

黑豆 ACE 抑制肽的分离纯化与稳定性研究

杜晓妹, 李梅青*, 周鑫, 李芬

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: 利用大孔吸附树脂 DA201-C、超滤和 Sephadex G-15 凝胶色谱对 ACE 抑制肽进行分离纯化, 并对其稳定性进行研究。结果表明, 经过分离纯化后, 得到的 4 个组分均有一定的 ACE 抑制作用, 其中组分 III ACE 抑制率最高为 90.78%, 其分子量主要集中在 145~468 Da; ACE 抑制肽具有较好的 pH (2~10)、金属离子 (Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Mg^{2+}) 和温度 (<40℃) 稳定性, 但发现其抗消化稳定性不强, 属于底物型 ACE 抑制肽。该结果可为进一步研究和开发黑豆的 ACE 抑制肽提供参考。

关键词: ACE 抑制肽; 分离纯化; 稳定性

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)04-0516-04

Isolation and stability of black soybean ACE inhibitory peptide

DU Xiaomei, LI Meiqing, ZHOU Xin, LI Fen

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

Abstract: ACE inhibitory peptide in black soybean was isolated and purified using DA201-C resin, ultrafiltration and Sephadex G-15 gel filtration chromatography. Its stability was further studied. Four fractions with ACE inhibitory activity were separated and purified in which fraction III had the highest activity that was 90.78%. The molecular weight of the peptide was 145-468 Da. ACE inhibitory peptide was stable in the high pH, metal ion and thermo (<40℃) condition, while it was of substrate type with weak stability against gastrointestinal proteases. The results would provide a reference for further studying and developing black soybean ACE inhibitory peptide.

Key words: ACE Inhibitory Peptides; Purification; Stability

血管紧张素转换酶 (Angiotensin I-Converting Enzyme, ACE) 在人体血压调节过程中起重要作用, ACE 通过使血管紧张素 I 向血管紧张素 II 转换以及降解缓激肽而起升高血压的作用。ACE 抑制肽通常是在温和条件下酶解动植物蛋白质而获得的一类具有 ACE 抑制活性的多肽物质, 大多含有 2~15 个氨基酸, 能够通过抑制 ACE 的活性有效地防治高血压^[1]。食源性 ACE 抑制肽因其效果温和、专一、持久, 安全性高且对正常人群血压无影响, 尤其受到人们的关注^[2-3]。目前发现主要来源有乳酪蛋白、植物、鱼贝和肉类蛋白等^[4]。

黑豆除含有大量的蛋白质、脂肪及其它对人体有益的营养素外, 还具有较高的药用价值。目前, 对黑豆活性物质的研究主要是黑豆蛋白、色素、多

糖和脂肪酸等。其中, 黑豆色素有降血脂作用^[5], 从而降低由血脂造成的血压升高, 但是黑豆中是否存在抑制 ACE 作用而起到降压效果的这类研究尚未有报道。前期实验发现黑豆蛋白经过碱性蛋白酶水解后, ACE 抑制率能够显著提高。本研究采用碱性蛋白酶法制备黑豆 ACE 抑制肽, 利用大孔吸附树脂 DA201-C、超滤和 Sephadex G-15 凝胶色谱对黑豆 ACE 抑制肽进行分离纯化, 并对其稳定性进行研究, 以期获得高活性的黑豆 ACE 抑制肽, 为其进一步开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑豆, 购于超市; 碱性蛋白酶 (酶活力为 200000

收稿日期: 2016-04-04

基金项目: 合肥农产品加工研究院资助院企合作项目(2012HAPP002)资助。

作者简介: 杜晓妹, 硕士研究生。

* 通信作者: 李梅青, 副教授。E-mail: lmq@ahau.edu.cn

U·g⁻¹), 江苏锐阳生物科技有限公司; 猪胃蛋白酶(806.3 U·mg⁻¹)、牛胰凝乳蛋白酶(40 U·mg⁻¹)、牛胰蛋白酶(12132 U·mg⁻¹)、血管紧张素转换酶(ACE)、呋喃丙烯酸苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸(FAPGG), 美国 Sigma 公司; Sephadex G-15, 美国 Pharmacia 公司; DA201-C 大孔吸附树脂, 杭州普修生物科技有限公司; TSKgel G2000SW_{XL}, 日本 TOSOH 公司; 相对分子量标品: 牛血清白蛋白(Mw66430)、细胞色素 C(Mw12500)和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(Mw189), 中国药品生物制品检定所; 乙腈: 色谱纯, 美国 Tedia 试剂公司; 其他试剂均分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; 微波干燥箱, 美国培安有限公司; 真空冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; IKA RV 10 数显型真空旋转蒸发器, 上海凌初环保仪器有限公司; 电脑全自动部分收集器, 上海青浦沪西仪器厂; MAX190 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Waters600 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 黑豆蛋白提取制备 将一定量黑豆粕置于烧杯中, 黑豆粕与水料液比 1:10、采用 NaOH 溶液调节 pH 值到 8.5、温度 55℃, 搅拌浸提 30 min; 将浸提液于 4000 r·min⁻¹ 条件下离心 15 min, 将沉淀加适量水二次碱提; 合并 2 次上清液, 用 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液将其 pH 值调至 4.3~4.5, 静置 20 min, 离心分离后得凝乳状酸性蛋白, 加少量蒸馏水冲洗后把粗蛋白 pH 值调回到 7.0, 冷冻干燥后即得黑豆蛋白质。

1.3.2 黑豆多肽的制备 利用碱性蛋白酶在料液比 4%, pH9.0, 微波功率 235.5 W, 酶用量 4.00%, 微波时间 19.50 min 的条件下酶解黑豆蛋白, 酶解结束后迅速置于 90℃ 水浴中灭酶 5 min, 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液调回 pH7.0, 冷冻干燥即得黑豆蛋白酶解多肽干粉。

1.3.3 DA201-C 大孔吸附树脂分离纯化 将 DA201-C 大孔吸附树脂装入层析柱(1.6 cm×30 cm)中, 对黑豆 ACE 抑制肽进行分离纯化: 上样质量浓度 14 mg·mL⁻¹, pH4.0, 上样流速 0.5 mL·min⁻¹, 洗脱液乙醇体积分数 70%, 洗脱流速 1.5 mL·min⁻¹, 洗脱体积 30 mL。旋转蒸发后进行冷冻干燥, 得到 ACE 抑制肽, 测定 ACE 抑制率。

1.3.4 超滤 将浓度为 200 μg·mL⁻¹ 的黑豆多肽加入到超滤离心管中(3 kDa), 放入离心机中, 以 5000 r·min⁻¹ 的转速离心 20 min, 分离出的各组分进行冷冻干燥备用, 测定不同组分的 ACE 抑制率。

1.3.5 Sephadex G-15 分离纯化 将冷冻干燥粉末配制成质量浓度为 55 mg·mL⁻¹ 的溶液, 经 Sephadex G-15(1.6 cm×60 cm)分离, 上样量 2 mL, 洗脱液为超纯水, 紫外检测波长 280 nm, 洗脱速度 0.3 mL·min⁻¹, 每管收集 5 mL。多次收集后, 将不同组分冷冻干燥成粉末待用, 测定 ACE 抑制率和蛋白质含量。

1.3.6 黑豆 ACE 抑制肽的稳定性研究 利用步骤 1.3.5 得到的组分 III 进行稳定性研究。

(1) pH 稳定性。将 ACE 抑制肽溶于 pH 为 2、4、6、8、10 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液中 2 h (ACE 抑制肽浓度为 10 mg·mL⁻¹), 分别测定其 ACE 抑制率。

(2) 温度稳定性。配制 10 mg·mL⁻¹ 的 ACE 抑制肽水溶液, 于 20、40、60、80 和 100℃ 条件下保存 2 h, 分别测定其 ACE 抑制率。

(3) 金属离子稳定性。配制 10 mg·mL⁻¹ 的 ACE 抑制肽水溶液, 并将其溶于浓度分别为 0、2、4、6、8 mmol·L⁻¹ 的 CaCl₂、KCl、MgCl₂ 溶液中, 保存 2 h 后, 分别测定其 ACE 抑制率。

(4) 体外抗消化酶稳定性。采用徐克寒^[6]的实验方法。

1.3.7 分析测定方法 (1) 多肽含量的测定方法。采用鲁伟^[7]的实验方法测定多肽含量。

(2) ACE 抑制率的测定。利用 ACE 和 FAPGG 测定 ACE 抑制率^[8]。ACE 抑制率按式 (1) 计算: ACE 抑制率 (%) = (1 - ΔA_{样品}/ΔA_{空白}) × 100 (1)

其中, ΔA_{样品}和 ΔA_{空白} 分别表示样品和空白吸光度的变化。

(3) 酶解产物的相对分子质量分布测定。采用 HPLC 法测定。色谱条件: Waters 600 高效液相色谱仪(2487 紫外检测器); 色谱柱, TSKgel G2000SW_{XL} 凝胶柱(300 mm×7.8 mm); 流动相, 乙腈:水:三氟乙酸=45/55/0.1(V/V); 检测波长, UV220 nm; 流速, 0.5 mL·min⁻¹; 柱温, 30℃。数据处理及计算由 Waters GPC 软件自动进行。根据标准品相对分子质量及其出峰时间, 制作标准品相对分子质量工作曲线。相对分子质量(Mw)与保留时间(T)之间的回归方程为: LgMw = 7.0753 - 0.2161T, R² = 0.9909。

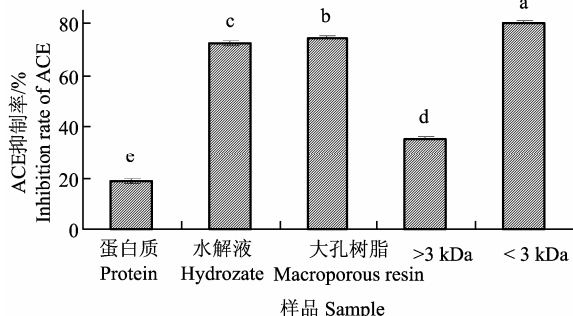
1.3.8 数据处理方法 数据处理方法试验数据均是 3 次平行试验的平均值, 并计算其误差, 应用 SPSS 17.0 软件进行方差分析, 利用 Duncan 法比较因素水平间的显著性 (P < 0.05)。

2 结果与分析

2.1 DA201-C 大孔吸附树脂和超滤分离结果

由图 1 可知, 经过碱性蛋白酶酶解后, 黑豆 ACE

抑制率变化显著,增加了 53.83%;经过大孔树脂分离纯化后,黑豆 ACE 抑制率有少许增加;经过超滤分级分离后,当黑豆多肽分子量<3 kDa 时,ACE 抑制活性为 80.53%,比>3 kDa 的黑豆多肽高出 44.89%。因此,选择分子量<3 kDa 的黑豆多肽进一步分离纯化。



不同小写字母表示数据间存在显著差异($P<0.05$)。下同
The different small letters represent significant difference at 0.05 level. The same below

图 1 大孔吸附树脂 DA201-C 和超滤分离纯化后的黑豆 ACE 抑制率

Figure 1 ACE inhibitory activity from black soybean after the purified of DA201-C resin and ultrafiltration

2.2 Sephadex G-15 分离及 ACE 抑制率测定结果

由图 2 可知,经过 Sephadex G-15 的分离纯化共分离出四个组分,即峰 I、II、III 和 IV,经过多次分离收集,发现洗脱峰重复性很好。

组分 I、II、III、IV 的多肽含量和 ACE 抑制率如表 1 所示。经 Sephadex G-15 的分离纯化后,4 个组分均具有一定 ACE 抑制活性,其中组分 III 的 ACE 抑制活性最高为 90.78%。ACE 抑制肽的前期研究发现:大豆多肽^[9]和玉米醇溶酶解蛋白^[10]经

SephadexG-25 得到的多肽 ACE 抑制率为 92.15%和 68.36%,绿豆渣经过 Sephadex G-15 分离纯化得到的最高 ACE 抑制活性为 81.5%^[11],花生多肽经 Sephadex G-15 分离纯化后最高抑制活性为 78.99%^[12],这表明黑豆中 ACE 抑制肽活性较高,具有进一步研究价值。组分 III 的分子量分布如图 3 所示,主要为分子量在 500 Da 以下的短肽,其分子量主要集中在 145~468 Da,说明组分 III 是混合物,有待进一步分离纯化。

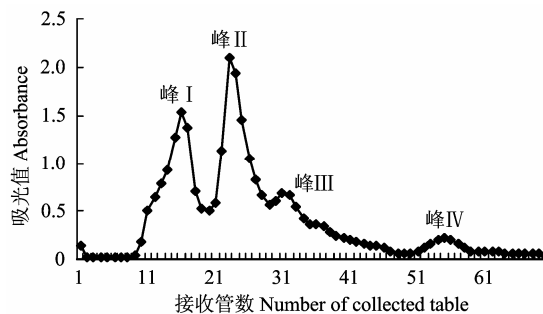


图 2 黑豆 ACE 抑制肽的 Sephadex G-15 凝胶过滤层析
Figure 2 Gel-filtration chromatography of ACE inhibitory peptides from black soybean on Sephadex G-15

2.3 黑豆 ACE 抑制肽的稳定性研究

2.3.1 pH 稳定性

如图 4 所示,随着 pH 的增加,黑豆 ACE 率变化不显著,其抑制率在 90%左右,说明黑豆 ACE 抑制肽具有较好 pH 稳定性,米糠^[13]、苜蓿^[14]、鲑鱼肝脏^[15]和猪股骨^[16]的蛋白中的 ACE 抑制肽也具有较好的耐酸耐碱性。由于 ACE 抑制肽具有较好的 pH 稳定性,所以在人体的胃酸中能够较好的保持活性,并且有利于实际保藏和生产加工。

表 1 Sephadex G-15 分离后各组分的 ACE 抑制率和多肽含量

Table 1 ACE inhibitory activity and polypeptides concentration of the fractions isolated by Sephadex G-15

| 项目 Item | 组分 Fraction | | | |
|---|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | I | II | III | IV |
| 多肽含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ polypeptides concentration | 144.15 \pm 0.22 | 64.30 \pm 0.18 | 68.92 \pm 0.29 | 21.50 \pm 0.30 |
| ACE 抑制率/% ACE inhibitory rate | 58.91 \pm 0.31 | 73.77 \pm 0.37 | 90.78 \pm 0.28 | 75.41 \pm 0.11 |

2.3.2 温度稳定性

如图 5 所示,随着温度的逐步增加,当温度低于 40℃ 时,黑豆 ACE 率变化不显著,其抑制率在 88%左右;当温度继续上升时,ACE 抑制率迅速下降,变化显著,在 100℃ 时抑制率为 30.03%,下降了 50%左右。这可能是当温度逐渐上升时,加速了 ACE 抑制肽肽链的裂解。可见,当温度低于 40℃,黑豆 ACE 抑制肽具有良好的温度稳定性。

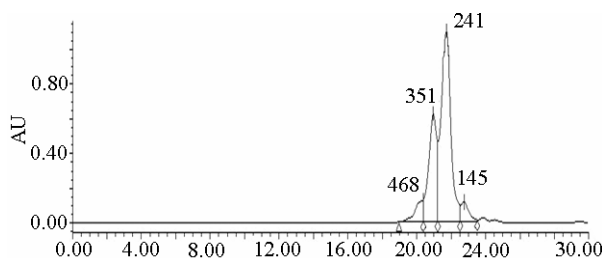


图 3 组分 III 的分子量分布
Figure 3 Molecular weight distribution of fraction III

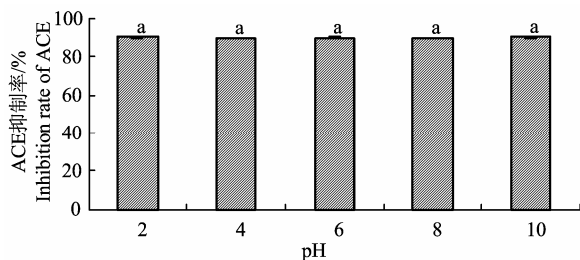


图 4 pH 对 ACE 抑制率的影响

Figure 4 Effect of pH on ACE inhibitory activity

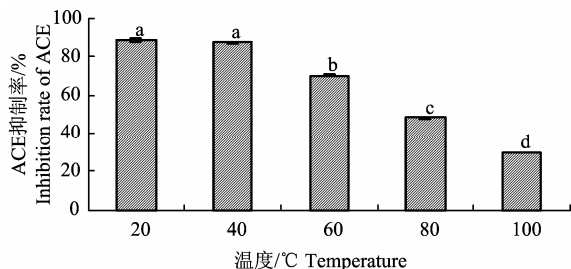


图 5 温度对 ACE 抑制率的影响

Figure 5 Effect of temperature on ACE inhibitory activity

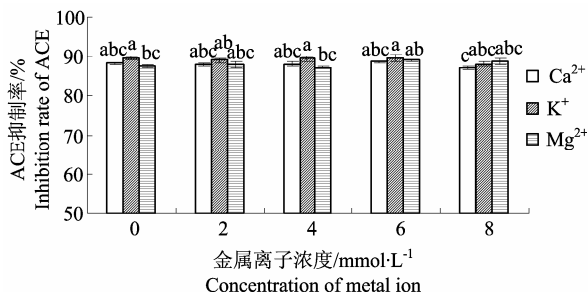


图 6 金属离子浓度对 ACE 抑制率的影响

Figure 6 Effect of concentration of metal ions on ACE inhibitory activity

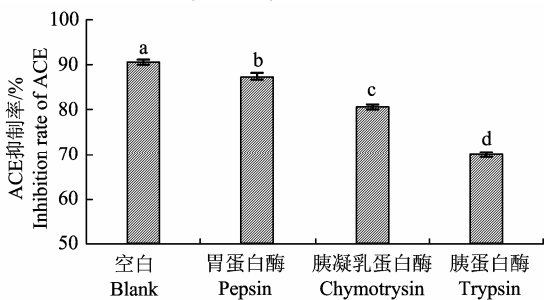


图 7 消化酶对 ACE 抑制率的影响

Figure 7 Effect of digestive enzymes on ACE inhibitory activity

2.3.3 金属离子稳定性 如图 6 所示, 随着金属离子浓度的增加, 黑豆 ACE 率变化不显著, 几乎都维持在 85%~90%, 说明 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Mg^{2+} 基本不影响黑豆 ACE 抑制肽的稳定性。血液中含有 Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Mg^{2+} , 说明黑豆 ACE 抑制肽由血液进入生物体内发挥作用时, 不会受到这些离子的影响而丧失 ACE 抑制活性。

2.3.4 体外抗消化酶稳定性 如图 7 所示, 经过胃

蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶逐步酶解, 黑豆 ACE 率逐渐下降, 变化显著。这可能是因为 ACE 抑制肽部分片段被 3 种消化酶水解, 使其活性降低, 所以黑豆 ACE 抑制肽属于底物型 ACE 抑制肽^[17]。

3 结论

黑豆蛋白酶解物分离纯化后, 得到四个组分均具有 ACE 抑制活性, 其中组分 III 的 ACE 抑制率最高为 90.78%, 其分子量主要集中在 145~468 Da。黑豆 ACE 抑制肽具有较好的 pH (2-10)、金属离子 (Ca^{2+} 、 K^{+} 和 Mg^{2+}) 和温度 (<40 °C) 稳定性, 但对胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶三种体外抗消化酶稳定性不强, 属于底物型 ACE 抑制肽。

参考文献:

- [1] LI G H, LE G W, SHI Y H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 469-486.
- [2] NI H, LI L, GUO S S. Isolation and identification of an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from yeast [J]. Current Analytical Chemistry, 2012, 8(1): 180- 185.
- [3] CHEN C, CHI Y J, WEI X, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate[J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(1): 27-34.
- [4] 黄家音, 朱禹洁, 沈金玉. 降血压肽研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 81-85.
- [5] 龙伟, 靳瑾, 沈秀, 等. 新体系评价东北黑大豆的营养健康功效[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 915-919.
- [6] 徐克寒, 申铨日, 陈国华. 三斑海马蛋白肽 ACE 抑制活性的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 96-99.
- [7] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
- [8] 崔楠, 陶晓赞, 李娟, 等. 响应面法优化黄粉虫蛋白制备 ACE 抑制肽的条件[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 156- 160.
- [9] 孙强, 黄纪念, 芦鑫, 等. 大豆多肽的降活活性及其相对分子质量分布研究[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(9): 36-39.
- [10] 刘志国, 陈江源, 王亚林, 等. 玉米醇溶蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(2): 138-141.
- [11] 李庆波, 刁静静, 井雪莲, 等. 绿豆渣 ACE 抑制肽的纯化鉴定及构效关系初探[J]. 农产品加工, 2014(11): 5-9.
- [12] 江利华, 王璋, 许时婴, 等. 花生 ACE 抑制肽的分离纯化、结构鉴定及体内降血压功能研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 94-98.
- [13] 丁青芝, 马海乐, 骆琳, 等. 米糠蛋白 ACEI 活性肽的超滤分离及其稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 48-51.
- [14] 陈飞平. 苋籽 ACE 抑制的分离纯化及其性质评价[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [15] 王林, 王鹏, 胡建恩, 等. 鲑鱼肝脏蛋白中 α -葡萄糖苷酶抑制肽的研究[J]. 食品科技, 2015(4): 315-321.
- [16] 舒一梅, 李诚, 付刚, 等. 凝胶层析法分离猪股骨降血压肽及其体外稳定性[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 100- 104.
- [17] ZHANG J H, TATSUMI E, DING C H, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in douche, a Chinese traditional fermented soybean product[J]. Food Chemistry, 2006, 98: 551-557.