

瑞士乳杆菌发酵法制备乳清蛋白源性 ACE 抑制肽的研究

郭宇星¹, 陈庆森^{1,*}, 赵林森², 杨晓威²

(1. 天津市食品生物技术重点实验室 天津商学院生物技术与食品科学学院 天津 300134;
2. 石家庄市兄弟伊兰香精香料有限公司 河北 石家庄 050000)

摘要:利用益生菌发酵法制备 ACE 抑制肽(Angiotensin I-Convert ing Enzyme (ACE) i nhi bi tory pepti des)已成为近年来研究的新热点,对于功能性食品的开发具有十分重要的意义。本文以瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)为发酵菌种,研究了其水解乳清蛋白的能力及发酵产物的 ACE 抑制活性。研究发现发酵产品在瑞士乳杆菌对数生长期收获时为最佳,16h 收获时 ACE 抑制率达到 44.17%,活菌数为 10^7 CFU/ml。发酵产品超滤结果显示,用 10000D 分子量膜超滤后,其 ACE 抑制活性比未超滤前提高 2.5 倍,IC₅₀ 达到 19.63 μ g/ml。最后对发酵产品进行喷雾干燥和冷冻干燥,发现这两种干燥方法对产品 ACE 抑制活性没有影响,冷冻干燥的方法产率比较高,可达到 106.08g/L,且 IC₅₀ 为 50.28 μ g/ml。

关键词: 瑞士乳杆菌; 乳清蛋白; 蛋白水解能力; ACE 抑制活性

ACE Inhi bi tory Pepti des of Whey Protei n Fermentati on wi th *Lactobacillus helveticus*

GUO Yu-xi ng¹, CHEN Qi ng-sen^{1,*}, ZHAO Li n-sen², YANG Xi ao-wei²

(1. Ti anj i n Key Laboratory of Food Bi otechnol ogy, Col l ege of Bi o-technol ogy and Food Sci ence, Ti anj i n Uni versi ty of Commerce, Ti anj i n 300134, Chi na; 2. Shi j i azhuang Brothers Industry and Commerce Co. Ltd., Shi j i azhuang 050000, Chi na)

Abstract :Prepari ng the Angi otensi n Convert ing Enzyme (ACE) i nhi bi tory pepti des fermented by probi oti c has become a new hot pot i n recent years, and i t was si gni fi cant to the devel opment of the functi onal food market. Proteol yti cacti vi ty of *Lactobacillus helveticus* was studi ed i n thi s arti cl e and the ACE-i nhi bi tory acti vi ty of the products was al so researched. I t showed that the products harvested i n the peri od of l ogar i thm growth have better performance. After 16h fermentati on, the ACE-i nhi bi tory acti vi ty reached to 44.17% and cell count was 10^7 CFU/ml i n the products. The ACE-i nhi bi tory acti vi ty of the product ul tra fi l t rated

收稿日期:2006-03-28

*通讯作者

基金项目: 国家重大科技攻关专项计划项目(2002BA518A06)

作者简介: 郭宇星(1981-),女,硕士研究生,研究方向为发酵生物技术、生物活性物质。

- di gests of soybean protei n[J]. Journal of Agri cul ture and Food Chemi stry, 1996, 44: 2617-2623.
- [7] 荣建华, 李小定, 等. 大豆肽体外抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118-120.
- [8] 张强, 阚国仕, 等. 玉米抗氧化肽的分离制备及其体外抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(5): 36-39.
- [9] Amado R, Arri goni E. Nutri tive and functi onal properti es of wheat germ [J]. Int Food Ingredi ents, 1992, (4): 30-34.
- [10] Atughonu A G, Zayas J F, Heral d T J, et al. Thermo-rheol ogy, qual i ty characteri sti cs, and mi crostructure of frankfurters prepared wi th sel ected pl ant and mi lk addi ti ves[J]. Journal of Food Qual i ty, 1998, 21(3): 223-238.
- [11] Jens Aadl er-Ni ssen. Enzymi c hydrol ysi s of food protei ns[M]. El sevi er Appl i ed Sci ence Publ i shers, 1986.
- [12] Yu W, Zhao Y, Xue Z, et al. The anti oxidant properti es of lycopene concentrate extracted from tomato paste[J]. Journal of the Ameri can Oil Chemi sts Society, 2001, 78: 697-701.
- [13] Shi mada K, Fuj i kawa K, Yahara K, et al. Anti oxidati ve properti es of xanthum on the autoxi dati on of soybean oi l i n cycl odextri n emul si on [J]. Journal of Agri cul tural and Food Chemi stry, 1992, 40: 945-948.
- [14] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002.

by 10000D molecular weight membrane is 2.5 times higher than is the product that not ultrafiltrated. The IC_{50} reaches to 19.63 μ g/ml. Finally two methods of dryness are studied, one is spray-dry and the other is freeze-dry. ACE-inhibitory activity of the products is not affected by these two methods. Output of the product made by the freeze-dried method is higher: it reaches to 106.08g/L, and IC_{50} of the product is 50.28 μ g/ml.

Key words: *Lactobacillus helveticus*; whey protein; proteolytic activity; ACE-inhibitory activity

中图分类号: 0514.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)06-0151-04

血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme, 简称 ACE)^[1]是使血压升高的一个关键性酶, 可以将血管紧张素 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Leu-Val-Ile-His) 转换成血管紧张素 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) 血管紧张素可加强心肌的收缩力, 并同时使血管平滑肌收缩, 造成血压上升。ACE 抑制肽主要是通过抑制 ACE 的活性来实现降压的作用。ACE 抑制肽可从多种植物蛋白和动物蛋白中通过酶解或微生物水解所获得, 目前已有许多相关的报导^[1-8]。本实验室现正致力于乳清蛋白源性 ACE 抑制肽的开发, 已取得了一定的成果, 这对乳清蛋白的开发以及构建功能性食品都具有很重要的意义。本文以乳清粉为原料, 瑞士乳杆菌为发酵菌种, 研究发现其发酵产品中具有较高的 ACE 抑制活性。本文研究了发酵过程中 ACE 抑制肽的产生情况, 并用超滤的方法分析了 ACE 抑制肽的分子量分布范围, 最后对产品进行干燥。

1 材料与方法

1.1 试剂

乳清粉(D-40 Bonlac) 蛋白质 > 11.5%、脂肪 < 1%、乳糖 > 79.4%、灰分 < 6.5%、水分 < 3%; 25mg Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu) 美国Sigma公司; 0.1Unit ACE(Angiotensin converting enzyme from rabbit lung) 美国Sigma公司; hepes 上海生工; 邻苯二甲醛(OPA, 分析纯) 天津厚普。

1.2 菌种

瑞士乳杆菌 本实验室保藏菌种。

1.3 仪器

上海新星 HGY- 型迴转式恒温调速摇瓶柜; 上海智诚 HWY211 恒温摇床柜; 日立 HITACHI 850 荧光分光光度仪; 三洋全自动灭菌锅; OLYMPUS 显微镜; MILLIPORE 不锈钢平板式过滤器; EYELA 喷雾干燥器 SD-1000; 郑州长城 FD- 冷冻干燥机; 飞鸽牌低速大容量冷冻离心机。

1.4 培养基

1.4.1 瑞士乳杆菌斜面保藏培养基: 牛肉膏 0.5%; 酵母膏 0.5%; 蛋白胨 1%; 葡萄糖 1%; 乳糖 0.5%; 氯化钠 0.5%; 琼脂 2%; 调 pH 至 6.8。

1.4.2 发酵培养基: 复原乳清粉培养基配制成为一定浓度, 115 灭菌 30min。

1.5 方法

1.5.1 产品生产工艺

10% 乳清粉(pH5.5, 115 , 30min 灭菌) 冷却(40 左右) 接种(1.5%) 恒温静止培养(33) 发酵完成后取出, 产品干燥。

1.5.2 游离氨基酸测定 采用邻苯二甲醛荧光法, 见参考文献[9]。

1.5.3 ACE 抑制活性的测定^{[2][6-8][10]}

试管中加入 200 μ l 的 5mmol/L Hip-His-Leu 溶液(6.7mmol/L HHL, 50mmol/L HEPES, 300mmol/L NaCl, 定容至 50ml, 调 pH 值至 8.3)和 100 μ l 的样品, 于 37 下保温 3min 后, 再加入 20 μ l ACE 溶液(溶解于蒸馏水中, 活力为 0.1U/ml), 混匀后在 37 下保温 30min, 再加入 250 μ l 的 1.0N 盐酸溶液以终止反应, 再加入 1.7ml 醋酸乙酯, 经 15s 振荡混匀后, 离心(4000r/min 离心 15min), 用移液管吸取 1.0ml 的醋酸乙酯层, 在 120 的烘箱中经 30min 蒸干, 再将它重新溶于 3ml 的去离子水中, 在 228 nm 处测定吸光度。

在上述条件下, ACE 抑制率 = $[(B-A)/(B-C)] \times 100\%$ 。

IC_{50} 为抑制 50% 的 ACE 活性所需抑制剂的浓度。

其中 A 为样品和 ACE 溶液反应的吸光度; B 为不含样品, 但含有 ACE 溶液, 即对照; C 为抑制剂与酶都不存在时的光密度, 即空白。

1.5.4 超滤

发酵液取出, 离心(4000r/min, 20min), 取上清液做超滤分析。选用 10000D 截留分子量超滤膜, 142mm 平板式不锈钢过滤器进行, 压力维持在 4kPa。

1.5.5 喷雾干燥

进口温度调至 140 左右, 出口温度调至 90 , 风速维持在 0.9m³/min, 压力 9kPa。当出口温度上升到 90 , 打开泵开关, 开始进样, 维持出口温度 90 。

1.5.6 冷冻干燥

把发酵产品放置冰箱中冷冻一夜, 取出放入冷冻干燥机, 温度维持在 -50 , 冷冻干燥 24h 取出。

2 结果与分析

2.1 瑞士乳杆菌形态观察

实验证实了瑞士乳杆菌属革兰氏阳性无芽孢菌，微好氧，最适生长温度为 30~42℃，最适生长 pH 为 4.5~7.5，发酵葡萄糖产生 DL 型乳酸。图 1、2 为瑞士乳杆菌纯培养物显微镜照片。



图1 100倍照片
Fig.1 Photograph of 100 x

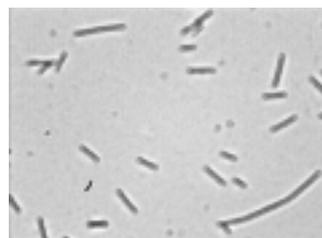


图2 40倍照片
Fig.2 Photograph of 40 x

从瑞士乳杆菌显微镜照片可以看出，瑞士乳杆菌呈短杆状，链状排列。

2.2 瑞士乳杆菌蛋白酶活力测定

2.2.1 瑞士乳杆菌菌体制备 取对数生长期发酵物，离心(4000r/min, 20min)，用 pH7.0 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤菌体三次，再将菌体制成 1g/ml 的悬浮液。

2.2.2 将处理后的菌液 1ml，于 37℃ 水浴预热 2min，再加同样预热的 12% 乳清蛋白溶液 2ml，反应 1h 后，加 24% 的 TCA 1ml 中止反应。4000r/min 离心 20min，取上清液测定游离氨基酸含量。

空白管：空白先加 24% 的 TCA 1ml 和 12% 乳清蛋白溶液 2ml，摇匀后，再加菌液 1ml，以下操作同样品管。

2.2.3 酶活定义 37℃，1h 分解乳清蛋白生成 0.1μg 游离氨基酸定义为一个活力单位。经测定瑞士乳杆菌蛋白酶活力为 5 U。

2.3 瑞士乳杆菌发酵过程中 ACE 抑制活性变化曲线

按 1.5.1 工艺制作瑞士乳杆菌发酵产品，测定不同发酵时间的发酵液的 ACE 抑制活性，结果见图 3。

从图 3 中可以看出，前 5h 瑞士乳杆菌生长处于迟

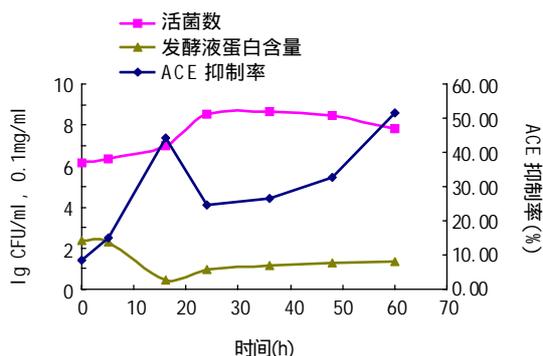


图3 发酵过程中 ACE 抑制率变化情况
Fig.3 Evolution of ACE-inhibitory activity during fermentation

缓期，发酵液中蛋白含量并无明显减少，ACE 抑制活性较低；当瑞士乳杆菌生长进入对数生长期后，菌体生长旺盛，细胞壁蛋白酶活性高，乳清蛋白不断被水解，从图中还可以看出，发酵液中蛋白含量不断下降，随着乳清蛋白被不断水解，发酵液中短肽含量随之提高，ACE 抑制率也相应升高，在发酵 16h 后抑制率达到 44.17%；随着菌体的生长，发酵液中短肽进入细胞中，由胞内肽酶再进一步水解成氨基酸，用于菌体的生长，所以在 16h 后，发酵液中短肽含量有一段短暂的减少过程，同时 ACE 抑制率也下降；24h 后菌体生长进入稳定期，瑞士乳杆菌发酵代谢产物也逐渐产生，发酵液中短肽和游离氨基酸含量不断积累，从图中可见发酵液中蛋白含量上升，同时，ACE 抑制率也升高；60h ACE 抑制率达到最高为 51.94%。总之，从实验结果可以看出，ACE 抑制肽的产生和菌体发酵过程是相关的，为了保证瑞士乳杆菌生长的活力，研究确定 ACE 抑制产品最佳的收获时间是发酵进行到 16h，此时，发酵液中 ACE 抑制率为 44.17%，活菌数达到 10^7 。

2.4 超滤分析

按 2.1 工艺制作发酵产品，16h 后收获产品，发酵液经 4000r/min, 20min 离心，取上清液做超滤分析，超滤结果见图 4。

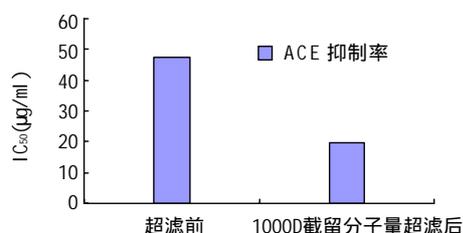


图4 超滤前后发酵液 ACE 抑制率比较
Fig.4 Comparison of ACE-inhibitory activity before and after ultrafiltration

从图 4 可以看出，超滤后发酵液的 ACE 抑制率比超滤前 ACE 抑制率提高了 2.5 倍， IC_{50} 达到了 19.63μg/ml，

因此研究确定 ACE 抑制肽主要集中在 10000D 分子量以下。

2.5 终产品干燥方式的确定

按 2.1 工艺制作发酵产品, 16h 后收获产品, 通过喷雾干燥和冷冻干燥两种方法来干燥产品, 最后产品的 ACE 抑制率和产品得率见表 1、表 2 所示:

表 1 不同干燥产品 ACE 抑制率比较

Table 1 Comparison of ACE-inhibitory activity of the two dryness products

	未干燥 IC ₅₀ (μg/ml)	喷雾干燥 IC ₅₀ (μg/ml)	冷冻干燥 IC ₅₀ (μg/ml)
A	50.43	56.07	54.89
B	47.65	53.03	50.28

注: A 为直接收获发酵液, B 为发酵液经离心去除菌体后上清液。

表 2 不同干燥产品得率比较

Table 2 Comparison of yield of the two dryness products

	喷雾干燥(g/L)	冷冻干燥(g/L)
A	41.25	85.80
B	47.30	106.08

注: A 为直接收获发酵液, B 为发酵液经离心去除菌体后上清液。

从表 1 可看出, 产品经喷雾干燥和冷冻干燥后 ACE 抑制率并没有受明显影响, 说明发酵产品对热较稳定。从表 2 产品得率看出, 冷冻干燥的方法较喷雾干燥的方法要好一些, 产品干燥时不会损失。因此, 研究确定需用冷冻干燥方法较好。

2.6 产品描述

发酵培养基采用 10% 的乳清粉, 初始 pH 调至 5.5, 灭菌(115℃, 30min), 1.5% 接种量接入瑞士乳杆菌发酵剂(10⁶CFU/ml), 33℃ 静止培养 16h 后取出, 发酵液 ACE 抑制率为 44.17%, 活菌数为 10⁷CFU/ml, 发酵液 pH 为 3.83, 发酵液成黄绿色, 有奶香。产品冷冻干燥, 产率为 106.08g/L, IC₅₀ 为 50.28μg/ml (注: 实验获得的冻干产品未经超滤纯化处理)。

3 结论与讨论

3.1 研究证实了瑞士乳杆菌在益生菌中属于蛋白水解能力较强的菌种, 蛋白酶具有特异性, 具有水解乳清蛋白产生 ACE 抑制肽的能力, 通过超滤方法的初步分析确

定 ACE 抑制肽分子量在 10000D 以下。

3.2 本实验的研究结果表明, 利用瑞士乳杆菌生产出高 ACE 抑制肽活性的产品。显现出一定的开发推广前景。

3.3 高血压正在日益危害人类的健康, 据专家推测, 2025 年全世界将有超过 15 亿高血压患者, 因此对于降压产品的开发具有重要意义, 市场潜力也是巨大的。本实验对于降压产品的开发只是作了初步的探讨, 旨在促进益生菌的开发利用和功能性食品的发展, 为人类造福。

参考文献:

- [1] Anne Pihlanto-Leppä I. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides[J]. Trends in Food Science and Technology, 2001, 11: 347-356.
- [2] Pierre-Louis Leclerc. Anti hypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 955-1004.
- [3] Yamamoto N, Aki no A, Takano T. Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. Journal of Biochemistry, 1993, 114: 740-745.
- [4] Yamamoto N, Maeno M, Takano T. Purification and characterization of an anti hypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPM4[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 1388-1393.
- [5] Mulally M M, Meisel H, FitzGerald R J. Synthetic peptides corresponding to β -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity[J]. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1996, 377: 259-260.
- [6] M A F Belém, B F Gibbs, B H Lee. Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(3): 486-493.
- [7] Blanca Hernandez-Ledesma, Lourdes Amigo, Mercedes Ramos, et al. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion[J]. Journal of chromatography A, 2004, 1049: 107-114.
- [8] Vanessa Vermeirssen, Arie van der Bent, John Van Camp. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests[J]. Biotechnology, 2004, 86: 231-239.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 等. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 高等教育出版社, 1997. 76-78.
- [10] 许庆陵, 等. 鲢头酶解物对 ACE 的抑制活性[J]. 大连水产学院学报, 2004, 119(12): 87-91.

中国期刊方阵双效期刊