

裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的制备

李艳敏¹, 郁书怀¹, 全艳军¹, 杨瑞金², 赵伟^{1,2,*}

(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2.江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:通过响应面法优化裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的制备工艺,以期得到一种调控餐后血糖的新型有效成分。选择五种蛋白酶水解裙带菜蛋白筛选最佳水解酶,研究底物浓度、加酶量、pH、酶解温度、酶解时间对产物抑制率和水解度的影响,并根据单因素实验结果运用 Box-Behnken 设计原理进行三因素三水平的响应面优化试验,测定酶解液的分子量并绘制酶抑制动力学曲线。结果表明,最佳酶解条件为碱性蛋白酶,底物浓度 7.11%, pH10.14, 温度 47℃, 加酶量 10000 U/g, 反应时间 1 h, 在此条件下,酶解液的抑制率为 51.17%, 与预测值接近;裙带菜酶解液多为小肽,半抑制浓度为 46.079 mg/mL,抑制类型为典型的可逆混合型抑制。本研究获得了裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的最佳制备工艺和理化性质,为开发新型降血糖活性肽提供理论基础和实验依据。

关键词:裙带菜, α -葡萄糖苷酶抑制剂, 血糖, 活性肽

Preparation of α -Glucosidase Inhibitory Peptides Derived from Sea Mustard

LI Yan-min¹, YU Shu-huai¹, TONG Yan-jun¹, YANG Rui-jin², ZHAO Wei^{1,2,*}

(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The preparation process of α -glucosidase inhibitory active peptides from sea mustard was optimized by response surface method in order to obtain a new effective ingredient for regulating postprandial blood glucose. Five proteases were selected to hydrolyze sea mustard protein. The effects of substrate concentration, enzyme-substrate ratio, pH, temperature, and hydrolysis time on inhibition rate and degree of hydrolysis were studied. Based on the results of single-factor experiments, Box-Behnken design principle was used to perform a three-factor and three-level response surface optimization test. Then the molecular weight of the hydrolysate was measured and the kinetic curve of enzyme inhibition was drawn. The optimal hydrolysis conditions were: Alcalase, substrate concentration 7.11%, pH10.14, temperature 47℃, enzyme concentration 10000 U/g, and reaction time 1 h. Under these conditions, the inhibition rate was 51.17%. The half-inhibitory concentration of the sea mustard hydrolysate was 46.079 mg/mL, and the inhibition type was typical reversible mixed-type inhibition. In this study, the optimal preparation technology and physicochemical properties of α -glucosidase inhibitory active peptides from sea mustard were obtained, which provided theoretical and experimental basis for the development of novel hypoglycemic active peptides.

Key words: *Undaria pinnatifida*; α -glucosidase inhibitors; blood sugar; active peptide

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)20-0127-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.021

引文格式: 李艳敏, 郁书怀, 全艳军, 等. 裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的制备[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 127-134.

糖尿病是继心血管病、肿瘤之后的第三大慢性非传染性疾病^[1]。其中,有超过 90% 的糖尿病患者患有 2 型糖尿病(T2DM)。2 型糖尿病是一种由代谢、激素、表观遗传和氧化失衡等多因素引发的慢性疾病^[2],可引发视网膜病变、肾病、缺血性心脏病和外周血管病变等多种并发症^[3]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过阻断碳水化合物在体内的消化吸收防止餐后血

糖升高,提高胰岛素敏感性^[4-5],被称为糖尿病学“未被开发的钻石”^[6]。市面上常见的 α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物有阿卡波糖、米格列醇、伏格列波糖等,虽药效好,但是存在价格高、有副作用等缺点^[7-9],因此,从天然产物中筛选和制备出安全、高效、低毒、价廉的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,成为 2 型糖尿病治疗药物的研究热点。

收稿日期:2020-02-03

作者简介:李艳敏(1997-),女,硕士研究生,研究方向:食品加工与配料,E-mail:6190112058@stu.jiangnan.edu.cn。

* 通讯作者:赵伟(1982-),男,博士,教授,研究方向:食品加工与配料,E-mail:zhaow@jiangnan.edu.cn。

基金项目:国际自然科学基金(31901630);江苏省自然科学基金(BK20190583);江南大学基本科研计划-青年基金(JUSRP12007)。

目前,研究人员已从鸡蛋蛋白^[10]、鹰嘴豆^[11]、牡丹籽^[12]、蚕蛹^[13]、条斑紫菜^[14]等动植物蛋白酶解产物中分离纯化得到了一系列降血糖活性肽。裙带菜(*Undaria pinnatifida*)作为三大经济海藻之一,含有岩藻黄质、多肽、褐藻多糖等降血糖成分^[15],可在为身体提供营养的同时防控糖尿病。国内对裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究还停留在极性提取上,黄晓冬等^[16]发现裙带菜的乙醇洗脱组分具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,冯学珍等^[17]从裙带菜的不同极性部位提取得到了 α -葡萄糖苷酶抑制剂,但有关裙带菜降血糖活性肽的研究尚未见报道。

我国裙带菜的工业利用率仅达30%左右^[18],严重导致了资源浪费及环境污染^[19],开发裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂对于裙带菜资源的充分开发利用及提高裙带菜产业的附加值具有深远的意义。本文以制备裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽入手,围绕裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂的工艺优化和理化性质进行研究,为开发新型降血糖活性肽提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

裙带菜粉 江苏华硕士食品有限公司; α -葡萄糖苷酶 上海源叶生物科技有限公司;碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶 诺维信生物技术有限公司;4-硝基苯基- α -D 吡喃葡萄糖苷 阿拉丁试剂有限公司;其他试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

MP-501A 超级恒温循环槽 上海一恒科技有限公司;C-MAG HS 4 S25 磁力搅拌器、Genius3 漩涡振荡器 德国 IKA 公司;Five Easy Plus pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;T-6 型紫外可见分光光度计 南京菲勒仪器有限公司;酶标仪 南京拜尔沃克智能科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 裙带菜的预处理 将裙带菜粉过80目筛,置于50℃烘箱中烘干至恒重。在酶解前对裙带菜进行沸水处理15 min,使酶解位点暴露^[14]。

1.2.2 裙带菜蛋白水解度测定 采用邻苯二甲醛(OPA)法^[20]。

1.2.3 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定 参考 Kwon 等^[21]的方法,根据实际情况进行一定的修改。用67 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH6.8)把 α -葡萄糖苷酶配制成0.5 U/mL的溶液。移取100 μ L α -葡萄糖苷酶溶液和50 μ L 裙带菜酶解液于96孔板中,充分混

合,在37℃烘箱中孵育10 min,再加入50 μ L 5 mmol/L的PNPG溶液,37℃反应0.5 h后加入0.2 mol/L的 Na_2CO_3 溶液100 μ L终止反应,于405 nm下测定吸光度,三次平行试验取平均值。同时设立空白组和背景对照组。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \times 100$$

式中: A_1 :空白组,以缓冲液代替裙带菜酶解液反应后的吸光度; A_2 :样品组,加入样品反应后的吸光度; A_3 :背景对照组,以缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶溶液反应后的吸光度。

1.2.4 蛋白酶的选择 根据各蛋白酶的作用范围,选择合适的酶解条件,如表1所示。将50 mL 裙带菜溶液置于100 mL 酶反应器中,用0.1 mol/L的盐酸和氢氧化钠溶液调节pH至酶的最适pH,在50℃下预热30 min,加入蛋白酶酶解。反应结束后于沸水浴灭酶15 min,待冷却后离心收集上清液。以抑制率为主要指标,蛋白质水解度为辅助指标,筛选出最佳水解用酶。

1.2.5 酶解条件单因素实验 分别研究底物浓度、加酶量、pH、酶解温度、反应时间对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和裙带菜蛋白的水解度的影响。

1.2.5.1 底物浓度的确定 选取碱性蛋白酶,在加酶量8000 U/g、pH10.5、酶解时间4 h、酶解温度50℃的条件下,考察1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%不同底物浓度对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和裙带菜蛋白水解度的影响。

1.2.5.2 加酶量的确定 选取碱性蛋白酶,在底物浓度7%、pH10.5、酶解时间4 h、酶解温度50℃的条件下,考察不同加酶量2000、4000、6000、8000、10000、12000 U/g对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和裙带菜蛋白水解度的影响。

1.2.5.3 pH的确定 选取碱性蛋白酶,在底物浓度7%、加酶量10000 U/g、酶解时间4 h、酶解温度50℃的条件下,考察不同pH8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和裙带菜蛋白水解度的影响。

1.2.5.4 酶解温度的确定 选取碱性蛋白酶,在底物浓度7%、加酶量10000 U/g、pH10.0、酶解时间4 h的条件下,考察40、45、50、55、60℃不同酶解温度对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和裙带菜蛋白水解度的影响。

1.2.5.5 反应时间的确定 选取碱性蛋白酶,在底物浓度7%、加酶量10000 U/g、pH10.0、酶解温度

表1 蛋白酶的作用条件

Table 1 The reaction conditions of protease

水解条件	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	酸性蛋白酶	木瓜蛋白酶	风味蛋白酶
温度(℃)	50	50	50	50	50
时间(h)	4	4	4	4	4
底物浓度(%)	4	4	4	4	4
加酶量(U·g ⁻¹)	8000	8000	8000	8000	8000
pH	10.5	7.5	3.0	7.5	7.5

45 ℃ 的条件下,考察 1、2、3、4、5 h 不同反应时间对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和裙带菜蛋白水解度的影响。

1.2.6 响应面优化试验 单因素实验反映了底物浓度、pH、酶解温度为影响抑制率较为显著的三个因素,且酶解液的抑制率与水解度非线性关系。因此,运用 Box-Behnken 设计原理,控制加酶量 10000 U/g,酶解时间 1 h,以底物浓度 (X_1)、pH (X_2)、酶解温度 (X_3) 为变量,以抑制率 (Y) 为响应值,展开三因素三水平的响应面试验,因素与水平设计见表 2。

表 2 试验设计因素与水平
Table 2 Independent variables and their coded and actual values

水平	因素		
	X_1 底物浓度 (%)	X_2 pH	X_3 温度 (℃)
-1	6	9.5	40
0	7	10.0	45
1	8	10.5	50

1.2.7 裙带菜降血糖活性肽的相对分子量分布 裙带菜酶解液用 0.22 μ m 滤膜处理备用。色谱条件:液相色谱柱 TSKgel 2000 SWxl (300 mm $\times$ 7.8 mm, 5 μ m);柱温为 30 ℃;流动相:水:三氯乙酸:乙腈 = 550:450:1 (V/V);流速为 1 mL/min;进样量为 5 μ L;检测波长为 220 nm。分子质量校正曲线所用标准品:细胞色素 ($M_w = 12500$),杆菌酶 ($M_w = 1450$),乙胺酸-乙胺酸-酪氨酸-精氨酸 ($M_w = 451$),乙胺酸-乙胺酸-乙胺酸 ($M_w = 189$)^[22]。

1.2.8 半抑制浓度和抑制类型的测定 半抑制浓度:将酶解液冷冻干燥。配制一系列不同浓度的多肽溶液 (10、20、30、40、50、60 mg/mL),测定各浓度溶液的抑制率。

抑制类型:将裙带菜多肽粉配制 30 mg/mL 的溶液,固定多肽溶液和底物 PNPG 溶液的浓度不变,配制一系列不同浓度的 α -葡萄糖苷酶溶液 (1、0.5、0.333、0.25、0.167 U/mL),测定反应初速度。用缓冲溶液代替抑制剂作为空白对照。反应初速度以每分钟生成的 PNP 量计算。以酶浓度为纵坐标、反应初速度为纵坐标做曲线。

将裙带菜多肽粉配制 30 mg/mL 的溶液,固定多肽溶液和酶溶液的浓度不变,配制一系列不同浓度的 PNPG 溶液 (2、4、6、8、10 mmol/L),测定反应初速度。用缓冲溶液代替抑制剂作为空白对照。以 PNPG 浓度为纵坐标、反应初速度为纵坐标做曲线。然后以 PNPG 浓度的倒数为横坐标、以反应初速度的倒数为纵坐标,作 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,判断裙带菜酶解液的抑制类型。

1.3 数据处理

本实验部分数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。使用 Origin 9.1 作图,SPSS 24 和 Excel 2017 数据分析,响应面实验采用 Design-Expert.V8.0.6 软件进行数据处理及相关分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的选择

各类蛋白酶的主要作用位点如表 3 所示,酶切位点不同导致产生不同大小和结构的多肽,具有不同的生理活性^[14]。如图 1 所示,裙带菜经 5 种不同蛋白酶水解后,抑制作用最强的是碱性蛋白酶的酶解产物,抑制率达到 23.63%,其次是木瓜蛋白酶,且经碱性蛋白酶酶解的酶解液的水解度仅次于风味蛋白酶。据报道,活性肽段通过氢键、极性和疏水作用与 α -葡萄糖苷酶催化位点上的氨基酸相结合,从而阻碍糖苷酶的生理功能^[5],多肽 C 端存在丙氨酸、蛋氨酸残基和 N 端存在含羟基的氨基酸 (丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸) 残基可能会增强抑制活性^[23]。鉴于碱性蛋白酶存在丙氨酸和酪氨酸的酶切位点,其酶解产物拥有的特定序列可能通过某种作用与 α -葡萄糖苷酶催化位点上的氨基酸相结合,且结合程度相比于其他蛋白酶酶解产物更高,由此得到了最大抑制率。综上,选取碱性蛋白酶作为最佳用酶,进行接下来的工艺优化。

表 3 各类蛋白酶的主要作用位点
Table 3 Main reaction sites of different enzymes

蛋白酶种类	主要氨基酸作用位点
碱性蛋白酶	Ala-1、Leu、Val、Tyr-1、Phe、Trp-1
中性蛋白酶	Tyr、Phe、Trp-1
酸性蛋白酶	优先切开两端是芳香族或疏水性氨基酸残基之间的肽键
木瓜蛋白酶	Arg-1、Lys-1、Phe
风味蛋白酶	肽链末端疏水性氨基酸

注:AA-1 表示酶的作用位点在氨基酸羧基端。

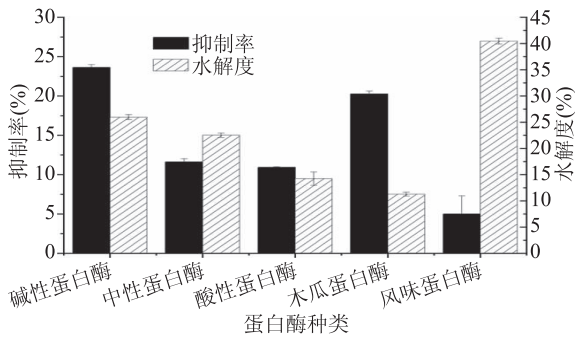


图 1 最佳蛋白酶的选择

Fig.1 Selection of the best protease

2.2 单因素酶解条件的研究

2.2.1 底物浓度的确定 从图 2 可以看出,随着底物浓度不断升高,酶解液的抑制率和蛋白质水解度都在初期呈现上升趋势,底物浓度 7% 时抑制率最高,为 42.87%,此时的水解度为 16.66%,但底物浓度 5%~8% 之间的抑制率无显著性差异 ($P > 0.05$)。出现此现象的可能原因是随着底物浓度的增高,溶液黏度不断增加,阻碍了酶与底物的充分接触,致使水解度和抑制率降低。因此,将底物浓度 7% 作为响应面中心实验点。

2.2.2 加酶量的确定 由图 3 可知,随着加酶量的增

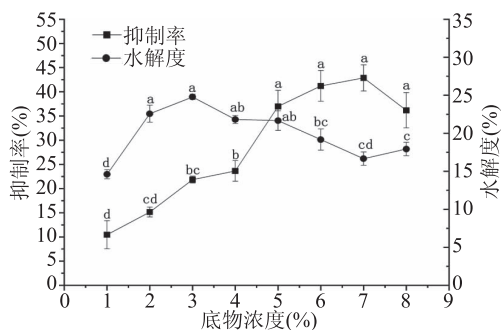


图2 不同底物浓度对抑制率和水解度的影响

Fig.2 Effects of different substrate concentrations on inhibition rate and hydrolysis degree

注:不同小写字母表示相同指标

存在显著性差异($P < 0.05$);图3~图6同。

加,酶解液的抑制率和蛋白质水解度都在初期呈现上升趋势,当加酶量为 10000 U/g 时,抑制率达到最大值为 44.69%,随后抑制率开始显著下降($P < 0.05$),但是水解度仍然显著升高($P < 0.05$),当加酶量为 12000 U/g 时,水解度达到最高。可能由于在 10000 U/g 的加酶量时水解过度,导致抑制率下降。因此,选择最佳加酶量为 10000 U/g。

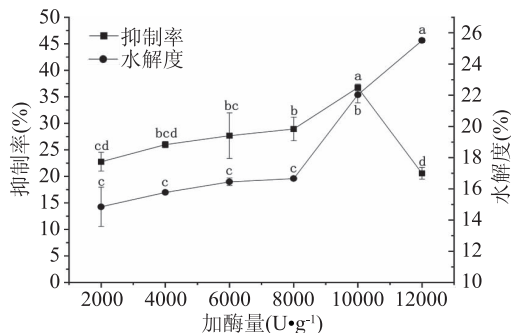


图3 不同加酶量对抑制率和水解度的影响

Fig.3 Effect of different enzyme-substrate ratio on inhibition rate and hydrolysis degree

2.2.3 pH 的确定 pH 的大小影响酶的构象和稳定性,还影响酶和底物的解离状态,进而影响其催化活性。因此,在一定条件下酶都有最适的 pH。由图 4 可以看出,随着 pH 的增加,在一定范围内,酶解液的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈现上升趋势,当 pH 为 10.0 时,抑制率达到最大值为 46.18%,随后抑制率开始下降,但 pH9.0~10.5 之间抑制率不存在显著性差异($P > 0.05$)。pH9.5 之后水解度随着 pH 的增加而显著下降($P < 0.05$)。可能由于碱性蛋白酶的最适 pH 在 9.5 及之前,这与周峰^[14]在探究碱性蛋白酶酶解条斑紫菜蛋白制备降血糖活性肽的结果是一致的。产生这种现象的原因可能是,在 pH 在 9.0~10.5 范围时,碱性蛋白酶不是处在最适 pH,水解度没有达到最大,但酶解产生的多肽分子量大小恰好可与 α -葡萄糖苷酶作用,产生最大抑制。因此,将 pH10.0 作为响应面中心试验点。

2.2.4 酶解温度的确定 由图 5 可以看出,抑制率随反应温度变化的趋势与 pH 类似,当温度为 45 °C 时,抑制率达到最大值为 50.32%,50 °C 以后抑制率开始

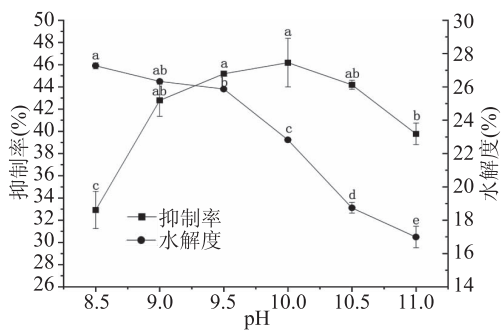


图4 不同 pH 对抑制率和水解度的影响

Fig.4 Effects of different pH on inhibition rate and hydrolysis degree

显著下降($P < 0.05$),但 45 与 50 °C 之间抑制率不存在显著性差异($P > 0.05$)。水解度随着 pH 的增加也呈现相似趋势,在温度为 55 °C 时水解度最大。说明在此反应中碱性蛋白酶的最适温度是 55 °C 附近。产生这种现象的原因可能是,在 45~50 °C 时,碱性蛋白酶不是处在最适温度,水解度没有达到最大,但酶解产生的多肽分子可与 α -葡萄糖苷酶更好结合,产生最大抑制,当温度继续升高,水解度不断增加,水解产生的多肽过小,溶液中有效活性肽段的比例降低,抑制率下降。因此,将温度 45 °C 作为响应面中心试验点。

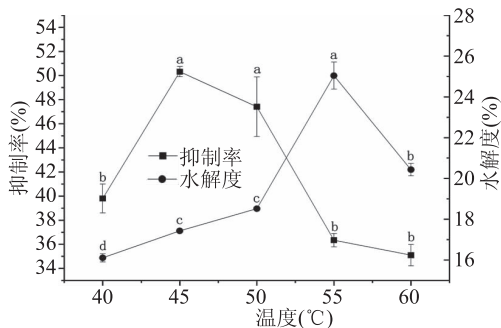


图5 不同温度对抑制率和水解度的影响

Fig.5 Effects of different temperature on inhibition rate and hydrolysis degree

2.2.5 反应时间的确定 由图 6 可以看出,酶解液对 α -葡萄糖苷酶的抑制率随着反应时间的增加没有显著性变化($P > 0.05$)。水解度随着反应时间的增加先升高后降低,在反应时间为 4 h 时水解度最大。但

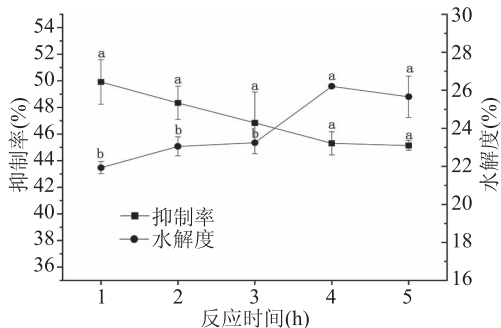


图6 不同反应时间对抑制率和水解度的影响

Fig.6 Effects of different action time on inhibition rate and hydrolysis degree

是,两个指标的变化幅度都不大,可能是因为在加酶量较大的情况下,酶解反应迅速进行,在 1 h 左右反应就已经基本进行完成,在之后的几小时不会产生较大的变化。因此,为了提高实验效率,选择最佳反应时间为 1 h。

2.3 响应面优化试验

2.3.1 响应面优化试验设计及结果 17 个试验点的试验结果见表 4。

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken test

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 抑制率(%)
1	0	1	1	43.64
2	1	1	0	42.38
3	0	0	0	48.27
4	0	0	0	49.04
5	-1	-1	0	32.31
6	0	-1	-1	24.60
7	0	-1	1	41.82
8	-1	0	1	40.88
9	0	1	-1	43.02
10	0	0	0	48.40
11	1	0	1	46.49
12	0	0	0	50.74
13	1	0	-1	25.56
14	-1	1	0	40.18
15	0	0	0	49.57
16	-1	0	-1	34.56
17	1	-1	0	28.08

2.3.2 模型方差分析 对表 4 的试验数据进行分析,得到回归方程:

$$Y = 49.20 - 0.68X_1 + 5.30X_2 + 5.64X_3 + 1.61X_1X_2 + 3.651X_1X_3 - 4.15X_2X_3 - 7.43X_1^2 - 6.03X_2^2 - 4.90X_3^2。$$

表 5 回归模型的方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
模型	1157.21	9	128.58	56.95	<0.0001	**
X ₁	3.67	1	3.67	1.63	0.2429	
X ₂	224.83	1	224.83	99.58	<0.0001	**
X ₃	254.14	1	254.14	112.56	<0.0001	**
X ₁ X ₂	10.34	1	10.34	4.58	0.0697	
X ₁ X ₃	53.36	1	53.36	23.64	0.0018	**
X ₂ X ₃	68.89	1	68.89	30.51	0.0009	**
X ₁ ²	232.57	1	232.57	103.01	<0.0001	**
X ₂ ²	153.33	1	153.33	67.91	<0.0001	**
X ₃ ²	101.07	1	101.07	44.77	0.0003	**
残差	15.80	7	2.26			
失拟项	11.77	3	3.92	3.88	0.1115	
纯误差	4.04	4	1.01			
总和	1173.02	16				

$R^2 = 0.9865; R^2_{Adj} = 0.9692$

注: * 为差异显著(P<0.05); ** 为差异极显著(P<0.01)。

各因素对抑制率影响的方差分析如表 5 所示。
由表 5 方差分析可看出,该模型回归极显著 ($P<0.01$),失拟项不显著 ($P>0.1$),总决定系数 $R^2=0.9865$,调整决定系数 $R^2_{Adj}=0.9692$,表明此回归方程拟合程度良好,可以用于描述各自变量与响应值之间的关系。偏差系数 $CV=3.70\%$,表明此实验的精确度很高,操作可靠,用该模型优化裙带菜降血糖活性肽酶解工艺是合理的。

对回归方程系数进行显著性检验,各因素在所选水平范围内,对抑制率的贡献率为:温度(X_3)>pH(X_2)>底物浓度(X_1)。其中,方程的一次项 X_2 、 X_3 、二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 和交互项 X_1X_3 、 X_2X_3 对响应值影响极显著 ($P<0.01$)。

2.3.3 各因素交互作用分析 曲面的陡峭程度可说明因素对抑制率的影响大小,等高线形状可判断各因素交互作用的强弱^[24]。图 7a 的等高线图形状近似圆形,表明底物浓度与 pH 两个自变量之间的交互作用不显著,底物浓度对抑制率的影响较大,表现为响应面图曲线较陡峭和等高线较密集。图 7b 的等高线形状呈椭圆形,表明底物浓度与温度的交互作用显著,底物浓度对抑制率的影响大于温度。图 7c 的等高线形状呈椭圆形,表明温度与 pH 的交互作用显著,pH 对抑制率的影响远大于温度,在一定程度上增大 pH 有助于得到更高的抑制率。这与表 5 的方差分析结果一致。

2.3.4 验证实验 采用 Design-Expert 8.0.6.1 对回归模型进行分析,得到最佳工艺为:底物浓度 7.11%,pH10.14,温度 47.48 ℃,加酶量 10000 U/g,反应时间 1 h,活性肽抑制率的最大预测值为 51.31%。因仪器设定条件及实验操作方便等原因将条件相应调整为底物浓度 7.11%,pH10.14,温度 47 ℃,加酶量 10000 U/g,反应时间 1 h。开展三次平行试验进行验证,酶解液的抑制率为 51.17%,此结果与最佳酶解条件下的预测值的误差小于 1%,说明回归方程与实

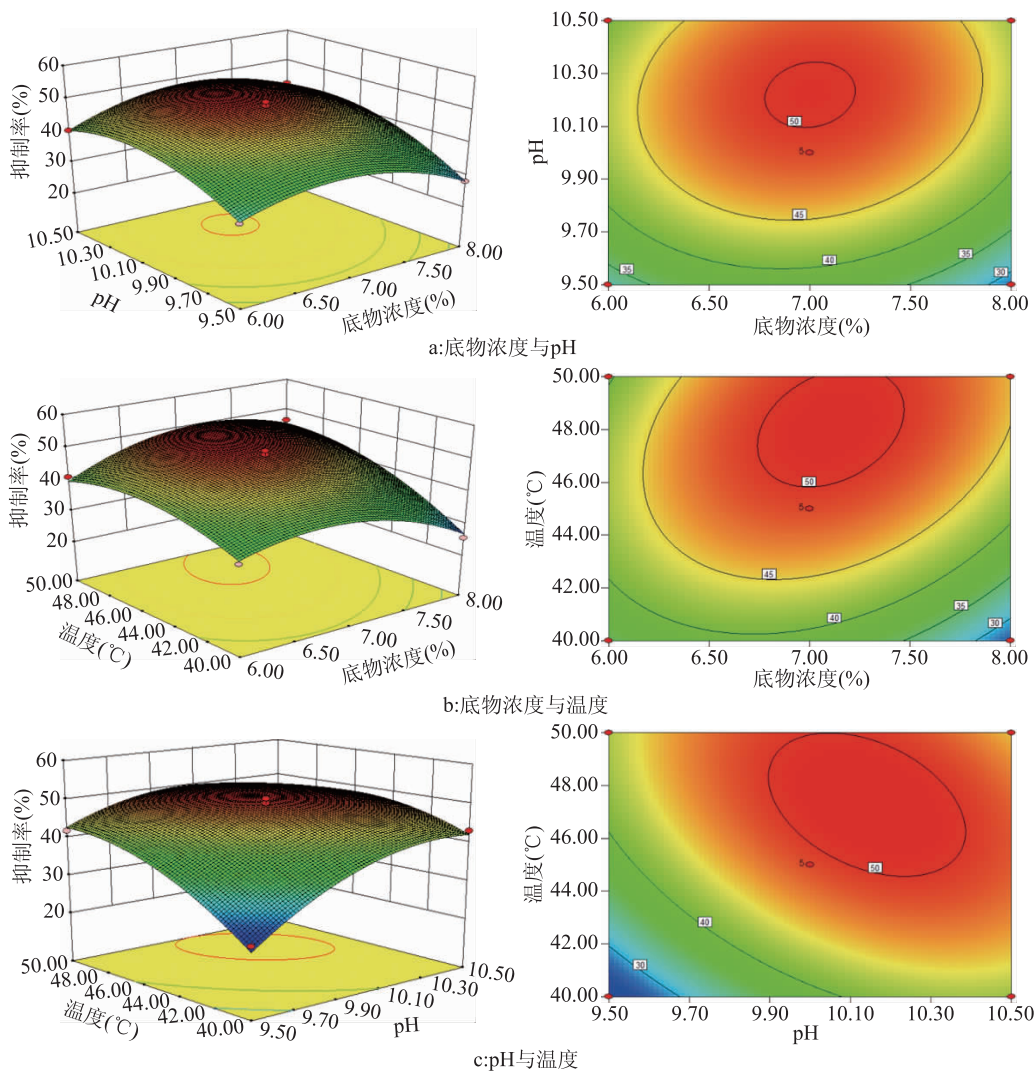


图7 各因素交互水平对抑制率影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface plots for the interactive effects of different variables on inhibition rate

际情况拟合良好,可以应用于实际操作。

2.4 裙带菜降血糖活性肽的分子量分布

研究表明,肽的生物活性与其分子量大小有着紧密联系。2~4 个氨基酸组成的小肽具有特殊的转运机制,吸收速度快且不消耗能量。短肽容易以完整的形式被吸收进入人体代谢循环中,从而其生理活性较易保持。顾欣等^[25]在研究山杏仁蛋白源α-葡萄糖苷酶抑制肽时发现,酶解肽的分子量越小,对α-葡萄糖苷酶的抑制率越大。因此,本研究采用液相色谱柱 TSKgel 2000 SWxl 对裙带菜酶解液的相对分子量分布进行分析,绘制图 8 所示的分子量分布矫正曲线,得到表 6 所示的分子量分布。

表 6 裙带菜酶解液的分子量分布

Table 6 Molecular weight distribution of *Undaria pinnatifida* hydrolysate

分子量 (kDa)	含量 (%)
10~5	1.24
5~1	9.83
1.0~0.5	15.03
<0.5	73.90

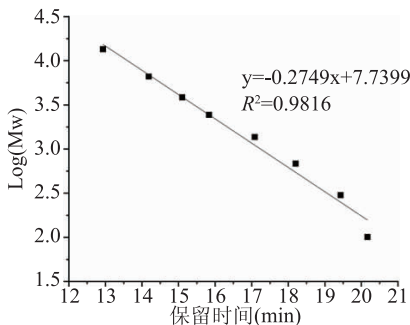


图8 分子量分布矫正曲线

Fig.8 Correction curve of molecular weight distribution

由表 6 可以看出,裙带菜经碱性蛋白酶酶解 1 h 后所得的酶解液中,分子量在 5 kDa 以上的肽段已经很少,分子量在 1 kDa 以下的小分子多肽所占的比例极大,其中有 73.90% 比例的多肽分子量小于 0.5 kDa,即二肽、三肽、四肽或氨基酸,这部分肽段可能对抑制 α-葡萄糖苷酶有着主要贡献,且较易被人体吸收利用。

2.5 半抑制浓度和抑制类型

2.5.1 半抑制浓度 由图 9 可以看出,随着裙带菜酶

解液浓度的升高,抑制率逐渐升高,但是浓度与抑制率并不是线性关系。当浓度为 46.097 mg/mL 时,抑制率达到 50%,此浓度为裙带菜降血糖活性肽的半抑制浓度。与阳性对照阿卡波糖(0.119 mg/mL)相比,样品的抑制作用较弱,原因是裙带菜活性肽的纯度较低,仍含有许多杂质,可通过进一步的纯化提高抑制能力。

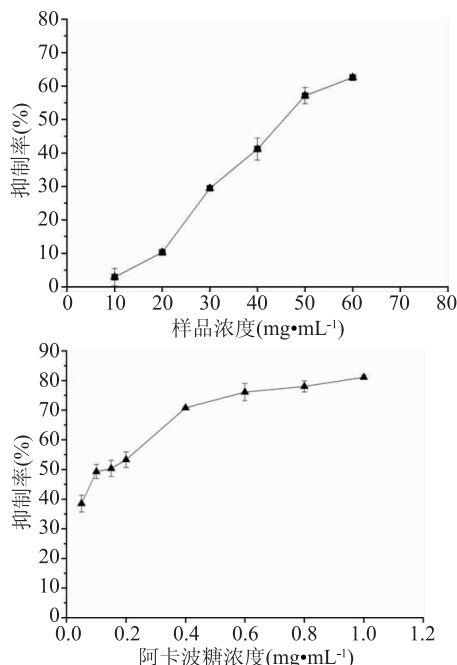


图9 裙带菜降血糖活性肽和阿卡波糖的 IC_{50} 测定

Fig.9 IC_{50} determination of *Undaria pinnatifida* hypoglycemic active peptide and acarbose

2.5.2 抑制类型 由加抑制剂与不加抑制剂的酶反应速率曲线可判断出抑制作用是否可逆,两条曲线平行则为不可逆抑制,两条曲线相交于原点则为可逆抑制^[26]。由图 10 可知,两条图线近似交于原点,且随着抑制剂的加入,图线斜率下降,表明裙带菜降血糖活性肽的抑制作用是一个可逆过程,抑制剂通过非共价键与酶或酶-底物复合物可逆性结合,降低酶的催化活性进而降低反应速率^[27]。

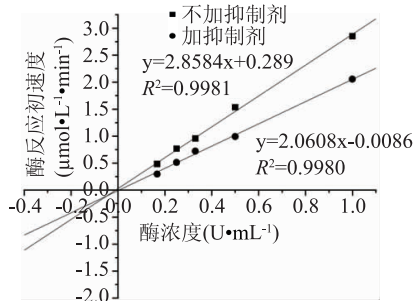


图10 裙带菜降血糖活性肽对 α -葡萄糖苷酶抑制作用分析

Fig.10 Analysis of the inhibitory effect of hypoglycemic peptides from *Undaria pinnatifida* on α -glucosidase

由图 11 可知,随着底物浓度的增加,酶反应速度都有所增加,加入抑制剂的实验组相较于不加抑制剂的实验组,速率增加更加缓慢。以 PNPG 浓度的倒数为横坐标、以反应初速度的倒数为纵坐标,作

Lineweaver-Burk 双倒数曲线,如图 12 所示。

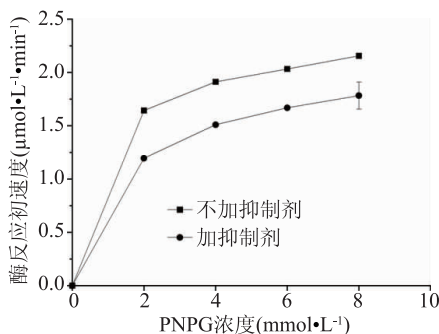


图11 α -葡萄糖苷酶的 v -[S] 图

Fig.11 v -[S] diagram of α -glucosidase

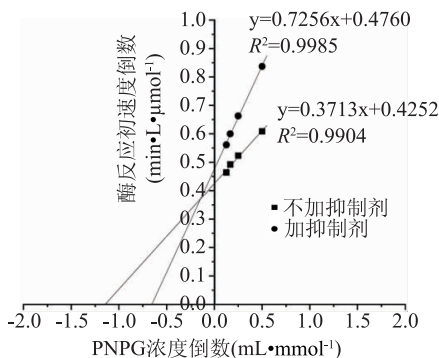


图12 α -葡萄糖苷酶的双倒数曲线

Fig.12 Double reciprocal plot of α -glucosidase

Lineweaver-Burk 双倒数作图是一种判断酶抑制类型非常有效的方法,作图后如果得到一组相较于 Y 轴的直线,则为竞争性抑制,如果得到一组相交于 X 轴的直线,则为非竞争性抑制,如果得到一组平行的直线,则为反竞争性抑制,如果得到一组交于二、三象限的直线,则为混合型抑制^[28]。由图 12 可以看出,两条图线交于第二象限,说明加入抑制剂后,米氏常数 K_m 增大,最大反应初速度 V_m 减小,因此本抑制类型为典型的混合型抑制。抑制剂既能在酶的活性部位以外与游离酶结合,也能在非活性中心位点与酶-底物络合物结合,致使反应速率的降低^[29]。

3 结论

随着糖尿病患者急剧增多,寻找安全有效的降血糖药物成为亟待解决的一大问题,利用现代生物技术开发裙带菜相关保健食品,可以改善膳食营养结构,提高人类健康水平,满足药食同源的需求。本研究利用碱性蛋白酶解裙带菜制备降血糖活性肽,经过单因素实验和响应面优化试验,得到最佳酶解工艺为底物浓度 7.11%, pH10.14, 温度 47 °C, 加酶量 10000 U/g, 反应时间 1 h, 在此条件下得到酶解产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 51.17%, 酶解产物主要为较易被人体吸收利用的短肽类,半抑制浓度为 46.097 mg/mL,抑制类型为典型的可逆混合型抑制。研究内容对于寻找新型 α -葡萄糖苷酶抑制剂和发展裙带菜的深加工产业具有一定的借鉴意义,但是还存在着酶解产物纯度低、只进行了体外实验等问题,未来需要对活性肽进一步纯化并开展体内研究,发现其抑制 α -葡萄糖苷酶的分子机制,并探索实验

室研究成果与产业相连接的有效方法。

参考文献

- [1] 曹石金,何朝辉,李逊,等.糖尿病大鼠模型的制备[J].解剖学研究,2012,34(4):295-298.
- [2] Dalmazi G D, Pagotto U, Pasquali R, et al. Glucocorticoids and type 2 diabetes: From physiology to pathology [J]. Journal of Nutrition and Metabolism, 2012, 2012(12):525093.
- [3] 苏照环.海洋生境分泌 α -淀粉酶抑制剂微生物的筛选及活性成分纯化的研究[D].桂林:广西师范大学,2013.
- [4] Prasad Patil, Surajit Mandal, Sudhir Kumar Tomar, et al. Food protein - derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes [J]. European Journal of Nutrition, 2015, 54(6):863-880.
- [5] Mojica L, Elvira González de Mejía. Optimization of enzymatic production of anti - diabetic peptides from black bean (L.) proteins, their characterization and biological potential [J]. Food & Function, 2016, 7(2):713-727.
- [6] Valko M I, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1):44-84.
- [7] Krentz A J, Bailey C J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus [J]. Drugs, 2005, 65(65):385-411.
- [8] Nathan D M, Buse J B, Davidson M B, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy [J]. Diabetologia, 2006, 49(8):1711-1721.
- [9] Campbell L K, Baker D E, Campbell R K. Miglitol: Assessment of its role in the treatment of patients with diabetes mellitus [J]. Annals of Pharmacotherapy, 2000, 34(11):1291-1301.
- [10] Yu Z, Yin Y, Zhao W, et al. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting α -glucosidase [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4):1376-1382.
- [11] 李昱菲,田洪磊,詹萍,等.酶解鹰嘴豆制备 α -葡萄糖苷酶抑制肽的工艺研究[J].食品工业,2016,37(6):156-161.
- [12] 颜辉,蔡豪,贾俊强,等.牡丹籽酶解制备降血糖肽工艺的响应面优化[J].江苏农业科学,2017,45(14):167-170.
- [13] 张玉,王伟,张一帆,等.响应面法优化蚕蛹蛋白源 α -葡萄糖苷酶抑制肽酶解条件[J].中国食品学报,2016(4):137-144.
- [14] 周锋.蛋白酶水解条斑紫菜产活性肽的研究[D].无锡:

江南大学,2014.

- [15] Lei W, Young-Jin P, You-Jin J, et al. Bioactivities of the edible brown seaweed, Undaria pinnatifida: A review [J]. Aquaculture, 2018; S0044848618308950-.
- [16] 黄晓冬,黄世英,戴聪杰,等.裙带菜乙醇洗脱组分对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J].泉州师范学院学报,2017,35(6):12-16.
- [17] 冯学珍,覃慧逢,赵丽婷,等.食用海藻中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选及抑制动力学[J].食品工业,2019,40(6):195-198.
- [18] 王明艳,周琴,杨俊,等.响应面法同步优化裙带菜中蛋白和多糖提取工艺[J].食品科学,2012,33(24):66-71.
- [19] 裴钊.裙带菜的综合利用研究[D].青岛:中国海洋大学,2013.
- [20] 罗艳华,王全杰,陈沛海,等.蛋白水解物水解度测定方法的研究[J].皮革与化工,2017,34(2):26-31.
- [21] Kwon Y, Vatter D A, Shetty K. Evaluation of clonal herb of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension [J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2006, 15(1):107-118.
- [22] 李艳红.鹰嘴豆蛋白酶解物的制备及其抗氧化肽的研究[D].无锡:江南大学,2008.
- [23] Ibrahim MA, Bester MJ, Neitz AWH, et al. Structural properties of bioactive peptides with α -glucosidase inhibitory activity [J]. Chemical Biology & Drug Design. 2017, 91(2):370-379.
- [24] Rodríguez-González V M, Femenia A, Minjares-Fuentes R, et al. Functional properties of pasteurized samples of Aloe barbadensis Miller: Optimization using response surface methodology [J]. LWT - Food Science and Technology, 2012, 47(2):225-232.
- [25] 顾欣,崔洁,李迪,等.山杏仁蛋白源 α -葡萄糖苷酶抑制肽的分离、纯化及鉴定[J].中国粮油学报,2016,31(8):116-121.
- [26] 王镜岩.生物化学.上册[M].北京:高等教育出版社,2002:370-373.
- [27] 丁浩森,孙弢,夏彭奎,等.羊栖菜组分多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].核农学报,2019,33(2):95-102.
- [28] 王占一,廖成斌,公金艳,等.复合酶提取石榴幼果总黄酮工艺优化及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J].食品工业科技,2019,40(9):178-183,188.
- [29] 李娜,鲁晓翔.红花黄酮对酪氨酸酶的抑制及其机理研究[J].食品科技,2010(12):176-179.

(上接第121页)

America, 1978, 75(10):4801-4805.

- [23] 杨钰昆,宋佳,乔沈,等.高效液相色谱法同时测定酵素原液中的乳酸和醋酸[J].食品工业科技,2018,39(10):246-250.
- [24] 王祝健,马海乐,崔恒林.醋醅中细菌菌株的分离鉴定及系统学分析[J].中国食品学报,2011,11(6):170-176.
- [25] 姚洪礼.基于16SrDNA的醋酸菌筛选及其发酵特性食品科学[J],2017,38(4):6-11.
- [26] 朱其瀚.镇江香醋发酵过程中微生物分离及其产酸特性[D].无锡:江南大学,2008.

- [27] 金鸿娟,林颖,管彬彬,等.基于多变量分析结合HPLP的镇江香醋有机酸季节差异性分析[J].中国食品学报,2015,15(4):218-226.
- [28] 吕艳歌,马海乐,张志燕,等.山西老陈醋醋酸发酵过程中有机酸的变化分析[J].中国酿造,2013,32(5):55-58
- [29] 刘芳,张奶英,刘书亮,等.四川麸醋发酵过程中有机酸及游离氨基酸含量变化分析[J].食品与机械,2017,33(7):11-15.
- [30] 张丽娟,许伟,许泓瑜.恒顺香醋固态发酵过程中有机酸的变化分析[J].中国调味品,2009,34(2):106-109.