼酸缓冲液0.05 mL、样品0.025 mL及0.025 U/mL的ACE酶液0.05 mL,混合均匀后立刻将小试管置于37℃的水浴锅中加热30 min,反应后加入0.75 mL 0.3 mol/L NaOH终止反应。向ACE反应液中加入0.05 mL质量浓度为2 g/mL的OPA溶液,振荡混匀,静置10 min后加入0.1 mL 3 mol/L HCl,在30 min内进行荧光测定,激发波长340 nm,发射波长455 nm。ACE抑制率的计算公式为:

$$\text{ACE抑制率}/\% = [1 - (A - B) / C] \times 100$$

式中: A 为样品的荧光强度; B 为以硼酸缓冲液代替 ACE 酶液时的荧光强度; C 为以硼酸缓冲液代替样品时的荧光强度。

1.2.4 DPP-IV 抑制活性的测定

参考 Nongonierma 等^[14]的方法。向 96 孔酶标板中加入 25 μL 样品与 25 μL 1.6 mmol/L 的底物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min 后, 加入 8 U/L 的 DPP-4 酶液 50 μL , 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min, 加入 100 μL 1 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液终止反应, 在 405 nm 下测吸光值。DPP-IV 抑制率的计算公式:

$$\text{DPP-IV 抑制率}/\% = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{阴性空白}})] \times 100$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为样品的吸光值; $A_{\text{样品空白}}$ 为以 Tris-HCl 缓冲液代替 DPP-IV 酶液时的吸光值; $A_{\text{阴性对照}}$ 为以 Tris-HCl 缓冲液代替样品时的吸光值; $A_{\text{阴性空白}}$ 为以 Tris-HCl 缓冲液代替 DPP-IV 酶液和样品时的吸光值。

1.2.5 生物活性肽的分离纯化

1) 超滤分离。使用分子量分别是 10、5 和 3 ku 的中空纤维超滤膜对中性蛋白酶酶解 4 h 的羊乳清蛋白酶解液进行分离^[12], 得到 4 个分子量不同的组分, 分别是 N1: > 10 ku; N2: 5 ~ 10 ku; N3: 3 ~ 5 ku; N4: < 3 ku。冷冻干燥各组分并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2) Sephadex G-15 凝胶过滤层析分离。采用凝胶过滤层析法对 N4 组分进一步分离^[15]。分离条件为: 洗脱液为蒸馏水, 流速 1.5 mL/min。根据在 280 nm 处监测的洗脱曲线分离并收集 4 个部分, 冷冻干燥, 测定各组分的 ACE 及 DPP-IV 抑制活性, 筛选生物活性最高的组分进行下一步的分离。

3) RP-HPLC 分离。采用 RP-HPLC 对 N4-1 组分进行第 3 步分离^[16]。RP-HPLC 分离条件: 色谱柱为 Kromasil C18; 流动相 A 为含 0.1% TFA 的超纯水; 流动相 B 为含 0.1% TFA 的乙腈 (ACN); 进样量 50 μL ; 进样质量浓度 10 mg/mL; 流速 1 mL/min; 检测波长 220 nm。洗脱程序为: 0~5 min B 为 5%, 5~40 min B 从 5% 到 45%, 40 min 停止。通过自动部分收集器对各组分进行收集, 冷冻干燥后测生物活性。

1.2.6 LC-MS/MS 鉴定

采用 LC-MS/MS 对多肽的氨基酸序列进行分析鉴定^[17]。色谱条件: 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的超纯水; 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈; 进样量为

5 μL ; 进样质量浓度 2 mg/mL; 梯度洗脱条件为 0~40 min, B 从 1% 到 40%。洗脱液流入质谱仪系统用于分析。采用电喷雾正离子扫描模式, 扫描范围为 0.3~2 ku; 喷雾压力 2 kV; 传输毛细管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 二级质谱碰撞电压为 10 eV。利用 Mascot 2.4 search engine 软件对 Swiss-Prot 蛋白质数据库中的羊乳清蛋白的氨基酸序列进行搜索。将质谱鉴定分析所得肽段的氨基酸序列送往生物公司进行肽的合成, 得到纯度高于 95% 的多肽, 置于冰箱 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 统计分析

数据结果用平均值 \pm 标准差表示以及试验均为 3 个重复, 通过 SPSS 20.0 软件分析数据之间的显著性差异性 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 酶和酶解时间对羊乳清蛋白酶解物水解度的影响

羊乳清蛋白分别经中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解后, 测定不同酶解时间点的酶解产物的水解度, 结果见表 1。酶解初期即 0.5 h 内, 水解度增长迅速, 随着水解反应的进行, 水解度增长速度变慢, 这可能与体系中羊乳清蛋白可酶切的位点减少有关。5 种蛋白酶具有各自的底物特异性, 这使得不同酶解产物的水解度存在较大差异。碱性蛋白酶的作用范围较广, 其 5 h 酶解产物的水解度最高, 为 17.35% \pm 0.27%。其余 4 种酶作用 5 h 产生的酶解产物的水解度按照以下顺序排列: 中性蛋白酶 > 胰蛋白酶 > 风味蛋白酶 > 木瓜蛋白酶。

2.2 酶和酶解时间对羊乳清蛋白酶解物 ACE 抑制活性和 DPP-IV 抑制活性的影响

羊乳清蛋白经 5 种酶酶解后, 于 0、0.5、1、2、3、4 和 5 h 取样, 将样品质量浓度调为 5 mg/mL, 分别检测其 ACE 抑制活性及 DPP-IV 抑制活性 (表 2)。5 种蛋白酶水解物的抑制率与未酶解时相比明显提高 ($P < 0.05$), 在酶解的前 0.5 h, 各种蛋白酶水解物的 ACE 及 DPP-IV 抑制率增长较快; 酶解 0.5 h 之后, 抑制率的增长速度减慢。分析中性蛋白酶酶解 3 与 4 h 酶解产物的 2 种生物活性发现, 它们之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 4 h 酶解产物的水解度较高, 这表明乳清蛋白中更多的肽键被切割, 可能产生了更多的小分子肽段, 有利于后续分离纯化出

具有一定生物活性的短肽。因此选择中性蛋白酶酶解 4 h 的产物进行超滤分离。

表 1 不同酶和酶解时间处理的羊乳清蛋白酶解物的水解度

Table 1 The degree of hydrolysis (DH) of goat whey protein hydrolysates treated with different proteases and time %

时间/h Time	中性蛋白酶 Neutrase	碱性蛋白酶 Alcalase	风味蛋白酶 Flavourase	胰蛋白酶 Trypsin	木瓜蛋白酶 Papain
0	0	0	0	0	0
0.5	5.35±0.04 Ca	7.34±0.02 Ea	6.32±0.07 Da	4.56±0.11 Ba	2.48±0.01 Aa
1	7.20±0.03 Db	8.96±0.05 Eb	6.76±0.06 Cb	5.85±0.14 Bb	3.24±0.09 Ab
2	8.46±0.23 Dc	12.99±0.16 Ec	7.23±0.04 Cc	6.26±0.06 Bc	3.51±0.10 Ac
3	9.15±0.09 Dd	13.93±0.09 Ed	7.78±0.16 Cd	7.15±0.06 Bd	4.20±0.04 Ad
4	11.95±0.11 Ce	15.56±0.24 De	7.91±0.09 Be	8.12±0.11 Be	5.23±0.10 Ae
5	13.86±0.10 Df	17.35±0.27 Ef	8.77±0.06 Bf	9.70±0.06 Cf	5.67±0.04 Af

注:不同大小写字母分别表示同一行及同一列数值间存在显著性差异($P<0.05$),表 2 同。

Note: Values with different capital letters in each line and small letters in each column are statistically different ($P<0.05$), the same as Table 2.

表 2 不同酶和酶解时间处理的羊乳清蛋白酶解物的 ACE 抑制活性和 DPP-IV 抑制活性

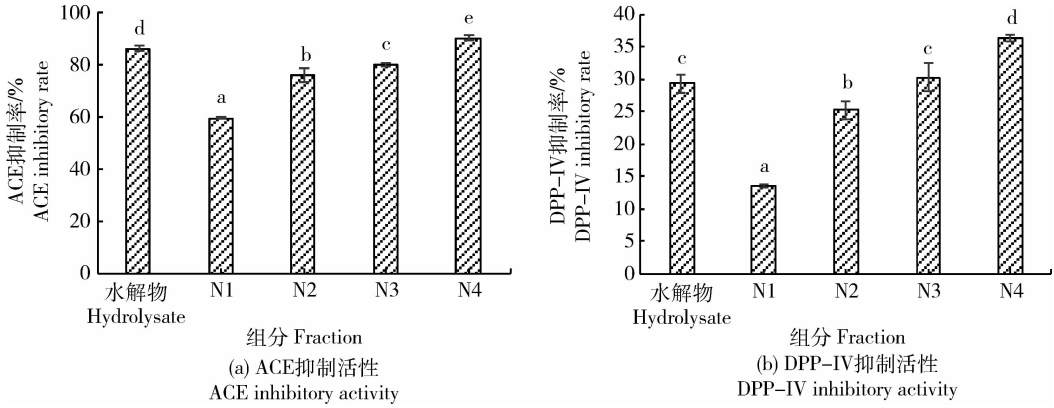
Table 2 Angiotensin-converting enzyme (ACE) and dipeptidyl-peptidase (DPP-IV) inhibitory activity of goat whey protein hydrolysates treated with different proteases and time %

指标 Index	时间/h Time	中性蛋白酶 Neutrase	碱性蛋白酶 Alcalase	风味蛋白酶 Flavourase	胰蛋白酶 Trypsin	木瓜蛋白酶 Papain
ACE 抑制率 ACE inhibitory rate	0	8.54±0.73 Aa	8.54±0.73 Aa	8.54±0.73 Aa	8.54±0.73 Aa	8.54±0.73 Aa
	0.5	78.29±1.55 Db	71.28±1.28 Cb	59.97±0.14 Bb	60.37±0.85 Bb	46.01±1.97 Ab
	1	82.44±0.13 Ec	76.41±0.51 Dc	63.56±0.29 Bc	67.07±0.49 Cc	47.98±0.61 Abc
	2	82.99±1.04 Dcd	78.03±2.69 Ccd	69.44±0.72 Bd	67.93±0.37 Bcd	49.49±0.91 Acd
	3	84.62±0.26 Ede	81.88±1.41 De	72.02±0.72 Ce	68.78±0.49 Bd	50.40±1.52 Acd
	4	86.15±1.03 Ee	80.38±0.13 Dde	69.01±0.29 Cd	67.68±0.61 Bcd	51.0±1.82 Ad
DPP-IV 抑制率 DPP-IV inhibitory rate	0	-6.77±1.28 Aa	-6.77±1.28 Aa	-6.77±1.28 Aa	-6.77±1.28 Aa	-6.77±1.28 Aa
	0.5	20.95±0.50 Db	20.29±0.29 Db	14.24±0.58 Ab	17.51±0.10 Cb	15.68±0.25 Bb
	1	22.58±0.88 Db	20.43±0.43 Cb	19.84±0.58 Cc	18.32±0.31 Bb	15.56±0.13 Ab
	2	27.98±2.39 Cc	22.29±0.86 Bc	22.87±0.35 Bd	18.22±0.41 Ab	17.06±0.13 Ac
	3	29.11±1.38 Dc	21.71±0.76 Bc	25.20±0.58 Ce	18.63±2.04 Ab	18.32±0.38 Ad
	4	29.36±1.38 Cc	22.29±1.43 Bc	24.15±1.63 Bde	19.65±0.62 Ab	19.20±0.75 Ae
5	32.12±0.13 Dd	24.86±1.43 Cd	30.81±0.35 Df	23.22±0.92 Bc	20.20±0.75 Af	

2.3 羊乳清蛋白水解物的超滤分离

利用 3、5 和 10 ku 的超滤膜将中性蛋白酶水解物分成 N1、N2、N3 和 N4 这 4 个组分,测定水解物和 4 个组分的生物活性,结果见图 1。不同分子量组分的抑制率按以下顺序排列: N4 > N3 > N2 >

N1。分子量最低的 N4 组分具有较高的 ACE 和 DPP-IV 抑制活性,抑制率分别为 90.31% ± 1.17% 和 36.38% ± 0.53%,显著高于水解物 ($P < 0.05$)。因此选择 N4 组分进行下一步分离。



不同字母表示组分之间差异显著 ($P < 0.05$), 下图同。

Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$), the same below.

图 1 羊乳清蛋白酶解物及其超滤后 4 个组分的生物活性

Fig. 1 Bioactivity of goat whey protein hydrolysate and its four fractions from ultrafiltration

2.4 N4 组分的 Sephadex G-15 分离纯化

按照图 2(a) 对凝胶过滤层析分离后的 3 个组分进行收集并检测其生物活性。ACE 抑制效果见

图 2(b); 组分 N4-1 的 ACE 抑制率显著高于其他组分 ($P < 0.05$), 其 ACE 抑制率为 93.35% ± 0.28%; 图 2(c) 表示各组分的 DPP-IV 抑制效果, 组分 N4-1

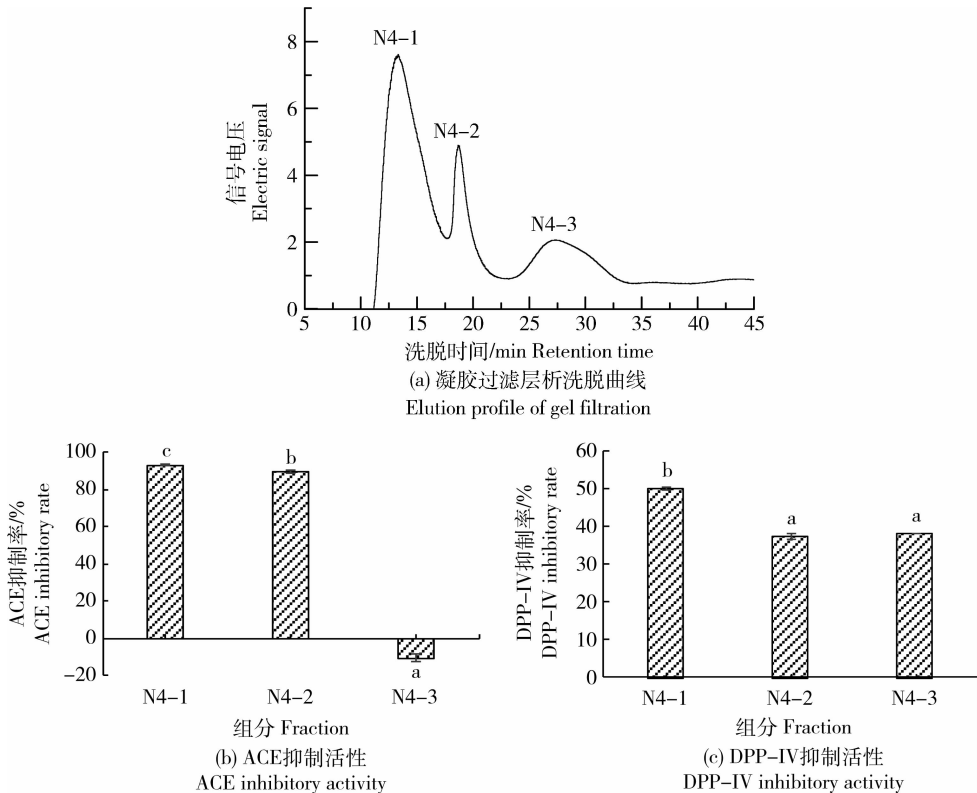


图 2 N4 组分 Sephadex G-15 凝胶过滤层析图谱及分离后各组分生物活性

Fig. 2 Sephadex G-15 gel filtration chromatography of N4 and bioactivity of subfractions from gel filtration

的 DPP-IV 抑制率为 $49.97\% \pm 0.31\%$, 其降血糖效果明显优于组分 N4-2 与 N4-3 ($P < 0.05$), DPP-IV 抑制率分别为 $37.38\% \pm 0.83\%$ 和 $38.11\% \pm 0.10\%$ 的 N4-2 与 N4-3 之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。综合 2 种生物活性, 选择凝胶过滤层析后的组分 N4-1 用于第 3 步分离。

2.5 N4-1 组分的 RP-HPLC 分离纯化

组分 N4-1 经过 RP-HPLC 分离得到如图 3(a) 所示的图谱。RP-HPLC 根据疏水性不同对样品

进行分离, 样品中疏水性越弱的组分在 C18 柱子上吸附的时间越短, 越容易被极性流动相洗脱, 会先从柱子上被洗脱下来。组分 N4-1 的组成比较复杂, 经过 C18 柱被分成不同的组分, 利用自动部分收集器收集得到了 N4-3-1 到 N4-3-9 这 9 个组分。调整样品质量浓度为 1 mg/mL 并测定其生物活性, 结果表明, 组分 N4-1-8 的 ACE 和 DPP-IV 抑制活性均较好, 因此选择该组分进行质谱鉴定。

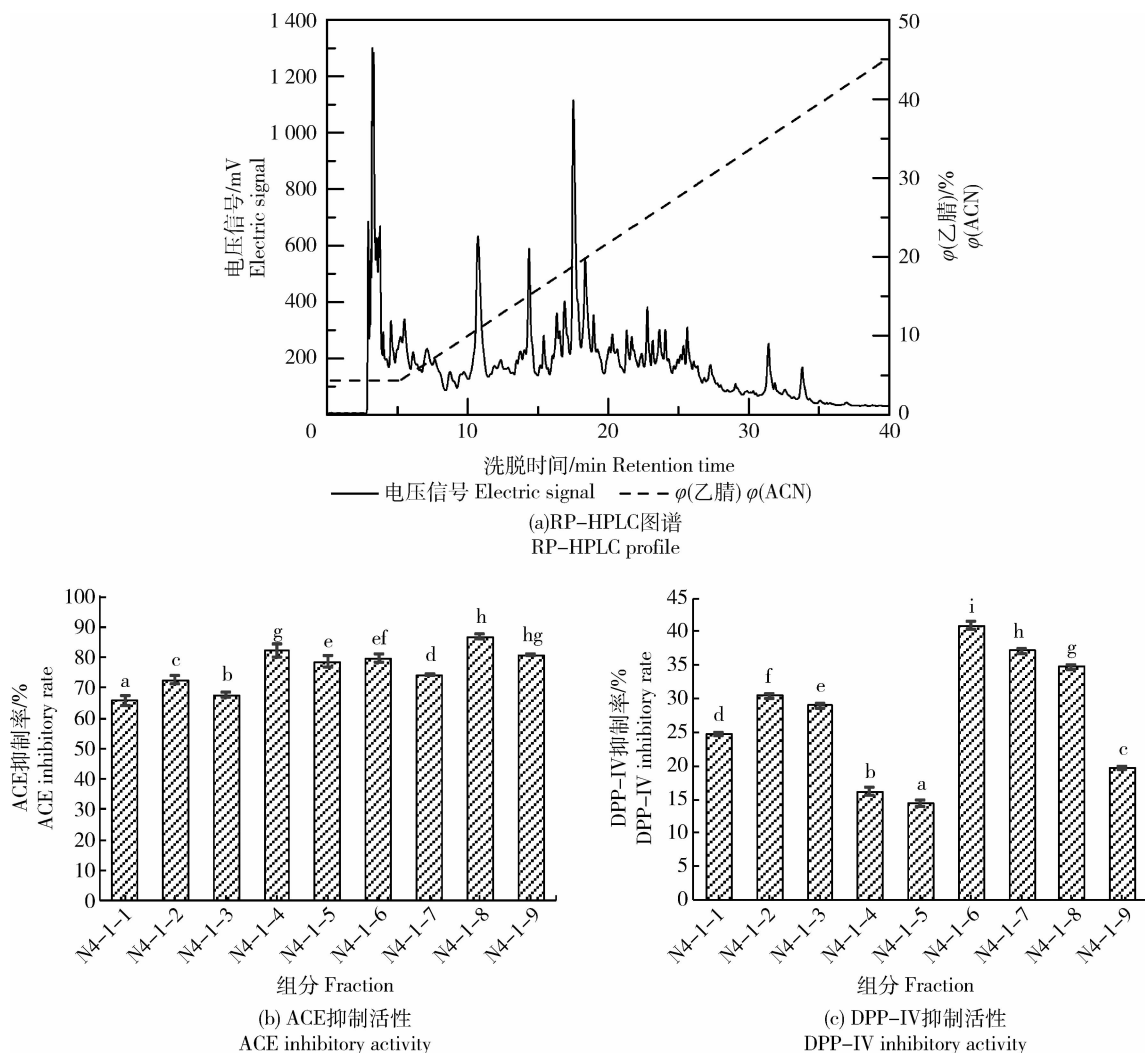


图 3 N4-1 组分的 RP-HPLC 图谱及分离后各组分生物活性

Fig. 3 RP-HPLC profile of the fraction N4-1 and bioactivity of subfractions from RP-HPLC

2.6 质谱鉴定分析及合成多肽生物活性

利用 LC-MS/MS 对组分 N4-1-8 中多肽的氨基酸组成进行分析。质谱鉴定后根据结构与功能的关系选择 12 条多肽进行化学合成并检测合成肽的 ACE 抑制活性和 DPP-IV 抑制活性(表 3)。从中挑

选出活性较高的多肽测定 IC_{50} 值, Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro 和 Ile-His-Ala-Leu-Pro-Leu-Pro 具有较高的 ACE 抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 573.32 ± 4.63 和 $891.52 \pm 16.10 \mu\text{mol/L}$ 。Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp 对 DPP-IV 酶具有较有效

的抑制作用,其 IC₅₀ 值为 964.14 ± 4.09 μmol/L。此外,具有较强 ACE 抑制活性的 Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro 也显示一定程度的 DPP-IV

抑制活性。Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro 和 Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp 的氨基酸序列由质谱图分析得到(图 4)。

表 3 来源于羊乳清蛋白中性蛋白酶酶解产物的多肽氨基酸序列及其生物活性

Table 3 Bioactivity of peptides identified from goat whey protein hydrolysates produced by Neutrase

多肽序列 Peptide sequence	蛋白来源 Origin	位点 Location	抑制率/% Inhibitory rate		IC ₅₀ / (μmol/L)	
			ACE	DPP-IV	ACE	DPP-IV
IHALPLP	含有 SPRY 结构域的 SOCS 盒蛋白	257—263	88.18 ± 1.09	60.11 ± 1.44	891.52 ± 16.10	2 689.98 ± 41.12
IHDILP	sen 蛋白特异性蛋白酶	371—377	47.59 ± 0.18	7.61 ± 0.18		
TPVVVPPF	β-酪蛋白	95—102	73.08 ± 0.18	64.37 ± 0.30	2 045.33 ± 3.86	2 595.41 ± 1.19
LGPVRGPF	β-酪蛋白前体	211—219	66.37 ± 1.34	71.90 ± 0.17	2 140.29 ± 6.72	1 734.81 ± 36.69
EMPFKYP	β-酪蛋白前体	123—130	63.76 ± 1.87	46.70 ± 0.30	2 613.96 ± 26.08	
VRGPFPI	β-酪蛋白	214—220	26.11 ± 0.09	11.59 ± 0.41		
HEPYFGY	碳酸酐酶抑制剂	201—207	51.52 ± 0.71	19.66 ± 0.29		
QLAPFLP	蛋白酶相关蛋白同系物	1110—1116	83.42 ± 0.71	52.13 ± 0.29	1 570.28 ± 14.09	
VVPPFLQ	β-酪蛋白前体	98—104	12.92 ± 0.62	6.20 ± 0.06		
IPAVFKID	β-乳球蛋白	17—24	48.58 ± 1.89	87.23 ± 0.91		964.14 ± 4.09
PPASEVVKP	糖基化依赖性细胞粘附分子-1	146—154	91.51 ± 1.23	69.34 ± 0.12	573.32 ± 4.63	2 065.35 ± 22.30
FPKYPVEPF	β-酪蛋白前体	126—134	17.22 ± 1.65	64.72 ± 0.29		2 364.48 ± 58.95

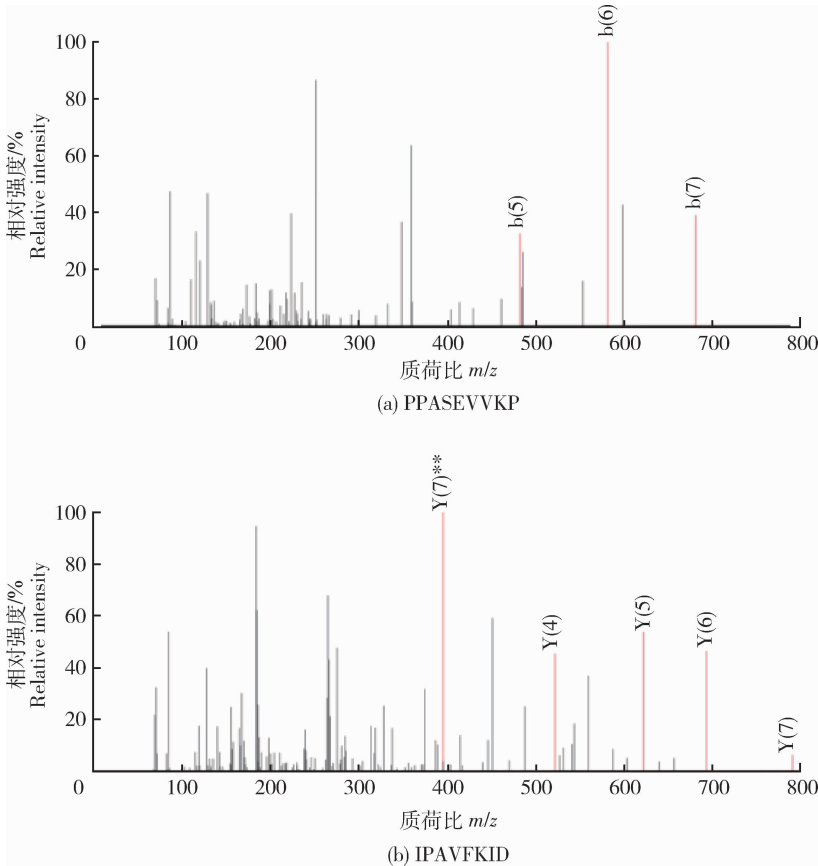


图 4 羊乳清蛋白肽的 LC-MS/MS 图

Fig. 4 LC-MS/MS spectra of the peptides from goat whey protein

3 讨论

随着食源性生物活性肽研究的开展,对乳清蛋白水解物进行功能评价并开发相关的多肽产品逐渐成为国内外的研究热点。已有研究从乳清蛋白中分离纯化出了一种新型的具有 ACE 抑制活性的寡肽并探究了其相关的分子作用机制^[18]。Ferreira 等^[19]使用胰蛋白酶水解乳清蛋白,体外测定其 ACE 抑制活性后用高效液相色谱对其进行分离纯化,并鉴定出 ACE 抑制肽的序列为 Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg。薛长勇等^[20]以乳清蛋白为原料,将从碱性蛋白酶水解产物中分离纯化得到的多肽用于动物实验,发现分子量分布在 0.9~1.9 ku 的多肽能使灌胃后 KKAy 糖尿病小鼠的血糖降低并会导致灌胃后 0.5 h 的血清胰岛素水平提高。本研究对中性蛋白酶酶解 4 h 后得到的羊乳清蛋白水解物进行超滤分离,结果表明生物活性与分子量有关,分子量小的组分可能具有更高的生物活性,这与 Wang 等^[16]的研究结果一致。分离纯化后得到的多肽 Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro 对 ACE 酶具有较强的抑制作用,其 IC_{50} 值为 $573.32 \pm 4.63 \mu\text{mol/L}$,显著高于一些已报道的食源 ACE 抑制肽,但与 IC_{50} 值为 $0.3 \pm 0.015 \mu\text{mol/L}$ 的合成药物卡托普利相比,其降血压效果仍较弱。López-Fandiño 等^[21]提出大多数具有 ACE 抑制活性的多肽是短序列,通常由 2 到 12 个氨基酸组成。根据定量结构-活性/性质的相关研究,ACE 抑制肽 C-末端的氨基酸组成对生物活性有更大的贡献,通常由 Pro、Tyr、Phe、Leu 和 Trp 组成,而 N 末端对 ACE 抑制活性的影响较小,一般为 Val、Ile 和 Leu^[22]。此外,C 端其他位点如 C2 到 C4 位的氨基酸组成也会对 ACE 抑制活性有一定的影响^[23]。Divide Tagliacruzchi 等^[24]从山羊乳中鉴定出具有较高 ACE 抑制活性的寡肽 VPP 和 IPP 存在类似的结构。Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp 具有较高的 DPP-IV 抑制活性,其 IC_{50} 值为 $964.14 \pm 4.09 \mu\text{mol/L}$,这与来自鳙鱼蛋白水解物的 Leu-Gly-Gln-Asn-Pro-Ala-Ala-Met-Leu 的抑制效果接近^[25],但两者降血糖的能力均显著低于 IC_{50} 值为 $5.48 \pm 0.75 \mu\text{mol/L}$ 的合成药物抑二肽素 A。DPP-IV 抑制肽可能具有特定的氨基酸序列,一般 N 末端首位氨基酸为 Ile、Leu 或 Trp 等,第 2 位的位置存在 Pro、Leu、Ala 残基的多肽具有较高的 DPP-IV 抑制活性。存在这种结构的肽段与 DPP-

IV 底物的结构类似,这可能是它们具有较高生物活性的原因^[26-27]。综合以上分析,与其他的因素如长度或净电荷相比,氨基酸组成似乎是决定 ACE 和 DPP-IV 抑制活性的主要因素。Konrad 等^[28]最近的一项研究表明,用丝氨酸蛋白酶处理乳清蛋白浓缩物而产生的水解产物对 ACE 和 DPP-IV 都具有抑制作用,但试验并没有对多肽的氨基酸组成进行分析,因此不能确定具有 ACE 抑制活性的多肽是否能对 DPP-IV 起抑制作用。而本试验中的结果显示只有 4 条多肽能同时对 2 种酶起抑制作用,大多数肽不具有双重活性,且每条肽对 2 种酶的抑制作用差别较大,这可能与水解物中 ACE 抑制肽的氨基酸序列与 DPP-IV 抑制肽不一致有关。

4 结论

羊乳清蛋白经中性蛋白酶作用 4 h 后得到的水解物对 ACE 及 DPP-IV 均有一定程度的抑制作用。分离纯化后利用 LC-MS/MS 对多肽的氨基酸序列进行鉴定,根据鉴定结果合成 12 条多肽,其中 Pro-Pro-Ala-Ser-Glu-Val-Val-Lys-Pro 具有 ACE 和 DPP-IV 双重抑制活性,其 IC_{50} 值分别为 573.32 ± 4.63 和 $2065.35 \pm 22.30 \mu\text{mol/L}$, Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp 对 DPP-IV 的抑制效果显著,其 IC_{50} 值为 $964.14 \pm 4.09 \mu\text{mol/L}$ 。本研究为羊乳清蛋白肽多重生物活性的研究提供了新视角,也为乳清蛋白生物活性多肽产品的开发提供了理论依据和科学参考。

参考文献 References

- [1] 唐剑,卢燕琼. 2 型糖尿病与高血压[J]. 中国实用医药, 2008, 3(5): 98-100
Tang J, Lu Y Q. Type 2 diabetes and hypertension[J]. *China Practical Medicine*, 2008, 3(5): 98-100(in Chinese)
- [2] World Health Organization. A global brief on hypertension [R]. Geneva: World Health Organization, 2013
- [3] Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins[J]. *Journal of Food Science*, 2000, 65(4): 564-569
- [4] Tasyurek H M, Altunbas H A, Balci M K, Sanlioglu S. Incretins: Their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Diabetes/metabolism Research & Reviews*, 2014, 30(5): 354-371
- [5] 吴建平,潘文彪. 乳蛋白生物活性肽的研究概述[J]. 中国乳品工业, 1999(1): 12-15
Wu J P, Pan W B. A review on biological active peptides derived from milk protein[J]. *China Dairy Industry*, 1999

- (1): 12-15(in Chinese)
- [6] Pihlanto-leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11(9-10): 347-356
- [7] 张媛媛, 张富新. 羊奶乳清蛋白水解物的酶解制备[J]. 广西农业生物科学, 2007, 26(3): 227-231
Zhang Y Y, Zhang F X. Preparation of goat whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis[J]. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 2007, 26(3): 227-231 (in Chinese)
- [8] Osman A, Goda H A, Abdel-Hamid M, Badran S M, Otte J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 65: 480-486
- [9] Gobetti M, Vini F M, Rizzello C G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57(2-3): 173-188
- [10] Nongonierma A B, FitzGerald R J. Milk proteins as a source of tryptophan-containing bioactive peptides [J]. *Food & Function*, 2015, 6(7): 2115-2127
- [11] 孙骞, 胡鑫, 罗永康, 刘昌蓉, 白涛. 猪血红蛋白抗氧化肽的酶法制备及其体外抗氧化活力观察[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(4): 77-81
Sun Q, Hu Xing, Luo Y K, Liu C R, Bao T. Study on enzymatic preparation and antioxidant activity *in vitro* of porcine hemoglobin antioxidant peptides [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2008, 13(4): 77-81 (in Chinese)
- [12] 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
- [13] 张晓峰. 腐乳发酵及其抗氧化和 ACE 抑制活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006
Zhang X F. Fermentation and antioxidative & ACE inhibitory activity of Sufu (Fermented soybean curd) [D]. Beijing: China Agricultural University, 2006(in Chinese)
- [14] Nongonierma A B, FitzGerald R J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates[J]. *Peptides*, 2013, 39(1): 157
- [15] Ngo D H, Vo T S, Ryu B, Kim S K. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(10): 1622-1628
- [16] Wang B, Li L, Chi C F, Ma J H, Luo H Y, Xu Y F. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 1713-1719
- [17] Zhang Y, Chen R, Ma H, Chen S. Isolation and identification of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, 63(40): 8819
- [18] Pan D D, Cao J X, Guo H Q, Zhao B. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2012, 1(1): 121-126
- [19] Ferreira I M P L V O, Pinho O, Mota M V, Tavares P, Pereira A, Gonçalves M P, Torres D, Rocha C, Teixeira J A. Preparation of ingredients containing an ace-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates [J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(5): 481-487
- [20] 徐庆, 王颀, 刘英华, 薛长勇. 乳清蛋白水解法及其多肽对 KKAY 小鼠血糖的影响[J]. 卫生研究, 2011, 40(5): 624-627
Xu Q, Wang J, Liu Y H, Xue C Y. Hydrolysis of whey protein and polypeptide effect on KKAY mice blood glucose [J]. *Health Research*, 2011, 40(5): 624-627 (in Chinese)
- [21] López-Fandiño R. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(10): 1119-1131
- [22] Sagardia I, Roa-Ureta R H, Bald C. A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3-4): 1370
- [23] Nongonierma A B, Fitzgerald R J. Learnings from quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: A review[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6: 75400-75413
- [24] Tagliazucchi D, Shamsia S, Helal A, Conte A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion [J]. *International Dairy Journal*, 2017, 71: 6-16
- [25] Zhang C, Zhang Y Q, Wang Z Y, Chen S W, Luo Y K. Production and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibition and dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) muscle hydrolysate [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 35: 224-235
- [26] Mochida T, Hira T, Hara H. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(7): 3095-3104
- [27] Tulipano G, Faggi L, Nardone A, Cocchi D, Caroli A M. Characterisation of the potential of β -lactoglobulin and α -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function; *In silico* and *in vitro* comparative studies [J]. *International Dairy Journal*, 2015, 48: 66-72
- [28] Konrad B, Anna D, Marek S, Marta P, Aleksandra Z, Józefa C. The evaluation of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV, α -Glucosidase and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of whey proteins hydrolyzed with serine protease isolated from asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*) [J]. *International Journal of Peptide Research & Therapeutics*, 2014, 20(4): 483-491