

食物源 ACE 抑制肽的生产及构效关系研究进展

王灵芝, 张燕玲, 王元明, 乔延江*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘 要: 生物活性肽是蛋白质中隐藏着的可在体内发挥一定生理功能的活性肽段。目前已从食物蛋白中获得了具有免疫调节、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、抗血栓形成、抗高血压等功能的多肽, 其中血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽是研究热点之一。ACE 通过产生具有升压作用的血管紧张素和降解扩张血管的舒缓激肽在调节血压中发挥着重要作用。ACE 抑制肽可通过消化道水解、发酵和熟化过程、体外酶解和遗传重组方法而获得, 并可作为功能因子添加到功能食品中, 相关产品已上市或研发中。本文对 ACE 抑制肽的生产及其构效关系研究进展等进行综述。

关键词: 生物活性肽; 血管紧张素转化酶(ACE); 高血压

A Review of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides Derived from Foods: Production and Quantitative Structure-Activity Relationship

WANG Ling-zhi, ZHANG Yan-ling, WANG Yuan-ming, QIAO Yan-jiang*

(School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Bioactive peptides are peptides with physiological functions in the body, such as immunomodulatory, antimicrobial, anticancer, antiviral, antithrombotic and antihypertension functions. Currently, peptides from foods with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity are the focus of intense study. ACE plays a vital role in the regulation of blood pressure by producing potent vasoconstrictor angiotensin II, as well as by inactivating the vasodilating bradykinin. ACE inhibitory peptides have widely been produced by gastrointestinal digestion, fermentation and maturation process, enzymatic hydrolysis and genetic recombination. These inhibitory peptides may be incorporated into functional foods and several products are currently commercially available or under development. This paper presents an overview of antihypertensive peptides derived from food protein.

Key words: bioactive peptides; angiotensin converting enzyme (ACE); hypertension

中图分类号: Q514.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0314-04

食物不仅在生长和维持机体时提供所必需的能量和物质基础, 而且与人体健康息息相关。近年来功能食品蓬勃兴起, 所谓功能食品是指通过提高机体健康状态或者降低患病风险而有益健康的食品, 它有别于药物, 是正常食物摄入的一部分^[1]。食物蛋白经消化后可获得有益健康的生物活性成分, 因此, 生物活性肽逐渐引起人们关注。这些活性肽由 2~50 个氨基酸组成, 在食物蛋白中没有活性, 经体外酶水解或消化道酶水解后被释放出来, 发挥着不同的生理调节功能。同时, 传统的蛋白质消化、吸收理论暴露出一定的局限性, 寡肽吸收理论逐渐被大众接受, 与游离氨基酸相比, 寡肽吸收具有更快更高的速率和效率^[2]。这些生物肽具有多

种生物学活性, 如抗氧化、抗血栓形成、抗高血压、免疫调节、抗肿瘤、促进矿物质元素吸收、阿片样肽等^[3-4]。近 10 年来这些降低慢性疾病危害、提高天然免疫力并存在于食品蛋白中的生物肽引起了学术界和商业界的极大兴趣。

高血压是危害人类健康的常见疾病之一, 是心血管疾病的重要独立危险因素。针对其高发性和危害性, 改变生活方式、调整饮食结构和药物治疗是广泛被接受的治疗手段, 其中营养因素在预防、治疗高血压中发挥着不可忽视的作用, 因此, 研发具有降压作用的功能食品是科研工作者努力方向之一。血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1)在

收稿日期: 2011-10-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102750)

作者简介: 王灵芝(1974—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为生物制药。E-mail: yanyan30186@sina.com.cn

* 通信作者: 乔延江(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为中药信息工程、中药信息开发。E-mail: yjqiao@263.net

血压调节中发挥着重要作用,首先可作用于肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin system, RAS),将十肽的血管紧张素裂解成具有收缩血管作用的血管紧张素,同时能够促进醛固酮分泌,导致水钠滞留,血压升高。其次,作用于激肽释放酶-激肽系统(kallikrein kinin system, KKS)系统,使具有血管舒张作用的舒缓激肽转变为没有活力的缓释肽,导致血压进一步升高。动物和临床实验表明,生物活性肽通过抑制该酶活性产生了明显的降压效果。1979年, Oshima等^[5]首次利用细菌胶原酶水解明胶获得了6种活性较强的ACE抑制肽,此后从其他食品蛋白中分离的降血压肽相继出现,目前已从乳源蛋白质^[4,6]、海洋生物^[7-8]、蛋黄^[9]、油菜籽^[10]、鹰嘴豆^[11]、荞麦粉^[12]、高粱^[13]、小麦^[14]、玉米^[15-16]中获得了食源性的ACE抑制肽。这些食品源降压肽的降压效果虽没有临床药物好,但其副作用小,因而备受关注^[17]。本文就近年来ACE抑制肽的生产加工、构效关系、作用机制等研究热点进行综述。

1 ACE抑制肽的制备

国内外生产生物活性肽常用的方法主要有酶解法、微生物发酵法、重组DNA法、化学合成法、酶合成法等^[18-20]。

1.1 胃肠消化

膳食蛋白质和多肽被摄取后,在胃肠道中被各种酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、肽酶水解后,释放不同长度的肽段。一部分肽可调节消化道酶活性、肠上皮细胞分泌炎性细胞因子、促进钙离子吸收等方面直接发挥作用,其他肽则被吸收后经体循环到达靶器官或者组织而行使功能^[21]。为深入了解消化道蛋白酶对膳食蛋白作用后产生ACE抑制肽的情况,可模拟胃肠道生理作用的条件对各种蛋白用消化酶进行处理。Jiménez-Escrig等^[22]利用胃蛋白酶和胰蛋白酶水解豆渣蛋白,获得了ACE抑制肽和抗氧化肽。食品处理和加工方式可促进蛋白的消化和多肽释放。高流体静压(200~400MPa)可加速胃蛋白酶水解卵清蛋白速率和提高血压肽YAEERYPIL、FRADHPFL和RADHPFL的产量^[23]。与煮鸡蛋相比煎蛋消化物表现出较高的ACE抑制活性,推测可能由于沸水加工过程使蛋白质变性程度较低,从而导致蛋白消化程度相对较低^[24]。

1.2 发酵和熟化过程

微生物在生产发酵乳制品过程中会产生生物活性肽。文献报道*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*、*Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*等多种菌可水解乳蛋白并释放出ACE抑制肽,部分生物活性肽可使自发性高血压大鼠(systolic

blood pressure, SHR)收缩压降低7.1~29.3mmHg,脱脂乳经发酵后可使中度高血压患者血压下降4.6~14.1mmHg^[25]。研究较为清楚、已经进入商业化生产的降压肽有VPP和IPP,如日本的Calpis公司生产的Ameal BP Peptide和芬兰Valio公司生产的Valio Evolus Double Effects。

Pihlanto等^[26]比较了牛乳经25株乳酸菌发酵后ACE体外活性,发现不同菌种间存在着差异,且与水解度存在相关性;同时采用RP-HPLC、MS和氨基酸测序方法获得了*Lactobacillus jensenii*发酵产物中两个ACE活性肽,即LVYFPFGPIHNSLPQN和LVYFPFGPIH。牛乳经*Enterococcus faecalis*发酵后可产生多种ACE抑制肽,其中五肽LHLPLP和十九肽LVYFPFGPIPNLSLPQNIPP的IC₅₀值分别为5.5、5.2μmol/L^[27]。在发酵过程中钙离子浓度变化对ACE活性存在一定影响^[28]。

在干酪成熟过程中,多数乳蛋白在内源性蛋白酶、凝固剂和微生物酶的作用下被降解成大量的多肽。在干酪制作过程中尤其是熟处理会产生大量的ACE抑制肽,目前,已经从Gouda等多种奶酪中获得了氨基酸结构明确的降压肽^[29]。Bütikofer等^[30]于2007年采用液质联用方法测定了44种传统奶酪制品中降压三肽VPP和IPP的含量分别在0~224mg/kg和0~95mg/kg之间,且奶酪水提物降压活性与三肽含量存在相关性;但是品种间、同一品种不同样品间三肽含量差异较大,因此应当采用高重复性的制备工艺以提高降压肽含量。

东方传统的大豆发酵食品是ACE降压肽的另外一个重要来源。我国传统调味品豆豉(埃及曲霉*Aspergillus egyptiacus*发酵)富含ACE抑制肽,发酵48h的豆豉曲及经胃蛋白酶单酶解、胃蛋白酶和胰蛋白酶双酶解、水豆豉的IC₅₀值分别为5.09、0.16、0.057、4.54mg/mL^[31]。韩国传统大豆发酵食品Doenjang、Cheonggukjang、Kochujang等含有大量的生物肽,其中分子量小于3kD的ACE抑制肽的IC₅₀值为0.5mg/mL,500~999D的IC₅₀值为0.094mg/mL^[32]。

1.3 酶解法

酶解法是目前研究的最多的一种方法。有大量研究报道利用消化道源蛋白酶如:胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶等获得各种功能生物肽。用胃蛋白酶水解牡蛎蛋白,然后采用Sephadex LH-20凝胶层析和RP-HPLC方法分离得到了一种降压活性较好的九肽^[33]。Contreras等^[34]用胃蛋白酶等水解酪蛋白,获得具有体内外降压活性的生物活性肽RYLGY和AYFYPEL。与此同时,微生物和真菌来源的蛋白水解酶也可用来水解各种蛋白以制备生物活性肽,这些商业化生产的蛋白酶因其价格低、安全性好和产量高而倍受关注。Ueno等^[35]从瑞士乳杆菌*Lactobacillus helveticus* CM4中分离和纯化到可产生降

压肽的内切酶,该酶在底物的C端处理中发挥重要作用。采用9种不同的商业化蛋白酶水解酪蛋白以获得ACE抑制肽,发现曲霉属 *Aspergillus oryzae* 来源的蛋白酶可高效释放降压三肽VPP和IPP^[36]。

近年来,采用高压、热变性和功率超声等技术改变蛋白结构以提高蛋白水解效率是另一研究热点。与常压条件下相比,高压状态(400MPa)胰蛋白酶水解蛋白发生了质和量的变化,其中疏水性肽增加^[37]。Henández-Ledesma等^[38]用嗜热菌蛋白酶水解乳球蛋白发现,水解温度60~80与37和50相比,会产生新的生物活性肽LDA、LKPTPEGD和LQKW,其中四肽LQKW据文献报道具有降压活性。研究表明长时间高密度超声产生的·OH和剪切力可降低α-淀粉酶活性,但是短暂的超声处理可促进酶解。Jia Junqiang等^[39]用碱性蛋白酶水解小麦胚蛋白制备ACE降压肽,发现用超声波处理的样品与常规处理相比,其结合常数 K_A 增加22.2%,米氏常数(K_m)降低了13.0%,且ACE抑制活力增加21.0%~40.7%。

1.4 遗传重组

基因工程技术的发展为降压肽的开发利用带来了新的契机。Liu Dong等^[40]将降压肽KVLVPV连接成六拷贝的串联多肽,并利用基因工程手段克隆到大肠杆菌融合表达载体上,构建了重组降血压肽基因工程菌,表达的融合蛋白GST-ACEIP经蛋白酶消化后获得了体内活性较高的重组降压肽。由于释放目标肽段时需要添加额外蛋白酶,因而增加了分离和纯化的成本。Rao Shengqi等^[41]成功表达了包含11种降压肽的融合蛋白,经消化道酶消化后,多肽ACE抑制率达85%以上。

2 定量构效关系

近来,人工神经网络和QSAR建模方法被用于基于结构-活性数据构建统计计算机模型,已识别出了影响食物源ACE抑制肽效能的部分结构特征。许多描述符已经被公认为QSAR模型中的关键变量,如分子质量、分子形状、疏水性电荷和静电特征^[42]。大多数ACE抑制肽序列较短,一般为2~12个氨基酸;这与Natesh等^[43]的结果一致,他们的晶体学研究证明ACE的活性位点不能容纳大的多肽分子。构效关系研究表明,C末端三肽残基在竞争性结合ACE活性位点中起关键作用。大多数有效的ACE抑制肽在C-端包含Tyr、Phe、Trp,以及可能含有Pro,而且Leu可能对增加多肽的ACE抑制潜力具有显著作用。此外,其他支链脂肪族氨基酸在高抑制肽活性中占有主要地位,如Ile和Val。带正电荷的Lys(ε-氨基)和Arg(胍基)作为C末端有助提高抑制活性。ACE抑制肽有不同于非活性肽的特征结构,如在C-末端有相似的正电位,在离C末端3个氨基酸位置上需要L-构型氨基酸等。此外,ACE抑制肽C端Pro的cis-trans构象的变化可能引起与酶相互作用的显著变化。

3 结 语

在目前所发现的各种具有生物活性的多肽之中,具有抗高血压活性的多肽备受关注,其抗高血压的活性在包括体外实验、动物模型和人体实验中被检测过,并且被添加于各种不同的食品中。然而,相互矛盾的临床实验结果和不同的健康法规使得这一领域的研究显得更加迫切。此前的各类研究都证实了这类多肽的稳定性、可吸收性及其在生物体内的活性形态。随着分析技术的发展,已经能够在模型生物或者人体内的复杂基质或者生物体液中追踪微量多肽及其衍生物并进行动力学分析。同样,随着营养基因组学和营养遗传学等新学科的发展,将能够通过识别新的更加复杂的生物标记来研究生物体内的生物活性物质。

参考文献:

- [1] MURRAY B A, FITZGERALD R J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(8): 773-791.
- [2] ROBERS P R, BURNEY J D, BLACK K W, et al. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract[J]. *Digestion*, 1999, 60(4): 332-337.
- [3] MEISEL H, FITZGERALD R J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects[J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(16): 1289-1295.
- [4] LÓPEZ-FANDIÑO R, OTTE J, van CAMP J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity[J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(11): 1277-1293.
- [5] OSHIMA G, SHIMABUKURO H, NAQASAWA K. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1979, 566(1): 128-137.
- [6] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, RECIO I, AMIGO L. α-Lactoglobulin as source of bioactive peptides[J]. *Amino Acids*, 2008, 35: 257-265.
- [7] BYUN H G, KIM S K. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin[J]. *Process Biochem*, 2001, 36(12): 1155-1162.
- [8] HE Hailun, CHEN Xiulan, WU Hao, et al. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis[J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(18): 3499-3505.
- [9] YOSHII H, TACHI N, OHBA R, et al. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 128(1): 27-33.
- [10] MARCZAK E D, USUI H, FUJITA H, et al. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed[J]. *Peptides*, 2003, 24: 791-798.
- [11] YUST M M, PEDROCHE J, GIRÓN-CALLE J, et al. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase[J]. *Food Chem*, 2003, 81(3): 363-369.
- [12] AOYAGI Y. An angiotensin-converting enzyme inhibitor from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour[J]. *Phytochemistry*, 2006,

- 67(6): 618-621.
- [13] KAMATH V, NIKETH S, CHANDRASHEKAR A, et al. Chymotryptic hydrolysates of α -kafirin, the storage protein of sorghum (*Sorghum bicolor*) exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity[J]. Food Chem, 2007, 100(1): 306-311.
- [14] MATSUI T, LI C, OSAJIMA. Preparation and characterization novel bioactive peptides responsible for aniotensin α -converting enzyme inhibition from wheat germ[J]. J Cereal Sci, 1999, 5(7): 289-297.
- [15] MARUYAMA S, MIYOSHI S, KANEKO T, et al. Angiotensin α -converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the Tandem repeated sequence of a maize endosperm protein[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(4): 1077-1081.
- [16] KIM J M, WHANG J H, KIM K M, et al. Preparation of corn gluten hydrolysate with angiotensin α -converting enzyme inhibitory activity and its solubility and moisture sorption[J]. Process Biochem, 2004, 39(8): 989-994.
- [17] CHEN Qihe, XUAN Guodong, FU Mingliang, et al. Effect of angiotensin α -converting enzyme inhibitory peptide from rice dregs protein on antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(Suppl 1): 281-285.
- [18] GILL I, LÓPEZ-FANDIÑO R, JORBA X, et al. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production[J]. Enzyme Microb Technol, 1996, 18(3): 162-183.
- [19] 李卫, 李斌, 宁正祥. 应用生物技术生产活性肽[J]. 粮油食品科技, 2005, 13(4): 50-52.
- [20] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, CONTRERAS M M, RECIO I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2011, 165(1): 23-35.
- [21] SHIMIZU M. Food-derived peptides and intestinal functions[J]. Biofactors, 2004, 21(1/4): 43-47.
- [22] JIMÉNEZ-ESCRIG A, ALAIZ M, VIOQUE J, et al. Health promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by *in vitro* gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxigenase[J]. Eur Food Res Technol, 2010, 230(4): 655-633.
- [23] QUIRÓS A, CHICHÓN R, RECIO I, et al. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin[J]. Food Chem, 2007, 104(4): 1734-1739.
- [24] MAJUMDER K, WU J. Angiotensin α -converting enzyme inhibitory peptides from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of cooked eggs[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(2): 471-477.
- [25] FITZGERALD R J, MURRAY B B A. Bioactive peptides and lactic fermentations[J]. Int J Dairy Technol, 2006, 59(2): 118-125.
- [26] PIHLANTO A, VIRTANEN T, KORHONEN H. Angiotensin α -converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk[J]. Int Dairy J, 2010, 20(1): 3-10.
- [27] QUIRÓS A, RAMOS M, MUGUERZA B, et al. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*[J]. Int Dairy J, 2007, 17(1): 33-41.
- [28] GONZALEZ-GONZALEZ C R, TUOHY K M, JAUREGI P. Production of angiotensin- α -converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: effects of calcium, pH and peptides on ACE- inhibitory activity[J]. Int Dairy J, 2011, 21(9): 615-622.
- [29] SAITO T, NAKAMURA T, KITAZAWA H, et al. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese[J]. J Dairy Sci, 2000, 83(7): 1434-1440.
- [30] BÜTIKOFER U, MEYER J, SIEBBER R, et al. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses[J]. Int Dairy J, 2007, 17(8): 968-975.
- [31] ZHANG Jianhua, TATSUMI E, DING Changhe, et al. Angiotensin α -converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product[J]. Food Chem, 2006, 98(3): 551-557.
- [32] KIM J E, HWANG K, LEE S P. ACE inhibitory and hydrolytic enzyme activities in textured vegetable protein in relation to the solid state fermentation period using *Bacillus subtilis* HA[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(2): 487-495.
- [33] WANG Jiabei, HU Jianen, CUI Jinzhe, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chem, 2008, 111(2): 302-308.
- [34] CONTRERAS M M, CARRÓN R, MONTERO M J, et al. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity[J]. Int Dairy J, 2009, 19(10): 566-573.
- [35] UENO K, MIZUNO S, YAMANOTO N. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4[J]. Lett Appl Microbiol, 2004, 39(4): 313-318.
- [36] MIZUNO S, NISHIMURA S, MATSUURA K, et al. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease[J]. J Dairy Sci, 2004, 87(10): 3183-3188.
- [37] CHICÓN R, LÓPEZ-FANDIÑO R, QUIRÓS A, et al. Changes in chymotrypsin hydrolysis of α -lactoglobulin A induced by high hydrostatic pressure[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(6): 2333-2341.
- [38] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, RAMOS M, RECIO I, et al. Effect of α -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides[J]. J Chromatogr A, 2006, 1116(1/2): 31-37.
- [39] JIA Junqiang, MA Haile, ZHAO Weirui, et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein [J]. Food Chem, 2010, 119(1): 336-342.
- [40] LIU Dong, SUN Haiyan, ZHANG Lijun, et al. High-level expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli* and its bioactivity[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(13): 5109-5112.
- [41] RAO Shengqi, SU Yujie, LI Junhua, et al. Design and expression of recombinant antihypertensive peptide multimer gene in *Escherichia coli* BL21[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(12): 1620-1627.
- [42] PRIPP A H, ISAKSSON T, STEPANIAK L, et al. Quantitative structure-activity relationship modeling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins[J]. Eur Food Res Technol, 2004, 219(6): 579-583.
- [43] NATESH R, SCHWAGER S L U, STURROCK E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex[J]. Nature, 2003, 421: 551-554.