

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.80310

# 益生菌发酵藜麦制备 ACE 抑制肽

## Study on the preparation of ACE inhibitory peptides by probiotic fermentation of quinoa

李 帅 袁亚宏 岳田利

LI Shuai YUAN Ya-hong YUE Tian-li

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 咸阳 712100)

(College of Food Science and Engineering, Northwest A &amp; F University, Xianyang, Shaanxi 712100, China)

**摘要:**目的:探究利用益生菌发酵藜麦制备血管紧张素转换酶(ACE)抑制发酵液潜在的能力及发酵工艺对其的影响。方法:以藜麦为原料,ACE抑制率为指标,对18株乳酸菌和12株酵母制备具有ACE抑制能力的发酵液进行了筛选,并对接种量、发酵温度、发酵时间进行了正交优化;对发酵液中的肽进行液质鉴定,并对筛选出的肽进行体内试验评价降压效果。结果:30株菌中 *Lactobacillus paracasei* L2(副干酪乳杆菌)作用效果最好,发酵藜麦制备的发酵液 ACE抑制率高达(86.50±0.25)%;*Lactobacillus paracasei* L2菌株发酵藜麦制备具有ACE抑制活性的发酵液最佳发酵条件为接种量5%,发酵时间48h,发酵温度34℃,该条件下ACE抑制率最高,为(90.41±0.16)%;通过对液质鉴定结果比对数据库得到两条ACE抑制效果较好的两条肽 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL,它们均能够在自发性高血压大鼠(SHR)体内显示出显著的降血压作用,均在灌胃4h时达到最佳降压效果。收缩压(SBP)分别降低(2.67±0.21), (3.46±0.01) kPa,舒张压(DBP)分别下降(29.36±0.54), (22.33±0.77) kPa。且 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 均对 Wistar-Kyoto 大鼠(WKY)的血压不产生影响。结论:藜麦是制备具有ACE抑制活性发酵液的优质谷物原料,且从发酵液中分离制备的 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL ACE抑制肽可用于降血压功能食品或者药品的开发。

**关键词:**益生菌;高血压;藜麦;ACE抑制肽;工艺优化;体内试验

**Abstract: Objective:** The potential ability of probiotics to prepare

angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory fermentation broth from quinoa and the effects of fermentation process on it were investigated. **Methods:** In this study, 18 strains of lactic acid bacteria and 12 strains of yeast were screened for their ability to prepare ACE inhibitory fermentation broth using quinoa as the raw material and the ACE inhibition rate as an indicator. The inoculum amount, fermentation temperature and fermentation time were optimized by orthogonal tests. Finally, the peptides in the fermentation broth were identified, and the selected peptides were tested in vivo to evaluate the antihypertensive effect. **Results:** *Lactobacillus paracasei* L2 had the best effect among the 30 strains, and the ACE inhibition rate of the fermentation broth prepared by fermenting quinoa was as high as (86.50±0.25)%; The optimal fermentation conditions for the preparation of ACE inhibitory fermentation broth by fermenting quinoa with *Lactobacillus paracasei* L2 strain were 5% inoculum, 48 h fermentation time, and 34 °C fermentation temperature. Under these conditions, the ACE inhibition rate was the highest, which was (90.41±0.16)%; By comparing the results of liquid quality identification with the database, two peptides NIFRPFAPEL and AALEAPRILNL with better ACE inhibition effect were obtained. Both NIFRPFAPEL and AALEAPRILNL could significantly lower blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR), and both achieved the best blood pressure lowering effect at 6 h after gavage. Systolic blood pressure (SBP) decreased by (2.67±0.21) and (3.46±0.01) kPa, and diastolic blood pressure (DBP) decreased by (29.36±0.54) and (22.33±0.77) kPa, respectively. And NIFRPFAPEL and AALEAPRILNL had no effect on blood pressure in Wistar-Kyoto rats (WKY). **Conclusion:** Therefore, quinoa is a high-quality grain raw material for preparing ACE inhibitory fermentation broth, and NIFRPFAPEL and AALEAPRILNL can be used for the development of blood pressure-lowering functional foods or medicines.

**Keywords:** probiotic; hypertension; quinoa; ACE inhibitory peptide; process optimization; in vivo test

基金项目:“十三五”重点研发计划项目(编号:2019YFC1606703)

作者简介:李帅,男,西北农林科技大学硕士研究生。

通信作者:袁亚宏(1971—),女,西北农林科技大学教授,博士。

E-mail: yyh324@126.com

收稿日期:2022-04-16 改回日期:2022-07-23

据最新调查结果<sup>[1]</sup>显示,中国高血压病人约占总人口的 23.2%,其中控制率仅有 15.3%。预计至 2025 年,全球高血压人数将涨到 16 亿左右,而中国将是位居榜首的国家<sup>[2]</sup>。高血压作为人类的“无声杀手”,常导致心肌梗塞、脑出血等严重危害人类生命的心血管和脑疾病<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,人体血压受到很多系统的调节,其中激肽释放酶—激肽和肾素—血管紧张素系统作为互相拮抗的两个系统发挥着至关重要的作用,二者平衡失调是引起高血压发病的主要因素之一。在该系统中,肝源性血管紧张素原被肾素裂解,形成非活性十肽血管紧张素 I,继而由血管紧张素转换酶(ACE)酶解为八肽血管紧张素 II(一种有效的血管收缩剂)。此外,ACE 代谢九肽的舒缓激肽(bradykinin, BK, 一种血管扩张剂),转化为不活跃的 BK-(1-7)和 BK-(1-5)<sup>[5]</sup>。因此,由于 ACE 在血管系统中具有双重直接作用,抑制其已成为治疗高血压的主要靶点。然而 ACE 抑制剂药物具有高效的降血压作用时,也会产生诸多副作用,甚至药物依赖性<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明,很多食物中含有预防或治疗高血压的生物活性肽,具有安全性高、副作用小的特点,逐渐成为降血压药物替代品的首选。迄今为止,乳类<sup>[8]</sup>、肉类<sup>[9]</sup>、蛋类<sup>[10]</sup>、海洋生物<sup>[11]</sup>、植物<sup>[12]</sup>均是制备 ACE 抑制肽的丰富来源。

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)产于南美洲,其蛋白含量丰富且比例平衡,含有全部天然氨基酸,是联合国粮农组织推荐的唯一全营养食品<sup>[13-14]</sup>。藜麦作为伪谷物不含麸质,易消化吸收,能避免引起胃肠道的过敏反应<sup>[15-16]</sup>。且藜麦是一种潜在的生物活性肽制备来源,来自藜麦蛋白的肽已被证明能够发挥一些有益的作用,如 Vilcacundo 等<sup>[17]</sup>发现藜麦蛋白消化物中释放的肽在胃十二指肠中抑制 DPP-IV、 $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,从而表现出有效的体外抗糖尿病特性。并且 Vilcacundo 等<sup>[18]</sup>还报告了上述消化物在结肠癌细胞中的抗增殖作用以及抗氧化特性。 $<5$  kDa 的肽分离组分表现出更高的抗氧化活性,而含有  $>5$  kDa 肽的组分表现出更高的抗增殖活性。此外藜麦水解肽在抗炎、降胆固醇、抗高血压等方面均表现出积极作用<sup>[19-20]</sup>。尽管如此,关于藜麦 ACE 抑制活性的研究还较少,且目前多采用酶解方式制备降压肽,微生物发酵应用较少<sup>[21]</sup>。而利用酶水解时酶的切割位点较为固定,可采用的商业酶种类较少,利用复合酶会提高经济成本且在酶解前需要对样品进行预处理。微生物发酵法逐渐成为一种有效的水解手段,具有简单经济、不会造成必需氨基酸损失的优点,同时可以提高发酵物营养价值和感官属性<sup>[22-23]</sup>。目前常用的发酵菌株如乳酸菌、芽孢杆菌属、酿酒酵母、汉逊酵母等都是富产蛋白酶的菌种,可以利用自身所产的蛋白酶系酶解底物蛋白,制备具有 ACE 抑制活性的多肽。

研究拟以藜麦为原料,采用微生物发酵法制备藜麦

ACE 抑制发酵液,通过比较 ACE 抑制活性筛选出优势益生菌,并对其制备条件进行优化;同时对发酵液中的肽进行液质鉴定,并对筛选出的肽进行体内试验,以期筛选出有望用于降血压功能食品或者药品研发的高效肽。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

藜麦:繁峙县懿康土特产有限公司;  
原发性高血压大鼠(SHR)、Wistar-Kyoto 大鼠(WKY);北京维通利华实验动物技术有限公司;  
MRS 肉汤:北京奥博星生物技术有限责任公司;  
来自兔肺(A6778-1UN)的血管紧张素转化酶(ACE)、*N*-马尿酸-*L*-组氨酸-*L*-亮氨酸水合物(HHL):美国 Sigma-Aldrich 公司;  
三氟乙酸:色谱级,上海麦克林生化科技有限公司;  
乙腈:色谱级,安徽天地高纯溶剂有限公司;  
卡托普利:济南永宁制药股份有限公司;  
NIFRPFAPPEL/AALEAPRILNL: $\geq 95\%$ ,上海三工生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

高速万能粉碎机:FW-400AD 型,天津鑫博得仪器有限公司;  
恒温摇床培养箱:TS-100B 型,上海善志仪器设备有限公司;  
立式高压蒸汽灭菌器:LDZX-50L-I 型,上海申安医疗器械厂;  
高速冷冻离心机:HC-3018R 型,安徽中科中佳科学仪器有限公司;  
恒温水浴锅:HSQ-1 型,上海智城分析仪器有限公司;  
高效液相色谱仪:LC-20A 型,日本岛津公司;  
无创血压计:CODA™ Monitor 型,美国 Kent Scientific 公司。

#### 1.1.3 试验菌株

18 株乳酸菌(动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis* B15、动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis* B16、两歧双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum* B17、嗜酸乳杆菌 *Bifidobacterium bifidum* B18、短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* L1、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei* L2、鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* L8、类植物乳杆菌 *Lactobacillus paraplantarums* L13、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* YTL1、鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* YTL2、短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* YTL3、消化乳杆菌 *Digestion of Lactobacillus* YTL4、植物乳杆菌 *Lactobacillus paraplantarums*

YTL5、植物乳杆菌 *Lactobacillus paraplantarum* YTL6、发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum* YTL7、戊糖乳杆菌 *Lactobacillus pentosus* YTL8、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei* YTL9、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* YTL10)和 12 株酵母菌(异常毕赤 *Pichia anomala* H2、H5、H7、H10, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Hansen WF1、WF17、WF38、WF58、WLS21、PF14、YN6、4#);西北农林科技大学食品科学与工程学院健康食品制造与安全控制研究实验室。

## 1.2 方法

1.2.1 菌株活化 将保存在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30%甘油中的乳酸菌和酵母按 1%的比例分别接种在无菌 MRS 肉汤和 YPD 培养基中,使乳酸菌和酵母单独复苏并繁殖,并在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h。每种益生菌进行两次传代培养,得到发酵种子液。

1.2.2 藜麦发酵液的制备 将藜麦种子用粉碎机粉碎,过 60 目筛,得到藜麦面粉。藜麦面粉在密封容器中于  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  干热灭菌 15 min<sup>[24-25]</sup>。向面粉中按 10 mL/100 g 的接种量加入发酵种子液,将面粉与无菌水以  $m_{\text{面粉}}:V_{\text{无菌水}}$  为 1:2 (g/mL)的比例混合后,接种乳酸菌的面粉在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中固态发酵 72 h;酵母在  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中固态发酵 72 h。发酵结束后,将藜麦发酵物在蒸馏水中以  $m_{\text{发酵物}}:V_{\text{无菌水}}$  为 1:10 (g/mL)的比例稀释,然后在室温 $[(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}]$ 下搅拌 1 h。将获得的混合物于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 400 r/min 离心 10 min,上清液经 Whatman 定性滤纸过滤,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  贮藏供下一步分析<sup>[26]</sup>。

1.2.3 ACE 抑制活性的测定 参考 Deng 等<sup>[6]</sup>的方法,修改如下:将 50  $\mu\text{L}$  发酵液与 30  $\mu\text{L}$  HHL 混合预热 5 min,添加 ACE 开始反应。在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保持反应 30 min,然后添加 80  $\mu\text{L}$  1 mol/L HCl 以停止反应。溶液过 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜,将 10  $\mu\text{L}$  反应溶液注入配备安捷伦 TC-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ )的 RP-HPLC 中,以测量马尿酸(HA)的浓度。色谱条件:流动相乙腈/超纯水(0.1% TFA)的比例为 25/75,等度洗脱,流速为 0.5 mL/min,柱温为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。按式(1)计算 ACE 抑制活性。

$$R = \frac{A-B}{A} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——ACE 抑制活性,%;

A——空白对照组测定得到的马尿酸峰面积;

B——添加样品后测定得到的马尿酸峰面积。

在测定条件下抑制 50% ACE 活性所需的样品浓度定义为 IC<sub>50</sub>。

1.2.4 高 ACE 抑制菌株的筛选 将 18 株乳酸菌和 12 株酵母菌分别发酵藜麦制备降压肽,以无菌接种的面粉为

对照组,对得到的发酵液进行 ACE 抑制活性测定,筛选出具有高抑制活性的乳酸菌或酵母菌株。

1.2.5 单因素试验 选取接种量(5.0%,7.5%,10.0%,12.5%,15.0%)(固定水平为 10.0%)、发酵时间(24,48,72,96,120 h)(固定水平为 72 h)、发酵温度(31,34,37,40,43  $^{\circ}\text{C}$ )(固定水平为 37  $^{\circ}\text{C}$ )3 个因素的 5 个水平进行单因素试验,通过对各个条件下制备的藜麦发酵液的 ACE 抑制率进行测定,选取较优的条件进行正交试验。

1.2.6 正交试验 在单因素试验的基础上,选取 3 个试验因素中各自较优的 3 个水平,以 ACE 抑制率为指标,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>1</sup>)正交试验设计,确定最佳发酵工艺。

1.2.7 发酵液中肽的液质鉴定及筛选 使用配备有纳流毛细管液相色谱 Easy-nLC 1200 的三合一超高分辨组合液质联用仪鉴定 ACE 发酵液中的肽段。将冻干样品溶解在含有 0.1%甲酸的去离子水中,进行纳米液相色谱分离。流动相 A 为含 0.1%甲酸的超纯水,流动相 B 为含 0.1%甲酸的乙腈-超纯水( $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{超纯水}}$  = 4:1)。梯度洗脱过程:B 相在 50 min 内由 4%线性增加到 50%,在随后的 4 min 内 B 相增加到 100%,并保持 6 min。洗脱肽的序列鉴定采用 MS/MS 分析,标准化碰撞能量 30%;扫描范围  $m/z$  375~1 500。质谱原始文件使用 Proteome Discovered 2.2 检索 NCBI 和 BIOPEP 藜麦蛋白数据库进行筛选。

1.2.8 体内试验 将 24 只 11 周龄雄性 SHR,18 只 WKY 在标准条件下适应性喂养 7 d。SHR 随机分成数量相等的生理盐水组、NIFRPFAPEL 组、AALEAPRILNL 组和卡托普利组 4 组。同样的,WKY 随机分成数量相等的 NIFRPFAPEL、AALEAPRILNL 和生理盐水 3 组。各组均以 10 mg/kg·BW 的剂量标准灌胃,然后采用 CODATM Monitor 测定大鼠灌胃 0,2,4,6,8 h 时尾动脉的收缩压(SBP)和舒张压(DBP),以观察血压变化。根据《实验动物护理和使用指南》(美国国立卫生研究院第 85-23 号出版物,修订版),所有动物都接受了人道护理。

1.2.9 统计分析 试验中 ACE 抑制活性的测定均进行 3 次重复,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。通过 SPSS 18.0 版对数据进行统计分析,并使用软件 Origin 2018 绘图。使用方差分析(ANOVA)中的 Duncan 检验来测试平均值之间的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 高 ACE 抑制活性菌株的筛选

由图 1 可知,作为对照的未经益生菌发酵的藜麦,其 ACE 抑制率为 $(52.06\pm 3.60)\%$ ,表明藜麦本身就具有较好的 ACE 抑制活性。其中 25 株菌固态发酵产生的藜麦发酵液的 ACE 抑制率较对照组显著提高( $P < 0.05$ ),抑

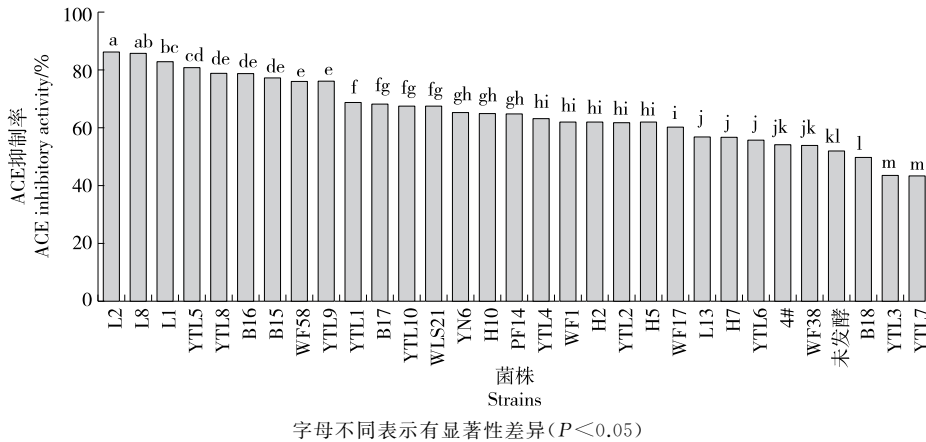


图 1 30 株益生菌发酵藜麦制备的发酵液的 ACE 抑制率

Figure 1 ACE inhibition rate of fermentation broth prepared by fermenting quinoa with 30 probiotic strains

制效果最好的菌株为 *Lactobacillus paracasei* L2(副干酪乳杆菌),发酵液的 ACE 抑制率高达(86.50±0.25)%,显著高于除 *Lactobacillus rhamnosus* L8(鼠李糖乳杆菌)以外的菌株发酵液的(P<0.05),其次为鼠李糖乳杆菌 L8,其 ACE 抑制率为(85.74±0.62)%。3 株菌固态发酵藜麦后的 ACE 抑制率与对照组无显著差异,分别为酿酒酵母 4#、WF38 和嗜酸乳杆菌 B18,2 株菌固态发酵藜麦后的 ACE 抑制率显著降低(P<0.05),分别为短乳杆菌 YTL3 和发酵乳杆菌 YTL7,表明大多益生菌能够在生长繁殖过程中,利用自身的酶分解藜麦产生具有 ACE 抑制活性的物质,而少数菌则利用一些 ACE 抑制活性物质进行生长繁殖,导致发酵液的 ACE 抑制率下降。藜麦发酵液的 ACE 抑制活性因菌株的不同而显现出不同的效果。Ayyash 等<sup>[24-25]</sup>利用双歧杆菌、乳酸菌罗伊氏乳杆菌 K777 和植物乳杆菌 K779,对奎奴亚藜采用固态发酵法进行发酵时,也表现出 ACE 抑制活性增强作用。试验中的副干酪乳杆菌 L2 的 ACE 抑制作用高于 Ayyash 等<sup>[24-25]</sup>报道的几株菌,表明副干酪乳杆菌 L2 是一株潜在的利用藜麦蛋白的优势菌株。因此,选取该菌株作为后续研究的目标菌株。

2.2 发酵藜麦制备 ACE 抑制肽的单因素试验

2.2.1 接种量对制备 ACE 抑制肽的影响 由图 2 可以看出,藜麦发酵液的 ACE 抑制率随接种量的变大先增后降,在接种量为 7.5%时藜麦发酵液的 ACE 抑制率最高。这是由于接种量较低时,菌株无法充分分解藜麦,产生的 ACE 抑制活性物质较少,致使 ACE 抑制活性较低;而接种量较高时,菌株会利用分解得到的 ACE 抑制活性物质为其生长繁殖提供营养,从而造成 ACE 抑制率下降。故将 7.5%作为制备降压藜麦发酵液最佳的接种量。

2.2.2 发酵时间对制备 ACE 抑制肽的影响 由图 3 可以看出,藜麦发酵液的 ACE 抑制率随发酵时间的延长先增长后下降。在发酵 72 h 时,藜麦发酵液的 ACE 抑制活

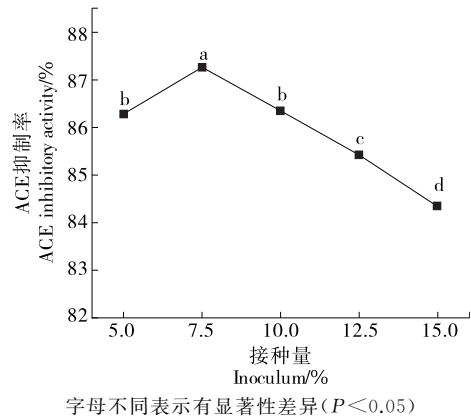


图 2 接种量对制备 ACE 抑制肽的影响

Figure 2 Effects of inoculum on preparation of ACE inhibitory peptides

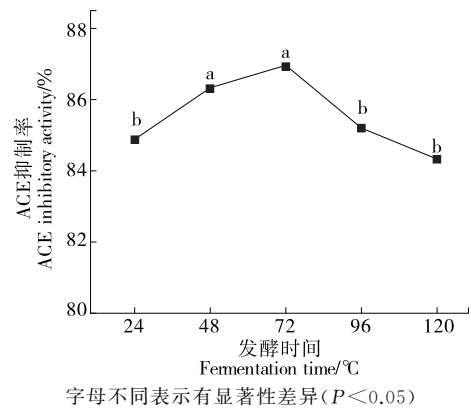


图 3 发酵时间对制备 ACE 抑制肽的影响

Figure 3 Effects of fermentation time on preparation of ACE inhibitory peptides

性最强。再延长发酵时间,ACE 抑制活性不增反降,可能是由于发酵液中的菌株过多,藜麦分解成 ACE 抑制活性物质的量远远不及其生长和繁殖所需的量,从而导致发

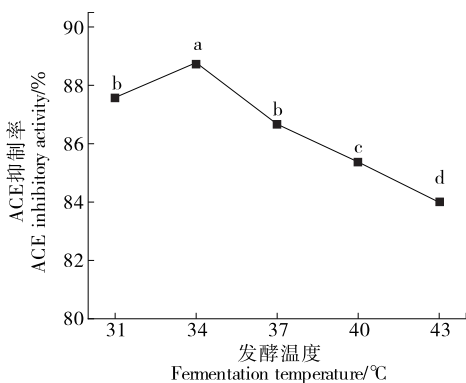


酵液中的活性物质含量下降,对 ACE 的抑制率也随之降低。故将 72 h 作为菌株发酵藜麦最适发酵时间。

2.2.3 发酵温度对制备 ACE 抑制肽的影响 如图 4 所示,发酵液 ACE 抑制率随发酵温度的升高先缓慢增加后下降,在 34 °C 达到最大。这可能是由于在 34 °C 时,该菌株能够适应生长,且是所产蛋白酶的最适酶解温度,随着温度的继续增加,菌株偏离适宜生长温度和蛋白酶最适酶解温度,降压活性物质制备量减少,ACE 抑制率下降。故将 34 °C 作为制备降压藜麦发酵液的最佳发酵温度。

2.3 发酵藜麦制备 ACE 抑制肽的正交试验

根据单因素试验结果确定正交试验的因素与水平取值见表 1,正交试验结果见表 2。



字母不同表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ )

图 4 发酵温度对制备 ACE 抑制肽的影响

Figure 4 Effects of fermentation temperature on preparation of ACE inhibitory peptides

表 1 藜麦发酵条件正交试验因素及水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels of quinoa fermentation conditions

水平	A 接种量 / %	B 发酵时间 / h	C 发酵温度 / °C
1	5.0	24	31
2	7.5	48	34
3	10.0	72	37

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验

Table 2  $L_9(3^4)$  Orthogonal test

试验号	A	B	C	ACE 抑制率 / %
1	1	1	1	84.21±0.39
2	1	2	2	90.28±0.01
3	1	3	3	85.23±0.34
4	2	1	2	85.98±0.13
5	2	2	3	88.37±0.44
6	2	3	1	85.53±0.17
7	3	1	3	82.62±0.22
8	3	2	1	84.21±0.39
9	3	3	2	90.28±0.01
-----				
$k_1$	259.72	252.81	253.95	
$k_2$	259.88	262.86	266.54	
$k_3$	257.11	261.04	256.22	
R	2.77	10.05	12.59	

根据表 2 可知,各因素对藜麦发酵液的 ACE 抑制率影响大小依次为  $C > B > A$ ,制备藜麦发酵液的最优组合为  $C_2 B_2 A_2$ 。如表 3 所示,基于藜麦发酵液 ACE 抑制率建立的模型  $P$  值  $< 0.05$ ,表明该模型显著,说明该模型拟合程度较好。根据结果表明,3 个因素对藜麦发酵液 ACE 抑制率均有显著影响。通过各因素水平间的方差分析表明,接种量为 5% 和 7.5% 时,ACE 抑制率显著高于 10%;发酵时间为 48 h 和 72 h 时,ACE 抑制率显著高于 24 h;发酵温度为 34 °C 和 37 °C 时,ACE 抑制率显著高于 31 °C。结合试验结果, $C_2 B_2 A_1$  和  $C_2 B_2 A_2$  均可作为最优水平组合。

通过对两个最优组合的发酵条件进行验证实验,结果发现  $C_2 B_2 A_1$  和  $C_2 B_2 A_2$  的 ACE 抑制率分别为  $(90.41 \pm 0.16) \%$ ,  $(89.55 \pm 0.18) \%$ ,故选取  $C_2 B_2 A_1$  作为最优藜麦发酵条件,即接种量为 5%,发酵时间为 48 h,发酵温度为 34 °C。

表 3 正交试验方差分析表<sup>†</sup>

Table 3 Orthogonal test ANOVA table

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
校正模型	93.811 <sup>a</sup>	6	15.635	11.908	0.000	*
截距	132 326.413	1	132 326.413	100 783.614	0.000	*
A	22.311	2	11.155	8.496	0.006	*
B	35.421	2	17.711	13.489	0.001	*
C	36.080	2	18.040	13.740	0.001	*
-----						
误差	14.443	11	1.313			
总计	132 434.667	18				
校正的总计	108.254	17				

<sup>†</sup> \* 表示  $P < 0.05$ ,差异显著。

## 2.4 发酵液中肽的液质鉴定及筛选

通过质谱对发酵液鉴定后,得到的肽段较多无法全部合成检验其降压效果。比对 BIOPEP 数据库筛选出了最具有潜在降压能力的肽段 AALEAPRILNL 和与文献 [27] 的 NIFRPF 有一段相同序列的肽段 NIFRPFAPEL 进行了合成,通过体外活性测定其  $IC_{50}$  值分别为  $(79.72 \pm 0.21)$ ,  $(49.02 \pm 0.54)$   $\mu\text{mol/L}$ , ACE 抑制活性较好。两条肽的质谱图见图 5。

## 2.5 体内试验

对 NIFRPFAPEL、AALEAPRILNL 体内降压效果进行了测定,结果见图 6。

由图 6(a)和图 6(b)可知,灌胃 NIFRPFAPEL 对 SHR 有显著的降压效果,0~4 h 时,SHR 的 SBP、DBP 均逐渐降低,在 4 h 时达到最低,分别下降了  $(2.67 \pm 0.21)$ ,  $(3.46 \pm 0.01)$  kPa;4 h 后药效减弱,血压逐渐回升,在 8 h 时基本回升至初始血压,表明 NIFRPFAPEL 体内降压效果显著。灌胃 AALEAPRILNL 对 SHR 的降血压趋势与灌胃 NIFRPFAPEL 类似,在灌胃 4 h 时血压下降最多,分别下降了  $(29.36 \pm 0.54)$ ,  $(22.33 \pm 0.77)$  kPa,表明 AALEAPRILNL 也是一种具有较好的体内降压效果的肽段。

NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 均能在体内发挥

一定的降压作用,4 h 时二者的血压下降至最低,然而二者的降血压效果却有所差异。相同剂量下,AALEAPRILNL 的 SBP 降血压效果比 NIFRPFAPEL 好,而其 DBP 降血压效果比 NIFRPFAPEL 略差。这与两个肽的体外抑制效果表现出了不同的情况,说明肽进入体内还会因其不同生化性质导致效果发生变化,因此进行体内试验是验证其活性大小最有效的方法。在对比 8 h 时的数据可以看出 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 的 SBP、DBP 血压下降值均回升至初始血压值附近,表明两种肽的降压持久性相似。

在灌胃卡托普利之后,SHR 的 SBP 和 DBP 均持续降低,在 6 h 时降到最低,分别降低了 44.38,55.69 kPa,在第 8 h 时 SHR 的血压有所回升。与之相比,NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 能够在短时间内使 SHR 血压下降到最低值。说明 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 具有显著的降压作用,但降压效果和持久性不如卡托普利。

图 6(c)和图 6(d)分别为灌胃 WKY 同等剂量的 NIFRPFAPEL、AALEAPRILNL 和生理盐水 8 h 内大鼠的 SBP 和 DBP 变化情况,经方差分析发现,分别灌胃 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 后 WKY 的 SBP 和 DBP 值与 0 h WKY 的无明显差异 ( $P > 0.05$ ),表明 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 对 WKY 血压无影响。

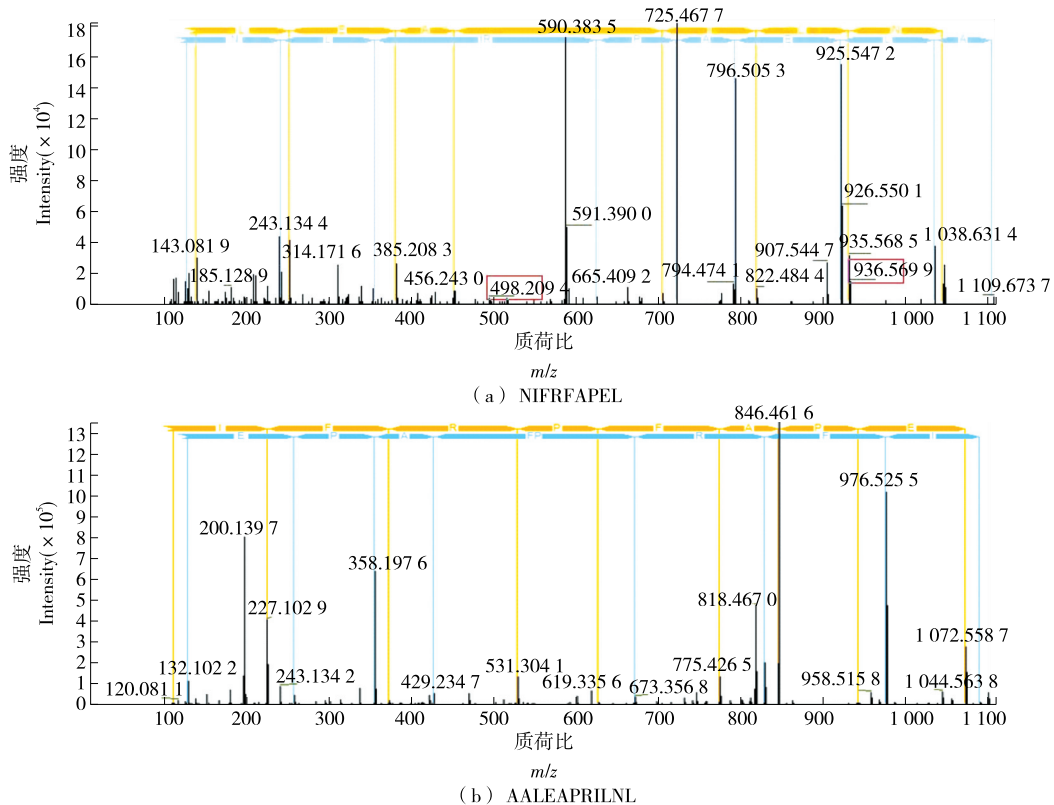


图 5 ACE 抑制肽 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 的 MS/MS 谱图

Figure 5 MS/MS spectrum of ACE inhibitory peptides NIFRPFAPEL and AALEAPRILNL

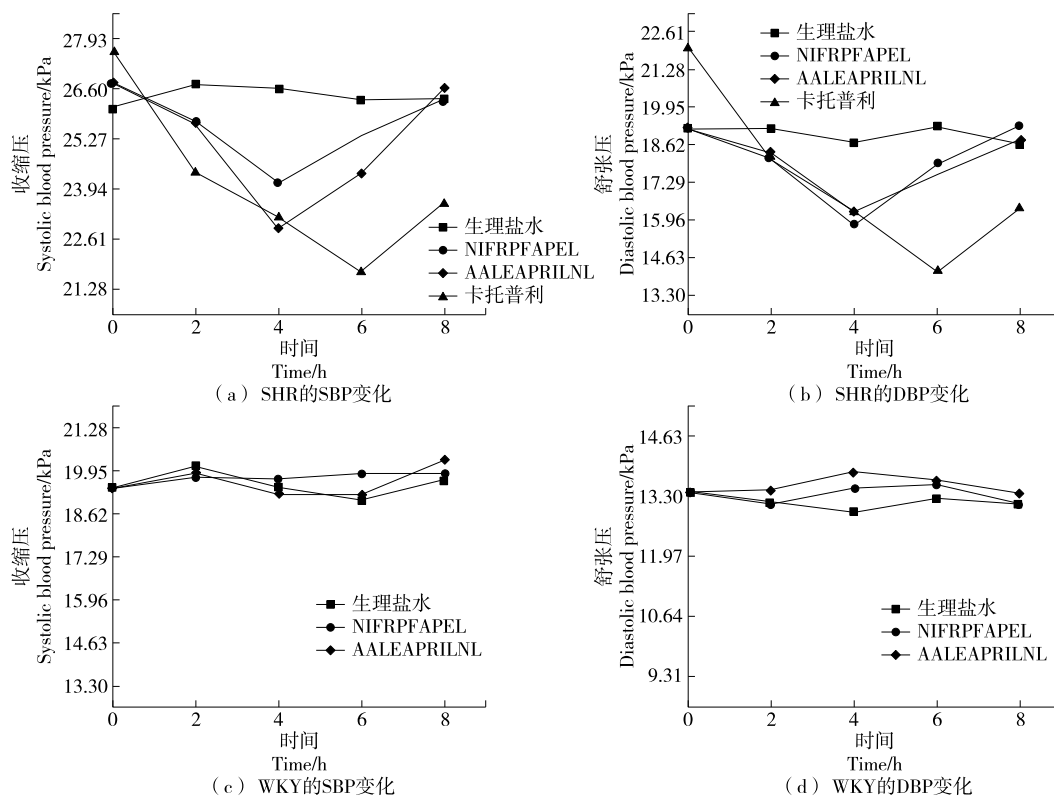


图 6 灌胃各样品后大鼠 8 h 内的血压变化图

Figure 6 Changes of blood pressure in rats within 8 hours after gavage of each sample

### 3 结论

试验表明, *Lactobacillus paracasei* L2 菌株发酵藜麦制备血管紧张素转换酶抑制发酵液的最佳发酵条件为接种量 5%, 发酵时间 48 h, 发酵温度 34 °C, 在此条件下血管紧张素转换酶抑制率最高达(90.41 ± 0.16)%。通过液质鉴定和筛选得到的两条抑制效果较好的肽 NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL, 其原发性高血压大鼠体内试验均能够在大鼠体内显现出显著的降血压作用, 且均对 Wistar-Kyoto 大鼠的血压不产生影响。综上, 藜麦是一种优良的血管紧张素转换酶抑制发酵液制备来源, 能够作为降血压功能食品的原料。根据体内试验推测, NIFRPFAPEL 和 AALEAPRILNL 不会对正常人群的血压造成影响, 在降血压功能食品或者药品研发方面有重要的潜力。

#### 参考文献

[1] 王增武, 杨瑛, 王文, 等. 我国高血压流行新特征: 中国高血压调查的亮点和启示[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(10): 937-939.  
WANG Z W, YANG Y, WANG W, et al. New characteristics of hypertension epidemic in China: Highlights and enlightenment of hypertension survey in China[J]. Chinese Circulation Journal, 2018, 33(10): 937-939.

[2] 陈冰冰, 欧颖仪, 叶灏铎, 等. 富硒辣木叶蛋白 ACE 抑制肽的酶

解工艺优化及活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 1-9.  
CHEN B B, OU Y Y, YE H D, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process and activity of ACE inhibitory peptides from selenium-rich moringa oleifera leaves protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 1-9.

[3] 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.

[4] ERDÖS E G, JACKMAN H L, BROVKOVYCH V, et al. Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2002, 34(12): 1 569-1 576.

[5] PACURARI M, KAFOURY R, TCHOUNWOU P B, et al. The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling [J]. International Journal of Inflammation, 2014, 2 014: 689360.

[6] DENG Z Z, LIU Y J, WANG J, et al. Antihypertensive effects of two novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) in spontaneously hypertensive rats (SHRs) [J]. Marine drugs, 2018, 16(9): 299.

[7] XIE J L, CHEN X J, WU J J, et al. Antihypertensive effects, molecular docking study, and isothermal titration calorimetry assay of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from *Chlorella*

- vulgaris[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(6): 1 359-1 368.
- [8] CUI P F, YANG X, LI Y L, et al. The milk macromolecular peptide: Preparation and evaluation of antihypertensive activity in rats[J]. Food & Function, 2020, 11(5): 4 403-4 415.
- [9] CHOE J, SEOL K H, KIM H J, et al. Isolation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from thermolysin-injected beef *M. longissimus* [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2019, 32(3): 430-436.
- [10] ZHANG B Y, LIU J B, LIU C, et al. Bifunctional peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in vitro from egg white hydrolysates [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(9): e13347.
- [11] 章禹航, 翟雨, 韩玥颖, 等. 鲑鱼加工副产物水解液中 ACE 抑制肽分离纯化研究[J]. 农产品加工, 2021(13): 6-8, 16.  
ZHANG Y H, ZHAI Y, HAN Y Y, et al. Study on isolation and purification of ace inhibitory peptides from spanish mackerel processing by products hydrolysate [J]. Farm Products Processing, 2021(13): 6-8, 16.
- [12] KARAMI Z, PEIGHAMBARDoust S H, HESARI J, et al. Identification and synthesis of multifunctional peptides from wheat germ hydrolysate fractions obtained by proteinase K digestion [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(4): e12800.
- [13] FÖSTE M, ELGETI D, BRUNNER A K, et al. Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction[J]. Food and Bioproducts Processing, 2015, 96: 20-26.
- [14] NAVRUZ-VARLI S, SANLIER N. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Journal of Cereal Science, 2016, 69: 371-376.
- [15] 刘雪, 宋菁景, 林小晖. 藜麦营养和生物活性成分研究进展[J]. 食品安全导刊, 2022(7): 135-137.  
LIU X, SONG J J, LIN X H. Research progress on nutrition and bioactive components of *Chenopodium quinoa* Willd. [J]. China Food Safety, 2022(7): 135-137.
- [16] 王天, 江含秀, 路丽妮, 等. 藜麦可溶性膳食纤维提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(2): 137-146.  
WANG T, JIANG H X, LU L N, et al. Optimization of extraction process of quinoa soluble dietary fiber and its antioxidant activity [J]. China Food Additives, 2022, 33(2): 137-146.
- [17] VILCACUNDO R, MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, HERNÁNDEZ-LEDESMA B. Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 531-539.
- [18] VILCACUNDO R, MIRALLES B, CARRILLO W, et al. In vitro chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Research International, 2018, 105: 403-411.
- [19] MUDGIL P, KILARI B P, KAMAL H, et al. Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes [J]. Journal of Cereal Science, 2020, 96: 103130.
- [20] NONGONIERMA A B, LE MAUX S, DUBRULLE C, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties [J]. Journal of Cereal Science, 2015, 65: 112-118.
- [21] 王姣琳, 岳田利, 袁亚宏. 红曲霉与乳酸菌混合发酵藜麦制备降压肽[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 217-224.  
WANG J L, YUE T L, YUAN Y H. The preparation of antihypertensive peptides from quinoa by mixed fermentation with monascus and lactic acid bacteria [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 217-224.
- [22] HAJFATHALIAN M, GHELICHI S, GARCÍA-MORENO P J, et al. Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(18): 3 097-3 129.
- [23] CRUZ-CASAS D E, AGUILAR C N, ASCACIO-VALDÉS J A, et al. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides [J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021, 3: 100047.
- [24] AYYASH M, JOHNSON S K, LIU S Q, et al. Cytotoxicity, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat by *Bifidobacterium* species: In vitro investigations [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 95: 295-302.
- [25] AYYASH M, JOHNSON S K, LIU S Q, et al. In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp [J]. Food Chemistry, 2019, 275: 50-58.
- [26] KLUPSAITE D, JUODEIKIENE G, ZADEIKE D, et al. The influence of lactic acid fermentation on functional properties of narrow-leaved lupine protein as functional additive for higher value wheat bread [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 180-186.
- [27] ZHENG Y J, WANG X, ZHUANG Y L, et al. Isolation of novel ACE-Inhibitory and antioxidant peptides from quinoa bran albumin assisted with an in silico approach: Characterization, in vivo antihypertension, and molecular docking [J]. Molecules, 2019, 24(24): 4 562.