

玉米蛋白制备降血压肽的研究

黄家音, 朱宇洁, 沈金玉*

(清华大学化学工程系生化研究所, 北京 100084)

摘 要: 本实验以我国来源丰富且价格低廉的玉米蛋白为原料, 选用嗜热菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和碱性蛋白酶等4种酶来水解玉米蛋白制备降血压肽。选用马尿酸-组氨酸-亮氨酸(HHL)为血管紧张素转化酶(ACE)的模拟底物, 利用反相高效液相色谱(RHPLC)检测ACE催化反应生成的马尿酸(Hip)的量, 确定水解产物的ACE抑制活性从而对酶进行筛选。研究表明, 碱性蛋白酶的水解能力最强, 碱性蛋白酶和嗜热菌蛋白酶的水解产物都达到了很好的ACE抑制活性(90%左右)。

关键词: 玉米蛋白; 血管紧张素转化酶; 降血压肽

Study on Producing Antihypertensive Peptides from Zein

HUANG Jia-yin, ZHU Yu-jie, SHEN Jin-yu*

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In this study, zein, a very abundant and cheap crop in China was hydrolyzed by thermolysin, chymotrypsin, trypsin and alkaline protease for processing antihypertensive peptides. Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) was used as the simulant substrate of Angiotensin Converting Enzyme (ACE), and reverse-phase performance liquid chromatography (RHPLC) was used to measure the yield of Hippuryl (Hip). According to this process, the ACE inhibitory activity of each hydrolyzate was determined and chosen as the best protease. The results showed that alkaline protease has the optimum hydrolytic capability, while the hydrolyzate of alkaline and thermolysin shows great ACE inhibitory activity (up to 90%).

Key words zein; angiotensin converting enzyme(ACE); antihypertensive peptides

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0290-04

高血压是一种以动脉收缩压或舒张压升高为特征的临床综合症, 近年来, 高血压在世界范围内成日趋严重的态势, 已经成为生命“第一杀手”。来自食品蛋

白的降血压肽对高血压患者可起到降压作用, 对血压正常者则无降压作用, 长期使用无副作用, 安全性极高, 已经成为目前研究的热点。

收稿日期: 2006-10-19

*通讯作者

作者简介: 黄家音(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化工。

- | | |
|--|--|
| <p>[6] MAHONEY R R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review[J]. Food Chemistry, 1998, 63(2): 147-154.</p> <p>[7] REJIKUMAR S, DEVI S. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β-galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol) [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2001, 36: 91-98.</p> <p>[8] OVSEJEVI K, GRAXU V, BATISTA VIERA F. β-galactosidase from <i>Kluyveromyces lactis</i> immobilized on to thiol sulfinate/thiol sulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products[J]. Bio-technology Techniques, 1998, 12(2): 143-148.</p> <p>[9] 韩雅珊. 食品化学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 57.</p> | <p>[10] 李达, 刘兆庆, 姜媛媛, 等. 乳糖不耐受与功能性液体乳-低乳糖奶[J]. 农产品加工, 2005, 47(11): 33-36.</p> <p>[11] WIERZBICKI L E, KOSIKOWSKI F V. Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by beta-galactosidase from <i>Aspergillus niger</i> [J]. Journal of Dairy Science, 1973, 56(11): 1396-1399.</p> <p>[12] 秦燕, 宁正祥, 胡新宇. 固定化β-半乳糖苷酶催化生成低聚半乳糖[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 12-16.</p> <p>[13] 伯奇 G G. 酶与食品加工[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 93-110.</p> <p>[14] RUSTOM I Y S, FODA M I, LOPEZ LEIVA M H, et al. Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis-analysis of factors[J]. Food Chemistry, 1998, 62(2): 141-147.</p> |
|--|--|

导致高血压的一个重要因素是存在于血压调节系统中的血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, EC3.4.15.1, 简称ACE), 它一方面催化血管紧张素 I (Ang I) 从 C 端裂解二肽转换为活性很强的血管收缩剂——血管紧张素 II (Ang II), 使血压升高; 另一方面也能作用于降血压物质缓激肽, 使其失活, 同样导致血压升高。降血压肽正是通过抑制 ACE 的活性来达到降血压的目的。自从 1965 年, Ferreira 首次从南美洲蝮蛇的毒液中发现降血压肽后^[1], 人们对降血压肽进行了广泛地研究, 已经从乳酪蛋白^[2]、鱼类蛋白^[3]、大豆^[4]等多种食用蛋白质中提取出了降血压肽。

我国对降血压肽的研究则刚刚起步, 且主要集中在酪蛋白和大豆蛋白方面的研究。本实验选取我国资源非常丰富的玉米蛋白作为原料。玉米加工的副产物——玉米胚含有丰富的醇溶蛋白, 但目前国内主要将它用于饲料工业或自然排放, 这造成了极大的浪费和污染。如果能够利用低价值的玉米蛋白开发具有高附加值的生物活性肽, 前景相当可观。同时, 玉米醇溶蛋白中含有高比例的 Ile、Leu、Val、Ala 等疏水性氨基酸和 Pro 等, 很少含有 Lys 等碱性氨基酸, 这种不平衡的氨基酸组成使玉米醇溶蛋白成为多种生理活性肽, 特别是降血压多肽的来源^[5]。本实验利用酶解法从玉米醇溶蛋白中提取降血压肽, 对酶解用酶进行初探性的筛选。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米醇溶蛋白 高邮市日星药用辅料有限公司; 嗜热菌蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶, 碱性蛋白酶, 胰蛋白酶, ACE, Hip-His-Leu(HHL), 马尿酸(Hip) Sigma 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器

HW-SY 系列电热恒温水浴锅 北京市长风仪器仪表公司; PHS-3B 型精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; 78-1 型磁力加热搅拌器 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; JJ-1 增力电动搅拌机 江苏金坛新一佳仪器; TGL-16C 台式高速离心机 上海安亭科学仪器厂; 10A 高压液相色谱 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质浓度测定

双缩脲法。

1.3.2 水解度(DH)测定

pH-stat 法^[6]。

水解度计算公式: $DH = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/MP \times 1/h_{tot} \times 100\%$ ($pH > 6.5$), 式中, B 为碱液体积(ml); N_b 为碱液浓度(mol/L); α 为氨基酸的解离度, $\alpha = [10$

$(pH - pK)]/[1 + 10(pH - pK)]$, 其中 pK 为氨基酸的平均 pK, 按 7.0 计算; pH 为反应起始的 pH 值。MP 为底物中蛋白质的总量(g 或 kg); h_{tot} 为单位质量底物蛋白质中肽键总数(mmol/g); 玉米蛋白 $h_{tot} = 7.35 \text{ mmol/g}$ 。

1.3.3 水解液制备

将玉米醇溶蛋白粉末调成固形物含量 5% (W/V) 的悬浮液, 按 1.5mg/ml 的比例添加 Na_2SO_3 , 45℃ 下预处理 15min 后, 将温度与 pH 值分别调至实验用酶的最适条件下, 然后分别向溶液中添加实验用酶 7mg, 进行酶解反应。反应过程中用 1mol/L NaOH 维持 pH 值稳定(± 0.1)。水解一定时间后在沸水中加热 15min 使酶失活, 冷却到室温, 5000r/min, 离心 10min, 即得到水解液。

1.3.4 降血压肽抑制活性检测

本实验采用体外检测法, 选取 HHL 为 ACE 催化反应的模拟底物, 通过反相 HPLC 法^[7]检测生成的 Hip 的量, 从而确定降血压肽的抑制程度。

1.3.4.1 样品准备

总反应体积 70 μl , 包含 50 μl 6.5mmol/L HHL, 10 μl 0.1mU ACE (溶于 100mmol/L 硼酸盐缓冲液, 含 300mmol/L NaCl, pH8.3) 和 10 μl 蛋白水解液。HHL 和水解液在 1.5ml 聚乙烯小离心分离管中混合, 37℃ 保温 3min。ACE 也预先于 37℃ 保温 3min, 然后两者混合, 37℃ 反应 30min 后, 加入 85 μl 1mol/L HCl 终止反应, 混合液经 0.45 μm 过滤膜过滤后用反相 HPLC 检测。用 10 μl 硼酸盐缓冲液代替蛋白水解液, 作为空白样品。

1.3.4.2 反相 HPLC 条件

选用 ODS 柱 (4.6 \times 200mm, 粒径 5 μm), 柱温 36℃。流动相为甲醇-水体系 (各含 0.1% (体积分数) TFA (三氟乙酸)), 进行梯度洗脱; 0~10min, 49%~8% 甲醇梯度洗脱, 10.01~23min, 49% 甲醇洗脱。流速为 0.5ml/min, 紫外检测波长 228nm, 自动进样量 20 μl 。

2 结果与分析

2.1 酶水解能力的比较

本实验综合考虑了不同酶的水解特异性和已发现的降血压肽的组成结构, 选取了以下四种酶进行实验, 筛选效果较好的酶。它们的水解特性和反应条件如表 1 所示。

本实验主要利用水解度和蛋白质浓度两个指标来反映酶水解能力的大小。

在水解过程中, 用 1mol/L NaOH 维持 pH 值稳定, 通过 NaOH 的消耗量来大致计算水解度。实验结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出, 就反应过程中的水解度而言, 碱性蛋白酶水解时的水解度远远大于其他三种酶, 最大可以达到 60%, 但水解时间也比较长。胰蛋白酶水解时

表1 水解酶的特异性和反应条件
Table 1 Hydrolysis specification and reaction conditions of proteases

酶	反应条件	水解特异性
胰凝乳蛋白酶	pH8.5, 37℃	水解芳香族氨基酸的羧基形成的肽键
嗜热菌蛋白酶	pH8.0, 65℃	水解由疏水性氨基酸的氨基端形成的肽键
碱性蛋白酶	pH9.6, 50℃	主要断裂疏水氨基酸的C端
胰蛋白酶	pH8.0, 55℃	水解由碱性氨基酸的羧基所形成的肽键

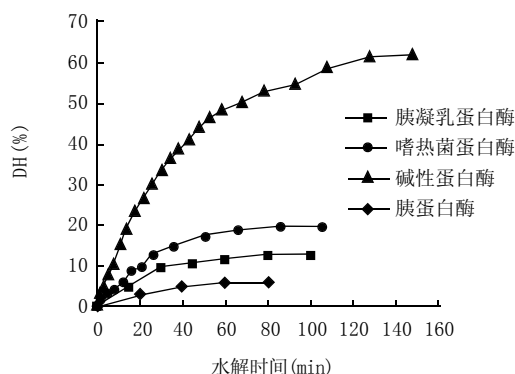


图1 水解度比较
Fig.1 Comparison of DH

的水解度最低, 胰凝乳和嗜热菌蛋白酶居中, 即水解度: 碱性蛋白酶>嗜热菌蛋白酶>胰凝乳蛋白酶>胰蛋白酶。此外, 从图上还可以看出, 达到相同的水解度, 所消耗的时间顺序为: 碱性蛋白酶<嗜热菌蛋白酶<胰凝乳蛋白酶<胰蛋白酶。可见四种酶中, 碱性蛋白酶的水解能力最强。

四种酶的不同时刻水解物的蛋白质浓度变化曲线如图2所示。

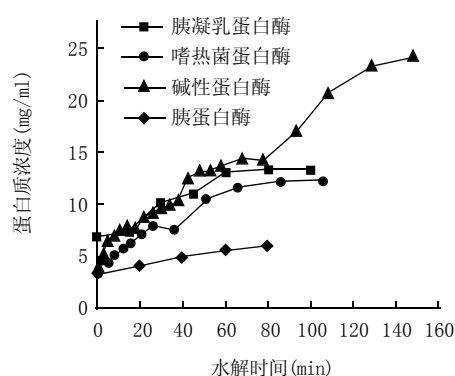


图2 蛋白质浓度比较
Fig.2 Comparisons of protein concentrations

从图2可以看出, 胰蛋白酶在整个水解过程中, 蛋白质浓度变化不大(3.5~5.9mg/ml), 这说明胰蛋白酶的水解能力相对较弱。其他三种酶水解产物中蛋白质的浓度都明显的呈上升趋势。在水解初期(0~40min), 碱性蛋白酶、嗜热菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶这三种酶水解时

水解液中的蛋白质浓度相差不大。但是, 40min后, 差别逐渐显现出来, 碱性蛋白酶随着水解时间的增长, 蛋白质浓度也逐渐增大, 嗜热菌和胰凝乳蛋白酶的数据则趋于稳定。

综合以上两个因素的比较可以看出, 几种酶当中, 碱性蛋白酶的水解能力最强, 嗜热菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶次之, 胰蛋白酶水解能力较弱。

2.2 ACE抑制活性的检测

本实验采用反相HPLC的方法, 检测水解液对ACE活性的抑制程度。标准样品的梯度洗脱图谱如图3所示。

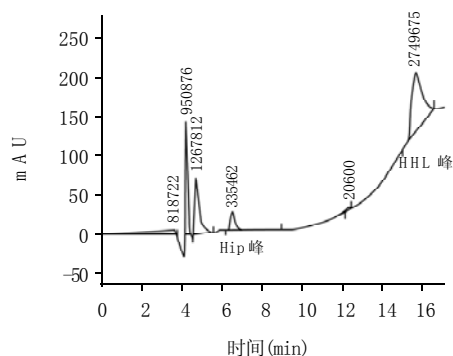


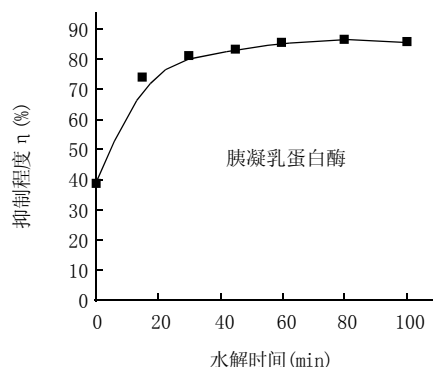
图3 标准样品反相HPLC洗脱图谱
Fig.3 RP-HPLC chromatogram of standard sample

通过不同水解液反应后的洗脱图谱定量Hip的生成量, 以生成Hip的量来判断水解液的ACE抑制效果。用下式计算抑制程度 η :

$$\eta(\%) = \frac{\text{空白对照的Hip峰面积} - \text{样品的Hip峰面积}}{\text{空白对照的Hip峰面积}} \times 100$$

四种酶的水解液对ACE的抑制程度随水解时间的变化曲线如图4所示。

分析上述几种酶水解液的ACE抑制程度可以得出, 水解产物ACE抑制效果最好的是碱性蛋白酶和嗜热菌蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶次之, 胰蛋白酶较前三种酶而言效果较差。四种酶中, 效果最好的可以达到90%, 效果最差的也能达到70%以上。从水解时间上考虑, 嗜



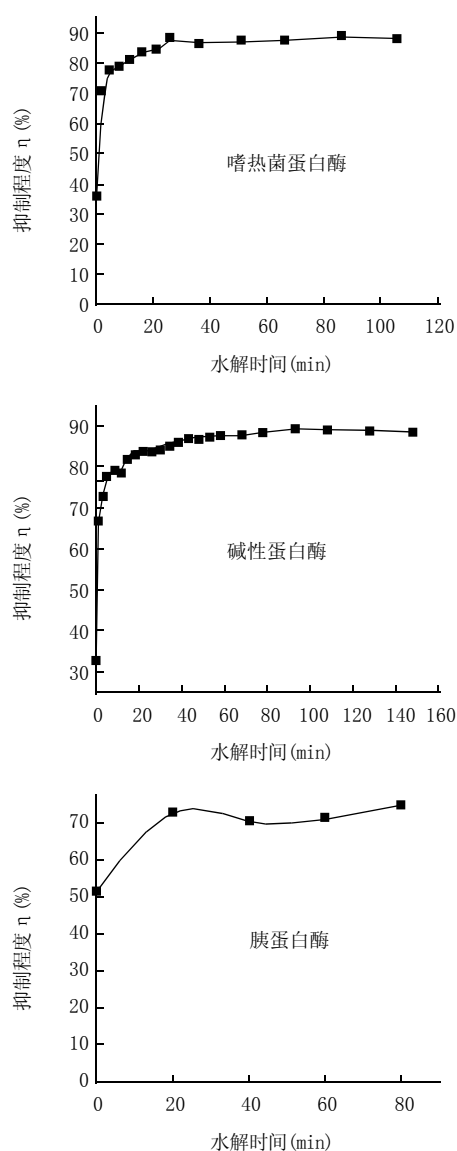


图4 四种酶的水解液抑制程度曲线
Fig.4 Curves of ACE inhibitory activity of hydrolyzates

热菌蛋白酶30min后的水解液的ACE抑制效果基本上不发生变化了,而达到同样抑制效果,碱性蛋白酶则需要60min。胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶达到最大抑制效果的水解时间则分别为50min和20min。所以综合考虑,嗜热菌蛋白酶最适合于水解玉米蛋白制备降血压肽。

将各酶的水解度变化曲线和ACE抑制效果变化曲线对比可以发现,水解进行一段时间后,虽然水解度还在发生变化,即水解还在进行,但水解液的ACE抑制效果不再发生变化了。同时,水解度高,并不代表抑

制效果好。例如,碱性蛋白酶水解时,水解度远远大于嗜热菌蛋白酶水解时的水解度,但两个酶水解液的ACE抑制效果相差不大。可见不同酶的水解能力和其水解产物对ACE抑制效果之间没有必然联系,这一结果与吕桂善等^[8]的研究结果是一致的。

3 结论

3.1 对于所筛选的四种水解酶,水解能力大小的顺序为:碱性蛋白酶>嗜热菌蛋白酶>胰凝乳蛋白酶>胰蛋白酶。

3.2 在等量底物以及等量酶的情况下,嗜热菌蛋白酶和碱性蛋白酶水解产物对ACE的抑制效果最好(90%左右),胰凝乳蛋白酶居中,胰蛋白酶较前三种效果一般,但也达到了70%以上。而四者达到其最大抑制效果所需要的水解时间顺序为:胰蛋白酶>嗜热菌蛋白酶>胰凝乳蛋白酶>碱性蛋白酶。因此综合考虑后,筛选出的最适于水解玉米蛋白制备降血压肽的酶为嗜热菌蛋白酶。

3.3 水解度与ACE的抑制活性之间没有一定的相关性,因此在优化确定生产工艺条件时,应该以产物的ACE抑制活性作为指标,而非单纯以水解能力来判断。

参考文献:

- [1] 吴建平,丁霄霖.食品蛋白质降血压肽的研究进展[J].中国粮油学报,1998,13(5):10-14.
- [2] GÓMEZ-RUIZ J A, RAMOS M, RECIO I. Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054: 269-277.
- [3] BYUN H G, KIM S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. Process Biochemistry, 2001, 36: 1155-1162.
- [4] 范俊峰,李里特,张艳艳,等.2种蛋白酶的大豆蛋白水解物对血管紧张素转换酶的抑制作用[J].食品与发酵工业,2004,30(1):80-84.
- [5] 金英姿.玉米蛋白生物活性肽的开发[J].新疆师范大学学报:自然科学版,2004,23(2):40-42.
- [6] 刘亚丽,李会侠,王红新.酶解玉米渣生产玉米蛋白肽的研究[J].粮食科技与经济,2005(2):46-47.
- [7] 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.
- [8] 吕桂善,周文红,姜瞻梅,等.酪蛋白水解进程的研究[J].食品工业科技,2003,24(8):24-27.