

# 分步酶解酪蛋白制备小分子 ACE 抑制肽

王桂春<sup>1</sup>, 吕 兵<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 常熟市金城食品添加剂有限公司, 江苏 常熟 215531)

**摘 要:** 通过模拟胃肠道消化, 采用单酶和复合酶分步水解酪蛋白获得小分子的血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制肽。首先通过胃蛋白酶水解条件的优化获得具有高 ACE 抑制活性肽。然后以此为底物通过胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶复合酶水解条件优化获得具有高 ACE 抑制活性的小分子肽。结果表明: 第一步的胃蛋白酶水解最优条件为:  $[E]/[S]=6\%$ 、 $[S]=0.015\text{ g/mL}$ 、 $\text{pH}=1.8$ 、 $t=37^\circ\text{C}$ 、 $t=2\text{ h}$ , 水解产物稀释 10 倍后 ACE 抑制率为 84.5%, 分子质量集中在 2000D 以下; 第二步的复合酶水解最优条件为:  $m$  胰蛋白酶(6%): $m$  胰凝乳蛋白酶(3%)=2:1、 $\text{pH}=7.8$ 、 $t=48^\circ\text{C}$ 、 $t=5\text{ h}$ , 水解产物稀释 10 倍后 ACE 抑制率为 85.9%, 分子质量集中在 500D 以下。研究表明, 通过分步酶解选择合适的酶解条件可以获具有较高 ACE 抑制活性的小分子肽。

**关键词:** 酪蛋白; 血管紧张素转化酶(ACE); 活性肽; 分步水解

## Preparation of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Peptides with Low Molecular Mass from Casein by Stepwise Enzymatic Hydrolysis

WANG Gui-chun<sup>1</sup>, LÜ Bing<sup>1,2</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Changshu Jincheng Food Additive Co. Ltd., Changshu 215531, China)

**Abstract:** The aim of this study was to prepare ACE inhibitory peptides with low molecular mass from casein by stepwise hydrolysis with a single enzyme followed by double enzymes as a mimic for the gastrointestinal tract digestive system. Peptides with high ACE inhibitory activity were first produced by hydrolyzing casein under optimized operating conditions and then further hydrolyzed by trypsin and chymotrypsin together into small peptides still having high ACE inhibitory activity. The optimal conditions for pepsin hydrolysis were enzyme/substrate ratio of 6%, substrate concentration of 0.015 g/mL, initial hydrolysis pH of 1.8, hydrolysis temperature of  $37^\circ\text{C}$  and hydrolysis time of 2 h, and the ACE inhibitory rate of the 10-fold diluted hydrolysate obtained was 84.5%. The optimal conditions for further hydrolysis by trypsin and chymotrypsin together were trypsin/chymotrypsin ratio of 2:1 ( $m/m$ ), initial hydrolysis pH of 7.8, hydrolysis temperature of  $48^\circ\text{C}$  and hydrolysis time of 5 h, and the resulting 10-fold diluted hydrolysate showed an ACE inhibitory rate of 85.9% and a molecular mass of less than 500 D. Thus, the stepwise enzymatic hydrolysis process proposed in this study can enable the preparation of casein-derived small peptides with high ACE inhibitory activity.

**Key words:** casein; angiotensin-converting enzyme (ACE); active peptide; stepwise hydrolysis

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0152-04

近来研究表明寡肽比氨基酸具有更好的吸收性能, 且营养和生理效果更为优越, 不仅如此, 许多肽还具有原蛋白质或其组成氨基酸所没有的功能, 其中多肽的降血压作用越来越引起人们的重视。

ACE 是调节人体血压系统的重要酶, 理论上具有 ACE 抑制作用的多肽在患有高血压的动物体内可起到降低血压的作用, 大量的实验证明乳蛋白来源的 ACE 抑制肽具有较高的体内降压作用<sup>[1-3]</sup>, 且主要集中在小分子的肽类, Oshima 等<sup>[4]</sup>最早报道食品蛋白源 ACE 抑制肽是由细

菌胶原酶降解明胶获得的 6 条活性肽, 并证实抑制 ACE 活性的肽分子质量主要集中在 1500u 以下。2000—2006 年间 Fujita 等<sup>[5]</sup>、Miguel 等<sup>[6]</sup>研究发现, 对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)分别饲喂蛋清蛋白酶解多肽、未水解蛋清和自来水发现, 多肽的降压作用明显高于后两者, 蛋清蛋白有微小的降压作用。国外已经出现了胃肠道模拟制备降压肽的报道<sup>[7]</sup>, 国内文献报道<sup>[8-9]</sup>的多利用胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶单酶水解制备降压肽, 而胃肠道模拟消化只是为

收稿日期: 2011-01-17

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009572)

作者简介: 王桂春(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为乳品生物技术。E-mail: wgc10000@163.com

了评判 ACE 抑制肽的抗体内消化稳定性。本研究以此为出发点,通过模拟胃肠道消化,对分步酶水解条件进行优化,从而获得具有高 ACE 抑制活性的小分子肽,以填补国内模拟胃肠道消化制备降压肽的空白,同时为后续的动物实验、多肽的分离纯化及结构鉴定做好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酪蛋白、胃蛋白酶、胰蛋白酶 国药集团化学试剂有限公司;胰凝乳蛋白酶 上海楷洋生物技术有限公司;福林酚试剂 上海荔达生物科技有限公司;马尿酸组氨酰亮氨酸(Hip-His-Leu, HHL)、ACE 美国 Sigma 公司;其他试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

PE20 pH 计 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;DKZ-450A 型恒温振荡水浴锅 上海森信实验仪器有限公司;TDL-5A 低速台式大容量离心机 江苏无锡瑞江离心机厂;UV-1100 型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;RH basic 1 磁力搅拌器 德国 IKA 公司;Waters 6000 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件) 美国 Waters 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 蛋白酶活力测定

参考 SB/T 10317—199《蛋白酶活力测定法》<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.2 酪蛋白的预处理

胃蛋白酶水解,取酪蛋白加去离子水,沸水中变性 10min,调节 pH 值后加酶;胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶水解,取一定量的酪蛋白溶于去离子水中,加 1mol/L 的 NaOH 溶液助溶,在 3/3 档磁力搅拌器上加热完全溶解后定容得酪蛋白悬浊液,调节 pH 值后加酶。

#### 1.3.3 单酶水解条件优化

酶解反应在恒温振荡水浴槽中进行,酶解反应完成后沸水浴 10min 灭酶,4000r/min 离心得上清液,参照文献<sup>[11]</sup>,以甲醛法测定水解液的水解度,确定 3 种酶的最适条件。方法如下:将水解上清液转移至 100mL 的小烧杯里,加入 30mL 去 CO<sub>2</sub> 蒸馏水,电磁搅拌同时 pH 计指示 pH 值的变化,用 NaOH 溶液调节 pH8.2 后加入 10mL 中性甲醛溶液,1min 后用 0.05mol/L 的 NaOH 溶液滴定至 pH9.2,并记录所消耗的 NaOH 溶液体积,同时做空白实验,水解度(degree of hydrolysis, DH)计算公式如下:

$$DH = \frac{\rho(V_i - V_0) \times 1000}{c \times 25 \times 10/V} - 0.45 \times 100 \quad (1)$$

8.2

式中:  $c$  为滴定用 NaOH 溶液的浓度/(mol/L);  $V_i$ 、 $V_0$  分别为样品、空白滴定所消耗 NaOH 溶液的体积/mL;  $\rho$  为酪蛋白溶液的质量浓度/(mg/mL);  $V$  为酶解上清液的体积/mL; 0.45、8.2 分别为每克酪蛋白所含的游离氨基和肽键的毫摩尔数/(mmol/g)。

在一定的反应时间内,以水解度为指标确定 3 种酶水解酪蛋白的最适 pH 值和温度;然后以 ACE 抑制率为指标确定胃蛋白酶水解具有最高抑制活性的时间。

#### 1.3.4 复合酶水解条件优化

模拟胃肠道消化<sup>[12-13]</sup>,取胃蛋白酶在较优条件下的水解产物继续水解,按实验设计的酶比加入胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶,反应不同时间取样测定水解产物的 ACE 抑制活性,确定较优的复合酶比例及时间。

#### 1.3.5 高 ACE 抑制活性水解产物分子质量分布

以上两步水解确定的最优条件水解酪蛋白,取不同时间的产物测定上清液的 ACE 抑制活性,用 HPLC 法测定产物的分子质量分布。

色谱条件:色谱柱:TSKgel 2000 SWXL(300mm × 7.8mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈-水-三氟乙酸(体积比 45:55:0.1);检测波长:UV 220nm;流速:0.5mL/min;柱温:30  $^{\circ}$ C。

分子质量校正所用标准品为:1) 细胞色素 c (Mw12384D); 2) 杆菌酶(bacitracin, Mw1450D); 3) 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(Gly-Gly-Tyr-Arg, Mw451D); 4) 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(Gly-Gly-Gly, Mw18D)。

#### 1.3.6 ACE 抑制活性测定方法

参考 Nakamura 等<sup>[14]</sup>检测方法进行测定,终止反应后于各试管中加入乙酸乙酯 1.4mL,混匀后离心(4000r/min, 10min),吸取 800  $\mu$ L 乙酸乙酯层于试管中,沸水浴中挥发溶剂约 30min,取出冷却后加入 2mL 去离子水,漩涡混合 1min 后在 228nm 波长条件下测定其吸光度,计算公式如下:

$$ACE \text{ 抑制率} \% = \frac{A_b - A_a}{A_b - A_c} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_a$  为加入抑制剂的样品管吸光度;  $A_b$  为加入缓冲液的样品管吸光度;  $A_c$  为反应前灭酶的样品管吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶活力

表 1 蛋白酶的酶活力

Table 1 Activity of three proteases used in this study

酶种类	胃蛋白酶	胰蛋白酶	胰凝乳蛋白酶
酶活力/(U/g)	581633	255957	496233

由表 1 可知,胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的酶活力相

对较高, 胰蛋白酶活力相对低一些。

## 2.2 单酶水解 pH 值优化

除 pH 值外, 各种酶的水解条件如下, 胃蛋白酶水解:  $[S]=0.015\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=6\%$ 、 $t=37^\circ\text{C}$ ; 胰蛋白酶水解:  $[S]=0.055\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=4\%$ 、 $t=50^\circ\text{C}$ ; 胰凝乳蛋白酶:  $[S]=0.04\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=2\%$ 、 $t=45^\circ\text{C}$ , 在不同的 pH 值条件下反应 2 h 后测定水解度, 结果见图 1。

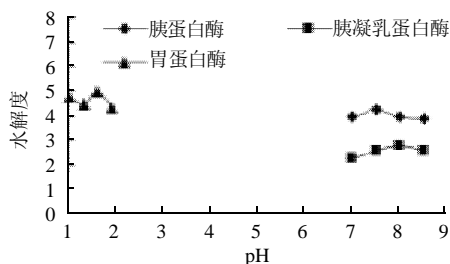


图 1 pH 值对酪蛋白酶解的影响

Fig.1 Effect of hydrolysis pH on degree of hydrolysis of casein

溶液的 pH 值会影响酶的构象和酶的氨基酸侧链基团以及底物解离状态, 从而影响酶活力。图 1 表明胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的最适 pH 值分别在 1.8、7.5、8.0。而胃蛋白酶在 pH1.0 和 pH1.8 时都具有较高的水解度, 可能是由于反应过程中 pH 值上升, pH1.0 条件下能较长时间处于酶的适宜 pH 值范围内, 而 pH1.8 条件下开始时反应较快, 反应一段时间后 pH 值升高导致酶活力降低, 故选择 pH1.8 作为胃蛋白酶的最适反应 pH 值。胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶反应的最适 pH 值分别为 7.5 和 8.0, 第二步的复合酶解参考后两者取 pH=7.8。

## 2.3 单酶水解温度优化

参考文献[15-16], 各种酶的水解条件如下, 胃蛋白酶水解:  $[S]=0.015\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=6\%$ 、pH=1.8; 胰蛋白酶水解:  $[S]=0.05\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=4\%$ 、pH=7.5; 胰凝乳蛋白酶水解:  $[S]=0.04\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=2\%$ 、pH=8.0, 在不同的温度条件下反应 2 h 后测定水解度, 结果见图 2。

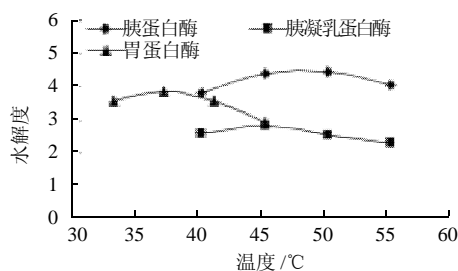


图 2 温度对酪蛋白水解的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis temperature on degree of hydrolysis of casein

由于酶结构、耐热性和催化机理的不同, 各种酶

最适温度也会有较大的差异。温度的升高有利于反应速度的加快, 导致酶结构的改变, 甚至会导致其变性失活, 从图 2 可以看出, 胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的最适温度依次为 37、50 °C 和 45 °C, 第二步的复合酶解参考后两者取  $t=48^\circ\text{C}$ 。

## 2.4 水解时间对胃蛋白酶产物的 ACE 抑制活性的影响

胃蛋白酶水解条件,  $[S]=0.015\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=6\%$ 、pH=1.8、 $t=37^\circ\text{C}$ , 不同时间取样测定水解液的 ACE 抑制率, 结果见图 3。

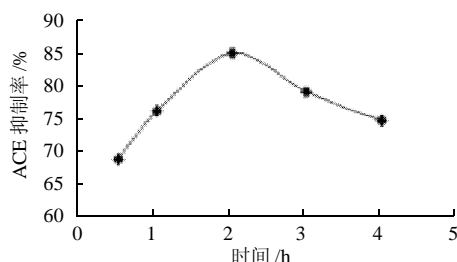


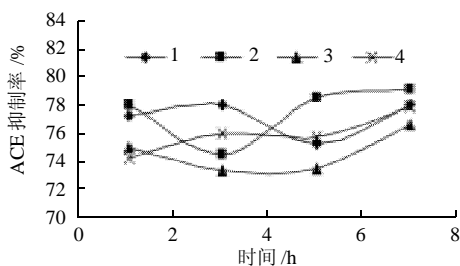
图 3 水解时间对 ACE 抑制活性的影响

Fig.3 Effect of pepsin hydrolysis time on ACE inhibitory activity of casein hydrolysates

由图 3 可知, 胃蛋白酶反应 2 h 时水解产物的 ACE 抑制率最高, 随着时间的增加, ACE 抑制活性逐渐降低, 可能是具有 ACE 抑制活性的肽被水解成无 ACE 抑制活性的肽段, 导致抑制活性下降, 这与文献报道<sup>[16]</sup>类似, 故取胃蛋白酶水解 2 h 的产物继续水解。

## 2.5 胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶复合酶比例和酶解时间的确定

胃蛋白酶反应条件,  $[S]=0.015\text{g/mL}$ 、 $[E]/[S]=5\%$ 、pH=1.8、 $t=37^\circ\text{C}$ 、 $t=2\text{h}$ , 水解液 ACE 抑制率为 78%, 调节 pH=7.8 分别按以不同添加量比例加入胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶两种复合酶, 48 °C 条件下反应不同时间取样测定其 ACE 抑制率, 结果如图 4 所示。



1.  $m$  胰蛋白酶(8%): $m$  胰凝乳蛋白酶(2%)=4:1; 2.  $m$  胰蛋白酶(6%): $m$  胰凝乳蛋白酶(3%)=2:1; 3.  $m$  胰蛋白酶(5%): $m$  胰凝乳蛋白酶(5%)=1:1; 4.  $m$  胰蛋白酶(3%): $m$  胰凝乳蛋白酶(6%)=1:2。

图 4 酪蛋白水解液的 ACE 抑制活性

Fig.4 Effect of trypsin/chymotrypsin ratio on ACE inhibitory activity of casein hydrolysates as a function of hydrolysis time

由图 4 可知, 添加不同复合酶比例的水解产物 ACE 抑制率先降后升, 除  $t=3\text{h}$  外,  $m$  胰蛋白酶(6%): $m$  胰凝乳蛋白酶(3%)=2:1

的水解产物 ACE 抑制率最高, 故选取  $m$  胰蛋白酶(6%):  $m$  胰凝乳蛋白酶(3%)=2:1 作为复合酶添加量, 5h 后 ACE 抑制率趋于稳定, 故第二步的复合酶水解时间选择 5h。

## 2.6 最优条件下水解产物及分子质量分布

第一步, 胃蛋白酶水解条件,  $[S]=0.015\text{ g/mL}$ ,  $[E]/[S]=6\%$ ,  $\text{pH}=1.8$ ,  $t=37^\circ\text{C}$ ,  $t=2\text{h}$ , 第二步,  $m$  胰蛋白酶(6%):  $m$  胰凝乳蛋白酶(3%)=2:1,  $\text{pH}=7.8$ ,  $t=48^\circ\text{C}$ , 不同时间取样测定水解产物的 ACE 抑制率。第一步水解产物 ACE 抑制率为 84.5%, 第二步水解产物 ACE 抑制率如图 5 所示。

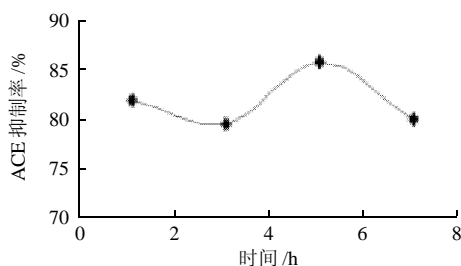


图 5 酪蛋白水解液的 ACE 抑制活性

Fig.5 Effect of dual-enzyme hydrolysis time ACE inhibitory activity of casein hydrolysates

由图 5 可知, ACE 抑制活性先降低再升高, 当  $t=5\text{h}$  时产物的 ACE 抑制活性最大为 85.9%, 这与与 2.3 节中所出现的趋势一致, 可重复性好。分别取第一步水解产物和第二步水解 5h 的产物进行分子质量测定。二者的分子质量分布分别如图 6、7 所示。

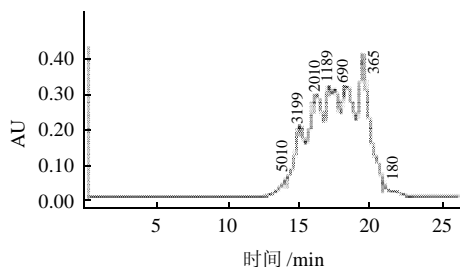


图 6 胃蛋白酶水解产物分子质量分布

Fig.6 Molecular weight distribution of hydrolysates obtained after pepsin hydrolysis

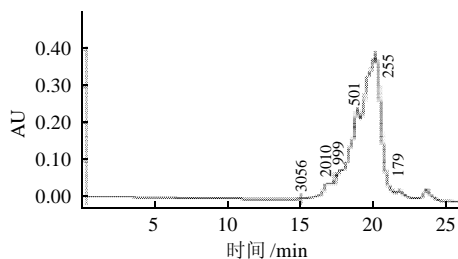


图 7 复合酶水解产物分子质量分布

Fig.7 Molecular weight distribution of hydrolysates obtained after dual-enzyme hydrolysis

由图 6、7 可知, 第一步水解产物分子质量主要集

中在 1000D 左右, 而第二步的复合酶水解产物分子质量主要集中在 500D 以下。有研究发现二肽或者三肽由于能够抵抗胃肠道肽酶的作用, 直接被吸收, 从而能有效的发挥降血压作用。经过两步水解之后, 抑制活性稍有增加, 分子质量大大减小, 这为研究小分子肽的体内降压作用提供了一定的研究方向。

## 3 结 论

酪蛋白经第一步的胃蛋白酶水解 2h 时产物具有较高的 ACE 抑制活性, 水解液 10 倍稀释后 ACE 抑制率为 84.5%, 分子质量集中在 2000D 以下; 第二步的  $m$  胰蛋白酶(6%):  $m$  胰凝乳蛋白酶(3%)=2:1 条件下水解 5h 时产物 10 倍稀释后的 ACE 抑制率为 85.9%, 分子质量集中在 500D 以下。通过进一步对具有降压作用的水解产物进行分离纯化和小分子肽类的结构分析, 可以为构造小分子降压肽的结构模型提供一定的理论基础。

## 参考文献:

- [1] KIM Y K, CHUNG B H. A novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from human  $\alpha_{s1}$ -casein[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(7): 575-578.
- [2] HAQUE E, CHAND R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk protein[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(1): 7-15.
- [3] 霍建新, 赵征. 瑞士乳杆菌 TUST005 发酵乳 ACE 抑制活性的检测[J]. 中国农学报, 2009, 25(2): 33-38.
- [4] OSHIMA G, SHIMABUKURO H, NAGASAWA K. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 566(1): 128-137.
- [5] FUJITA H, YAMAGAMI T, OHSHIMA K. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects[J]. Nutr Res, 2001, 21(8): 1149-1158.
- [6] MIGUEL M, ALEIXANDRE M A, RAMOS M, et al. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(3): 726-731.
- [7] VERCRUYSSSE L, SMAGGHE G, MATSUI T, et al. Purification and identification of an angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the gastrointestinal hydrolysate of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(8): 900-904.
- [8] 范远景, 姬莹莹, 张焱. 大豆蛋白酶解肽的分子量分布及抑制 ACE 活性关系研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 57-61.
- [9] 沈要林. 酶解酪蛋白制备血管紧张素转化酶抑制肽(ACEIP)的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2007.
- [10] 上海市酿造科学研究所. SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65-67.
- [12] 姜詹梅, 吴刚, 刘丽波, 等. 酪蛋白源降血压肽稳定性及其抑制作用机理的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 249-252.
- [13] 江小云, 潘道东. 乳蛋白水解产生肽工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 360-363.
- [14] NAKAMURA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme[J]. J Dairy Sci, 1995, 78(6): 1253-1257.
- [15] 王艳萍, 刘鹏, 白小佳. 酪蛋白糖巨肽的制备及其多对变形链球菌的抑菌特性[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(5): 14-17.
- [16] 姜詹梅. 酶解酪蛋白生产 ACE 抑制肽[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.