

醋蛋中 ACE 抑制肽的分离及其活性保护的研究

吴迪, 杜先锋*

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: ACE 抑制肽在体内稳定性的研究对于其功能活性的保护具有重要意义。采用凝胶色谱层析法对经酶解后的醋蛋液进行分离纯化, 收集具有较高抑制活性的多肽组分。再将其与卵磷脂结合形成复合物, 目的是利用卵磷脂的乳化性保护多肽活性。利用 FT-IR、XRD 对复合物的结合效果进行验证分析, 结果发现卵磷脂与活性肽结合后, 活性肽的 ACE 抑制活性在体外模拟前后相较于未经结合处理得到明显的升高。红外光谱研究发现复合物中活性肽与卵磷脂发生相互作用。通过 XRD 进一步验证并推断是活性多肽被卵磷脂吸收后以无定形或分子态的形式存在。因此, 可认为经过卵磷脂复合的多肽可以很好保留 ACE 抑制活性且可以降低其被胃肠道酶降解的风险。

关键词: 血管紧张素转化酶抑制肽; 卵磷脂复合物; FT-IR; XRD

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0775-05

Isolation of ACE inhibitory peptide in vinegar-egg hydrolysates and its activity protection

WU Di, DU Xianfeng

(School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The stability of ACE inhibitory peptide in vivo is significant to protection of its biological active. Vinegar-egg hydrolysates were isolated and purified with Superdex gel chromatography. The high inhibitory activity components were collected and then were emulsified with lecithin in order to protect the bioactivity of ACE inhibitory peptides. The peptide-lecithin complex was investigated using FT-IR and XRD. The results showed that the bioactivity of ACE inhibitory peptides was increased after the binding treatment. The FT-IR showed that the interaction was detected in the peptide-lecithin complex. Further verification of the interaction using XRD proposed that ACE inhibitory peptide was absorbed by lecithin and existed in the form of amorphous and molecular state. Thus, the peptide-lecithin complex plays a role in retaining the bioactivity of ACE inhibitory peptides and reducing its risk of gastrointestinal enzyme digestion.

Key words: angiotensin converting enzyme inhibitory peptides; lecithin; FT-IR; XRD

血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE EC 3.4.15.1) 能催化血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II; 同时使缓激肽失活, 引起血压升高^[1]。抑制 ACE 的活性从而使血管紧张素 II 的生成减少, 同时使缓激肽失活减少, 从而达到抑制血压升高, 预防及治疗高血压的目的。醋蛋作为一种中国传统的食疗保健饮品, 因其工艺简单, 成本低廉, 安全性高的特点, 具有较好的市场前景。且据文献报道醋蛋中有 ACE 抑制肽^[2]。然而, ACE 抑制

肽的抑制活性在体内外具有不同的抑制效果, 主要原因可能因为活性肽经口服后进入胃肠道, 活性肽的氮端或碳端的关键氨基酸被胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等消化蛋白酶裂解, 从而导致活性肽失活^[3]。

卵磷脂 (lecithin), 化学名为磷脂酰胆碱, 是一种含磷酸的类脂化合物, 是构成细胞生物膜的基本构成, 具有较高的营养价值和生理调节机能^[4]。卵磷脂磷原子上的羟基有较强的得电子能力, 而胆酰基

收稿日期: 2017-03-03

作者简介: 吴迪, 硕士研究生。E-mail: 974306056@qq.com

* 通信作者: 杜先锋, 博士, 教授, 博士生导师。Email: dxf@ahau.edu.cn

团中氮原子有较强的失电子倾向,有研究认为多肽与磷脂形成复合物的过程中,肽链的C-末端和N-末端可与磷脂发生作用^[5]。磷脂复合物可以提高人体对天然活性成分的吸收,并优化其生物有效性^[6]。

本研究采用卵磷脂复合方法,将卵磷脂与多肽形成复合物,以降低ACE抑制肽在人体内降解失活,从而提高ACE抑制肽生物利用度,这对于醋蛋ACEI类口服产品的开发奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

鸡蛋,市售;9°米醋,镇江市恒康调味品厂;卵磷脂, sigma 公司;碱性蛋白酶, sigma 公司;马尿酸组氨酰亮氨酸,美国 sigma 公司;卡托普利,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;血管紧张素转化酶,美国 sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

BioLogicDuoFlow 层析系统,美国 Bio-Red 公司; Superdex peptide 10/300GL 凝胶色谱柱, Amersham Pharmacia Biotech 公司;高效液相分析仪 Waters 600;美国 Waters 公司;傅立叶红外光谱仪 Nicolette is50,美国赛默尔飞世尔公司;TTR-III X 射线衍射仪,日本理学公司。

1.2 实验方法

1.2.1 醋蛋液的制备方法 将新鲜生鸡蛋洗净,蛋壳表面用酒精消毒晾干后置入 250 mL 烧杯,加入 9°米醋 150 mL,外套保鲜膜密封 48 h。蛋壳全溶后用无菌纱布过滤,将蛋膜洗净后挑破弃去,并搅匀醋蛋液密封 24 h,放入冰箱冷藏,即制得醋蛋液。

1.2.2 醋蛋液的酶解 醋蛋液经过粗滤去除难溶物后,取 100 mL 转移至锥形瓶中,置于 90℃ 恒温水浴锅中热变性 10 min,然后将其置于 50℃ 下恒温酶解,酶解过程用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 10.0,加入碱性蛋白酶 1 g (按酶与底物质量比 1:100 比例加入),在酶解过程中不断滴加氢氧化钠以保持水解液维持 pH 在 10±0.5 范围内,酶解 3 h 后经 80℃ 灭酶 10 min,离心酶解液 (10 000 r·min⁻¹、10 min),取上清液待用^[7]。

1.2.3 ACEI 活性肽的分离纯化 将 1.2.2 制备上清液采用截留分子量为 10、3 和 1 kDa 的超滤膜过滤,使不同分子量的多肽从溶液中分离,同时对分子量范围在 ≥10、10~3、3~1 和 ≤1 kDa 的各组分进行多肽含量及 ACE 抑制活性测定。

使用 Superdex peptide 10/300GL 凝胶色谱柱对超滤后活性较高的组分进行柱层析,流动相采用 50 mmol·L⁻¹ phosphate buffer + 0.15 mol·L⁻¹ NaCl,

pH7.0,流速 0.5 mL·min⁻¹,280 nm 波长下测定吸光度,收集不同组分,同时测定 ACE 抑制活性。

1.2.4 ACE 抑制活性的测定 血管紧张素转化酶抑制活性测定方法在 Kim 等^[8]方法基础上进行了部分改进:取 30 μL 马尿酸组氨酰亮氨酸作为模拟底物,加入 10 μL 测试样品溶液 (阳性对照卡托普利, pH 为 8.3 的硼酸缓冲液和样品溶液) 混合均匀,在 (37±0.5)℃ 恒温水浴中预热 3~5 min,然后加入 20 μL 血管紧张素转化酶液充分混合启动反应,在 37℃ 条件下进行反应 30 min 后,加入 60 μL 的 1 mol·L⁻¹ HCl 终止反应。得到的反应液直接进行 HPLC 分析。液相色谱分析条件:柱温 25℃,流速 0.5 mL·min⁻¹,流动相乙腈和 0.05%TFA 超纯水的比例为 25/75 等度洗脱,检测波长为 228 nm。活性肽对血管紧张素转化酶抑制活性计算公式如下:

$$\text{抑制活性} / \% = \frac{M - N}{M} \times 100 \quad (1)$$

式中: *M* 为空白对照组反应完成后测定的马尿酸的峰面积; *N* 为添加活性肽组反应完成后测定的马尿酸的峰面积。*IC*₅₀ 定义为抑制 50% ACE 活性所需抑制剂浓度。

1.2.5 活性肽磷脂复合物的制备 按 1:1 质量比称取 1.2.3 制备所得活性肽与卵磷脂,加入 1 mL 含 5% 冰醋酸的二甲基亚砜 (DMSO),充分混匀静置,放入 -40℃ 冰柜预冻过夜,真空冷冻干燥后即得活性肽磷脂复合物^[9]。DMSO 在化学反应中同时起到反应溶剂和反应催化剂的双重作用,多肽与卵磷脂在 DMSO 溶剂中可以被良好的溶解,其已被广泛用于生物制药中蛋白质物质的溶解^[10],冻干后使用蒸馏水反复清洗冻干样品,再经烘干以除去残留的 DMSO^[11]。同时按同样制备方法,不添加含 5% 冰醋酸的 DMSO,制备即得磷脂多肽水溶混合物;将单独冷冻干燥后的活性肽和卵磷脂粉末混合均匀,即磷脂多肽物理混合物。

1.2.6 红外光谱研究 通过傅里叶红外光谱仪来对活性肽与磷脂的相互作用进行研究。以 KBr 压片法对活性肽、卵磷脂、二者的物理混合物和活性肽磷脂复合物测定在波长范围 400~4 000 cm⁻¹ 下的吸收光谱,分辨率 4 cm⁻¹,波数精度 0.01 cm⁻¹,扫描次数 16 次。

1.2.7 X-射线衍射研究 利用 X-射线衍射装置观察多肽、卵磷脂和不同处理样品结合方式后晶型变化。将样品均研磨成粉末状,均匀铺置于样品板上,用玻璃板在其上紧压。衍射条件选择 X-衍射管为铜对阴极, Ni 过滤器,电压 40 kV,电流 200 mA,扫

描速率为 $8^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$, 测量范围为 $2\theta=5^{\circ}\sim 55^{\circ}$ 。

1.2.8 体外模拟测定磷脂多肽复合物 ACE 抑制活性
采用体外模拟实验来预测卵磷脂多肽复合物在人体胃肠道内的抗降解效果, 评价标准依据复合物经过酶解后对 ACE 抑制活性来衡量。具体步骤如下: 取一定量待测样品 (活性肽、水溶混合物、物理混合物、复合物), 加入 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 调节 pH 值到 2.0, 37°C 恒温水浴保温, 加入胃蛋白酶, 反应 4 h, 用 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节 pH 到 8.0, 再加入胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶, 于 37°C 水浴反应 4 h, 终止反应采用沸水灭酶 10 min, 最后酶解液经离心分离 ($10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 测定 ACE 抑制活性^[12-13]。

1.2.9 统计分析 实验数据采用 origin, SPSS 分析软件对数据进行处理分析。不同因素水平采用 SPSS 单因素方差分析 (ANOVA), Tukey's 检验用以比较均值在置信区间 95% 的显著不同, 实验结果用平均值 \pm 标准差表示^[14]。

2 结果与分析

2.1 凝胶色谱柱分离纯化 ACE 抑制肽

经酶解后的醋蛋液先经超滤分离, 测定不同分子量范围内的 ACE 抑制活性如表 1。其中分子量 $\leq 1\text{ kDa}$ 的范围内酶解产物具有较高的抑制活性, 该组分在紫外 214 nm 处具有特征吸收峰, 收集此段的酶解产物经浓缩后使用 Superdex peptide 10/300GL 凝胶色谱柱进一步分离。由图 1 所示, 经凝胶色谱柱分离后, 该组分可进一步分离出 4 段多肽组分, 对每个组分进行多次收集并浓缩, 并进行 ACE 抑制活性检测, 结果如表 2 所示。

表 1 不同分子量范围酶解醋蛋液抑制活性

Table 1 The inhibitory activity of vinegar-egg hydrolysates with different molecular weight range

分子量范围/kDa The range of molecular weight	$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
≥ 10	47.12 ± 1.82^c
10~3	31.98 ± 0.80^b
3~1	31.15 ± 0.71^b
≤ 1	23.20 ± 0.32^a

注: 表内数值为平均值 \pm 标准差, 同一列不同字母表示 Tukey's 检验多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Note: Values are expressed as mean and SD. Different letters in the same column indicate a significant difference ($P < 0.05$) on Tukey's test. The same below.

由表 2 可知, 经凝胶色谱分离出在 214 nm 处具有吸收峰的 4 个肽段, 都具有一定的抑制活性, 其中组分 4 的 ACE 抑制活性最高。因此, 对组分 4 进行收集并浓缩, 进行下一步研究。

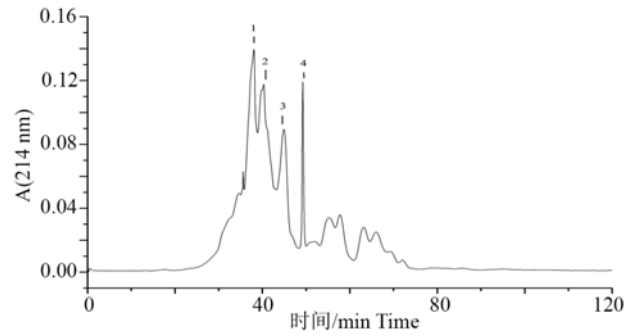


图 1 Superdex peptide 10/300GL 分离醋蛋液超滤产物图谱
Figure 1 Graph of ultrafiltration product of vinegar-egg separated by Superdex peptide 10/300GL

表 2 凝胶色谱分离组分 ACE 抑制活性

Table 2 The inhibitory activity of ACE inhibitory peptide-separated by sephadex gel chromatography

组分 Component	$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	29.56 ± 0.68^c
2	30.53 ± 0.36^c
3	27.95 ± 0.51^b
4	18.72 ± 0.21^a

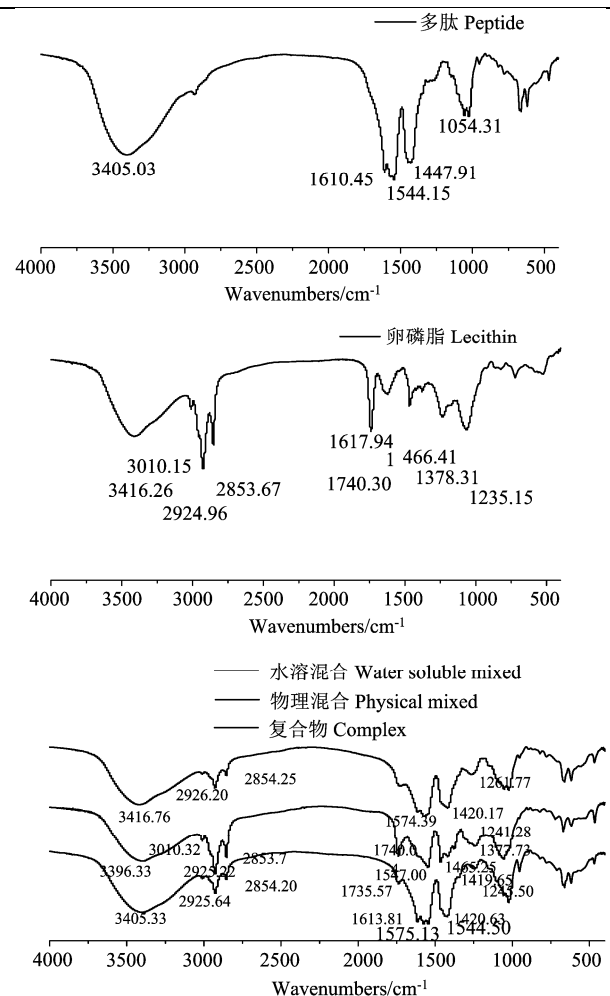
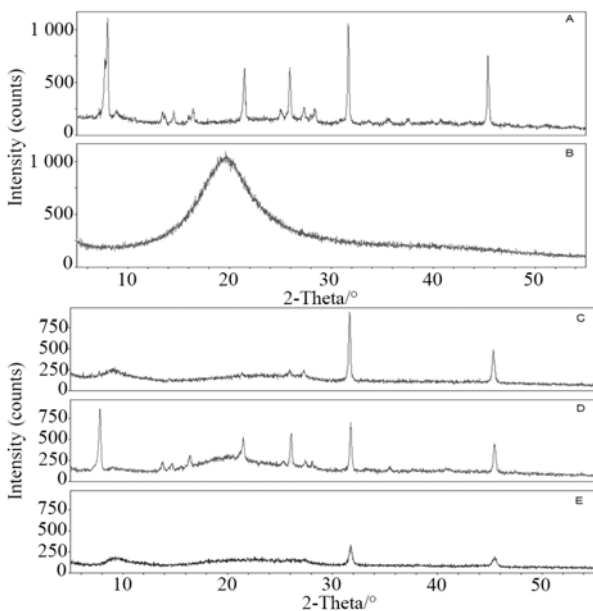


图 2 多肽、卵磷脂及 3 种不同处理方式的复合物 FT-IR 图谱
Figure 2 FT-IR spectra of the peptide, lecithin and peptide-lecithin complex with three different treatments



A.多肽; B.卵磷脂; C.水溶混合; D.物理混合; E.复合物
A.peptide;B.lecithin;C.water soluble mixed;D.physical mixed;E. complex

图3 XRD图谱
Figure 3 XRD spectra

2.2 FT-IR 分析结果

活性多肽与卵磷脂分别以3种不同方式处理后的FT-IR图谱如图2所示。活性多肽和卵磷脂各有明显的特征吸收峰,在酰胺谱带I带中主要是C=O的伸缩振动($1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$)^[15],此活性多肽的特征峰 $1\ 610\text{ cm}^{-1}$ 证明其存在 β 折叠结构。研究发现肽链中的羧基端对ACEI的活性起重要的作用,且COOH主要存在于 $3\ 300\sim 3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 段波数范围^[16],由图2可以看出经过复合处理的卵磷脂与活性肽复合物完全保留了 $3\ 405\text{ cm}^{-1}$ 处的特征峰,而其他2种方式的峰位均有偏移。卵磷脂的特征吸收峰位于 $1\ 740.31\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 466\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 235\text{ cm}^{-1}$,其与活性多肽以不同方式处理后的图谱明显不同,水溶解混合后活性多肽与卵磷脂的特征吸收峰消失,且无新特征峰出现。物理混合表现为活性多肽和卵磷脂的叠加,在 $1\ 466\text{ cm}^{-1}$ 处仍有卵磷脂的特征吸收峰,而在经过结合处理之后的复合物图谱中,

这个特征吸收峰被覆盖,说明卵磷脂与活性多肽之间有相互作用^[17]。进一步对比复合物图谱与其他混合物图谱发现,经过结合处理的复合物在 $1\ 575.13\text{ cm}^{-1}$ 处有区别于水溶混合和物理混合的峰出现,可能为氢键结合作用的结果。而且结合后多肽的特征峰 $1\ 447.91\text{ cm}^{-1}$ 发生了峰移至 $1\ 420.63\text{ cm}^{-1}$,表明C-N键的振动频率发生变化^[18]。综上,可通过红外图谱初步推断经过结合后的多肽活性被保留且其与卵磷脂发生了相互作用。

2.3 XRD 分析

XRD 可用来观察物质的结晶结构变化,活性多肽、卵磷脂、水溶混合物、物理混合物和结合复合物的X-射线衍射分析结果如图3所示,活性多肽有许多衍射强峰,主要位于 7.727° 、 8.034° 、 21.475° 、 25.968° 、 31.651° 和 45.323° ,说明活性多肽的结晶结构较为明显。而卵磷脂的衍射图呈现出独立的较宽扁峰型,是典型的无定形态。经过水溶混合和物理混合后的XRD图谱的结晶结构与多肽类似,说明这2种方式的混合没有产生活性多肽与卵磷脂之间的相互作用或是作用很弱。峰型的微变化可能仅仅是卵磷脂的介入导致其无定形峰略有增加,结晶度略微降低。

但是,经过结合处理的卵磷脂与活性多肽复合物的结晶结构有显著下降,趋近于无定形态,说明活性肽的羧基、氨基与卵磷脂发生以配位键形式的结合,并导致活性多肽被卵磷脂吸收后以无定形或分子态的形式存在。

2.4 体外模拟 ACE 抑制活性结果分析

由于醋蛋中具有ACE抑制活性的多肽是一种食源性ACE抑制剂,所以其具有降血压作用的前提之一就是能够有效地抗体内消化道酶系的降解,也才能够更加有效地在体内作用于ACE作用位点。否则即使ACE抑制肽在体外具有高抑制活性,经体内消化道时也会被酶解成为不具有抑制活性的碎片。因此,活性肽抗消化道酶系的酶降解能力的提高是关键。

表3 模拟消化道环境对活性组分ACE抑制活性的影响

Table 3 Effects of digestive environment on the inhibitory activity of ACE inhibitory peptide

项目 Item	Before simulate in vitro 体外 模拟前 $IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	After simulate in vitro 体外 模拟后 $IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
多肽组分 Polypeptide component	19.12 ± 0.68^a	29.23 ± 0.46^d
磷脂多肽水溶混合物 Phospholipid polypeptide water soluble mixture	22.35 ± 1.02^{bc}	28.42 ± 0.92^d
磷脂多肽物理混合物 Phospholipid polypeptide physical mixture	21.02 ± 0.19^b	31.11 ± 0.24^e
磷脂多肽复合物 Phospholipid complexes	22.67 ± 0.15^c	23.12 ± 0.18^c

从表 3 看出, 经凝胶色谱分离纯化后的具有较高 ACE 抑制活性的多肽组分, 在模拟消化道环境处理后, ACE 抑制活性明显下降。同时比较多肽磷脂复合物及另外 2 种不同处理方式的混合物, 结果可以看出, 多肽磷脂复合物在体外模拟前后抑制活性的下降没有其他 2 种方式明显, 其他处理方式后, 经体外模拟后 ACE 抑制活性明显下降。综合前面的 FT-IR 与 XRD 结果, 进一步证明经卵磷脂结合的活性多肽在体外模拟胃肠道环境中很好的被保护。虽然其 ACE 抑制活性有所下降, 但相对于其他处理组活性降低程度并不明显。

3 结论

研究结果发现, 醋蛋液经分离得到的活性较高 ACE 抑制肽主要分布于分子量 ≤ 1 kDa 的范围内, 利用 Superdex peptide 10/300GL 凝胶色谱柱进一步纯化分离后得到 4 个组分, 其中组分 4 活性最强。进一步的研究针对组分 4 的活性保护, 将其与卵磷脂结合处理后发现, 复合物仍具有抑制 ACE 的活性, 且经过体外模拟胃肠道实验结果表明经过结合处理后的活性肽能够很好的预防胃肠道酶的降解。

参考文献:

- [1] ONDETTI M A, RUBIN B, CUSHMAN D W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents[J]. *Science*, 1977, 196(4288): 441-444.
- [2] 陈黎斌, 杨严峻. 从醋蛋水解物中分离纯化 ACE 抑制活性物质[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(12): 29-31.
- [3] FUJITA H, SASAKI R, YOSHIKAWA M. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 1995, 59(12), 2344-2345.
- [4] 关明, 任晓佳, 李茵萍, 等. 槲皮素-卵磷脂复合物的制备及理化性质研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(2): 51-53.
- [5] BENETOLLO C, LAMBERT G, TALUSSOT C, et al. Lipid-binding properties of synthetic peptide fragments of human apolipoprotein A-II[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 242(3): 657.
- [6] BOMBARDELLI E, GHIONE M. Use of bilobalide and derivatives thereof for treating an infection in an individual and pharmaceutical compositions adapted for such use: EP19930301010 [P]. 1993-08-18.
- [7] 刘静波, 于志鹏, 赵文竹, 等. 蛋清源活性 ACE 抑制肽结构鉴定及其稳定性[J]. *吉林大学学报(工学版)*, 2011, 41(2): 579-584.
- [8] KIM Y M, WANG M H, RHEE H I. A novel alpha- glucosidase inhibitor from pine bark[J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(3), 715-717.
- [9] CUI F, SHI K, ZHANG L Q, et al. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation[J]. *J Control Release*, 2006, 114(2): 242-250.
- [10] WINTERS M A, KNUTSON B L, DEBENEDETTI P G, Sparks H G. Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide[J]. *J Pharm SCI-US*, 1996, 85(6): 586-594.
- [11] ZABAR S, LESMES U, KATZ I, et al. Studying different dimensions of amylase-long chain fatty acid complexes: Molecular, nano and micro level characteristics[J]. *Food Hydrocolloid*, 2009, 23(7): 1918-1925
- [12] SAMARAKOON K W, KWON O N, KO J Y, et al. Purification and identification of novel angiotensin-i converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate[J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(5): 1595-1606.
- [13] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, RAVALLECPLE R, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases[J]. *Food Chem*, 2008, 111(2): 350-356.
- [14] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社, 2000: 85-86.
- [15] CARBONARO M, NUCARA A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(3): 679-690.
- [16] WU J P, ALUKO R E, NAKAI S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues[J]. *QSAR Comb SCI*, 2006, 25(10), 873-880.
- [17] MURARIU M, DRAGAN E S, DROCHIOIU G. IR, MS and CD investigations on several conformationally- different histidine peptides[J]. *Int J Pept Res Ther*, 2009, 15(4), 303-311.
- [18] CARBONARO M, NUCARA A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid- infrared region[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(3), 679-690.