

loids from Australasian and southeast Asian *Huperzia* [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(9): 1073-1078.

[11] 黄雅祺, 向 琴, 钱继伟. 三种千层塔中石杉碱甲含量测定[J]. 中国民族民间医药杂志, 2014, 23(3): 20.

[12] 郑雅焯, 刘海元, 张方方, 等. HPLC 法测定蛇足石杉及闽浙马尾杉不同部位的石杉碱甲含量[J]. 福建中医药大学学报, 2013 23(3): 42-43.

[13] 王 姗, 王 沫. HPLC 法测定石杉属植物中石杉碱甲的含量[J]. 商洛学院学报, 2012, 26(2): 38-41.

[14] 邵 浩, 张 丽, 吕会芳, 等. HPLC 测定九龙山国家自然保护区石杉科 4 种植物石杉碱甲的含量[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(6): 67-69.

[15] 黄 静, 杨理明, 李齐激, 等. HPLC 法测定台江产千层塔中的石杉碱甲的含量[J]. 贵州医药, 2007, 31(7): 644-645.

[16] 孙远明, 余红英, 杨跃生, 等. HPLC 法测定蛇足石杉中石杉碱甲含量[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1078-1080.

[17] 杜 次, 李 菁, 田向荣, 等. 湘西蛇足石杉不同部位石杉碱甲分布及与 LDC 表达的关系[J]. 中药材, 2013, 36(3): 361-364.

[18] Ma X, Tan C, Zhu D, *et al.* Huperzine a from *huperzia* species-an ethnopharmacological review [J]. *J ethnopharmacol*, 2007, 113(1): 15-34.

[19] Goodger J Q D, Whincup A L, Field A R, *et al.* Variation in huperzine A and B in Australasian *Huperzia* species[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2008, 36(8): 612-618.

[20] Szypuła W, Pietrosiuk A, Suchocki P, *et al.* Somatic embryogenesis and in vitro culture of *huperzia* selago shoots as a potential source of huperzine A [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(6): 1443-1452.

[21] Ma X, Gang D R. *In vitro* production of huperzine a, a promising drug candidate for alzheimer's disease[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(10): 2022-2028.

[22] 吴 荭, 庄 平, 冯正波, 等. 中国蛇足石杉资源调查与评估[J]. 自然资源学报, 2005, 20(1): 59-67.

[23] 王 峻, 潘胜利. 湖南省石杉属植物中石杉碱甲含量的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(21): 1616-1618.

[24] 环境保护部和中国科学院. 中国生物多样性红色名录-高等植物卷 [M/OL]. 2013-09-02. <http://www.mep.gov.cn/gkml/hbb/bgg/201309/W020130917614244055331.pdf>

麦芽蛋白质组成分析及其酶解物 ACE 抑制活性

张月圆^{1,2}, 刘 露^{1,2}, 陈佩瑶^{1,2}, 冀会方^{1,2}, 李玲玲^{1,2}, 王灵芝^{1*}

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 分析麦芽蛋白质组成, 并研究其清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白 4 类组分酶解产物的血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制活性。**方法** 采用顺序抽提法依次提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白 4 类组分, 并采用凯氏定氮法及 SDS-PAGE 电泳进行定量和定性分析; 各蛋白组分用胃蛋白酶水解, 经超滤 (截留分子量 3 kD) 后收集滤液, 获得小分子肽组分, RP-HPLC 法进行 ACE 抑制活性评价。**结果** 麦芽总蛋白含有量为 10.27%, 其中清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白分别占总蛋白含有量的 24.70%、9.25%、20.09% 和 33.30%。清蛋白酶解产物 (小于等于 3 kD) 对 ACE 具有最高的抑制活性, 在质量浓度 0.01 mg/mL 下的抑制率为 33.28%。相反, 谷蛋白酶解产物 (小于等于 3 kD) 对 ACE 具有一定的促进活性, 同一质量浓度下的抑制率为-10.50%。**结论** 麦芽清蛋白含有量较为丰富, 其多肽组分具有明确的体外 ACE 抑制活性, 可进一步开发降压活性成分。

关键词: 麦芽; 清蛋白; 球蛋白; 醇溶蛋白; 谷蛋白; 抑制活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0642-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.028

Analysis of protein compositions and study ACE inhibitory activities of their hydrolysates in raw malt

收稿日期: 2017-09-06

基金项目: 北京中医药大学基本科研业务费自助选题项目 (2015-JYB-JSM S026); 北京中医药大学发展基金 (2016)

作者简介: 张月圆 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药活性蛋白及多肽的功能。Tel: 18810612568, E-mail: 13521311896@163.com

* 通信作者: 王灵芝 (1973—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为中药活性蛋白及多肽的功能。Tel: (010) 84738621, E-mail: wanglz@bucm.edu.cn

ZHANG Yue-yuan^{1,2}, LIU Lu^{1,2}, CHEN Pei-yao^{1,2}, JI Hui-fang^{1,2}, LI Ling-ling^{1,2},
WANG Ling-zhi^{1*}

(1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

KEY WORDS: raw malt; albumin; globulin; prolamine; glutelin; inhibitory activities

麦芽为禾本科一年生草本植物大麦（*Hordeum vulgare* L.）的成熟籽粒经水浸泡后，在适宜的温度、湿度下，待幼芽长至约 5 mm 时晒干或低温干燥而得，是一种药食同源性传统中草药，具有行气消食、健脾开胃、退乳消胀的作用^[1]。研究表明，麦芽具有广泛的药理活性，如催乳作用^[2]、回乳作用^[3]、抗结肠炎^[4]等。血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）为抗高血压一线药物之一，其可分为 3 类，即含巯基或巯基类（卡托普利等）、含羧基类（赖诺普利等）及含次磷酸基类（西罗普利等）^[5]，尽管它们的降压效果明显，但均存在如咳嗽、皮疹、味觉功能紊乱及白细胞减少等不同程度的副作用^[6]。与传统降压药物相比，食源来源的 ACE 抑制肽具有效果温和、专一、持久且对正常人群血压无影响的特点而备受关注^[7-8]。大量的 ACE 抑制肽从不同食物蛋白如酪蛋白^[9]、小麦蛋白^[10]、玉米蛋白^[11]及大豆蛋白^[12]等水解物中被分离出来。Gangopadhyay^[13]等的研究表明，使用胃蛋白酶水解大麦蛋白获得的小于等于 3 kD 水解物在 1 mg/mL 浓度下对 ACE 的抑制率达 70.37%。目前国内外对麦芽蛋白、多肽的研究报道较少，故本实验将对麦芽的蛋白质组成及分子量大小、氨基酸组成进行研究，并初步探究其蛋白酶解产物的 ACE 抑制活性，为从麦芽中制备食源性 ACE 抑制肽及其在临床上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 生麦芽（批号 52061201，河北）购自北京同仁堂药店，经北京中医药大学刘春生教授鉴定为禾本科一年生草本植物大麦（*Hordeum vulgare* L.）的成熟果实经发芽干燥制得。胃蛋白酶（批号 01535535，日本 Sigma 公司）；马尿酸-组氨酸-亮氨酸（批号 1001510772，日本 Sigma 公司）；血管紧张素转化酶（批号 1001926470，日本 Sigma 公司）；卡托普利（批号 100318-200602，中国药品生物制品检定所）。

1.2 方法

1.2.1 生麦芽主成分分析 根据药典中的凯氏定氮法、索氏提取法、马弗炉法及烘干法分别进行蛋

白质、粗脂肪、灰分和水分含量测定^[1]。其中，蛋白质含量计算公式如下：

$$\text{粉末样品中蛋白质含量} = (V_2 - V_1) \times 0.01 \times 14 \times 6.25 \times N / (C \times 1\,000) \times 100\%$$

$$\text{提取液样品中蛋白质含量 (mg)} = (V_2 - V_1) \times 0.01 \times 14 \times 6.25 \times N$$

式中， V_2 为滴定样品所用 HCl 平均 mL 数， V_1 为滴定空白所用 HCl 为平均 mL 数，0.01 为 HCl 浓度，14 为氮的原子量，6.25 为系数， N 为样品稀释倍数， C 为称样量。

采用旋光法^[14]测定麦芽的淀粉含量。计算公式如下：

$$\omega = \frac{2\,000}{181.5} \times \left[\frac{2.5\alpha_1}{m_1} - \frac{5\alpha_2}{m_2} \right] \times \frac{100}{\omega_1}$$

式中， α_1 为总物质的旋光度值， α_2 为醇溶物质的旋光度值，181.5 为大麦纯淀粉在 589.3 nm 波长下的比旋光度， ω_1 为样品中干物质质量分数（%）， m_1 为总样品的质量， m_2 为醇溶样品的质量。

1.2.2 蛋白质顺序抽提 使用高速万能粉碎机将生麦芽粉碎后过 40 目筛，石油醚脱脂（固液比 = 1 : 4）4 h，5 000 r/min 离心 15 min，弃上清，沉淀真空干燥。脱脂后的麦芽粉末分别经双蒸水、0.5 mol/L NaCl、70% 乙醇（5% β -巯基乙醇，0.5% NaAc）、0.012 5 mol/L 硼酸钠缓冲液（1% SDS，2% β -巯基乙醇）依次提取 4 类蛋白质组分^[15]。将各蛋白组分提取液低温透析 24 h，透析液冷冻干燥后置于 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2.3 SDS-PAGE 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[16]测定麦芽 4 类蛋白质组分的分子量。将各组分配制成适当浓度后与上样缓冲液按 3 : 1 混合，100 ℃ 变性 5 min，取 20 ~ 50 μ g 蛋白上样。起始电流为 10 mA，待样品进入分离胶后改为 30 mA。当蓝色指示剂迁移至距胶底 1.5 cm 时，终止电泳。将分离胶置于考马斯亮蓝 R-250 中过夜染色，后置于脱色液中进行脱色。

1.2.4 氨基酸含量测定 将精密称定的生麦芽粉末溶于 6 mol/L HCl，110 ℃ 真空水解 24 h。将

水解产物真空干燥后溶于适量 0.02 mol/L HCl 中，采用日立 L-8900 进行氨基酸含有量测定^[17]。

1.2.5 ACE 抑制肽制备 采用蛋白酶水解法^[18]制备 ACE 抑制肽。胃蛋白酶（0.01 mol/L HCl，pH 2.0，37 ℃）对 4 类蛋白质水解， $[S] = 2\%$ ， $[E]/[S] = 1:10$ 。水解 48 h 后，95 ℃ 变性 5 min，使胃蛋白酶灭活终止反应，冰浴 10 min 后 8 000 r/min 下低温离心 10 min，取上清液备用。

1.2.6 超滤 将“1.2.5”中上清液过截留分子量为 3 kD 的超滤管，以制备小于等于 3 kD ACE 抑制肽组分。采用 Lowry 法^[19]进行多肽浓度测定，并采用 RP-HPLC 法进行 ACE 抑制活性测定。

1.2.7 ACE 抑制活性的测定 采用 RP-HPLC 法^[18]测定小于等于 3 kD 多肽组分的 ACE 抑制活性。使用硼酸缓冲液（0.1 mol/L 硼酸，0.3 mol/L NaCl，pH 8.3）将“1.2.6”中多肽稀释成质量浓度为 0.05 mg/mL 的溶液。反应体系 50 μL（样品溶液 10 μL、ACE 20 μL、底物 HHL 20 μL）37 ℃ 温育 80 min，加入 100 uL 乙腈终止反应。10 000 r/min 离心 10 min，测定反应液中马尿酸的含有量。以终浓度 4×10^{-9} mol/L 的卡托普利为阳性对照组，硼酸缓冲液为空白对照组。样品经 C₁₈ 色谱

柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）进行分析。流动相 100% 乙腈-0.05% TFA 纯水（25：75）；柱温 30 ℃；体积流量 1 mL/min；检测波长 228 nm；进样量 10 μL。ACE 抑制率计算公式如下

ACE 抑制率 = $(A - B) / A \times 100\%$
式中，A 空白对照组 HA 峰面积，B 样品组 HA 峰面积。

2 结果

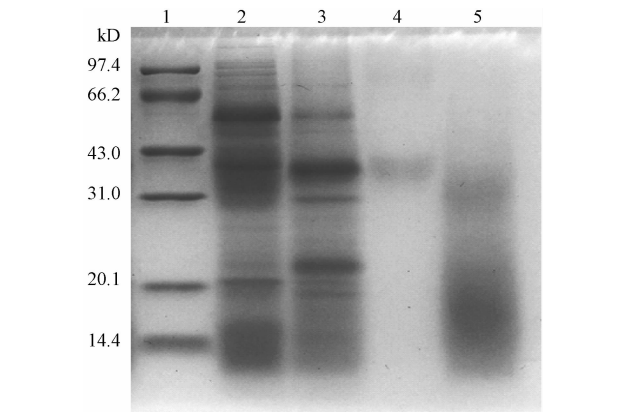
2.1 麦芽主要成分 淀粉为最主要成分，占生麦芽的 52.42%，其次是蛋白质占 10.27%；而粗脂肪、水分和灰分的含有量分别为 6.67%、8.74% 和 2.41%。

2.2 麦芽蛋白组成 采用凯氏定氮法测定各蛋白质组分的含有量，结果见表 1。谷蛋白含有量最高；其次为清蛋白。采用顺序抽提法提取 4 类蛋白质后，仅有 9.02% 的蛋白质存在于残渣中，提取率较高。各蛋白质组分经 SDS-PAGE 电泳后，分离结果见图 1。清蛋白和球蛋白条带较多，在 60 ~ 10 kD 之间均有分布，其中，清蛋白主要分布在 20 ~ 10 kD 和 60 ~ 27 kD 之间；而球蛋白在约 23 和 40 kD 高度表达。醇溶蛋白和谷蛋白分离得到的条带相对较少。

表 1 麦芽蛋白质组分（%）

Tab. 1 Protein compositions of raw malt（%）

指标	清蛋白	球蛋白	醇溶蛋白	谷蛋白	残渣
含有量/（mg·100 mg 鲜重 ⁻¹ ）	2.54	0.95	2.06	3.42	0.93
占总蛋白比例/%	24.70	9.25	20.09	33.30	9.02



1. 标准分子量 2. 清蛋白 3. 球蛋白 醇溶蛋白 5. 谷蛋白
1. molecular marker 2. albumin 3. globulin 4. prolamin 5. glutelin

图 1 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE image

2.3 麦芽氨基酸组成 采用酸水解法进行麦芽氨基酸含有量测定，共检测到 14 种氨基酸，结果见表 2。其中含有量最高的是 Phe，其次是 Glu

和 Val。

表 2 各氨基酸含有量测定结果（mg/100 mg）

Tab. 2 Results of content determination of various amino acids（mg/100 mg）

氨基酸	含有量	氨基酸	含有量
Asp	0.86	Ile ^α	0.55
Thr ^α	0.69	Leu ^α	0.45
Ser	0.85	Phe ^α	3.47
Glu	2.52	Lys ^α	0.38
Gly	0.40	His ^α	0.12
Ala	0.22	Arg ^α	1.19
Val ^α	2.40	Pro	1.01

注：α 为人体必需/半必需氨基酸。

2.4 酶解产物 ACE 抑制活性 采用 RP-HPLC 法测定各蛋白组分酶解产物的 ACE 抑制活性。空白对照组（硼酸缓冲液）无 ACE 抑制活性，因而生成较高量的 HA（见图 2A）；阳性对照组（卡托普利）在 4×10^{-9} mol/L 浓度下 ACE 抑制率为 95.66（见图 2B）；使用胃蛋白酶酶解 4 类蛋白质，测定

酶解产物（小于等于 3 kD）的 ACE 抑制活性，结果见图 3。清、球及醇溶蛋白酶解产物（小于等于 3 kD）在 0.01 mg/mL 浓度下均呈现出不同程度的 ACE 抑制活性。其中，清蛋白酶解产物表现出最高的 ACE 抑制活性，抑制率为 $33.28 \pm 0.99\%$ （见图 2C）。球蛋白和醇溶蛋白对 ACE 的抑制活性较清蛋白酶解产物弱，抑制率分别为 $13.93 \pm 0.78\%$ 和 $8.65 \pm 0.31\%$ 。相反，谷蛋白酶解产物对 ACE 活性具有一定程度的促进作用，其抑制率为 $-10.50 \pm 1.12\%$ 。由此可知，麦芽的 4 类蛋白酶解产物对 ACE 均具有不同程度的抑制或促进作用，需分别探究其生物活性。

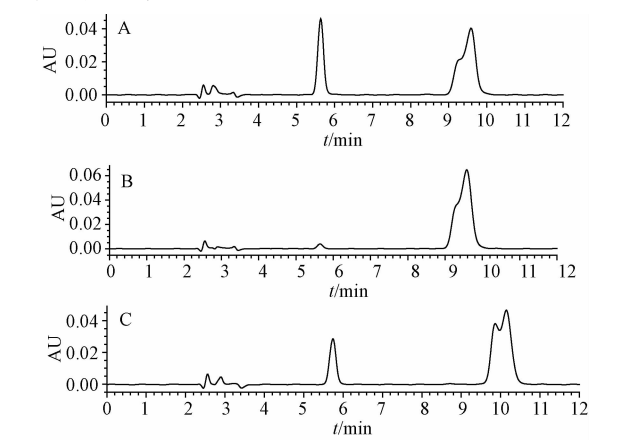


图 2 样品及卡托普利 RP-HPLC 色谱图
Fig. 2 RP-HPLC chromatograms of samples and captopril

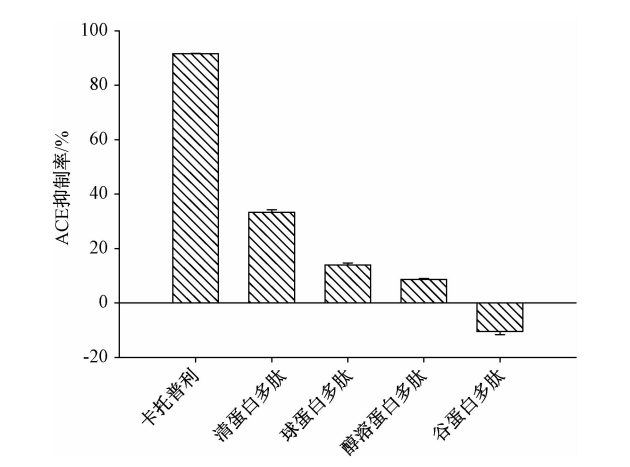


图 3 多肽（≤3 kD）ACE 抑制活性
Fig. 3 ACE inhibitory activities of peptides (≤3 kD)

3 讨论

大麦经过发芽制成麦芽后其营养成分均大大提高，其中总能量提高 0.06 倍，蛋白质、脂肪、维生素和矿物质含量分别提高 2、5、4 和 3 ~ 4 倍^[20]。研究表明，大麦制成麦芽后 ABTS 自由基

清除活性与还原力显著增加，而脂肪酸氧化酶（LOX）活力显著降低^[21]。魏安华^[22]等报道，麦芽提取物可显著降低雌性小鼠血清中的 PRL 水平。麦芽中的麦黄酮具有改善记忆，治疗老年痴呆症的功能^[23]。此外，麦芽中的类黄酮具有一定的 DNA 修复作用^[24]。

麦芽作为一种药食同源性传统中草药，在民间有着广泛的应用价值。目前已有很多就麦芽的抗结肠炎、抗氧化性、助消化和回乳等功能的报道，但对其在防治心血管类疾病的研究却鲜有报道。本研究通过顺序抽提法依次提取 4 类蛋白质组分，并对它们的含有量、分子量分布做较详细的报道。另采用胃蛋白酶水解各蛋白质组分，研究其小于等于 3 kD 酶解产物的体外 ACE 抑制活性。结果表明，清蛋白酶解产物具有良好的 ACE 抑制活性，在质量浓度为 0.01 mg/mL 时的抑制率为 33.28%。此外，球蛋白及醇溶蛋白酶解产物也具有一定的 ACE 抑制活性。以期运用多种色谱技术从这 3 种蛋白质组分酶解产物中分离纯化出高活性 ACE 抑制肽。麦芽多肽类组分具有显著的体外 ACE 抑制活性，为该药临床应用和药效物质基础研究提供了新的实验数据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[2] 刘爱如，庄立品，任遵华，等. 麦芽对哺乳期母鼠乳腺的作用[J]. 山东中医学院学报，1991，15(2)：41-42，73.

[3] 胡烈. 麦芽临床新用[J]. 中国临床医生杂志，2000，28(11)：50-51.

[4] Kanauchi O, Iwanaga T, Andoh A, *et al.* Dietary fiber fraction of germinated barley foodstuff attenuated mucosal damage and diarrhea, and accelerated the repair of the colonic mucosa in an experimental colitis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(2)：160-168.

[5] 黄梅. 血管紧张素转化酶抑制剂药代动力学特征预测模型的研究[D]. 天津：天津大学，2013.

[6] 黄燕，田清清，李谭瑶，等. 亲和色谱法筛选中药中血管紧张素转化酶抑制剂[J]. 中国科学 B 辑：化学，2009，39(8)：760-766.

[7] Ni H, Li L, Guo S S, *et al.* Isolation and identification of an an-giotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from yeast (*saccharomyces cerevisiae*) [J]. *Curr Anal Chem*, 2012, 8(1)：180-185.

[8] Chen C, Chi Y J, Xu W, *et al.* Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21(1)：27-34.

[9] Kohmura M, Nio N, Kubo K, *et al.* Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein[J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(8): 2107-2114.

[10] Matsui T, Li C H, Tanaka T, *et al.* Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma[J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(4): 427-431.

[11] Suh H J, Whang J H, Lee H. A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I-converting enzyme[J]. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(12): 1055-1058.

[12] Shin Z I, Yu R, Park S A, *et al.* His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(6): 3004-3009.

[13] Gangopadhyay N, Wynne K, O'Connor P, *et al.* In silico and in vitro analyses of the angiotensin- I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (Hordeum vulgare) protein concentrates [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 367-374.

[14] GB/T 20378—2006/ISO10520—1997, 原淀粉-淀粉含量的测定-旋光法[S].

[15] Siong H T, Rodney J M, Christopher L B, *et al.* Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals. *Food Res Int*, 2011, 44(4): 1075-1082.

[16] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2004: 216-223.

[17] Wang L Z, Xu C Z, Qu M L, *et al.* Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from *zea mays* ssp. *mexicana* into cultivated maize[J]. *J Cereal Sci*, 2008, 48(2): 387-393.

[18] Yuan J, Liang Y, Cui S, *et al.* Angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of adlay (coix lacryma-jobi l. var. ma-yuen stapf) glutelin hydrolysate[J]. *Ital J Food Sci*, 2014, 26(3): 282-288.

[19] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.

[20] 栗婉媛, 张菊芬. 麦芽提取物在发酵饮料中的应用[J]. 饮料工业, 2011, 14(7): 15-17.

[21] 邱然, 郭建华, 石殿瑜, 等. 麦芽抗氧化性与常规指标相关性分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 67-71.

[22] 魏安华, 蔡亚玲, 吴金虎, 等. 麦芽提取物对高泌乳素血症小鼠泌乳素水平的影响[J]. 医药导报, 2009, 28(11): 1441-1443.

[23] 许东晖, 梅雪婷, 许实波. 小麦黄素对小鼠脑记忆障碍的药理作用[J]. 中国药理通讯, 2003, 20(1): 81.

[24] 杨涛, 曾亚文, 萧凤回, 等. 药用大麦及其活性物质研究进展[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 1154-1158.