

脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰

李亚云, 赵新淮*

(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 利用枯草杆菌碱性蛋白酶水解酪蛋白制备 ACE 抑制肽, 其 IC_{50} 为 $47.1 \mu\text{g/mL}$; 采用相同酶催化 ACE 抑制肽和脯氨酸进行 Plastein 反应, 对 ACE 抑制肽进一步修饰, 并用响应面分析法优化反应条件。在 ACE 抑制肽质量分数为 35%, 反应时间为 6h, 以反应体系游离氨基减少量为指标, 得到适宜的反应条件为: 温度为 47.8°C 、脯氨酸比例为 0.54、酶添加量为 9.5kU/g pro , 此条件下体系游离氨基减少量约 $195.7 \mu\text{mol/g pro}$ 。在适宜条件下改变反应时间对酪蛋白 ACE 抑制肽进行不同程度的 Plastein 反应修饰, 制备出 6 个修饰程度不同的多肽混合物并测定它们的 ACE 抑制活性、计算其 IC_{50} 值。结果表明: 修饰产物的 ACE 抑制活性随修饰程度的增加不规则变化, 当反应体系的游离氨基减少量为 $195.7 \mu\text{mol/g pro}$ 时, 修饰产物的 IC_{50} 降低至 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 酪蛋白; 类蛋白反应; ACE 抑制肽; 碱性蛋白酶; 修饰

Plastein Reaction-based Modification of ACE Inhibitory Peptides Derived from Casein in the Presence of Proline

LI Ya-yun, ZHAO Xin-huai*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: ACE inhibitory peptides with IC_{50} value of $47.1 \mu\text{g/mL}$ were prepared by hydrolyzing casein with alkaline protease from *Bacillus subtilis* and further modified by plastein reaction under the catalysis of the same protease in the presence of proline. The optimal conditions for plastein reaction were determined using response surface methodology at the fixed concentration of 35% (*m/m*) peptides and the reaction time of 6 h as follows: reaction temperature 47.8°C , molar ratio of proline to total free amino groups in ACE inhibitory peptides derived from casein 0.54, and addition level of alkaline protease $9.5 \text{ kU/g proteins}$. Under these optimal reaction conditions, a maximal decrease of free amino groups in reaction mixture of $195.7 \mu\text{mol/g proteins}$ was obtained. Six modified products with different modification degrees were prepared by adjusting reaction time. ACE inhibitory activities and IC_{50} values of these modified peptides were also analyzed. Results indicated that ACE inhibitory activity of modified products revealed irregular change with increasing modification degree. When the reaction mixture had a decrease of free amino groups of $195.7 \mu\text{mol/g proteins}$, there was a decline of IC_{50} value of modified products to $0.2 \mu\text{g/mL}$.

Key words: casein; plastein reaction; ACE inhibitory peptide; alkaline protease; modification

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0125-06

蛋白质经酶水解会改变其功能性质, 甚至是生物活性变化, 从而得到所谓的生物活性肽^[1-2]。酪蛋白是生物活性肽的重要来源之一^[3-4]。血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽的安全性高, 具有重要的研究和实用价值^[5]。国内外对 ACE 抑

制肽的研究主要集中在: 1) 水解酶和蛋白质的选择^[6]; 2) 酶解条件和相关参数优化^[7-8]; 3) 高活性 ACE 抑制肽的分离鉴定^[9]。在这些工作中, 均采用蛋白酶直接水解蛋白质的一步法来制备 ACE 抑制肽。然而, 仅通过酶水解蛋白质制备的 ACE 抑制肽, 其氨基酸序列结构必定受

收稿日期: 2009-06-08

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z324); 国家自然科学基金项目(30972132)

作者简介: 李亚云(1982—), 女, 硕士, 主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail: cloud125531@yahoo.com.cn

* 通信作者: 赵新淮(1963—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品化学研究。E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

原料蛋白质一级结构的限制,而根据 ACE 抑制肽所初步呈现的构效关系,其 ACE 抑制活性也将受到相应的限制。所以,为解决原料蛋白质一级结构对 ACE 抑制肽活性的局限性,进一步提高蛋白质水解物的 ACE 抑制活性,有必要对 ACE 抑制肽进一步的修饰处理,以期提高其 ACE 抑制活性。

类蛋白(plastein)反应可以看成蛋白质水解反应的逆反应,通过类蛋白反应可以产生新蛋白质、新多肽序列^[10]。Plastein 反应过去被用于改善蛋白质氨基酸组成、提高蛋白质的功能性质等方面^[11-13]。Plastein 反应所涉及的机理至少有 3 种:缩合作用、转肽作用、物理聚集^[14]。由于转肽作用和缩合作用涉及新肽键的生成,意味着蛋白质水解物通过 Plastein 反应能生成原料蛋白质中没有的新肽段。为此,在先前研究工作的基础上,尝试利用 Plastein 反应、用两步法从酪蛋白制备高活性 ACE 抑制肽。首先用碱性蛋白酶水解酪蛋白获得活性较高的 ACE 抑制肽,再利用相同的酶催化 ACE 抑制肽和脯氨酸发生的 Plastein 反应,完成对 ACE 抑制肽的修饰作用。研究将以反应体系游离氨基减少量为指标,应用响应面分析法优化修饰反应条件、建立模型,最后对修饰产物的 ACE 抑制活性进行评价、比较,确定在脯氨酸存在下酪蛋白制备高活性 ACE 抑制肽的技术条件参数。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酪蛋白(蛋白质含量 95.7%) 上海山浦化工有限公司;碱性蛋白酶 南宁庞博生物工程有限公司;L-脯氨酸 国药集团化学试剂有限公司;FAPGG(FA-Phe-Gly-Gly);兔肺丙酮粉 Sigma 公司;卡托普利(Captopril) Fluca 公司。

1.2 仪器与设备

UV-2401PC 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;DELTA 320 精密 pH 计 梅特勒-托利多中国有限公司;Kjeltec TM 2300 全自动凯氏定氮仪 瑞士 Foss 公司;G1-21M 冷冻离心机 上海市离心机械研究所;LGJ-1 真空冷冻干燥机 上海医用分析仪器厂;HZQ-F160 全温振荡培养箱 哈尔滨东联电子技术开发有限公司;H-1 微型漩涡混合器 上海精科实业有限公司;DK-98-1 电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 技术路线

研究的整体技术路线如图 1 所示。

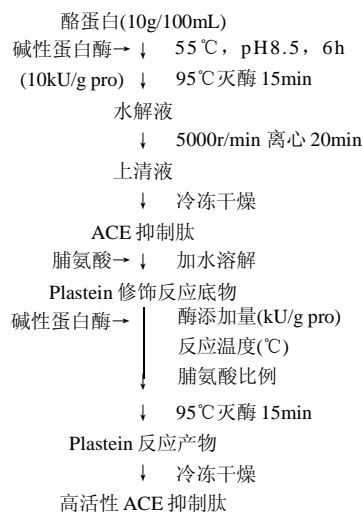


图 1 脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰

Fig.1 Flow chart of plastein reaction-based modification of ACE inhibitory peptides derived from casein in the presence of proline

1.3.2 ACE 抑制肽的制备

配制 10g/100mL 酪蛋白溶液并用 2mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8.5,加入碱性蛋白酶,55°C 下酶解 6h,迅速在 95°C 水浴中灭酶 15min,冷却至室温后 5000r/min 离心 20min 除去沉淀。测定上清液中蛋白质含量和游离氨基含量,计算水解度。取上清液 1mL,一定倍数稀释后测定其 ACE 抑制活性。所得到的产物冷冻干燥后保存于 -20°C。

1.3.3 脯氨酸存在下 ACE 抑制肽的修饰反应优化

基于 ACE 抑制肽 Plastein 反应修饰的前期研究,选择适宜的因素和水平进行试验,优化脯氨酸存在下 ACE 抑制肽的 Plastein 反应条件。固定 ACE 抑制肽质量分数(35%)、反应时间(6h),着重研究酶添加量、反应温度、脯氨酸比例(脯氨酸的物质的量与 ACE 抑制肽总游离氨基的物质的量之比)3 个因素对修饰反应的影响,以反应体系游离氨基减少量(反应前体系游离氨基含量减去反应后反应体系游离氨基含量)为响应值,根据中心组合试验设计原理采用三因素五水平响应面分析方法,其因素水平编码见表 1。

表 1 响应面分析的因素水平编码表

Table 1 Independent variables and levels in central composite design

因素	水平				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
酶添加量/(kU/g pro)	4.6	6	8	10	11.4
反应温度/°C	18	35	45	55	62
脯氨酸比例	0.08	0.25	0.5	0.75	0.92

1.3.4 相关分析

1.3.4.1 蛋白质含量、水解度以及酶活力的测定

蛋白质含量: 凯氏定氮法^[15]。

游离氨基含量与蛋白质水解度(DH)测定: 邻苯二甲醛(OPA)法^[16-17]。

OPA 试剂的配制: 准确称取 2.00g 十二烷基硫酸钠(SDS), 加入 30mL 硼酸缓冲液(pH9.5), 水浴加热使其完全溶解, 冷却至室温后再加入 1mL 80mg/mL OPA 乙醇溶液和 200 μ L β -巯基乙醇, 最后用硼酸缓冲液定容至 100mL。此溶液现用现配。

样品溶液先稀释 1000 倍。3mL 样品稀释液或标准溶液与同体积 OPA 试剂混合并开始计时, 准确计时 5min, 立即在分光光度计上于 340nm 波长处测吸光度。以亮氨酸(12~36 μ g/mL)为标准绘制标准曲线, 利用标准曲线计算样品中游离氨基浓度(μ mol/mL)。水解度计算公式如式(1)。

$$DH/\% = \left[\frac{\text{水解物游离氨基含量}/(\mu\text{mol/mL})}{63.8 \times \text{水解物氮含量}/(\text{mg/mL})} - 0.76 \text{mmol/g} \right] \times \frac{1}{8.2 \text{mmol/g}} \times 100 \quad (1)$$

酶活力测定: 福林酚法^[18]。

1.3.4.2 ACE 抑制活性测定^[19]

ACE 酶液: 50mg 兔肺丙酮粉浸泡于 5mL 预冷至 4℃ 的硼酸缓冲液(pH 8.3, 100mmol/L)中, 4℃ 保持 12h, 然后 4℃、20000r/min 离心 40min, 收集上清液并 4℃ 保存。FAPGG 底物溶液: 将 FAPGG 溶于 100mmol/L 的硼酸缓冲液(含 300mmol/L 的 NaCl, pH8.3), 配制成 1.6mmol/L 的溶液。

500 μ L FAPGG 底物溶液与 100 μ L 超纯水或抑制剂(ACE 抑制肽或卡托普利)混匀, 37℃ 预热 2min, 加入 300 μ L ACE 酶液开始反应, 30min 后立即加入 100 μ L EDTA(100mmol/L)终止反应, 加入 4000 μ L 超纯水稀释, 实验平行 3 次。0min 样品的测定, 要先加入 EDTA 再加入 ACE 酶液, 其他相同。于 340nm 波长处分别测体系在 0min 和 30min 时的吸光度, 计算差值 ΔA ($\Delta A = A_{0\text{min}} - A_{30\text{min}}$)。以单位时间内吸光度的变化表示 ACE 酶活力, 抑制剂对 ACE 的抑制程度用(2)式计算^[3]。

$$\text{ACE 抑制活性}/\% = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_c} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中: ΔA_c 为加入超纯水时吸光度在 30min 内的变化; ΔA_i 为加入抑制剂时吸光度在 30min 内的变化。

半抑制浓度(IC₅₀)定义为抑制 50% ACE 酶活力时抑制剂的浓度。配制不同浓度的 ACE 抑制剂(nmol/L 或 mg/mL), 按上述步骤测定其 ACE 抑制活性, 以 lg(抑制剂的浓度)为横坐标, ACE 抑制活性(%)为纵坐标, 进行回归分析得回归方程, 利用回归方程计算抑制剂的 IC₅₀。本方法

测得卡托普利的 IC₅₀ 为 5.2nmol/L。

1.3.5 统计分析

采用 Design Expert 7.0 软件中 Response Surface 程序进行分析, 用 Model Graphs 程序作响应曲面图。

2 结果与分析

2.1 酪蛋白 ACE 抑制肽的制备

利用前期研究工作所选定的水解条件, 水解处理酪蛋白 6h, 可以获得 ACE 抑制活性较强的酪蛋白水解物, 其 IC₅₀ 为 47.1 μ g/mL。通过测定、计算, 所制备的酪蛋白 ACE 抑制肽的水解度为 11.2%。以下将利用此 ACE 抑制肽和脯氨酸的混合物作为 Plastein 反应的底物, 研究脯氨酸存在下 Plastein 反应对 ACE 抑制肽的修饰作用及适宜的条件。

2.2 脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽的 Plastein 反应修饰条件优化

关于 ACE 抑制肽结构与活性关系的研究, 已经发现了一些基本特征。大多数 ACE 抑制肽由 2~12 个氨基酸组成, 个别由 27 个氨基酸组成。ACE 抑制肽的 C- 端氨基酸是与其 ACE 活性部位结合的关键, 其中 C- 末端三肽序列强烈影响其活性。一般情况下, C- 末端三肽序列含疏水性氨基酸(芳香族氨基酸或带支链氨基酸)其活性较强; 如果 C- 末端三肽序列中含有一个脯氨酸, 活性将明显增强; 另外, 在 C- 末端三肽序列中含有一个带正电的氨基酸如赖氨酸(ϵ -氨基带正电荷)或精氨酸(胍基带正电荷), 其活性也会明显增强。ACE 对 C- 末端是谷氨酸的底物或竞争性抑制剂的亲和力较低^[20]。故此, 选择脯氨酸来修饰所制备的酪蛋白抑制肽。

2.2.1 回归方程的建立与分析

前期研究发现, Plastein 反应修饰时如果底物浓度过大, 则体系黏度太大而不利于反应, 浓度过低则导致发生水解反应, 适宜的酪蛋白 ACE 抑制肽质量分数为 35%; 并且, 适宜的反应时间为 6h。为了确定其他的适宜条件参数, 按照中心组合设计的统计学要求进行 20 组试验, 以 Plastein 反应修饰过程中反应体系游离氨基减少量为响应值 Y, 试验设计和结果如表 2 所示。

利用 Design-Expert 软件对表 2 试验数据进行二次多项回归拟合, 获得反应体系游离氨基减少量(Y)与反应温度(X₁)、脯氨酸比例(X₂)和酶添加量(X₃)关系的二次多项式回归方程如下:

$$Y = -585.02 + 22.25X_1 + 183.43X_2 + 41.18X_3 + 5.16X_1X_2 + 0.18X_1X_3 - 4.23X_2X_3 - 0.28X_1^2 - 363.60X_2^2 - 2.50X_3^2$$

表 3 分析结果显示所得模型显著($P < 0.0001$), 失拟检验不显著($P = 0.0549$), 模型与实际情况拟合较好($R^2_{\text{Adj}} = 0.9710$), 能够反映修饰反应过程中体系游离氨基减少量的变化, 可用于实际预测。Design-Expert 软件分析表

明, 各因素对反应体系游离氨基减少量的影响顺序为反应温度>酶添加量>脯氨酸比例。

表2 中心组合设计表及试验结果
Table 2 Matrix and results of central composite design

试验号	X_1 反应温度	X_2 脯氨酸比例	X_3 酶添加量	Y 游离氨基减少量/ ($\mu\text{mol/g pro}$)
1	-1	1	-1	93.22
2	0	0	-1.682	131.27
3	0	1.682	0	130.43
4	0	0	0	181.16
5	1.682	0	0	127.48
6	1	-1	1	130.43
7	-1.682	0	0	89.84
8	0	0	0	181.16
9	0	0	0	184.54
10	1	1	-1	133.81
11	-1	1	1	108.44
12	0	0	0	177.78
13	-1	-1	1	127.04
14	0	0	1.682	187.92
15	0	-1.682	0	116.80
16	0	0	0	187.92
17	0	0	0	184.54
18	1	1	1	160.02
19	-1	-1	-1	106.75
20	1	-1	-1	92.38

表3 回归方程方差分析表

Table 3 Analysis of variance for developed quadratic regression model describing the response value of decrease of free amino groups to plastein reaction conditions

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	23591.26	9	2621.25	71.72	< 0.0001
失拟项	302.58	5	60.52	4.81	0.0549
纯误差	62.91	5	12.58		
所有项	23956.75	19			
$R^2=0.9847$ $R^2_{\text{Adj}}=0.9710$					

反应温度和所添加的脯氨酸比例对反应体系游离氨基减少量交互作用的响应面如图2所示。二者之间的交互作用显著, 当脯氨酸比例一定时, 所选温度范围内反应体系游离氨基减少量随温度的升高而增加, 这一现象与温度升高能提高反应速率有关。当酶添加量为8.0 kU/g pro($X_3=0$)、脯氨酸比例为0.38~0.60、温度为42~50℃时, 反应体系游离氨基减少量较大。

酶添加量和反应温度对反应体系游离氨基减少量交互作用的响应面如图3所示。二者之间的交互作用较小, 游离氨基减少量随酶添加量和反应温度的增加而增加。当脯氨酸比例为0.5($X_2=0$)、酶添加量为8.0~10.0 kU/g pro、反应温度为45~55℃时, 反应体系的游离氨基减少量较大。

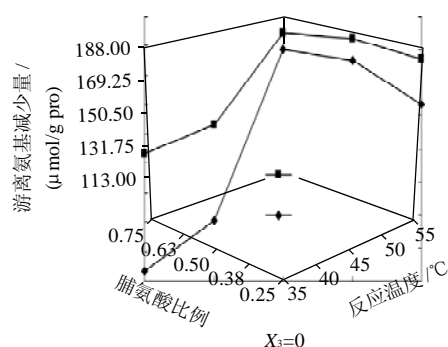


图2 脯氨酸比例和反应温度对 Plastein 反应体系游离氨基减少量的影响

Fig.2 Three-dimensional response surface diagram showing the interactive effects of molar ratio of proline to total free amino groups in ACE inhibitory peptides derived from casein and reaction temperature on the decrease of free amino groups in reaction system

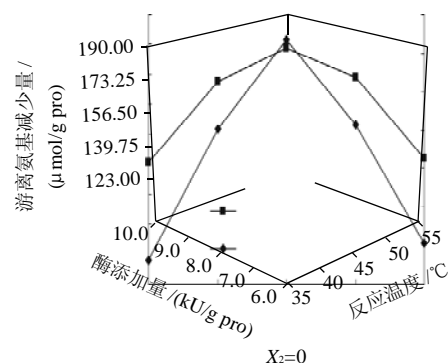


图3 酶添加量和反应温度对 Plastein 反应体系游离氨基减少量的影响

Fig.3 Three-dimensional response surface diagram showing the interactive effects of enzyme dose and reaction temperature on the decrease of free amino groups in reaction system

所添加的脯氨酸比例和酶添加量交互作用的响应面如图4所示。二者之间的交互作用较小, 随着酶添加量、脯氨酸比例的增加, 游离氨基减少量先逐渐增加, 然后逐渐减少。当反应温度为45℃($X_1=0$)、酶添加量为8.0~10 kU/g pro、脯氨酸比例为0.4~0.6时, 游离氨基减少量较大。

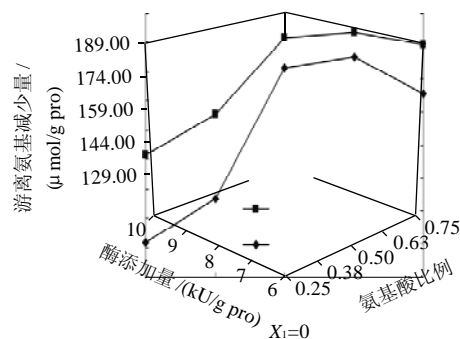


图4 酶添加量和脯氨酸比例对 Plastein 反应体系游离氨基减少量的影响

Fig.4 Three-dimensional response surface diagram showing the interactive effects of enzyme dose and molar ratio of proline to total free amino groups in ACE inhibitory peptides derived from casein on the decrease of free amino groups in reaction system

对回归模型进行数学分析, 计算得到极大响应值和对应的因素条件为: 游离氨基减少量(Y)为 $190.19 \mu\text{mol/g pro}$ 、反应温度(X_1)为 47.8°C 、脯氨酸比例(X_2)为 0.54 、酶添加量(X_3)为 9.5 kU/g pro 。

2.2.2 验证实验

采用上述反应条件进行实际反应, 测得反应体系中游离氨基减少量为 $195.68 \mu\text{mol/g pro}$ (3次平均值), 与理论值无显著差别, 说明响应面法优化得到的反应条件参数以及模型是可靠的。

2.3 脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽 Plastein 修饰产物的 ACE 抑制活性

表4 Plastein 反应修饰对酪蛋白水解物 ACE 抑制活性的影响^a
Table 4 Effect of plastein reaction-based modification on ACE inhibitory activity of casein hydrolysates

时间/h	脯氨酸存在下的 Plastein反应修饰产物			无脯氨酸存在下的 Plastein反应对照产物		
	修饰产物	游离氨基减少量/ ($\mu\text{mol/g pro}$)	IC ₅₀ / ($\mu\text{g/mL}$)	对照产物	游离氨基减少量/ ($\mu\text{mol/g pro}$)	IC ₅₀ / ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	83.2	25.4	1	71.1	42.3
2	2	116.9	37.6	2	92.0	34.2
3	3	131.3	66.3	3	125.3	29.8
4	4	160.0	41.2	4	142.1	5.2
5	5	181.2	1.1	5	162.8	1.6
6	6	195.7	0.2	6	175.5	0.6

注: a. 酪蛋白 ACE 抑制肽的 IC₅₀ 为 $47.1 \mu\text{g/mL}$ 。

利用上述的优化反应条件, 通过改变反应时间制备酪蛋白 ACE 抑制肽的不同修饰程度 Plastein 修饰产物, 共计 6 个修饰产物。此外, 还设置了相应的对照样品; 对照样品是利用相同的酪蛋白 ACE 抑制肽进行 Plastein 反应修饰, 除不加入脯氨酸外, 其他反应条件均相同, 共计 6 个对照产物。脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽 Plastein 反应修饰产物的游离氨基减少量和修饰产物的 IC₅₀ 及相应的对照产物的游离氨基减少量和对照产物的 IC₅₀ 如表 4 所示。酪蛋白 ACE 抑制肽的 IC₅₀ 为 $47.1 \mu\text{g/mL}$, 脯氨酸本身没有 ACE 抑制活性。在脯氨酸存在下, 酪蛋白 ACE 抑制肽经过不同程度的 Plastein 反应修饰后, 伴随着反应体系游离氨基减少量的增加(游离氨基减少了 $83.2 \sim 195.7 \mu\text{mol/g pro}$), 其 IC₅₀ 出现不规则的变化模式。与原料酪蛋白 ACE 抑制肽相比, 修饰产物的 IC₅₀ 先减少又逐渐增加、最后大幅度降低。但是最终结果仍然表明, 在脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽经 Plastein 反应修饰处理后, ACE 抑制活性发生改变, 尤其是在进行充分的修饰反应后, 其 ACE 抑制活性大幅度增加(例如游离氨基减少量达到 $181.2 \sim 195.7 \mu\text{mol/g pro}$ 时)。同时, 在无脯氨酸存在下, 修饰后的对照产物的 IC₅₀ 一直呈现逐渐降低趋势, 这与过去的研究结果^[21]一致。

酪蛋白 ACE 抑制肽在脯氨酸存在下的修饰产物的 ACE 抑制活性随反应时间的变化, 可能与反应过程中脯氨酸和 ACE 抑制肽的结合方式(C-末端或 N-末端)有关。虽然 ACE 抑制肽的 C-末端三肽序列中如果含有 1 个脯氨酸, 其抑制活性将明显增强; 但是 Cheung 等^[22]的研究表明, 若 N-末端为脯氨酸, 其活性反而降低。因此, 可以推测在反应 1~3h 时, 脯氨酸优先结合于 ACE 抑制肽的 N-末端; 随着反应时间的延长, 结合到 ACE 抑制肽 N-末端的脯氨酸的比例增大, 导致了修饰产物的 ACE 抑制活性降低。脯氨酸优先结合到 ACE 抑制肽的 N-末端, 可以通过实际反应过程中游离氨基的变化情况来部分体现, 因为可以看出在相同的反应时间下, 在脯氨酸存在下修饰产物的游离氨基减少量, 总是大于相应的无脯氨酸存在下对照产物的游离氨基减少量。由于脯氨酸中的亚氨基不能与 OPA 结合, 它在游离氨基测定的时候不能引起吸光度的变化; 如果脯氨酸与 ACE 抑制肽的 N-末端结合, 所产生的新肽段肯定将减少 1 个游离氨基, 导致反应体系游离氨基减少; 如果脯氨酸与 ACE 抑制肽的 C-末端结合, 所产生的新肽段将不会减少游离氨基; 表 4 充分表明有相当量的脯氨酸结合于 ACE 抑制肽的 N-末端, 最终导致游离氨基含量下降更多。在反应时间为 4~6h 时, 修饰产物的 ACE 抑制活性随反应时间的延长而增强, 则可能是由于此时结合于 ACE 抑制肽 C-末端的脯氨酸的数量增加所引起的。所以, 在脯氨酸存在下通过充分的反应时间, 仍然可以利用酪蛋白 ACE 抑制肽的 Plastein 反应来获得高活性 ACE 抑制肽, 并且其最终活性改善效果要好于无脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽的直接 Plastein 反应修饰效果。

3 结论

用枯草杆菌碱性蛋白酶水解酪蛋白, 获得 ACE 抑制活性较高的 ACE 抑制肽, 其 IC₅₀ 为 $47.1 \mu\text{g/mL}$ 。在脯氨酸存在条件下, 利用碱性蛋白酶对 ACE 抑制肽进行 Plastein 反应修饰。在固定酪蛋白 ACE 抑制质量分数为 35%、反应时间为 6h 时, 应用响应面分析法建立了 Plastein 修饰反应的数学模型, 得到的优化反应条件为: 反应温度为 47.8°C 、脯氨酸比例为 0.54 、酶添加量为 9.5 kU/g pro , 此条件下反应体系游离氨基减少量为 $195.7 \mu\text{mol/g pro}$ 。在优化条件下, 通过改变反应时间制备出不同修饰程度的修饰产物, 分析发现修饰产物的 ACE 抑制活性在反应时间为 1~3h 时随时间的延长而降低, 在反应时间为 4~6h 随时间的延长而提高。当反应时间为 6h 时, 修饰产物的游离氨基减少量为 $195.7 \mu\text{mol/g pro}$, IC₅₀ 降低至 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 。脯氨酸存在下酪蛋白 ACE 抑制肽修饰产物的 ACE 抑制活性变化, 是由于脯氨酸结合到 ACE 抑制肽 C-末端或 N-末端的优先性

所引起的。在脯氨酸存在下, 可以通过 Plastein 修饰反应来制备高活性的酪蛋白 ACE 抑制肽。

参考文献:

- [1] 陈洁, 刘国琴, 裴爱泳, 等. 葵花浓缩蛋白的酶法改性研究[J]. 农业机械学报, 2008, 39(5): 86-90.
- [2] PIHLANTO A, AKKANEN S, KORHONEN H J. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*)[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 104-112.
- [3] KUBA M, TANA C, TAWATA S, et al. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(6): 2191-2196.
- [4] LÓPEZ-FANDIÑO R, OTTE J, van CAMP J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1277-1293.
- [5] 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.
- [6] OTTE J, SHALABY S M, ZAKORA M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(5): 488-503.
- [7] 姚成虎, 王志耕, 梅林, 等. 胃蛋白酶水解珠蛋白获得 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(5): 284-288.
- [8] 陈季旺, 刘英, 夏文水, 等. 大米降压肽酶法制备工艺及其性质研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 210-213.
- [9] KUBA M, TANA C, TAWATA S, et al. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(6): 2191-2196.
- [10] LOZANO P, COMBES D, IBORRA J L. Food protein nutrient improvement by protease at reduced water activity[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(4): 876-888.
- [11] ARAI S, YAMASHITA M, FUJIMAKI M. A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: papain catalyzed polymerization of *L*-methionine ethyl ester and its regulation by adding a protein substrate[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1979, 43(5): 1069-1074.
- [12] SHIMADA A, YAMAMOTO I, SASE H. Surface properties of enzymatically modified proteins in aqueous systems[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1984, 48(11): 2681-2688.
- [13] YAMASHITA M, ARAI S, FUJIMAKI M. Plastein reaction for food protein improvement[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976, 24(6): 1100-1104.
- [14] STEVENSON D E, MORGAN K R, FENTON G A, et al. Use of NMR and mass spectrometry to detect and quantify protease-catalyzed peptide bond formation in complex mixtures[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(3/5): 357-363.
- [15] GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定[S].
- [16] CHURCH F C, SWAISGOOD H E, PORTER D H, et al. Spectrophotometric assay using O-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and milk proteins[J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66(6): 1219-1277.
- [17] SPELLMAN D, MCEVOY E, O CUINN G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(6): 447-453.
- [18] SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定[S]. 北京: 中国标准出版社.
- [19] MURRAY B A, WALSH D J, FITZGERALD R J. Modification of the furanacryloyl-*L*-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 59(2): 127-137.
- [20] ROBERT M C, RAZANAME A, MUTTER M, et al. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(23): 6923-6931.
- [21] 李亚云, 赵新淮. 酪蛋白水解物的酶法修饰与ACE抑制活性变化[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 35-39.
- [22] CHEUNG H S, WANG F L, ONDETTI M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of the angiotensin-I-converting enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 1980, 255(25): 401-407.