



(21) 申请号 202311720042.8

A61P 9/12 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.13

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510000 广东省广州市天河区五山路
381号

申请人 广东华活之光生物科技有限公司

(72) 发明人 曹庸 翁哲希 何泽琪 彭新安
李俊 陈宇立

(74) 专利代理机构 广州正明知识产权代理事务
所(普通合伙) 44572

专利代理师 张丽

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

C12P 21/06 (2006.01)

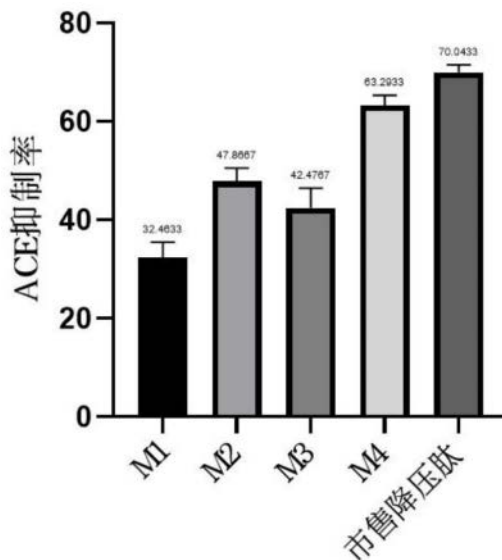
权利要求书1页 说明书4页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种料酒渣来源ACE抑制肽及其制备方法和
应用

(57) 摘要

本发明属于料酒渣资源化利用技术领域,公开了一种来自料酒渣的ACE抑制肽。为提高料酒渣的经济利用价值,从中开发出具有降血压功效的寡肽,本发明以料酒渣为原料,通过水浸提法、膜过滤法、高效液相色谱法等多种分离纯化方法得到了一种降血压肽单体,氨基酸序列为WCYND,分子量为699.73Da,具有活性好,能人工合成,安全无毒的特点。经测定其ACE抑制活性,该降血压寡肽在体外对血管紧张素转化酶具有抑制作用,可以应用于降血压领域,且有利于料酒渣的高值化综合利用。



1. 一种从料酒渣中提取出来的寡肽,其特征在于,所述寡肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 权利要求1所述寡肽在制备抑制血管紧张素转化酶ACE的活性的功能产品中的应用。
3. 权利要求1所述寡肽的制备方法,其特征在于,将料酒渣经过酶解后,以提高血管紧张素转化酶的抑制活性为目标,通过多次分离纯化得到。
4. 根据权利要求3所述的寡肽的制备方法,其特征在于,酶解所用的酶为中性蛋白酶。
5. 权利要求1所述寡肽在制备降血压的功能产品中的应用。
6. 一种血管紧张素转化酶ACE的抑制剂,其特征在于,活性成分为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的寡肽。
7. 一种降血压功能产品,其特征在于,活性成分为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的寡肽。

一种料酒渣来源ACE抑制肽及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及料酒渣资源化利用技术领域,更具体的,涉及一种料酒渣来源的ACE抑制肽及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 高血压是一种以动脉压升高为特征的疾病。正常成人血压标准为收缩压 $\leq 140\text{mmHg}$,舒张压 $\leq 90\text{mmHg}$ 。如果成人收缩压 $\geq 160\text{mmHg}$,舒张压 $\geq 95\text{mmHg}$ 即可判断为高血压。高血压是当今世界上最常见的一种严重的慢性健康疾病,其早期症状不明显,后期会出现脑血管破裂或者突发心脏病,严重危害人体健康状况。根据研究可知人体内许多的系统与血压的调节有着密切关系,抗高血压药物可以作用于影响血压调节的任一环节从而使得血压下降。目前已证实了RAS系统是治疗高血压的关键靶点,ACE抑制剂可降低高血压患者的死亡率,如卡托普利和赖诺普利等化学类合成药物,在临床上用于治疗高血压,但它们可能伴有一些副作用。相比之下,天然的生物活性肽更环保、更安全,因此成为了近年来研究的热点。除了日常健康饮食,增加果蔬和优质蛋白的摄入量可降低血压外,蛋白中含有的活性肽片段也对人体健康有很大帮助。

[0003] 大米是世界上最重要的农作物之一,大米蛋白的营养价值可媲美鸡蛋、鱼、虾及牛肉蛋白等动物蛋白。但我国在大米资源的开发和综合利用方面水平不高,研究水平落后于发达国家,致使大米的经济价值未得到完全充分体现。料酒是大米加工利用的途径之一,生产过程中会产生大量的发酵基料,也可称为料酒糟。目前除了少数厂家将其烘干作为饲料出售外,大部分厂家均作为饲料以低廉的价格出售,还有些厂家则以废弃物直接排放,这造成了蛋白资源的浪费,也对环境造成了污染。料酒渣中富含各种氨基酸、维生素和多种微量元素,营养成分丰富,目前已有多项研究证明从料酒渣中可分离提取出具有降血压活性的多肽,因其具有无毒副作用的优点从而成为了降血压研究领域的关注重点。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术中存在的上述问题,提供一种从料酒渣中提取出来的寡肽。

[0005] 本发明的第二个目的是提供上述寡肽的应用。

[0006] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0007] 一种从料酒渣中提取出来的寡肽,所述寡肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0008] 本发明以料酒渣为原料,通过使用多种分离纯化的手段得到一种降血压寡肽,该寡肽氨基酸序列为WCYND,分子量为699.73Da,具有纯度高,活性好,能人工合成,安全无毒的特点。

[0009] ACE抑制活性测定结果表明,该降压肽在体外对ACE具有显著的抑制作用,可以应用于降血压领域,且有利于料酒渣的综合利用。

[0010] 因此,本发明还提供所述寡肽在制备抑制血管紧张素转化酶ACE的活性的功能产

品中的应用。

[0011] 本发明还提供上述寡肽的制备方法,是将料酒渣经过酶解后,以提高血管紧张素转化酶的抑制活性为目标,通过多次分离纯化得到。

[0012] 优选的,制备方法中酶解所用的酶为中性蛋白酶。

[0013] 更优选的,制备方法包括以下步骤:

[0014] S1、料酒渣原料与水混合,加入中性蛋白酶在46℃的水浴中酶解反应3h,停止酶解冷却至室温后离心。保留上清液并测定其ACE抑制率;

[0015] S2、将S1所得具有高ACE抑制活性的样品分别通过0.45 μ m、0.2 μ m微孔滤膜,3000Da卷式膜和1000Da超滤杯膜片,分别测定截留液和透过液的ACE抑制活性;

[0016] S3、将S2所得的高ACE抑制活性组分经过大孔吸附树脂处理,用不同浓度的乙醇进行洗脱,对ACE抑制率进行分别测定。将高活性组分紧接着用Sephadex G-25色谱柱再分离,监测吸光度,对得到组分再进行ACE抑制率测定。

[0017] S4、将S3所得的高ACE抑制活性的组分经过C18柱(20mm $\times$ 450mm,10 μ m)进行高效液相色谱分离,液相色谱洗脱条件如下:0-20min,10-30%B;20-50min,30-57%B;50-60min,57-90%B;60-62min,90-10%B;62-70min,10%B。根据色谱图峰型将组分收集,以ACE抑制率为判断依据,收集保留高活性的ACE抑制活性组分进行下步细分;

[0018] S5、将S4所得的ACE高活性组分通过分析型高效液相色谱进行成分分析,液相色谱洗脱条件如下:0-30min,5-35%B;30-50min,35-45%B;50-50.1min,45-70%B;50.1-60min,90%B。对单体峰进行收集并测定ACE抑制率,得到高活性的ACE抑制寡肽;

[0019] S6、将S5所得的高活性单体使用UPLC-LTQ-Orbitrap-Velos Pro质谱分析仪结合PPSQ氨基酸测序仪对其进行鉴定。EASY-nLC条件如下:洗脱条件为0-60min,15-50%B;50-70min,50-100%B;70-75min,100%B;流速:300nl/min;流动相:A相为0.1%(v/v)的甲酸水溶液,B相为纯乙腈溶液。质谱条件如下:进样流速20 μ l/min;进样体积5 μ l;选用正离子模式,ESI电喷雾离子源,喷雾电压2.0kV;碰撞模式:CID;扫描范围:350-2000m/z;采集时间为75min。采用Proteome Discoverer软件解析多肽结构既得。

[0020] 本发明还提供所述寡肽在制备降血压的功能产品中的应用。

[0021] 本发明还提供一种血管紧张素转化酶ACE的抑制剂,其活性成分为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的寡肽。

[0022] 本发明还提供一种降血压功能产品,其活性成分为氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的寡肽。

[0023] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0024] 本发明提供了一种来自料酒渣的ACE抑制肽。为提高料酒渣的经济利用价值,从中开发出具有降血压功效的寡肽,本发明以料酒渣为原料,通过水浸提法、膜过滤法、高效液相色谱法等多种分离纯化方法得到了一种降血压肽单体,氨基酸序列为WCYND,分子量为699.73Da,具有活性好,能人工合成,安全无毒的特点。经测定其ACE抑制活性,该降血压寡肽在体外对血管紧张素转化酶具有抑制作用,可以应用于降血压领域,且有利于料酒渣的高值化综合利用。

附图说明

- [0025] 图1为酶解粗提物与市售降压肽的ACE抑制率比对；
[0026] 图2为膜过滤组分的ACE抑制活性与市售降压肽比对；
[0027] 图3为不同浓度乙醇洗脱组分的ACE抑制活性与市售降压肽比对；
[0028] 图4为大孔吸附树脂分离组分的ACE抑制活性与市售降压肽比对；
[0029] 图5为制备液相分离组分的ACE抑制活性与市售降压肽比对；
[0030] 图6为分析液相分离单体的ACE抑制活性与市售降压肽比对；
[0031] 图7为单体F1的一级质谱图和PPSQ测序结果图。

具体实施方式

[0032] 下面对本发明的具体实施方式作进一步说明。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0033] 实施例1

[0034] ACE抑制肽的分离纯化,包括以下步骤:

[0035] S1、将料酒渣原料与水混合,在pH为7.2的条件下加入0.3%的中性蛋白酶。在46℃的水浴中酶解反应3h,然后将混合物置于90℃的高温下10min以停止酶解反应,待水解液冷却至室温后,在4000rpm,20min离心。保留上清液并测定其ACE抑制率为40.33%。如图1所示。

[0036] S2、将酶解粗提物先后通过0.45 μ m、0.2 μ m微孔滤膜,再将0.2 μ m透过液在3000Da卷式膜和1000Da超滤杯膜片(超滤杯全程在常温下使用,密封空间保持压力在0.1-0.22MPa)中分离,分别测定截留液和透过液的ACE抑制活性,结果发现1000Da透过液的抑制活性最高,达56.26%,如图2所示。

[0037] S3、将1000Da超滤透过液用10%、20%、35%、50%、70%的乙醇经过大孔吸附树脂进行洗脱,对ACE抑制率进行分别测定后发现10%乙醇洗脱样品的抑制活性最高,达58.85%,随后将10%乙醇洗脱组分通过Sephadex G-25色谱柱二次分离,结果发现M4的抑制活性为63.29%,为所有组分中活性最高,如图3、图4所示。

[0038] S4、将M4组分过0.45 μ m滤膜后,借助制备型高效液相色谱进行分离。制备条件:①色谱柱:20mm $\times$ 450mm,C18填料(10 μ m,300Å,MachereyNagel,France);②流动相:A泵为超纯水,B泵为乙腈;③流速:10ml/min;④进样量:5ml;⑤检测波长:214nm。ACE抑制活性测定D3组分的活性最高为67.07%,随后将D3进行组分再细分。结果如图5所示。

[0039] S5、将D3通过分析型高效液相色谱进行成分分析,分离条件:①色谱柱:ECOSIL C18(260mm $\times$ 4.6mm,5 μ m);②流动相:A泵为超纯水,B泵为乙腈;③流速:1ml/min;④进样量:20 μ l;⑤检测波长:214nm。ACE抑制活性测定F1单体的活性最高为77.57%,此时ACE抑制活性高于市售降压肽。随后对F1单体峰进行收集,进行结构解析。结果如图6所示。

[0040] S6、将D3使用分析型HPLC对其峰尖进行收集,结果发现F1为高ACE抑制活性目标单体,使用UPLC-LTQ-Orbitrap-Velos Pro质谱分析仪结合Proteome Discoverer(PD)软件比对,以及PPSQ氨基酸测序仪检测。先从离子流图的主峰位置对应的一级质谱图可推断其分子量约为701.49Da[M+H],将该结果导入到PD软件中的Uniprot库中,将搜索到的有可能性

的匹配序列与PPSQ给出的结果比对,可鉴定出F1的氨基酸序列为Trp-Cys-Tyr-Asn-Asp(WCYND),其分子量为699.73Da,经比对该序列为本专利全新发现的具有ACE抑制活性的寡肽。结果如图7所示。

[0041] ACE抑制活性检测方法按照如下方法进行:

[0042] 分别向空白组、对照组和样品组加入10 μ L ACE溶液(0.2U/mL),样品组加入10 μ L ACEI,空白组和对照组加入10 μ L缓冲液,在37 $^{\circ}$ C下放置5min后所有组别均加入30 μ L HHL溶液(6.5mmol/mL,HHL溶于pH8.3的0.1mol/L硼酸缓冲液,含0.3mol/LNaCl),在37 $^{\circ}$ C下反应1h后,对照组和样品组分别加入80 μ L 1.0mol/L HCl中止反应。

[0043] 表1

[0044]	试剂	空白组/ μ L	对照组/ μ L	样品组/ μ L
	ACE	10	10	10
	缓冲溶液	10	10	/
[0045]	ACEI	/	/	10
	HCL	80	/	/
	37 $^{\circ}$ C恒温放置 5min			
	HHL	30	30	30
	37 $^{\circ}$ C恒温反应 60min			
	HCL	/	80	80

[0046] 液相色谱条件:①色谱柱:ECOSIL C18(260mm $\times$ 4.6mm,5 μ m);②流动相:乙腈:超纯水=25:75(含0.1%(v/v)TFA);③流速:1mL/min;④检测波长:228nm;⑤柱温:30 $^{\circ}$ C;⑥进样量:20 μ L。

[0047] 结果计算:

[0048] 原理:HHL在ACE的催化下快速地分解并产生马尿酸(Hip)和二肽(His-Leu,HL),马尿酸在228nm处有最大吸收。当加入ACEI样品时,ACE酶活受到抑制,马尿酸生成量减少,所以可通过高效液相色谱测定马尿酸的生成量来评估ACEI对ACE活性的抑制率。

[0049] 计算公式为: $R = \frac{(A-B-A_0)}{(A-A_0)} \times 100\%$

[0050] 式中:R:ACEI样品对ACE的抑制率(%);

[0051] A:对照组中马尿酸的峰面积;

[0052] B:添加ACEI组中马尿酸的峰面积;

[0053] A₀:空白管中马尿酸的峰面积。

[0054] 以上对本发明的实施方式作了详细说明,但本发明不限于所描述的实施方式。对于本领域的技术人员而言,在不脱离本发明原理和精神的情况下,对这些实施方式进行多种变化、修改、替换和变型,仍落入本发明的保护范围内。

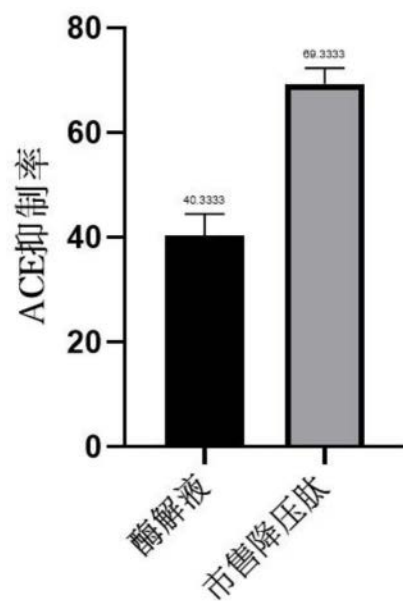


图1

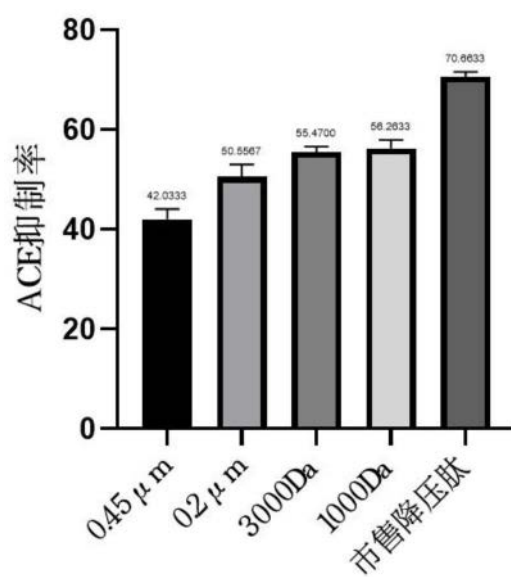


图2

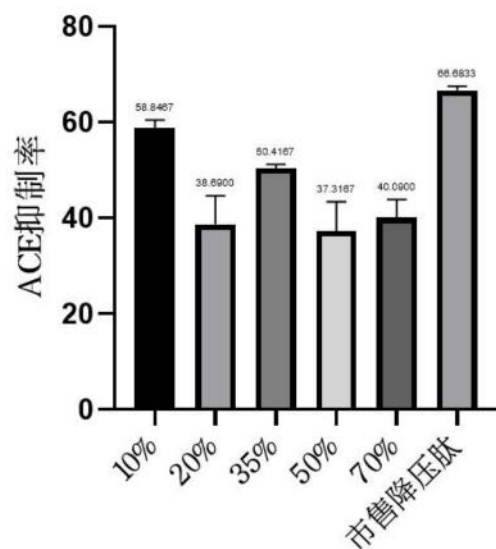


图3

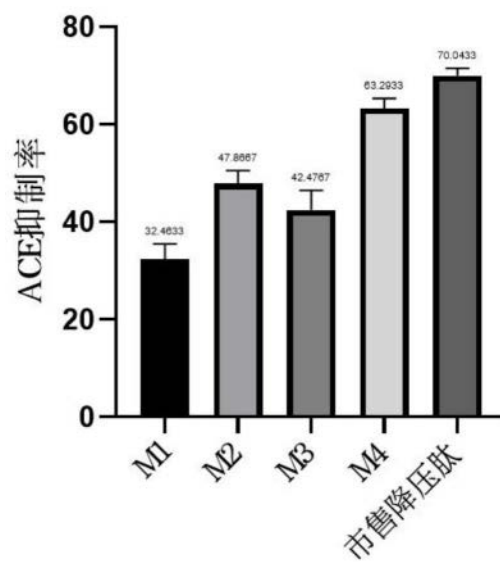


图4

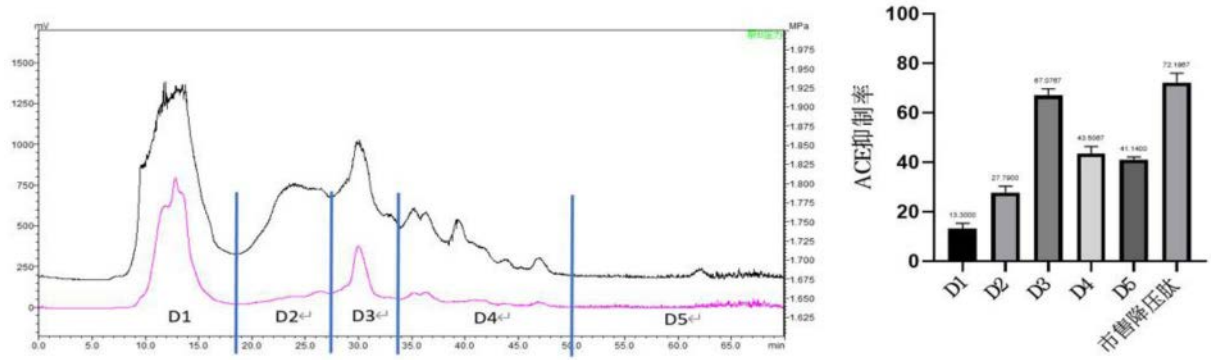


图5

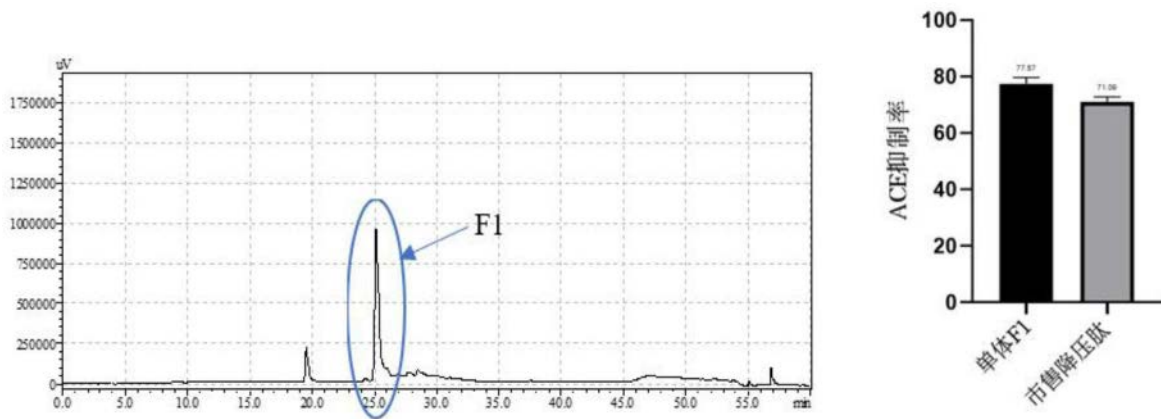
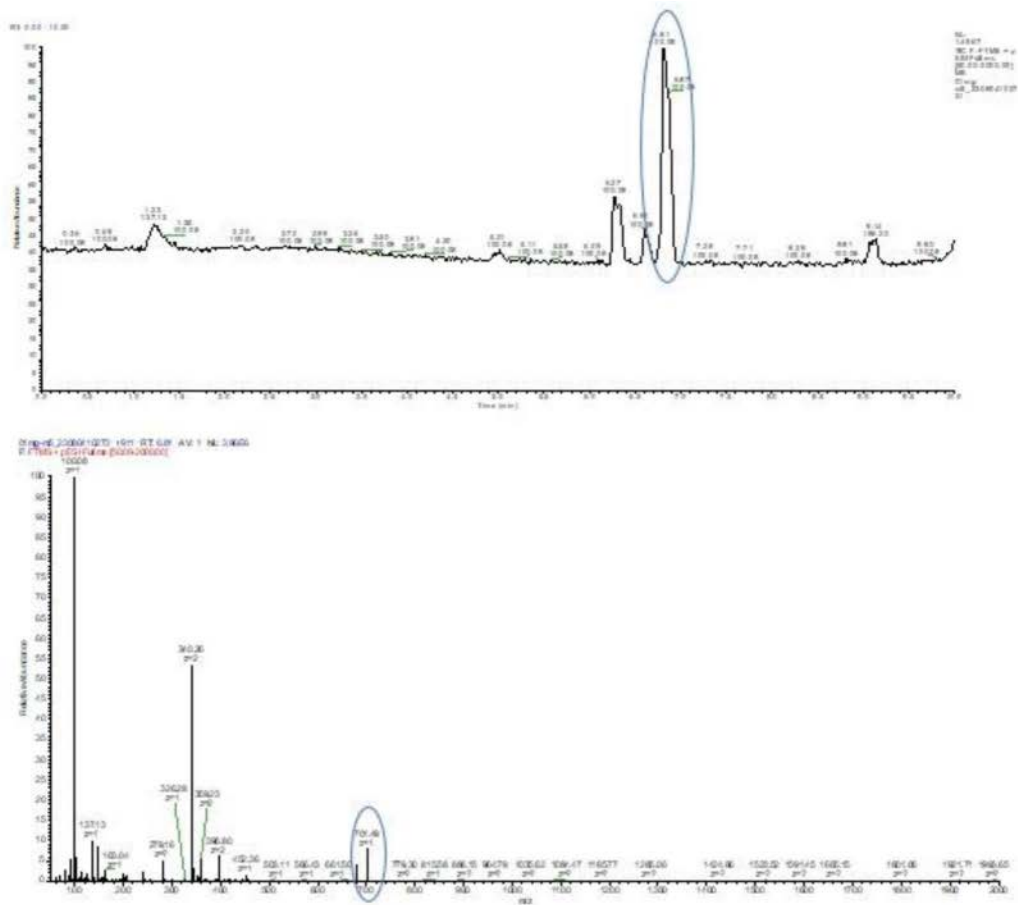


图6



[测算序列]

	1	2	3	4	5	6	7
1st	Trp	Val	Tyr	Asn	Lys	Trp	Gly
2nd	Phe	Ile	Pro	Asp	Asp	Asp	Lys
3rd	Ala	Glu	Gln	Gly	His	Ala	Phe
4th	Gly	Asp	Met	Lys	Gln	Pro	Asp

```
>sp|Q09151|GLUA3_ORYSJ Glutelin type-A 3 OS=Oryza sativa subsp.
japonica OX=39947 GN=GLUA3 PE=2 SV=2
MATIKFPIVSVYCLFLLCNGSLAQLLSQSTSQWQSSRRGSPRECRFRLQAFEPITVR
SQAGTTEFFDYSNELFQCTGVFVRRVIEPRGLLLPHYSNGATLVVYIQGRGITGTPFG
CPETYQQQFQSQEQDQLLEGQSSHKFRDEHQIHRFQQGDVVALPAGVAHICINDGAP
IVAIYVTDIYNANQLDPRHRDFFLAGNNKIQQLRYREARDNSKNVFGGFSVELLSEAL
GISSGVARQLQCNDRGEIVRVEHGLSLQPIYASLQEQQEQVQSRDYGQTQYQQKQLQ
GSCNGLDETCTMRVQRNDNPRLADYINPRAGTITYLNGQKFIPLNLVQMSAVKVNLY
QNALLSPFNINAHSVYITQGRARVQVXXNGKTFVDGLRRQLLIPIQHVVIKKAQ
REGCSYIALKTNPDSMVSHMAGKNSIFRALPDVYANAYIRISREEARRLKHNRGDELGVF
TPSHAYKSYQDISVSA
```

图7