

富含ACE抑制肽的酪蛋白水解物及其功能性酸奶对SHR血压的影响

王佳佳, 胡志和*, 蒋毅

(天津市食品生物技术重点实验室, 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要:目的:用酪蛋白双酶(胃蛋白酶和胰蛋白酶)水解物(A)及其超滤物(截留分子量6ku)(B)、水解物的脱苦产物(C)及其超滤物(D)分别灌胃12周龄雄性原发性高血压大鼠(SHR)和正常Wistar大鼠,研究其降血压作用。方法:A和C的灌胃剂量分别为0.083、0.25、0.75g/kg mb;B和D的灌胃剂量分别为0.01、0.03、0.09g/kg mb;检测灌胃后8h内大鼠尾动脉收缩压(SBP)的变化。结果:四种物质的高剂量对正常Wistar大鼠的血压无影响;四种物质的三种剂量分别灌胃SHR大鼠对其血压有明显的降低作用,其中A(0.25g/kg mb)、C(0.75g/kg mb)、B(0.03g/kg mb)、D(0.03g/kg mb)灌胃SHR大鼠在第4h达到最高降压幅度,分别为22.630、19.375、33.375、29.000mm Hg。用两种超滤物制备发酵乳灌胃SHR大鼠在第4h血压分别下降了36.875、31.875mm Hg;且间隔4h连续灌胃两种发酵乳可以在8h内维持较低的血压。结论:利用富含ACE抑制肽的酪蛋白水解物制备的功能性发酵乳在控制和治疗高血压方面有一定的效果,这为以后食源性降压食品的开发提供了一定的依据。

关键词:酪蛋白双酶水解物,功能性发酵乳,降血压作用

Effect of Casein hydrolysates and functional yoghurt containing rich ACE inhibitory peptides on blood pressure in Spontaneously Hypertensive Rats

WANG Jia-jia, HU Zhi-he*, JIANG Yi

(Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: Objective: Using 12-week-old male SHR and Wistar rats as the trial animals, they were gavaged casein bi-enzymatically (pepsin and trypsin) hydrolysates (A), the ultrafiltration (B), debittering (C) products of the hydrolysates, and ultrafiltration of debittering products (D) respectively, in order to study their antihypertensive effect. Methods: In the study, the gavage administration doses of A and C was 0.083, 0.25 and 0.75g/kg mb, B and D was 0.01, 0.03 and 0.09g/kg mb. The SHR were tested for their systolic blood pressure (SBP) during 8 hours post-administration. Results: normal Wistar rats administered high dose of the four products did not present any obvious change after administration, each of the three doses about the four products had a notable inhibitory effect on the increase of SBP in SHR, the four hydrolysates (A, C, B and D) achieving the highest reduction 22.630, 19.375, 33.375, 29.000mm Hg in the fourth hour at the administered dose 0.25, 0.75, 0.03 and 0.03g/kg mb respectively. The blood pressure of SHR rats dropped with 36.875, 31.875mm Hg at four hour after administered the fermented milk produced by the two ultrafiltration products, furthermore, continuous administration of the two yoghurt could keep SBP at a lower level for a long time period. Conclusion: There were certain effect on control and treatment about high blood pressure using functional yoghurt containing rich ACE inhibitory peptides, and providing a certain basis for antihypertensive food.

Key words: casein bi-enzymatically hydrolysates; functional yoghurt; anti-hypertension effect

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)10-0345-08

心血管疾病以冠心病为主,冠心病又称冠状动脉硬化性心脏病,而高血压是动脉粥样硬化的重要危险因素^[1],且血压水平与心血管发病危险呈正相关^[2]。在WHO/ISH^[3]、ESH/ESC^[4]和中国高血压指南^[5]

中强调了控制收缩压的重要性,阐述选择降压药物的原则以及联合用药干预心血管危险因素的高血压治疗新观念,但这些降压药物都有一定的毒副作用,如对心脏和肾造成损害或者对于特殊人群如心衰患者有使用限制^[6]。人们逐渐发现食物蛋白质水解后形成的小分子多肽具有明显的降血压作用,与普通降压药物相比具有无毒副作用、对正常的血压没有影

收稿日期: 2012-11-19 * 通讯联系人

作者简介: 王佳佳(1986-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

响的特点。因此,食源性降血压肽成为目前抗高血压功能食品或药物研究的重点之一^[7]。目前,很多具有辅助降血压功效的食物已被报道,如大豆^[8]、牛奶^[9]、乳酪^[10]、鱼肉、蔬菜、小麦、大米及苦荞麸皮蛋白^[11]等。

ACE抑制肽主要来自食品中的蛋白质,目前已成功提取出的主要有乳类蛋白、植物类蛋白及动物类蛋白中的ACE抑制肽。酪蛋白富含磷、吸附钙和丰富的必需氨基酸,酪蛋白的主要成分是 α s1-、 α s2-、 β -、 κ -酪蛋白,重量比例是3:0.8:3:1^[12]。自Maruyama等^[13]于1982年在酪蛋白水解物分离出具有ACE抑制活性的12肽(CEJ12),各国研究人员采用不同的方法从酪蛋白中分离提取了更多具有不同降压效果的ACE抑制肽。

本文通过研究酪蛋白、酪蛋白双酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶)水解物、水解物的超滤产物、脱苦后的水解物和超滤物,分别以不同剂量灌胃SHR大鼠和正常Wistar大鼠,观察其在大鼠血压的影响。在此基础上,用其最佳剂量制备功能性发酵乳,制备具有辅助降血压作用的发酵乳制品。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酪蛋白 天津海河乳业有限公司;全脂乳粉 天津海河乳业有限公司;直投式发酵剂 CHR HANSEN;胰蛋白酶(10000U/g)、胃蛋白酶(10000U/g) Sigma公司;风味蛋白酶(33000U/g) 丹麦Novo公司;原发性SHR高血压大鼠 中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心;正常Wistar大鼠 北京维通利华实验动物技术有限公司。

FA1104N电子天平 上海精密科学仪器有限公司;FLUKO FA-25均质机 上海弗鲁克流体机械制造有限公司;PB-10 pH计 Sartorius德国赛多利斯股份公司;Scientz-50N冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;BP-2006A智能无创血压计 北京软隆科技有限责任公司;6ku中空纤维膜组件 天津膜天膜工程技术有限公司。

1.2 酪蛋白的双酶水解

根据张艳^[14]所确定的胃蛋白酶和胰蛋白酶水解酪蛋白的条件,对酪蛋白进行水解。具体方法如下:

1.2.1 胃蛋白酶水解条件 水解条件为37℃,pH3.0,酶与底物质量比为1:100,底物质量浓度7%。水解过程中滴加1mol/L HCl溶液维持pH3.0。水解3h后加热灭酶结束反应。

1.2.2 胰蛋白酶水解条件 将胃蛋白酶水解后的酶解液pH调至7.7,并加热至48℃,按照酶与底物质量比1:500加入酶液,继续水解,水解过程中滴加1mol/L NaOH维持pH7.7。水解3h后加热煮沸10min灭酶,然后冷却至室温,调节pH7.0。4000r/min离心15min,取上清液进行冷冻干燥得到酪蛋白双酶水解物的粉末。

1.3 风味酶法对水解物脱苦的单因素实验

研究风味酶的酶底比([E]/[S])、pH、酶解时间对水解物脱苦效果的影响,固定[E]/[S]为3000U/g、pH6、酶解时间2h,其他变量因子水平见表1。以感官评定

苦味值作为评价指标,评价方法如下:将通过风味酶水解的水解液提供给5名品尝者,将酪蛋白双酶水解液分别稀释0、1、2、3、4、5、6、7、8倍,其对应的苦味评分分别是0、1、2、3、4、5、6、7、8。根据此评分标准,品尝复合肽溶液的苦味,并与标准比较进行评分,最后取平均值表示苦味程度。

表1 风味酶法脱苦的单因素水平表

Table 1 The factors and levels about single factor of debittering with flavourzyme

因素	水平				
A [E]/[S](U/g)	2000	2500	3000	3500	4000
B 水解pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
C 水解时间(h)	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0

1.4 风味酶法对水解物脱苦的正交实验

在单因素基础上,按L₉(3³)正交表进行正交实验,因素水平见表2。本实验先通过感官评价初步确定因素水平的范围,再利用电子舌技术通过对水解物苦味和苦味回味的的评价选择脱苦效果好的几组,通过测定酪蛋白双酶水解液及经风味酶法脱苦处理的几个典型试样(这里苦味和苦味的回味数值越小,脱苦效果越好),选择IC₅₀值最小的条件。

表2 风味酶法正交实验因素水平表

Table 2 The factors and levels about orthogonal experiment of debittering with flavourzyme

因素	水平		
	1	2	3
A [E]/[S](μ/g)	3000	3200	3500
B 水解pH	6.2	6.5	6.8
C 水解时间(h)	1.5	2	2.5

1.4.1 ACE体外检测及IC₅₀的测定 因为风味蛋白酶对酪蛋白双酶水解液的水解,可能会使水解液中原本的ACE抑制肽活性降低甚至丧失,所以需要从正交实验中选取的最好的几个结果中,挑选出对其活性影响最小的组合。

1.4.1.1 ACE抑制活性的体外检测 采用最常用的HHL方法^[15-16]体外检测ACE抑制率。具体方法如表3所示。硼酸钠缓冲液:含有300mmol/L NaCl的100mmol/L硼酸盐缓冲液(pH8.3),去离子水配制;HHL试剂:溶于硼酸钠缓冲溶液,配成浓度为5mmol/L,

表3 ACE抑制率体外检测方法

Table 3 The detection method of ACE inhibition ratio *in vitro*

试剂	样品	对照	空白
HCl	0	0	250
HHL	200	200	200
抑制剂	100	0	0
上述三种溶液在37℃中水浴3min			
ACE	20	20	20
上述溶液在37℃中水浴30min			
HCl	250	250	0
硼酸钠缓冲液	0	100	100

分装后-20℃保藏;ACE试剂:将0.25U的ACE用2.5mL的硼酸钠缓冲溶液溶解,配成0.1U/mL,分装后-20℃保藏;浓度1mol/L的盐酸溶液;抑制剂:用硼酸钠缓冲溶液溶解样品成不同浓度。

根据表3,将各试剂加入到5mL离心管中混匀(每管做三组平行),反应结束后加入1.7mL乙酸乙酯,经15s振荡、混匀后离心(4000r/min, 15min, 4℃),吸取1.0mL乙酸乙酯层于试管中,在120℃的烘箱中烘干30min后,向试管中加入3mL去离子水,检测在228nm处的吸光度,其计算公式为:

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

式中,A为反应中ACE抑制剂和ACE同时存在的吸光度;B为反应中不加抑制剂的吸光度,即对照;C为ACE和HHL空白反应的吸光度,即空白。

1.4.1.2 半数抑制浓度(IC₅₀)的测定 称取双酶水解产物以及通过电子舌评定结果即脱苦效果好的几种样品,分别配制质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.6、1.0mg/mL的溶液,测定各溶液的ACE抑制率,并绘制ACE抑制率曲线,计算出IC₅₀值。

1.5 脱苦水解物的超滤

选取正交实验最优结果得到的水解物进行超滤,方法如下:利用截留分子量6ku的中空纤维膜组件对双酶水解液进行循环超滤分离^[17-19],在室温下,控制压力0.05~0.10MPa,得到分子量小于6ku的溶液,并将其进行冷冻干燥成粉末。

1.6 功能性发酵乳的制备

将全脂乳粉(质量浓度12g/100mL)、白砂糖(质量浓度8g/100mL)、水分别加入降压效果好的样品制成功能性发酵乳,均质20s后在90℃下灭菌5min,冷却至42℃左右接种0.7%的直投式发酵剂,42℃培养6.5h后,于4℃冰箱后熟15h冷藏备用。

1.7 动物实验

1.7.1 实验动物分组 12周龄雄性SHR大鼠40只,体质量为(260±15)g,自由采食饮水,保持环境温度(23±1)℃,相对湿度60%±5%,预饲养1周。大鼠随机分为4组,每组8只,分别为空白组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,分别灌胃生理盐水(10mL/kg mb)、低、中、高剂量的双酶水解物及其脱苦产物(灌胃剂量为0.083、0.25、0.75g/kg mb),低、中、高剂量的双酶水解物超滤物和脱苦产物的超滤物(灌胃剂量为0.01、0.03、0.09g/kg mb)。另取Wistar大鼠8只,分为2组,分别作为空白组和正常对照组,灌胃生理盐水和高剂量水解产物。

采用同一批SHR大鼠进行实验,间隔1周,待其血压恢复原值后再进行灌胃其他产品的测试。

1.7.2 动物血压测定 采用血压计,测定大鼠尾动脉收缩压(SBP)^[20]。测定前,将大鼠固定于鼠网保温套中在39℃恒温预热,使尾动脉扩张,血流畅通。按照1.7.1中剂量对相应组进行灌胃,每天灌胃1次,测定灌胃后1~8h的尾动脉血压,连续测3次,取平均值。

1.7.3 单、多次灌胃水解物及其超滤物、脱苦水解物及其超滤物对大鼠SBP的影响

1.7.3.1 单次灌胃水解脱苦产物对大鼠SBP的影响 按照1.7.1中剂量对相应组进行灌胃,每天1次,测定灌胃后1~8h的尾动脉血压,连续测3次,观察灌胃后SHR及Wistar大鼠的收缩压(SBP)的变化。

1.7.3.2 连续灌胃水解脱苦产物对大鼠SBP的影响 将各组以1.7.3.1中灌胃结果的最适剂量灌胃SHR大鼠,每隔4h灌胃1次,每天2次,测定灌胃后8h内的SBP值。

1.7.3.4 单、多次灌胃功能性发酵乳对大鼠SBP的影响 单次灌胃发酵酸奶对SHR大鼠血压的影响:按照1.7.3.1中单次灌胃后效果最好的剂量制备功能性发酵乳进行灌胃,每天1次,测定灌胃后1~8h的尾动脉血压,连续测3次,观察灌胃后大鼠的收缩压(SBP)的变化。

连续灌胃发酵酸奶对SHR大鼠血压的影响:以最佳剂量发酵酸奶灌胃SHR大鼠,每4h灌胃1次,每天2次,测定灌胃后8h内的SBP值。

1.8 实验数据处理

用SPSS 17.0软件分析实验结果,比较各组与对照组之间差异的显著性,所得结果应用配对t检验, $p < 0.05$ 表明统计学有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 风味酶脱苦的单因素实验结果

表4 风味酶法脱苦的单因素实验感官评分结果

Table 4 The results of sensory score about single factor of debittering with flavourzyme

[E]/[S] (U/g)	苦味评分	水解pH	苦味评分	水解时间 (h)	苦味评分
2000	4.4	5	6.2	0.5	7.0
2500	5.8	5.5	6.6	1.0	7.6
3000	7.8	6.0	7.2	2.0	7.8
3500	7.8	6.5	7.8	4.0	7.4
4000	8.0	7.0	7.6	6.0	7.4

由表4可以看出,随着加酶量的增加苦味评分随之增加,当[E]/[S]为3000U/g时水解液的苦味基本脱除,继续增加酶量苦味消除效果不明显;且通过观察发现,随着加入酶量的增加,水解液的颜色逐渐加深,不利于其进一步应用,故这里确定加酶量为3000U/g。在水解pH为6.5和水解时间2.0h时,苦味评分最好,故选择水解pH为6.5、水解时间2.0h进行正交实验。

2.2 风味酶法脱苦的正交实验结果

由表6的方差分析可以看出,加酶量和pH对苦味的影响都为极显著,时间对苦味值的影响为显著,其中影响的主次因素为:pH>加酶量>水解时间。

由表7对苦味回味的方差分析可以看出,加酶量、pH、水解时间对苦味回味值的影响都极显著,其中影响的主次因素为:pH>加酶量>水解时间。

2.3 风味酶法脱苦对ACE抑制活性的影响

由图1结果显示试样3、6、8、9的IC₅₀值分别是0.31、0.8、0.56和0.28mg/mL,与未经脱苦的酪蛋白双

表5 风味酶法脱苦的正交实验结果

Table 5 The orthogonal experiment results about debittering with flavourzyme

实验号	A	B	C	苦味值	苦味回味值
1	1	1	1	-1.600	-1.608
2	1	2	2	-2.030	-2.123
3	1	3	3	-2.590	-2.532
4	2	1	3	-1.385	-1.468
5	2	2	1	-1.435	-1.665
6	2	3	2	-2.465	-2.473
7	3	1	2	-1.915	-1.892
8	3	2	3	-2.395	-2.308
9	3	3	1	-2.420	-2.419

表6 正交实验结果(苦味值)方差分析表

Table 6 Variance analysis for orthogonal array experimental results (bitterness value)

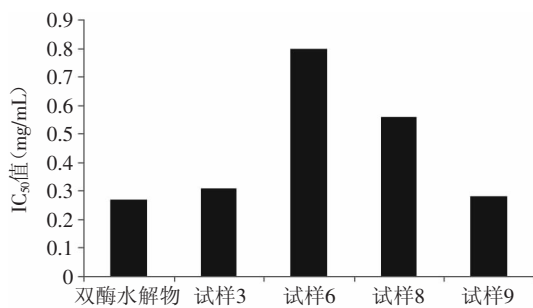
方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F值	p值
A	0.716	2	0.358	11.870	0.002
B	2.258	2	1.129	37.428	0.000
C	0.389	2	0.195	6.450	0.014
误差	0.332	11	0.030		

注: $p < 0.01$, 极显著; $p < 0.05$, 显著;表7同。

表7 正交实验结果(苦味回味值)方差分析表

Table 7 Variance analysis for orthogonal array experimental results (after-bitterness value)

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F值	p值
A	0.352	2	0.176	19.879	0.000
B	2.014	2	1.007	113.869	0.000
C	0.232	2	0.116	13.120	0.001
误差	0.097	11	0.009		

图1 风味酶法脱苦对IC₅₀值的影响Fig.1 The effect for IC₅₀ with flavor enzymatic

酶水解物的0.27mg/mL相比,试样9不仅脱苦效果好,而且IC₅₀值也是相对最低的,虽然风味酶法的脱苦仍略带苦味,但配合加糖等办法仍具有应用价值。

2.4 单次灌胃酪蛋白水解物对SHR和Wistar大鼠的影响

2.4.1 单次灌胃酪蛋白双酶水解物对SHR和Wistar大鼠的影响 由图2可知,灌胃酪蛋白双酶水解物的所有剂量组SHR大鼠的血压均与空白组相比较有明

显下降。统计显示在8h内各剂量组与空白组比较有显著性差异($p < 0.05$)。灌胃后,0~4h内收缩压(SBP)明显降低,4h后SBP开始逐渐上升,8h恢复原值。低剂量组在5h时达到最大降压值,下降了17.500mm Hg;中剂量组在4h时达到最大降压值,下降了22.630mm Hg;高剂量组在4h时达到最大降压值,下降了15.630mm Hg;然后血压开始慢慢回升,而单次灌胃高剂量的酪蛋白与灌胃生理盐水组相比对SHR的血压没有显著的影响($p > 0.05$)。高剂量组降压效果反而差,分析原因可能是由于水解物由于是通过酸性和碱性环境水解而得来,故产生了大量的盐类,由于高盐会使得血压有所升高。这表明经双酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶)水解后的酪蛋白产生了可以降低血压的ACE抑制肽。在8h基本恢复到灌胃前的水平,这表明酪蛋白双酶水解物有较强的抗高血压的效果。

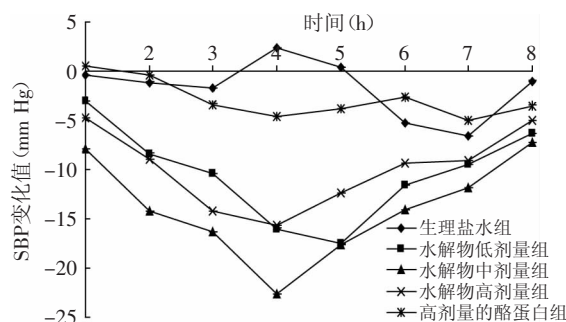


图2 单次灌胃酪蛋白双酶水解物对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.2 Antihypertensive effect of single administration of casein bi-enzymatically hydrolysates on the SBP of SHR

对照正常鼠的血压变化,由图3可知,正常鼠灌胃高剂量的酪蛋白复合蛋白酶水解物后,在0~8h内SBP无显著变化,酪蛋白复合蛋白酶水解物组与空白对照组相比无显著性差异($p > 0.05$),结果表明灌胃酪蛋白双酶水解产物对正常鼠的血压变化没有显著影响。

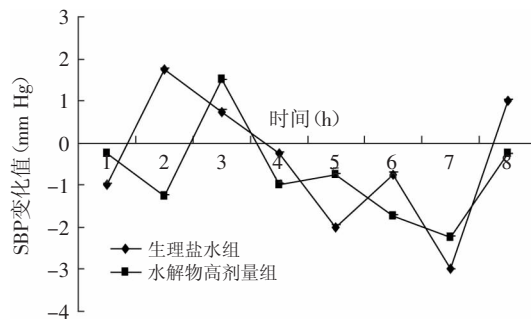


图3 单次灌胃酪蛋白双酶水解物对Wistar大鼠血压变化的影响

Fig.3 Antihypertensive effect of single administration of casein bi-enzymatically hydrolysates on the SBP of Wistar

2.4.2 单次灌胃超滤物对SHR和Wistar大鼠的影响

由图4可知,SHR在灌胃不同剂量的超滤物后,0~4h内收缩压(SBP)有明显降低,中剂量组在4h时达到最大降压值,下降了33.375mm Hg;4h后SBP开始逐渐上升,8h恢复原值。统计检验结果显示,低、中、高剂量

组与对照组相比 $p<0.05$,因此三个剂量的灌胃组与对照组均有显著性差异。

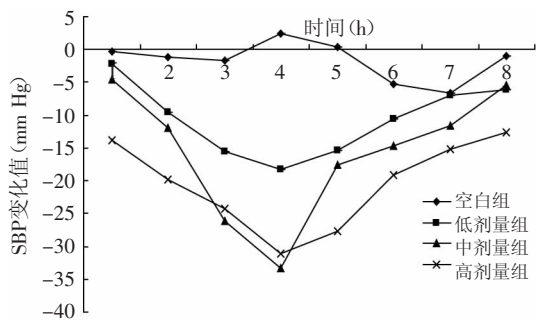


图4 单次灌胃水解物的超滤物对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.4 Antihypertensive effect of single administration of ultrafiltration products about hydrolysates on the SBP of SHR

由图5可知,正常鼠灌胃高剂量的超滤物后,在0~8h内SBP无显著变化。 T 检验结果也显示,灌胃超滤物与空白对照组相比无显著性差异($p>0.05$)。结果表明灌胃酪蛋白双酶水解物的超滤产物对正常鼠的血压变化没有显著影响。

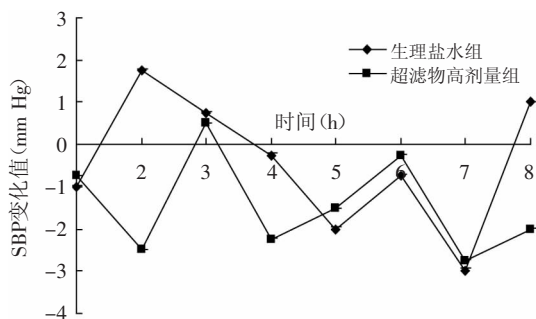


图5 单次灌胃水解物的超滤物对Wistar大鼠血压变化的影响

Fig.5 Antihypertensive effect of single administration of ultrafiltration products about hydrolysates on the SBP of Wistar

2.4.3 单次灌胃脱苦产物对SHR和Wistar大鼠的影响 由2.2和2.3可知,经风味酶法脱苦的正交实验中,试样9不仅苦味值和苦味的回味值较低,而且而且 IC_{50} 值与未经脱苦的双酶水解物相比也是最低的,因此这里选择试样9进行动物降压实验。

由图6可知,SHR在灌胃不同剂量的脱苦试样9后,中、高剂量组在0~4h内收缩压(SBP)有明显降低,

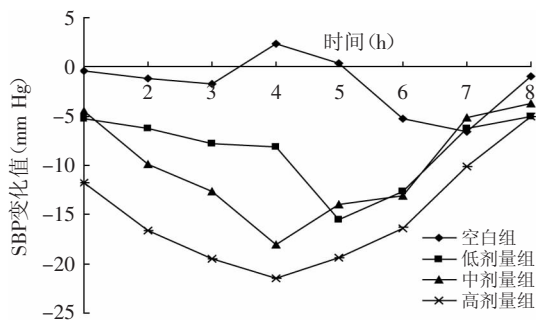


图6 单次灌胃脱苦试样9对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.6 Antihypertensive effect of single administration of debittering sample 9 on the SBP of SHR

并在4h时达到最大降压值,下降了19.375mm Hg,4h后SBP开始逐渐上升,8h恢复原值,而低剂量组是在5h达到最低后逐渐上升的。统计结果显示,低、中、高剂量组与对照组相比, $p<0.05$,因此三个剂量的灌胃组与对照组均有显著性差异。

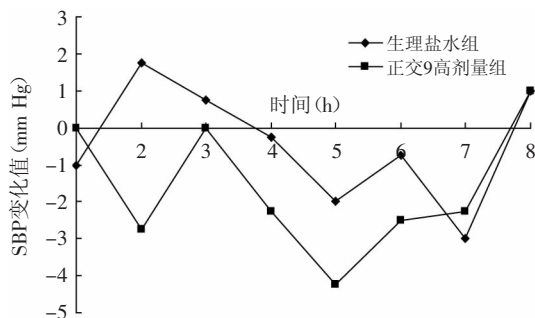


图7 单次灌胃脱苦试样9对Wistar大鼠血压变化的影响

Fig.7 Antihypertensive effect of single administration of debittering sample 9 on the SBP of Wistar

由图7可知,正常鼠灌胃高剂量的脱苦试样9后,在0~8h内SBP无显著变化。 T 检验结果也显示,灌胃高剂量的脱苦试样9与空白对照组相比无显著性差异($p>0.05$)。结果表明灌胃酪蛋白双酶水解物的脱苦试样9对正常鼠的血压变化没有显著影响。

2.4.4 单次灌胃脱苦试样9的超滤物对SHR和Wistar大鼠的影响 由图8可知,SHR在灌胃不同剂量的脱苦试样9的超滤物后,低、中剂量组在0~4h内收缩压(SBP)有明显降低,并在4h时达到最大降压值,最多下降了29.000mm Hg,4h后SBP开始逐渐上升,8h恢复原值,而高剂量组是在5h达到最低后逐渐上升的。统计结果显示,低、中和高剂量组与对照组相比, $p<0.05$,因此三个剂量的灌胃组与对照组均有显著性差异。

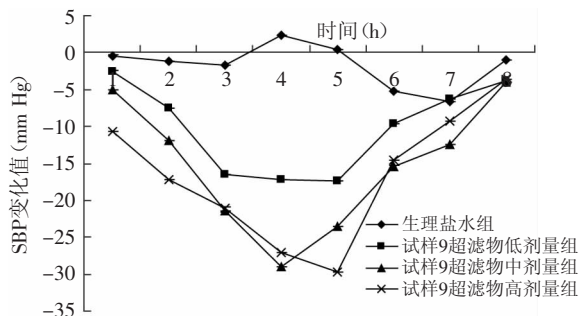


图8 单次灌胃脱苦试样9的超滤物对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.8 Antihypertensive effect of single administration of debittering sample 9 with ultrafiltration on the SBP of SHR

由图9可知,正常鼠灌胃高剂量的脱苦试样9的超滤物后,在0~8h内SBP无显著变化。 T 检验结果也显示,灌胃高剂量的脱苦试样9的超滤物与空白对照组相比无显著性差异($p>0.05$)。

2.5 连续灌胃酪蛋白水解产物的实验结果

2.5.1 连续灌胃酪蛋白双酶水解产物和超滤物对SHR大鼠的影响 降压肽效果如何,除了考察其是

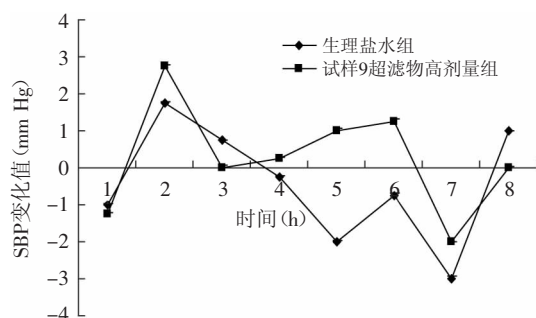


图9 单次灌胃脱苦试样9超滤物对Wistar大鼠血压变化的影响

Fig.9 Antihypertensive effect of single administration of debittering sample 9 with ultrafiltration on the SBP of Wistar

否能有显著的降压作用,还有一个重要的方面就是考察其降压的稳定性,因此在单次灌胃实验的基础上,根据2.4.1和2.4.2选用中剂量的酪蛋白双酶水解产物和超滤物进行了连续灌胃实验,考察其降压的稳定性。由图10可知,在第1次灌胃2h后血压有显著的降低,降幅达到12.875mm Hg和16.000mm Hg,在4h灌胃后测定血压分别降低了22.500、28.625mm Hg,然后进行第2次灌胃。

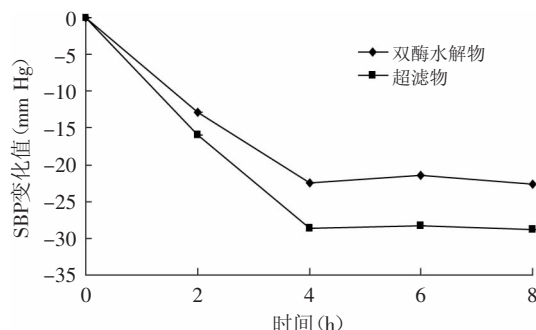


图10 连续灌胃酪蛋白双酶水解物及其超滤物对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.10 Antihypertensive effect of continuous administration of casein bi-enzymatically hydrolysates and its ultrafiltration products on the SBP of SHR

在第2次灌胃后2h和4h,即图10中的6h和8h时血压仍处于较低的水平,灌胃酪蛋白双酶水解物的分别比初始血压值降低了21.500mm Hg和22.625mm Hg,灌胃超滤物的分别比初始血压值降低了28.375mm Hg和28.875mm Hg。各测定点与初始点相比较有显著性的差异($p < 0.01$)。这表明每隔4h灌胃1次,可长时间的维持较低水平的血压值,酪蛋白双酶酶解产物具有很好的稳定性,这为转化成抗高血压功能性食品提供了有力的数据及理论支持。

2.5.2 连续灌胃试样9和试样9的超滤物对SHR大鼠的影响 由图11可知将中剂量的试样9及其超滤物分别用于灌胃SHR大鼠,在第1次灌胃2h后血压有显著的降低,降幅达到13.625、15.125mm Hg,在4h灌胃前测定血压为降低了17.875、26.125mm Hg,然后进行第2次灌胃。

第二次灌胃在6h和8h时血压仍处于较低的水

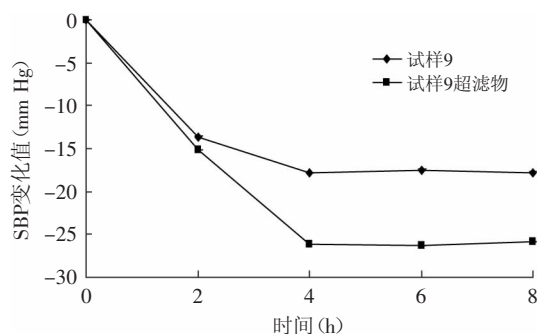


图11 连续灌胃脱苦试样9及其超滤物对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.11 Antihypertensive effect of continuous administration of debittering sample 9 and its ultrafiltration on the SBP of SHR

平,灌胃试样9分别比初始血压值降低了17.500mmHg和17.750mm Hg,灌胃试样9的超滤物分别比初始血压值降低了26.250mm Hg和25.875mm Hg。各测定点与初始点相比较有显著性的差异($p < 0.01$)。这表明酪蛋白双酶水解物的脱苦试样9及其超滤物具有很好的稳定性。

2.6 单次灌胃功能性酸奶对SHR大鼠的影响

2.6.1 正常发酵乳对SHR降压效果的影响 将发酵乳灌胃SHR大鼠后,从图12可以看出在0~8h内收缩压有明显降低($p < 0.05$),在3h降到最低下降了8.625mm Hg,这表明发酵对乳制品产生了影响使其产生了降压物质,这可能由于乳酸菌的胞外蛋白酶能限制性的水解乳蛋白质在发酵液中可得到一些活

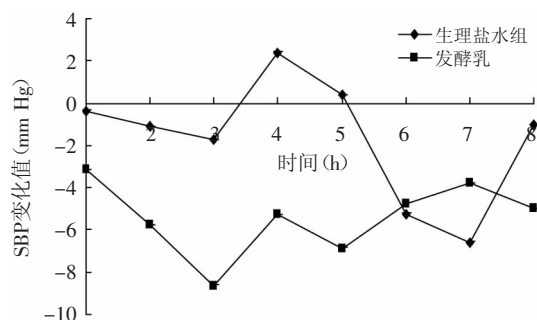


图12 单次灌胃普通发酵乳对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.12 Antihypertensive effect of single administration of ordinary fermented milk on the SBP of SHR

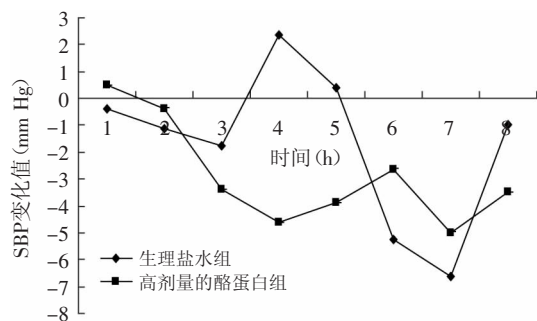


图13 单次灌胃正常发酵乳对Wistar大鼠血压变化的影响

Fig.13 Antihypertensive effect of single administration of ordinary fermented milk on the SBP of Wistar

性多肽^[21]。由图13可知,正常鼠灌胃发酵乳后,在0~8h内SBP无显著变化。*T*检验结果也显示,灌胃发酵乳与空白对照组相比无显著性差异($p>0.05$)。

2.6.2 单次灌胃加入超滤物、试样9、试样9超滤物的发酵乳对SHR大鼠的影响 由图14可知,SHR大鼠在灌胃加入中剂量的超滤物、试样9、试样9的超滤物发酵乳后,在0~8h内收缩压(SBP)有明显降低,分别在4、4.5h时达到最大降压值,最多下降了36.875、23.375、31.875mmHg,随后SBP开始上升逐渐恢复原值。

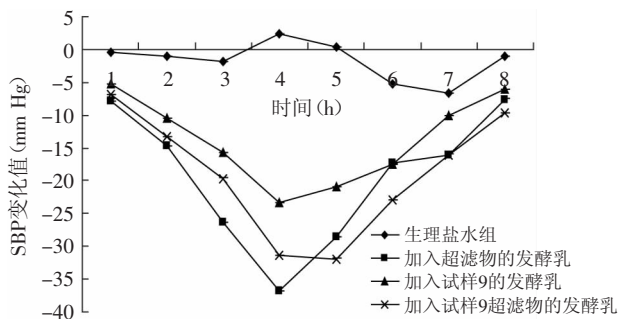


图14 单次灌胃功能性发酵乳对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.14 Antihypertensive effect of single administration of functional fermented milk on the SBP of SHR

2.7 连续灌胃功能性发酵乳对SHR大鼠的影响

由2.6.2可知加入超滤物和试样9的超滤物制成的功能性发酵乳的降压效果最为显著,故将两种功能性发酵乳对SHR大鼠进行连续灌胃,结果如图15所示。加入中剂量超滤物制成的功能性发酵乳灌胃SHR大鼠在第1次灌胃2h后血压有显著的降低,降幅达到16.375mmHg,在4h灌胃前测定血压为降低了35.375mmHg,然后进行第2次灌胃,在6h和8h时血压仍处于较低的水平,分别比初始血压值降低了32.250mmHg和33.250mmHg。各测定点与初始点相比较有显著性的差异($p<0.01$)。加入中剂量试样9超滤物制成的功能性发酵乳灌胃SHR大鼠在第1次灌胃2h后血压有显著的降低,降幅达到15.125mmHg,在4h灌胃前测定血压为降低了33.500mmHg,然后进行第2次灌胃,在6h和8h时血压仍处于较低的水平,分别比初始血压值降低了32.750mmHg和29.875mmHg。

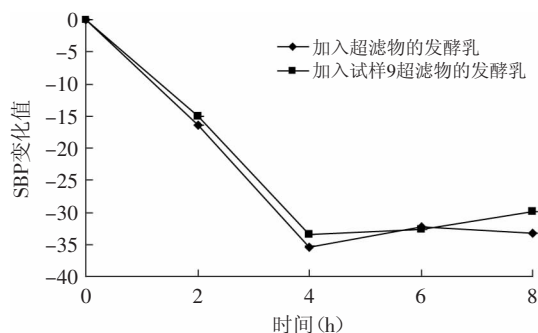


图15 连续灌胃加入超滤物的发酵乳对SHR大鼠血压变化的影响

Fig.15 Antihypertensive effect of continuous administration of functional fermented milk on the SBP of SHR

各测定点与初始点相比较有显著性的差异($p<0.01$)。

3 结论

实验利用酪蛋白为原料,模拟人体胃肠道环境选取胃蛋白酶和胰蛋白酶对其进行水解得到富含ACE抑制肽的水解物,由于得到的酪蛋白水解物是一个多肽混合体系,一般而言,生物活性肽的分子量小于6000ku^[22],故对其用6ku的中空纤维膜进行超滤使其中的ACE抑制肽得到富集,虽然酶法水解蛋白质可得到多种具有高ACE抑制活性的ACE抑制肽,但在水解的同时也会相应的有苦味肽的形成,这使得产品无法满足口感和嗜好的要求从而限制了短肽在食品工业领域的应用^[23-24]。

本研究采用风味酶法对双酶水解物进行脱苦,选择出对其ACE抑制活性影响最小的脱苦试样,并对其进行超滤得到脱苦试样的超滤物。将得到的四种物质分别灌胃SHR和Wistar大鼠进行抗高血压效果验证。结果表明四种物质灌胃SHR大鼠的最低降压幅度分别为22.630、33.375、19.375、29.000mmHg,而对正常的Wistar大鼠无降低血压作用,这表明所得的水溶性提取物对于正常血压不会有影响,其作用是有针对性的。两种超滤物质不仅灌胃剂量远远低于两种水解物,且降压效果高于这两种水解物,故选择两种超滤物制备功能性发酵乳灌胃SHR大鼠,制得的两种发酵乳都在4h达到最低值分别下降了36.875、31.875mmHg。且连续灌胃两种功能性发酵乳可以在8h内维持较低的血压。利用富含ACE抑制肽的酪蛋白水解物制备的功能性发酵乳在控制和治疗高血压方面有一定的效果,这为以后食源性降压食品的开发提供了一定的依据。

参考文献

- [1] 揭红波. 浅谈心血管疾病的发病机理与预防[J]. 中外医疗, 2011(5):184.
- [2] 陈绍行, 沈卫峰. 高血压治疗现状[J]. 国际心血管病杂志, 2006, 33(2):67-69.
- [3] CHOBANIAN A V, BAKRLS G L, BLACK H R, et al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure[J]. Hypertension, 2003, 42(2):1206-1252.
- [4] Guidelines Committee. European Society of Hypertension - European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension[J]. Hypertension, 2003, 21(6):1011-1053.
- [5] 中国高血压防治指南修订委员会. 2004年中国高血压防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(12):1060-1064.
- [6] 张元宏. 高血压病的药物治疗新进展[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(3):382-385.
- [7] 张源淑, 邹思湘. 酪蛋白源生物活性肽[J]. 国外畜牧科技, 1998, 25(4):33-36.
- [8] WU J P, DING X L. Characterization of inhibition and stability of soy-protein derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2002, 35(4):367-372.

(下转第356页)

- elevation of postprandial blood glucose in humans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(14): 5869-5874.
- [23] Nakagawa K, Kubota H, Kimura T, *et al.* Occurrence of orally administered mulberry 1-deoxynojirimycin in rat plasma[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8928-8933.
- [24] Wang L Q, Peng J M, Wang X, *et al.* Carboxymethyl cellulose sodium improves the pharmacodynamics of 1-deoxynojirimycin by changing its absorption characteristics and pharmacokinetics in rats[J]. Die Pharmazie, 2012, 67(2): 168-173.
- [25] Kim J Y, Kwon H J, Jung J Y, *et al.* Comparison of absorption of 1-deoxynojirimycin from mulberry water extract in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(11): 6666-6671.
- [26] Tsuduki T, Nakamura Y, Honma T, *et al.* Intake of 1-deoxynojirimycin suppresses lipid accumulation through activation of the β -oxidation system in rat liver[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57(22): 11024-11029.
- [27] Islam B, Khan S N, Haque I, *et al.* Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of streptococcus mutans biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(4): 751-757.
- [28] 李宏, 钱永华, 王建芳, 等. 桑叶中1-脱氧野尻霉素(DI)的气相法测定[J]. 北方蚕业, 2006, 37(3): 31-32.
- [29] 李继文, 郭晓燕, 王腾, 等. 荧光衍生化法测定不同季节桑叶中1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 462-464.
- [30] 马静, 万志平. 正交优化桑叶中1-脱氧野尻霉素酸水提取的工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 36-39.
- [31] 郑晓静, 伍金娥, 何计国, 等. 响应面法优化超声波提取桑叶中1-脱氧野尻霉素的工艺研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(9): 34-40.
- [32] 胡瑞君, 车振明, 徐丹, 等. 微波辅助提取桑叶生物碱DNJ的工艺研究[J]. 食品科技, 2007(8): 139-141.
- [33] 李有贵, 储一宁, 钟石, 等. 59份野生桑桑叶中的DNJ含量及粗提物对 α -糖苷酶的抑制活性[J]. 蚕业科学, 2010, 36(5): 729-737.
- [34] 李宇亮, 李剑敏, 吴雅睿. 1-脱氧野尻霉素提取分离方法研究[J]. 应用化工, 2006, 35(9): 559-561.
- [35] 周惠燕, 胡晓渝, 马英. 桑叶中1-脱氧野尻霉素的纯化及含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(5): 367-369.
- [36] Kimura T, Nakagawa K, Saito Y, *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, 52(6): 1415-1418.
- [37] Dai K J, Hou L B, Luo Q Z. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves by high-performance liquid chromatographic-tandem mass/mass spectrometry[J]. Zhong Yao Cai, 2009, 32(3): 375-377.
- [38] 张晓臣. 气相色谱法测定桑叶中1-脱氧野尻霉素含量的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [39] 汪孟夏. 毛细管柱气相色谱法测定桑叶中1-脱氧野尻霉素含量的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.

(上接第351页)

- [9] EIJI E. Resistance to gastrointestinal proteases of the short chain peptides has reductive effect in blood pressure[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 1996, 43(5): 520-525.
- [10] HAILESLASSIE S S, LEE B H, GIBBS B F. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese[J]. J Dairy Sci, 1999, 82: 1612-1617.
- [11] 林汝法, 陕方, 宋金翠, 等. 酶法水解苦荞麸皮蛋白生产降血压肽[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 207-209.
- [12] MATSUMOTO H, SHIMOKAWA Y, USHIDA Y, *et al.* New biological function of bovine α -lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65(5): 1104-1111.
- [13] MARUYAMA S, SUZUKI H. A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(5): 1393-1394.
- [14] 张艳, 胡志和, 闫星, 等. 胃蛋白酶水解酪蛋白制备ACE抑制肽的条件[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 42-46.
- [15] MIGUEL M, CONTETAS M M, RECIO I, *et al.* ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 211-214.
- [16] 赵骏, 宫霞, 郭本恒. 乳酪蛋白源ACE抑制肽的分离纯化[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(6): 8-11.
- [17] 田波, 霍贵成. 超滤法分离酪蛋白酶解物中的ACE抑制肽[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 59-61.
- [18] 申晓文, 牟光庆. 酪蛋白源ACE抑制肽的评价方法和研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 375-381.
- [19] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20: 1637-1648.
- [20] 张燕, 王红英, 胡艳君, 等. SHR大鼠血压尾套法测定影响因素探讨[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 34-42.
- [21] 王海燕, 张佳程. 食品降压肽的比较与评价方法[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 70-73.
- [22] XU Ruojun. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications[J]. Food Rev Int, 1998, 14(1): 1-9.
- [23] 何慧, 王进, 裴凡, 等. 蛋白质水解物与苦味的构效关系及脱苦研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 571-574.
- [24] 唐传核, 彭志英. 大豆蛋白水解物的苦肽以及脱除方法进展[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 167-172.