

苦瓜皂苷与乳清蛋白水解物协同对二肽基肽酶-IV 的抑制活性

于海坤, 热罕古丽, 吴尚仪, 陈佳丽, 夏扣娜, 李墨翰, 岳喜庆*
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要: 为评价动植物源天然产物的二肽基肽酶-IV (dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV) 抑制活性, 以苦瓜皂苷 (momordica saponins, MS)、乳清蛋白胃蛋白酶水解物 (whey protein pepsin hydrolysates, WPPHs)、乳清蛋白胰蛋白酶水解物 (whey protein trypsin hydrolysates, WPTHs) 为原料, 采用单因素试验和响应面分析优化水解条件, 再将 MS 与 WPPHs、WPTH 进行复配, 结合模拟体外消化, 探究 DPP-IV 抑制活性。结果表明, MS、WPPHs 及 WPTHs 具有 DPP-IV 抑制活性, 最佳水解条件为: 当酶添加量 4%、pH 2.7 酶解 2 h 时, WPPHs 的 DPP-IV 抑制率最高为 15.43%; 当酶添加量 4%、pH 7.6 酶解 4 h 时, WPTHs 的 DPP-IV 抑制率最高为 14.62%。苦瓜皂苷与乳清蛋白水解物具有协同对二肽基肽酶-IV 抑制活性作用, 当 MS 与 WPPHs、WPTHs 的复配体积比均为 1:1 时, 显著高于两者单独累加 ($p < 0.05$)。经胃消化后, WPPHs 的 DPP-IV 抑制率降低 2.02%, MS 和 WPTHs 的 DPP-IV 抑制率升高 0.99%、7.01%; 经肠道消化后, WPPHs 的 DPP-IV 抑制率升高 2.23%, 而 MS 和 WPTHs 的 DPP-IV 抑制率降低 4.12%、2.70%。研究结果可为天然动植物源产物协同对二肽基肽酶-IV 抑制活性提供了基础性数据, 为降血糖功能性产品的开发提供新的方向。

关键词: 苦瓜皂苷; 乳清蛋白水解物; 降血糖; 二肽基肽酶-IV; 协同作用

文章编号: 1673-9078(2022)03-63-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0664

Synergistic Inhibitory Activity of *Momordica charantia* Saponin and Whey Protein Hydrolysate on Dipeptidyl Peptidase-IV

YU Haikun, Rayhnigul, WU Shangyi, CHEN Jiali, XIA Kouna, LI Mohan, YUE Xiqing*
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: To evaluate the inhibitory activity of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) from natural animal products, *Momordica* saponins (MS), whey protein pepsin hydrolysates (WPPHs), and whey protein trypsin hydrolysates (WPTHs) were used as raw materials, and the hydrolysis conditions were optimized by single factor test and response surface analysis, and then MS and WPPHs and WPTH were compounded, combined with simulated *in vitro* digestion, the inhibitory activity of DPP-IV was explored. The results showed that MS, WPPHs and WPTHs had DPP-IV inhibitory activity. The optimal hydrolysis conditions were as follows: When the enzyme was added at 4% and the pH was 2.7 for 2 h, the highest DPP-IV inhibitory rate of WPPHs was 15.43%; The highest DPP-IV inhibition rate of WPTHs was 14.62% when the addition amount was 4% and pH 7.6 was enzymatically hydrolyzed for 4 h. MS and whey protein hydrolysate had a synergistic effect on inhibitory activity of DPP-IV. When the combined volume ratio of MS, WPPHs and WPTHs is 1:1, it is significantly higher than that of their accumulation alone ($p < 0.05$). After gastric digestion, the DPP-IV inhibition rate of WPPHs decreased by 2.02%, and the DPP-IV inhibition rate of MS and WPTHs increased by 0.99% and 7.01%, respectively; after intestinal digestion, the DPP-IV inhibition rate of WPPHs increased by

引文格式:

于海坤,热罕古丽,吴尚仪,等.苦瓜皂苷与乳清蛋白水解物协同对二肽基肽酶-IV 的抑制活性[J].现代食品科技,2022,38(3):63-73

YU Haikun, Rayhnigul, WU Shangyi, et al. Synergistic inhibitory activity of *Momordica charantia* Saponin and whey protein hydrolysate on dipeptidyl peptidase-IV [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 63-73

收稿日期: 2021-06-23

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2018YFC1604302-03); 国家建设高水平大学公派研究生项目 (202008210391); 辽宁省“兴辽英才计划”科技创新领军人才项目 (XLYC1902083); 沈阳市科技创新“双百工程”项目 (Y17-0-028)

作者简介: 于海坤(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物源食品加工利用, E-mail: yxksp1827@163.com

通讯作者: 岳喜庆(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物源食品加工利用, E-mail: yxqsyou@126.com

2.23%, while the DPP-IV inhibition rate of MS and WPTHs decreased by 4.12% and 2.70%, respectively. The results provide basic data for the synergistic inhibitory activity of natural animal and plant products against dipeptidyl peptidase-IV, and provide a new direction for the development of hypoglycemic functional products.

Key words: *Momordica* saponins; whey protein hydrolysis; hypoglycemic; dipeptidyl peptidase-IV; synergistic effect

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢内分泌疾病, 主要由胰岛素分泌绝对或相对不足、胰岛素抵抗而引起的^[1,2], 通常伴有多种慢性并发症, 导致多种器官系统严重受到损害, 发病率极高, 已成为一种常见且多发的疾病, 对人类健康产生严重危害^[3,4]。据国际糖尿病联盟 (IDF) 统计显示, 全球患糖尿病成人在 2013 年约有 3.87 亿人, 2019 年已增至 4.63 亿人, 预计到 2030 年将超过 5 亿, 2045 年高达 7 亿左右^[5]。目前临床上对糖尿病的治疗以口服降糖药物和胰岛素治疗为主, 如双胍类^[6,7]、促胰岛素分泌剂类^[8,9]、 α -葡萄糖苷酶抑制剂类^[10,11]、噻唑烷二酮类^[12]、磺酰脲类等^[13]。使用口服降糖药在维持血糖控制方面有一定的效果, 但不能预防糖尿病的长期并发症, 长期使用会有严重副作用^[14,15]。而天然来源的二肽基肽酶-IV (dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV) 抑制剂能够延长肠促胰岛素的有效时间, 降低餐后血糖浓度, 具有安全性能高, 不易诱发体重增长、低血糖等不良反应, 有效性及耐受性较好等优点, 是近些年新兴治疗二型糖尿病的一种方法^[16,17]。因此毒副作用低且具有降低血糖活性的天然植物及其生物活性成分、功能因子是目前的研究热点。

苦瓜享有“植物胰岛素”之称, 其主要生物活性成分是皂苷和多糖, 在降血糖方面有较好的功效, 是迄今为止受赞誉最多、辅助治疗糖尿病研究最广泛的植物之一^[18]。其中苦瓜皂苷 (*Momordica saponins*, MS) 能够一定程度上改善胰岛素抵抗和增加胰岛素敏感性^[19,20], 同时可以修复受损 β 细胞^[21], 抑制肠道对葡萄糖的吸收^[22]。此外, MS 与其他降糖药叠加使用可以更好的血糖控制。牛乳是一种低血糖指数 (glycemic index, GI) 食品, 牛乳中的乳清蛋白可以显著提高糖尿病人高 GI 饮食时的胰岛素水平, 具有稳定餐后血糖水平的作用^[23]。临床证实, 乳清蛋白水解物比乳清蛋白本身更有助于糖尿病人的血糖控制^[24], 乳清蛋白水解物中的生物活性肽具有抑制 DPP-IV 的活性、抑制 α -葡萄糖苷酶活性、改善胰岛素抵抗等作用^[25], 通过促进胰高糖素分泌、提升肠促胰岛素含量、调节血糖、控制食物的摄入等降低餐后的血糖水平^[26,27]。然而, 苦瓜皂苷与乳清蛋白水解物协同降血糖的作用尚未见报道。目前对于糖尿病的治疗早已不单单依赖调节血糖药物, 而是通过药物控制血糖, 同

时结合合理的膳食及适度的运动, 因而寻找天然来源的 DPP-IV 抑制剂具有较高的研究价值, 动物源抑制剂与植物源抑制剂协同作用调节血糖有待进一步研究。

本文研究乳清蛋白胃蛋白酶水解物 (whey protein pepsin hydrolysates, WPPHs)、乳清蛋白胰蛋白酶水解物 (whey protein trypsin hydrolysates, WPTHs) 及 MS 的 DPP-IV 抑制活性, 并进行协同试验, 测定消化后水解物及 MS 的 DPP-IV 抑制活性变化, 并对其消化特性进行评估, 旨在通过此研究补充动植物源抑制剂协同作用调节血糖作用机理, 进一步推进 DPP-IV 抑制类降血糖功能性产品开发进程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苦瓜皂苷粉, 市售苦瓜皂苷粉 (皂苷含量为 10%); 分离乳清蛋白粉 (92%, 食品级), 新西兰恒天然公司; 邻苯二甲醛 (OPA), 国药集团化学试剂有限公司; 胃蛋白酶 (酶活力 ≥ 250 U/mg), 上海麦克林生化科技有限公司; 胰蛋白酶 (酶活力 ≥ 250 U/mg), 鼎国生物技术有限责任公司; DPP-IV 抑制活性试剂盒, Abnova 艾美捷科技有限公司

1.2 仪器与设备

JB-1 型磁力搅拌器, 天津市欧谱仪器仪表有限公司; VS-1 涡旋仪, 北京中时维兴仪器设备公司; CR-21G 离心机, 日立公司; 荧光酶标仪, Eppendorf 公司; FD5-3 型真空低温冷冻干燥机, 上海龙捷仪器有限公司; 7200-紫外-可见分光光度计, 尤尼柯有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 乳清蛋白水解

乳清蛋白 \rightarrow 配成质量浓度为 0.05 g/100 mL 溶液 \rightarrow 水浴处理 (80 $^{\circ}$ C \ 10 min) \rightarrow 加蛋白酶水解 \rightarrow 调节 pH 值 \rightarrow 灭酶 (90 $^{\circ}$ C \ 10 min) \rightarrow 冷却至室温 \rightarrow 离心 \rightarrow 取上清液备用

1.3.2 单因素试验设计

以水解度及 DPP-IV 抑制率作为评价指标, 在不同影响因素下对胃蛋白酶和胰蛋白酶的水解条件进行优化, 优化实验设计如表 1 所示。

表1 胃蛋白酶、胰蛋白酶水解条件优化单因素试验

Table 1 Single factor test for optimizing hydrolysis conditions of pepsin and trypsin

水解条件	胃蛋白酶	胰蛋白酶
酶解时间/h	0~4	2~6
pH 值	1~3	7~9
不同酶添加量/%	2~6	2~6

1.3.3 响应面试验

根据单因素试验结果, 选取 pH 值 (A)、酶解时间 (B)、不同酶添加量 (C) 为自变量, 以 DPP-IV 抑制率为响应值, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理设计响应面分析试验, 试验因素与水平设计见表 2、3。

表2 胃蛋白酶水解条件优化响应面试验因素与水平

Table 2 Factors and levels of response surface experiment for optimization of pepsin hydrolysis conditions

水平	因素		
	A pH 值	B 酶解时间/h	C 酶添加量/%
-1	2	1.5	3
0	2.5	2	4
1	3	2.5	5

表3 胰蛋白酶水解条件优化响应面试验因素与水平

Table 3 Factors and levels of response surface experiment for optimization of trypsin hydrolysis conditions

水平	因素		
	A pH 值	B 酶解时间/h	C 酶添加量/%
-1	7.5	3.5	3
0	8	4	4
1	8.5	4.5	5

1.3.4 水解度测定

将 400 μL 去离子水、丝氨酸标准溶液、样品溶液分别加入到盛有 3 mL OPA 试管中作为空白样、标准

样、样品, 精准反应 2 min, 立即测定其在 340 nm 波长下的吸光度。为避免试验顺序对结果产生影响, 在试验开始、结束时分别测定丝氨酸标准样吸光值, 试验重复 3 次并取均值。水解度如下式计算:

$$\text{水解度}/\% = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\%$$

$$h = \frac{OD_{S1} - OD_B}{OD_{S2} - OD_B} \times \frac{M \times 0.1 \times 100}{X} - 0.04$$

式中:

h ——水解肽键数;

h_{tot} ——总肽键数;

OD_{S1} ——样品吸光值;

OD_{S2} ——标准样丝氨酸吸光值;

OD_B ——空白样去离子水吸光值;

M ——丝氨酸溶液浓度, mol/L;

X ——样品中蛋白质含量。

1.3.5 DPP-IV 抑制率测定

参考 Matheeußen 等^[28]的方法略有修改。将 DPP-IV 分析缓冲液、人重组 DPP-IV (DPP-IV 与 DPP-IV 分析缓冲液体积比为 1:5)、质量浓度为 1 mmol/L 西他列汀阳性对照抑制剂、DPP-IV 底物按顺序准确移取至 96 孔板中, 加样量见表 4。

放置烘箱中 37 °C 温育 30 min, 在激发波长为 355 nm、发射波长为 460 nm 的荧光酶标仪中测定其荧光强度, DPP-IV 抑制率按下式计算:

$$I = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100\%$$

式中:

I ——样品 DPP-IV 抑制率;

OD_1 ——阴性对照组荧光吸光度;

OD_2 ——样品组荧光吸光度。

表4 各试剂添加量和顺序

Table 4 Addition amount and order of each reagent (unit: μL)

组别	DPP-IV 分析缓冲液/μL	人重组 DPP-IV/μL	抑制剂/μL	DPP-IV 底物/μL
阴性对照组	40	10	0	50
背景对照组	50	0	0	50
阳性对照组	30	10	10	50
样品组	30	10	10	50

1.3.6 与乳清水解物协同作用

将浓度为 1 mg/mL 乳清蛋白胃蛋白酶水解物、乳清蛋白胰蛋白酶水解物分别与 0.2 mg/mL、1 mg/mL、5 mg/mL MS 混合均匀, 以 DPP-IV 抑制率作为指标考察其协同作用。

1.3.7 胃肠道消化模拟试验

模拟胃消化: 取适量样品在 5% 甲酸中溶解为质

量浓度为 1 mg/mL 溶液, 胃蛋白酶添加量为 1%, 在 37 °C 条件下孵育 1 h。在 100 °C 水中加热 5 min 后停止反应, 每种样品至少重复三次试验。

模拟肠道消化: 取适量样品溶解于磷酸盐缓冲液 (pH=7.0), 其中弹性蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶添加量分别为 0.2%、1% 和 1%, 在 37 °C 条件下孵育 1 h。在 100 °C 水中加热 5 min 后停止反应, 每种样品

至少重复三次试验^[29]。

1.4 数据处理

所有实验均至少重复 3 次，数据以平均值±标准差的形式表示，选用 SPSS (version 22.0) 统计分析及 Design-Expert 8.0.6 进行数据处理，当 $p < 0.05$ 时认为该数据在统计学意义上具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 酶解时间对乳清蛋白水解度及 DPP-IV 抑制率的影响

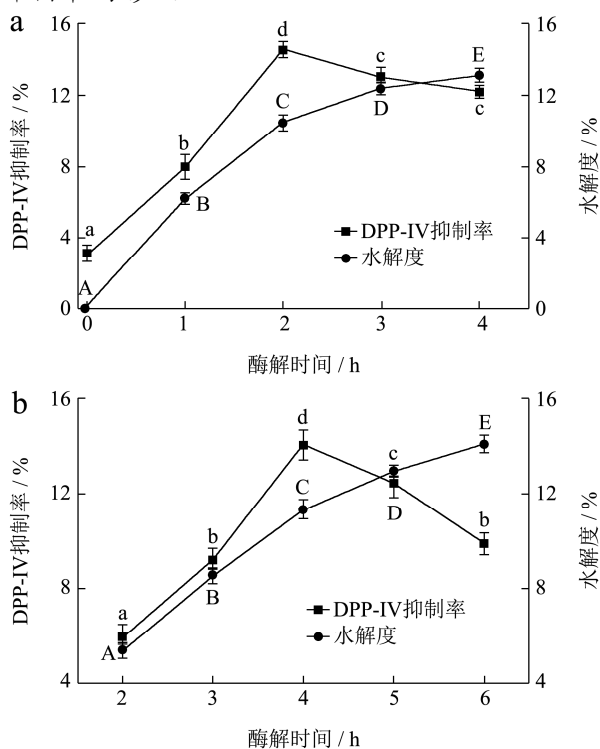


图1 酶解时间对乳清蛋白水解度及 DPP-IV 抑制率的影响

Fig.1 Effect of enzymolysis time on degree of hydrolysis of whey protein and inhibition rate of DPP-IV

注：a: 胃蛋白酶水解乳清蛋白；b: 胰蛋白酶水解乳清蛋白。图 2、3 同。

由图 1 可知，在试验时间范围内，胃蛋白酶、胰蛋白酶水解乳清蛋白的水解度呈递增趋势 ($p < 0.05$)，在不同时间段内水解度增大趋势存在明显差异，刚开始水解时由于酶可作用的肽键数较多，水解度增加明显，底物浓度随着水解时间延长而降低，可被催化的酶切位点逐渐减少，导致水解度增加趋势减缓。水解物 DPP-IV 抑制率的变化趋势为先上升后下降，WPPHs、WPTHs 的 DPP-IV 抑制率分别在 2 h 时、4 h 时最高，DPP-IV 抑制率均为 14.05%，随着酶解时间

逐渐延长 DPP-IV 抑制率显著下降 ($p < 0.05$)，与吉薇^[30]对南极磷虾蛋白源 DPP-IV 抑制肽的研究结论一致。可能是蛋白质水解生成的肽含量增多，DPP-IV 抑制率不断上升，但持续水解，酶解程度过大，导致得到活性多肽进一步水解成氨基酸，多肽含量降低，DPP-IV 抑制活性也随之降低^[31]。

2.1.2 水解 pH 值对乳清蛋白水解度及 DPP-IV 抑制率的影响

不同蛋白酶存在最适 pH 范围，由图 2 可知，胃蛋白酶、胰蛋白酶水解乳清蛋白水解度及水解物 DPP-IV 抑制率随 pH 值增加均呈现先上升后下降的趋势。pH 值分别在 2.5、8 时，二者均达到最大值，随着 pH 值继续增大水解度及 DPP-IV 抑制活性显著降低 ($p < 0.05$)，与刘利军等^[32]在酶法水解乳清蛋白过程中对 pH 的优化研究结果相近。出现此现象的原因可能是 pH 影响酶分子的构象以及酶与底物的结合和催化，在酸碱不适宜条件下，维护酶三维结构的许多非共价键受到干扰，使蛋白酶的空间构型产生变化，导致酶活力降低甚至失活^[33]；推测也可能是 DPP-IV 抑制肽的结构发生变化使其活性下降。因此胃蛋白酶、胰蛋白酶水解乳清蛋白最优 pH 值分别为 2.5 和 8。

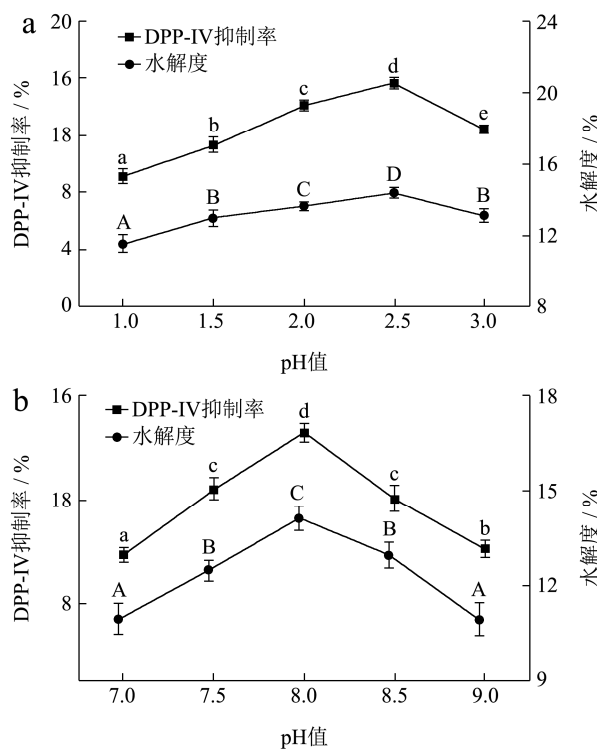


图2 水解 pH 值对乳清蛋白水解度及 DPP-IV 抑制率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis pH on the degree of hydrolysis and DPP-IV inhibition rate of whey protein

2.1.3 酶添加量对乳清蛋白水解度及 DPP-IV 抑制率的影响

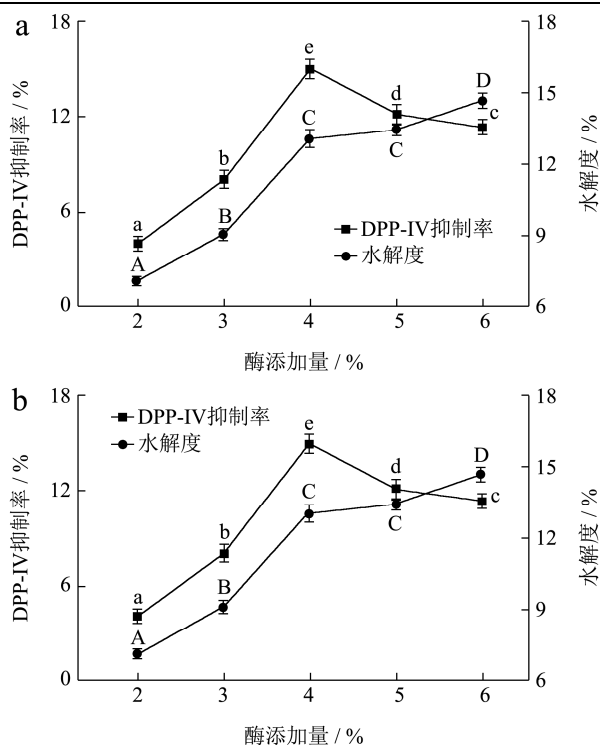


图3 酶添加量对乳清蛋白水解度及DPP-IV抑制率的影响
Fig.3 Effect of enzyme addition on whey protein hydrolysis degree and DPP-IV inhibition rate

由图3可知,胃蛋白酶、胰蛋白酶水解乳清蛋白水解度随着酶添加量增加呈上升趋势,在2%~4%与

5%~6%时水解度显著增高($p < 0.05$)。酶添加量较小时,底物浓度过高,底物大多都堆积在酶活动中心,阻碍产物分子的扩散及水解速度;酶添加量适宜时,酶能够很好地作用于均匀分布在酶周围的底物,水解度增加;酶添加量过大时,虽然底物分散的更均匀,酶的浓度却降低,酶解反应速度减缓^[34]。水解物DPP-IV抑制率呈现先上升后下降趋势,随着酶添加量的增加,蛋白质逐渐分解,DPP-IV抑制率增大,在4%时DPP-IV抑制活性达到最大,WPPHs、WPTHs的DPP-IV抑制率分别为15.18%、14.97%。继续添加蛋白酶后,蛋白质分子水解完全,导致DPP-IV抑制活性的多肽分子减少,这与Nongonierma等^[35]的结论相似。

2.2 胃蛋白酶、胰蛋白酶水解乳清蛋白响应面

试验结果

2.2.1 胃蛋白酶水解乳清蛋白响应面设计方案及实验结果

响应面因素水平设计方案及结果见表5。将数据进行二次多项式回归拟合,得各因素回归方程为: $Y = 15.45 + 0.95A - 0.23B + 0.43C + 0.35AB + 0.51AC + 0.78BC - 1.08A^2 - 0.92B^2 - 2.24C^2$,利用Design-Expert 8.0.6软件对试验结果进行方差分析,结果见表6。

表5 胃蛋白酶水解乳清蛋白响应面试验设计与结果

Table 5 Design and results of response surface test of pepsin hydrolysis of whey protein

试验序号	pH值	酶解时间/h	酶添加量/%	DPP-IV抑制率/%
1	2	1.5	4	12.91±0.11
2	2.5	2.5	3	10.54±0.20
3	2.5	1.5	3	13.12±0.16
4	3	2	3	12.29±0.12
5	2	2.5	4	12.29±0.21
6	3	1.5	4	13.90±0.14
7	2.5	1.5	5	12.49±0.24
8	2	2	5	10.96±0.26
9	2.5	2	4	15.91±0.18
10	3	2	5	14.09±0.22
11	2.5	2	4	15.34±0.13
12	2.5	2	4	15.27±0.10
13	3	2.5	4	14.69±0.25
14	2.5	2	4	15.74±0.15
15	2	2	3	11.20±0.21
16	2.5	2	4	15.01±0.12
17	2.5	2.5	5	13.02±0.10

表 6 乳清蛋白胃蛋白酶水解物 DPP-IV 抑制活性回归模型方差分析

Table 6 Regression model variance analysis to the DPP-IV inhibition rate of whey protein pepsin hydrolysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	45.45	9	5.05	28.36	0.0001**
A	7.24	1	7.24	40.66	0.0004**
B	0.44	1	0.44	2.48	0.1592
C	1.45	1	1.45	8.16	0.0244*
AB	0.50	1	0.50	2.79	0.1387
AC	1.04	1	1.04	5.84	0.0463*
BC	2.42	1	2.42	13.58	0.0078**
A2	4.93	1	4.93	27.68	0.0012**
B2	3.60	1	3.60	20.21	0.0028**
C2	21.07	1	21.07	118.33	<0.0001**
残差	1.25	7	0.18		
失拟项	0.71	3	0.24	1.78	0.2899
纯误差	0.53	4	0.13		
矫正总和	46.69	16			

注: *表示差异显著 ($p < 0.05$), **表示差异极显著 ($p < 0.01$), 表 8 同。

由表 6 可知, 该回归模型 F 值为 28.36, $p < 0.01$, 差异极显著, 失拟项 F 值为 1.78, $p > 0.05$, 差异不显著, 且 R^2 为 0.9733, R^2_{adj} 为 0.9390, 表明该 WPPHS 模型成立且设计合理。由 F 值可以判断出各因素对 WPPHS 的 DPP-IV 抑制率的影响顺序为: pH 值(A) > 酶添加量(C) > 酶解时间(B)。

状越接近椭圆形因素间的交互作用显著, 反之, 则交互作用不显著^[36,37]。通过对图 4 中的响应面及等高线的形状分析发现, 与 AB 相比, AC、BC 等高线的形状更接近椭圆形, 响应面倾斜度更陡峭, 因此判断酶添加量与 pH 值及酶解时间之间的交互作用比 pH 值与酶解时间之间的交互作用对 DPP-IV 抑制率影响较显著。

2.2.2 胰蛋白酶水解乳清蛋白响应面设计方案及实验结果

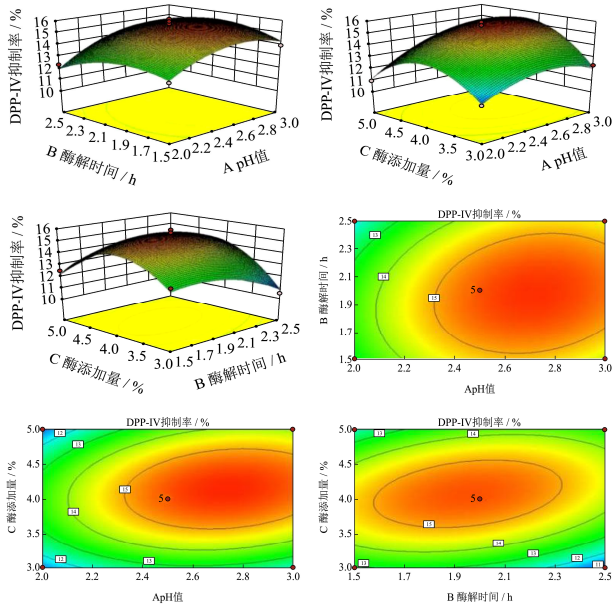


图 4 各因素对乳清蛋白胃蛋白酶水解物 DPP-IV 抑制率的交互影响

Fig.4 Interaction of various factors on inhibition rate of whey protein pepsin hydrolysis DPP-IV

在响应面分析中, 响应面曲面倾斜度、等高线形状反映交互作用的程度, 响应面曲面越陡、等高线形

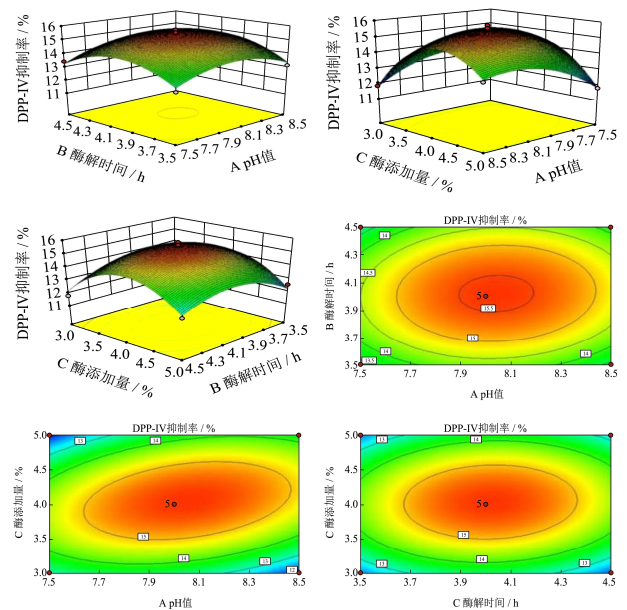


图 5 各因素对乳清蛋白胰蛋白酶水解物 DPP-IV 抑制率的交互影响

Fig.5 Interaction of various factors on inhibition rate of whey protein trypsin hydrolysis DPP-IV

表 7 胰蛋白酶水解乳清蛋白响应面试验设计与结果

Table 7 Design and results of response surface test for trypsin hydrolysis of whey protein

试验序号	pH 值	酶解时间/h	酶添加量/%	DPP-IV 抑制率/%
1	8.5	4	3	11.85±0.27
2	8	4	4	15.69±0.17
3	7.5	4	5	11.78±0.20
4	7.5	4	3	13.23±0.18
5	8	4.5	3	11.79±0.12
6	8	4	4	15.41±0.16
7	8	4	4	15.38±0.13
8	8	4	4	15.78±0.22
9	7.5	4.5	4	13.44±0.19
10	7.5	3.5	4	13.02±0.25
11	8	3.5	5	12.51±0.10
12	8.5	3.5	4	13.18±0.13
13	8.5	4.5	4	14.11±0.20
14	8.5	4	5	13.55±0.18
15	8	4	4	15.61±0.14
16	8	3.5	3	12.43±0.22
17	8	4.5	5	12.54±0.16

表 8 乳清蛋白胰蛋白酶水解物 DPP-IV 抑制活性回归模型方差分析

Table 8 Regression model variance analysis to inhibition rate of DPP-IV of pepsin hydrolysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	33.21	9	3.69	38.65	
A	0.19	1	0.19	1.95	<0.0001**
B	0.07	1	0.07	0.72	0.2054
C	0.15	1	0.15	1.53	0.4251
AB	0.07	1	0.07	0.68	0.2564
AC	2.48	1	2.48	25.99	0.4364
BC	0.11	1	0.11	1.18	0.0014**
A2	3.61	1	3.61	37.80	0.3142
B2	6.17	1	6.17	64.66	0.0005**
C2	17.62	1	17.62	184.61	<0.0001**
残差	0.67	7	0.10		<0.0001**
失拟项	0.55	3	0.18	5.99	0.0583
纯误差	0.12	4	0.03		
矫正总和	33.87	16			

响应面因素水平设计方案及结果见表 7。将数据进行二次多项式回归拟合, 得各因素回归方程为: $Y=15.57+0.15A+0.092B+0.14C+0.13AB+0.79AC+0.17BC-0.93A^2-1.21B^2-2.05C^2$, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行方差分析, 结果见表 8。

由表 8 可知, 该回归模型 F 值为 38.65, $p<0.01$, 差异极显著, 失拟项 F 值为 5.99, $p>0.05$, 差异不显著, 且 R^2 为 0.9803, R^2_{adj} 为 0.9549, 表明该 WPTHs

模型成立且设计合理。由 F 值可以判断出各因素对 WPTHs 的 DPP-IV 抑制率的影响顺序为: pH 值 (A) > 酶添加量 (C) > 酶解时间 (B)。

由图 5 可知, pH 值与酶添加量及酶解时间与酶添加量之间的交互作用响应面倾斜度更陡峭, 等高线的形状更接近椭圆形, 说明它们二者的交互作用对 WPTHs 的 DPP-IV 抑制率的影响较大, pH 值与酶解时间的交互作用影响较小, 与表 8 的方差分析结果一致。

2.2.3 水解最优工艺条件及结果验证

通过响应试验分析得出乳清蛋白胃蛋白酶水解优化通过回归方程求解得到最佳提取工艺条件为 pH 值 2.74、酶解时间 2.02 h、酶添加量 4.15%，根据实际操作调整为 pH 值 2.7，酶解时间 2 h，酶添加量 4%。按照优化条件进行重复验证试验，结果取均值此水解物的 DPP-IV 抑制率为 15.43%，与预测值相对误差仅为 0.28%，说明实验结果可靠；对乳清蛋白胰蛋白酶水解优化，通过回归方程求解得到最佳提取条件为 pH 值 7.57、酶解时间 3.99 h、酶添加量 3.87%，根据实际操作调整为 pH 值 7.6、酶解时间 4 h、酶添加量 4%。据以上最优条件进行验证可得此水解物的 DPP-IV 抑制率为 14.62%，与预测值 14.80%几乎一致，充分验证了试验效果较好。

2.3 DPP-IV 抑制率测定结果

将优化条件下得到的 WPPHs、WPTHs 及 MS 分别配置成质量浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL，测定其 DPP-IV 抑制率。WPPHs 质量浓度与其 DPP-IV 抑制率的拟方程为 $y=0.0864x+0.0014$ ($R^2=0.9992$)；WPTHs 质量浓度与其 DPP-IV 抑制率拟方程为 $y=0.0685x+0.0012$ ($R^2=0.9990$)；MS 质量浓度与其 DPP-IV 抑制率的拟方程为 $y=0.0955x+0.0036$ ($R^2=0.9992$)，将抑制率为 50%代入公式可得胃蛋白酶水解物抑制 DPP-IV 的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 5.77 mg/mL；胰蛋白酶水解物抑制 DPP-IV 的 IC_{50} 为 7.28 mg/mL；MS 抑制 DPP-IV 的 IC_{50} 为 7.28 mg/mL，与文献报道结论相似^[38,39]。

2.4 MS 与乳清水解物协同作用研究

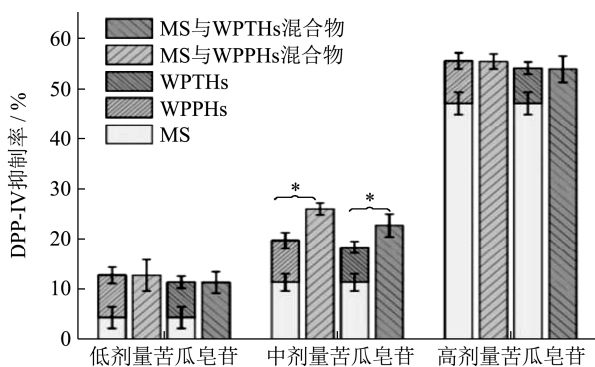


图6 不同配比的苦瓜皂苷与水解物的DPP-IV抑制率
Fig.6 The DPP-IV inhibition rate of different proportion between *Momordica saponins* and hydrolysis

由图6可知，将不同剂量MS与WPPHs和WPTHs的DPP-IV抑制率进行比较可得：MS剂量不断提高，

MS的DPP-IV抑制率也逐步上升；低剂量和高剂量组MS与水解物混合物DPP-IV抑制率较两种成分抑制率单独累积相比无显著性差异；而中剂量组MS与水解物混合物具有一定的协同作用，MS与WPPHs和WPTHs复配的DPP-IV抑制率较两种成分单独累积相比，DPP-IV抑制率分别提高6.54%与3.76%。由此推测，当MS与水解物体积比为1:1时具有一定的协同作用，其混合物抑制作用效果显著高于两者单独累加 ($p<0.05$)。水解物占比过高时，抑制率主要取决于水解物或两种成分的单独作用，因此未产生相互作用与影响；当MS的占比过高时，水解物因含量较少从而未能表现出协同作用。

2.5 胃肠道消化模拟实验

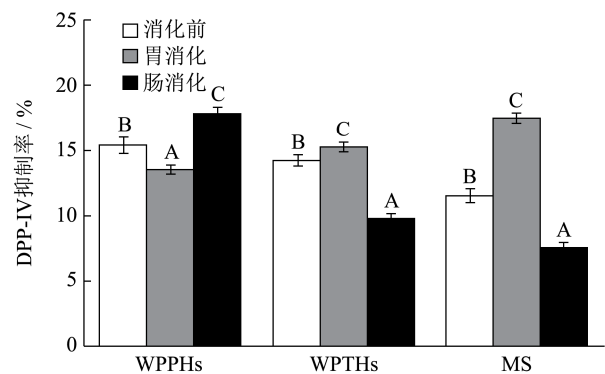


图7 胃肠道消化模拟试验结果

Fig.7 Simulated gastrointestinal tract test results

由图7可知，WPPHs、WPTHs及MS经过模拟胃肠道消化后DPP-IV抑制率均发生显著改变 ($p<0.05$)。WPPHs的DPP-IV抑制率经胃消化后降低2.02%，而经肠道消化后DPP-IV抑制率却升高2.23%，推测可能肠道内的酶对WPPHs进一步水解，使得具有DPP-IV抑制活性的肽段含量大幅度增加，因此其抑制作用增强；WPTHs的DPP-IV抑制率经胃消化后升高0.99%，但是经过肠道消化后DPP-IV抑制率降低4.12%，推测消化过程有新的酶参与水解，使水解物的组成成分发生变化，有部分肽链断裂导致新的小分子多肽生成^[40]；MS的DPP-IV抑制率经胃消化后显著升高7.01%，经肠道消化后降低2.70%，推测可能是pH值对MS的抑制效果产生了影响。Velarde-Salcedo等^[41]研究的苜蓿蛋白水解物及董宇婷^[38]研究的燕麦多肽水解产物在经过胃肠消化后DPP-IV抑制率出现一定程度的下降；张颖等^[42,43]对牛羊乳酪蛋白、鲢鱼水解产物研究发现，在经过体外消化后DPP-IV抑制活性并没有显著的变化；而Nongonierma等^[35]及Huang等^[44]分别对乳清蛋白胰酶酶解物、三条金枪鱼肉蛋白水解物的研究过程中发现，

胃肠模拟消化会显著增加其水解产物的 DPP-IV 抑制活性。经肠胃消化后不同来源于蛋白水解物 DPP-IV 抑制活性稳定性存在差异,可能与所含的关键有效活性肽组分的氨基酸序列结构有关。

3 结论

通过单因素试验及响应面试验确定了 WPPHs 及 WPTHs 具有 DPP-IV 抑制活性。当 pH 值 2.7, 酶解时间 2 h, 酶添加量 4% 时, WPPHs 的 DPP-IV 抑制率最高为 15.43%, IC_{50} 为 5.77 mg/mL; 当 pH 值 7.6、酶解时间 4 h、酶添加量 4% 时, WPTHs 的 DPP-IV 抑制率最高为 14.62%, IC_{50} 为 7.28 mg/mL, 胃蛋白酶水解物的抑制活性高于胰蛋白酶水解物。实验研究发现 MS 也具有 DPP-IV 抑制活性, IC_{50} 为 5.20 mg/mL, MS 与 WPPHs 和 WPTHs 复配体积比为 1:1 时还具有协同抑制 DPP-IV 活性作用, DPP-IV 抑制率分别提高 6.54% 与 3.76%, 其抑制效果显著高于两者单独累加 ($p < 0.05$)。通过体外试验可知, WPPHs 的 DPP-IV 抑制率经胃消化后显著下降 ($p < 0.05$), 经肠道消化后 DPP-IV 抑制率却显著升高 ($p < 0.05$), 而 WPTHs 及 MS 胃肠消化后结果则相反。试验为动植物源 DPP-IV 抑制剂研究提供了新思路, 也为 DPP-IV 抑制类降血糖功能性产品开发提供了理论依据和科学参考。

参考文献

- [1] 樊红秀.玉米蛋白组氨酸-脯氨酸环二肽的高效制备技术及其降血糖功效研究[D].长春:吉林农业大学,2016
FAN Hongxiu. Study on the technology of efficient preparation of corn protein cyclo(his-pro) and its anti-hyperglycemic activity [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016
- [2] Hwang H J, KIM S W, Lim J M, et al. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Life Sciences, 2005, 76: 3069-3080
- [3] Melorin M, Charles C J, Lauren O R, et al. Gangrenous cholecystitis: a silent but potential fatal disease in patients with diabetic neuropathy. A case report [J]. World Journal of Clinical Cases, 2018, 6(15): 1007-1011
- [4] 董迎.糖尿病慢性并发症的治疗进展[J].临床诊疗进展, 2019,33(3):76-79
DONG Ying. Progress in the treatment of chronic complications of diabetes [J]. Progress in Clinical Diagnosis and Treatment, 2019, 33(3): 76-79
- [5] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2014, 103(2): 137-149
- [6] Collier C A, Bruce C R, Smith A C, et al. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle [J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2006, 291(1): 182-189
- [7] Islam T, Rahman A, Islam A U. Effects of aqueous extract of fresh leaves of *Abroma augusta* L. on oral absorption of glucose and metformin hydrochloride in experimental rats [J]. Isrn Pharm, 2012: 472-586
- [8] Tahrani A A, Bailey C J, Delprato S, et al. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment [J]. The Lancet, 2011, 378(9786): 182-197
- [9] 闫爽,光耀,戴丛书,等.蒲公英提取物对 2 型糖尿病大鼠降血糖作用研究[J].食品与机械,2020,11(36):138-142
YAN Shuang, GUANG Yao, DAI Congshu, et al. Hypoglycemic effect of dandelion extract on type 2 diabetic rats [J]. Food and Machinery, 2020, 11(36): 138-142
- [10] 马宇航,彭永德.2 型糖尿病降糖药物治疗进展[J].中国临床保健杂志,2020,23(4):437-445
MA Yuhang, PENG Yongde. Progress in the treatment of type 2 diabetes hypoglycemic drugs [J]. Chinese Journal of Clinical Health, 2020, 23(4): 437-445
- [11] 杜俊杰,杨继红.2 型糖尿病的治疗新进展[J].中国临床保健杂志,2020,23(3):302-306
DU Junjie, YANG Jihong. New progress in the treatment of type 2 diabetes [J]. Chinese Journal of Clinical Health, 2020, 23(3): 302-306
- [12] Morsink L M, Smits m M, Diamant M. Advances in pharmacologic therapies for type 2 diabetes [J]. Curr Atheroscler Rep, 2013, 15(2): 302
- [13] 张蕾.DPP-IV 抑制剂-异槲皮苷促进 2 型糖尿病模型小鼠胰岛素分泌及降糖作用的研究[D].长春:吉林大学,2013
ZHANG Lei. Identification of isouercitrin as a inhibitor of DPP-IV implications for insulin secretion and hpyerglycemic in type 2 diabetes mice [D]. Changchun: Jilin University, 2013
- [14] Sarkar D, Orwat J, Hurburt T, et al. Evaluation of phenolic bioactive-linked functionality of blackberry cultivars targeting dietary management of early stages type-2 diabetes using in vitro models [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 212: 193-202
- [15] Bailey C J, Tahrani A A, Barnett A H, et al. Future

- glucose-lowering drugs for type 2 diabetes [J]. The Lancet Diabetes Endocrinology, 2016, 4(4): 350-359
- [16] 甲承立. α -乳白蛋白源 DPP-4 抑制肽的制备以及结构解析与功能评价[D].北京:中国农业科学院,2019
JIA Chengli. Study on preparation and structure analysis of DPP-4 inhibitory peptide from α -lactalbumin and its functional evaluation [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019
- [17] 高雯雯.DPP-4 抑制剂联合二甲双胍治疗 T2DM 的短期效果及长期药物经济学评价[D].济南:山东大学,2016
GAO Wenwen. Short term efficacy of DPP-4 inhibitors combined with metformin in the treatment of T2DM and its long term pharmacoeconomics evaluation [D]. Jinan: Shandong University, 2016
- [18] WANG Qi, WU Xueyan, SHI Fulin, et al. Comparison of antidiabetic effects of saponins and polysaccharides from *Momordica charantia* L. in STZ-induced type 2 diabetic mice [J]. Biomedicine Pharmacotherapy, 2019, 109: 744-750
- [19] Joseph B, Jini D. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2013, 3(2): 93-102
- [20] Sun H, Wang N, Zhen C, et al. Modulation of microbiota-gut-brain axis by berberine resulting in improved metabolic status in high-fat diet-fed rats [J]. Obes Facts, 2016, 9(6): 365-378
- [21] 吴利利,吴阿莉,彭威风.中草药治疗糖尿病研究概况[J].实用中医内科杂志,2019,33(10):99-103
WU Lili, WU Ali, PENG Weifeng. Research progress of Chinese herbal medicine treating diabetes mellitus [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine, 2019, 33(10): 99-103
- [22] Jaipaul S, Emmanuel C, Gunasekar M, et al. Ernest adeghate medicinal chemistry of the anti-diabetic effects of *Momordica charantia*: active constituents and modes of actions [J]. The Open Medicinal Chemistry Journal, 2011, 5(Suppl 2): 70-77
- [23] Power O, Nongonierma A B, Jakeman P, et al. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes [J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2013, 73(1): 34-46
- [24] 贾宏信,苏米亚,陈文亮,等.乳制品对代谢综合征预防作用的研究进展[J].乳业科学与技术,2020,43(1):45-49
JIA Hongxin, SU Miya, CHEN Wenliang, et al. Recent progress in understanding the preventive effect of dairy products on metabolic syndrome [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2020, 43(1): 45-49
- [25] Brody E P. Biological activities of bovine glycomacropeptide [J]. British Journal of Nutrition, 2000, 84(Suppl 1): 39-46
- [26] 吴尚仪,李乳姝,石佳鑫,等.乳清蛋白及其生物活性肽调节血糖功能研究进展[J].食品科学,2020,41(3):266-271
WU Shangyi, LI Rushu, SHI Jiixin, et al. The role of whey protein and whey protein-derived bioactive peptides in blood glucose regulation: a review [J]. Food Science, 2020, 41(3): 266-271
- [27] Gaudel C, Nongonierma A B, Maher S, et al. A whey protein hydrolysate promotes insulinotropic activity in a clonal pancreatic β -cell line and enhances glycemic function in ob/ob mice [J]. Journal of Nutrition, 2013, 143(7): 1109-1114
- [28] Matheussen V, Lambeir A M, Jungr Aithmayr W, et al. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors [J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413(3/4): 456-462
- [29] Ongonierma A B, Mazzocchi C, Paoella S, et al. Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis [J]. Food Research International, 2017, 94: 79-89
- [30] 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
- [31] 刘丹,吴晓彤.响应面法优化酶法制备驴血红蛋白源二肽基肽酶-IV 抑制活性肽[J].肉类研究,2021,35(2):19-24
LIU Dan, WU Xiaotong. Optimization of enzymatic preparation of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from donkey hemoglobi [J]. Meat Research, 2021, 35(2): 19-24
- [32] 刘利军,赵征.酶法水解乳清蛋白过程的优化[J].天津科技大学学报,2005,20:9-11
LIU Lijun, ZHAO Zheng. Optimization of enzymatic hydrolysis of whey protein [J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2005, 20: 9-11
- [33] 郑宝东.食品酶学[M].南京:东南大学出版社,2006:65-91
ZHENG Baodong. Food Enzymology [M]. Nanjing: Southeast University Press, 2006: 65-91
- [34] 韩雪兰.乳清蛋白酶水解工艺及水解产物功能特性研究[D].天津:天津科技大学,2017
HAN Xuelan. Study on hydrolysis process of whey protein and functional properties of hydrolysates [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017

- [35] Nongonierma A B, Fitzgerald R J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and fooodrug interaction [J]. International Dairy Journal, 2013, 32(1): 33-39
- [36] 付励,陈继兰,王攀林,等.鸡胚蛋白的酶解工艺优化及抗氧化性研究[J].食品科技,2020,45(9):35-42
FU Mai, CHEN Jilan, WANG Panlin, et al. Antioxidant and optimization of enzymatic hydrolysis of chicken embryo protein [J]. Food Technology, 2020, 45(9): 35-42
- [37] Dehghan-Shoar Z, Hardacre A K, Meerdink G, et al. Lycopene extraction from extruded products containing tomato skin [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(2): 365-371
- [38] 董宇婷.燕麦源 α -glucosidase抑制肽与DPP-IV抑制肽的筛选及抑制机理研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019
DONG Yuting. Screening and inhibition mechanism of oat source α -glucosidase inhibitory peptide and DPP-IV inhibitory peptide [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019
- [39] Silveira S T, Martinez-Maqueda D, Recio I, et al. Dipeptidyl peptidas generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 1072-1077
- [40] 段春红,姚晓琳,朱新荣,等.大豆 7S 球蛋白碱性蛋白酶酶解产物的结构表征[J].食品科学,2009,30(17):181-184
DUAN Chunhong, YAO Xiaolin, ZHU Xinrong, et al. Structural characterization of alcalase hydrolysates of soybean 7S globulin [J]. Food Science, 2009, 30(17): 181-184
- [41] Velarde-Salcedo, Aida J, Barrera-Pacheco A, et al. *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 758-764
- [42] 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
- [43] Zhang Y, Chen R, Chen X, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(4): 831-839
- [44] Huang S L, Jao C L, HO K P, et al. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides from tuna cooking juice hydrolysates [J]. Peptides, 2012, 35: 114-121

(上接第 55 页)

- [15] 张晓玫,王忠.腹泻患者呕吐物中麦氏弧菌的分离及其生物学性状观察[J].蚌埠医学院学报,2012,37(12):1530-1532
ZHANG Xiaomei, WANG Zhong. Isolation of *Vibrio mckii* from the vomit of patients with diarrhea and observation of its biological characteristics [J]. Journal of Bengbu Medical College, 2012, 37(12): 1530-1532
- [16] Yadav S, Reddy B, Dubey S. De novo genome assembly and comparative annotation reveals metabolic versatility in cellulolytic bacteria from cropland and forest soils [J]. Functional & Integrative Genomics, 2019, 20(5): 89-101
- [17] Vaghefi N, Kikkert J R, Bolton M D, et al. De novo genome assembly of *Cercospora beticola* for microsatellite marker development and validation [J]. Fungal Ecology, 2017, 26: 125-134
- [18] 郑连爽.嗜碱细菌研究进展[J].微生物学通报,1991,18(3): 166-169
ZHENG Lianshuang. Research progress of alkaliphilic bacteria [J]. Microbiology Bulletin, 1991, 18(3): 166-169
- [19] Cheng B, Meng Y, Cui Y, et al. Alkaline response of a halotolerant alkaliphilic *Halomonas* strain and functional diversity of its $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporters [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(50): 26056-26065
- [20] Altinisik Kaya F E, Avci F G, Sayar N A, et al. What are the multi-omics mechanisms for adaptation by microorganisms to high alkalinity? A transcriptomic and proteomic study of a bacillus strain with industrial potential [J]. Omics : A Journal of Integrative Biology, 2018, 22(11): 717-732
- [21] Affandi T, Mcevoy M M. Mechanism of metal ion-induced activation of a two-component sensor kinase [J]. The Biochemical Journal, 2019, 476(1): 115-135
- [22] Vázquez-ciros O J, Alvarez A F, Georgellis D. Identification of Z nucleotides as an ancient signal for two-component system activation in bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(52): 33530-33533