

ACEI 发酵乳的稳定性与降血压效果试验研究

马海乐¹, 吴琼英²

(1. 江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013

2. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏 镇江 212018)

摘 要: 对具有抑制血管紧张素转换酶活性的发酵乳(ACEI 发酵乳)的热稳定性、耐碱性和抗肠道酶解能力进行研究, 结果表明: ACEI 发酵乳具有良好的耐高温性能; 在 20℃, pH ≤ 11.0 的情况下, 发酵乳对 ACE 的抑制活性基本保持稳定; ACEI 发酵乳具有抗肠道酶解能力。以 10ml/kg bw 发酵乳一次性灌胃原发性高血压大鼠, 大鼠动脉血压变化最大值为: -29 ± 14.75 mmHg, 证实所制得的发酵乳具有明显的降血压效果。

关键词: 发酵乳; 稳定性; 降血压效果; 原发性高血压大鼠

Study on Stabilities and Antihypertensive Effect of ACEI Fermented Milk

MA Hai-le¹, WU Qiong-ying²

(1. College of Biology and Environment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. Biotechnology College, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: To study on stabilities of heat, pH and intestinal enzymes proteolysis, the results indicated that: the fermented milk could inhibit the activity of angiotensin I-converting enzyme in good capability to endure high temperature. The activity to incubation ACE was kept in conditions of 20℃ and pH ≤ 11.0, so the fermented milk could have the ability to resist intestinal enzymes proteolysis. The spontaneously Hypertensive Rats were each given 10ml/kg bw fermented milk by single gastric intubation. The systolic blood pressure of rats was decreased significantly: -29 ± 14.75 mmHg. This result testified that the fermented milk had apparent effect on depressing blood pressure.

Key words: fermented milk; stabilities; antihypertensive effect; spontaneously hypertensive rats

中图分类号 TS252.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0234-04

血管紧张素转换酶(Angiotensin I-converting enzyme, ACE)可催化血管紧张素 I 转化为强效升压物质——血管紧张素 II, 同时使血管舒张物质——缓激肽分解。因此, ACE 对血压的升高起着重要作用。血管紧张素转换酶抑制剂(Angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)在体内可通过抑制 ACE 的活性达到降低血压的目的。

乳源蛋白质是多种生物活性肽的前体, 这些肽在原蛋白质序列中并没有活性, 但经体内消化或体外蛋白酶水解, 使它们从原有序列中释放出来时, 便表现出特有的功能。大量的试验证明, 通过乳酸菌发酵, 借助乳酸菌培养产生的蛋白酶系对乳蛋白的降解, 可以得到对 ACE 具有显著抑制作用的发酵乳, 因此是一种优良的 ACEI。

目前关于具有 ACEI 活性的发酵乳的研究主要来自日本^[1~3], 意大利和瑞典也有相关研究^[4,5], 而国内尚未见相关报道。

本文对自制的 ACEI 发酵乳的热稳定性、耐碱性和抗肠道酶解能力进行研究, 以确定 ACEI 发酵乳对 ACE 抑制性能是否稳定, 进一步通过动物体内试验, 考察其降压效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ACEI 发酵乳 江苏大学生物资源工程重点实验室研制; ACE、马尿酸组氨酰亮氨酸(N-Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, HHL) Sigma 公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶 中国医药集团上海化学试剂公司; 其他化学试剂均为国产分析纯; 雄性原发性高血压模型大鼠(SHR), 8 周龄, 5 只, 体重范围 180~220g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 生产许可证号: 中动管第 003 号。

ACEI 发酵乳的制备工艺: 称取一定量的脱脂奶粉, 加 10 倍重量的水溶解, 115℃杀菌, 冷却至室温,

收稿日期: 2004-10-13

作者简介: 马海乐(1962-), 男, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事食品分离与生物技术方面的研究。

加入乳酸菌接种,在发酵罐中40℃下发酵,随后搅拌,65℃灭菌30min,即可得到ACEI发酵乳。

1.2 设备

Aglient 1100 高效液相色谱仪 美国Aglient公司
PHS-3C 精密pH计 雷磁仪器厂;手提式压力蒸汽灭菌器 上海医用核子仪器厂;SZX-3 超净工作台 沪通制药机械设备厂;SPX-250B 生化培养箱 常州国华仪器有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;RBP-1 大鼠血压计 中日友好临床医学研究所。

1.3 试验方法

1.3.1 ACEI 发酵乳的稳定性和体外酶解试验

1.3.1.1 ACEI 发酵乳耐热稳定性试验

取5瓶ACEI发酵乳,在pH3.42的状态下,分别于4、37、50、70、90℃进行保温试验,每30min取样测其对ACE的抑制作用。

1.3.1.2 ACEI 发酵乳耐酸碱稳定性试验

ACEI发酵乳的pH值为3.42,处于酸性,这说明ACEI发酵乳中的活性肽具有良好的耐酸性。现测定其对碱性的耐受能力。

取3瓶ACEI发酵乳,分别将pH值调至9.0、11.0、13.0,在20℃保存。每30min取样测其对ACE的抑制作用。

1.3.1.3 ACEI 发酵乳的体外酶解试验

人体摄取食物后,食物中的蛋白质首先在胃内与胃蛋白酶反应,然后进入十二指肠,在此处再与胰液中的胰蛋白酶反应。胃蛋白酶只在酸性环境中发挥作用,在pH2.0时优先作用于天然蛋白质,pH4.0时能消化某些特异性的肽,pH超过6.0以上即失去活性;胰蛋白酶的最适pH为8.0^[6]。

根据蛋白质在体内与消化酶接触的顺序及反应条件,发酵乳体外酶解试验的反应组合为:发酵乳+胃蛋白酶;发酵乳+胃蛋白酶+胰酶。

取200ml的ACEI发酵乳,取样测其对ACE的抑制率。然后将发酵乳的pH值调至2.0,加入胃蛋白酶,于37℃保温模拟消化2h,调pH值至8.0,取样测其对ACE的抑制率及HPLC图谱;再加入胰蛋白酶,在37℃保温模拟消化2h,然后在沸水浴中保持10min钝化酶,再取样测其对ACE的抑制率。

1.3.2 ACEI 发酵乳的ACE抑制活性检测分析

具体操作为:吸取ACEI样品10μl,加入5μl IACE (1UACE溶于10ml pH8.3、0.1mol/L 硼酸缓冲液,该缓冲液含0.3mol/L NaCl),37℃保温5min,随后加入50μl 6.5mmol/L HHL(溶于相同的缓冲液中),在37℃恒温反应30min,然后加入85μl 1mol/L HCl 中止反应,所得反应液直接用高效液相色谱(HPLC)进行分析。色谱条件为:4.6×150mm ZORBAX-C₁₈柱,柱温25℃,洗脱液流速0.5ml/min,检测波长228nm,洗脱液组成为超纯水-乙

腈(75%:25%,各含0.3%的冰醋酸)。同时用10μl pH8.3、0.1mol/L的硼酸缓冲液作空白对照反应。

ACEI对ACE的抑制率用下式计算

$$R = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式中,R:ACEI对ACE的抑制率

A:空白对照组Hip的峰面积

B:添加ACEI组Hip的峰面积

以上分析参照Cuxhman DW^[7]建立的方法进行,并有改进。

1.3.3 降血压发酵乳的初步动物试验

5只原发性高血压大鼠为一组,每只大鼠单笼喂养,自由进水,保持环境温度25±1℃,相对湿度(60±5)%。SHR大鼠适应环境7d后,开始进行样品的测试。样品按10ml/kg bw剂量进行一次性灌胃,灌胃后采用RBP-1型大鼠血压计测定0、1、2、3、4、5、6、8、10、12h SHR大鼠尾部的动脉血压;重复灌胃和测定两次,观察大鼠血压的下降情况。

2 结果与分析

2.1 ACEI 发酵乳的耐热稳定性

不同温度下保存时,发酵乳ACE抑制活性的变化如图1所示。

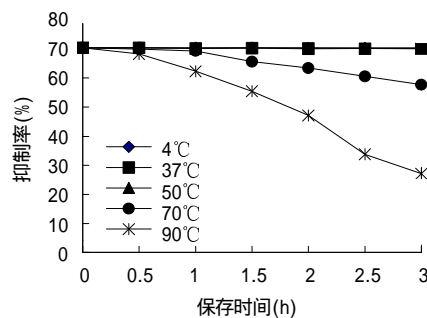


图1 不同温度对ACE发酵乳活性的影响

Fig.1 The effect of different temperature on activity of ACE fermented milk

从图1可以看出,保存温度为4~50℃时,整个保存过程中,发酵乳的ACE抑制活性保持不变;当保存温度为70℃时,前1h,发酵乳的ACE抑制活性基本不变,然后缓慢下降,但保存至3h时,其活性仍为原来的81.85%;保存温度升至90℃,前0.5h活性下降不明显,随着时间的延长,活性下降逐渐加快,然而当高温保存至2h时,活性仍为原来的66.91%,到3h时,活性还保留有初始时的38.48%。

此试验结果表明:发酵乳降压肽具有良好的耐高温性能。

将发酵乳在 4℃ 保存 1w, 测得其对 ACE 的抑制率为 70.12%, 与初始时的 70.47% 相差不大。因此, 在 4℃ 保存可长时间的保持发酵乳的 ACE 抑制活性。

2.2 ACEI 发酵乳的耐酸碱稳定性

不同 pH 值对发酵乳降压肽活性的影响示于图 2。

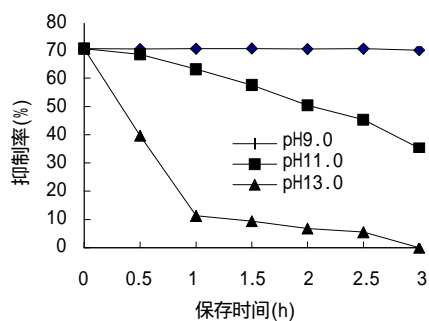


图2 不同 pH 对 ACE 发酵乳活性的影响

Fig.2 The effect of different pH on activity of ACE fermented milk

从图 2 可见, 随着 pH 值的升高, 保存时间的延长, 发酵乳对 ACE 的抑制率下降速度逐渐加快。在 pH 值为 9.0 的条件下, 发酵乳对 ACE 的抑制率基本没有变化; pH 值为 11.0 时, 发酵乳的 ACE 抑制活性呈现下降趋势, 但保存至 3h 时其活性仍为原来的 50.13%; 当 pH 值为 13.0 时, 保持 1h 后, 发酵乳对 ACE 的抑制率迅速降至原来的 15.12%, 直至完全丧失。这可能是因为强碱条件下, 大部分肽键被水解。

此试验结果表明, 在 pH 低于 11.0 的条件下, 发酵乳可较好地保持 ACE 抑制活性。为了更好地保持发酵乳的活性, 应尽量在低于 pH9.0 的条件下操作与保存。

2.3 ACEI 发酵乳的体外酶解试验

具有 ACE 抑制活性的肽经口服是否具有降血压作用的前提条件是不被肠道酶降解, 因此在进行动物试验之前, 通过体外模拟, 研究 ACEI 发酵乳中活性肽的抗肠道酶降解能力。

发酵乳在体外先经胃蛋白酶 pH2.0、37℃ 水解 2h, 再经胰蛋白酶 pH8.0、37℃ 水解 2h。两种酶水解前后的发酵乳对 ACE 的抑制活性结果如表 1。

表 1 肠道酶水解前后发酵乳对 ACE 的抑制率

Table 1 The ratio of fermented milk inhibit ACE fore-and-aft intestinal enzymes proteolysis

样品	抑制率 (%)
发酵乳	67.88
发酵乳+胃蛋白酶	62.80
发酵乳+胃蛋白酶+胰蛋白酶	67.24

从表 1 可以看出: ACEI 发酵乳经胃蛋白酶水解 2h 后对 ACE 的抑制率有所下降, 这说明胃蛋白酶在水解乳蛋白的同时也水解了一部分降压肽; 而继续经胰蛋白酶水解 2h 后, 发酵乳水解液对 ACE 的抑制率又回升至与未水解时的抑制率接近, 这可能是由于胰蛋白酶在分解乳蛋白的过程中产生了一些具 ACE 抑制活性的肽, 从而

使水解液的 ACE 抑制活性升高。

2.4 ACEI 发酵乳的降血压初步动物试验

将 10ml/kg bw 发酵乳一次性灌胃后, 每隔一定时间测定大鼠尾部的动脉血压。重复灌胃和测定血压两次, 每次以灌胃后 0h 的血压为对照血压, 试验结果如表 2。

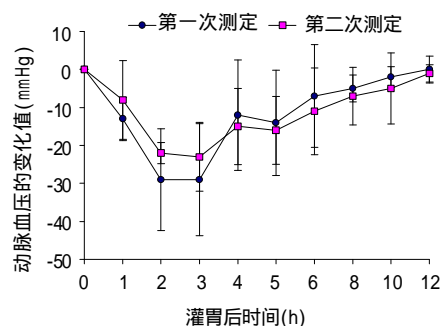
表 2 一次性灌胃发酵乳对 SHR 的降血压效果 (平均值±标准差, mmHg)*

Table 2 Antihypertensive effects in SHR of fermented milk given by a single gastric intubation (average ± standard deviation, mmHg)

测定时间(h)	第一次测定 (mmHg)	第二次测定 (mmHg)
0(对照组)	186 ± 4	190 ± 4
1	173 ± 8	182 ± 9
2	157 ± 13	168 ± 6
3	157 ± 14	167 ± 8
4	176 ± 16	175 ± 9
5	172 ± 14	174 ± 7
6	179 ± 16	179 ± 11
8	181 ± 7	183 ± 8
10	184 ± 6	185 ± 8
12	186 ± 4	189 ± 4

注: * 剂量为 10ml/kg bw。

由于每次灌胃时大鼠血压的初始值(即对照组血压)不同, 为更好的体现喂食发酵乳后大鼠血压的变化, 将变化值示于图 3。



* 剂量为 10ml/kg bw, 数据点表示 5 只大鼠血压变化的平均值, 直棒表示标准偏差。

图 3 SHR 一次性灌胃发酵乳动脉血压的变化

Fig.3 Changes in systolic blood pressure after a single gastric intubation to SHR

从图 3 可以看出, 两次灌胃后测定的血压变化趋势基本一致。将 10ml/kg bw 发酵乳一次性灌胃后, 大鼠动脉血压逐渐下降, 在灌胃后 2~3h 时, 血压下降幅度达到最大(值为 $-29 \pm 14.75\text{mmHg}$), 随后血压逐渐回升, 灌胃后 12h 回升至原始血压。

动物试验的结果表明, 本研究所制得的发酵乳在体内具有降血压作用, 而且降血压效果达到国外同类研究所得产品的效果。

3 结 论

藤茶辅助降血脂作用的研究

刘翠娥, 王海玉, 王亚东, 张 杰
(河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450003)

摘 要: 目的: 本文主要研究大别山产藤茶的辅助降血脂作用, 为开发防治高血脂的保健食品提供科学依据。研究方法: 即用高脂饲料喂养动物形成脂代谢紊乱, 再给予动物藤茶提取物经口灌胃 30d, 随机选择 100 名志愿受试者, 每天按 9g 泡饮 45d 后, 检测动物和人血清中 TC、TG、HDL-C 三项指标, 动物试验结果表明: 高剂量组总胆固醇含量下降明显, 中、高剂量组总胆固醇含量下降幅度分别为 16.7%、23.1%。低、中、高剂量组甘油三酯含量下降明显, 低、中、高剂量组甘油三酯含量下降幅度分别为 17.4%、17.8%、19.1%。低、中、高剂量组高密度脂蛋白胆固醇含量升高明显, 低、中、高剂量组平均升高值为 4.64、5.03、4.26mg/dl。人体试食试验结果表明: 试验组降总胆固醇有效率为 42%、降甘油三酯有效率为 72%、降血脂有效率为 28%, 受试者血清总胆固醇、甘油三酯明显降低。结论: 藤茶具有辅助降血脂作用。

关键词: 藤茶(显齿蛇葡萄); 降血脂作用; 高脂血症; 总黄酮; 双氢杨梅素

Study on Ampelis grossedentata to Lower Plasma Lipids Level

LIU Cui-e, WANG Hai-yu, WANG Ya-dong, ZHANG Jie
(Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450003, China)

收稿日期: 2004-11-18

作者简介: 刘翠娥(1954-), 女, 副主任技师, 学士, 主要从事食品毒理及保健食品功能学检验。

3.1 本文作者制备的 ACEI 发酵乳具有良好的耐高温性能。温度 $\leq 50^{\circ}\text{C}$ 时, 发酵乳对 ACE 的抑制活性保持不变; 在 90°C 加热 3h, 活性还保留有初始时的 38.48%。

3.2 ACEI 发酵乳的耐碱能力研究表明: 在 20°C , pH ≤ 11.0 的情况下, 发酵乳对 ACE 的抑制活性基本保持稳定; 当 pH 值为 13.0 时, 由于大部分降压肽的肽键被水解, 保持 1h 后, 发酵乳对 ACE 的抑制率迅速降至原来的 15.12%, 直至完全丧失。

3.3 体外酶解试验结果表明, 胃蛋白酶对发酵乳的降压活性有一定的消解作用, 而胰蛋白酶对发酵乳的降压活性有提升作用, 不过两种酶的消长幅度相差不大。因此认为发酵乳经两种酶消化后, 对 ACE 的抑制作用保持不变。

3.4 以 10ml/kg bw 发酵乳一次性灌胃 SHR 大鼠, 灌胃后 2~3h 时, 大鼠动脉血压下降幅度达到 $-29 \pm 14.75 \text{ mmHg}$, 随后血压逐渐回升, 灌胃后 12h 回升至原始血压。

参考文献:

[1] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hyperten-

sive rats[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4): 776-778.

[2] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. J Dairy Sci, 1994, 77(4): 917-922.

[3] 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]. Journal of Dairy Science. 1995, 78(4): 1253-1257.

[4] M, gobetti, P ferranti, E smacchi. Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 3898-3904.

[5] Pierre-Louis Leclercq, Sylvie F Gauthier, H"el"ene Bachelard, et al. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus* [J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 995-1004.

[6] 聂剑初, 吴国利, 张冀伸, 等. 生物化学简明教程(第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

[7] Cushman D W, Cheung H S. Spectro- photometric assay and properties of angiotensin- converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.