

# *Lactobacillus delbrueckii* QS306 对 牛乳蛋白质水解能力与 ACE 抑制活性的研究

双全, 吴青海, 苏日娜, 韩剑骄, 万月

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

**摘要:**通过研究 *Lactobacillus delbrueckii* QS306 在 10% 的还原脱脂牛乳中的生长特性, 探讨培养基中添加核酸关联物质时对蛋白质水解能力及其水解产物对血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性的影响。结果表明, 菌株 QS306 在 10% 的还原脱脂牛乳中生长缓慢, 产酸量和生物量逐渐上升, 在 37 °C 培养第 4 d 时, 滴定酸度和生物量分别达到 68.24 (°T) 和 6.91 (OD<sub>410 nm</sub> × 10), 蛋白质水解能力为 623.21 μg · mL<sup>-1</sup> Tyr。在培养基中添加核酸关联物质鸟嘌呤(Guanine)时蛋白质水解能力提高了 43.7%, ACE 抑制活性可达到 61.99%。

**关键词:**乳酸菌, 蛋白质水解能力, ACE 抑制活性

## Study on the proteolytic ability and ACE inhibitory activity of *Lactobacillus delbrueckii* QS306 to milk

SHUANG Quan, WU Qing-hai, SU Ri-na, HAN Jian-jiao, WAN Yue

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** The growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii* QS306 in reconstituted skim milk (10% wt/wt) was observed, and its proteolytic ability and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity were investigated by the addition of growth promoting substances. The results showed that *Lactobacillus delbrueckii* QS306 was slow-growing in skim milk, and its acid production and biomass were increased gradually. The titratable acidity, biomass and protein decomposition at 37 °C for 4 days were 68.24 (°T), 6.91 (OD<sub>410 nm</sub> × 10) and 623.21 μg · mL<sup>-1</sup> Tyr, respectively. The proteolytic ability of strain QS306 was increased by 43.7% and the (ACE) inhibitory activity was 61.99% when adding Guanine in skim milk.

**Key words:** *Lactobacillus*; proteolytic ability; ACE inhibitory activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0159-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.025

乳酸菌是一类能利用糖源产生大量乳酸的细菌统称<sup>[1]</sup>。目前广泛应用于食品加工和医药等与人类密切相关的领域。近年来, 研究发现一些发酵乳制品具有一定的降血压作用, 且这些降血压作用与发酵乳中的 ACE 抑制肽有关<sup>[2]</sup>。1982 年, Maruyama 等人第一次从酪蛋白的水解物中分离到了具有 ACE 抑制活性的小肽<sup>[3]</sup>。1995 年, Nakamura 等以 *Lactobacillus helveticus* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株作为发酵剂制成 Calpis 酸乳中分离出两个 ACE 抑制肽 IPP、VPP<sup>[4]</sup>。血管紧张素转化酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE)可以把无活性的血管紧张素 I 转化成能引起升压效应的血管紧张素 II, 同时可钝化具有舒张血管作用的激肽, 从而使机体的血压升

高<sup>[5]</sup>。因此, 通过抑制 ACE 活性, 减少血管紧张素 II 的生成来达到降低血压的效果。研究表明, 来自食物蛋白的 ACE 抑制肽(降血压肽)即降血压又无毒、无副作用, 安全可靠, 显示出良好的应用前景, 已成为目前研究的热点<sup>[6]</sup>。乳酸菌在发酵过程通过分泌的蛋白酶降解乳蛋白产生降血压或降血脂等活性肽类<sup>[7]</sup>, 但由于乳酸菌的蛋白水解能力相对较弱, 限制了活性肽类的产生能力。目前, 关于乳酸菌 ACE 抑制活性肽的开发研究较多<sup>[8-9]</sup>, 但关于乳酸菌蛋白水解能力的变化对 ACE 抑制活性的影响方面的相关研究较少。

本文选用产生 ACE 抑制肽的 *Lb. delbrueckii* QS306 作为研究对象, 在 10% 还原脱脂牛乳中的生

收稿日期: 2015-01-23

作者简介: 双全(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: shuangquan@imau.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(31460443)。

长特性、蛋白水解能力和 ACE 抑制活性进行研究,还探讨了该菌在添加核酸关联物时对蛋白质水解能力、ACE 抑制活性的影响。为今后开发和生产具有 ACE 抑制活性发酵乳制品提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

*Lb.delbrueckii* QS306 内蒙古农业大学食品科学与工程学院乳品实验室。

培养基:10% 还原脱脂牛乳培养基;MRS 液体培养基和 MRS 固体培养基(蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、酵母粉 5 g、磷酸氢二钾 2 g、柠檬酸钠 2 g、无水乙酸钠 5 g、无水葡萄糖 20 g、吐温-80 1 mL、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL)。

主要试剂:血管紧张素转化酶(ACE) 兔肺中提取,美国 Sigma 公司;马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL) 美国 Sigma 公司;酪蛋白,酪氨酸 北京 Coolaber 公司;乳清粉;OPA(邻苯二甲醛)试剂;脱脂牛乳粉(澳大利亚进口)。

SW-GJ-2D 超净工作台 苏州智净净化设备有限公司;超速冷冻离心机 TU1810 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;生化培养箱 上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌株 QS306 在脱脂牛乳中的生长情况 将活化 3 代的乳酸菌 QS306 按 2% (v/v) 接种到 10% 的灭菌(115 °C、10 min) 还原脱脂牛乳中,在 37 °C 培养至 7 d,在培养期间每天取样,测定其滴定酸度、生物量以及蛋白质水解能力。

1.2.1.1 滴定酸度的测定 参照 GB 5413.34-2010 《食品安全国家标准 乳和乳制品酸度的测定》方法测定。

1.2.1.2 生物量的测定 按照吕加平<sup>[10]</sup>的方法稍作改进,取菌株 QS306 发酵乳 0.5 mL 置于 10 mL 的离心管中,加入 4.5 mL 的 0.2% 的 EDTA-2Na 盐,震荡摇匀后,用 12 mol/L 的 NaOH 溶液调至 pH 为 12 左右,再次摇匀,在 410 nm 处测定其吸光度值(以未发酵的灭菌还原脱脂乳做为空白对照)。

1.2.1.3 蛋白水解能力的测定 参照 F.Minervini 等(2003)<sup>[11]</sup>的方法进行适当修改,发酵乳经预处理后,取 100 μL 的乳清,加入 2 mL 的 OPA 试剂,混匀后在室温下反应 10 min,在 340 nm 处测定其吸光值,将吸光度的差值( $\Delta OD_{340\text{nm}}$ )作为“OPA 指数”,表示乳酸菌水解乳蛋白时产生的游离氨基酸、寡肽含量,对应标准曲线的得出的是酪氨酸的量。用未接入该菌的灭菌脱脂牛乳作为空白对照。

酪氨酸标准曲线的绘制:将酪氨酸配制成不同浓度的标准溶液,分别取 100 μL 标准液置比色皿中,各加 2 mL OPA 试剂混匀,室温(21 ± 2) °C 反应 10 min 后,在 340 nm 处测定吸光值。

1.2.2 核酸关联物对菌株 QS306 蛋白质水解能力的影响 据报道,在脱脂牛乳培养基中添加氨基酸和核酸关联物质时可以促进乳酸杆菌的生长<sup>[12]</sup>。本文选择核酸关联物质:腺嘌呤(Adenine)、鸟嘌呤

(Guanine)、尿嘧啶(Uracil)和黄嘌呤(Xanthine),分别按 5 mg/100 mL(质量浓度)添加到 10% 的还原脱脂乳培养基中,接种 *Lb.delbrueckii* QS306 后,在 37 °C 条件下培养至 72 h,分别在 0、12、24、48、72 h 时采用 OPA 试剂法测定其游离氨基酸和寡肽含量。

1.2.3 不同类型蛋白对菌株 QS306 蛋白水解能力的影响 将活化后的菌株 QS306 按 2% (v/v) 接种量分别接种到蛋白质含量为 3% (质量分数) 的还原脱脂牛乳、还原乳清和酪蛋白溶液中,在 37 °C 条件下培养至 7 d,在此期间每天取 2 mL 样品,采用 OPA 试剂法测定其游离氨基酸和寡肽含量。

1.2.4 菌株 QS306 发酵乳 ACE 抑制活性的测定 测定方法参照 Blanca<sup>[13]</sup>等方法并根据实际情况稍做改动。

试料的制备:将菌株 QS306 按 2% (v/v) 接种于 10% 脱脂牛乳培养基中,37 °C 培养,每天取样 5 mL 发酵液经过 65~70 °C,30 min 杀菌,然后用乳酸或 NaOH 调 pH 至 4.6,12000 × g 离心 20 min,取上清液,再调 pH 至 8.3 后,再次 12000 × g 离心 20 min,取上清液作为试料备用(-4 °C 冷藏)。

基质的制备:将马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)溶于 0.1 mol/L 的硼酸缓冲液(含 300 mmol/L 的 NaCl)中,pH 为 8.3,充分溶解后分装备用(-20 °C 保藏)。

ACE 溶液的制备:将 1U 血管紧张素交换酶(ACE)固体用 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(含 300 mmol/L 的 NaCl)溶解,pH 为 8.3,配制成 0.1 U/mL<sup>-1</sup>,分装备用(-20 °C 保藏)。

ACE 抑制活性的测定方法:

将冷藏的试料、基质、ACE 溶液,置于 37 °C 恒温水槽中预热 30 min,恢复其活力后,在 2 mL 的 Ep 管中取基质 50 μL、试料 50 μL、ACE 溶液 25 μL,作为 Eb(样品);以蒸馏水 50 μL 代替试料 50 μL 作为 Ea(标准);在 Ea 上加入反应停止液(0.5 N HCl) 125 μL,作为 Ec(空白)。再将 Ea、Eb、Ec 同时放置 37 °C 恒温水槽中反应 1 h 后,在 Ea、Eb 上加入同量的反应停止液(0.5 N HCl) 125 μL,终止反应。各管中加入 1.2 mL 的乙酸乙酯抽出反应生成的马尿酸,震荡漩涡 15 s,1000 × g 离心 10 min,再移出 1 mL 的乙酸乙酯液,浓缩离心 20 min,再加入 1 mL 的蒸馏水放置 15 min,充分溶解后,在 228 nm 处测定吸光值。(计算公式:ACE 抑制率(%) =  $(Ea - Eb) / (Ea - Ec) \times 100\%$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的绘制

本实验通过酪氨酸不同浓度的标准液作为比较,测定发酵乳中游离氨基酸、寡肽的量来衡量乳中蛋白被水解的能力。结果如图 1 所示。

### 2.2 *Lb.delbrueckii* QS306 在 10% 还原脱脂牛乳中生长特性

菌株 QS306 在 10% 还原脱脂牛乳中生长特性。结果如图 2 所示。

由图 2 可知,*Lb.delbrueckii* QS306 在还原脱脂牛乳中培养初期蛋白水解能力随着发酵时间的延长而

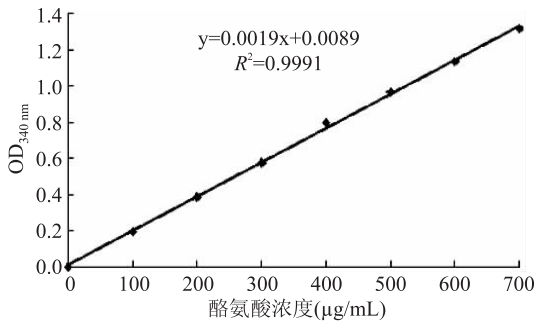


图1 酪氨酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of tyrosine

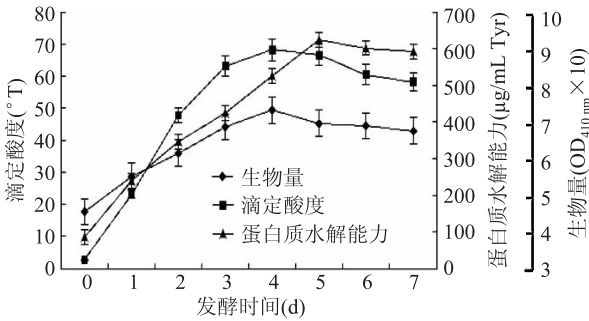


图2 *Lb.delbrueckii* QS306 在脱脂牛乳中的生长特性

Fig.2 The growth characteristics of *Lb.delbrueckii* QS306 in skim milk

逐渐增强,在第5 d 时蛋白质水解能力达到最高值的  $623.21 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Tyr。在发酵过程中,乳酸菌的蛋白质水解系统较弱,但是胞外蛋白酶能够限制性的水解乳蛋白,并将水解的游离氨基酸和寡肽释放到发酵培养基中<sup>[14]</sup>。滴定酸度和生物量随发酵时间缓慢上升,在发酵第4 d 达到最高,分别为  $68.24 (^{\circ}\text{T})$  和  $6.91 (\text{OD}_{410 \text{ nm}} \times 10)$ 。表明,*Lb.delbrueckii* QS306 在还原脱脂牛乳中生长缓慢。发酵第4 d 后,产酸能力、生物量均呈下降趋势,说明菌株代谢产物反过来开始影响其生长能力。

### 2.3 核酸关联物对 *Lb.delbrueckii* QS306 蛋白质水解活性的影响

菌株 QS306 的还原脱脂牛乳培养基中,分别添加腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、黄嘌呤4种核酸关联物质后,测定其各个培养基中生成的游离氨基酸、寡肽类物质的含量变化。结果如图3所示。

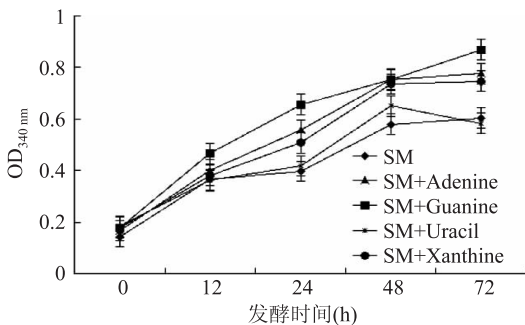


图3 蛋白质水解能力的变化

Fig.3 The changes of protein decomposition

从图3可知,在培养基中添加腺嘌呤、鸟嘌呤、

尿嘧啶、黄嘌呤4种核酸关联物时,除了尿嘧啶以外其余核酸关联物质对菌株 QS306 的蛋白质水解能力具有一定的促进作用,其中鸟嘌呤的促进作用最为明显,在培养72 h 时的 OD 值可以达到 0.868 ( $\text{OD}_{340 \text{ nm}}$ ),比对照组的 OD 值 0.604 ( $\text{OD}_{340 \text{ nm}}$ ) 提高了 43.7%。据报道,乳酸菌可利用无机氮源合成氨基酸能力非常弱,主要依赖于菌体的蛋白水解酶来水解底物蛋白,释放更多的寡肽和游离的氨基酸以满足自身生长的需要<sup>[15]</sup>。因此,部分核酸关联物质可作为菌株 QS306 的促长因子,促进生长的同时提高蛋白水解酶活力,产生更多的游离氨基酸、寡肽。

### 2.4 菌株 QS306 对不同类型蛋白质的水解能力

将 QS306 菌株按 2% (v/v) 接种量分别接种到脱脂牛乳、还原乳清和酪蛋白溶液中,在 37 °C 条件下培养时的蛋白水解能力。结果见图4所示。

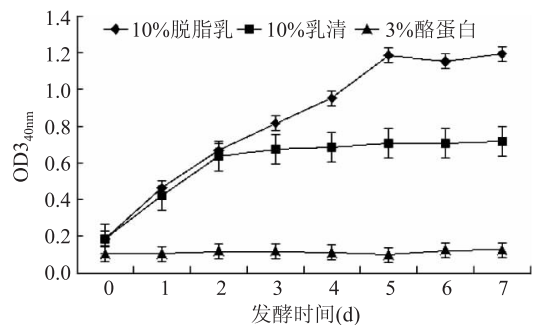


图4 菌株 QS306 对不同类型蛋白质的分解能力

Fig.4 Protein decomposition of strain QS306 to different types

由图4可知,菌株 QS306 对还原脱脂牛乳和乳清粉来源的蛋白质进行水解生成游离氨基酸和寡肽,而且在还原脱脂乳中的游离氨基酸和寡肽含量随着培养时间一直上升,第5 d 达到最高值 1.193 ( $\text{OD}_{340 \text{ nm}}$ ),之后进入稳定期。在还原乳清中,游离氨基酸和寡肽在培养前2 d 呈现上升趋势,第2 d 时的含量达到了 0.720 ( $\text{OD}_{340 \text{ nm}}$ ),之后含量进入稳定期,这是可能由于乳清中能够水解为游离氨基酸和寡肽的蛋白含量有限所致<sup>[16]</sup>。在酪蛋白溶液中,由于酪蛋白在提取过程中易变性,乳酸菌无法对其进行分解产生游离氨基酸和寡肽,因此在培养过程中酪蛋白没有明显变化。

### 2.5 菌株 QS306 的蛋白水解能力与其 ACE 抑制活性的关系

菌株 QS306 的蛋白水解能力与 ACE 抑制活性的关系。结果见图5所示。

由图5可知,随着发酵时间的延长,菌株 QS306 的蛋白水解能力和 ACE 抑制活性均逐渐上升,在发酵第5 d 时,蛋白水解能力和 ACE 抑制活性都达到了最高值,分别是  $647.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Tyr 和 61.93%。之后 ACE 抑制活性和蛋白质水解能力都有所下降。表明菌株 QS306 蛋白水解后所产生的游离氨基酸和寡肽中含有具有 ACE 抑制活性物质,并且其 ACE 抑制活性与水解产生的游离氨基酸和寡肽的含量成正相关,随着蛋白分解能力的增加,ACE



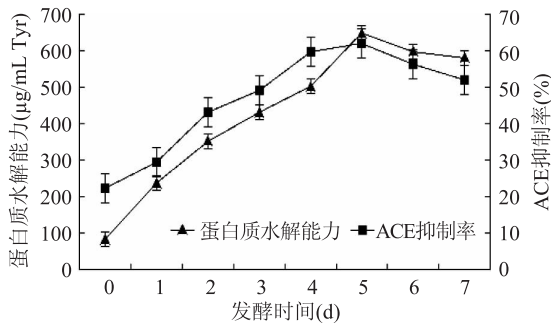


图5 菌株 QS306 的蛋白水解能力与 ACE 抑制活性的关系

Fig.5 The relationship of Protein decomposition and ACE inhibitory activity of QS306

抑制活性物质的含量也增加,使 ACE 抑制活性增强。

### 3 结论

3.1 *Lb.delbrueckii* QS306 在 10% 的还原脱脂牛乳中生长比较缓慢,产酸量和生物量逐渐上升,在 37 °C 培养第 4 d 时,滴定酸度和生物量分别达到 68.24(°T) 和 6.91( $OD_{410\text{nm}} \times 10$ ),此时的蛋白质水解能也达到了最大值  $623.21 \mu\text{g mL}^{-1}\text{Tyr}$ 。

3.2 核酸关联物质对 *Lb.delbrueckii* QS306 的蛋白质分解能力有一定的促进作用,其中添加鸟嘌呤(Guanine)时蛋白质水解能力提高了 43.7%。

3.3 随着发酵时间的延长,菌株 QS306 的蛋白水解能力和 ACE 抑制活性均逐渐上升,蛋白水解能力达到最高值  $647.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}\text{Tyr}$  时,ACE 抑制活性可达 61.93%。发酵第 5 d 之后蛋白质水解能力和 ACE 抑制活性都有下降现象。表明,菌株 QS306 蛋白水解后所产生的游离氨基酸和寡肽中含有具有 ACE 抑制活性物质,并且其 ACE 抑制活性与水解产生的游离氨基酸和寡肽的含量呈正相关。

### 参考文献

[1] 杨洁彬,郭兴华,傅晓丽,等.乳酸菌-生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社.1996:1-83.  
 [2] 李平兰.乳酸菌细菌素研究进展[J].微生物学通报,1998,5:295-299.  
 [3] Maruyama S, Suzuki H, A peptide inhibitor of angiotensin I

converting enzyme in the tryptichydrolysate of casein [ J ]. Agricultural Biological Chemistry, 1982, 46(5) : 1393-1394.

[4] Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, et al. Purification and Characterization of Angiotensin I—Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk [ J ]. J Dairy Science, 1995, 78: 777-783.

[5] Johnston J I, Franz V L. Renin—angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control [ J ]. J Hypertens, 1992, 10(S) : 13-26.

[6] 王朝晖,程龙献,王祥,等.卡托普利注射液对高血压急症的降压作用[J].临床心血管病杂志,1998,14(4) : 215-216.

[7] Hans M. Overview on milk protein—derived peptides [ J ]. Internat Dairy, 1998, 8(5) : 363-373.

[8] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats [ J ]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4) : 776-778.

[9] Mgobbetti, Ferranti P, Smacchi E. Production of angiotensin-I—converting—enzyme—inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9) : 3898-3904.

[10] 吕加平,董晓波,肖锐.发酵乳品中乳酸菌生物量测定方法的研究[J].肉品卫生,1997,(2) : 3-7.

[11] Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, et al. Angiotensin I—Converting Enzyme Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteins Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species [ J ]. American Society for Microbiology, 2003, 69: 5297-5305.

[12] 中島昭正.脱脂乳へのアミノ酸添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果日本家政學會誌 47(11) : 2007, 1085-1091.

[13] Hernández—Ledesma B, Miralles B, Amigo L, et al. Identification of antioxidant and ACE—inhibitory peptides in fermented milk [ J ]. J Food Agric Sci, 2005, 85: 1041-1048.

[14] Michaelidou A, Alichanidis E. Isolation and Identification of some major water—soluble peptides in feta cheese [ J ]. J Dairy Sci, 2011, 81: 3109-3116.

[15] 中島昭正.脱脂乳への核酸関連物質の添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果.日本家政學會誌 48(1) : 2008, 11-18.

[16] 商靚靚,陈卫,田丰伟,等.具有血管紧张素转换酶抑制活性的乳酸菌筛选及特性研究[J].中国乳品工业,2006,34(4) : 24-28.

(上接第 158 页)

715-721.

[13] SN/T 3924-2014, 出口贝类中大肠菌群、粪大肠菌群检测方法[S].

[14] SN/T 1194-2014, 植物及其产品转基因成分检测[S].

[15] Blackstone G M, Noalmsxn J L, Viekerly M C, et al. Detection

of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real—time PCR [ J ]. Microbiol Methods, 2003, 53(2) : 149-155.

[16] 蔡潭溪,蒋鲁岩,黄克,等.基于 Taq Man 探针的 Real—time PCR 技术定量检测副溶血弧菌[J].微生物学报,2005,45(4) : 638-642.