

抗 ACE 活性之瑞士乳杆菌的筛选

潘道东

(南京师范大学金陵女子学院食品科学与工程系, 江苏 南京 210097)

摘 要: 为了筛选能发酵牛乳产生较强抗高血压活性肽的乳酸菌, 本研究通过发酵乳的抑制 ACE 活性试验, 从二种干酪制品的混合样品中分离筛选出能发酵牛乳产生较强抗 ACE 活性的乳杆菌 1002、1004 和 1006。经糖发酵、生长温度、精氨酸发酵产氨、产硫化氢试验及细胞壁中二氨基庚二酸(DAP)成分分析, 确认它们均为瑞士乳杆菌。
关键词: 发酵乳; ACE; 瑞士乳杆菌

Strains Screening of *Lactobacillus helveticus* with Anti-ACE Activity

PAN Dao-dong

(Department of Food Science, Jingling Womens' College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Anti-angiotensin-I-converting enzyme (ACE) were screened for obtaining the lactic acid strains which could ferment milk produce fermented milk conducting for the anti-ACE activity. 3 strains have been isolated and purified from the mixed cheese samples. These strains could ferment milk to produce anti-ACE activity significantly, and is identified as *Lactobacillus helveticus*.

Key words: fermented milk; angiotensin-I-converting enzyme (ACE); *Lactobacillus helveticus*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)02-0145-04

近几年来, 人们研究发现一些乳酸菌制作的发酵乳制品具有较强的降高血压功能, 如 Nakamura 等人发现给原发性高血压大鼠长期服用 Calpis 可抑制血压上升。Calpis 是日本的一种发酵乳饮料, 其所用的发酵剂中主要含有 *Lactobacillus helveticus* 和 *Saccharomyces cerevisiae*; Kawase 等人发现利用 *L. casei* TMC0409 和 *Streptococcus thermophilus* TMC1543 发酵的乳有显著的降血压作用。这些发酵乳制品具有降高血压功能, 主要是由于在发酵过程中, 乳酸菌分泌的蛋白酶分解乳蛋白质产生对 ACE 活性具有抑制作用的多肽, 从而达到降血压的效果。发酵乳制品降血压作用的强与弱与其所使用的乳酸菌的种类密切相关^[1-6]。

在众多乳酸菌中, 瑞士乳杆菌有较强的蛋白水解活性, 有文献报道, 一些瑞士乳杆菌制作的发酵乳, 具有较高的 ACE 抑制活性及抗高血压能力^[7-9]。本文将探讨从干酪中分离筛选出能发酵牛乳产生较强抗 ACE 活性的瑞士乳杆菌菌株, 为开发抗高血压功能性发酵乳制品打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与仪器

瑞士乳杆菌 ATCC15009 日本东京理化研究所; Hippuryl-L-histidyl-L-leucine Sigma 公司; ACE (angiotensin-I-converting enzyme, 来源于兔肺) 及其它试剂均 日本 Wake Pure Chemicals 有限公司; SL 培养基、MRS 培养基、脱脂乳培养基、糖发酵培养基以及其他培养基和试剂等按文献[10-12]介绍的方法配制。

1.1.2 仪器

分光光度计 日立公司; PHS-3C 型精密酸度计; 真空冷冻干燥机等。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离和纯化及初步鉴定

将市售干酪样品粉碎用无菌水稀释, 经脱脂乳培养基增菌后, 划线接种在 SL 琼脂培养基上, 37℃ 培养 48h, 挑取单个菌落接种到 MRS 琼脂培养基进行培养,

收稿日期: 2006-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571311); 教育部乳品科学重点实验室主任基金项目(KLDS2006-10A); 江苏省自然科学基金项目(BK2005137)

作者简介: 潘道东(1964-), 男, 教授, 博士, 主要从事乳品科学研究。

然后进行革兰氏染色、个体形态特征和菌落特征观察、镜检并做过氧化氢酶试验。分别将可疑乳酸菌移入CM发酵培养基中, 30℃静置培养12h, 取10ml发酵液进行离心, 对上清液进行纸层析(展开剂为正丁醇:甲酸:水=80:15:5), 鉴定发酵液中的有机酸种类, 挑选能产生乳酸的乳酸菌。最后将分离所得的乳酸菌纯培养物制作酸奶, 并进行该酸奶的抑制ACE活性试验。

1.2.2 抑制ACE活性试验

酸奶的制作及预处理: 10%的脱脂乳在90℃下杀菌15min, 杀菌结束后冷却至37℃, 按4%的量接种分离所得的乳酸菌发酵剂, 混匀后在37℃下保温培养12h, 制得酸奶。在0、2、4、6、8、10、12h分别取样一次, 将样品用50%乳酸将其pH值调节至3.4~3.6, 在5000r/min下冷冻离心15min, 收集上清液, 再用10N的氢氧化钠溶液将pH值调节到8.3, 在5000r/min下冷冻离心15min, 收集上清液冷冻干燥后, 用于抑制ACE活性的测定。

抑制ACE活性的测定: 采用Cushman等的方法^[14]。用含有0.3mol/L NaCl的0.1mol/L硼酸盐缓冲液(pH8.3)将Hip-His-Leu配成5.0mmol/L的溶液。在10ml试管中分别加入200μl的5mmol/L Hip-His-Leu溶液和80μl的发酵乳上清液, 于37℃下保温3min后, 再加入20μl 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250μl的1.0N的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, 静置5min, 用移液管吸取1.0ml的醋酸乙酯层, 真空冷冻干燥后, 加入1.0ml蒸馏水, 混匀后在228nm处测定吸光度。在上述条件下, 抑制50%的ACE活性(IC₅₀)为样品的一个活性单位。

$$\text{ACE抑制率} = [(B-A)/(B-C)] \times 100\%$$

式中, A为含有发酵乳乳清(或溶于蒸馏水的多肽溶液)和ACE溶液的吸光度; B为不含发酵乳乳清(或溶于蒸馏水的多肽溶液)样品, 但含有ACE溶液的吸光度; C为含脱脂乳乳清(或蒸馏水), 但不含ACE溶液的吸光度。

1.2.3 活化与增菌培养以及供试菌液的调制

将菌株经脱脂乳培养基, MRS培养基进行活化, 离心。菌体用生理盐水洗两次调细胞浓度为10⁸CFU/ml, 即为供试菌液。

1.2.4 乳酸菌种和属的鉴定试验^[10-13]

进行葡萄糖分解产气、生长温度、pH4.5生长、精氨酸产氨、产硫化氢试验和细胞壁中二氨基庚二酸(DAP)成分分析。

1.2.5 细胞壁中二氨基庚二酸(DAP)成分分析

将菌种接种于MRS液体培养基中, 在37℃下培养

24h; 培养结束后3000r/min, 10min离心弃上清, 再用灭菌蒸馏水离心洗涤两次, 弃上清, 置于无水乙醇中室温下干燥或风干, 加6N HCl 1ml混匀, 121℃分解菌体15min, 取上清液加入灭菌试管中, 置于沸水浴中蒸馏浓缩, 每蒸干1次加数滴蒸馏水, 当浓缩物pH>3.5时为止, 最后将浓缩物在纤维板上点样, 在展开液中展开2~3次, 同时用标准DAP点样层析, 烘干后用0.4%(W/V)即4g/L茚三酮水饱和正丁醇溶液喷洒, 置105~110℃烘箱中加热5min, 根据标准DAP显色位点(呈现橄榄绿色)判定被检样品中有无二氨基庚二酸(DAP)成分^[10,14]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离结果

表1 纸层析法鉴定发酵液中的乳酸
Table 1 Analysis of lactic acid of fermented solution by paper chromatogram

可疑乳酸菌	R _f 值	R _f * 值	可疑乳酸菌	R _f 值	R _f * 值
ATCC11842	0.785	0.788	1005	0.790	0.793
1001	0.792	0.790	1006	0.769	0.771
1002	0.784	0.787	1007	0.768	0.771
1003	0.795	0.796	1008	0.780	0.783
1004	0.763	0.765			

从干酪样品中共分离得到10株可疑乳酸菌, 镜检发现其中二株呈球状, 其菌落光滑, 湿润微白色, 边缘整齐; 其余8株均呈杆状, 其菌落中等大小, 微白色, 湿润, 边缘不整齐, 如棉絮团状。通过纸层析法测定以上8株杆菌发酵液的R_f值, 并与标准乳酸的R_f*值进行比较, 其结果如表1所示。从表1可以看出, 8株可疑乳酸杆菌发酵液经过纸层析并显色后, 黄色斑点的R_f值与标准乳酸的R_f*值相近, 均在允许的误差范围内; 另外, 将不同菌株的发酵液与标准乳酸混合后点样, 进行纸层析实验, 层析显色后均出现一个黄色斑点, 因此可确定待测发酵液中有有机酸主要为乳酸, 初步确定所分离得到的8株菌株为乳酸菌。

2.2 抑制ACE活性试验结果

抑制ACE活性结果如图1、2所示。由图1、2可看出1004制作的发酵乳具有较强的抗ACE活性, 其次为1006和1002, 其它菌株制作的发酵乳虽有一定的抗ACE活性, 但不是很显著, 而且在一定培养时间内, 随发酵时间的延长, 其抑制ACE活性效应也随之增强, 这说明发酵乳的抑制ACE活性物质是在培养发酵过程中产生的。

2.3 乳杆菌属的鉴定结果

对能发酵牛乳产生较高抗ACE活性的1002、1004和1006菌株的鉴定和糖发酵试验结果见表2、3。由表

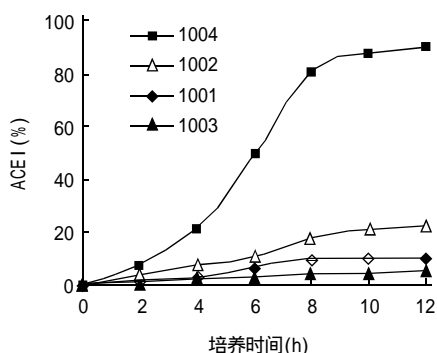


图1 发酵时间对发酵乳抗ACE活性效应的影响
Fig.1 Effects of culture time on anti-ACE activity of fermented milk

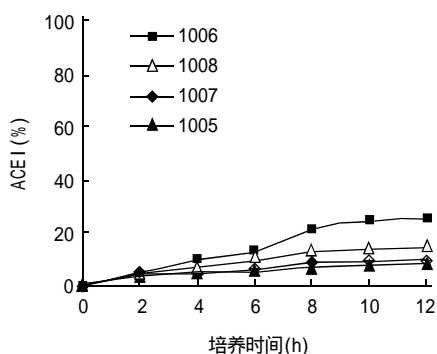


图2 发酵时间对发酵乳抗ACE活性效应的影响
Fig.2 Effects of culture time on anti-ACE activity of fermented milk

2 知, 标准菌株 ATCC 15009 符合瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) 的生物学特性。葡萄糖分解产气试验中均不产气, 为同型发酵。1002、1004、1006 除符合乳杆菌属的特征外, 能发酵利用乳糖、半乳糖、葡萄糖, 不能利用蔗糖、木糖、鼠李糖、果糖和阿

拉伯糖, 乳酸旋光性为 DL 型, 细菌细胞壁肽聚糖结构中无 DAP, 鉴定为瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)。它们不能水解精氨酸和七叶灵, 不能在 15℃ 下生长, 但在 40℃ 和 45℃ 的条件下生长。

3 结 论

本试验从二种混合干酪样品中分离筛选出 8 株乳杆菌, 它们的发酵乳制品都具有一定的抗 ACE 功能, 其中由编号为 1002、1004、1006 三个菌株制作的发酵乳具有较强的抗 ACE 活性, 1004 号菌株抗 ACE 活性最强。根据葡萄糖分解产气、生长温度、pH 4.5 生长、精氨酸产氨、产硫化氢试验和细胞壁中二氨基庚二酸 (DAP) 成分分析等试验结果并对照伯杰系统细菌学手册表明, 1002、1004、1006 号菌株均属于瑞士乳杆菌^[13]。

在乳蛋白的一级结构中存在抑制 ACE 活性的氨基酸序列, 当这些序列在酶的作用下被完整地切割下来, 而且不被进一步降解, 才能发挥抗 ACE 效应。不同的乳酸菌由于其分泌的蛋白分解酶种类和活性不同, 故它们发酵牛乳产生抗 ACE 活性的效应也不一样, 一些乳酸菌的蛋白酶活性比较强, 在一种或几种酶的联合作用下, 正好能把乳蛋白一级结构中的活性片段完整地切割下来, 故其发酵乳能产生较强的抗 ACE 活性, 而有的则不能把这些片段完整地切割下来, 或虽然能把它完整地切割下来, 但很快被其它蛋白酶进一步分解了, 因此其发酵乳无抗 ACE 活性。另外, 有些乳酸菌蛋白酶虽然也能把这些片段完整地切割下来, 但由于其蛋白酶活性比较弱, 分解乳蛋白产生抑制 ACE 活性肽的数量比较少或其产生的肽, 抗 ACE 活性的效果比较低, 故其发酵乳的抗 ACE 效应比较低。由此可见, 发酵乳抗 ACE

表 2 乳杆菌发酵试验结果
Table 2 Fermentation test results of *Lactobacillus*

分离菌株	形态	葡萄糖分解产气	生长温度试验(℃)			精氨酸产 NH ₃	pH4.5	DAP 试验	产 H ₂ S 试验
			15	40	45				
ATCC15009	中长杆状	—	—	++++	++++	—	+	—	—
1002	中长杆状	—	—	++++	+++	—	+	—	—
1004	中长杆状	—	—	++++	++++	—	+	—	—
1006	长杆状	—	—	++++	+++	—	+	—	—

注: +++++ 为振荡试管时完全混浊 (100% 生长); +++ 为振荡试管时混浊度不如 +++++ (75% 生长); ++ 是 50% 生长; + 是 25% 生长; — 为阴性。

表 3 乳杆菌糖发酵试验结果
Table 3 Sugar fermentation test results of *Lactobacillus*

菌株	阿拉伯糖	苦杏仁甙	蜜二糖	纤维二糖	海藻糖	果糖	半乳糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	甘露糖	核糖	山梨醇	蔗糖	木糖	葡萄糖	鼠李糖	七叶灵
1002	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
1004	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
1006	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
ATCC15009	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—

注: “+” 表示试验结果阳性, “—” 表示试验结果阴性。

活性的高低,与乳酸菌的蛋白酶种类和活性密切相关。据报道,瑞士乳杆菌有较强的蛋白酶活性,其一些菌株制作的发酵乳制品,有较强的抗ACE活性^[5,14],本研究结果也证明了这一点。作者将就瑞士乳杆菌蛋白酶与其发酵乳的抗ACE活性关系作深入的研究,以阐明与产生抑制ACE活性肽有关的酶的种类和性质及其协同效应,为提取有关的酶用于开发抗ACE活性肽打下基础。

目前从乳酸菌发酵牛乳获得的ACE抑制肽的降压效果还无法与常用抗高血压药物相比,但乳源性ACE抑制肽可以长期安全食用,不会出现常用抗高血压药物常见的不良反应如疼痛、发烧等,目前研究所取得的结果也证明^[15],通过筛选能发酵牛乳产生ACE抑制肽的乳酸菌是一种可靠的途径,利用这些乳酸菌开发具有抗高血压作用的保健食品将是今后的一个重要研究领域。

参考文献:

- [1] FITZGERALD R J, MEISEL H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme[J]. Br J Nutr, 2000, 84(Suppl 1): 33-37.
- [2] YASUNORI N, NAOYUI Y, KUMI S, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk[J]. J Dairy Sci, 1995, 78: 777-783.
- [3] YASUN N, OSAMU M, TOSHIKI T. Decrease of tissue angiotensin-I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats[J]. Biosei Biotech Biochem, 1996, 60(3): 488-489.
- [4] NAOYUKI Y, ATSUKO A, TOSHIKI T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4): 776-778.
- [5] NAOYUKI Y, ATSUKO A, TOSHIKI T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. J Dairy Sci, 1994, 77: 917-922.
- [6] HIDEAKI K, KANIO D, SHIGERU S, et al. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats[J]. Comp Biochem Physiol, 1990, 96(2): 367-371.
- [7] 吕桂善, 霍贵成. 乳及乳制品中的抗高血压活性肽[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 53-56.
- [8] PAN Dao-dong, LUO Yong-kang, Tanolura M. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004[J]. Food Chem, 2005, 91: 123-129.
- [9] 潘道东. 酸乳中抗高血压肽的分离及其特性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 205-210.
- [10] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [11] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化实验手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992.
- [12] 杨洁彬. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [13] 布坎南 R E, NE吉本斯. 伯杰细菌学手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [14] CUSHMAN DW, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.
- [15] FURUSHIRO M, SAWADA H, HIRAI K, et al. Blood pressure-lowering effect of extract from *Lactobacillus casei* in spontaneously hypertensive rats[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54: 2193-2198.

信息

科学家找到治疗失眠症的新药物


一组科学家最近在治疗失眠症方面取得了重大进展,他们发现阻断大脑中的进食素(orexin)——一种血液多肽——能促进老鼠、狗和人类的睡眠。这一结果已经发表在了1月28日的刊物《Nature Medicine》上。

进食素是一种下丘脑激素,它对于维持清醒状态至关重要。嗜睡症患者的大脑中就缺乏这类激素,这些患者没有正常的睡眠周期。根据美国健康署的数据,大约有超过135000美国人患有这种疾病。

研究小组由Francois Jenck负责,他们发明了一种药物来阻断大脑中的进食素的受体,结果证明这一药物在啮齿类、狗和人身上都有效。目前科学家正对这一药物进行更详尽的分析。一般而言,嗜睡症患者还伴有昏倒症状,即肌肉短时间的失去控制。来自哈佛大学的神经学助理教授Thomas Scammell表示:“这一工作是可靠的,但是也需要注意一些事情。这可能是重大发现的开始。”

这一新型药物的机制和目前流行的各种治疗失眠的药物并不一样。Scammell表示这一药物适用于使用其它安眠类药物效果不佳的患者,但是他同时提醒,这类依靠阻断下丘脑激素受体来实现睡眠的药物有可能会引起大脑的其它问题,例如出现类似嗜睡的症状等。

Scammell说:“我们还需要足够的研究来证明睡眠质量是好的。”而来自Stanford大学的副教授Luis de Lecea说:“这可能发展出一类新的安眠药物。它的最大好处是影响神经相对较少。”

作者: 潘道东, PAN Dao-dong
作者单位: 南京师范大学金陵女子学院食品科学与工程系, 江苏, 南京, 210097
刊名: 食品科学 
英文刊名: FOOD SCIENCE
年, 卷(期): 2007, 28(2)

参考文献(15条)

1. YASUN N;OSAMU M;TOSHIKI T [Decrease of tissue angiotensinI-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats](#)[外文期刊] 1996(03)
2. YASUNORI N;NAOYUI Y;KUMI S [Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk](#)[外文期刊] 1995(4)
3. FITZGERALD R J;MEISEL H [Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme](#)[外文期刊] 2000(z1)
4. 潘道东 [酸乳中抗高血压肽的分离及其特性研究](#)[期刊论文]-[食品科学](#) 2005(01)
5. PAN Dao-dong;LUO Yong-kang;Tanolura M [Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of Lactobacillus helveticus JCM1004](#)[外文期刊] 2005(1)
6. 吕桂善;霍贵成 [乳及乳制品中的抗高血压活性肽](#)[期刊论文]-[中国乳品工业](#) 2002(05)
7. HIDEAKI K;KANIO D;SHIGERU S [Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats](#) 1990(02)
8. FURUSHIRO M;SAWADA H;HIRAI K [Blood pressure-lowering effect of extract from Lactobacillus casei in spontaneously hypertensive rats](#) 1990
9. CUSHMAN DW;CHEUNG H S [Spectrophotometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung](#)[外文期刊] 1971
10. 布坎南 R E;NE 吉本斯;中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组 [伯杰细菌学手册](#) 1984
11. 杨洁彬 [乳酸菌——生物学基础及应用](#) 1996
12. 郝士海 [现代细菌学培养基和生化实验手册](#) 1992
13. 凌代文;东秀珠 [乳酸细菌分类鉴定及实验方法](#) 1999
14. NAOYUKI Y;ATSUKO A;TOSHIKI T [Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from Lactobacillus helveticus CP790](#)[外文期刊] 1994
15. NAOYUKI Y;ATSUKO A;TOSHISKI T [Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats](#)[外文期刊] 1994(04)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_spkx200702035.aspx