

海参二肽基肽酶 IV 抑制肽的酶解制备及结构鉴定

刘志彤, 郑淋, 王晨阳, 赵谋明

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 通过抑制二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl-peptidase IV, DPP-IV) 的活性, 从而减少 GLP-1 的降解, 提高血液中胰岛素的水平, 是控制血糖水平的一种重要手段。本文以海参 (*Holothuria tubulosa*) 为原料, 通过探究蛋白酶种类、加酶量和酶解时间对酶解产物 DPP-IV 抑制活性、蛋白回收率和水解度的影响, 确定了海参 DPP-IV 抑制肽的制备条件, 并进一步测定了其分子量分布和总氨基酸组成, 最后通过 UPLC-MS/MS 鉴定了其潜在的活性肽序列。结果发现, 木瓜蛋白酶与复合蛋白酶 1:1 的复配酶解具有最佳的酶解效果, 其产物的得率和 DPP-IV 抑制活性均最高, 且在加酶量为干海参质量的 1%, 酶解时间为 4 h 时, 海参酶解产物在终浓度为 2 mg/mL 时的 DPP-IV 抑制率为 66.97%, 蛋白回收率为 76.25%, 水解度为 6.10%。酶解产物的分子量大都小于 5000 u, 且富含脯氨酸 (Pro) 和丙氨酸 (Ala) 等与抑制 DPP-IV 活性有关的氨基酸。将获得的酶解物中的肽段进行液质联用检测, 并通过 Mascot 分析筛选得到 28 条具 DPP-IV 抑制肽的肽序列, 分子量在 500~1936 u。本实验结果为以海参为原料进行降血糖产品的开发奠定了基础。

关键词: 海参; DPP-IV 抑制肽; 制备; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2020)08-166-174

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.1124

Preparation and Structure Identification of Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides from *Holothuria tubulosa* by Enzymatic Hydrolysis

LIU Zhi-tong, ZHENG Lin, WANG Chen-yang, ZHAO Mou-ming

(College of Food Sciences and Food Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) inhibitors are among the newest agents to regulate blood glucose levels by preventing degradation of the gut-derived hormone GLP-1. These inhibitors play an important role in regulating insulin secretion. In this study, DPP-IV inhibitory peptides were prepared from sea cucumber (*Holothuria tubulosa*) by enzymatic hydrolysis. The types of protease, their concentrations, and hydrolysis times were optimized to maximize DPP-IV inhibition, protein recovery (PR), and degree of hydrolysis (DH). In addition, the molecular weight distribution and the total amino acid composition of each hydrolysate were determined. DPP-IV inhibitory peptide sequences were identified by UPLC-MS/MS. Sea cucumber hydrolysates prepared with a 1:1 combination of papain and Protamex displayed optimal hydrolysis efficiency, and yielded products exhibiting the highest DPP-IV inhibition and PR. Optimal hydrolysis conditions were as follows: the total amount of Protamex added was 1% of the mass of the dry sea cucumber, and hydrolysis time was 4 h. Under these optimal conditions, DPP-IV inhibition, PR, and DH were 66.97%, 76.25%, and 6.10%, respectively. Most peptide molecular weights in the optimal enzymatic hydrolysates were under 5000 u. The peptides were rich in Pro, Ala, and other amino acids related to DPP-IV inhibition. Peptides within the hydrolysates were identified by UPLC-MS/MS. Twenty eight of these polypeptides (with molecular weights ranging from 500 to 1936 u) were found by Mascot analysis to possess features typical of DPP-IV inhibitory peptides. The results of this study lay a foundation for development of

引文格式:

刘志彤, 郑淋, 王晨阳, 等. 海参二肽基肽酶 IV 抑制肽的酶解制备及结构鉴定[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 166-174

LIU Zhi-tong, ZHENG Lin, WANG Chen-yang, et al. Preparation and structure identification of dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from *Holothuria tubulosa* by enzymatic hydrolysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 166-174

收稿日期: 2019-11-19

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2018MS91); 广西创新驱动发展专项资金项目 (桂科 AA17204075)

作者简介: 刘志彤 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

hypoglycemic agents from sea cucumber.

Key Words: sea cucumber; DPP-IV inhibitory peptides; preparation; identification

糖尿病是一种以高血糖为主要特征的代谢性疾病,是由于胰岛素作用缺陷或胰岛功能障碍,或两者兼有引起。长期高血糖状态可能导致各组织器官,特别是眼、足、肝、肾、心脏等慢性损害与功能障碍,产生严重的并发症,危害生命健康。目前糖尿病的治疗主要是采用药物或注射胰岛素的方式来控制血糖水平,但长期使用会产生低血糖或肝肾功能损害等严重的副作用。所以,食源性降血糖替代品已经成为全世界关注的焦点^[1]。

二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl-peptidase IV, DPP-IV) 是一种细胞表面的丝氨酸蛋白酶,其主要作用是优先将氨基末端第 2 个氨基酸为丙氨酸 (Ala) 或脯氨酸 (Pro) 的寡肽的氨基末端前两个氨基酸残基剪切去除。在血糖调节的过程中,胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 能通过刺激胰岛素分泌、促进胰岛 β 细胞的增殖和分化与抑制胰高血糖素分泌等方式降低血糖,其氨基末端第 2 个氨基酸为丙氨酸,容易被 DPP-IV 酶剪切,失去促胰岛素分泌等活性^[2]。因此,抑制 DPP-IV 活性从而减少 GLP-1 分解是糖尿病治疗的重要方向之一^[3]。目前国内关于 DPP-IV 抑制肽的研究报道较少,关于制备 DPP-IV 抑制肽的食源性原料仅有牛乳酪蛋白^[4]和各海洋鱼类^[5]等少数几种。

在过去的 30 年中,先后有中医提出以海参单用或组方治疗肿瘤、再生障碍性贫血和糖尿病等疾病,并取得了良好的效果^[6]。同时大量研究表明,海参 (*Holothuria tubulosa*) 具有较强的降血糖活性^[7-10]。王静凤^[7]等证明日本刺参具有降血糖功效,并证明其作用机制可能与胰岛素介导的 PI3K/PKB/Glut4 信号通路有关。胡世伟^[8]等发现海参中的岩藻糖基化的硫酸软骨素能降低糖尿病小鼠血糖,改善胰岛素抵抗。温敏^[9]等提取海参皂苷后发现其对 α -糖苷酶具抑制活性。董丽莎^[10]等发现仿刺参酶解液可降低糖尿病小鼠的血糖、尿葡萄糖水平,提高血液中胰岛素含量与胰岛素敏感性。且已有研究发现,海参富含优质的氨基酸,其中甘氨酸 (Gly)、脯氨酸 (Pro)、谷氨酸 (Glu)、丙氨酸 (Ala) 和羟脯氨酸 (Hyp) 的含量最高^[11]。故其具有较大的释放含丙氨酸或脯氨酸的肽段的潜力,可以竞争性的抑制 DPP-IV 活性。然而,目前对于海参多肽的降血糖活性研究,尤其是其抑制 DPP-IV 活性的研究却较少。本文通过对酶的种类、加酶量、酶解时间的优化,以蛋白回收率、水解度、DPP-IV 抑制

率为导向,制备 DPP-IV 抑制肽,并鉴定其结构,为具有 DPP-IV 抑制活性的海参肽的开发和应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

淡干海参购于广州海中宝干货海鲜市场。木瓜蛋白酶 (Papain, 2.0×10^5 U/g), 菠萝蛋白酶 (Bromelain, 5.0×10^5 U/g), 南宁庞博生物工程有限公司; 复合蛋白酶 (Protamex, 1.5 AU/g)、风味蛋白酶 (Flavourzyme, 1000 LAPU/g)、中性蛋白酶 (Neutrase, 0.8 AU/g)、碱性蛋白酶 NS37071 (NS37071, 4.0 AU/g), 丹麦 Novozymes 公司; 合成肽 IPI, 纯度 $\geq 95\%$, 上海吉尔生化有限公司; 邻苯二甲醛 (OPA)、甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺-对甲苯磺酸盐 (Gly-Pro-p-nitroanilide p-toluenesulfonatesalt)、二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl Peptidase IV), 美国 Sigma 公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

美的 PB12Power311 破壁机, 广州美的生活电器制造有限公司; 全波长扫描多功能读数仪、ST 16R 高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 科技公司; Alpha 2-4 LDplus 真空冷冻干燥机, 德国 Martin Christ 公司; 数显 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; KDN-103F 自动定氮仪, 上海纤检仪器有限公司; A300 氨基酸自动分析仪, 德国曼默博尔公司; TSK 凝胶色谱柱 (G2000 SWXL, 7.8 mm \times 300 mm), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Impact II 高分辨四级杆飞行时间质谱 (ESI-Q-TOF-MS/MS) 美国 Bruker 公司; ACQUITY 超高效液相色谱 (UPLC)、HSS T3 柱 (2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m) 美国 Waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 预处理

称取一定质量的干海参经常温泡发 24 h 后洗净、煮沸, 使海参充分泡发后再次称重, 保留泡发汁液, 记录泡发比为 2.48。

1.3.2 酶解

泡发后的海参用破壁机搅为肉糜, 取一定质量以 1:3 比例加入泡发后保留的汁液, 搅拌均匀, 分别调

pH至各蛋白酶最适水解pH后加入蛋白酶,置于摇床中反应,如表1为各蛋白酶最适酶解条件。酶解结束后经沸水浴灭酶15 min后4 ℃8000 r/min下离心20 min,取上清液称重后冷冻干燥。

表1 蛋白酶最适酶解条件

酶的种类	pH	温度/℃	加酶量/%	酶解时间/h
木瓜蛋白酶	7.0	55	1	4
中性蛋白酶	7.0	50	1	4
风味蛋白酶	7.0	50	1	4
碱性蛋白酶	8.0	55	1	4
菠萝蛋白酶	6.5	45	1	4
复合蛋白酶	7.0	50	1	4

1.3.3 水解度的测定

水解度(Degree of hydrolysis, DH)是指已断裂肽键所占百分比,使用邻苯二甲醛(OPA)^[12]方法定量分析。以0.9516 mmol/L 丝氨酸为标准品,纯净水为空白对照,样品稀释至0.5 mg/mL,分别加入40 μL于96孔酶标板中,再加入300 μL OPA试剂,测定反应后的产物在340 nm下的吸光值。

$$DH(\%) = \frac{\text{水解的肽键数}}{\text{总肽键数}} \times 100\% = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

其中, h_{tot} 取决于原料的类型, h 则是丝氨酸氨基毫摩尔数的函数。

$$h = \frac{\text{Serine NH}_2 - \beta}{\alpha} \text{ mmol/g protein}$$

$$\text{Serine NH}_2 = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{stand}} - OD_{\text{blank}}} \times 0.9516 \text{ mmol/L} \times \frac{1}{C}$$

C 为样品的蛋白浓度, 海参的 α , β , h_{tot} 根据原料特征^[13] 分别取 0.796, 0.457, 11.1。

1.3.4 蛋白回收率的测定

采用凯氏定氮法(GB 5009.5-2016)分别测定干海参的蛋白质含量与酶解液的蛋白质含量,并按以下公式计算蛋白质回收率:

$$\text{蛋白回收率}(\%) = \frac{\text{酶解液蛋白含量} \times \text{回收体积}}{\text{原料蛋白含量} \times \text{质量}} \times 100\%$$

1.3.5 DPP-IV 抑制活性的测定

在碱性条件下 DPP-IV 催化底物 Gly-Pro-pNA 水解,产生 Gly-Pro 和黄色的对硝基苯胺,后者在 405 nm 处有特征吸收峰,根据 Zheng 等人的方法进行测定^[14]。在 96 孔可见酶标板内分别加入 80 μL 的样品(终浓度为 2 mg/mL)和 80 μL 的 0.5 mM 底物,震荡,37 ℃ 孵育 10 min 后加入 40 μL 的 12.5 mU/mL DPP-IV 酶液,震荡,37 ℃ 孵育 120 min,期间每 2 min 测定一次 405 nm 下的吸光度值,选取吸光度值在

线性范围内变化的两个时间点计算斜率(Slope)。以 IPI 为阳性对照标准物,100 mM pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液为空白对照。所有样品及反应试剂均采用该 Tris-HCl 缓冲液进行配置或稀释。按以下公式计算 DPP-IV 抑制率:

$$\text{DPP-IV抑制率}(\%) = \frac{(\text{Slope}_{\text{blank}} - \text{Slope}_{\text{sample}})}{\text{Slope}_{\text{blank}}} \times 100\%$$

1.3.6 分子量分布的测定

采用凝胶色谱法测定分子量分布^[15],以细胞色素 C(相对分子质量 12384 u),抑肽酶(相对分子质量 6511 u),杆菌肽(相对分子质量 1450 u),Gly-Gly-Tyr-Arg(相对分子质量 451 u),Gly-Gly-Gly(相对分子质量 189 u)为标准品,以各标准品的分子量与高效液相色谱法检测的各标准品的保留时间作标准曲线。通过比较样品的保留时间计算样品的分子量分布。0.5 mg/mL 样品过 0.22 μm 微孔滤膜后进入仪器进行分析检测,高效液相色谱条件:色谱柱 TSK-GEL G2000 SWxl 7.8 mm×300 mm,进样量 20 μL,检测波长 214 nm,温度 35 ℃ 流动相为乙腈:水:三氟乙酸=20:80:0.1,流速 1 mL/min。

1.3.7 总氨基酸组成的测定

采用 A300 氨基酸自动分析仪(membra Pure, Bodenheim, Germany)进行总氨基酸组成分析。称取样品后加入 5 mL 6 M 的盐酸在 110 ℃ 条件下 24 h,超纯水定容至 50 mL 后取 1 mL 溶液脱酸至干燥后加入 1 mL 样品缓冲液,溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后装入液相小瓶上机分析。氨基酸的含量用 g/100 g 表示。

1.3.8 多肽序列的鉴定

海参酶解物中的多肽序列采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)进行鉴定^[16]。以 0.1% 甲酸水为溶剂稀释样品至 5 mg/mL,过 0.22 μm 的有机系微孔滤膜后进样,进样量为 2 μL。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)。流动相 A 为 0.1% 甲酸水, B 为乙腈(色谱纯),洗脱程序:0~10 min, 5%~40% B; 10~12 min, 40%~90% B; 12~14 min, 90% B; 14~15 min, 90%~5% B; 15~18 min, 5% B,平衡至初始状态,流速:0.2 mL/min。质谱参数:毛细管电压 4500 V,离子源温度 200 ℃ 干燥气体流速 8.0 L/min,雾化器压力 1.5 bar,采用正离子扫描模式,扫描范围为 m/z 50~1500 u。获得的数据采用 Mascot 搜库鉴定多肽序列。一级质谱偏差为 10 ppm,二级偏差为 0.05 u。

1.3.9 数据分析

所有测定均重复两次。结果以平均值±标准偏差

表示。数据采用 IBM SPSS Statistics 22 进行单因素方差分析,以 Duncans 多重比较法进行显著性分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 海参酶解物的制备

2.1.1 最佳蛋白酶的筛选

对泡发后的海参分别采用木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和风味蛋白酶进行酶解,酶解条件如表 1 所示。六种蛋白酶酶解产物的 DPP-IV 抑制活性如图 1 所示。此外,由于蛋白回收率的测定可反映海参在酶解过程中的得率,在海参实际加工中具有重要的经济意义,而水解度 DH 可反映海参的水解情况,探讨其与 DPP-IV 抑制活性和蛋白回收率之间的关系具有重要意义,因此还测定了海参酶解产物的蛋白回收率和 DH,结果如图 1 所示。

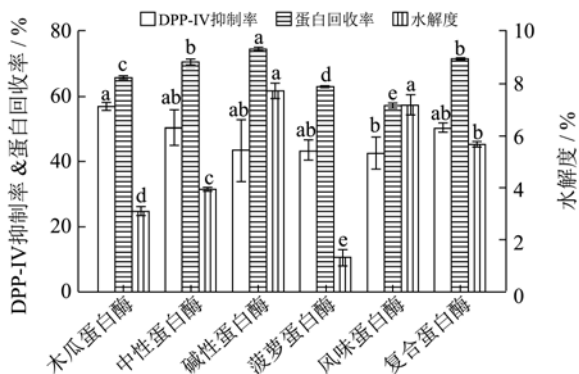


图 1 不同蛋白酶酶解海参的酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率与水解度

Fig.1 DPP-IV inhibition, PR and DH of sea cucumber hydrolysates prepared by different proteases

注:图中的不同字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著,下同。

可以看出,六种不同蛋白酶酶解海参的酶解产物在终浓度为 2 mg/mL 时 DPP-IV 抑制率处于 42.54%~56.86%之间,其中木瓜蛋白酶的酶解产物的抑制率最高,达到 56.86%;其次是复合蛋白酶与中性蛋白酶的酶解产物,其抑制率分别为 50.15%、50.42%;而风味蛋白酶、碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶酶解产物的抑制率较低,分别为 42.54%、43.54%和 43.10%。六种蛋白酶酶解产物的蛋白回收率在 57.43%~74.61%之间,其中碱性蛋白酶酶解海参的酶解产物的蛋白回收率最高,显著 ($p < 0.05$) 高于其它蛋白酶的酶解产物;而风味蛋白酶的酶解产物回收率最低。同时,不同蛋白酶的酶解产物的水解度也具有

显著性差异 ($p < 0.05$),碱性蛋白酶和风味蛋白酶酶解产物的水解度较高,其中碱性蛋白酶的酶解产物可达到 7.72%。研究表明,DPP-IV 酶的底物包括氨基末端第二位氨基酸是 Pro 或 Ala 的多肽。因此,具有该结构序列的多肽可优先被 DPP-IV 酶水解,具有更强的 DPP-IV 抑制活性^[17,18]。虽然木瓜蛋白酶的酶解产物的蛋白得率和水解度水平均不高,但是其产物具有最高的 DPP-IV 抑制活性,这说明海参蛋白经木瓜蛋白酶的有限酶解后可能产生较多氨基末端第二位氨基酸是 Pro 或 Ala 的多肽。同时,虽然碱性蛋白酶酶解产物的得率和水解度均较高,而其 DPP-IV 抑制活性较低,这可能是由于碱性蛋白酶属于非特异性肽键内切酶,具有较多的酶切位点,可以从海参蛋白中释放出更多的可溶性氨基酸和多肽,但是其水解下的多肽在氨基末端第二位氨基酸为 Pro 或 Ala 的含量相对较少,这也说明了海参酶解产物的 DPP-IV 抑制活性与其水解度没有直接相关性,而可能与其肽段中特定的氨基酸序列有关。

为了获得具有较强 DPP-IV 抑制活性的海参酶解产物,同时进一步提升酶解物的蛋白回收率,采用木瓜蛋白酶与其它五种蛋白酶进行复配,并进一步探究不同蛋白酶复配方式对酶解物的酶解效果和 DPP-IV 抑制活性的影响。

2.1.2 蛋白酶的复配方式探究

将木瓜蛋白酶分别与其它蛋白酶 1:1 进行复配,在总加酶量 1%、酶解时间 4 h、酶解温度 55 °C 料液比为 1:3 和 pH 7 下对海参进行酶解,酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率和水解度,结果如图 2 所示。

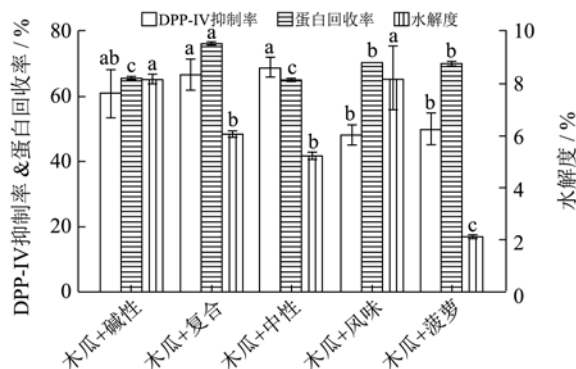


图 2 两种蛋白酶复配酶解海参的酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率与水解度

Fig.2 DPP-IV inhibition, PR and DH of sea cucumber hydrolysates prepared by the combination of two kinds of proteases

可以看出,木瓜蛋白酶与其它五种蛋白酶(碱性蛋白酶,复合蛋白酶,中性蛋白酶,风味蛋白酶、菠

萝蛋白酶)进行复配后,各酶解产物在终浓度为 2 mg/mL 时的 DPP-IV 抑制率在 48.66%~68.72%之间,均高于单酶酶解产物。其中,木瓜蛋白酶与复合蛋白酶及中性蛋白酶复配后产物的 DPP-IV 抑制率较强,但无显著性差异 ($p<0.05$)。此外,复配后的酶解产物的蛋白回收率在 65.27%~76.25%之间,且木瓜蛋白酶与复合蛋白酶复配酶解产物的蛋白回收率最高,达到 76.25%,高于单酶酶解产物以及其它复配酶解得到的海参酶解产物 ($p<0.05$)。同时,从水解度情况来看,复配酶的水解度在 2.17%~8.13%,对比单酶酶解产物得到了提升。其中,木瓜蛋白酶与碱性蛋白酶和风味蛋白酶复配的酶解产物的水解度最高,分别为 8.13%和 8.09%。由此可以看出,将木瓜蛋白酶与其它蛋白酶的复配,不仅能提升其 DPP-IV 抑制率还能提高其蛋白回收率和水解度。故综合考虑各复配方式的 DPP-IV 抑制率及其蛋白得率,选择以木瓜蛋白酶与复合蛋白酶的复配作为海参酶解工艺的作用酶。因此后续实验研究将选用木瓜蛋白酶加复合蛋白酶对海参蛋白进行酶解,进一步探索加酶量与酶解时间对其产物 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率以及水解度的影响,而酶解温度和 pH 则在商业酶最适宜的作用条件下进行。

2.1.3 加酶量的探究

为进一步优化海参酶解效果,对其加酶量进行探究。在酶解时间 4 h、料液比 1:3、酶解温度 55 °C pH 为 7 的条件下,以木瓜蛋白酶与复合蛋白酶 1:1 复配酶解海参,测定不同总加酶量下的酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率和水解度,结果见图 3。

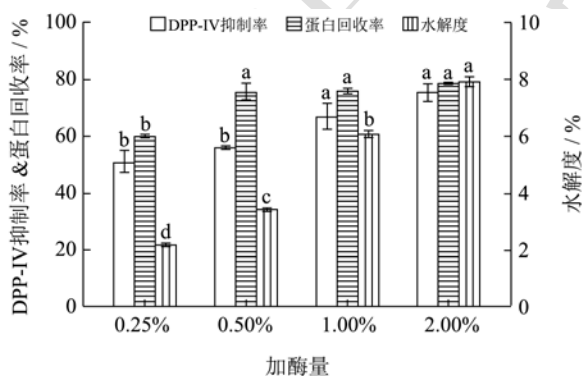


图 3 不同加酶量的海参酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率与水解度

Fig.3 DPP-IV inhibition, PR and DH of sea cucumber hydrolysates prepared by different addition amounts of protease

由图 3 可知,不同加酶量下酶解产物的 DPP-IV 抑制率随加酶量的增加而持续增加,加酶量为 2% 时,酶解产物的 DPP-IV 抑制率达到最高,为

75.66%,略高于加酶量 1%的产物的 DPP-IV 抑制率 (66.97%),但无显著性差异 ($p<0.05$)。这说明虽然可溶性的大分子肽段随着加酶量的增加变化不大,但是将大分子肽段降解成小分子肽段以及具有 DPP-IV 抑制活性的肽段则需要更高的加酶量。同时,不同加酶量下的酶解产物的蛋白回收率在 60.32%~78.76%之间,且先随加酶量的增加而增加,在总加酶量为 0.5%时达到 75.54%,后趋于平稳。而水解度随加酶量增加持续上升,加酶量为 2%时显示最高的水解度,达到 7.93%,显著 ($p<0.05$) 高于加酶量为 1%时的水解度 (6.10%)。可以看出,海参酶解产物的 DPP-IV 抑制活性与蛋白回收率随着 DH 的增加,呈现先增加后平稳的趋势,并未持续增加。综合可知,木瓜蛋白酶与复合蛋白酶复配酶在总加酶量为 1%时即可达到较高的 DPP-IV 抑制活性,且蛋白回收率也较高,综合实际应用情况与工业化成本考虑,因此选择总加酶量为 1%。

2.1.4 酶解时间的探究

为进一步优化海参酶解效果,对其酶解时间进行探究。在加酶量 1%、料液比 1:3,酶解温度 55 °C pH 为 7 的条件下用木瓜蛋白酶与复合蛋白酶复配酶解海参,测定不同酶解时间的酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率和水解度,见图 4。

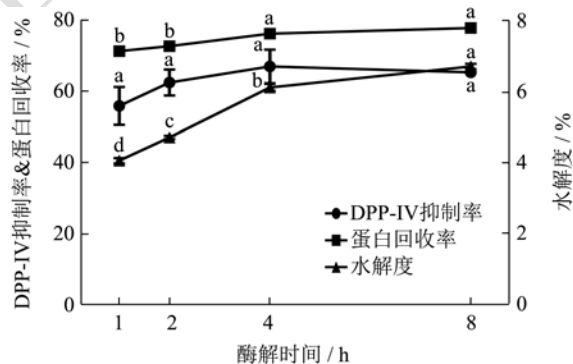


图 4 不同酶解时间的海参酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率与水解度

Fig.4 DPP-IV inhibition, PR and DH of sea cucumber hydrolysates prepared by different hydrolysis time

图 4 显示,酶解时间 4 h 之内,海参酶解产物的 DPP-IV 抑制率、蛋白回收率和水解度均呈现为随酶解时间的延长而增加。而酶解时间为 8 h 时,反应产物的蛋白回收率与水解度趋于平缓,DPP-IV 抑制率出现轻微下降的趋势。这说明酶解反应开始后,在酶的高效催化下,海参蛋白中的肽段被快速水解下来,而随着酶解反应的进行,可作用的肽键减少,因此其蛋白回收率、水解度均逐渐趋于平稳,而水解时间的增加极有可能使具 DPP-IV 抑制活性的肽被分解为更

小的分子,使 DPP-IV 抑制率出现下降趋势。同时,酶解时间过长会延长生产周期,增加能耗,并且可能会带来微生物的滋生而导致产品品质下降。因此综合考虑选择酶解4 h为最佳酶解时间,此时DPP-IV抑制活性与蛋白回收率均较高,分别为 76.25%和 66.97%,水解度适中,为 6.10%。

综合对蛋白酶的筛选,蛋白酶复配方式的探究,以及加酶量与酶解时间的优化,得出海参的制备工艺为:木瓜蛋白酶与复合蛋白酶 1:1 进行复配,总加酶量为 1%,酶解时间为 4 h。

2.2 酶解产物的分子量分布

分子量分布的测定是基于凝胶色谱中不同分子量的物质具有不同的保留时间,分子量较大的物质可以优先通过凝胶色谱,故以各标准品的分子量与保留时间作标准曲线,计算样品的分子量分布。图 5 显示了六种单酶酶解产物与木瓜蛋白酶与复合蛋白酶 1:1 复配后的酶解产物的分子量分布,可以看出海参酶解产物的分子量大部分分布于 5000 u 以下,较容易被人体吸收。其中,木瓜蛋白酶的酶解产物含有的小分子物质高于木瓜蛋白酶与复合蛋白酶复配的酶解产物,而对比 DPP-IV 抑制率结果,复配酶的活性 (66.97%) 高于木瓜蛋白酶 (56.86%),推测可能是由于两种酶复配酶解的产物产生了更多氨基末端第二位为丙氨酸或脯氨酸的肽,使其具有更高的抑制活性,而与小分子肽的含量无关。

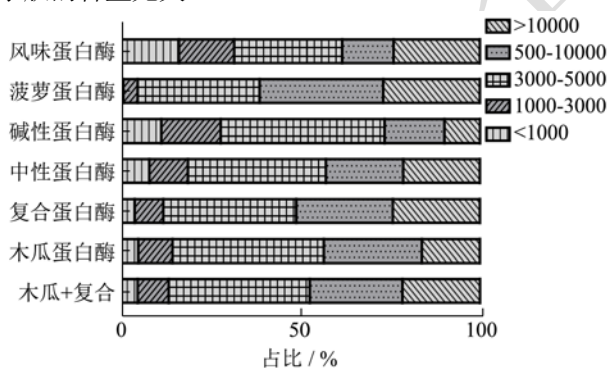


图 5 酶解产物的分子量分布

Fig.5 Molecular weight distribution of enzymatic hydrolysate

2.3 氨基酸组成分析

干燥的海参体壁中,蛋白质的含量高达 90% 以上。且已有研究发现,海参富含优质的氨基酸,其中甘氨酸 (Gly)、脯氨酸 (Pro)、谷氨酸 (Glu)、丙氨酸 (Ala) 和羟脯氨酸 (Hyp) 的含量最高^[11,19]。故其具有较强的释放含丙氨酸或脯氨酸的肽段的潜力,可以竞争性的抑制 DPP-IV 活性。表 2 显示了海参酶

解产物的氨基酸组成。由图可知,酶解产物的氨基酸种类齐全,富含多种人体生命活动必不可少的必需氨基酸与非必需氨基酸。其中, Gly (甘氨酸)、Glu (谷氨酸)、Leu (亮氨酸)、Pro (脯氨酸)、Asp (天冬氨酸)、Ile (异亮氨酸) 和 Ala (丙氨酸) 含量较高,而 His (组氨酸)、Tyr (酪氨酸) Met (蛋氨酸) 含量较低,是典型水产胶原蛋白氨基酸组成的特征^[20]。其中与 DPP-IV 作用底物有关的脯氨酸与丙氨酸含量均较高,分别为 10.31% 与 5.81%,若它们处于氨基末端第二位即可作为 DPP-IV 酶的作用底物竞争性地减少 GLP-1 分解,从而达到降血糖效果。

表 2 海参酶解液氨基酸组成分析

Table 2 Analysis of amino acid composition of sea cucumber hydrolysate

氨基酸种类	含量/(g/100 g)	占比/%
Asp	6.98	9.62
Thr	1.49	2.05
Ser	0.59	0.81
Glu	8.83	12.16
Gly	10.88	15.00
Ala	4.37	6.03
Cys	0.25	0.34
Val	3.74	5.16
Met	1.61	2.21
Ile	5.93	8.17
Leu	8.88	12.24
Tyr	0.87	1.20
Phe	3.26	4.49
His	0.45	0.62
Lys	3.27	4.51
Arg	3.40	4.69
Pro	7.77	10.70
合计	72.58	100

2.4 DPP-IV 抑制肽的结构鉴定

为鉴定海参酶解液中发挥 DPP-IV 抑制作用的肽段结构,采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 对海参酶解物的肽段进行序列解析。前人研究发现, DPP-IV 抑制肽在结构组成上存在一定的规律,即通常 N 末端具有 Trp (色氨酸) 或第二位置为 Pro 或 Ala^[2,3] 的结构。通过对海参中酶解产物的肽段进行分析,共筛选出 28 条具有这种 DPP-IV 抑制肽典型结构特征的肽段,如表 3 所示。这些肽的分子量在 500~1936 之间。DPP-IV 抑制肽的原料来源广泛,包括酪蛋白、乳清蛋白、胶原蛋白等多种来源于植物或动物蛋白原料。

目前已报道的 DPP-IV 抑制肽大约共有 400 多条^[21], 通常是由 2~13 个氨基酸组成的寡肽序列。其中, 对来源于海洋鱼类的 DPP-IV 抑制肽的研究如 Huang SL^[22]等分离纯化得到金枪鱼中 PGGVGLPIGPCYG, YAYQWRPVDRIR 和 PACGGVYISGRPG 具 DPP-IV 抑制活性, 在 2 mg/mL 浓度时, DPP-IV 抑制率分别能达到 30.49%±1.34%, 39.76%±0.87%, 39.76%±1.12%; Neves A C^[23]等在三文鱼中鉴定出具 DPP-IV 抑制活性的肽: GPAV (IC₅₀=245.58±7.151 μM), VC (IC₅₀=5413.45±62.151 μM), VP (IC₅₀=880.0

μM), YP (IC₅₀=658.1 μM) 和 PP (IC₅₀=5860 μM)。结果表明, 大部分带有脯氨酸和丙氨酸的多肽 DPP-IV 抑制率较高。对表 3 鉴定得出的肽采用 BIOPEP(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>)检索对比已报道 DPP-IV 抑制肽, 发现鉴定出的具 DPP-IV 抑制肽特征的肽均没有被报道, 其中有一条类似结构的肽 APGPAGP 的 IC₅₀ 为 105.44 μM。因此, 在后续研究中有待进一步合成这些潜在的 DPP-IV 抑制肽, 验证其活性强弱, 从而挖掘出新的强活性 DPP-IV 抑制肽。

表 3 海参酶解液潜在 DPP-IV 抑制肽的序列鉴定

Table 3 Identification of potential DPP-IV inhibitory peptides in sea cucumber hydrolysate

序号	序列	分子量	m/z meas	保留时间/min
1	APGPAGPA	653.32	653.32	3.36
2	APGPAGPAG	710.34	710.34	3.29
3	APGPAGPM	729.32	729.32	3.02
4	APGPAGPMG	770.35	770.35	4.58
5	APGPAGNAGPA	911.42	911.42	3.10
6	QPGPAGPAG	767.36	767.36	3.16
7	GAIGAPG	558.28	558.28	2.80
8	GASGPKG	573.29	573.29	1.24
9	GADGPPGPQGLAG	1126.52	563.26	2.76
10	GPAGLTG	572.30	572.30	3.56
11	GPAGPQG	583.28	583.28	2.72
12	GPAGAAG	500.24	500.24	2.08
13	GPAGPPGPTGPTGPA	1247.62	623.81	4.59
14	GPAGPPGPTGPTGPAG	1304.64	652.32	4.52
15	GPAGPAGQDGFPGQDGPAG	1935.85	967.93	3.62
16	GPAGAPGAPGMDGAPGAR	1587.69	793.85	3.88
17	GPAGPRGLPGP	976.54	488.27	4.92
18	GPLGPVGPVGD	1065.55	1065.55	5.64
19	GPLGPVGPVGDG	1123.58	561.79	5.62
20	GPQGPQGPAG	865.41	865.41	3.34
21	GPQGEQG	672.29	672.29	1.77
22	GPKGFPQPQG	942.49	471.25	3.60
23	GPPGAPG	568.27	568.27	2.80
24	GPTGPQG	613.29	613.29	2.69
25	GPTGPTGPAG	811.39	811.39	3.70
26	GPDGPTGPK	857.40	857.40	3.95
27	GPDGPTGPKG	898.42	898.42	4.58
28	GPDGPRGEPGEP	1181.54	590.77	5.44

3 结论

通过探究蛋白酶种类、复配方式、加酶量和酶解时间对海参酶解产物 DPP-IV 抑制活性、蛋白回收率

和水解度的影响, 确定海参 DPP-IV 抑制肽的制备工艺为: 复合蛋白酶与木瓜蛋白酶以 1:1 的比例复配酶解海参, 加酶量为 1%, 酶解时间为 4 h。该条件下, 海参酶解产物在 2 mg/mL 时的 DPP-IV 抑制率为

66.97%，蛋白回收率为 76.25%，水解度为 6.10%。酶解产物的分子量大部分分布在 5000 u 以下，且富含 Pro 和 Ala 等与抑制 DPP-IV 活性有关的氨基酸。通过质谱鉴定得到 28 条具 DPP-IV 抑制肽典型特征结构的多肽序列，分子量在 500~1936 u 之间。本研究为食源性降血糖肽的制备提供了理论科学依据。

参考文献

- [1] 董宇婷,王荣春.降糖肽的发展现状及研究进展[J].生物信息学,2018,59(2):21-27
DONG Yu-ting, WANG Rong-chun. The status quo and research progress of hypoglycemic peptide [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2018, 59(2): 21-27
- [2] 赖孟瑄,张金兰,武瑞赟,等.鱼皮胶原蛋白提取二肽基肽酶-IV 抑制剂研究进展[J].中国水产,2018,514(9):109-110
LAI Meng-xuan, ZHANG Jin-lan, WU Rui-yun, et al. Advances in the study of dipeptidase-IV inhibitors for collagen extraction from fish skin [J]. China Fisheries, 2018, 514(9): 109-110
- [3] 陈静,李婉如,李阜烁,等.三种乳源生物活性肽的二肽基肽酶-IV 抑制活性研究[J].中国乳品工业,2018,46(2):4-8
CHEN Jing, LI Wan-ru, LI Fu-shuo, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by three casein-derived bioactive peptides *in vitro* [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(2): 4-8
- [4] 张颖牛.羊乳酪蛋白源 DPP-IV 抑制肽的制备、鉴定及抑制机理研究[D].北京:中国农业大学,2016
ZHANG Ying. Enzymatic preparation, identification and inhibition mechanism of DPP-IV inhibitory peptides derived from bovine and caprine milk casein [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016
- [5] 吉薇.南极磷虾蛋白源二肽基肽酶-IV(DPP-IV)抑制肽的研究[D].湛江:广东海洋大学,2017
JI Wei. Study on dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory peptides derived from Antarctic krill protein [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2017
- [6] 崔凤霞.海参胶原蛋白生化性质及胶原肽活性研究[D].青岛:中国海洋大学,2007
CUI Feng-xia. Study on the biochemical characterization of collagen and activity of collagen peptide extracted from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007
- [7] 王静凤,傅佳,徐雷雷,等.日本刺参降血糖及对胰岛素信号通路的影响[J].深圳大学学报(理工版),2011,28(2):172-177
WANG Jing-feng, FU Jia, XU Lei-lei, et al. Involvement of the PI3K/Akt pathway in the hypoglycemic effects of sea cucumber *Apostichopus japonicus* in diabetic rats [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2011, 28(2): 172-177
- [8] 胡世伟,王静凤,王玉明,等.海地瓜岩藻糖基化海参硫酸软骨素对 II 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗改善作用的研究[J].中国海洋药物,2014,33(1):58-64
HU Shi-wei, WANG Jing-feng, WANG Yu-ming, et al. The effects of fucosylated chondroitin sulfate from *Acaudina molpadioides* on ameliorating insulin resistance in type 2 diabetic mice [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(1): 58-64
- [9] 温敏,王佳慧,刘丰海,等.海参皂苷对自发性糖尿病小鼠的降血糖作用[J].食品工业科技,2013, 34(22):149-152
WEN Min, WANG Jia-hui, LIU Feng-hai, et al. Hypoglycemic effect of sea cucumber saponins on spontaneous diabetic mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(22): 149-152
- [10] Dong L, Li Y, Zhang D, et al. Dietary *Apostichopus japonicus* alleviates diabetes symptoms and modulates genes expression in kidney tissues of db/db mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 66(1): 154-162
- [11] 刘尊英.海参(*Parastichopus californicus*)胶原蛋白酶解物乳化特性研究[C]/2010 年中国水产学会学术年会论文摘要集.中国水产学会:中国水产学会,2011:1
LIU Zun-ying. Emulsification characteristics of collagen protease hydrolysates of *Parastichopus californicus* [C] // Abstracts of the 2010 Annual Meeting of Chinese Fisheries Society. China Society of Fisheries: China Society of Fisheries, 2011: 1
- [12] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C, et al. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2010, 66(5): 642-646
- [13] Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [J]. Canadian Medical Association Journal, 1986, 172(8): 1783-1785
- [14] Zheng L, Zhao M, Xiao C Q, et al. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: importance of controlling reaction pH and time [J]. Food Chemistry, 2016, 192(1): 288-294
- [15] 任娇艳,史传超,常博,等.核桃蛋白的分离制备及其酶解物的抗氧化特性[J].现代食品科技,2019,35(3):118-124
REN Jiao-yan, SHI Chuan-chao, CHANG Bo, et al. Separation and preparation of walnut protein and antioxidant properties of its enzymatic hydrolysate [J]. Modern Food Science and

- Technology, 2019, 35(3): 118-124
- [16] 钱兢菁,郑淋,赵谋明.酪蛋白体外消化过程中 DPP-IV 抑制活性的变化规律及其机制分析[J/OL].食品科学,1-16.2020-07-08.http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20191014.1803.028.html
QIAN Jingjing, ZHENG Lin, ZHAO Mouming. Analysis of the mechanism and changes in law of DPP-IV inhibition activity of casein digestion *in vitro* [J/OL]. Food Science, 1-16. 2020-07-08.http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20191014.1803.028.html
- [17] 焦伟杰,朱崇泉,赖宜生,等.新型抗糖尿病药物二肽基肽酶 IV 抑制剂[J].药学进展,2008,32(7):289-296
JIAO Wei-jie, ZHU Chong-quan, LAI Yi-sheng, et al. Research advances on dipeptidyl peptidase IV inhibitors [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2008, 32(7): 289-296
- [18] Aertgeerts K, Sheng Ye, Mike G Tennant, et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation [J]. Protein Science, 2010, 13(2): 412-421
- [19] 陈娟娟.黑乳海参胶原蛋白活性肽的研究[D].郑州:河南大学,2013
- CHEN Juan-juan. Study on the collagen activity peptide of *Holothuria nobilis* selenka [D]. Zhengzhou: Henan University, 2013
- [20] 侯虎,孙江,毛家楠,等.海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J].现代食品科技,2013,28(7):34-38
HOU Hu, SUN Jiang, MAO Jia-nan, et al. Collagen fibers morphology and physical and chemical properties of collagen of sea cucumber [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 28(7): 34-38
- [21] Lir R, Cheng J, Wu H. Discovery of food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: a review [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 463
- [22] Huang S L, Jao C L, Ho K P, et al. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates [J]. Peptides, 2012, 35(1): 114-121
- [23] Neves A C, Hamedy P A, O'Keeffe M B, et al. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 396-405
-
- (上接第 245 页)
- [16] 钟秀娟,张多敏,周雪松,等.红枣豆奶稳定性分析[J].食品科技,2011,36(2):86-89
ZHONG Xiu-juan, ZHANG Duo-min, ZHOU Xue-song, et al. Stability analysis of jujube bean milk [J]. Food Technology, 2011, 36(2): 86-89
- [17] 吕长鑫,李萌萌,徐晓明,等.利用 Turbiscan 稳定性分析仪检测紫苏酸性乳饮料乳化稳定性[J].中国食品学报,2014,14(4):239-245
LYU Chang-xin, LI Meng-meng, XU Xiao-ming, et al. Detection of emulsifying stability of perilla acid milk beverage by Turbiscan stability analyzer [J]. Chinese Journal of Food, 2014, 14(4): 239-245
- [18] 高喜凤.市售常见植物蛋白饮料在不同条件下稳定性比较分析研究[D].黑龙江:黑龙江八一农垦大学,2015
GAO Xi-feng. A comparative study on the stability of common vegetable protein drinks on market under different conditions [D]. Heilongjiang: Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2015
- [19] 韩红霞,李世民.饮料稳定性快速鉴定的几种方法[J].食品研究与开发,1999,20(6):58-59
HAN Hong-xia, LI Shi-ming. Several methods for rapid identification of beverage stability [J]. Food Research and Development, 1999, 20(6): 58-59
- [20] 王银娟,王晓君,田芬,等.乳清浓缩蛋白改善脱脂发酵乳饮料的稳定性[J].乳业科学与技术,2014,37(6):1-5
WANG Yin-juan, WANG Xiao-jun, TIAN Fen, et al. Application of whey protein concentrate to improve the stability of fermented skim milk drink [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2014, 37(6): 1-5
- [21] 李彬.影响核桃乳饮料稳定性的因素分析[J].商洛师范专科学校学报,2004,18(4):38-41
LI Bin. Analysis of factors affecting the stability of walnut milk beverage [J]. Journal of Shangluo Teachers College, 2004, 18(4): 38-41
- [22] 叶倩.绿茶和菊花茶饮料色泽褐变机理和控制技术研究[D].杭州:浙江大学,2008
YE Qian. Study on browning mechanism of ready-to-drink green tea and *Chrysanthemum morifolium* Ramat. beverage and antibrowning technology [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008