

文章编号: 1009-038X(2004)04-0050-06

大豆生理活性肽的研究(II) ——抗氧化性和 ACE 抑制活性的初步研究

刘健敏, 钟芳, 麻建国
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用 AS1.398 和 Alcalase 两种蛋白酶,制备了水解度为 10%~24% 的大豆多肽,对其抗氧化性、ACE 抑制活性和相对分子质量的分布进行了研究。结果表明:采用 AS1.398 酶水解的 DH 为 12% 的产品抗氧化活性最高,添加量为 6 mg/mL 时使亚油酸的氧化诱导期延长 2.92 倍,其相对分子质量分布在 1 000 以上的组分较多;采用 Alcalase 酶水解的 DH 为 14% 的大豆多肽产品,ACE 抑制活性最高,IC₅₀ 为 0.144 mg/mL,其相对分子质量分布大多在 200~600 之间。

关键词:大豆生理活性肽;抗氧化性;ACE 抑制活性;相对分子质量分布
中图分类号:Q 516 文献标识码:A

Soybean Bioactive Peptides(II) ——Antioxidant activity and ACE inhibitory activity of the hydrolysates

LIU Jian-min, ZHONG Fang, MA Jian-guo
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The experiments investigating the properties of antioxidant activity, ACE inhibitory activity, and molecular weight distribution of the soybean polypeptides with DH of 10%~24% produced by AS1.398 and Alcalase, were conducted. The results indicated that the sample produced by hydrolyzing SPI with AS1.398 at DH 12% had the best antioxidant activity among all the other samples. The oxidant induction period of linoleic acid was extended to 2.92 times of that of the blank when the sample concentration was 6 mg/mL. Whereas, the sample produced by hydrolyzing SPI with Alcalase at DH 14% had highest ACE inhibitory activity among all the samples, and its IC₅₀ was 0.144 mg/ml. From molecular weight distribution measurements, it could be found that the hydrolysates with higher antioxidant activity were those having more peptides (consists of about 10 amino acid units, MW higher than 1 000), and the hydrolysates with higher ACE inhibitory activity were mainly those of molecular weight ranging from 200 to 600.

Key words: soybean bioactive peptides; antioxidant activity; ACE inhibitory activity; molecular weight distribution

收稿日期: 2003-09-29; 修回日期: 2003-11-10.

作者简介: 刘健敏(1979-)男,安徽和县人,工学硕士.

万方数据

大豆生理活性肽是大豆蛋白经蛋白酶水解后生成的大豆多肽和氨基酸的混合物,其氨基酸组成和大豆蛋白质基本相同,但更易被人体消化吸收,而且具有多种生理功能,如抗氧化性、降血压、降低胆固醇含量和预防骨质疏松等。这些生理活性取决于多肽的相对分子质量大小和氨基酸序列,而多肽的相对分子质量大小和氨基酸序列又与蛋白质水解所用的蛋白酶种类和水解度大小有关。因此,选择不同种类的蛋白酶、水解度,可以得到不同生理活性的大豆多肽。

自1995年以来,关于大豆蛋白水解物的抗氧化性以及机理、结构研究的论文相继发表^[1-3],对大豆多肽的研究已由初级提取、制备深入到理论探讨,对大豆多肽的氨基酸序列和肽段大小也有了初步的认识。最近,Hua-ming Chen^[1]等选用来自芽孢杆菌产的蛋白酶,制备具有抗氧化性的大豆短肽,通过Sephadex G-25色谱制备、提取、分离及纯化后,经氨基酸顺序检测确定具有高抗氧化性的短肽分别是:

P₁ Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn

P₂ Leu-Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn

P₃ Leu-Leu-Pro-His-His

并提出具有抗氧化性多肽片段由5~16个氨基酸残基组成,相对分子质量分布在600~1700之间。

人体内的血管紧张素I在血管紧张素转化酶(ACE)的作用下生成血管紧张素II,血管紧张素II是已知的最高内源升压肽。ACE抑制剂能阻止血管紧张素II的生成,因此,可作为降血压药物^[4]。食物蛋白中有许多ACE抑制活性的序列,它们可源于大豆蛋白、酪蛋白、玉米蛋白、胶原蛋白及其他蛋白如鱼类蛋白等^[5]。关于大豆来源的ACE抑制剂国内外已有很多报道^[6-9],Jiangping Wu^[9]等用Alcalase蛋白酶水解大豆,经超滤、离子交换树脂初分离,得到具有ACE抑制活性的肽,再经过Sephadex G-15和HPLC纯化,得到两个组分,经氨基酸顺序检测确定它们为Asp-Leu-Pro和Asp-Gly。

在前期的研究工作中,作者采用中性蛋白酶AS1.398和碱性蛋白酶Alcalase酶法水解大豆分离蛋白,控制水解度DH为10%~24%,得到一系列不同水解度的大豆生理活性肽。作者测定了这些产品的抗氧化性和ACE抑制活性,并用高效凝胶过滤色谱测定了相对分子质量分布,探讨了这些活性与蛋白酶的种类、水解度的大小和相对分子质量分布的关系。^{万方数据}

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白:黑龙江三江食品公司产品;AS1.398中性蛋白酶:无锡杰能科酶制剂公司产品;Alcalase碱性蛋白酶:丹麦NOVO公司产品;DA201-C大孔吸附树脂:江阴有机化工厂产品;ACE和HHL:美国Sigma公司;乙腈,色谱纯;其它试剂均为分析纯。

1.2 方法与条件

1.2.1 大豆活性肽粉末的制备 大豆分离蛋白的酶解工艺:按一定的底物浓度准确称取大豆分离蛋白于酶反应器中,加入适量蒸馏水搅拌均匀,90℃热处理10min,冷却到酶反应温度后,用2mol/L的NaOH溶液调至酶反应所需pH值,依据所用酶的活力单位加入一定蛋白酶,反应过程中不断滴加2mol/L的NaOH溶液,使pH值稳定在最适pH值;反应至一定水解度后,用2mol/L的HCl溶液调至pH4.5,沸水浴灭酶10min,冷却后3000r/min离心15min,取上清液,即得到黄褐色的大豆活性肽溶液。该溶液经DA201-C大孔吸附树脂脱盐后,再浓缩、干燥得到淡黄色的大豆活性肽粉末。水解度的控制和计算采用pH-Stat法^[10]。

1.2.2 抗氧化性的测定 硫氰酸铁(FTC)法^[11]。于10mL试管中加入3.0mL的活性肽溶液和2.0mL0.05mol/L的亚油酸溶液,在混匀器上混合均匀,用硅橡胶塞密封,放在60℃恒温培养箱中保温,每24h测定吸光度。吸光度的测定:取反应液0.1mL,依次加入0.1mL体积分数为75%的乙醇溶液,0.1mL质量分数为30%硫氰酸铵溶液和0.1mL硫酸亚铁溶液(含质量分数3.5% HCl),混合均匀5min后在500nm处测定吸光度,每天测定一次吸光度,定义吸光度达到0.3所需的天数为诱导期。

1.2.3 ACE抑制活性的测定 反相高压液相色谱法^[6]。

1) 色谱条件:高压液相色谱系统(HPLC)检测器:Waters 490;积分仪:HP3396A INTEGRATOR;色谱柱:Symmetry C₁₈;洗脱液:12%乙腈-0.5%乙酸;洗脱液流速:1.0mL/min;检测波长:228nm;上样量:10μL。

2) 色谱分析样品的制备:样品溶于超纯水,离心(7200g,15min),取上清液进行ACE抑制活性

测定. 取样品 10 μL 和 40 μL 2.17 mmol/L 底物溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 6 min, 加入 ACE 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 后, 加入 80 μL 1 mol/L 的 HCl 溶液终止反应; 反应产物经微孔过滤膜 (0.45 μm) 过滤后取 10 μL 进样, 通过 HPLC 洗脱图谱定量马尿酸生成量. 以生成马尿酸的量来判断样品的 ACE 抑制活性, 同时做空白对照.

ACE 活性抑制率 (%) = [(空白对照的马尿酸峰面积 - 样品的马尿酸峰面积) / 空白对照的马尿酸峰面积] \times 100%

1.2.4 多肽相对分子质量分布的测定 采用高效凝胶过滤色谱法.

1) 色谱条件: Waters 600 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站); 色谱柱: TSK_{ge}l2000; 流动相: V(乙睛): V(水): V(三氟乙酸) = 45: 55: 0.1; 检测波长: 220 nm; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$.

2) 样品制备: 大豆活性肽粉溶于去离子水, 配成质量浓度为 5 mg/mL 的样液. 吸取样液 2 mL, 用流动相稀释至 100 mL, 微孔过滤膜 (0.45 μm) 过滤后供进样.

相对分子质量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C (MW 12 500), 抑肽酶 (MW 6 500), 杆菌酶 (MW 1 450), 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW 451), 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW 189).

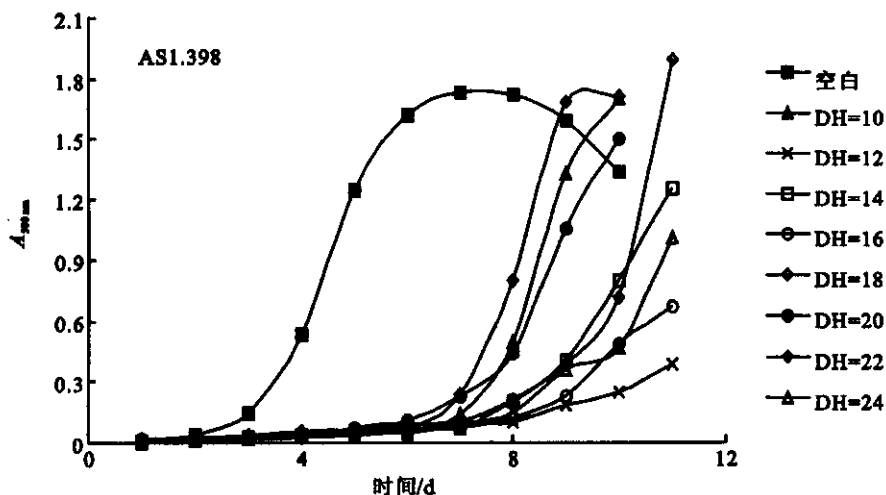
2 结果与讨论

2.1 大豆多肽的抗氧化性

由 Alcalase 和 AS1.398 酶解得到的一系列水解度的大豆活性肽对亚油酸模拟体系的抗氧化效

果见图 1. 由图可见, 在初始的几天内, 亚油酸的氧化速率较慢, 曲线比较平缓, 当吸光度超过 0.3 之后, 氧化速率突然增大, 呈直线上升. 而在添加了大豆活性肽的体系中, 亚油酸的氧化速率受到抑制, 曲线的平缓期得到延长. 作者定义吸光度达到 0.3 所需的天数为诱导期, 计算出添加不同酶解产物的亚油酸体系的诱导期, 结果图 2. 由图可见, 没有添加大豆活性肽的对照亚油酸体系的氧化诱导期是 3.55 d, 而添加了大豆活性肽的亚油酸体系的氧化诱导期均有不同程度的延长, 说明这些大豆活性肽都有一定的抗氧化性.

采用两种不同蛋白酶和不同水解度的酶解产物的抗氧化性均有一定的差异, 这说明蛋白酶的种类和水解度的大小都对酶解产物的抗氧化性有影响. 不同的蛋白酶有不同的专一性和不同的作用位点, 促使产物多肽的 N-末端和 C-末端氨基酸组成及氨基酸排列顺序各异, 这是影响多肽抗氧化性的主要因素. 水解度大小对肽段长短和游离氨基酸的相对含量是至关重要的, 如水解度太小, 则肽段过长, 具有抗氧化性的一些氨基酸未能断裂而呈现在肽段的 N-末端和 C-末端, 抗氧化性显示不出; 如水解度太大, 游离氨基酸含量过高, 抗氧化性则降低. 所以, 选择合适的蛋白酶和控制适当的水解度是制备高抗氧化性大豆活性肽的关键. 实验结果可知, AS1.398 酶解产物的抗氧化性略高于 Alcalase 的酶解产物, 其 DH 为 12% 的产品抗氧化活性最高, 添加量为 6 mg/mL 时使亚油酸的氧化诱导期延长了 2.92 倍.



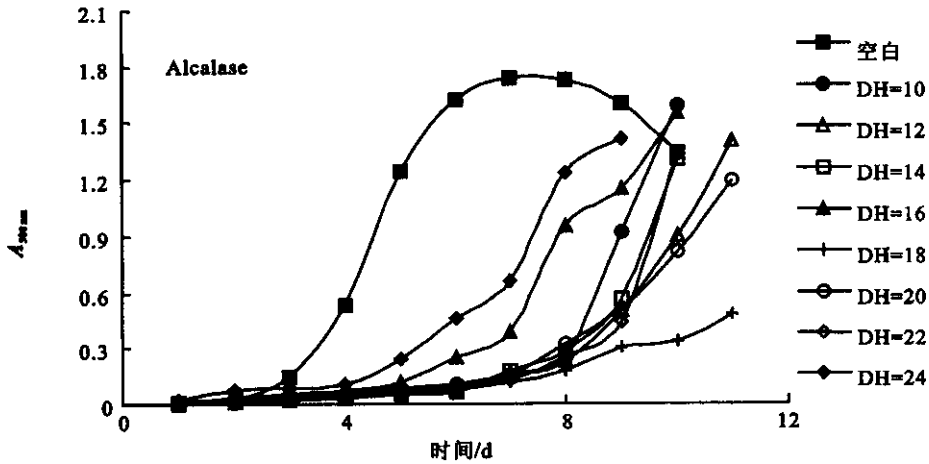


图 1 添加大豆多肽的亚油酸的氧化曲线

Fig.1 The oxidant curve of linoleic acid adding soybean peptides

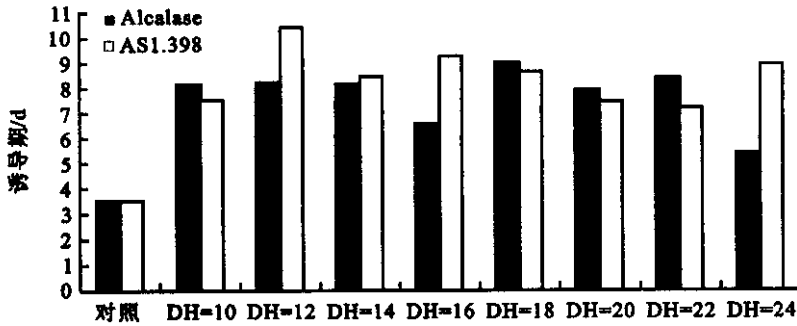
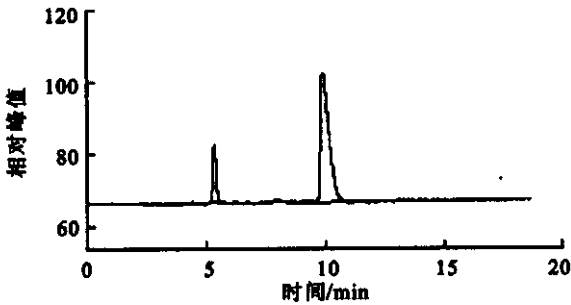


图 2 添加大豆多肽的亚油酸的氧化诱导期

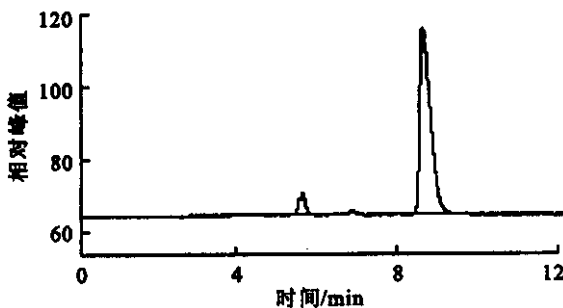
Fig.2 The oxidant induction period of linoleic acid adding soybean peptides

2.2 大豆多肽的 ACE 抑制活性

作者通过 HPLC 图谱可以定量测定马尿酸的生成量,结果见图 3.



a. 空白与反应液的产物



b. 大豆活性肽溶液与反应液的产物

图 3 反应产物的 RP-HPLC 图谱

Fig.3 RP-HPLC profile of products

图 3a 是以水作为空白和反应液(ACE 和 HHL)作用后产物的 HPLC 图谱.与标准物质的图谱比较后,确定第一个峰是马尿酸,第二个峰是过量的底物三肽,利用峰面积可以表示马尿酸的量;图 3b 是大豆活性肽溶液与反应液作用后产物马尿酸的 HPLC 图谱,马尿酸的生成量与空白相比较明显降低.采用此法测定了两种蛋白酶一系列水解度产物的 ACE 抑制活性.

从表 1 中数据可以看出,两种蛋白酶不同水解度产物的 ACE 抑制活性有明显差异.对肽结构与 ACE 抑制活性关系的研究发现:C 末端是 Pro, Phe, Tyr 或序列中含有疏水性氨基酸是维持高 ACE 抑制活性所必需的.由于不同的蛋白酶对蛋白质水解存在特异性,水解产物的末端氨基酸组成不同,可能造成 ACE 抑制活性存在差异.此外还有研究结果表明:具 ACE 抑制活性的多肽主要集中在相对分子质量较小的组分.由于两种蛋白酶水解产物的相对分子质量都集中在 1 000 以下,所以都有较高的 ACE 抑制活性,而 Alcalase 的水解能力更强,产物的相对分子质量更小,对羧基端为疏水性氨基酸的作用有特异性,所以 Alcalase 的水解产物 ACE 抑

制活性更强.对 AS1.398 水解产物,ACE 抑制活性随着水解度的增大而增大,因为水解度大的产物的相对分子质量更小.对 Alcalase 水解产物,由于 ACE 抑制活性普遍较高,可能由于活性肽的质量浓度过高,对 ACE 的抑制作用还没有得到完全发挥.作者降低了活性肽溶液的质量浓度再次测定了 ACE 抑制活性,结果见表 2.可以看出,Alcalase 酶, DH 为 14% 的产物有最强的 ACE 抑制活性,在质量浓度 0.2 mg/mL 时的抑制率为 69.45%,其 IC_{50} (ACE 活性被抑制 50% 时的质量浓度)为 0.144 mg/mL.继续增加水解度,产物的 ACE 抑制活性反而略有下降,这可能是由于具 ACE 抑制活性的多肽有部分被进一步水解,生成活性较小或没有活性的多肽.

表 1 两种蛋白酶不同水解度产物的 ACE 抑制活性

Tab.1 ACE inhibitory activity of hydrolysates with DH of 10% ~ 24% produced by AS1.398 and Alcalase

DH/%	抑制率/%	
	AS1.398	Alcalase
10	63.87	88.29
12	70.37	82.55
14	73.85	82.52
16	75.63	83.20
18	84.61	80.63
20	87.28	83.02
22	86.44	85.65
24	87.59	85.00

表 2 Alcalase 酶解产物的 ACE 抑制活性

Tab.2 ACE inhibitory activity of hydrolysates produced by Alcalase

DH/%	抑制率/%	
	0.5 mg/mL	0.2 mg/mL
10	89.23	63.73
12	76.33	65.25
14	89.54	69.45
16	71.48	60.38
18	56.51	57.37
20	81.05	55.86
22	71.27	53.85
24	77.15	53.65

2.3 大豆多肽的相对分子质量分布

大豆多肽的生理活性和它的相对分子质量分布有必然的联系,而相对分子质量分布又取决于水

解时选用的蛋白酶和控制的水解度的大小.作者用高效凝胶过滤色谱法测定了两种蛋白酶不同水解度制备的大豆活性肽的相对分子质量分布的情况.

根据各种平均相对分子质量的定义求出各种平均相对分子质量,结果见表 3.

$$\text{重均相对分子质量 } M_w = \frac{\sum M_i H_i}{\sum H_i}$$

$$\text{数均相对分子质量 } M_n = \frac{\sum H_i}{\sum (H_i/M_i)}$$

$$\text{分布宽度指数 } D = M_w/M_n$$

表 3 酶解产物的相对分子质量分布

Tab.3 The molecular weight distribution of hydrolysates

酶	DH/%	相对分子质量分布	比例/%	M_w	M_n	D
AS1.398	12	1 174	20.26	921	338	2.724 9
		595	28.11			
		228	41.65			
	16	1 091	19.15	816	335	2.435 8
		595	29.22			
		244	41.32			
	20	1 184	21.32	725	315	2.301 6
		597	28.48			
		228	46.59			
	24	1 113	13.33	519	267	1.943 8
		593	24.70			
		234	57.58			
Alcalase	10	1 250	20.28	665	299	2.224 1
		626	26.70			
		237	49.48			
	14	1 254	17.50	614	272	2.257 4
		626	28.19			
		239	50.79			
	18	1 177	12.67	514	271	1.896 7
		605	28.16			
		231	56.05			
	22	1 121	9.07	446	237	1.881 9
		585	26.77			
		210	60.51			

由表 3 可以看出,两种蛋白酶水解产物的相对分子质量主要在 1 000 以下(90% 以上).从重均相对分子质量和数均相对分子质量的数值来看,随着水解度的增大,两种相对分子质量都是不断减小,而重均相对分子质量的减小幅度更大,所以分布宽

度指数 D 值随着水解度的增大而减小,同一水解度的产物,Alcalase 的 D 值更小.这说明碱性蛋白酶 Alcalase 在较低的水解度就将蛋白质水解成长度比较平均的肽键,而中性蛋白酶 AS1.398 一开始将蛋白质水解成长短不一的肽键,但随着水解度的增加,较长的肽键继续被水解成短的肽键,肽键的长度趋于平均.即 AS1.398 的水解产物在较低的水解度,相对分子质量分布较广,较高的水解度时,相对分子质量分布趋于平均,而 Alcalase 水解产物的相对分子质量分布在较低的水解度时就比较均匀.通过对酶解产物相对分子质量分布的分析,说明了两种蛋白酶不同的水解方式,这与前面通过水解得率分析所得到的结论是一致的.将不同水解度的大豆活性肽产品的抗氧化性和 ACE 抑制活性与其相对分子质量分布的情况相比较,可以看出,具有较高抗氧化性的大豆活性肽相对分子质量在 1 000 以上的组分含量相对较高,具有较高 ACE 抑制活性的

大豆活性肽相对分子质量在 200 ~ 600 之间的组分含量相对较高,这与参考文献的报道是一致的.

3 结 论

综上所述,实验所用的两种蛋白酶各个不同水解度的大豆活性肽产品都有一定的抗氧化活性和 ACE 抑制活性,活性大小由蛋白酶的种类和水解度的大小决定.采用 AS1.398 酶水解的 $DH = 12$ 的产品抗氧化活性最高,添加量为 6 mg/mL 时使亚油酸的氧化诱导期延长 2.92 倍,其相对分子质量分布在 1 000 以上的组分较多;采用 Alcalase 酶水解的 $DH = 14$ 的产品 ACE 抑制活性最高, IC_{50} 为 0.144 mg/mL,其相对分子质量分布在 200 ~ 600 之间的组分较多.以上结论的得出,为大豆生理活性肽的进一步分离、纯化和结构鉴定提供了一定的依据.

参考文献:

- [1] Hua-Ming Chen, Koji Muramoto, Fumio Yamauchi. Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean β -conglycinin [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 574 - 578.
- [2] Hua-Ming Chen, Koji Muramoto, Fumio Yamauchi *et al.* Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44: 2619 - 2623.
- [3] Hua-Ming Chen, Koji Muramoto, Fumio Yamauchi, *et al.* Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 49 - 53.
- [4] 倪莉. 废蚕丝蛋白的研究 [D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1999.
- [5] 吴建平, 丁霄霖. 大豆降压肽的研制(II)——酶 E 作用条件的优化 [J]. *中国油脂*, 1998, 23: 6 - 9.
- [6] Emikko Kinoshita, Yamakoshi, Mamoru Kikuchi. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Soy Sauce [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57: 1107 - 1110.
- [7] Zae-ik Shin, Rina Yu, Soo-Ah Park *et al.* His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 3004 - 3009.
- [8] Jiangping Wu, Xiaolin Ding. Hypotensive and physiological effect of antihypertensive enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 501 - 506.
- [9] Jiangping Wu, Xiaolin Ding. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. *Food Research International*, 2002, 35: 367 - 375.
- [10] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. *J Agric Food Chem*, 1979, 27(6): 6.
- [11] Jianping Wu, Rotimi E Alko, Alister D Muir. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions [J]. *J Chromatography A*, 2002, 950: 125 - 130.

(责任编辑 朱明)