

## 小米多肽酶解工艺及其抗氧化和 ACE 抑制活性

陈昶宇, 陈博睿, 赵卿宇, 王 晗, 朱益清, 沈 群\*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 国家粮食产业(青稞深加工)技术创新中心  
植物蛋白与谷物加工北京市重点实验室 国家果蔬加工工程技术研究中心 北京 100083)

**摘要** 以小米蛋白为原料,制备具有抗氧化活性和血管紧张素转移酶(ACE)抑制活性的食源性多肽。采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶酶解小米蛋白,选取最优酶解工艺。选用碱性蛋白酶酶解 4 h,得到的蛋白水解液分别通过 3 ku 和 10 ku 的超滤膜,得到分子量<3,3~10 ku 和>10 ku 的 3 种组分,测定其抗氧化活性和 ACE 抑制活性。结果表明:采用碱性蛋白酶酶解 4 h 得到的蛋白水解液经超滤后得到分子量<3 ku 的多肽具有最高的抗氧化活性和 ACE 抑制活性,其 DPPH 清除能力为 38.44%,ABTS 自由基清除能力为 81.62%,羟基自由基清除能力为 68.49%,ACE 抑制活性为 87.53%。此方法得到的多肽分子量小,功能氨基酸含量较高,具有良好的抗氧化活性和 ACE 抑制活性。本研究结果为抗氧化肽和 ACE 抑制肽的开发提供试验依据,对未来工业化的发展提供理论参考。

**关键词** 小米; 碱性蛋白酶; 抗氧化; ACE 抑制活性; 多肽

**文章编号** 1009-7848(2023)12-0125-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.014

根据《中国心血管健康与疾病报告》可知,2017 年我国因高收缩压死亡的人数达到 254 万人,截至 2020 年,我国 $\geq 18$  岁的成年人高血压患病人数为 2.45 亿,全国有 4.35 亿人为血压正常高值<sup>[1]</sup>。目前高血压已成为诱发冠心病、脑血管病、心律失常、中风、动脉粥样硬化等中高风险疾病的诱因之一<sup>[2]</sup>。血管紧张素转移酶(ACE)在控制人体内血压的肾素-血管紧张素系统和激肽-激肽生成酶系统中起到促进血压升高的作用<sup>[3]</sup>。目前研究表明 ACE-肾素-血管紧张素系统和机体细胞氧化与心血管健康有着紧密的关系,且 ACE 抑制剂和抗氧化剂被广泛认为是多种心血管疾病的潜在治疗方法<sup>[4]</sup>。然而,传统的 ACE 抑制剂和抗氧化剂药物会引起咳嗽、心率加快、头疼、水肿等副作用。高效、稳定、安全的 ACE 抑制剂和抗氧化剂在食药领域成为一种新的研究趋势<sup>[5]</sup>。近些年人们将目光转移到天然食品产物方向,其中 ACE 抑制肽和抗氧化肽因高效、无毒的特点而受到人们的关注,已成为国内外研究的热点<sup>[6]</sup>。

小米起源于中国,为我国的主要粮食产物之一。小米中富含碳水化合物、蛋白质、膳食纤维、多酚、类黄酮等多种营养素,是一种优质的杂粮摄入来源<sup>[7]</sup>。蛋白质是小米中含量第二高的成分,小米蛋白中必需氨基酸配比合理,具有降血压、抗氧化、降血糖等多种功能,是一种优质的植物蛋白,具有较高的研究和开发潜力<sup>[8-10]</sup>。然而,目前关于小米肽商业开发的前期研究较少,制约了小米多肽的深加工进程。本研究对比 3 种酶法水解制备的小米蛋白肽,以 ACE 抑制活性、DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、羟基自由基清除能力为指标,确定酶解工艺,检测不同超滤条件下蛋白肽产物的 ACE 抑制活性、DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、羟基自由基清除能力,为小米多肽的商业化利用和工业化生产提供理论参考。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 试验材料

“东方亮”小米,山西省大同市广灵县; $\alpha$ -淀粉酶(50 U/mg)、糖化酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg),上海源叶有限公司;复合纤维素酶(葡聚糖酶活力 700 EGU/g,木聚糖酶活力 250 FXU/g),丹麦诺维信有限公司;风味蛋白酶(20 U/

收稿日期: 2022-12-16

基金项目: 财政部和农业农村部国家谷子糜子产业技术体系项目(CARS-07-13.5)

第一作者: 陈昶宇,男,硕士生

通信作者: 沈群 E-mail: shenqun@cau.edu.cn

mg)、中性蛋白酶(100 U/mg),德国默克集团。其它试剂为分析纯级。

## 1.2 仪器与设备

KN520 型半自动凯氏定氮仪, 济南阿尔瓦仪器有限公司; Mili-Q 超滤管, 美国密理博公司; L-8900 型氨基酸分析仪, 日立高新技术公司; FE20K 型 pH 计, 上海青浦沪西仪器厂; 酶标仪, 美国 Thermo Fisher 科技公司; H1650-W 型离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; SHA-BA 水浴恒温振荡器, 金坛荣华仪器制造有限公司; LGJ-25C 真空冷冻干燥机, 北京四环科学仪器有限公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 小米蛋白的提取 参考张凡等<sup>[11]</sup>的方法从脱脂小米粉中提取小米蛋白。将小米粉过 60 目筛, 按照料液比 1:5 添加正己烷在 37 °C 水浴摇床中脱脂 4 h, 回收正己烷, 小米粉在通风橱自然风干 24 h, 备用。采用  $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶和复合纤维素酶三酶复合法提取脱脂后的小米蛋白。提取的最佳工艺为 pH 4.7, 酶解温度 48 °C, 加酶量 2.2%, 酶解时间 10 h。然后灭酶并在 7 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液, 多次水洗至中性, 冻干 48 h, 得到的小米蛋白含量为 67.14%, 备用。

1.3.2 蛋白质含量测定 使用凯氏定氮法, 参照 GB 5009.5-2016 方法对酶法提取物进行蛋白含量测定<sup>[12]</sup>。蛋白质含量按式(1)计算:

$$X = \frac{V - V_0 \times 0.014 \times C}{m} \times F \times 100 \quad (1)$$

式中:  $X$ ——样品中蛋白质含量, g/100 g;  $V$ ——滴定试样消耗体积, mL;  $V_0$ ——滴定空白消耗体积, mL;  $C$ ——盐酸标准浓度, mol/L;  $m$ ——样品质量, g; 0.014——1 mL 1 mol/L 盐酸标准溶液相当于氮的质量, g;  $F$ ——小米的蛋白质系数为 5.83。

1.3.3 小米蛋白的酶解 将小米蛋白按料液比 1:10 溶解在蒸馏水中, 然后分别将碱性蛋白酶(pH 值 8.0、60 °C)、中性蛋白酶(pH 值 7.0、50 °C)和风味蛋白酶(pH 值 7.0、50 °C)以 4 000 U/g 的比例加入溶液中。在每个时间间隔(0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 min)取等分试样, 并在 90 °C 下持续加热 10 min 达到灭酶效果。然后将所有样品在

8 000 r/min 下离心 20 min。取上清液冻干, -20 °C 储存备用。

1.3.4 水解度的测定 参考 Nielsend 等<sup>[13]</sup>的方法测定小米蛋白酶解物的水解度, 使用邻苯二甲醛法(OPA 法)测定其水解度。水解度按式(2)计算:

$$DH(\%) = \frac{N - N_0}{\rho \times h_{tot}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $N$ ——水解液氨基氮的浓度, mol/L;  $N_0$ ——蛋白溶液氨基氮的浓度, mol/L;  $\rho$ ——样品质量浓度(5 mg/mL);  $h_{tot}$ ——底物蛋白质中肽键总数, mmol/g, 本研究中  $h_{tot}$  以 7.5 计。

1.3.5 ACE 抑制率的测定 参考 Hanafi 等<sup>[14]</sup>的方法并进行修改测定小米蛋白酶解物的 ACE 抑制率。

马脲酰组氨酰亮氨酸(HHL)溶液的制备: 准确称取 0.107 g HHL 和 0.877 g NaCl, 准确量取 5 mL 硼酸钠缓冲液(pH 8.3), 将三者用超纯水定容于 50 mL 容量瓶中备用。

将适当浓度的 150  $\mu$ L 样品与 100  $\mu$ L (100 mU/mL) ACE 在 37 °C 下充分混合 10 min, 然后加入 500  $\mu$ L HHL 溶液, 37 °C 反应 60 min, 然后逐次加入 750  $\mu$ L HCl (1 mol/L)、1 500  $\mu$ L 吡啶、750  $\mu$ L 苯磺酰氯。将溶液涡旋 1 min 并立即在冰浴中冷却, 在波长 410 nm 处测量吸光度。ACE 抑制率按式(3)计算:

$$ACE \text{ 抑制率}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c - A_B} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_c$ ——对照组的吸光度;  $A_s$ ——样品的吸光度;  $A_B$ ——空白的吸光度。

1.3.6 抗氧化活性的测定 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力采用 Cotabarren 等<sup>[15-16]</sup>的方法测定; 羟基自由基清除能力采用 Siddhuraju 等<sup>[16]</sup>的方法测定。

1.3.7 小米蛋白酶解物的超滤 为了纯化小米 ACE 抑制肽, 将酶解产物配制质量浓度为 10 mg/mL, 作为初试溶液(MPH)。依次将 MPH 通过分子质量为 3 ku 和 10 ku 的超滤膜, 获得分子质量分别为 MW < 3 ku、3~10 ku 和 > 10 ku 的 3 个组分, 分别记为 MPH-1、MPH-2、MPH-3, 将 3 个组分冻干并储存于 -20 °C, 用于后续的 ACE 抑制活性和抗氧化活性评价。

1.3.8 超滤产物氨基酸组成测定 参考 Yang 等<sup>[17]</sup>的方法并进行修改,采用全自氨基酸分析仪对超滤产物进行氨基酸分析。

1.3.9 数据处理 采用 GraphPad Prism 9 和 SPSS Statistics 27 统计软件对数据进行处理和分析,One-way ANOVA 分析组间差异显著性( $P < 0.05$  时被认为差异显著)。每个试验均重复 3 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同蛋白酶对水解度的影响

水解度(Degree of Hydrolysis, DH)用来衡量蛋白质水解为多肽分子的能力。将水解度跟抗氧化活性和 ACE 抑制活性的结果相结合,能更高效得出最适酶解物和目标活性多肽<sup>[18]</sup>。本试验使用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶 3 种蛋白酶对小米蛋白进行酶解,其水解度随着时间的变化趋势结果见图 1。如图 1 所示,3 种蛋白酶的水解度均随着时间的增加呈现上升趋势。酶解时间为 300 min 时,3 种蛋白酶的水解度达到最大,中性蛋白酶的水解度为 19.85%、碱性蛋白酶为 19.39%、风味蛋白酶的水解度为 4.69%。多肽链的链长和末端氨基酸的种类很大程度上影响了其生物活性,蛋白质水解度越高,多肽链的水解程度越高,末端氨基酸的种类越丰富<sup>[19]</sup>。

### 2.2 不同蛋白酶对抗氧化活性的影响

氧化应激是一个比较复杂的过程,是自由基在体内产生的一种负面作用,是导致人体衰老和各种疾病的原因之一<sup>[20]</sup>。因此,需要多方面对自由基清除系统进行评价。本研究将从 DPPH 自由基清除能力(DRSA)、ABTS 自由基清除能力(ARSA)和羟基自由基清除能力(HRSA)3 个方面进行综合评价,进一步确保小米水解物体外抗氧化能力的准确性。结果如图 2~图 4 所示,碱性蛋白酶酶解的 MPH 相较于风味蛋白酶和中性蛋白酶具有更高的抗氧化活性。碱性蛋白酶酶解的 MPH 的 DRSA 随酶解时间的增加呈现上升趋势,在 240~300 min 趋于稳定,酶解 300 min 时达到最高活性,为 40.66%。碱性蛋白酶的 ARSA 和 HRSA 在前 15 min 就达到了较高的水平,最后在 300 min 趋于稳定。其 ARSA 在酶解时间为 300 min 时达到最高值,为 82.14%。其 HRSA 在酶解时间为 30

min 时达到最高值,为 76.95%,并在 30~180 min 内趋于稳定,并无显著性差异,酶解时间大于 180 min 后其 HRSA 呈下降趋势。结合碱性蛋白酶的水解度变化趋势,碱性蛋白酶酶解的 MPH 产生了较多的小分子质量多肽,有助于其抗氧化活性进一步提高。研究表明,低分子质量的多肽可能表现出更高的抑制自由基反应的能力,具有更高的抗氧化能力<sup>[21]</sup>。碱性蛋白酶酶解的 MPH 相较于另外两种酶有更高的抗氧化活性,其较高的水解度产生了更多的小分子质量多肽发挥了重要作用。除了分子质量之外,氨基酸的种类和特定氨基酸的含量也对多肽的功能活性发挥了重要作用。原料、水解度、酶的种类、反应温度和 pH 值等都会造成氨基酸种类和含量的差异<sup>[22]</sup>。研究表明,疏水性氨基酸具有更高的自由基清除能力,其侧链有助于

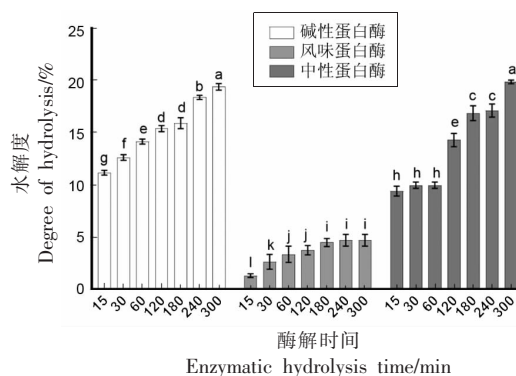


图 1 3 种蛋白酶不同时间酶解小米蛋白的水解度

Fig.1 Degree of hydrolysis of millet protein by three proteases at different times

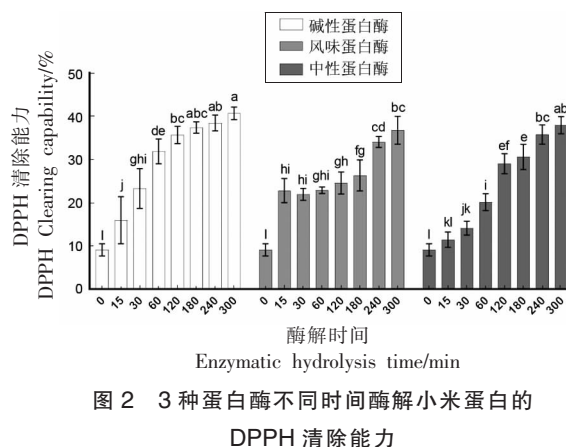


图 2 3 种蛋白酶不同时间酶解小米蛋白的 DPPH 清除能力

Fig.2 DPPH scavenging capacity of millet protein by three proteases at different times

抗氧化肽和过渡金属离子的相互作用,进一步抑制了氧化反应<sup>[23]</sup>。Wang等<sup>[24]</sup>的研究表明,在碱性蛋白酶水解蛋白过程中,水解度随着时间的增加不断升高,小分子质量肽不断增加,但脯氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸等疏水性氨基酸在120 min时含量最高。因此,特定氨基酸含量的降低可能导致碱性蛋白酶酶解的MPH在240 min和300 min的羟基自由基清除能力降低,尽管它们的低分子质量组分比例较高。

### 2.3 不同蛋白酶对ACE抑制活性的影响

不同MPH的ACE抑制活性的变化趋势如图5所示。3种蛋白酶相比,碱性蛋白酶酶解的MPH具有最高的ACE抑制活性,并在酶解240 min时达到了最高的ACE抑制活性,为92.08%。碱性蛋白酶的ACE抑制率在15 min就达到了较高的水平,并随着酶解时间的增加,其ACE抑制率呈现波动状态。有研究表明,小米蛋白的小分子质量多肽对ACE的抑制效果最佳<sup>[25]</sup>。此外,氨基酸的种类和含量也一定程度上影响了MPH的ACE抑制活性。目前,越来越多的研究报道,脯氨酸和大量芳香族氨基酸的存在会增加其与ACE的相互作用,进一步促进ACE的抑制活性<sup>[26]</sup>。碱性蛋白酶酶解的MPH从15 min至300 min都体现了较高的ACE抑制活性,是分子质量分布和氨基酸种类与含量的共同作用结果导致的。这些结果表明,碱性蛋白酶是从小米蛋白中生产抗氧化肽和ACE抑制肽的最佳酶。为了同时满足较高的水解度、抗氧化活性和ACE抑制活性,选用酶解时间240 min的碱性蛋白酶酶解的MPH用于进一步分离。

### 2.4 超滤提取抗氧化肽和ACE抑制肽

分子质量小于3 ku的多肽具有较高的ACE抑制活性和抗氧化活性。本试验将各组分样品配置成质量浓度为1 mg/mL的溶液测定其抗氧化活性和ACE抑制活性。由图6可知,在抗氧化活性和ACE抑制活性试验中,MPH-1组分均表现出最高的活性,且与对照组和另外两组具有显著性差异,这与文献中报道的分子质量小的多肽具有较高抗氧化活性和ACE抑制活性的结果保持一致。MPH-1组分可以用来进一步分离纯化出具有较高活性的生物肽,同样进一步分析MPH-1的氨基酸组成和相对分子质量分布,能验证其作为抗

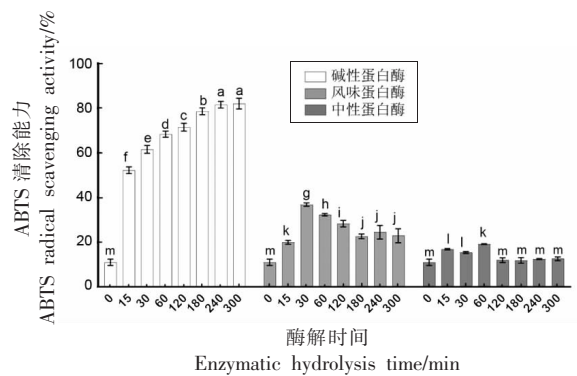


图3 3种蛋白酶不同时间酶解小米蛋白的ABTS清除能力

Fig.3 ABTS scavenging capacity of millet protein by three proteases at different times

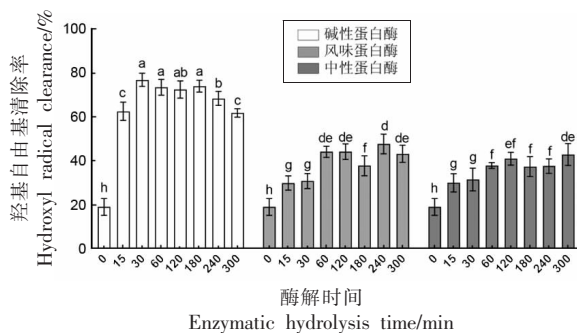


图4 3种蛋白酶不同时间酶解小米蛋白的羟基自由基清除能力

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging capacity of millet protein by three proteases at different times

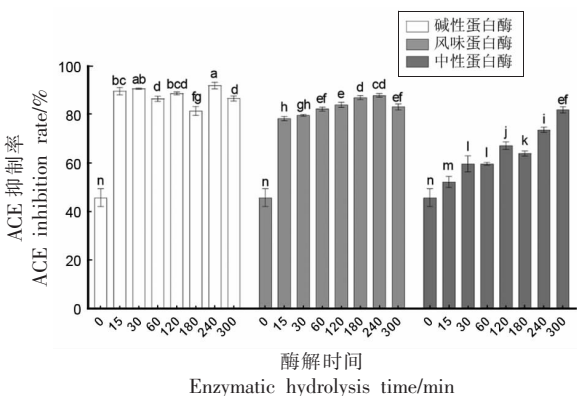
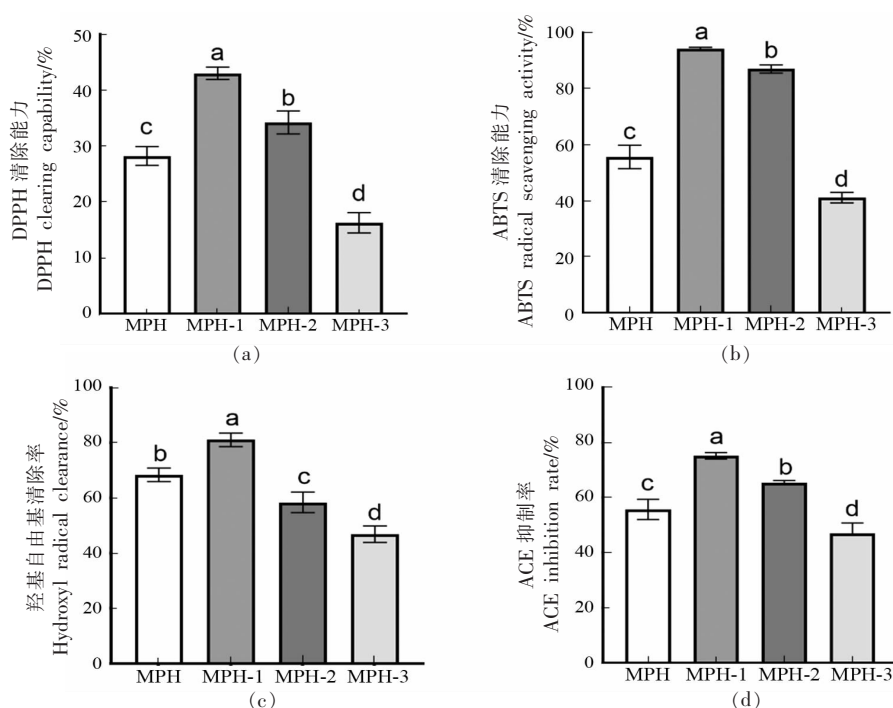


图5 3种蛋白酶不同时间酶解小米蛋白的ACE抑制活性

Fig.5 ACE inhibitory activity of millet protein by three proteases at different times



注:小写字母表示具有显著性差异的数据( $P < 0.05$ )。

图 6 超滤后各组分的 DPPH 清除能力(a)、ABTS 清除能力(b)、羟基自由基清除能力(c)和 ACE 抑制活性(d)

Fig.6 DPPH scavenging ability (a), ABTS scavenging ability (b), hydroxyl radical scavenging ability (c) and ACE inhibitory activity (d) of each component after ultrafiltration

氧化肽和 ACE 抑制肽的商用潜在价值。

## 2.5 超滤各组分的氨基酸组成

超滤处理小米水解物,得到不同分子质量的组分,并进行氨基酸组成和含量测定,结果如表 1 所示。由表 1 可知,超滤后各组分的氨基酸组成均较为完善,富含多种功能性氨基酸。超滤的 3 个组分的疏水性氨基酸含量从大到小排列顺序为: MPH-1>MPH-2>MPH-3,与 MPH-1 的高抗氧化活性和高 ACE 抑制活性相关。其中,苯丙氨酸和亮氨酸的含量与 3 个组分的抗氧化活性和 ACE 抑制活性的大小成正比。有研究表明,适量的亮氨酸能显著提高团头鲂血清中的抗氧化能力<sup>[27]</sup>,添加苯丙氨酸同样能达到更高的羟基自由基清除能力和 DPPH 自由基清除能力<sup>[28]</sup>。高血压大鼠容易造成其血管管腔收缩,管壁变厚,苯丙氨酸能够改善其血管重塑<sup>[29]</sup>。此外,天冬氨酸和谷氨酸是两种酸性氨基酸,其含量从大到小顺序为: MPH-3>MPH-2>MPH-1,与其抗氧化活性和 ACE 抑制活性呈负相关。沈攀攀等<sup>[31]</sup>在进行针刺对自发性大

鼠的降血压试验中发现,针刺在达到降压效果的同时,其天冬氨酸和谷氨酸含量也显著性降低。MPH-1 中的组氨酸含量同样最高,研究表明组氨酸中的咪唑环有较高的自由基清除能力,起到较好的抗氧化作用<sup>[32]</sup>。此外,有研究表明多肽中大量的芳香族氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸)会提高其与 ACE 的疏水相互作用,从而增加 ACE 抑制能力<sup>[33]</sup>。MPH-1 相较于另外两组有着较高的疏水性氨基酸含量和芳香族氨基酸含量,其抗氧化活性和 ACE 抑制活性也均高于另外两组,由此可推,MPH-1 的多肽可作为优质的抗氧化肽和 ACE 抑制肽原料。

## 2.6 小米多肽的相对分子质量分布

相对分子质量<3 ku 的小米多肽(MPH-1)的相对分子质量分布情况进行分析,主要分为 0~1 000 u、1 000~1 500 u、1 500~2 000 u、2 000~3 000 u 4 个分布阶段。结果见表 2。由表 2 可知,相对分子质量 1 000~1 500 u 占 58.46%,这也进一步说明分子质量小的多肽具有较高的抗氧化活性

表1 超滤后各组分的氨基酸组成  
Table 1 Amino acid composition of each component  
after ultrafiltration

氨基酸种类	氨基酸含量/g·(100 g) <sup>-1</sup>		
	MPH-1	MPH-2	MPH-3
天冬氨酸(Asp)	5.484	7.512	8.110
苏氨酸(Thr)	2.988	2.932	3.196
丝氨酸(Ser)	3.604	3.480	3.380
谷氨酸(Glu)	11.904	15.168	16.310
甘氨酸(Gly)	3.52	3.669	4.046
丙氨酸(Ala)	6.188	5.452	5.269
半胱氨酸(Cys)	—	—	—
缬氨酸(Val)	4.344	4.469	4.420
蛋氨酸(Met)	1.972	1.850	2.072
异亮氨酸(Ile)	3.104	3.125	3.165
亮氨酸(Leu)	7.608	6.686	5.933
酪氨酸(Tyr)	2.62	2.657	2.696
苯丙氨酸(Phe)	4.78	3.757	2.916
赖氨酸(Lys)	5.504	3.423	2.928
组氨酸(His)	2.056	1.628	1.902
精氨酸(Arg)	7.428	4.286	3.290
脯氨酸(Pro)	3.664	3.257	3.964
疏水性氨基酸 (HAA)	31.660	28.296	27.740

注:疏水性氨基酸(HAA)主要包括 Ala、Val、Met、Ile、Leu、Try、Phe和 Pro。

表2 小米多肽的相对分子质量分布  
Table 2 Molecular weight distribution  
of millet polypeptides

分子质量/ku	峰面积百分比/%
0~1 000	3.29
1 000~1 500	58.46
1 500~2 000	21.86
2 000~3 000	16.39

和 ACE 抑制活性。Wang 等<sup>[24]</sup>从钝顶节螺藻蛋白中提取具有抗氧化肽和 ACE 抑制肽的过程中,采用超滤法获得了分子质量<3 ku 和>3 ku 的两个组分,其中分子质量<3 ku 的组分表现出最高的抗氧化活性和 ACE 抑制活性,且与分子质量>3 ku 的组分有显著性差异。总体来说小分子质量的多肽相较于较大的分子质量而言,具有更强的抑制活性,由此可推断出小米蛋白中小分子多肽的活性

更高。

### 3 结论

小米蛋白经蛋白酶酶解后,其抗氧化活性和 ACE 抑制活性均得到了大幅提升。相较于风味蛋白酶和中性蛋白酶而言,碱性蛋白酶的整体酶解效果最好。相较于小米蛋白,采用碱性蛋白酶酶解小米蛋白 4 h 后得到的水解物的 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、羟基自由基清除能力和 ACE 抑制活性都显著提高。小米蛋白水解物进一步超滤得到不同分子质量的小米多肽,其中分子质量<3 ku 的多肽具有最高的抗氧化能力和 ACE 抑制活性,并通过氨基酸组成分析可知,分子质量<3 ku 的多肽含有较多与抗氧化和 ACE 抑制活性相关的氨基酸,如亮氨酸和苯丙氨酸等。由此可知,采用碱性蛋白酶酶解并通过 3 ku 的超滤膜过滤得到的多肽具有良好的抗氧化活性和 ACE 抑制活性,具有潜在的抗氧化肽和 ACE 抑制肽商业价值,为抗氧化肽和 ACE 抑制肽的工业化生产和商业化开发提供了理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告 2020[J]. 心肺血管病杂志, 2021, 40(9): 885-889. National Center for Cardiovascular Diseases. Annual report on cardiovascular health and diseases in China 2020[J]. Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases, 2021, 40(9): 885-889.
- [2] MAZZA A, SCHIAVON L, RIGATELLI G, et al. The effects of a new generation of nutraceutical compounds on lipid profile and glycaemia in subjects with pre-hypertension [J]. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2019, 26(4): 345-350.
- [3] DASKAYA-DIKMEN C, YUCETEPE A, KARBAN-CIOGLU-GULER F, et al. angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants[J]. Nutrients, 2017, 9(4): 316.
- [4] OCHIAI A, TANAKA S, TANAKA T, et al. Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(10): 2545-2551.
- [5] PISKOV S, TIMCHENKO L, GRIMM W D, et al.

- Effects of various drying methods on some physico-chemical properties and the antioxidant profile and ACE inhibition activity of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*)[J]. *Foods*, 2020, 9(2): 160.
- [6] ZHANG Y, HE S, BONNEIL E, et al. Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin; *In vitro* activity, de novo sequencing, and in silico docking for *in vivo* function prediction[J]. *Food Chemistry*, 2020, 306: 125581.
- [7] SACHDEV N, GOOMER S, SINGH L R. Foxtail millet: a potential crop to meet future demand scenario for alternative sustainable protein[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(3): 831–842.
- [8] CHEN J, DUAN W, REN X, et al. Effect of foxtail millet protein hydrolysates on lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats[J]. *European Journal of Nutrition*, 2017, 56(6): 2129–2138.
- [9] AGRAWAL H, JOSHI R, GUPTA M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2016, 204: 365–372.
- [10] FU Y X, YIN R Y, GUO E H, et al. Protein isolates from raw and cooked foxtail millet attenuate development of type 2 diabetes in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021, 65(6): 2000365.
- [11] 张凡, 李书田, 王显瑞, 等. 小米分离蛋白提取方法优化及对蛋白组成的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(2): 161–170.
- ZHANG F, LI S T, WANG X R, et al. Extraction method optimization of foxtail millet isolated protein and its effect on protein composition[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(2): 161–170.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 5009.6–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, General Administration of Food and Drugs. National Standards for Food Safety, Determination of Protein in Food: GB 5009.6–2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [13] NIELSEND P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642–646.
- [14] 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.
- [15] COTABARREN J, ROSSO A M, TELLECHEA M, et al. Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 848–856.
- [16] SIDDHURAJU P, BECKER K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(1): 10–19.
- [17] YANG B, YANG H S, LI J, et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees[J]. *Food Chemistry*, 2010, 124(2): 551–555.
- [18] GEORGE A, CATRIN T, MASSIMO M, et al. Why do millets have slower starch and protein digestibility than other cereals?[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 33(7): 73–83.
- [19] ZHANG Y F, DUAN X, ZHUANG Y L. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin[J]. *Peptides*, 2012, 38(1): 13–21.
- [20] LU X, ZHANG L, SUN Q, et al. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum* L.) protein hydrolysate[J]. *Food Research International*, 2019, 116: 707–716.
- [21] WANG X M, CHEN H X, FU X G, et al. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2017, 75: 93–99.
- [22] CHALAMAIAH M, KUMAR B D, HEMALATHA R, et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review[J]. *Food Chemistry*,

- 2012, 135(4): 3020–3038.
- [23] CHOMPOONUCH W, HANG X, ERIC A D, et al. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 7–15.
- [24] WANG K, LUO Q W, HONG H, et al. Novel antioxidant and ACE inhibitory peptide identified from *Arthrospira platensis* protein and stability against thermal/pH treatments and simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Research International, 2021, 139: 109908.
- [25] HIMANI A, ROBIN J, MAHESH G. Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate[J]. Food Research International, 2019, 120: 697–707.
- [26] ATEFE M, ALIREZA S M, LETICIA M, et al. Peptide identification in alcalase hydrolysed pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly[J]. Food Research International, 2018, 116: 905–915.
- [27] 梁化亮, 任鸣春, 戈贤平, 等. 亮氨酸对团头鲂生长性能, 抗氧化能力以及免疫反应的影响[C]//中国水产学会. 2017年中国水产学会学术年会论文摘要集, 2017: 1.  
LIANG H L, REN M C, GE X P, et al. Dietary leucine alter growth performance, antioxidant status and immunity of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [C]//China Society of Fisheries. 2017 Chinese Fisheries Society Annual Meeting Paper Abstracts Collection, 2017: 1.
- [28] 岳楠, 赵新淮. 苯丙氨酸添加下酪蛋白类蛋白反应修饰物的抗氧化性质[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 99–102.  
YUE N, ZHAO X H. *In vitro* antioxidant activity of the casein hydrolysates modified by plastein reaction in the presence of phenylalanine [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(10): 99–102.
- [29] 车在前, 顾天华, 吴永杰, 等. 苯丙氨酸缓解高血压大鼠血管重塑[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(2): 121–124.  
CHE Z Q, GU T H, WU Y J, et al. L-phenylalanine ameliorates the vascular remodeling in hypertensive rats [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2005, 21(2): 121–124.
- [30] HE Y, PAN X, CHI C F, et al. Ten new pentapeptides from protein hydrolysate of miyu croaker (*Micthys miyu*) muscle: Preparation, identification, and antioxidant activity evaluation [J]. LWT – Food Science and Technology, 2019, 105: 1–8.
- [31] 沈攀攀, 陈月婷, 肖双凯, 等. “太冲”配“内关”针刺对自发性高血压大鼠血压及延髓头端腹外侧区天冬氨酸及谷氨酸水平的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(2): 102–106.  
SHEN P P, CHEN Y T, XIAO S K, et al. Effect of acupuncture at "Taichong" (LR 3) and "Neiguan" (PC 6) on blood pressure and contents of aspartic acid and glutamic acid in the rostral ventrolateral medulla in spontaneous hypertension rats [J]. Acupuncture Research, 2017, 42(2): 102–106.
- [32] WANG L Y, DING L, YU Z P, et al. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells [J]. Food Research International, 2016, 90: 33–41.
- [33] RAÚL E C, JAVIER V, SILVINA R D. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH [J]. Food Research International, 2015, 69: 216–223.

### Enzymatic Hydrolysis Process of Millet Polypeptides and Its Antioxidant and ACE Inhibitory Activities

Chen Changyu, Chen Borui, Zhao Qingyu, Wang Han, Zhu Yiqing, Shen Qun\*

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University / National Center of Technology Innovation (Deep Processing of Highland Barley) in Food Industry / Beijing Key Laboratory of Plant Protein and Cereal Processing / National Engineering Research Center for Fruit and Vegetable Processing, Beijing 100083)

**Abstract** Millet protein was used as raw material to prepare food-derived peptides with antioxidant activity and an-



giotensin transferase (ACE) inhibitory activity. Alkaline protease, neutral protease and flavor protease were used to hydrolyze millet protein. Three components with molecular weight < 3, 3–10 ku and > 10 ku were obtained from the hydrolysate obtained by alkaline protease for 4 h, and their antioxidant and ACE inhibitory activities were determined. The results showed that the polypeptides with molecular weight < 3 ku obtained from the hydrolysate obtained by alkaline protease for 4 h after ultrafiltration had the highest antioxidant activity and ACE inhibitory activity, with DPPH scavenging capacity of 38.44%, ABTS free radical scavenging capacity of 81.62%, hydroxyl radical scavenging capacity of 68.49%. The inhibitory activity of ACE was 87.53%. The polypeptides obtained by this method have low molecular weight, high content of functional amino acids, and have good antioxidant and ACE inhibitory activities, which provide a basic for the development of antioxidant peptides and ACE inhibitory peptides, and provide a theoretical basis for the future industrial development.

**Keywords** foxtail millet; alkaline protease; antioxidant capacity; ACE inhibitory activity; peptide