

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90140

# 富硒辣木籽蛋白降压肽的酶法制备、硒含量及稳定性研究

Preparation, selenium content and stability of antihypertensive peptides from selenium-enriched *Moringa oleifera* seed protein by enzymatic hydrolysis

陈冰冰<sup>1</sup> 杨奕<sup>1</sup> 李嘉颐<sup>1</sup> 金昶言<sup>1</sup>

CHEN Bing-bing<sup>1</sup> YANG Yi<sup>1</sup> LI Jia-yi<sup>1</sup> JIN Chang-yan<sup>1</sup>

程缤霏<sup>1</sup> 邓泳琪<sup>1</sup> 林碧敏<sup>1</sup> 梁东<sup>2</sup>

CHENG Bin-pei<sup>1</sup> DENG Yong-qi<sup>1</sup> LIN Bi-min<sup>1</sup> LIANG Dong<sup>2</sup>

唐德剑<sup>3,4</sup> 孟莉<sup>3,4</sup> 苗建银<sup>1</sup>

TANG De-jian<sup>3,4</sup> MENG Li<sup>3,4</sup> MIAO Jian-yin<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学食品学院广东省功能食品活性物重点实验室, 广东 广州 510642;

2. 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室, 广西 桂林 541004;

3. 农业农村部富硒产品开发与质量控制重点实验室/富硒食品开发国家地方联合工程实验室, 陕西 安康 725000; 4. 安康市富硒产品研发中心, 陕西 安康 725000)

(1. College of Food Science South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. State Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China; 3. Key Laboratory of Se-enriched Products Development and Quality Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/National-Local Joint Engineering Laboratory of Se-enriched Food Development, Ankang, Shaanxi 725000, China; 4. Ankang R&D Center for Se-enriched Products, Ankang, Shaanxi 725000, China)

**摘要:**目的:开发富硒辣木籽蛋白资源。方法:以富硒辣木籽蛋白粉为原料,通过单因素和响应面优化得到富硒辣木籽蛋白降压肽的酶解工艺条件,并对最优酶解物的 ACE 抑制活性、硒含量和稳定性进行分析。结果:富硒辣木籽蛋白的最优酶解工艺为酶解时间 3 h,酶解温度 34 °C, pH 8,底物浓度 7%,酶底比 0.3%。此条件下水解

所得降压肽的 ACE 的半抑制浓度为 1.956 mg/mL;该降压肽中硒含量为 1.394 mg/kg,是原料蛋白的 1.1 倍;并且该降压肽(5 mg/mL)具有良好的热稳定性和酸碱稳定性,在体外经胃肠道酶系消化酶解后,依然能保持良好的 ACE 抑制活性。结论:富硒辣木籽蛋白降压肽具有较强的 ACE 抑制活性和良好的稳定性。

**关键词:**富硒辣木籽;酶解;降压肽;ACE 抑制活性;硒含量;稳定性

**基金项目:**省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室资助课题(编号:CMEMR2020-B\_07);广西创新驱动发展专项资金项目(编号:桂科 AA17202010);广西自然科学基金项目(编号:2017GXNSFFA198007);农业农村部富硒产品开发与质量控制重点实验室/富硒食品开发国家地方联合工程实验室开放课题(编号:Se-2020B04)

**作者简介:**陈冰冰,女,华南农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**苗建银(1981—),男,华南农业大学副教授,博士。

E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn

**收稿日期:**2021-11-13 **改回日期:**2022-05-10

**Abstract: Objective:** To develop selenium-enriched (Se-enriched) *Moringa oleifera* seed protein resources. **Methods:** Using Se-enriched *Moringa oleifera* seed protein powder as raw material, the enzymatic hydrolysis conditions of Se-enriched *Moringa oleifera* seed protein antihypertensive peptides from Se-enriched *Moringa oleifera* seed protein were obtained by single factor and response surface optimization, and the ACE inhibitory activity, Se content and stability of the optimal enzymatic hydrolysate were analyzed.

**Results:** The optimal enzymatic hydrolysis conditions of Se-enriched *Moringa oleifera* were as follows: enzymatic hydrolysis time 3 h, temperature 34 °C, pH 8, concentration of substrate 7%, enzyme to substrate ratio 0.3%. Under these conditions, the semi-inhibitory concentration of ACE of the peptides was 1.956 mg/mL. The Se content of the antihypertensive peptide was 1.394 mg/kg, which was 1.1 times that of the raw protein. Moreover, the antihypertensive peptides (5 mg/mL) had good thermal stability and acid-base stability, and could still maintain good ACE inhibitory activity after digestion by gastrointestinal enzyme system in vitro. **Conclusion:** The Se-enriched *Moringa oleifera* seed protein antihypertensive peptides obtained by response surface optimization showed strong ACE inhibitory activity and good stability.

**Keywords:** selenium-enriched *Moringa oleifera* seed; enzymolysis; antihypertensive peptide; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity; selenium content; stability

全球高血压患者人数逐年增加,预计到 2025 年,发病人数将超过 15 亿<sup>[1-2]</sup>。降压肽又称血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽,主要通过降低 ACE 活性来降低血压,而 ACE 在肾素—血管紧张素系统中起着关键作用<sup>[3]</sup>。目前,ACE 抑制剂是治疗高血压的主要药物,但临床上服用合成 ACE 抑制剂的患者存在不同程度的副作用,如头痛、疲劳、咳嗽、水肿、皮疹等<sup>[4-6]</sup>。而从蛋白质酶解产物中分离出的 ACE 抑制肽具有效果温和、专一、高效和无副作用等特点,具有良好的开发价值<sup>[7]</sup>。植物蛋白制备血管紧张素转换酶抑制肽因其成本低、安全性高、无毒副作用而成为研究热点,如从黑豆蛋白<sup>[8]</sup>、魔芋蛋白<sup>[9]</sup>、绿茶渣蛋白<sup>[2]</sup>、玉米蛋白<sup>[10]</sup>等酶解物中发现具有 ACE 抑制活性的多肽,并开发出了多种相关产品。

硒(Se)是人和动物的必需微量元素之一,参与硒酶和硒蛋白的形成,在调节氧化还原平衡、物质代谢、发育与生殖及免疫功能方面发挥重要作用<sup>[11]</sup>。此外,硒还具有抗氧化<sup>[12]</sup>、抗炎<sup>[13]</sup>、抗病毒<sup>[14]</sup>、提高机体免疫力<sup>[15]</sup>、预防心脑血管疾病<sup>[16]</sup>等生理功能。与无机硒相比,天然有机硒具有低毒性、生物利用率高和多种生理活性等优点,目前已从富硒大豆<sup>[17]</sup>、富硒大米<sup>[18]</sup>、富硒茶<sup>[19]</sup>中分离并鉴定出了含硒肽。

辣木(*Moringa oleifera* Lam.)是一种生长在热带和亚热带的药食两用植物<sup>[20-21]</sup>,其叶被中国绿色食品发展中心认定为“国家首推绿色食品”<sup>[22]</sup>,具有多种生理保健活性。研究发现,辣木籽是一种具有多种生理活性的天然原料,具有降糖尿病<sup>[23]</sup>、抗炎和缓解腹痛<sup>[24]</sup>等功能。研究拟以富硒辣木籽蛋白为原料,优化富硒辣木籽蛋白中具有 ACE 抑制活性肽的酶解制备工艺,并评价最优条件下降压肽的稳定性及硒含量,旨在为富硒辣木籽蛋白

资源的利用和天然富硒降压肽的开发提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

#### 1.1.1 材料与amp;试剂

富硒辣木籽蛋白粉:北部湾滨海富硒功能农业研究院;

碱性蛋白酶(20 万 U/g)、胃蛋白酶(300 万 U/g)、木瓜蛋白酶(20 万 U/g)、胰蛋白酶(25 万 U/g):广西南宁庞博生物工程有限公司;

血管紧张素转化酶(ACE,来源于兔肺)、N-[3-(2-咪唑基)丙烯酰]-L-苯丙氨酰-甘氨酸-甘氨酸(FAPGG)、羧乙基哌嗪乙磺酸(HEPES):美国 Sigma-Aldrich 公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

数显恒温水浴锅:HH-4 型,金坛市华城海龙实验仪器厂;

冷冻干燥机:FD-1 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

pH 计:PHS-3CW 型,北京赛多利斯科学仪器有限公司;

电热恒温培养箱:DH5000BII 型,天津泰斯特仪器有限公司;

台式低速自动平衡离心机:L530 型:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

多功能酶标仪:2300 型,美国 PerkinElmer 公司;

原子荧光光度计:AFS-9530 型,北京海光仪器有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 富硒辣木籽蛋白降压肽制备 称取一定量的富硒辣木籽蛋白粉,加入蒸馏水配制成一定浓度的蛋白质溶液,调节 pH,加入一定量的酶,沸水浴灭酶,4 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,测定 ACE 抑制率。

1.2.2 蛋白酶初筛 以富硒辣木籽蛋白为原料,选取 4 种蛋白酶在其最适条件下酶解,分别为碱性蛋白酶(pH 8.5, 55 °C)、胃蛋白酶(pH 2, 37 °C)、木瓜蛋白酶(pH 6.5, 55 °C)、胰蛋白酶(pH 8, 37 °C)。其余试验条件:底物浓度 5%,酶底比 0.3%,酶解时间 3 h,灭酶,离心,取酶解液用蒸馏水稀释 10 倍,测定 ACE 抑制率,选择制备富硒辣木籽蛋白降压肽的最佳酶。

#### 1.2.3 单因素试验

(1) 酶解时间:在最适蛋白酶的基础上,固定胰蛋白酶酶解温度 37 °C, pH 8,底物浓度 5%,酶底比 0.3%,考察酶解时间(1, 2, 3, 4, 5 h)对富硒辣木籽蛋白酶解物 ACE 抑制活性的影响。

(2) 酶解温度:在最适蛋白酶的基础上,固定胰蛋白酶酶解时间 3 h, pH 8,底物浓度 5%,酶底比 0.3%,考察

酶解温度(27,32,37,42,47 °C)对富硒辣木籽蛋白酶解物 ACE 抑制活性的影响。

(3) pH:在最适蛋白酶的基础上,固定胰蛋白酶酶解时间 3 h,酶解温度 37 °C,底物浓度 5%,酶底比 0.3%,考察 pH(7.0,7.5,8.0,8.5,9.0)对富硒辣木籽蛋白酶解物 ACE 抑制活性的影响。

(4) 底物浓度:在最适蛋白酶的基础上,固定胰蛋白酶酶解时间 3 h,酶解温度 37 °C,pH 8,酶底比 0.3%,考察底物浓度(1%,3%,5%,7%,9%)对富硒辣木籽蛋白酶解物 ACE 抑制活性的影响。

(5) 酶底比:在最适蛋白酶的基础上,固定胰蛋白酶酶解时间 3 h,酶解温度 37 °C,pH 8,底物浓度 5%,考察酶底比(0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%)对富硒辣木籽蛋白酶解物 ACE 抑制活性的影响。

1.2.4 响应面优化 基于单因素试验结果,以底物浓度、酶解温度和酶解时间为自变量,以 ACE 抑制率为响应值,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理进行三因素三水平响应面试验,优化降压肽的最佳制备工艺。

1.2.5 最优酶解液的超滤分离 将最佳条件下获得的酶解液用 10 kDa 的超滤膜进行超滤,收集 <10 kDa 和 >10 kDa 组分冷冻干燥,密封保存备用。

1.2.6 ACE 抑制率测定 根据文献[25]。

1.2.7 硒含量测定 按 GB 5009.93—2017 执行。

1.2.8 富硒辣木籽蛋白降压肽的稳定性分析 根据最优条件制备 ACE 抑制酶解液,冻干即得富硒辣木籽降压肽粗肽粉,配制质量浓度为 5 mg/mL 的多肽溶液,以 ACE 抑制率为指标,分别考察温度、pH 及体外模拟胃肠道酶系对富硒辣木籽降压肽稳定性的影响。

(1) 温度:根据文献[26]。

(2) pH:根据文献[26]。

(3) 模拟胃肠道消化:根据文献[26—27]并修改。将富硒辣木籽蛋白降压肽用 0.1 mol/L 的 HCl 调节 pH 为 2,加入质量分数为 1%的胃蛋白酶,37 °C 水浴 3 h,灭酶 10 min,冷却,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 为 7,4 000 r/min 离心 10 min,测定上清液的 ACE 抑制率。取离心前 pH 为 7 的溶液,加入质量分数为 1%的胰蛋白酶,37 °C 水浴 3 h,灭酶 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,测定上清液的 ACE 抑制率。

1.2.9 数据处理 使用 SPSS 21.0 软件进行数据处理,字母不同表示在  $P < 0.05$  范围内存在显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶初筛

由图 1 可知,4 种蛋白酶的酶解效果分别为胰蛋白酶 > 碱性蛋白酶 > 木瓜蛋白酶 > 胃蛋白酶,且差异显著 ( $P < 0.05$ )。胰蛋白酶水解富硒辣木籽蛋白产物具有最

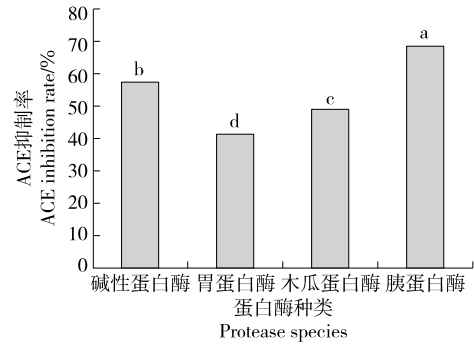


图 1 蛋白酶种类对酶解物 ACE 抑制率的影响

Figure 1 Effects of protease species on ACE inhibition rate of enzymatic hydrolysates

高的 ACE 抑制率(68.86%),其酶切位点优先在精氨酸和赖氨酸处裂解,C 末端 Arg 或 Lys 的存在能增强 ACE 抑制活性<sup>[28—30]</sup>。因此,选择最佳酶为胰蛋白酶。

### 2.2 单因素试验

2.2.1 酶解时间对酶解效果的影响 由图 2 可知,当酶解时间 < 3 h 时,ACE 抑制率随酶解时间的增加而显著升高 ( $P < 0.05$ );当酶解时间 > 3 h 时,ACE 抑制率有轻微下降,可能是由于酶解反应在 3 h 内持续进行,富硒辣木籽蛋白被不断水解,使得具有抑制 ACE 活性的肽不断积累,ACE 抑制率则不断增强;进一步延长反应时间 (> 3 h),富硒辣木籽的蛋白质底物被完全分解,而胰蛋白酶仍具有活性,会分解新生成的肽产物,导致活性肽含量降低,抑制活性降低。实际生产中,在不降低目标产物 ACE 抑制活性前提下,可以缩短酶解时间使生产效率最大化,故确定最佳酶解时间为 3 h。

2.2.2 酶解温度对酶解效果的影响 由图 3 可知,随着催化酶解反应温度的不断升高,水解产物对 ACE 的抑制作用明显增加 ( $P < 0.05$ ),当反应温度为 37 °C 时,ACE 抑制率最大为 66.88%。随着酶解温度的升高,胰蛋白酶的活性逐渐增大,与底物的接触几率增大,水解效率增加,ACE 抑制活性也随之增加。但当酶解温度超过最适温度 (37 °C) 后继续增高,过高的酶解温度可能导致胰蛋白酶

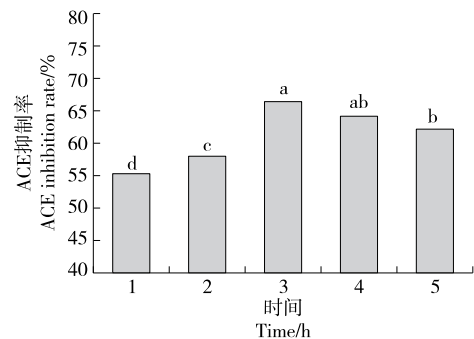


图 2 时间对 ACE 抑制率的影响

Figure 2 Effect of time on ACE inhibition rate

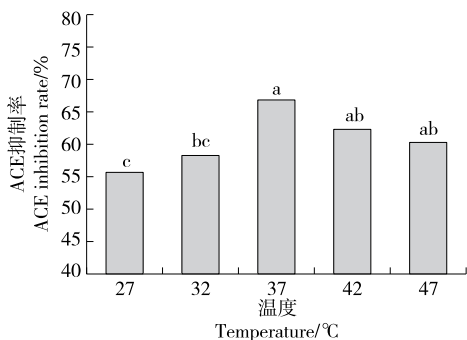


图 3 酶解温度对 ACE 抑制率的影响

Figure 3 Effect of hydrolysis temperature on ACE inhibition rate

变性失活,底物不能被有效地水解,降低了对底物水解后产物 ACE 的抑制效果<sup>[31-32]</sup>。故选择最佳酶解温度为 37 °C。

2.2.3 pH 对酶解效果的影响 由图 4 可知,ACE 抑制率随酶解 pH 的增大先上升后下降,当 pH 为 8 时达最大值 66.67%。pH 值是影响酶解效果的重要因素,其影响体现在蛋白酶构象、酶与蛋白质的结合状态等方面,过高或过低的 pH 都不利于酶解<sup>[33-34]</sup>。pH 8 是胰蛋白酶的最适 pH 值,此时酶活性最强,水解效率也最高,水解后的产物中含有更多的活性短肽,ACE 抑制率高,但当 pH 低于或高于 8 时,胰蛋白酶活性下降,富硒辣木籽蛋白被胰蛋白酶催化水解效率下降,具有 ACE 抑制活性的短肽数目减少,ACE 抑制率降低。故选择最佳 pH 为 8。

2.2.4 底物浓度对酶解效果的影响 由图 5 可知,当底物浓度为 1%~5% 时,ACE 抑制率随底物浓度的增加而显著增加( $P < 0.05$ ),当底物浓度为 7% 时,ACE 抑制率达最高值 68.78%,可能是由于通过增加底物浓度来增加反应体系中底物与酶分子的碰撞机会,从而提高了酶解反应速度<sup>[35]</sup>。当底物浓度不断增加,抑制剂的效果反而降低,一方面可能是因为没有足够的酶催化底物反应,另一方面由于酶解液过于黏稠,影响蛋白质的自由扩散,影响酶解效率,从而影响抑制率<sup>[36]</sup>。故选取最佳底物浓度为 7%。

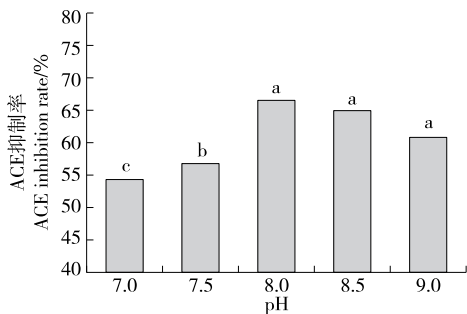


图 4 pH 对 ACE 抑制率的影响

Figure 4 Effect of pH on ACE inhibition rate

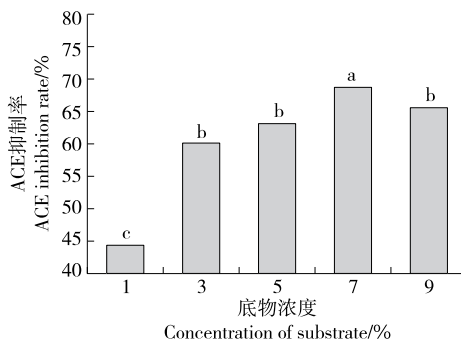


图 5 底物浓度对 ACE 抑制率的影响

Figure 5 Effect of substrate concentration on ACE inhibition rate

2.2.5 酶底比对酶解效果的影响 由图 6 可知,ACE 抑制率随酶底比的增加呈先增大后缓慢降低的趋势,当酶底比为 0.1%~0.3% 时,ACE 抑制率显著增加( $P < 0.05$ ),且在 0.3% 达最大值 68.85%。而后继续增大酶底比,ACE 抑制率缓慢降低( $P > 0.05$ ),主要是因为酶底比较低时,与蛋白底物结合未完全达到一定的饱和,随着酶底比的增加,酶与底物结合越来越接近饱和,由于底物蛋白有限,过多的蛋白酶无法作用蛋白进行水解,因此,抑制率变化缓慢。此外,酶解物被水解后含有更多不具有 ACE 抑制活性的小肽片段,导致活性降低<sup>[37-38]</sup>。故选取最佳酶底比为 0.3%。

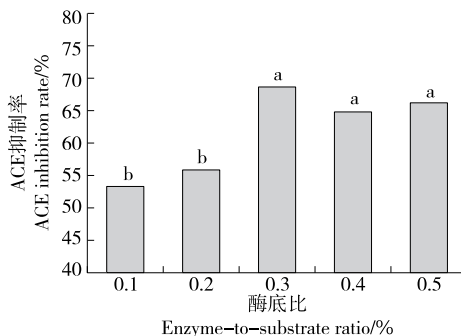


图 6 酶底比对 ACE 抑制率的影响

Figure 6 Effect of enzyme/substrate on ACE inhibition rate

### 2.3 响应面优化

在单因素基础上,选取底物浓度、酶解温度和酶解时间 3 个因素为优化因素。响应面因素水平设计见表 1,试验设计及结果见表 2。

各因素经二次多项回归拟合后,得回归方程为:

$$Y = 71.34 + 0.11A - 2.45B - 0.78C + 0.89AB - 1.56AC - 1.34BC - 2.52A^2 - 2.30B^2 - 3.86C^2 \quad (1)$$

由表 3 可知,模型显著( $P = 0.0124 < 0.05$ ),失拟项不显著,说明回归模型理想,可以用来拟合底物浓度、酶解温度和酶解时间 3 个因素对水解产物 ACE 抑制率的

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface experiment

水平	A 底物浓度/%	B 酶解温度/°C	C 酶解时间/h
-1	5	32	2
0	7	37	3
1	9	42	4

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 The design and results of the response surface experimental

试验号	A	B	C	ACE 抑制率/%
1	0	0	0	70.09
2	-1	1	0	61.61
3	1	1	0	65.18
4	0	0	0	72.32
5	-1	0	-1	64.29
6	0	0	0	72.32
7	0	0	0	68.75
8	0	0	0	73.21
9	0	-1	1	66.96
10	1	0	1	62.50
11	-1	-1	0	69.64
12	0	1	-1	66.07
13	0	1	1	60.71
14	-1	0	1	60.71
15	1	0	-1	66.96
16	0	-1	-1	66.96
17	1	-1	0	69.64

影响。一次项 B 和二次项 C<sup>2</sup> 对 ACE 抑制率影响极显著 ( $P < 0.01$ ), 二次项 A<sup>2</sup> 和 B<sup>2</sup> 对 ACE 抑制率影响显著 ( $P < 0.05$ )。

由图 7 可知, 各因素对酶解液 ACE 抑制率的影响为

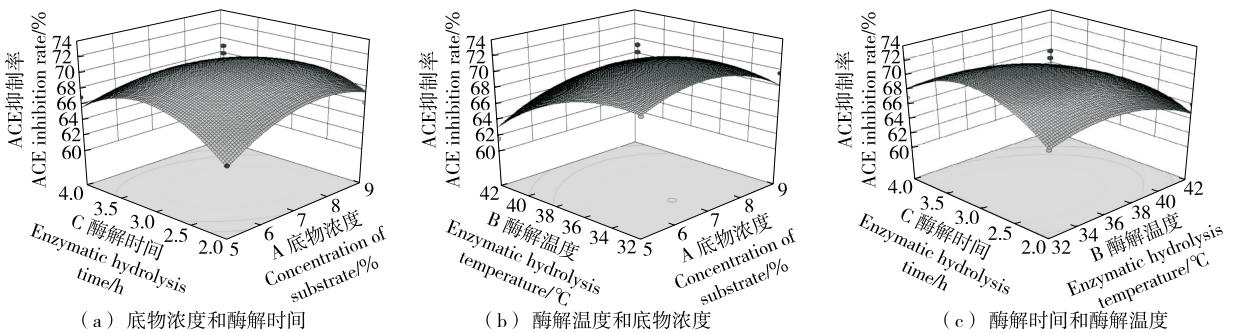


图 7 各因素相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面图

Figure 7 Response surface diagram of the influence of each factor interaction on ACE inhibition rate

表 3 响应面二次模型方差分析<sup>†</sup>

Table 3 Analysis of variance for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	197.26	9	21.92	6.23	0.012 4	*
A	0.10	1	0.10	0.03	0.871 5	
B	48.17	1	48.17	13.69	0.007 7	**
C	4.90	1	4.90	1.39	0.276 6	
AB	3.19	1	3.19	0.91	0.373 0	
AC	9.73	1	9.73	2.77	0.373 0	
BC	7.18	1	7.18	2.04	0.196 2	
A <sup>2</sup>	26.74	1	26.74	7.60	0.028 2	*
B <sup>2</sup>	22.28	1	22.28	6.33	0.040 0	*
C <sup>2</sup>	62.82	1	62.82	17.85	0.003 9	**
残差	24.64	7	3.52			
失拟项	10.95	3	3.65	1.07	0.456 9	不显著
纯误差	13.69	4	3.42			
总和	221.90	16				

<sup>†</sup> \*\* 为极显著 ( $P < 0.01$ ), \* 为显著 ( $P < 0.05$ );  $R^2 = 0.949, R^2_{adj} = 0.918; CV = 2.79\%$ 。

酶解温度 > 酶解时间 > 底物浓度。根据回归模型, 得到最佳酶解工艺为底物浓度 6.84%, 酶解时间 3.01 h, 酶解温度 34.25 °C。考虑实际生产情况, 将工艺调整为底物浓度 7%, 酶解时间 3 h, 酶解温度 34 °C, 此条件下, 酶解液 ACE 抑制率预测值为 72.01%, 实测值为 71.34%, 与理论值误差 < 1%, 说明该模型获得的最佳酶解工艺是可靠的。

#### 2.4 最优酶解物及超滤组分对 ACE 抑制活性的影响

由图 8 可知, 在质量浓度范围内, ACE 抑制率随质量浓度的增加显著上升 ( $P < 0.05$ ), 当质量浓度为 4 mg/mL 时, ACE 抑制率由高到低为分子量小于 10 kDa 组分 (78.88%) > 最优酶解物 (67.00%) > 分子量大于 10 kDa 组分 (62.71%), 相应的 IC<sub>50</sub> 值分别为 1.859, 1.956,

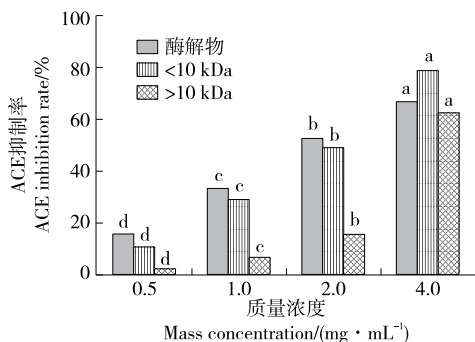


图 8 富硒辣木籽蛋白酶解物及超滤组分对 ACE 的抑制率

Figure 8 ACE inhibition rate of Se-enriched *Moringa oleifera* seed protein hydrolysates and ultrafiltration components

3.426 mg/mL,表明分子量小于 10 kDa 组分的 ACE 抑制率最高,显著高于最优酶解物和分子量大于 10 kDa 组分 ( $P < 0.05$ )。ACE 抑制率随富硒辣木籽多肽分子量的降低而升高,与陈龙等<sup>[39-40]</sup>的结论一致。

### 2.5 硒含量

试验发现,富硒辣木籽蛋白原料和富硒辣木籽降压肽中硒含量分别为 1.269,1.394 mg/kg,表明富硒辣木籽蛋白经酶解筛选后硒被富集。刘恋等<sup>[41]</sup>测得恩施富硒大豆蛋白粉中硒含量为 1.068 8 mg/kg,刘波等<sup>[42]</sup>测得富硒大米中硒含量为 0.167 5 mg/kg。此外,富硒螺旋藻蛋白获得的硒肽具有较高的 ACE 抑制率<sup>[43-44]</sup>,且富硒大豆低聚肽的降血压作用主要是硒与肽的协同作用<sup>[17]</sup>。综上,富硒辣木籽蛋白是一种硒含量较高的植物蛋白资源,是富硒辣木籽蛋白肽的制备及分离纯化的优良天然富硒原料。

### 2.6 富硒辣木籽蛋白降压肽的稳定性

2.6.1 温度对辣木籽降压肽稳定性的影响 由图 9 可知,当温度为 20~100 °C 时,降压肽的 ACE 抑制率为 79.17%~84.85%,说明 ACE 抑制率在温度 20~80 °C 时变化不显著 ( $P > 0.05$ );当温度为 100 °C 时,ACE 抑制率为 79.17%,相对于其他温度处理下显著降低 ( $P < 0.05$ ),但比例变化与其他温度处理下相比不超过 6%。总体看来,ACE 抑制活性受温度的影响较小,在一定范围内降压肽表现出良好的温度稳定性,与 Hwang 等<sup>[45]</sup>和王珊珊<sup>[46]</sup>的试验结果一致。

2.6.2 pH 对辣木籽降压肽稳定性的影响 由图 10 可知,当 pH 为 10 时,ACE 抑制率为 83.91%,相对于 pH 2~8 时显著降低 ( $P < 0.05$ ),可能是因为降压肽在一定碱性环境下出现了快速消旋,改变了肽链结构,降低了多肽活性<sup>[47]</sup>,但与最高值相差 $\leq 6\%$ 。因此,pH 对富硒辣木籽降压肽的 ACE 抑制活性存在一定影响,但幅度不

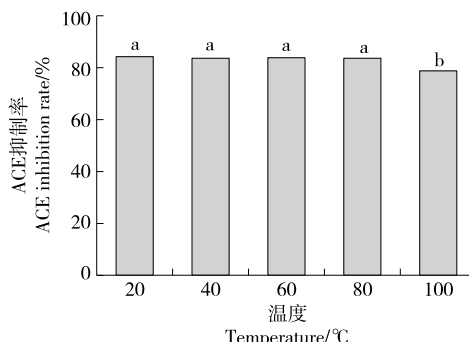


图 9 富硒辣木籽 ACE 抑制肽的温度稳定性

Figure 9 Temperature stability of ACE inhibitory peptides from Se-enriched *Moringa oleifera* seed

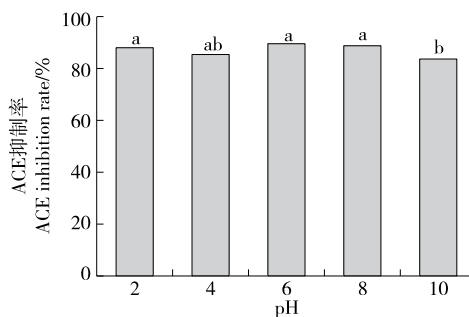


图 10 富硒辣木籽 ACE 抑制肽的酸碱稳定性

Figure 10 pH stability of ACE inhibitory peptides from Se-enriched *Moringa oleifera* seed

大,降压肽在强酸或强碱条件下继续维持较完整的酶体结构及活性。这与 Li 等<sup>[8]</sup>和周剑敏等<sup>[26]</sup>的试验结果一致。

### 2.6.3 模拟胃肠道消化对辣木籽降压肽稳定性的影响

由图 11 可知,与未消化的降压肽相比,胃蛋白酶水解的降压肽和胃蛋白酶与胰蛋白酶共同作用的降压肽的抑制率未明显降低 ( $P > 0.05$ ),说明富硒辣木籽降压肽活性不受胃肠蛋白酶的影,具有良好的体外消化稳定性,与 Antonio 等<sup>[48]</sup>和罗鹏等<sup>[49]</sup>的研究结论一致。

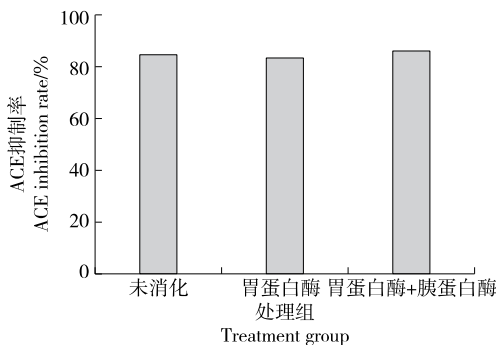


图 11 富硒辣木籽 ACE 抑制肽的体外消化稳定性

Figure 11 In vitro digestion stability of ACE inhibitory peptides from Se-enriched *Moringa oleifera* seed

### 3 结论

以富硒辣木籽蛋白粉为原料,以血管紧张素转化酶抑制率为指标,优化了富硒辣木籽蛋白降压肽的酶解工艺,并分析了酶解物的血管紧张素转化酶抑制活性、硒含量和稳定性。结果表明,富硒辣木籽蛋白降压肽的最佳酶解工艺为酶解时间 3 h,酶解温度 34 ℃,pH 8,底物浓度 7%,酶底比 0.3%。该条件下制备的血管紧张素转化酶抑制肽的硒含量是辣木籽蛋白原料的 1.1 倍。此外,该降压肽还具有良好的温度、酸碱和体外胃肠道消化稳定性。后续将对富硒辣木籽肽进行纯化鉴定、体内外活性评价、构效关系研究等,以明确其降血压作用机制。

#### 参考文献

- [1] WU J J, XIE D W, CHEN X J, et al. Inhibitory mechanism of a substrate-type angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 79: 97-104.
- [2] LAI X F, PAN S S, ZHANG W J, et al. Properties of ACE inhibitory peptide prepared from protein in green tea residue and evaluation of its anti-hypertensive activity [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 92: 177-187.
- [3] WU J P, WANG L, CHIBUIKE C U. Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 69: 214-219.
- [4] SUN W P, ZHANG H B, GUO J C, et al. Comparison of the efficacy and safety of different ACE inhibitors in patients with chronic heart failure: A PRISMA-compliant network meta-analysis[J]. *Medicine*, 2016, 95(6): e2554.
- [5] HANAFI M A, HASHIM S N, CHAY S Y, et al. High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 589-597.
- [6] LEE S Y, HUR S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 506-517.
- [7] WANG Y F, HUANG Q F, KONG D D, et al. Production and functionality of food-derived bioactive peptides: A review[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2018, 18(18): 1 524-1 535.
- [8] LI M Q, XIA S W, ZHANG Y J, et al. Optimization of ACE inhibitory peptides from black soybean by microwave-assisted enzymatic method and study on its stability[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 98: 358-365.
- [9] 毛跟年, 周亚丽, 贺磊, 等. 魔芋 ACE 抑制肽酶法制备工艺研究[J]. *食品工业*, 2017, 38(1): 99-102.  
MAO G N, ZHOU Y L, HE L, et al. Enzymatic preparation of Konjac ACE inhibitory peptides[J]. *The Food Industry*, 2017, 38(1): 99-102.
- [10] 高泽汝, 宁梦茹, 刘昆仑, 等. 酶法制备玉米胚芽 ACE 抑制肽的研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2020, 41(5): 44-49.
- [11] GAO Z R, NING M R, LIU K L, et al. Preparation of ACE inhibitory peptides from maize germ by enzymatic hydrolysis[J]. *Journal of Henan University of Technology*, 2020, 41(5): 44-49.
- [12] SUETSUNA K, CHEN J R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*[J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(4): 305-309.
- [13] SURAI P F, KOCHISH I I. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: The case of selenium [J]. *Poultry Science*, 2019, 98(10): 4 231-4 239.
- [14] EL-GHAZALY M A, FADEL N, RASHED E, et al. Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2017, 95(2): 101-110.
- [15] BLANCA L, VANESSA V, EDUARDO P, et al. The organic selenium compound selenomethionine modulates bleomycin-induced DNA damage and repair in human leukocytes[J]. *Biological Trace Element Research*, 2010, 133(1): 12-19.
- [16] NIAN H, BISSON W H, DASHWOOD W M, et al. Alpha-keto acid metabolites of organoselenium compounds inhibit histone deacetylase activity in human colon cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(8): 1 416-1 423.
- [17] NIKOLAY S, EVGENII D, GEIR B, et al. Selenium, selenoprotein P, and Alzheimer's disease: Is there a link? [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 127: 124-133.
- [18] 程天德, 戴必胜, 梁延省. 富硒大豆低聚肽降血压作用的研究[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(12): 1 664-1 666.  
CHENG T D, DAI B S, LIANG Y S. Blood pressure lowering of Se-riched soybean oligopeptides [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(12): 1 664-1 666.
- [19] FANG Y, PAN X, ZHAO E M, et al. Isolation and identification of immunomodulatory selenium-containing peptides from selenium-enriched rice protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 696-702.
- [20] 杜梦珂. 富硒碱性茶蛋白 ACE 抑制肽的制备、分离纯化及结构鉴定[D]. 上海: 上海师范大学, 2018: 44-56.  
DU M K. Study on the preparation, purification and identification of ACE inhibitory activity peptides from Se-enriched tea protein[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2018: 44-56.
- [21] 张能荣. 辣木的成分和药理[J]. *办公自动化*, 2018, 23(2): 17-21.  
ZHANG N R. The composition and pharmacology of *Moringa*[J]. *Office Informatization*, 2018, 23(2): 17-21.
- [22] GU X Z, YANG Y, WANG Z W. Nutritional, phytochemical, antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory properties of *Moringa oleifera* seeds[J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 133: 151-160.
- [23] 陈逸鹏, 梁建芬. 辣木叶功效相关成分研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(14): 201-205.  
CHEN Y P, LIANG J F. Active compounds and functions of Mor-

- inga oleifera* Lam. leaves[J]. Food Research and Development, 2016, 37(14): 201-205.
- [23] GONZÁLEZ G N G, CHUC K J A, TORRES C J A, et al. Bio-functional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*) [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(13): 4 268-4 276.
- [24] SAUCEDO-POMPA S, TORRES-CASTILLO J A, CASTRO-LÓPEZ C, et al. Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products[J]. Food Research International, 2018, 111: 438-450.
- [25] 骆琳, 丁青芝, 马海乐. 96 孔板法用于高通量血管紧张素转化酶抑制剂体外检测[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 129-134.
- LUO L, DING Q Z, MA H L. Establishment of in vitro high-throughput activity detection method for angiotensin converting enzyme inhibitors based on 96 well plates[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(1): 129-134.
- [26] 周剑敏, 尹方平, 于晨, 等. 高粱碱溶蛋白 ACE 抑制肽的制备及其稳定性研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(8): 66-72.
- ZHOU J M, YIN F P, YU C, et al. Preparation and stability of ACE inhibitory peptides derived from sorghum protein[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(8): 66-72.
- [27] 陈秋鑫, 陈雪芹, 马倩, 等. 酶解法制备牡丹籽 ACE 抑制肽及其稳定性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 149-156.
- CHEN Q L, CHEN X Q, MA Q, et al. Preparation and stability of ACE inhibitory peptides from peony seed meal by enzymatic hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(19): 149-156.
- [28] 侯成杰, 聂彩清, 王彦茜, 等.  $\alpha$ -乳白蛋白源 ACE 抑制肽快速筛选及验证[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 100-107.
- HOU C J, NIE C Q, WANG Y Q, et al. Accurate screening and verification of  $\alpha$ -lactalbumin-derived ACE inhibitory peptides[J]. Food Science, 2021, 42(24): 100-107.
- [29] GU Y C, MAJUMDER K, WU J P. QSAR-aided insilico approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2011, 44(8): 2 465-2 474.
- [30] JING P, QIAN B J, HE Y W, et al. Screening milk-derived antihypertensive peptides using quantitative structure activity relationship (QSAR) modelling and in vitro/in vivo studies on their bioactivity [J]. International Dairy Journal, 2014, 35(1): 95-101.
- [31] 张杨, 胡磊, 汪少芸, 等. 响应面优化酶解法制备蒲公英籽蛋白抗氧化肽工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 258-262.
- ZHANG Y, HU L, WANG S Y, et al. Optimization of enzymolysis technology for preparation of antioxidant peptides from dandelion seeds-derived proteins by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(5): 258-262.
- [32] 殷海洋, 刘振春, 张世康, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取油莎豆 ACE 抑制肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 182-187.
- YIN H Y, LIU Z C, ZHANG S K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of ACE inhibitory peptides from *Cyperus esculentus* by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 182-187.
- [33] QU W J, MA H L, PAN Z L, et al. Preparation and antihypertensive activity of peptides from *Porphyra yezoensis*[J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 14-20.
- [34] 马倩, 潘梦莹, 陈秋鑫, 等. 奇亚籽蛋白酶解制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(3): 122-129.
- MA Q, PAN M Y, CHEN Q L, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of chia seed protein to prepare antioxidant peptides[J]. Food Research and Development, 2021, 42(3): 122-129.
- [35] 杨云梅. 家蚕丝素蛋白 ACE 抑制肽的制备及性能研究[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2019: 22-23.
- YANG Y M. Preparation of ACE-inhibitory peptides from *Bombyx mori* silk fibroin and their physicochemical properties[D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2019: 22-23.
- [36] 贾叶叶, 田洪磊, 詹萍, 等. 酶法制备沙漠果蛋白 ACE 抑制肽工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 264-269.
- JIA Y Y, TIAN H L, ZHAN P, et al. Preparation of ACE inhibitory peptides from Brazil nut protein by enzymatic hydrolysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(6): 264-269.
- [37] 刘丽莉, 李丹, 杨陈柳, 等. 牛骨胶原蛋白酶解工艺优化及结构特性分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 40-46.
- LIU L L, LI D, YANG C L, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process and analysis of structural properties on bovine bone crude collagen[J]. Food & Machinery, 2017, 33(7): 40-46.
- [38] 王振斌, 刘加友, 陈兵兵, 等. 响应面优化酶法制备芝麻饼粕 ACE 抑制肽研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9): 88-93.
- WANG Z B, LIU J Y, CHEN B B, et al. The response surface optimize preparation of sesame dregs' ACE inhibitory peptides with enzyme[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(9): 88-93.
- [39] 陈龙, 庄溪, 许光治, 等. 大越豆芋蛋白 ACE 抑制肽的分离纯化研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 103-106.
- CHEN L, ZHUANG X, XU G Z, et al. Study on separation and purification of ACE inhibitory peptides from *Apios americana* Medikus[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(13): 103-106.
- [40] ZHANG X, XIONG Y L, CHEN J, et al. Synergistic inhibition of lipid oxidation by pea protein hydrolysate coupled with licorice extract in a liposomal model system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(35): 8 452-8 461.
- [41] 刘恋, 李琴, 张驰. 正交试验法提取大豆中硒蛋白工艺条件优化[J]. 山东化工, 2015, 44(6): 1-4.
- LIU L, LI Q, ZHANG C. Optimization of the extraction of selenoproteins from soybean by orthogonal test[J]. Shandong Chemical Industry, 2015, 44(6): 1-4.



- [42] 刘波, 孟辉. 微波消解—氢化物发生原子荧光法测定保健食品中的硒含量[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(2): 223-225.  
LIU B, MENG H. Determination of selenium in healthy food by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry method[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2008, 47(2): 223-225.
- [43] 高冬芳, 张逸波, 凌钦婕, 等. 富硒螺旋藻多肽对血管紧张素转化酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 7-10.  
GAO D F, ZHANG Y B, LING Q J, et al. Angiotensin convert enzyme inhibition of peptides derived from water soluble total protein of selenium-enriched *Spirulina platensis*[J]. Food Science, 2011, 32(7): 7-10.
- [44] 王韵, 蔡智辉, 张逸波, 等. 富硒螺旋藻蛋白水解多肽的制备及其对 ACE 活性的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1 574-1 579.  
WANG Y, CAI Z Z, ZHANG Y B, et al. Preparation of polypeptides by hydrolysis of selenium-enriched *Spirulina* protein and their inhibitory activity for angiotensin-converting enzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1 574-1 579.
- [45] HWANG J S. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice [J]. Food Research International, 2010, 43 (3): 902-906.
- [46] 王珊珊. 鲤鱼肌肉 ACE 抑制肽制备及稳定性的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017: 34-44.  
WANG S S. Study on preparation and stability of ACE inhibitory peptide from common carp mussel[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017: 34-44.
- [47] 蒋将, 朱波, 刘元法, 等. 脱酚和碱处理对豌豆分离蛋白基本性质的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 1-5.  
JIANG J, ZHU B, LIU Y F, et al. Functional properties of pea protein isolate subjected to phenol removal and alkali treatment[J]. Food Science, 2013, 34(23): 1-5.
- [48] ANTONIO J, MANUEL A, JAVIER V, et al. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: Identification of active peptide from soybean lipoxygenase[J]. European Food Research and Technology, 2010, 230(4): 655-663.
- [49] 罗鹏, 张晓伟, 徐晓, 等. 葵花籽 ACE 抑制肽的稳定性研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(1): 75-77.  
LUO P, ZHANG X W, XU X, et al. Stability of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides (ACEIPs) derived from sunflower seeds protein[J]. Cereals & Oils, 2016, 29(1): 75-77.
- 
- (上接第 143 页)
- [22] GAARDER M Ø, BAHUAUD D, VEISETH K E, et al. Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets[J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 9-17.
- [23] DONG C H, WANG B, LI F F, et al. Effects of edible chitosan coating on Harbin red sausage storage stability at room temperature[J]. Meat Science, 2020, 159(5): 107919.
- [24] LIU W J, LANIER T C, OSBORNE J A. Capillarity proposed as the predominant mechanism of water and fat stabilization in cooked comminuted meat batters[J]. Meat Science, 2016, 111: 67-77.
- [25] COFRADES S, CARBALLO J, JIMÉNEZ C F, et al. Heating rate effects on high-fat and low-fat frankfurters with a high content of added water[J]. Meat Science, 1997, 47(1/2): 105-114.
- [26] CARNEIRO C D S, MÁRSICO E T, RIBEIRO R D O R, et al. Low-Field Nuclear Magnetic Resonance (LF-NMR- $H^{-1}$ ) to assess the mobility of water during storage of salted fish (*Sardinella Brasiliensis*) [J]. Journal of Food Engineering, 2016, 169: 321-325.
- [27] DU W X, LIN C M, PHU A T, et al. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(1): 292-301.
- [28] LI K F, BAO Y L, LUO Y K, et al. Formation of biogenic amines in crucian carp (*carassius auratus*) during storage in ice and at 4 °C [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(12): 2 228-2 233.
- 
- (上接第 212 页)
- [17] 黄魏峰, 周雪松, 古川. 变性淀粉对烘焙果酱品质的影响[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 924-927.  
HUANG W F, ZHOU X S, GU C. Effect of modified starch on the quality of heat-resisting fruit jam[J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(8): 924-927.
- [18] 赵雷, 刘希涛, 杨诗妮, 等. 食品胶对荔枝果酱焙烤特性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(15): 265-269.  
ZHAO L, LIU X T, YANG S N, et al. Effects of hydrocolloids on the baking properties of the litchi jam[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(15): 265-269.
- [19] 李素芬, 王琴, 胡晖亮, 等. 佛手瓜复配柚子果酱的工艺研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(8): 98-104.  
LI S F, WANG Q, HU H L, et al. Study on the technology of compound jam with chayote and pomelo[J]. China Condiment, 2020, 45(8): 98-104.
- [20] 郑文雄, 陈燕清, 刘小欣, 等. 无核黄皮果酱的制备及其理化性质研究[J]. 食品质量检测学报, 2021, 12(22): 8 864-8 869.  
ZHENG W X, CHEN Y Q, LIU X X, et al. Study on the preparation and physicochemical properties of seedless Huangpi jam[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(22): 8 864-8 869.
- [21] 张丽华, 李昌文, 纵伟, 等. 猕猴桃果酱制作的研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(3): 699-702.  
ZHANG L H, LI C W, ZONG W, et al. Research on manufacture of kiwifruit jam[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(3): 699-702.