

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

范俊峰¹ 李里特¹ 张艳艳¹ 齐藤昌义² 辰巳英三²

1(中国农业大学食品学院, 北京, 100083) 2(日本农林水产省国际农林水产业研究中心)

摘 要 报道了 2 种工业化酶 ProteaseA 和 OrientaseB 的大豆蛋白水解物的高活性 ACEI 肽的筛选工作, 并且对所得到的活性较高的水解物进行了感官评价。这 2 种酶的水解物的 ACE 抑制活性均随着水解时间的增加呈指数归律增加。其中 OrientaseB 水解大豆蛋白 10 h, 其产物的 ACE 抑制活性最高达到 95%, ProteaseA 的最高也可达到 91.33%。ProteaseA 水解 4~10 h 的产物以及 OrientaseB 水解 6~10 h 的产物, 是由 2~5 个氨基酸组成的寡肽, ACE 的抑制活性高, 且苦味轻微或没有。这些肽因其天然、安全、作用温和而有望作为良好的降压成分进入人们的日常膳食。

关键词 大豆蛋白 血管紧张素转换酶(ACE) 降血压肽 血管紧张素转换酶抑制肽(ACEI 肽) 苦味

大豆蛋白酶解物中含有血管紧张素转换酶(EC3.4.15.1 ;ACE)抑制肽(ACEI 肽), 体外实验证实, 它具有抵御肠道蛋白酶的水解作用^[2], 还可以明显降低原发性高血压鼠(SHR)的心脏收缩压, 且没有副作用^[3,4], 目前已成为食物蛋白降压肽^[5~11]研究的热点。在我国开发大豆 ACEI 肽, 既可以充分利用大豆蛋白资源, 又可以为防止心脑血管疾病流行提供可靠有效的膳食干预模式。

研究开发大豆 ACEI 肽就要提高大豆 ACEI 肽活性和降低水解物的苦味, 其关键在于蛋白酶的选择和酶解过程的控制^[12~17]。Pro-

teaseA 和 OrientaseB 分别是米曲霉(*Aspergillus Oryzae*)和芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的精选菌株所产生的蛋白酶, 具有活性高、特定水解时间的产物苦味低的优点。因此本研究拟用这 2 种酶对大豆蛋白进行控制水解, 通过体外降压活性实验筛选出 ACE 抑制活性高、苦味低的大豆蛋白水解物, 为大豆 ACEI 肽的研究及生物技术开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器(表 1 和表 2)

表 1 实验材料

材 料	材质或规格	来 源
大豆分离蛋白(实验用)	蛋白含量 92.4 %	吉林不二制油公司
蛋白酶 ProteaseA	3000 U/mg 以上	日本天野酶制剂公司
蛋白酶 OrientaseB	1 × 10 ⁶ U/g	日本阪急酶制剂公司
马尿酸组氨酸亮氨酸(HHL)	肽含量 75 %	Sigma
血管紧张素转换酶(ACE)	1 μmol 马尿酸(1U/min)	Sigma
OPA(O-phthaldialdehyde)	色谱纯	Sigma

表 2 实验仪器设备

仪器或设备名称	生产厂家
RF5300PC- 荧光分光光度计	Shimadzu
1240- 紫外可见分光光度计	Shimadzu
MS-1 多用振荡器(MS-1 Multi Shaker)	Shimadzu

1.2 方 法

为筛选出 ACE 抑制活性较强且苦味较低的大豆蛋白水解物, 需对大豆蛋白进行一定条件下的控制水解, 水解时间分别选择为 0、0.5、

第一作者: 博士研究生(李里特教授为本文通讯作者)
收稿时间: 2003 - 11 - 17

1、2、4、6、8、10 h。水解后评价水解物的 ACE 抑制活性及苦味。从肽的吸收性出发,本研究同时也从水解度(DH)的角度考察了所得到的 ACE 抑制肽的大致链长。

1.2.1 大豆蛋白的水解

水解时底物浓度、温度、pH 值等参照酶制剂公司提供的 2 种酶的最适反应条件。选定底物浓度为 5%,ProteaseA 的 E:S 为 200 u/g(蛋白),最适 pH 为 4.5;OrientaseB 的 E:S 为 1/1000,最适 pH 为 7.5,2 种酶的最适反应温度均为 40℃。反应在水浴锅中进行,在酶解过程中保持酶的最适条件恒定。各个酶都分别在 0、0.5、1、2、4、6、8、10 h 取样,加热(80℃,30 min)终止酶的反应。调 pH 至 7.0,离心(3000 r/min,15 min 0~4℃)后,过滤上清液(25 mm,φ0.452μm),冷藏待用。

1.2.2 ACE 活性的测定

ACE 抑制活性的测定参照血压降下机能评价法^[18]。将 A 液(HHL 的 NaCl/H₃PO₄ 缓冲液,HHL 的最终浓度为 4.7 mmol/L,NaCl 的最终浓度为 600 mmol/L,磷酸缓冲液(final 浓度是 400 mmol/L,pH8.5)0.1 mL 和上述大豆蛋白酶解物 0.05 mL 加入小试管中,再加入 0.025 U/mL 的 ACE 液 0.1 mL,在旋涡振荡器上混合均匀后立刻将小试管置于 37℃ 的水浴锅中保温 30~60 min。反应完成后加入 1.5 mL 0.3 mol/L NaOH 终止酶的反应。

在 ACE 的反应中,以水代蛋白酶解液反应得到无抑制剂抑制的 ACE 反应液;以水代 ACE 反应得到对照液。

随后是 ACE 反应生成物的定量,具体步骤如下:加 0.1 mL 2% 的 OPA 液于 ACE 反应液中,振荡,混匀,静置。10 min 后加入 0.2 mL 3 mol/L HCl 终止反应。将上述溶液稀释 250 倍。在稀释后的 30~90 min 内进行荧光测定(激发波长 340 nm,发射波长 455 nm)。

ACE 活性的计算如下式:

$$\text{ACE}\% = [(b - c) \div a] \times 100$$

a 表示不存在抑制剂时的荧光强度; b 表示抑制剂与 ACE 都存在时的荧光强度; c 表示

抑制剂与 ACE 都不存在时的荧光强度。

该式中,ACE% 的值小,说明大豆蛋白酶解物抑制 ACE 活性的能力强,抑制血压上升的能力也就越强;反之则说明大豆蛋白酶解物抑制 ACE 活性的能力弱,抑制血压上升的能力也弱。

1.2.3 水解度(DH)的测定

参照 Jense Adler-Nissen 的 TNBS 法^[19],将 0.25 mL 的样品与 2 mL 0.2125 mol/L 磷酸缓冲液(pH8.2)和 2 mL TNBS(0.1%)混合,接着在 50℃ 的暗室中放置 60 min。反应完毕,加入 4 mL 0.1 mol/L HCl 终止反应,于 340 nm 下测其 ABS。以 1.5 mmol/L 的 L-亮氨酸作标准曲线。

1.2.4 大豆蛋白酶解物苦味的感官评价

以浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-4}$ mol/L 的奎宁为苦味标准^[20]。设待评价液的苦味分值为 0~4 分,奎宁浓度在 10^{-4} mol/L 时,味极苦,为 4 分。具体的苦味评价评分标准见表 3。

表 3 苦味值的评价评分标准

奎宁浓度 /mol·L ⁻¹	8×10^{-7}	3×10^{-6}	7×10^{-6}	2×10^{-5}	10^{-4}
苦味描述	无苦味	微苦	苦	非常苦	极苦
苦味分值	0	1	2	3	4

感官评定小组由中国农业大学中日食品研究中心 5 个年龄在 25~35 岁的成员组成。所有待评价液都随机摆放。评价员用去离子水漱口之后,取待评定液 2~3 mL 置于口中,10 s 后吐出,漱口后取与之苦味相近的标准液品尝,如确认 2 种苦味相近,即可将该标准液的苦味值定为该评价液的苦味值,否则,则需取其他标准液再尝,直至确定苦味值。结果取 5 人评定值的平均值。3 min 后评价下一个样品。

2 结果与讨论

2.1 大豆蛋白酶作用时间对 ACEI 肽活性的影响

大豆蛋白酶作用时间对 ACEI 肽活性的影响实验结果见图 1。

从图 1 可以看出,未水解的大豆蛋白对

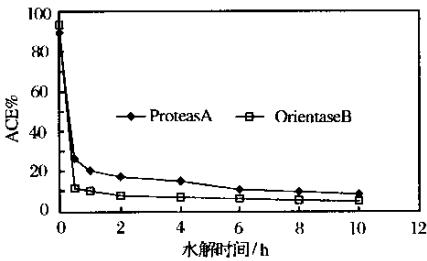


图1 水解时间对 ACE 抑制活性的影响

ACE 也有抑制作用,这说明酶解后的水解物中 ACEI 肽类物质并非可简单的归结为有或无,且 ACE 可能是一类专一性相对较宽的酶。但是水解时间不同,水解物对 ACE 的抑制效果差别较大,ACE 的活性随着水解物水解时间的增加呈指数减少[ACE 的活性与水解时间关系如

表 4 各种水解物的水解度

水解时间/h	0	0.5	1	2	4	6	8	10
DH/(ProteaseM)	3.2	22.1	35.1	47.5	52.5	56.6	58.9	60.5
DH/(Orientase90N)	2.8	29.0	38.2	43.2	47.0	49.3	51.1	53.3

本研究根据 Adler Nissen^[13]的水解度与肽的平均链长的关系考察了这些 ACE 抑制活性较强的大豆 ACEI 肽的平均链长。各种水解物的水解度见表 4。ProteaseA 水解 0.5~10 h 的产物的水解度为 22.1%~60.5%,OrientaseB 的为 29.0%~53.0%。按照 Adler Nissen 的理论,本研究得到的 ACEI 肽的平均链长应在 2~5 个氨基酸之间,按平均分子量 120 计,其分子量在 200~600 之间。Oshima 等^[5]用细菌胶原酶降解明胶获得 6 条活性较强的 ACEI 肽的分子量都在 1500 u 以下;吴建平用 HPLC 分析大豆蛋白降压肽认为主要是链长为 2~8 个氨基酸的寡肽^[2]。本研究所得到的活性较强的 ACEI 肽的分子量与平均链长基本与他们的研究结果一致,也属分子量较小的寡肽。

2.2 两种酶的大豆蛋白水解物的苦味评价

对大豆蛋白水解物的苦味评价如图 2 所示。由图 2 可知,对 ProteaseA 而言,除了其水解 2 h 的产物有苦味外,其他水解物都苦味很淡或没有苦味。综合考虑其对 ACE 的抑制作用,其水解大豆蛋白 4~10 h 的产物,不但苦味

下,对 ProteaseA: $y = 21.69 - 5.6568 \ln(x + 0.000006435)$ ($r = 0.9824$);对 OrientaseB: $y = 10.251 - 2.1702 \ln(x + 2.45 \times 10^{-17})$ ($r = 0.9870$);其中 $y = \text{ACE}\%$, $x = \text{水解时间}$ 。未水解的大豆蛋白对 ACE 的抑制作用是非常有限的,大豆蛋白水解 30 min 的产物,其对 ACE 的抑制作用相对于大豆蛋白急剧增加,达 73% 以上;以后随着水解时间的增加,水解物活性增加幅度不大,但对 ACE 抑制性呈稳定的渐进的增加。ProteaseA 作用大豆蛋白 10 h,可使 ACE% 降到 5.25%,OrientaseB 作用 10 h,使 ACE% 降低至 8.67%,都显示了最高的活性。这说明某些酶对大豆蛋白可专一性地产生较强 ACEI 肽类。

淡或没苦味,而且对 ACE 的抑制作用强,是食品中可充分利用的良好的降压成分。对 OrientaseB 而言也是这样,尽管其水解 6~10 h 的产物略有苦味,但是其对 ACE 的抑制作用强于相同水解时间的 ProteaseA 的水解物。考虑水解时间对生产的影响,对 ProteaseA 水解 4 h 获得的降压肽是合适的, OrientaseB 水解 6 h 得到的降压肽是合适的。

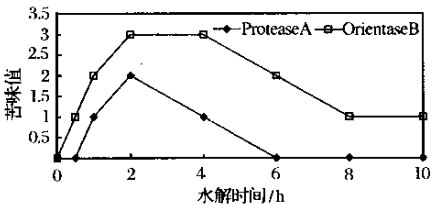


图2 两种蛋白酶水解物的苦味评价

这是对大豆 ACEI 肽感官评价的首次报道。本研究没有用传统的脱苦方法来对已得到的水解物进行处理,而仅是通过一定蛋白酶的控制水解得到的功能肽,这对于简化功能性肽的生产工艺具有一定意义。

3 结 论

2 种商业化的蛋白酶 ProteaseA 和 OrientaseB 水解大豆蛋白,其产物的 ACE 抑制活性均随水解时间的增加呈指数归律增加。其中, OrientaseB 的水解物的抑制活性最高达到 95%, ProteaseA 的最高也达到 91.33%。这一结果已远远超出国内报道的 66.3%,而与韩国的 Somg 报道的 91.6% 相当。ProteaseA 的 4~10 h 的水解物以及 OrientaseB 的 6~10 h 的水解物,苦味轻微或没有苦味,ACE 的抑制活性高,且是由 2~5 个氨基酸组成的寡肽,吸收性良好。

在研究中,以 2 种蛋白酶水解大豆蛋白所得的水解物对 ACEI 的抑制活性很高。目前,由于大豆功能性寡肽体外对 ACE 的抑制作用与体内降血压作用的关系还没有确定,因此,研究中的高活性的大豆 ACEI 肽在体内的降压作用尚须进一步的实验验证。但由于寡肽的吸收性良好,不易受体内蛋白酶的作用,因而这些高活性的 ACEI 肽很有可能会被肠道有效吸收进入血液循环系统发挥降压作用^[21~25];再者,这些高活性的 ACEI 肽没苦味或苦味低,在利用时不需烦琐的后脱苦处理,因而,若其体内的活性被确定,有望作为前景广阔的辅助食品在降压方面发挥作用。

参 考 文 献

- Potter S M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy[J]. J Nutr 1995, 125 :606s~611s
- Wu J P. Development of antihypertensive peptides from soy protein[D]. Wuxi University of Light Industry, Wuxi, China, 1998
- Wu J P, Ding X L. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 :501~506
- Yu R, Park S A, Chung D K et al. Effect of soybean hydrolysate on hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. J Korean Soc Food Sci Nutr, 1996, 25 :1031~1036
- Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digest of gelatin by bacterial collagenases[J]. Biochim, Biophys Acta, 1979, 566 :128~137
- Maruyama S, Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin-I converting enzyme in the tryptic hydrolyzate of casein[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46 :1393~1394
- Kohama Y, Matsumoto S, Oka H et al. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle Biochem Biophys Res Commun, 1988, 155 :332~337
- Miyoshi S, Kaneko T, Ishizawa Y et al. Structures and activities of angiotensin converting enzyme inhibitor[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55 :1313~1318
- Seki E, Osajima K. Quantitative analysis of digestion resistant ACE inhibitory peptides by small intestinal muco[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1996, 43 :967~969
- Hyun C K, Shin H K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides[J]. Process Biochem 2000, 36 :65~71
- Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E. Production of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FT5[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 :3898~3904
- Sang W A, Kyung M K, Kwang W Y. Isolation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from soybean hydrolysate[J]. Food Sci Biotech, 2000, 9(6) :378~381
- Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [J]. NY: Elsevier Applied Science Publishers, 1986
- Helbig N B, Ho L, Christy G E. Debitting of skim milk hydrolysates by adsorption for incorporation into acidic beverages[J]. J Food Sci, 1980, 45 :331~335
- Chersi A, Zito R. Isolation of tryptophan-containing peptides by adsorption chromatography[J], Anal Biochem, 1976, 73 :471~476
- Barry C M, O Cuinn G, Harrington D. Gerald, R. J. Debitting of a tryptic digest of bovine β -casein using porcine kidney general aminopeptidase and x-prolydipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris AM2[J]. J Food Sci, 2000, 65 (7) :1145~1149
- Lozano P, Combes D. α -Chymiotrypsin in plastein synthesis, Effect of hydroxylates additives on enzyme activity[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1992, 33 :51~56
- 日本农林水产省, 农林水产技术会议事務局, 食品

- 综合研究所.食品机能评价手册. 1999. 117~121
- 19 Adler-Nissen J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid[J]. J Agric Food Chem ,1979 ,27 (6):1256~1262
 - 20 Minagawa E , Kaminogawa S , Tsukasaki F. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by Aminopeptidase T [J]. J Food Sci , 1989 ,54 (5):1225~1229
 - 21 Grahl-Nielsen. Oligopeptides as sources of indispensable amino acids for mammalian cells in culture[J]. In Vitro ,1974 ,9 :414~420
 - 22 Lombardo Y B , Morse E L , Adibi S A. Specificity and mechanism of influence of amino acid residues on hepatic clearance of oligopeptides[J]. J Biol Chem , 1988 ,263 :12920~12926
 - 23 Silk D B , Hegarty J E , Fairlough P D. Characterization and nutritional significance of peptide transport in man[J]. Ann Nutr Metab ,1982 ,26 :337~352
 - 24 Roberts P. R , Burney J D , Black K W. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract[J]. Digestion 1999 ,26 :222~227
 - 25 Masuda O , Nakamura Y , Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats[J]. J Nut , 1996 , 126 :3036~3068

ACE Inhibitory Effect of the Peptides from Soybean Protein by Proteases

Fan Junfeng¹ Li Lite¹ Zhang Yanyan¹
Masayoshi Saito² Tatsumi²

1(College of Food Science and Engineering ,China Agricultural University , Beijing , 100083)

2(Food Science and Technology Division Japan International Research Center for
Agricultural Sciences ,Tsukuba ,Japan)

ABSTRACT Soybean hydrolysates prepared with Protease M and Orientase 90N were tested for their tastes and their inhibitory effects against angiotensin converting enzyme(ACE). The inhibitory effect increased exponentially with increasing hydrolysis time and max inhibitory effect (95 % for Orientase 90N and 91.33 % for Protease M) was observed after hydrolysis for 10 hours. Hydrolysates treated with Protease M for 4 to 10 hours and with Orientase 90N for 6~10 hours showed low to none bitterness and higher ACE inhibitory activity. The ACE inhibitory peptides with higher activity are oligopeptides composing of 2~5 amino acids. The soybean hydrolysates could be a promising antihypertensive food.

Key words soybean protein ,ACE ,ACEI peptides ,bitterness

政策、法规、标准
公布保健食品
国家食品药品
27种管理功能
监督管理局

2003 年 ,保健食品的管理由卫生部移交至国家食品药品监督管理局。自 1996 年 6 月~2003 年 9 月 ,卫生部按 22 个功能 ,共审批保健食品 5 070 种。其中国产 4 612 种 ,进口的有 458 种。5 070 个产品中按功能分 ,免疫调节占 30 % ,抗疲劳占 15 % ,调节血脂占 14 %。国家食品药品监督管理局接管保健食品后 ,对保健食品的申报功能范围 ,由原来的 22 种调整为 27 种。并规定自 2003 年 5 月 1 日起执行。同一配方的保健食品 ,最多允许申报 2 个功能。国家食品药品监督管理局规定 27 种功能为 (1)辅助增强免疫力、(2)辅助降血脂、(3)辅助降血糖、(4)抗氧化、(5)辅助改善记忆、(6)缓解体力疲劳、(7)缓解肌肉疲劳、(8)促进排铅、(9)清咽、(10)辅助降血压、(11)改善睡眠、(12)促进泌乳、(13)提高耐缺氧、(14)对辐射危害有辅助保护功能、(15)减肥、(16)改善生长发育、(17)增加骨密度、(18)改善营养性贫血、(19)对化学性肝损伤有辅助保护功能、(20)祛痤疮、(21)祛黄褐斑、(22)改善皮肤水分、(23)改善皮肤油性、(24)调节肠道菌群、(25)促进消化、(26)通便、(27)对胃粘膜有辅助保护功能。