

# 杏仁蛋白水解物对血管紧张素转化酶抑制作用的研究

刘 宁, 仇农学\*, 朱振宝, 牛鹏飞, 王丽媛, 苗利利  
(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062)

**摘 要:** 分别采用 Protamex、Alcalase、Neutrase、Flavourzyme、Proleather FG-F、木瓜蛋白酶水解杏仁蛋白, 利用高效液相色谱法测定水解物对血管紧张素转化酶(ACE)的抑制活性, 以水解度(DH)和水解产物对 ACE 的抑制率为指标对酶解过程进行分析, 并研究水解物的体外消化稳定性。结果表明, Proleather FG-F 和 Alcalase 对杏仁蛋白有较好的水解效果, 其水解物对 ACE 抑制率较高,  $IC_{50}$  分别为 1.24mg/ml 和 0.98mg/ml。模拟胃肠消化实验结果表明, 在消化酶的作用下杏仁蛋白水解物仍具有较强的 ACE 抑制活性。

**关键词:** 杏仁蛋白; ACE 抑制活性; 水解度; 模拟胃肠消化

## Inhibitory Effects of Almond Protein Hydrolysate against Angiotensin I-converting Enzyme

LIU Ning, QIU Nong-xue\*, ZHU Zhen-bao, NIU Peng-fei, WANG Li-yuan, MIAO Li-li  
(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract :** Almond protein was respectively hydrolyzed with Protamex, Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Proleather FG-F and Papain, and then the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of obtained hydrolysates were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). With the degree of hydrolysis (DH) and the ACE-inhibitory activity of hydrolysate as evaluation indexes, the hydrolysis course and the digestion stability *in vitro* of the hydrolysate were studied. The results indicated that Proleather FG-F and Alcalase have better hydrolysis ability to almond protein than other proteases, and the  $IC_{50}$  values of their hydrolysates to ACE are 1.24 mg/ml and 0.98 mg/ml, respectively. Moreover, after simulated gastrointestinal digestion their hydrolysates still have high ACE-inhibitory activity.

**Key words:** almond protein; ACE-inhibitory activity; degree of hydrolysis; simulated gastrointestinal digestion

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)05-0249-04

据报道,我国高血压患者已超过1亿人,预防和治疗高血压病是当今社会十分重要的课题<sup>[1]</sup>。血管紧张素转化酶(Angiotensin I-Converting Enzyme, ACE)在血压调节中起着重要作用。目前用于降血压的药物,其降压原理主要是抑制ACE的活性<sup>[2]</sup>。

近年来,国内外对天然ACE抑制剂的研究报道较多,目前已经从多种动植物原料及下脚料中分离出多种降血压肽,采用的工艺技术主要包括从发酵食品中分离提取、从自溶产物中提取以及从蛋白水解物中提取等<sup>[3]</sup>。已有报道利用酪蛋白、大豆蛋白、鱼贝蛋白、小麦胚芽蛋白、玉米蛋白、花生蛋白等<sup>[4-10]</sup>制备降血压肽。

杏仁是蔷薇科李属植物——杏(*Prunus armeniaca* L.)的种子,脱苦、脱甙的杏仁是一类优质的植物蛋白资

源,其氨基酸组成平衡合理,营养价值较高<sup>[11]</sup>,目前国内对杏仁蛋白水解物对抗ACE活性的抑制作用的研究还未见报道。本研究以杏仁蛋白粉为原料,分别用Protamex、Alcalase、Neutrase、Flavourzyme、Proleather FG-F、木瓜蛋白酶对其进行水解,研究水解过程中水解度的变化,对水解产物的ACE抑制效果及体外消化稳定性进行探讨,以期对杏仁蛋白的深度开发及降血压肽的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杏仁蛋白粉为实验室自制。

血管紧张素转化酶和马尿酸-组氨酸-亮氨酸(Hip-

收稿日期: 2008-04-02

作者简介: 刘宁(1984-),男,硕士研究生,研究方向为食品分离技术。E-mail: lynn20020226@stu.snnu.edu.cn

\* 通讯作者: 仇农学(1945-),男,教授,研究方向为食品分离与现代果汁加工技术。E-mail: nongxueq@snnu.edu.cn

His-Leu, HHL) 美国 Sigma 公司; 复合蛋白酶(Protamex)、碱性蛋白酶(Alcalase)、中性蛋白酶(Neutrase)和风味蛋白酶(Flavourzyme) 丹麦诺维信(Novo)公司; 碱性蛋白酶(Proleather FG-F) 日本天野酶制品株式会社; 木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰酶 和马尿酸(hippuric acid) 西安盛泰生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪 美国 DineX 公司; 501A 型超级恒温水浴槽 上海实验仪器厂有限公司; TGL-16G 型高速离心机 上海安亭科学仪器厂; LGJ-10 型冷冻干燥机 巩义市予华仪器有限责任公司; PHS-3C 型精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 上海亚荣生化仪器厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 杏仁蛋白的提取

参考文献[11]的方法进行。

### 1.3.2 杏仁蛋白的酶解工艺

取一定量杏仁蛋白粉(粗蛋白含量 85%, 以干基计), 按 4% (W/V) 底物浓度加入双蒸水, 在夹层玻璃反应器中搅拌, 待温度恒定后, 调节一定的 pH 值, 按酶活与底物比为 0.12 AU/g 加入蛋白酶开始水解, 搅拌状态下不断加入 0.5 mol/L NaOH, 以使反应体系的 pH 值始终维持在实验要求范围内, 用 pH-stat 法测定水解度, 水解一定时间后, 终止反应, 沸水浴灭酶 15 min。冷却后以 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液冷冻干燥, 4℃ 贮藏备用。

### 1.3.3 水解度的测定

采用 pH-stat 法<sup>[12]</sup>, 水解度(DH)的计算公式为:

$$DH(\%) = \frac{BN_b}{\alpha M_{Ph_{tot}}} \times 100$$

式中: B 为碱液体积(ml);  $N_b$  为碱液浓度(mol/L);  $\alpha$  为  $\alpha$ -氨基的解离度;  $M_p$  为底物中蛋白质含量(g);  $h_{tot}$  为底物蛋白质中的肽键总数(mmol/g), 对杏仁蛋白而言,  $h_{tot} = 7.58 \text{ mmol/g}$ 。

### 1.3.4 水解物 ACE 抑制活性的 RP-HPLC 测定

参照 Wu 等<sup>[13]</sup>的方法, 并加以改进。样品按一定浓度溶于双蒸水, 离心(12000 r/min, 15 min)后取上清液进行 ACE 抑制活性测定。取 10  $\mu$ l 样品溶液和 10  $\mu$ l ACE (0.25 U 溶于 2.5 ml pH 8.3 0.1 mol/L 硼砂-硼酸缓冲液, 其中含 0.3 mol/L NaCl) 于 37℃ 保温 6 min, 加入 50  $\mu$ l 6.5 mmol/L 底物(Hip-His-Leu 溶于相同的缓冲液中), 37℃ 下反应 30 min 后, 加入 80  $\mu$ l 1 mol/L 盐酸溶液终止反应, 至室温取 20  $\mu$ l 反应物进样, 通过 RP-HPLC 洗脱图谱计算马尿酸生成量, 以马尿酸的生成量判断样品对 ACE 的抑制

作用, 同时用硼砂-硼酸缓冲液代替样品溶液做空白对照。

$$\text{样品对 ACE 的抑制率}(\%) = \frac{\text{马尿酸峰值}_{\text{对照品}} - \text{马尿酸峰值}_{\text{样品}}}{\text{马尿酸峰值}_{\text{对照品}}} \times 100$$

高效液相色谱(RP-HPLC)系统: DIONEX P680 型泵(带在线脱气机、梯度混合器、20  $\mu$ l 定量环)和 UVD 170U 型紫外检测器; 色谱柱: Diamonsil™ 型  $C_{18}$  色谱分析柱(4.6 mm  $\times$  250 mm); 洗脱液: 25% 乙腈-75% 水(含 0.1% 三氟乙酸); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 228 nm; 进样量: 20  $\mu$ l; 柱温: 30℃。

### 1.3.5 水解物的体外模拟消化<sup>[10]</sup>

取 5 mg 胃蛋白酶和胰酶分别溶于 pH 2.0 盐酸溶液和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)中, 定容至 100 ml 配制成 0.05 mg/ml 胃蛋白酶溶液和胰酶溶液。取 50 mg 杏仁蛋白水解物冻干粉溶于 5 ml 0.05 mg/ml 胃蛋白酶溶液中([E]/[S] = 1:200), 37℃ 水浴振荡反应 3 h, 调节反应体系的 pH 值至中性, 沸水浴灭酶 5 min 终止反应。取 2 ml 经胃蛋白酶消化处理过的溶液, 加入 2 ml 0.05 mg/ml 胰蛋白酶溶液([E]/[S] = 1:200), 37℃ 水浴振荡反应 4 h, 随后反应液在沸水浴灭酶 5 min 终止反应。12000 r/min 离心 15 min 后取上清液冷冻干燥, 进行 ACE 抑制活性的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同蛋白酶水解物对 ACE 抑制作用的研究

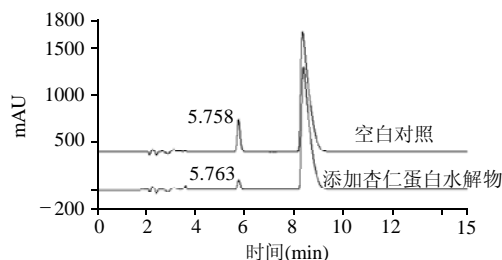


图1 马尿酸生成量的 RP-HPLC 色谱  
Fig.1 RP-HPLC chromatogram indicating hippuric acid content

由图 1 可见, 杏仁蛋白水解物与 ACE 反应生成的马尿酸较空白对照组明显减少, 说明杏仁蛋白水解物对 ACE 有较强的抑制作用。

表 1 6 种蛋白酶的杏仁蛋白水解物(2.5 mg/ml)对 ACE 的抑制作用  
Table 1 ACE-inhibitory activities of hydrolysates (2.5 mg/ml) of almond protein hydrolyzed by six proteases

酶	酶解条件	ACE 的抑制率(%)
Protamex	50℃, pH 7.0	76.09
Proleather FG-F	60℃, pH 10.0	67.50
Alcalase	55℃, pH 8.0	74.62
Neutrase	50℃, pH 7.0	69.08
Flavourzyme	50℃, pH 7.0	4.54
木瓜蛋白酶	55℃, pH 7.0	74.74

食物来源的 ACE 抑制剂一般采用酶法生产,即将食物蛋白用各种蛋白酶进行酶解,通过分离纯化提取酶解产物中具有 ACE 抑制活性的多肽,因此酶的选择是 ACE 抑制剂生产的关键<sup>[14]</sup>。不同酶的酶切位点不同,所产生水解物的功能特性也会有较大差异。本实验中,不同酶水解所得的杏仁蛋白水解物对 ACE 产生了不同的抑制效果。从表 1 可知,各种蛋白酶的杏仁蛋白水解物对 ACE 均有一定的抑制作用,但是差别较大。其中抑制作用最强的是复合蛋白酶 Protamex 水解物,抑制率高达 76.09%,其次为木瓜蛋白酶及 Alcalase、Proleather FG-F 两种碱性蛋白酶的水解物。风味蛋白酶 Flavourzyme 水解物对 ACE 几乎无抑制作用,其抑制率仅为 4.54%。

## 2.2 不同蛋白酶酶解过程的水解进程曲线

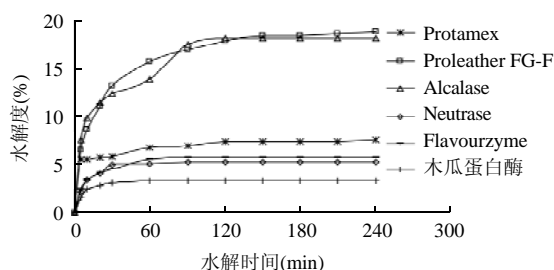


图2 6种蛋白酶酶解杏仁蛋白的水解进程曲线

Fig.2 Hydrolysis course curve of almond protein hydrolyzed by six proteases

在蛋白酶解过程中,酶解产物中多肽物质的结构和组成成分随水解度而变化,因此水解度是影响酶解产物 ACE 抑制活性高低的重要因素<sup>[14]</sup>。较高的水解度能保证较好的蛋白溶出率,水解物中有较多具有活性的肽段。由图 2 可知,Proleather FG-F 和 Alcalase 两种碱性蛋白酶对杏仁蛋白的水解度较大,90min 后即超过 16.90%,水解 120min 后均达 17.80% 以上。随着水解时间进一步延长,水解度基本保持不变。其他四种酶对杏仁蛋白的水解度一直保持在较低水平,木瓜蛋白酶最低,始终维持在 3% 左右。

综合以上 6 种酶酶解杏仁蛋白的水解物对 ACE 抑制作用及水解度大小考虑,选择 Proleather FG-F 和 Alcalase 两种碱性蛋白酶作进一步深入研究。

## 2.3 两种蛋白酶水解物对 ACE 的抑制作用研究

### 2.3.1 最佳酶解时间的确定

据报道,食物蛋白源 ACE 抑制肽的肽链长度一般在 2~15 之间<sup>[10]</sup>。随着酶解时间延长,酶解得到的肽段和游离氨基酸构成比例有所不同,水解物对 ACE 的抑制作用也有所变化。由图 3 可以看出,在水解最初的 90min 内,杏仁蛋白 Proleather FG-F 水解物的 ACE 抑制活性迅速上升,最高达到 68.61%,表明在此阶段 ACE 抑制肽

大量产生。之后呈现下降趋势,可能是由于一些对 ACE 有抑制作用的肽被部分水解,降解成活性较小或失活片段的肽或游离氨基酸;Alcalase 是一种内切酶,在蛋白水解中应用广泛。从图 3 可知,Alcalase 水解杏仁蛋白 30min 时的产物对 ACE 的抑制作用达 58.55%,表明此时水解即得到具有较高 ACE 抑制活性的肽段。随着水解时间的延长,水解物对 ACE 抑制作用略有下降,这可能是因为水解得到的部分肽段被进一步水解成游离氨基酸,导致 ACE 抑制活性降低。90min 后,Alcalase 逐渐水解出底物中更多具有较高活性的肽段,其对 ACE 的抑制率不断增大,到 180min 时最高,达到 75.70%,之后稍有所下降。

根据以上结果,确定 Proleather FG-F 和 Alcalase 酶解杏仁蛋白的最佳水解时间分别为 90min 和 180min。

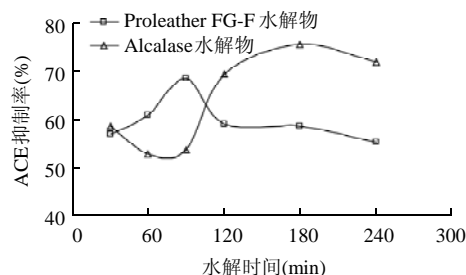


图3 不同酶解时间杏仁蛋白水解物对 ACE 的抑制作用

Fig.3 ACE-inhibitory activities of hydrolysate by Proleather FG-F or Alcalase at different hydrolysis time

### 2.3.2 水解物对 ACE 的半抑制浓度

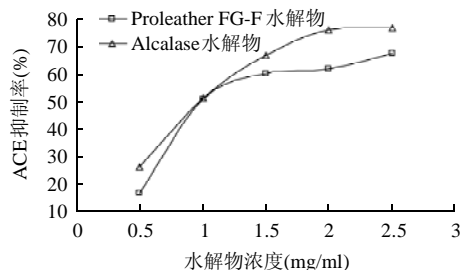


图4 不同浓度杏仁蛋白水解物对 ACE 的抑制作用

Fig.4 ACE-inhibitory activities of hydrolysate by Proleather FG-F or Alcalase at different concentrations

从图 4 可以看出,随着两种酶的水解物浓度增大,其对 ACE 抑制作用也不断增强,当浓度为 1.0mg/ml 时,两种酶的水解物对 ACE 抑制率较为接近。当浓度为 2.5mg/ml 时,水解物对 ACE 抑制率分别达 67.58% 和 76.81%。相同浓度下,Alcalase 酶解产物的 ACE 抑制活性高于 Proleather FG-F 酶解产物。两种酶对杏仁蛋白的水解度相差不大,但其水解物的 ACE 抑制活性却有差别,这可能是酶对底物的特异性及作用位点的差异所造成的。

对图4中数据分别取对数可得相应方程,由方程计算出Proleather FG-F和Alcalase的杏仁蛋白水解产物对ACE的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>,即ACE抑制率为50%时的底物浓度)分别为1.24mg/ml和0.98mg/ml,它们较接近于大豆肽的IC<sub>50</sub>(1.20mg/ml)<sup>[15]</sup>。

## 2.4 水解物的体外模拟消化

为考察杏仁蛋白水解物对胃肠道消化酶的抵抗作用及对ACE有抑制作用的新的物质出现的可能性,在模拟胃肠道消化生理作用的条件下对杏仁蛋白的Proleather FG-F和Alcalase的水解物用消化酶(胃蛋白酶、胰酶)作进一步消化处理,测定消化酶作用前后水解物对ACE抑制作用的变化,评价水解物的消化稳定性,结果见表2。

表2 水解物在消化酶作用前后对ACE抑制作用比较

Table 2 ACE-inhibitory activities of almond protein hydrolysate (2.5 mg/ml) by Proleather FG-F or Alcalase before and after pepsin and trypsin treatment

酶	消化前对ACE的抑制率(%)	消化后对ACE的抑制率(%)
Proleather FG-F	67.58	49.36
Alcalase	76.81	50.35

由表2可知,杏仁蛋白的Proleather FG-F和Alcalase水解物经胃蛋白酶和胰酶连续消化后,对ACE抑制率分别降低了18.22%和26.46%,均在50%左右,仍保持较高抑制活性。由此可见,若应用到药物中,口服这两种酶的杏仁蛋白水解物将有可能发挥降血压作用,但其作用机理有待进一步深入研究。

## 3 结 论

3.1 采用Protamex、Alcalase、Neutrase、Flavourzyme、Proleather FG-F、木瓜蛋白酶水解杏仁蛋白,研究水解物的ACE抑制活性。结果表明,除Flavourzyme外,其他蛋白酶的水解产物对ACE均有较好的抑制作用,浓度为2.5mg/ml时,抑制率均达67%以上。

3.2 Proleather FG-F、Alcalase酶解杏仁蛋白的最佳水解时间分别为90min和180min,对应的水解度分别为

16.91%和18.14%;两种酶的水解物对ACE的IC<sub>50</sub>分别为1.24mg/ml和0.98mg/ml。

3.3 Proleather FG-F、Alcalase酶解杏仁蛋白的水解物经胃蛋白酶和胰酶消化后,ACE抑制活性仍较高,显示出较好的体外消化稳定性。

## 参考文献:

- [1] 金融,王恬,许毅.植物源降血压肽研究进展[J].中国油脂,2007,32(9):22-26.
- [2] 吴琼英,马海乐,骆琳,等.高效液相色谱法测定血管紧张素转化酶抑制剂的活性[J].色谱,2005,23(1):79-81.
- [3] 黄家音,朱禹洁,沈金玉.降血压肽研究进展[J].食品与发酵工业,2006,32(6):81-86.
- [4] 蒋菁莉,任发政,蔡华伟.牛乳酪蛋白降血压肽的超滤分离[J].食品科学,2006,27(7):124-128.
- [5] WANG W Y, DE MEJIA E G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2005(4): 63-78.
- [6] JE J Y, PARK P J, KWON J Y, et al. A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 7842-7845.
- [7] XIA S H, WANG Z, XU S Y. Characteristics of *Bellamy purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 1188-1196.
- [8] 辛志宏,马海乐,吴守一,等.从小麦胚芽蛋白中分离和鉴定血管紧张素转化酶抑制肽的研究[J].食品科学,2003,24(7):130-133.
- [9] YANG Y J, TAO G J, LIU P, et al. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 7891-7895.
- [10] 黎观红.食物蛋白源血管紧张素转化酶的研究[D].无锡:江南大学,2006.
- [11] 刘宁,朱振宝,仇农学,等.苦杏仁蛋白提取工艺优化及氨基酸分析[J].中国油脂,2008,33(1):26-29.
- [12] ADLER-NISSEN J. Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- [13] WU J P, ALUKO R E, MUIR A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 950: 125-130.
- [14] 毕昊,刘志国,屈伸,等.米糠蛋白酶解产物中血管紧张素转化酶抑制剂的活性研究[J].华中科技大学学报:医学版,2005,34(5):699-702.
- [15] 吴建平,丁霄霖.大豆降血压肽的研制(I)——生产高活性ACE I肽酶系的筛选[J].中国油脂,1998,23(2):49-51.