

# 大米蛋白酶解物的 ACE 抑制活性研究

陈倩倩<sup>1,2</sup>, 佟立涛<sup>2</sup>, 钟葵<sup>2</sup>, 刘丽娅<sup>2</sup>, 周素梅<sup>2</sup>, 钱海峰<sup>1</sup>

(1. 江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214036)

(2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 为了考察大米四种蛋白经模拟体外消化后能否产生 ACE 抑制活性肽及其活性状况, 本研究以大米为原料, Osborne 法提取大米四种蛋白。体外模拟胃肠道消化过程, 研究消化酶解 ACE 抑制活性肽产生情况及其活性大小, 同时检测酶解产物的水解度和分子量分布。实验结果表明, 大米四种蛋白经胃蛋白酶消化 30 min, 酶解产物的 ACE 抑制活性均达到较高水平, 随后经过胰蛋白酶作用, 酶解产物的 ACE 抑制活性下降。大米清蛋白, 球蛋白, 醇溶蛋白和谷蛋白的 4 h 消化产物半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值分别为 1.45 mg/mL, 0.91 mg/mL, 1.19 mg/mL 和 0.75 mg/mL, 分子量集中在 1000 u 以下, 是易于被人体吸收的 ACE 抑制活性肽。同时, 未经酶解的蛋白几乎没有 ACE 抑制活性。结果说明大米四种蛋白的体外消化酶解物具有不同大小的 ACE 抑制活性, 其中大米谷蛋白消化产物的 ACE 抑制活性最高, 人体正常食用大米蛋白, 经胃肠消化可以产生被人体吸收的 ACE 抑制活性肽。

**关键词:** 大米蛋白; 血管紧张素转换酶; 活性肽; 体外消化; 分子量分布

文章编号: 1673-9078(2015)3-91-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.016

## Angiotensin-converting Enzyme Inhibition By Rice Protein Hydrolysate

CHEN Qian-qian<sup>1,2</sup>, TONG Li-tao<sup>2</sup>, ZHONG Kui<sup>2</sup>, LIU Li-ya<sup>2</sup>, ZHOU Su-mei<sup>2</sup>, QIAN Hai-feng<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University; State Key Laboratory of Food Science and Technology

Jiangnan University, Wuxi 214036, China) (2. Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In this study, the production of peptides with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition activity was investigated from simulated *in vitro* digestion of four rice proteins, namely albumin, globulin, prolamin, and glutelin. The proteins were extracted from rice using the Osborne method. Production and ACE inhibiting activity, the degree of hydrolysis, and the molecular weight distribution of the proteolysis products were investigated. The results revealed that ACE inhibition activity of individual products obtained after proteolysis of the proteins, was high after 30 min of pepsin digestion. The activity decreased upon subsequent digestion with trypsin. The hydrolysates of rice albumin, globulin, prolamin, and glutelin after 4-hour digestion showed half-inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of 1.45, 0.91, 1.19, and 0.75 mg/mL, respectively, and their molecular weight was < 1000 u, which means they can be easily absorbed by the human body. At the same time, undigested proteins had almost no ACE inhibition activity. The result also showed the products of *in vitro* protein proteolysis had different ACE inhibition activities and that rice glutelin proteolysis product showed the highest ACE inhibition activity. Therefore, the gastrointestinal digestion of regularly consumed rice can produce ACE-inhibiting peptides that can be absorbed by the human body.

**Key words:** rice protein; angiotensin-converting enzyme; bioactive peptides; *in vitro* digestion; molecular weight distribution

食物蛋白特别是植物蛋白, 其改善代谢综合症作用越来越受到世界各国食品及营养学家的关注。目前, 已通过采用合适的蛋白酶水解食物蛋白获得了大量的

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(201303070); 农业部公益性行业科研专项经费(201403063); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国农业科学院作物科学研究所)资助项目

作者简介: 陈倩倩(1990-), 女, 在读硕士研究生, 从事粮油深加工与功能食品研究; 佟立涛, 为并列第一作者

通讯作者: 钱海峰(1973-), 男, 副教授, 从事功能因子及健康食品研究

生物活性肽<sup>[1]</sup>, 包括 ACE 抑制肽、降血脂肽、抗动脉粥样硬化肽等, 其中以降血压肽的研究最为广泛和深入。高血压的主要特征是动脉血管收缩压或舒张压升高的临床综合症, 并且常伴有多种并发症。血管紧张素转化酶(ACE, EC3.4.15.1)对生物体血压的调节起到重要的作用, 调节主要通过两个方面: ACE 将不具有活性的血管紧张素 I 水解转化为血管紧张素 II; ACE 通过降解调节血压下降的舒缓激肽, 从而引起血压升高。目前关于生物活性肽的研究多局限于人为控制和静态化学测试, 与人体的消化吸收没有联系。这些生

物活性肽经过人体消化能否保持其生物活性不被降解有待考察。

Matsui 等<sup>[2]</sup>从大豆球蛋白中分离纯化得到小肽 WH, 并以等量的 W 和 H 两个氨基酸混合物做对照在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠中证实了其抗动脉粥样硬化(AS)作用, 而单纯的氨基酸混合物并不具有抗 AS 功效。这说明了, 小肽的氨基酸序列是其发挥功效的结构基础。进一步研究表明, WH 依赖于高的 ACE 抑制活性来调节血管平滑肌细胞中的 Ca<sup>2+</sup>平衡, 从而发挥改善代谢综合症的功效。大米蛋白是公认的优质植物蛋白, 含有 4~15% 球蛋白, 1~5% 清蛋白, 2~8% 醇溶蛋白和 80% 谷蛋白, 其改善生活习惯病的功效已获得实验证实<sup>[3]</sup>。在亚洲国家有一半以上的人群将大米作为日常主食, 目前对大米蛋白的研究较多, 但是对于大米不同种类蛋白的研究远远不及大豆, 玉米等其他谷物蛋白, 而每种蛋白的生理活性可能相差甚远。Wang 等<sup>[4]</sup>采用酸性蛋白酶对蚕蛹清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白进行酶解, 清蛋白和球蛋白水解产物的 ACE 抑制活性远远高于醇溶蛋白和谷蛋白。大米  $\alpha$ -球蛋白具有降血脂及其抗动脉粥样硬化作用, 而发挥作用的物质基础可能归因于其被人体消化后产生的功能活性肽段<sup>[5]</sup>。

本研究采用 Osborne 法从大米中提取四种蛋白。在模拟胃肠道消化环境的基础上, 研究四种蛋白在消化过程中 ACE 抑制活性肽的产生情况、活性变化和相对分子质量分布, 以探索人体在正常食用大米蛋白时能否产生 ACE 抑制活性肽及其变化规律, 并确定其 ACE 抑制活性主要来源于何种蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

原料籼米, 湖南金健米业股份有限公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶, 北京鸿润宝顺科技有限公司; ACE、马尿酸组氨酰亮氨酸(Hip-His-Leu, HHL), 美国 Sigma 公司; 低分子量蛋白质标准品(14.4~97.0 ku), 英国 GE Healthcare 公司; 4~20% 伯乐 Mini-Protean 预制胶, 美国 Bio-Rad 公司; 其他试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

2300 自动定氮仪, 瑞典 FOSS 公司; UB-7 pH 计, 美国丹佛仪器公司; LXJ-11B 大容量离心机, 上海安亭科学仪器厂; TU-1900 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; THZ-82A 水浴恒温振荡器, HJ-4 型多头磁力加热搅拌器, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; LGJ-25C 型冷冻干燥机, 北

京四环科学仪器厂有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; 伯乐 Mini-Protean 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; FluorChem FC2 凝胶成像系统, 美国 Alpha 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 Osborne 法提取大米蛋白

参考 Osborne 方法<sup>[6]</sup>, 1 kg 大米粉碎过筛, 加入 4 L 蒸馏水, 在室温下搅拌 2 h 后 4000 r/min 离心 20 min, 重复提取 2 次, 合并上清液。残渣与 4 L 的 5% 氯化钠溶液混合, 在室温下搅拌 2 h 后 4000 r/min 离心 20 min, 重复提取 2 次, 合并上清液。残渣与 4 L 的 70% 乙醇溶液混合, 在室温下搅拌 2 h 后 4000 r/min 离心 20 min, 重复提取 2 次, 合并上清液。以上得到的上清液抽滤后蒸发浓缩, 分别在等电点沉淀。残渣与 4 L 的 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液混合, 在室温下搅拌 2 h 后 4000 r/min 离心 20 min, 上清液调至等电点。蒸馏水洗涤沉淀 2 次, 冷冻干燥 24 h 后获得大米粗蛋白, 备用。具体提取的技术路线如下:

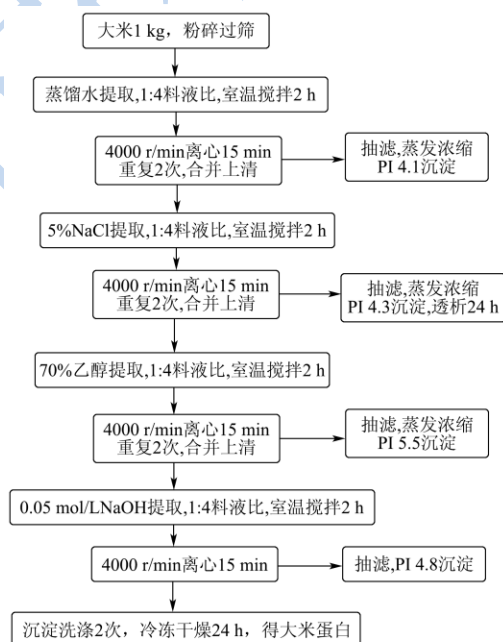


图 1 Osborne 法提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白工艺流程

Fig.1 The process of Osborne extraction of albumin, globulin, prolamin and glutelin from rice

#### 1.3.2 蛋白质含量的测定

采用 GB 5009.5-2010 凯氏定氮法测定大米及清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白的蛋白质含量 (N 取 5.95)。

#### 1.3.3 SDS-PAGE 凝胶电泳

采用 4~20% 梯度胶对清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、

谷蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 选择恒压 100 V。R-250 考马斯亮蓝染色 3 h, 用脱色液脱色。FluorChem FC2 凝胶成像系统拍照。

### 1.3.4 大米蛋白体外模拟胃肠消化酶解

蒸馏水配制一定浓度的四种大米蛋白溶液, 用 1 mol/L HCl 调溶液 pH 2.0, 加入胃蛋白酶, 37 °C 恒温条件下消化酶解 2 h。0.09 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 pH 5.3, 加入胰蛋白酶后, 再用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 7.8, 37 °C 恒温条件下消化酶解 2 h, 分别在消化过程中取样; 100 °C, 10 min 终止酶解反应。冷却后离心 (4500 r/min, 20 min), 收集上清液冷冻贮藏备用。

### 1.3.5 水解度 (DH) 的测定

采用 OPA(邻苯二甲醛)法<sup>[7]</sup>, 取 3.00 mL OPA 溶液于试管中加入 400 μL 稀释至一定倍数水解上清液, 精确反应 2 min 后在 340 nm 处测定吸光值。同时以丝氨酸标准溶液 (0.9516 mmol/L) 作参考和空白试验。通过以下两步公式计算:

$$\text{SerineNH}_2 = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{stand}} - OD_{\text{blank}}} \times 0.9516 \text{ mmol/L} \times \frac{N \times V}{X \times P} \text{ L/g protein}$$

式中: Serine NH<sub>2</sub>(mmol/g): 每克蛋白质中含 serine NH<sub>2</sub> 的量; X(g): 样品重量; P(%): 样品中的蛋白含量; N: 稀释倍数; V(L): 上清液体积。

$$DH = \frac{(\text{SerineNH}_2 - \beta) / \alpha}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

式中: β, α 分别以常数 0.4 和 1 表示; h<sub>tot</sub> 每克原料蛋白的肽键毫摩尔数 (mmol/g), h<sub>tot</sub>=7.72 mmol/g。

### 1.3.6 血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制活性的测定

含有 0.3 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH8.3) 将 Hip-His-Leu 配成 5 mmol/L 的溶液。在 1.5 mL EP 管中加入 80 μL 的 5.0 mmol/L Hip-His-Leu 溶液和 20 μL 的样品, 于 37 °C 保温 5 min 后, 再加入 20 μL ACE 溶液 (溶解于硼酸盐缓冲液中, 活力为 0.1 U/mL), 混匀后在 37 °C 保温 30 min, 200 μL 的 1.0

mol/L 盐酸溶液终止反应。同时做空白试验, 等量硼酸盐缓冲液代替样品。

采用高效液相色谱测定马尿酸的含量<sup>[8]</sup>, 色谱条件:

实验色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus-C18 (150 mm×4.6 mm), 流动相乙腈: 水: 三氟乙酸=50: 50: 0.05 (V/V/V), 检测波长 228 nm, 流速 0.4 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

$$\text{ACE 抑制率} (\%) = (B - A) / B \times 100\%$$

式中: A 为含有样品和 ACE 反应液的峰面积; B 为不含样品, 含有 ACE 反应液的峰面积。

### 1.3.7 胃蛋白酶、胰蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布

采用高效液相色谱法测定<sup>[9]</sup>。取胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶解液上清液稀释至一定浓度, 微孔过滤膜过滤后上色谱柱。色谱条件:

实验色谱柱: TSK gel 2000SWXL (300 mm×7.8 mm), 流动相乙腈: 水: 三氟乙酸=45: 55: 0.1 (V/V/V), 检测波长 220 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

相对分子质量校正标准品: 细胞色素 C (M<sub>w</sub> 12500 u), 抑肽酶 (M<sub>w</sub> 6500 u), 杆菌肽 (M<sub>w</sub> 1450 u), 乙氨酰氨-乙氨酰氨-精氨酸 (M<sub>w</sub> 451 u) 和乙氨酰氨-乙氨酰氨-乙氨酰氨 (M<sub>w</sub> 189 u)。

### 1.3.8 数据分析

每组实验重复 3 次, 采用 Excel 计算不同指标的平均值和标准偏差, 所有图中误差值采用 SD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 Osborne 方法提取大米四种蛋白的纯度和

提取率

表 1 大米各类蛋白的纯度和相对百分含量

Table 1 The content and the relative percentages of albumin, globulin, prolamin and glutelin in rice

	原料大米	清蛋白	球蛋白	醇溶蛋白	谷蛋白
质量/g	1000	0.62±0.12	3.48±0.24	1.38±0.17	40.02±1.12
蛋白质含量/%	7.52±0.14	74.57±0.26	98.61±0.40	90.57±0.67	84.72±0.59
相对百分含量/%	-	1.18±0.23	8.78±0.64	3.20±0.42	86.83±3.14

湖南籼米含有 7.52% 的大米蛋白, 经分级提取后, 提取率为 51.93±3.26%。本研究清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白重复提取了 2 次, 谷蛋白提取了 1 次。清蛋白的蛋白质含量低于其他蛋白的蛋白质含量, 可能是由于其中含有可溶性糖类。提取的大米蛋白中清蛋白含

量最少, 仅有 1.18%, 球蛋白和醇溶蛋白的相对百分含量分别占提取蛋白总量的 8.78%、3.20%, 而谷蛋白含量最多, 占 86.83%, 该结果与 Ju 等<sup>[6]</sup>报道相似。

### 2.2 大米蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

采用 4%~20% 的梯度胶对四种蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 凝胶成像系统拍照得到的电泳图谱如图 2 所示。清蛋白的亚基分子质量分布大概在 43、35、30、16 ku, 球蛋白亚基的分子质量大概分布在 26、16 ku; 醇溶蛋白和谷蛋白是贮藏蛋白质, 醇溶蛋白是由一条肽链通过分子间的二硫键连接而成的, 谷蛋白是由多肽链彼此通过二硫键连接而成的大分子组成。醇溶蛋白亚基的分子质量比较集中, 大概分布在 14 ku。谷蛋白亚基的分子质量大概分布在 37、22、16 ku。一般认为谷蛋白刚合成时是 57 ku 的大分子, 其后从核糖体转运到液泡并形成蛋白体的过程中, 该前体被水解成  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基, 其中  $\alpha$  为酸性亚基, 相对分子质量为 37~39 ku,  $\beta$  为碱性亚基, 相对分子质量 22 ku。该结果与先前的报道一致<sup>[10]</sup>。

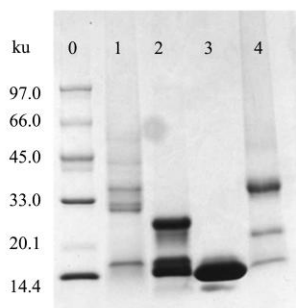


图 2 大米各类蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.2 SDS-PAGE patterns of albumin, globulin, prolamin and glutelin in rice

注: 0: 蛋白标样, 1: 清蛋白, 2: 球蛋白, 3: 醇溶蛋白, 4: 谷蛋白, 每条泳道含有 50  $\mu$ g 蛋白。

### 2.3 大米蛋白体外模拟胃肠消化酶解产物的 DH 变化

水解度代表蛋白质在水解过程中肽键断裂的程度, 体现蛋白被水解的程度。图 3 为不同种类大米蛋白的水解进程曲线, 前 120 min 为胃蛋白酶水解阶段, 120 min 到 240 min 为胰蛋白酶水解阶段。DH 随时间变化呈上升趋势。四种大米蛋白在胃蛋白酶水解阶段水解度较低, 在加入胰蛋白酶后水解度快速上升, 后上升趋势又略有减小。这是由于随着酶解反应的进行, 产物浓度增大, 底物浓度减小, 蛋白酶的活性降低等综合因素造成的<sup>[11]</sup>。不同蛋白经过体外消化水解的水解度变化有一定的差别。清蛋白的水解程度最高, 最终的水解度达到 27.77%。谷蛋白次之, 经过胃蛋白酶和胰蛋白酶水解后水解产物达到 22.35% 的水解度。醇溶蛋白和球蛋白的水解度值相似, 最终水解产物水解度分别为 18.52% 和 18.85%, 而醇溶蛋白更不易被胃

蛋白酶水解。结果说明清蛋白最易被人体消化, 而相对的醇溶蛋白最不易被消化。

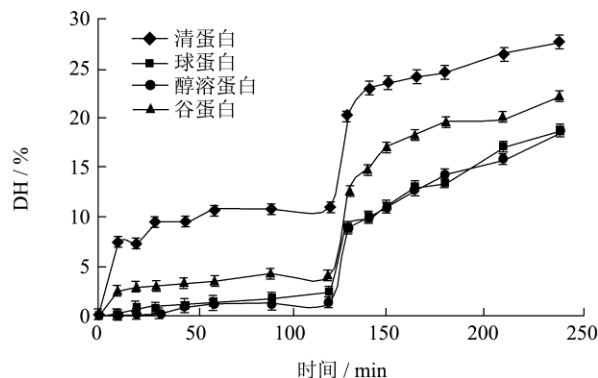


图 3 体外模拟胃肠消化酶解大米四种蛋白的水解度变化  
Fig.3 The changes in the degree of hydrolysis of albumin, globulin, prolamin and glutelin after stimulated *in vitro* gastrointestinal digestion

### 2.4 大米蛋白体外模拟胃肠消化酶解产物的 ACE 抑制活性变化

本研究中, 大米蛋白经胃蛋白酶和胰蛋白酶分步酶解, 不同时间的酶解物上清液稀释 20 倍的 ACE 抑制率测定结果为: 四种蛋白的总体变化趋势是一致的, 胃蛋白酶开始水解 30 min 内的水解产物快速产生 ACE 抑制活性。胃蛋白酶阶段的水解产物 ACE 抑制活性高于胰蛋白酶阶段的水解产物, ACE 抑制活性并没有随着水解度的增加而增强。胃蛋白酶对酪氨酸和苯丙氨酸的肽键作用, 胰蛋白酶专一水解赖氨酸和精氨酸的肽键, 前者的酶解产物易产生疏水性氨基酸和芳香族氨基酸末端, 而末端是疏水性和芳香族氨基酸的肽最能够与 ACE 产生竞争性结合, 这与现已提出的 ACE 抑制机理模型相符。值得注意的是, 清蛋白在胃蛋白酶水解阶段 ACE 活性较其它蛋白活性高, 但在加入胰蛋白酶后, ACE 抑制活性一直不断地降低, 而其他蛋白的酶解产物加入胰蛋白酶后, 随着水解度的升高, ACE 抑制活性有一定程度地提高。这可能是由于清蛋白的水解度过高的原因, 其在胃蛋白酶水解阶段水解度一直最高, 在 140 min 时其水解度就已经达到了 23.04%, 说明过度的水解也会破坏 ACE 抑制活性。本研究中 ACE 活性的变化与 Meg  $\acute{a}$ s C<sup>[12]</sup> 等对葵花籽蛋白体外消化酶解产物和刘志伟<sup>[13]</sup> 等对大豆蛋白体外消化酶解产物中的 ACE 抑制活性肽研究相一致。

最终水解产物的结果表明谷蛋白的 ACE 抑制活性最高, 达到 57.52%, 其次是醇溶蛋白和球蛋白的 ACE 抑制率分别为 51.20% 和 48.88%, 清蛋白水解产

物的 ACE 抑制活性最差, 仅有 43.65%。这可能和每种蛋白的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸含量有关, 疏水性氨基酸、芳香族氨基酸含量越高的蛋白其 ACE 抑制活性越高。

对胃蛋白酶和胰蛋白酶分步消化的酶解产物稀释至不同浓度后, 进行 ACE 抑制活性测定并拟合了回归方程。从回归方程计算得到酶解产物的 ACE 半抑制浓度, 结果如表 2 所示。

谷蛋白的消化产物 ACE 半抑制浓度为 0.75 mg/mL, 远远低于其它种类的蛋白, 说明谷蛋白的消化产物具有良好的 ACE 抑制活性。该结果与模拟胃肠消化水解产物的 ACE 抑制活性变化一致。类似的研究<sup>[8]</sup>对燕麦蛋白, 花生蛋白, 杏仁蛋白酶解得到的 ACE 抑制肽粗品 IC<sub>50</sub> 值在 0.38 到 1.24 mg/mL 不等, 本研究的 IC<sub>50</sub> 值数据与文献报道接近, 表明大米蛋白

的胃肠道消化产物具有较好的 ACE 抑制活性, 可对人体产生的一定的降压作用。

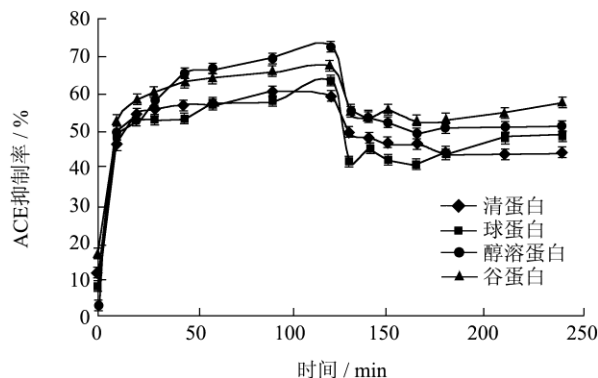


图4 体外模拟胃肠消化酶解大米四种蛋白的 ACE 抑制活性变化  
Fig.4 Changes in ACE inhibition activity of albumin, globulin, prolamin, and glutelin after stimulated *in vitro* gastrointestinal digestion

表 2 大米各类蛋白 4 h 体外消化产物的 ACE 半抑制浓度

Table 2 The IC<sub>50</sub> of ACE inhibition activity of peptide products obtained after a 4-hour *in vitro* simulated gastrointestinal digestion of albumin, globulin, prolamin and glutelin

组别	清蛋白	球蛋白
浓度-ACE 抑制活性的回归方程	$y = -4.335x^2 + 30.65x + 14.69$ ( $R^2 = 0.985$ )	$y = -10.37x^2 + 43.07x + 19.45$ ( $R^2 = 0.939$ )
ACE 半抑制浓度(mg/mL)	1.46	0.91
组别	醇溶蛋白	谷蛋白
浓度-ACE 抑制活性的回归方程	$y = -12.30x^2 + 45.48x + 13.27$ ( $R^2 = 0.961$ )	$y = -12.58x^2 + 44.02x + 24.01$ ( $R^2 = 0.991$ )
ACE 半抑制浓度(mg/mL)	1.12	0.75

### 2.5 胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布

#### 子质量分布

各个标样相对分子量的对数值与各自的洗脱时间呈很好的相关性, 相对分子质量与洗脱时间之间的回归方程  $\lg MW = -4.179t + 29.27$  ( $R^2 = 0.979$ ), 进而预测相对分子质量分布。

Oshima<sup>[14]</sup>报道具有 ACE 抑制活性的肽分子量大小集中在 1500 u 左右, 这说明 ACE 抑制活性不但与肽的序列有关, 与分子量的大小也有一定的联系。本研究的测定结果如图 5 所示。

胃蛋白酶消化水解产物分子量集中在 3000 u 以下。醇溶蛋白的胃蛋白酶消化产物分子量较小, 大于 3000 u 的多肽仅占 0.45%, 该结果与 SDS-PAGE 电泳和模拟体外消化的水解度变化结果一致。大米四种蛋白经胃蛋白酶和胰蛋白酶分步消化 4 h 的酶解产物水解程度较深, 分子量均集中在 1000 u 以下。四种蛋白 4 h 的消化产物的分子量分布是相似的, 只有球蛋白的 大于 5000 u 多肽占 12.22%, 其它蛋白的分子量都在

3000 u 以下。这可能与其球状分子有关, 相对其它蛋白不易被蛋白酶酶解成小片段的肽段。分子量小于 3000 u 的小肽更容易被人体吸收, 因此人体食用大米蛋白, 经胃蛋白酶和胰蛋白酶消化酶解后, 可能会在肠上皮细胞产生具有 ACE 抑制活性的小肽, 小肽经吸收后到达血液, 产生抗高血压的作用。

### 3 结论

3.1 采用 Osborne 分级提取大米四种蛋白, 清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白相对百分含量依次为 1.18%、8.78%、3.20% 和 86.83%。清蛋白的亚基分子量分布大概在 43、35、30、16 ku, 球蛋白亚基的分子量大概分布在 26、16 ku, 醇溶蛋白亚基的分子量比较集中, 分布在 14 ku, 谷蛋白亚基的分子量大概分布在 37、22、16 ku。

3.2 采用胃蛋白酶和胰蛋白酶, 在体外模拟大米蛋白的胃肠消化过程, 监测了四种蛋白在消化过程中的 ACE 活性肽产生情况及活性大小。未经酶解的四种蛋白几乎没有活性, 经胃蛋白酶水解快速产生 ACE 抑制活性, 后经过胰蛋白酶水解, 酶解物的 ACE 抑制

活性有一定程度的降低。

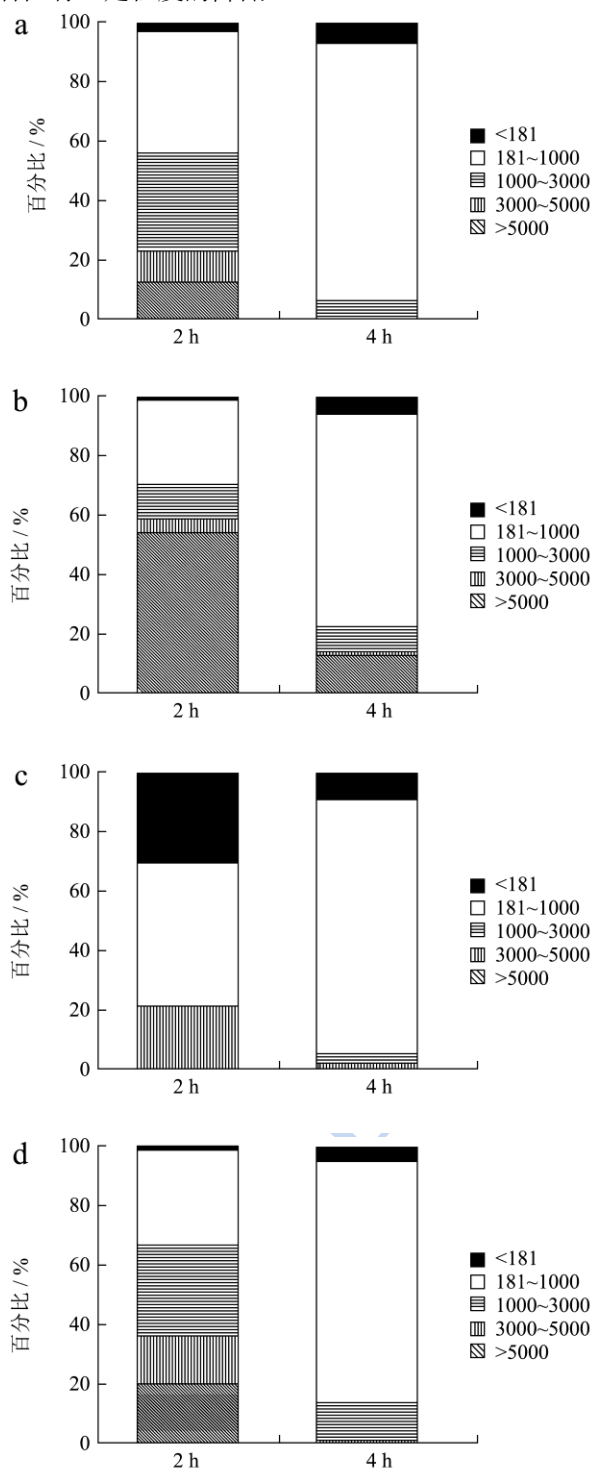


图5 体外消化 2 h 和 4 h 酶解产物的分子量分布

Fig.5 Molecular weight distribution of proteolysis products after 2 h and 4 h *in vitro* digestion

注: a: 清蛋白酶解产物; b: 球蛋白酶解产物; c: 醇溶蛋白酶解产物; d: 谷蛋白酶解产物。

3.3 研究表明,大米四种蛋白胃肠道消化产物的 ACE 抑制活性有一定差别,谷蛋白酶解产物活性最高,球蛋白和醇溶蛋白次之,清蛋白酶解产物的 ACE

抑制活性最差,蛋白经胃肠消化后分子量均集中在 181~1000 u。人体正常食用大米蛋白,经胃肠道消化后可以产生易被吸收的 ACE 抑制活性肽,其活性肽主要来源于谷蛋白和球蛋白。

参考文献

- [1] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review [J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956
- [2] Matsui T, Sato M, Tanaka M, et al. Vasodilating dipeptide Trp-His can prevent atherosclerosis in apo E-deficient mice [J]. British journal of nutrition, 2010, 103(03): 309-313
- [3] Ni W, Tsuda Y, Takashima S, et al. Anti-atherogenic effect of soya and rice-protein isolate, compared with casein, in apolipoprotein E-deficient mice [J]. British Journal of Nutrition, 2003, 90(01): 13-20
- [4] Wang W, Wang N, Zhou Y, et al. Isolation of a novel peptide from silkworm pupae protein components and interaction characteristics to angiotensin I-converting enzyme [J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(1): 29-38
- [5] Tong L T, Fujimoto Y, Shimizu N, et al. Rice  $\alpha$ -globulin decreases serum cholesterol concentrations in rats fed a hypercholesterolemic diet and ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 194-200
- [6] Ju Z Y, Hettiarachchy N S, Rath N. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(2): 229-232
- [7] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646
- [8] 王春艳.杏仁短肽制备及其降血压活性研究[D].北京:中国农业科学院,2011  
WANG Chun-yan. Study on preparation and antihypertensive activity of almond oligopeptides [D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Science, 2011
- [9] Su G, Ren J, Zhao M, et al. Comparison of Superdex peptide HR 10/30 column and TSK gel G2000 SWXL column for molecular weight distribution analysis of protein hydrolysates [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(12): 3620-3626
- [10] 王章存.米渣蛋白的制备及其酶法水解研究[D].无锡:江南大学,2005  
WANG Zhang-cun. Preparation and enzymatic hydrolysis of rice protein from rice dreg [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005
- [11] Sabiha-Hanim S, Noor M A M, Rosma A. Effect of

- autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) frond fibres for xylose and xyloligosaccharides production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1234-1239
- [12] Megás C, Yúst M M, Pedroche J, et al. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(7): 1928-1932
- [13] 刘志伟,刘秀梅,郑梦云,等.大豆蛋白体外酶解物中血管紧张素转化酶抑制剂活性肽研究[J].*营养学报*,2007,29(1):69-73
- LIU Zhi-wei, LIU Xiu-mei, ZHENG Meng-yun, et al. Study on angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from digestion of soy protein in vitro [J]. *Journal of Nutrition*, 2007, 29(1): 69-73
- [14] Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, 566(1): 128-137

现代食品科技