

# 不同益生菌发酵乳 ACEI 活性比较\*

杨振泉<sup>1</sup>, 卞海榕<sup>1</sup>, 顾瑞霞<sup>1</sup>, 汪家琦<sup>2</sup>, 李启明<sup>2</sup>

1(扬州大学乳品研究所, 江苏 扬州, 225001) 2(新希望乳业控股有限公司, 四川 成都, 610100)

**摘 要** 测定了6株德氏乳杆菌保加利亚亚种、6株嗜热链球菌、6株鼠李糖乳杆菌、4株双歧杆菌和天然发酵剂 Kefir 发酵产物的 ACEI 活性。结果显示, 发酵产物的 ACEI 活性呈现种属和菌株差异性, 发酵和贮藏条件对 ACEI 活性具有显著影响, 菌株发酵结束后经冷藏, ACEI 活性均有不同程度的下降。德氏乳杆菌保加利亚亚种 Lb9 菌株在发酵 6h 时的 ACEI 活性为 60%, 发酵产物在冷藏 24 h 和 48 h 后, ACEI 活性分别为 55.72% 和 49.64%。嗜热链球菌 Stnh16 菌株发酵 6h 时的 ACEI 活性显著高于其他嗜热链球菌菌株, 为 52.73%, 冷藏 24 h 和 48 h 后, ACEI 活性分别为 48.82% 和 42.58%。鼠李糖乳杆菌在发酵 18h 时的 ACEI 活性最高, 其中 F 菌株为 83.19%, R26 为 72.72%, LV108 菌株为 69.44%, 但是冷藏 24 h 和 48 h 后, ACEI 活性 LV108 菌株显著高于其他菌株, ACEI 活性分别为 66.19% 和 62.91%, 显示其适宜用作生产降血压益生菌发酵乳的发酵剂。双歧杆菌不同菌株中, H4 在发酵 24 h 时 ACEI 活性最高, 为 46.55%。Kefir 在发酵 24h 时, 其 ACEI 活性最弱, 仅为 15.23%。该研究为筛选降血压益生菌发酵乳的发酵剂及发酵乳生产提供了参考。

**关键词** 益生菌, 发酵乳, ACEI 活性

血管紧张素转化酶抑制(angiotensin I-converting enzyme inhibitory, ACEI)肽是血管紧张素转换酶的抑制剂, 对降低血压有积极的影响, 因而研究开发具有 ACEI 活性的药物和功能食品引起人们的关注。研究表明, 从牛乳蛋白质和发酵乳制品中可以提取获得乳源降血压肽<sup>[1]</sup>。目前发酵乳制品的降血压作用已经成为国内外的研究热点, 乳酸菌的降血压作用在于其能够代谢产生蛋白酶, 从而降解蛋白质, 产生 ACEI 活性肽, 而抑制活性与所使用的乳酸菌的种类密切相关<sup>[2]</sup>。不同乳酸菌发酵过程中的代谢产物具有多样性, 蛋白水解产物也不相同, 发酵乳制品的 ACEI 活性亦有区别。因此, 筛选高产 ACEI 活性的益生菌是开发降血压益生菌发酵乳的基础。本文主要从 6 株德氏乳杆菌保加利亚亚种、6 株嗜热链球菌、6 株鼠李糖乳杆菌、4 株双歧杆菌和 Kefir 中, 通过比较其发酵乳的 ACEI 活性和冷藏过程中的稳定性, 旨在筛选适合制作降血压发酵乳的益生菌发酵剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

第一作者: 硕士, 讲师(顾瑞霞教授为通讯作者)。

\* 国家“863 计划”(2007AA10Z357), 国家“十一五”科技支撑计划(2006BA104A17)和江苏省高校科研成果产业化推进资助项目(JH07-027)

收稿日期: 2008-11-18, 改回日期: 2009-01-07

本实验所涉及的德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) Llg、Lb1、Lwg、Lng、Lgg 和 Lb9, 嗜热链球菌(*Str. thermophilus*) Slq、Str、Syst、Stnh16、St1 和 Swq, 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) R02、R08、R26、LV108、F 和 Lr-4, 双歧杆菌(*Bifidobacterium*) BB12、BF、H1、H4, 以及 Kefir, 除双歧杆菌 BB12 来源于丹麦汉森公司外, 其余菌株均为扬州大学乳品研究所分离鉴定; 脱脂乳粉由扬州大学实验农牧场提供; 血管紧张素转化酶(ACE)和马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)购自 Sigma 公司; 其它常规试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 乳酸菌发酵试验

将脱脂乳粉按照 11% NFS(非脂肪固形物)的比例复原为脱脂乳, 再经 121℃, 15 min 灭菌后, 冷却到最适发酵温度, 接种乳酸菌发酵剂进行培养。将 6 株德氏乳杆菌保加利亚亚种和 6 株嗜热链球菌按 4% 的接种量, 接种到热处理后的脱脂乳中, 42℃ 发酵, 分别在发酵第 3 h、6 h 和 9 h 取样测定 ACEI 活性; 6 株鼠李糖乳杆菌和 4 株双歧杆菌按 4% 的接种量接种脱脂乳培养基, 37℃ 发酵, 分别在发酵第 10 h、18 h 和 24 h 取样测定 ACEI 活性, 每样平行测定 3 次, 取平均值。

### 1.3 发酵产物的冷藏试验

6 株德氏乳杆菌保加利亚亚种菌株 6 h 发酵产物、6 株嗜热链球菌菌株 6 h 发酵产物、6 株鼠李糖乳杆菌菌株 18 h 发酵产物和 4 株双歧杆菌菌株以及

Kefir 24 h 发酵产物,于 4 ℃ 冷藏,在第 0 h、24 h 和 48 h,取样测定 ACEI 活性,每样平行测定 3 次,取平均值,分析不同菌株发酵产物冷藏稳定性。

#### 1.4 ACEI 活性的体外检测

不同菌株发酵产物中的 ACEI 活性检测方法参考 Cushman 等人<sup>[3,16]</sup>建立的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同益生菌发酵产物中 ACEI 活性变化比较

按 1.2 试验方法,得到的测定结果如图 1~图 4 所示。由图 1 可见,德氏乳杆菌保加利亚亚种在发酵 6h 时 ACEI 活性最高,ACEI 活性具有较大的菌株差异性,其中 Lb9 在发酵 6h 时 ACEI 活性为 60.0%,而 Lwg 发酵产物中 ACEI 活性仅为 14.5%。

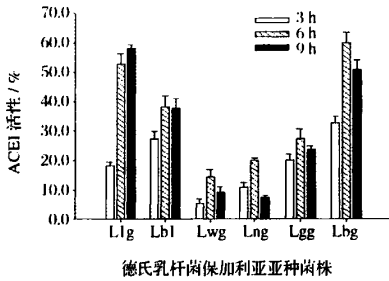


图 1 德氏乳杆菌保加利亚亚种不同菌株发酵乳的 ACEI 活性

由图 2 可见,6 株嗜热链球菌在不同发酵时间 ACEI 活性变化呈现多样性,菌株 Slq、Str 和 Syst 在发酵 3 h 时 ACEI 活性最高分别为 34.5%、47.4% 和 49.1%,随着发酵时间的延长活性逐步下降,至发酵 9 h 时 ACEI 活性分别为 23.2%、25.2% 和 24.5%,Stnh16 在发酵 6 h 时 ACEI 活性显著高于发酵 3 h 和 9 h 时 ACEI 活性 ( $P < 0.01$ );St1 菌株 ACEI 活性随着发酵时间的延长逐步上升。从图 3 可以看出 6 株鼠李糖乳杆菌均在 37℃ 发酵 18 h 时 ACEI 活性最高,其中菌株 F 最高,为 83.19%,显著高于其他菌株 ( $P < 0.01$ )。

4 株双歧杆菌的测定结果如图 4 所示。H4 在发酵 24 h 时 ACEI 活性最高(46.55%),而 BB12 和 BF 菌株 ACEI 活性峰值出现在 18h,分别为 37.5% 和 32.4%。上述结果显示,不同种属的乳酸菌产 ACEI 活性多肽能力具有差异性,本实验中鼠李糖乳杆菌中有 4 株 ACEI 活性介于 60%~85%,而 6 株德氏乳杆菌保加利亚亚种有 2 株 ACEI 活性在 50%~60%;嗜热链球菌中只有 1 株超过 50%,而双歧杆菌均小

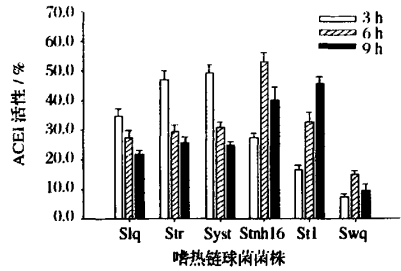


图 2 嗜热链球菌不同菌株发酵乳的 ACEI 活性

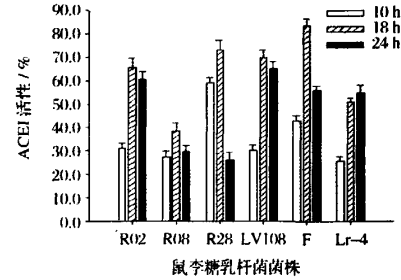


图 3 鼠李糖乳杆菌不同菌株发酵乳的 ACEI 活性

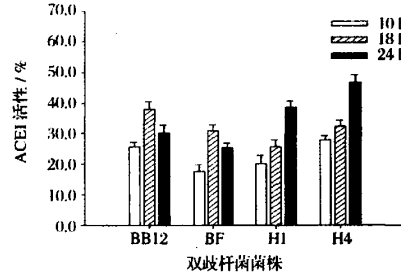


图 4 双歧杆菌不同菌株发酵乳的 ACEI 活性

于 50%,提示从鼠李糖乳杆菌中筛选高产 ACEI 活性菌株可能性最大。当然,在同一种属不同菌株之间产 ACEI 活性也存在多样性,因此扩大筛选菌株数量,进行大量比较研究是筛选高产 ACEI 活性菌株必要手段。

### 2.2 发酵产物在冷藏过程中 ACEI 活性变化比较

按 1.3 方法处理,比较不同菌株发酵产物冷藏稳定性,结果如图 5~图 8 所示。结果显示,4 ℃ 冷藏会不同程度的降低 ACEI 活性,但是不同菌株的发酵产物中 ACEI 活性下降的程度具有显著差异。在 6 株德氏乳杆菌保加利亚亚种和 4 株 *Bifidobacterium* 菌株以及 Kefir 24 h 发酵产物冷藏中 ACEI 活性均呈缓慢下降趋势,未发现显著差异(如图 5 和 8 所示,  $P > 0.05$ );6 株嗜热链球菌发酵产物 ACEI 活性下降程度具有较大差异(如图 6 所示),其中,Str、Syst 和 St1 下降速度显著高于其他菌株 ( $P < 0.01$ ),其原

因可能与降解产物的稳定性有关。6株 *L. rhamnosus* 菌株 18 h 发酵产物 4℃ 冷藏中, LV108 ACEI 活性没有出现显著下降(图 7), 而 F 菌株 ACEI 活性下降速度显著高于其他菌株( $P < 0.01$ )。综合考虑发酵产物中 ACEI 活性和冷藏后的 ACEI 活性的稳定性, 鼠李糖乳杆菌 LV108 发酵产 ACEI 活性的能力及冷藏稳定性较好, 适合作为降血压发酵乳制品发酵剂的候选菌株。

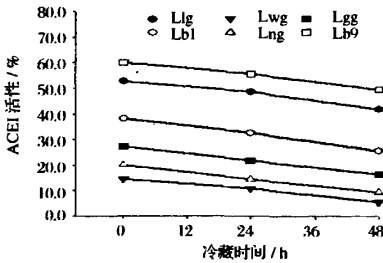


图 5 德氏乳杆菌不同菌株 6 h 发酵产物 4℃ 冷藏中 ACEI 活性变化

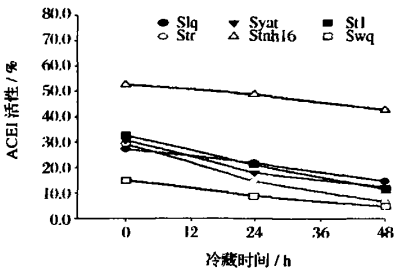


图 6 嗜热链球菌不同菌株 6 h 发酵产物 4℃ 冷藏中 ACEI 活性变化

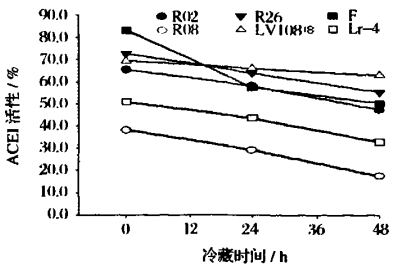


图 7 鼠李糖乳杆菌不同菌株 18 h 发酵产物 4℃ 冷藏中 ACEI 活性变化

### 3 讨论

将降血压肽和益生菌结合生产功能性发酵乳是乳酸菌制品发展的方向之一, 具有较广阔的前景。发酵乳制品的降血压作用的强弱与其所使用的乳酸菌的种类密切相关, 筛选适合生产降血压发酵乳的菌种

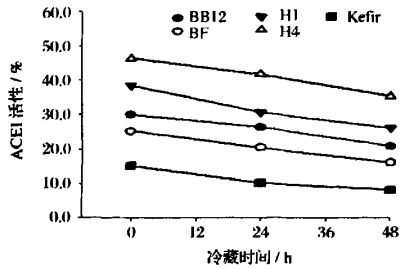


图 8 双歧杆菌不同菌株和 Kefir 24 h 发酵产物 4℃ 冷藏中 ACEI 活性变化

具有重要的意义。目前已经发现了多种具有降血压作用的乳酸菌, 其中主要以瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) 为主<sup>[4]</sup>。发酵乳制品 Calpis 使用 *L. helveticus* CP790 发酵牛乳, 产生的肽段具有良好的降压作用<sup>[5]</sup>。芬兰 Valio 公司的降压产品 Evolus 使用了 *L. helveticus* LBK16H 发酵牛乳, 使牛乳中含有大量降压肽达到降压效果<sup>[6]</sup>。分离自意大利干酪的 *L. helveticus* PR4 能够代谢产生一种蛋白酶, 这种蛋白酶可水解 6 种不同的乳蛋白, 包括牛乳、绵羊乳、山羊乳、猪乳、水牛乳以及人乳产生小肽, 经纯化获得 41 种小肽, Nakarnura<sup>[7]</sup> 和 Vermeirssen<sup>[8]</sup> 等对这些小肽进行了 ACE 抑制活性的检测, 发现均具有 ACE 抑制活性<sup>[9~11]</sup>, 对 ACE 的抑制活性能达到 70%~100%<sup>[12]</sup>。研究发现<sup>[13]</sup>, 其他瑞士乳杆菌, 如 *L. helveticus* CHCC637 和 *L. helveticus* CHCC641, 同样能够代谢产生蛋白酶, 降解蛋白产生 ACE 活性抑制肽。除瑞士乳杆菌外, 还发现其他一些乳酸菌同样产生降压肽。Gobbetti 等人<sup>[14]</sup> 研究发现, 保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*) SSI 和乳酸杆菌 (*L. lactis cremoris*) FT4 的发酵牛乳中也分离获得了具有降压作用的小肽。

本研究通过测定 6 株德氏乳杆菌保加利亚亚种菌株、6 株嗜热链球菌菌株、6 株鼠李糖乳杆菌菌株、4 株双歧杆菌和 Kefir 发酵产物的 ACEI 活性。结果显示发酵产物的 ACEI 活性呈现种属和菌株差异性, 发酵和贮藏条件对 ACEI 活性具有显著影响, 菌株发酵结束后经冷藏, ACEI 活性均有不同程度的下降。德氏乳杆菌保加利亚亚种 Lb9 在发酵 6 h 时的 ACEI 活性为 60%, 发酵产物在冷藏 24 h 和 48 h 后 ACEI 活性分别为 55.72% 和 49.64%。嗜热链球菌 Stnh16 发酵 6 h 时的 ACEI 活性显著高于其他嗜热链球菌菌株, 为 52.73%, 冷藏 24 h 和 48 h 后 ACEI 活性分别为 48.82% 和 42.58%。双歧杆菌不同菌株

中,H4 在发酵 24h 时 ACEI 活性最高,为 46.55%。Kefir 在发酵 24h 时,其 ACEI 活性最弱,仅为 15.23%。鼠李糖乳杆菌在发酵 18h 时的 ACEI 活性最高,其中 F 菌株为 83.19%,R26 为 72.72%,LV108 菌株为 69.44%,但是冷藏 24h 和 48h 后 ACEI 活性 LV108 菌株显著高于其他菌株,ACEI 活性分别为 66.19%和 62.91%,显示其适宜用作生产降血压益生菌发酵乳的发酵剂。本研究为筛选降血压益生菌发酵乳的发酵剂以及发酵乳的制作提供了参考。

## 参 考 文 献

- 1 吴玲,潘道东. 发酵乳抗高血压特性的研究[J]. 食品科学,2005,26(9):446~450
- 2 王海燕,张佳程. 乳源 ACE 抑制剂(降血压肽)的研究现状[J]. 食品与发酵工业,2001,27(11):70~73
- 3 Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. Pharmacol, 1971, 20: 1 637~1 648
- 4 杨焱炯,杭晓敏. 乳酸菌发酵产品的降血压功能及其机制[J]. 中国微生态学杂志,2006,18(2):141~144
- 5 Yamamoto N, 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
- 6 Fitzgerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins[J]. J Nutr, 2004, 134: 980S ~ 988S
- 7 Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory from sour milk [J]. J Dairy Sci, 1995, 78(3): 777~783
- 8 Vermeirssen V, Vancamp J, Verstraete W. Optimisation and validation of an angiotensin I-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides [J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 51(1): 75~87
- 9 Fitzgerald RJ, Meisel H. Milk protein-derived inhibitions of Angiotensin I-converting enzyme [J]. Brit J Nutr, 2002, 21(4): 833~837
- 10 Ginger MR, Grigor MR. Comparative aspects of milk caseins [J]. Comp Biochem Physiol, 1999, 124(1): 133~145
- 11 Tauzin J, Miclil, Gaillard JL. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine S2-CN [J]. FEBS Lett, 2002, 53(2): 369~374
- 12 Minervini F, Algaron F, Rizzelloccp, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolysed casein of milk from six species [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 47: 5 297~5 305
- 13 Fuglsang A, Nilsson D, Niels CB. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin Converting enzyme inhibitor evaluated in permanently catheterized spontaneously hypertensive rats [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 46: 3 566~3 569
- 14 Gobheiti M, Ferranti P, Smacchi E, et al. Production of Angiotensin I-convertingenzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* SSI and *Lactobacillus lactis* subsp. *Cremoris* FT4 [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 44: 3 898~3 904
- 15 王亚林. 食品蛋白质降血压肽(ACEIP)的开发研究 [J]. 粮食与饲料工业,2003(11):40~41
- 16 孙健,顾瑞霞. 乳蛋白 ACEI 酶解工艺条件的研究 [J]. 中国乳品工业,2006,34(7):4~8

## Parallel Study on ACEI Activity of Fermented Milk Products by Different Probiotic Bacteria

Yang Zhenquan<sup>1</sup>, Bian Hairong<sup>1</sup>, Gu Ruixia<sup>1</sup>, Wang Jiaqi<sup>2</sup>, Li Qiming<sup>2</sup>

1(Institute of Dairy Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225001,China)

2(New Hope Dairy Holdings Limited, Chengdu 610100,China)

**ABSTRACT** In this study, we determined ACEI activity of milk products fermented by 6 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains, 6 *Str. thermophilus* strains, 6 *L. rhamnosus* strains and 4 strains of *Bifidobacterium isolates* as well as natural starter Kefir. The results showed that ACE inhibition activity in products varied among species and strains and were influenced by fermentation and storage conditions significantly. When fermented milk products were stored in cold condition, ACE inhibition activity would gradually decrease at various degrees which related to starter used. Lb9 was found to have higher ACEI activity (60.0%) in 6h fermented milk among 6 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and decreased to 55.72% and 49.64% after stored at 4℃ for 24h and 48h, respectively. Stnh16 6h fermented milk had 52.73% of ACEI activity, which was significantly higher than other *Str. thermophilus* strains. For 6 *L. rhamnosus* strains, highest ACEI activity were found in 18h fermented products, in which, strains F, R26 and LV108 were 83.19%, 72.72% and 69.44%, respectively, however, after stored at 4℃ for 24h and 48h, LV108 was 66.19% and 62.91%, which was significantly higher than other strains. For *Bifidobacterium* isolates and Kefir, H4 24 h fermented products have higher ACEI activity (46.55%) and for Kefir ACEI activity only arrived at 15.23%. This study offered the useful data for screening potential bacteria starter for probiotic fermentation milk products.

**Key words** probiotic bacteria, fermentation milk, ACEI activity