

# 具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的苦杏仁醇溶蛋白酶解物制备及稳定性表征

武安琪<sup>1</sup>, 衣春敏<sup>1</sup>, 赵学旭<sup>1</sup>, 马培轩<sup>1</sup>, 武蕊<sup>1</sup>, 单良<sup>2\*</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 以苦杏仁醇溶蛋白(BAKG)为原料, 以 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率及水解度为指标, 筛选出酶解苦杏仁醇溶蛋白制备 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物(AGIH)的最佳蛋白酶, 以 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率为指标, 采用单因素和响应面设计实验选定制备AGIH所需的底物浓度、加酶量、pH值、最佳温度、酶解时间。并对该最佳酶解条件下制备活性酶解物的物理(pH、温度)稳定性和胃肠道稳定性进行研究。结果表明, 木瓜蛋白酶为最佳蛋白酶, 酶解最优工艺条件为底物浓度4.0% (m/V)、加酶量6000 U/g、pH 7.0、温度55 °C、酶解时间6 h。根据上述条件下制备的AGIH抑制率为18.10%, IC<sub>50</sub>为17.66 mg/mL。制得的AGIH在高温、低pH、高pH条件下, 或者经胃肠道模拟消化后, 都具有较好的稳定性。研究结果为苦杏仁醇溶蛋白功能活性酶解物的开发利用提供了新的思路。

**关键词:** 苦杏仁; 醇溶蛋白; 木瓜蛋白酶; 酶解;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物; 稳定性

文章篇号: 1673-9078(2022)04-34-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0874

## Preparation and Stability Characterization of Gliadin Hydrolysates from Bitter Almond Kernels with $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity

WU Anqi<sup>1</sup>, YI Chunmin<sup>1</sup>, ZHAO Xuexu<sup>1</sup>, MA Peixuan<sup>1</sup>, WU Rui<sup>1</sup>, SHAN Liang<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The optimal protease for preparing bitter almond kernel gliadin-based  $\alpha$ -glycosidase inhibitory hydrolysates (AGIH) was determined according to the inhibition rate and degree of hydrolysis. Based on the  $\alpha$ -glycosidase inhibition rate, optimal process parameters for AGIH preparation, including the substrate concentration required, amounts of enzymes added, pH, temperature, and duration, were examined in single-factor and response surface experiments. The physical stability (against pH and temperature) and gastrointestinal stability of the resulting AGIH were characterized. Papain was found to be the optimal protease; the optimal conditions were as follows: substrate concentration of 4.0% (m/V), enzyme addition of 6000 U/g, initial pH of 7.0, hydrolysis temperature of 55 °C, and reaction time of 6 h. AGIH prepared under these conditions showed an  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of 18.10% and IC<sub>50</sub> value of 17.66 mg/mL, and was stable under relatively high temperature, extreme pH, and gastrointestinal digestion conditions. This study provides a foundation for developing bitter almond kernel gliadin-based bioactive hydrolysates.

**Key words:** bitter almond kernel; gliadin; papain; enzymatic hydrolysis;  $\alpha$ -glucosidase inhibitory hydrolysate; stability

引文格式:

武安琪, 衣春敏, 赵学旭, 等. 具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的苦杏仁醇溶蛋白酶解物制备及稳定性表征[J]. 现代食品科技, 2022, 38(4): 34-42

WU Anqi, YI Chunmin, ZHAO Xuexu, et al. Preparation and stability characterization of gliadin hydrolysates from bitter almond kernels with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 34-42

糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) 是一种由胰岛

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1002300)

作者简介: 武安琪 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品创新加工技术, E-mail: 374198472@qq.com

通讯作者: 单良 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与综合利用, E-mail: 729844950@qq.com

素代谢障碍或分泌不足引起的以血糖浓度偏高为特征的代谢性疾病<sup>[1]</sup>, 作为威胁人类健康的三大慢性疾病之一, 糖尿病的患病人群已超过2亿, 而我国是全球糖尿病患者人数最多的国家, 因此, 预防及治疗糖尿病已刻不容缓<sup>[2,3]</sup>。市面上现已存在阿卡波糖等降血糖药物, 虽然治疗效果较好, 但其存在着价格昂贵和有恶心呕吐的不良反应<sup>[4]</sup>。因此, 许多具有生物亲和性

的天然活性物质被用于治疗糖尿病,其中酶解制备生物活性肽是当前研究的热点。张灿等<sup>[5]</sup>利用木瓜蛋白酶对银杏蛋白进行酶解制备 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽,测得其抑制率为17.18%;邓艳群<sup>[6]</sup>采用复合酶酶解牡蛎,并进一步利用葡聚糖凝胶层析法对牡蛎肽进行分离纯化,测得其 $IC_{50}$ 值为20.62 mg/mL;李艳敏<sup>[7]</sup>利用碱性蛋白酶酶解裙带菜,在最佳工艺条件下制备的酶解肽 $IC_{50}$ 值为46.079 mg/mL。王晟等<sup>[8]</sup>利用木瓜蛋白酶对苦杏仁粗蛋白进行酶解制备 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽,该试验证明苦杏仁蛋白经酶解之后得到的肽具有降血糖活性,但抑制效果较低, $IC_{50}$ 值仅为80 mg/mL。

有研究表明,疏水性氨基酸在许多具有降血糖功能活性的多肽中发挥较为显著的作用。袁晓晴<sup>[9]</sup>对癩葡萄蛋白及其酶解产物癩葡萄降血糖肽进行氨基酸检测,发现二者氨基酸组成差别不大,且都含有高比例的疏水性氨基酸。包美丽<sup>[10]</sup>通过对马鹿茸降血糖肽进行氨基酸序列分析得出,降血糖肽与氨基酸的疏水性可能有一定的关系。赵红星<sup>[11]</sup>对制备的大豆多肽进行了氨基酸分析,结果显示该多肽的疏水性氨基酸含量占比较高为27.57%,从而推断疏水性氨基酸对于多肽 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性有重要作用。因此,选用疏水性氨基酸含量高的原料制备降血糖肽具有重要意义。苦杏仁蛋白中疏水性氨基酸(丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸等)含量为9.374%<sup>[12-17]</sup>,其主要存在于苦杏仁醇溶蛋白中<sup>[18,19]</sup>,这些氨基酸的存在可能使得苦杏仁醇溶蛋白成为制备降血糖肽的良好原料。由此可见,提取苦杏仁醇溶蛋白进行酶解制备降血糖肽有望提高其降血糖活性。

因此,本研究以苦杏仁醇溶蛋白为原料、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和水解度为评价指标,筛选适宜的蛋白酶,采用响应面法进行工艺优化,制备具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的苦杏仁醇溶蛋白水解物,然后研究温度、pH和模拟胃肠道消化对制得 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制物(AGIH)活性的影响,为开发和利用苦杏仁蛋白的降血糖肽提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

苦杏仁,购自蔚县丰润农产品加工有限公司;木瓜蛋白酶(800 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(20 U/mg)、复合蛋白酶(120 U/mg)、菠萝蛋白酶(300 U/mg)、胃蛋白酶(1:15000)、胰蛋白酶(2.5 U/mg)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(25.4 U/mg)、4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷

(pNPG),均购自上海源叶生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

DZKW-S-4 恒温水浴锅,北京市永光明医疗仪器有限公司;TD5.5 低速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;TGL-16 高速冷冻离心机,上海沪粤明科学仪器有限公司;THYS-15 数控恒温槽,宁波天恒仪器厂;ST3100 pH计、e-G51HSRDM 加热磁力搅拌器,奥克斯仪器(常州)有限公司;LCJ-10D 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂有限公司;UV-1200 紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;Multiskan GO 全波长酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 苦杏仁醇溶蛋白的制备

- (1) 脱脂脱苷苦杏仁粉的制备<sup>[20]</sup>。
- (2) 苦杏仁粗蛋白的制备,具体参考碱溶酸沉法<sup>[21]</sup>。
- (3) 醇溶蛋白的制备,具体参考 Osborne 方法<sup>[22]</sup>。

#### 1.2.2 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制酶解物的制备工艺优化

##### 1.2.2.1 蛋白酶的筛选

称取适量苦杏仁醇溶蛋白,配制成4.0% (m/V)的蛋白溶液。95℃加热10 min,后调节溶液的pH值和温度至所添加酶的最适酶解条件,加入一定量的酶,使酶/底物比值(E/S)为6000 U/g。整个酶解过程需维持恒定最适条件。最后将溶液pH值回调至7.0,沸水浴灭酶后高速离心(8000×g, 15 min)取上清液(酶解产物),并以 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和水解度为评价指标,筛选最佳蛋白酶。每种蛋白酶的用量(加酶量以底物蛋白含量计)和反应的最适作用条件见表1。

表1 不同蛋白酶的最适作用条件

Table 1 Optimal enzymatic reaction conditions for various

proteases			
蛋白酶	反应温度/℃	反应 pH	加酶量/(U/g)
风味蛋白酶	50	7.5	6000
木瓜蛋白酶	55	7.0	6000
复合蛋白酶	45	7.0	6000
中性蛋白酶	45	7.0	6000
碱性蛋白酶	55	9.0	6000
菠萝蛋白酶	60	6.0	6000

##### 1.2.2.2 苦杏仁蛋白酶解单因素试验

选取上述最佳蛋白酶进行酶解,并选定温度、pH值、底物浓度、加酶量、酶解时间为单因素,以 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和水解度为评价指标,筛选最佳酶解条件。

表 2 响应面试验设计因素水平表

水平	A: pH	B: 酶解温度/℃	C: 加酶量/(U/g)	D: 底物浓度/%
-1	6.0	50	4000	2.0
0	7.0	55	6000	4.0
1	8.0	60	8000	6.0

表 3  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率检测反应体系的组成

组别	缓冲液/ $\mu$ L	pNPG/ $\mu$ L	样品/ $\mu$ L	$\alpha$ -葡萄糖苷酶/ $\mu$ L
空白组	50	50	50 (蒸馏水)	100
样品组	50	50	50	100
样品对照组	50	50 (缓冲液)	50	100 (缓冲液)
空白对照组	50	50 (缓冲液)	50 (蒸馏水)	100 (缓冲液)

### 1.2.2.3 苦杏仁蛋白酶解工艺优化

根据上述实验结果,选定酶解反应时间为 6 h,并选取其余单因素变量进行 Box-Behnken 响应面实验设计,具体实验设计如表 2 所示,响应值为苦杏仁醇溶蛋白酶解产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,分析各试验因素及交互作用对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响,对酶解工艺进行优化。

### 1.2.3 测定方法

#### (1) 水解度的测定

采用 pH-stat 法进行水解度的测定<sup>[23]</sup>。

#### (2) $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率的测定

参照 Boath 等<sup>[24]</sup>和 Raju 等<sup>[25]</sup>的测定方法,略加修改。用 0.2 mol/L, pH 6.8 的磷酸盐缓冲液将  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)分别配制成 0.2 U/mL 和 1 mg/mL 的溶液。移取 50  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液,50  $\mu$ L pNPG 溶液及 50  $\mu$ L 酶解物溶液于 96 孔酶标板中,在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 10 min,充分混合,然后再加入 100  $\mu$ L  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液启动反应,相同温度下继续孵育 30 min,完成后终止此次酶解,所用到的溶液为 150  $\mu$ L 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液。空白组用去离子水代替样品溶液,在 405 nm 波长下测定吸光值并记录。测定反应体系如表 3 所示。抑制率计算公式为:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}/\% = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中:

$A_{\text{空白}}$ ——空白组对应的吸光度值;

$A_{\text{样品}}$ ——样品组对应的吸光度值。

#### (3) $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物的热稳定性表征

将 AGIH 配制成一定浓度的溶液,调节酶解物溶液的 pH 至 7.0 后进行加热保温 30 min,加热温度分别是 37、50、70、90、110、121  $^{\circ}$ C,测定所采集反应液的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,计算 AGIH 活性的保留率。

(4)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物的酸碱稳定性表征  
将 AGIH 溶液调节至不同的 pH 值 (1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0),然后在室温下反应 30 min,测定所采集反应液的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,计算 AGIH 活性的保留率。

(5)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物的体外消化稳定性表征

参考 Wu 等<sup>[26]</sup>的方法,根据试验情况略加调整。先将 AGIH 溶液的 pH 值调至 2.0,温度调到 37  $^{\circ}$ C,添加一定量胃蛋白酶进行酶解反应,2 h 后,胃模拟消化结束;随后将反应体系的 pH 调至 7.0,添加一定量胰蛋白酶进行酶解反应,4 h 后,肠道模拟消化结束,在 95  $^{\circ}$ C 下进行灭酶,时间 10 min,整个反应过程中每 30 min 采集一次反应液样品,测定所采集反应液的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,计算 AGIH 活性的保留率。

### 1.2.4 数据处理

实验数据采用 SPSS Statistics Base 20、Origin Pro 2019b、Design Expert 8.0.5 进行分析处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白酶的筛选

由于不同蛋白酶的酶切作用方式及酶切位点不同,苦杏仁蛋白酶解产物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率强弱也有很大的差异,短肽容易以完整的形式被吸收进入人体代谢循环中,从而其生物活性较容易保持<sup>[27]</sup>。蛋白的酶解效果与生成产物中肽链的长短直接相关<sup>[23]</sup>,因而,要制备大量的小分子肽,就必须达到一定的酶解程度。此次筛选所用到的指标为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和水解度,结果见图 1。

本研究选取的 6 种蛋白酶均具有制备抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性酶解物的功效,其中木瓜蛋白酶催化水解

产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率显著高于其它五种酶,抑制率为18.82%,其次是碱性蛋白酶催化水解产物,抑制率为13.42%;碱性蛋白酶的水解度显著高于其它五种酶为39.78%,木瓜蛋白酶位居第二,水解度为26.45%。因而,综合功能活性和水解效果,本研究选取木瓜蛋白酶作为最佳用酶。

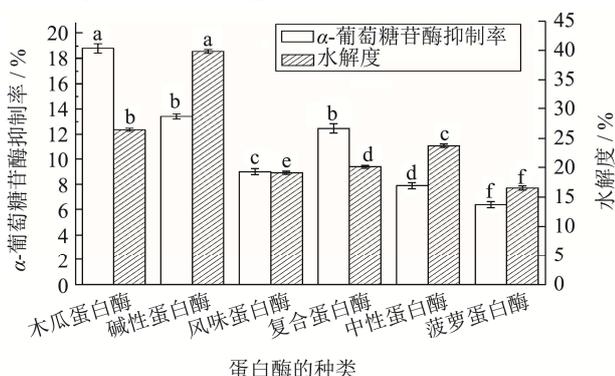


图1 不同蛋白酶对水解产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率及水解度的影响

Fig.1 Effects of various proteases on the hydrolysates as to their  $\alpha$ -glucosidase inhibition rates and degree of hydrolysis

注: 字母不同代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。

## 2.2 单因素实验

### 2.2.1 pH对酶解产物抑制活性的影响

pH值在5.0~9.0范围内时,酶解产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率总体表现出先升高后降低的趋势。其中,在酸性条件下(pH 5.0~7.0),酶解产物的整体抑制效果随酸性的减弱而逐步增强,在中性条件下,抑制率达到最大值,而当pH值在7.0~9.0范围内时,抑制率显著降低(图2)。这种现象的原因可能是酸或碱环境会影响酶的活性和底物的构象<sup>[28]</sup>,从而导致抑制率低。因而,pH 7.0为木瓜蛋白酶最佳酶解pH。

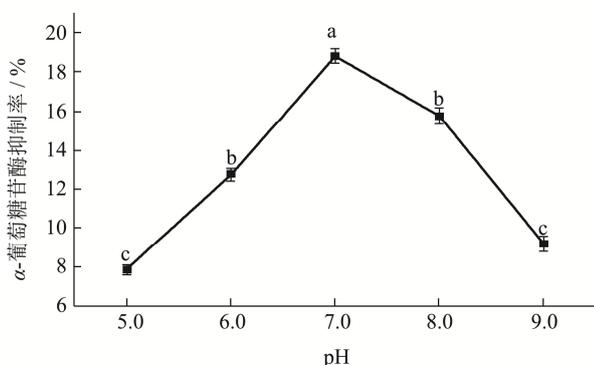


图2 pH对酶解产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.2 Effect of pH on the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of hydrolysates

### 2.2.2 酶解温度对酶解产物抑制活性的影响

当温度在40~55 $^{\circ}\text{C}$ 之间时,酶解产物的 $\alpha$ -葡萄糖

苷酶抑制率与温度的升高呈正相关,并在55 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值,继续升高温度则抑制率呈现下降趋势(图3)。可能是由于温度过高,酶分子吸收了过多的能量,使得维持酶分子结构的肽键断裂,导致酶的构型发生改变,进一步导致酶变性失活,从而影响了酶解速率<sup>[29]</sup>。因此,55 $^{\circ}\text{C}$ 为最适酶解温度。

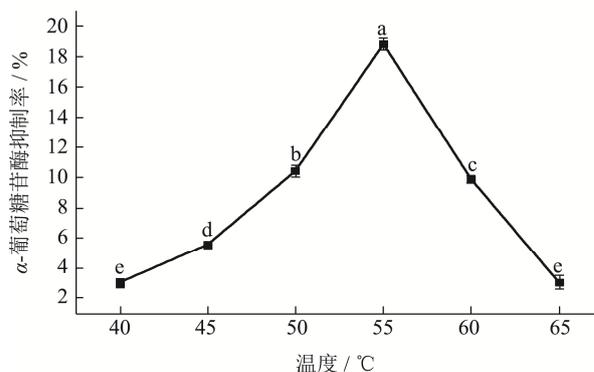


图3 温度对酶解产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of hydrolysates

### 2.2.3 酶解时间对酶解产物抑制活性的影响

整个反应阶段,酶解产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性呈现先逐渐升高,6h时达到顶点值,随后降低的趋势,(图4)。在0~6h时,蛋白酶不断切割目标肽键,隐藏于蛋白序列内部的活性肽段被逐步释放<sup>[30]</sup>,因而,酶解产物所具备的抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性呈现逐步上升趋势。而在酶解6h后,酶解产物的抑制效果显著性降低,原因可能是,酶解时间过长,原本具有功能活性的肽段受到了蛋白酶的进一步切割,从而破坏了肽序列的结构,进而导致了酶解产物的抑制活性大大降低。因此,6h为最佳木瓜蛋白酶最佳酶解时间。

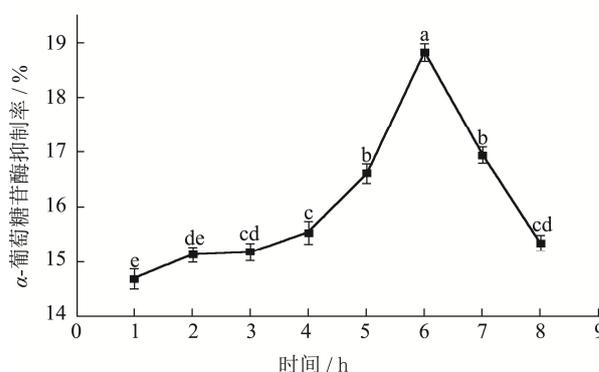


图4 反应时间对酶解产物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.4 Effect of reaction time on the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of hydrolysates

### 2.2.4 底物浓度对酶解产物抑制活性的影响

底物浓度在4.0%时,产物的抑制活性达到最高点,当底物浓度大于4.0%后,抑制率反而呈下降趋势

(图5)。可能的原因是,在整个酶解体系中,木瓜蛋白酶添加量固定,当底物浓度过高时,酶的含量不足以与底物充分接触,进而无法发挥较高的酶切作用<sup>[28]</sup>,甚至可能出现酶活性钝化的现象。因而,4.0%为最佳底物添加浓度。

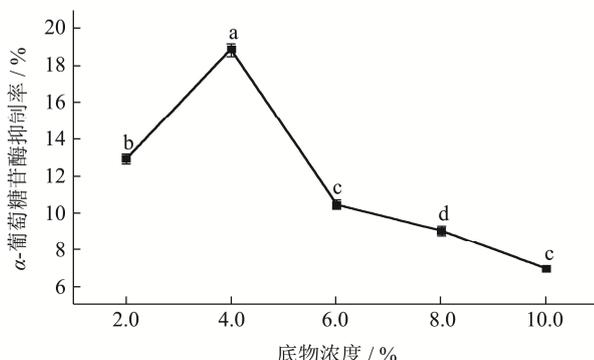


图5 底物浓度对酶解产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.5 Effect of substrate concentrations on the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of hydrolysates

### 2.2.5 加酶量对酶解产物抑制活性的影响

加酶量为 6000 U/g 时,酶解产物的抑制活性达到最高点,高于 6000 U/g 时,抑制活性反而下降(图6)。这可能是因为加酶量在过高时,生成的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物被酶过度切割,从而导致酶解物的抑制活性降低。因此,选择最佳加酶量为 6000 U/g。

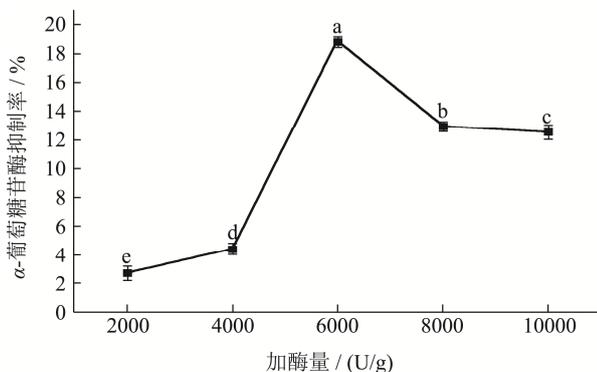


图6 加酶量对酶解产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.6 Effect of enzyme amount on the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of hydrolysates

## 2.3 酶解工艺条件优化

### 2.3.1 Box-Behnken 试验结果

结合制备 AGIH 所筛选的试验结果,响应值为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,对 pH 值、温度、加酶量和底物浓度进行考察,通过 Box-Behnken 试验进一步优化酶解条件,使其具备较高的制备效率和工业应用价值。具体试验方案及结果如表 4 所示。

### 2.3.2 Box-Behnken 试验结果方差分析

利用 Design expert 软件对表 4 数据进行多元回归

拟合,得到响应值 Y 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为响应关键因素的二次多项回归模型为:  $Y=17.85+0.30A-0.39B+0.96C-0.39D-0.025AB+0.071AC+0.24AD-0.075BC-0.057BD-0.050CD-1.96A^2-2.64B^2-1.10C^2-1.44D^2$

回归模型方差分析结果如表 5 所示。该回归方程的决定系数为 0.9481,表明采用该回归模型能够反映整个酶解过程中 94.81%的变化,因而该回归模型具有较高的准确度。且  $p<0.0001$ ,表明该模型是极显著的。一次项中, C 影响极显著, B、D 影响显著,二次项中,  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  影响极显著,而交互项的影响相对较小。各因素对酶解所得 AGIH 的活性影响的大小各不相同,具体表现为:  $X_C>X_D>X_B>X_A$ ,即加酶量>底物浓度>温度>pH。

表 4 Box-Behnken 响应面分析试验设计及结果

Table 4 The design and results of the Box-Behnken experiment

实验号	A	B	C	D	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率/%
1	-1	0	1	0	13.18
2	0	0	0	0	18.82
3	1	-1	0	0	13.63
4	0	0	0	0	16.82
5	1	0	1	0	14.23
6	0	0	0	0	18.13
7	0	0	-1	1	9.34
8	0	1	-1	0	8.97
9	-1	-1	0	0	13.33
10	-1	1	0	0	12.05
11	0	0	0	0	17.94
12	1	0	0	1	14.71
13	0	1	0	1	13.47
14	0	0	0	0	17.54
15	0	1	1	0	12.58
16	1	1	0	0	12.25
17	0	-1	0	-1	14.52
18	0	1	0	-1	14.03
19	0	0	1	1	12.96
20	-1	0	0	1	13.45
21	1	0	0	-1	15.26
22	0	-1	0	1	14.19
23	-1	0	-1	0	9.63
24	1	0	-1	0	10.11
25	0	0	1	-1	14.03
26	0	-1	1	0	13.26
27	-1	0	0	-1	14.97
28	0	0	-1	-1	10.01
29	0	-1	-1	0	9.05

表 5 回归模型方差分析

Table 5 Significance test of the regression model

方差来源	自由度	平方和SS	均方MS	F值	Pr>F	显著性
模型	14	202.01	14.43	37.53	<0.0001	**
A	1	1.07	1.07	2.78	0.1178	
B	1	1.79	1.79	4.65	0.0490	*
C	1	44.58	44.58	115.97	<0.0001	**
D	1	1.84	1.84	4.79	0.461	*
AB	1	2.05E-03	2.05E-03	0.01	0.9369	
AC	1	0.08	0.08	0.21	0.6528	
AD	1	0.24	0.24	0.61	0.4471	
BC	1	0.09	0.09	0.23	0.6360	
BD	1	0.01	0.01	0.03	0.8555	
CD	1	0.04	0.04	0.10	0.7518	
A <sup>2</sup>	1	24.89	24.89	64.73	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	1	45.29	45.29	117.82	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	1	125.01	125.01	325.16	<0.0001	**
D <sup>2</sup>	1	13.47	13.47	35.05	<0.0001	**
残差	14	5.38	0.38			
失拟差	10	3.20	0.32	0.59	0.7757	
纯误差	4	2.18	0.55			
总和	28	207.39				

注：“\*”表示影响显著 ( $p<0.05$ )，“\*\*”表示影响极显著 ( $p<0.01$ )。

### 2.3.3 响应面分析及最佳酶解工艺条件的确定

酶解产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率对 pH (A)、温度 (B)、加酶量 (C)、底物浓度 (D) 的响应见图 7~图 12。

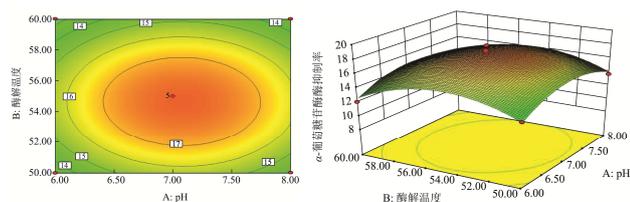


图 7 pH 与温度的交互作用影响的响应曲面和等高线图

Fig.7 Response and contours of inhibition rates versus pH and temperature

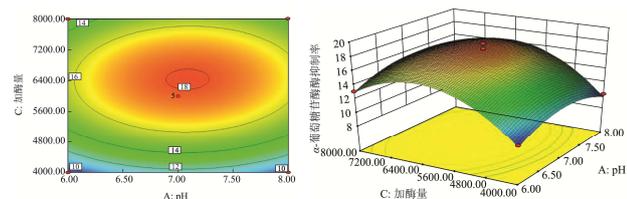


图 8 pH 与加酶量的交互作用影响的响应曲面和等高线图

Fig.8 Response and contours of the inhibition rates versus pH and papain amount

利用 Design Expert 8.0.5 软件对工艺条件进行优化,得到的苦杏仁 AGIH 的最佳酶解条件为:底物浓

度 3.73%,加酶量 6447.15 U/g, pH 7.08, 温度 54.61 °C; 在此条件下,产物抑制活性的预测值为 18.12%。实际操作过程中酶解设备往往不具备极高的分辨率,因而将上述最佳工艺条件修正为:底物浓度 4.0%,加酶量 6000 U/g, pH 7.0, 温度 55 °C。通过多次平行实验对其结果进行验证,得出酶解产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率为 18.10%,与模拟预测值十分接近。将此条件下得到的酶解液冻干复配后,测得其 IC<sub>50</sub> 值为 17.66 mg/mL。王晟等<sup>[8]</sup>利用木瓜蛋白酶酶解山杏仁蛋白同样制得了  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物,其抑制率和 IC<sub>50</sub> 值分别为 14.22%、80 mg/mL,与本研究相比,抑制率低 3.90%、IC<sub>50</sub> 值高 62.34 mg/mL,可见,本研究制备的 AGIH 具有更高的抑制活性。

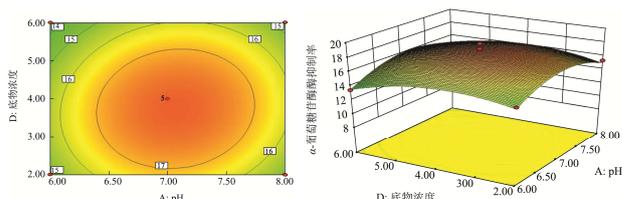


图 9 pH 与底物浓度的交互作用影响的响应曲面和等高线图

Fig.9 Response and contours of the inhibition rates versus pH and substrate concentration

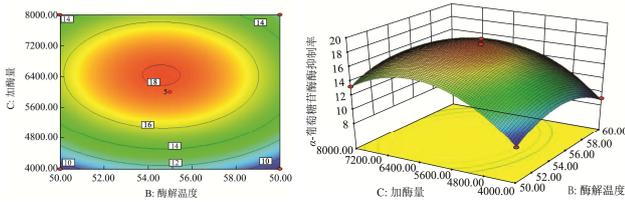


图 10 温度与加酶量的交互作用影响的响应曲面和等高线图

Fig.10 Response and contours of the inhibition rates versus temperature and papain amount

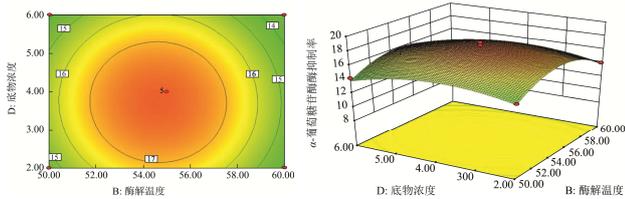


图 11 温度与底物浓度的交互作用影响的响应曲面和等高线图

Fig.11 Response and contours of the inhibition rates versus temperature and substrate concentration

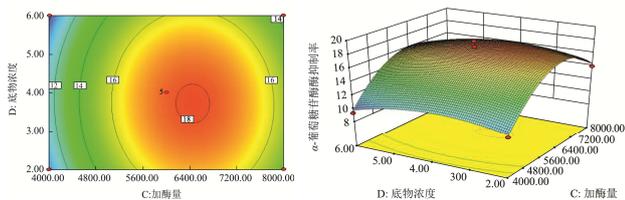


图 12 加酶量与底物浓度的交互作用影响的响应曲面和等高线图

图

Fig.12 Response and contours of the inhibition rates versus papain amount and substrate concentration

## 2.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解物的稳定性分析

### 2.4.1 热稳定性

当将酶解液置于 37 °C 环境时, AGIH 的抑制活性的保留率为 97.89%, 当环境温度为 50、70、90、121 °C 时, AGIH 活性有所降低, 且温度越高, 抑制率越低, 最低的为 121 °C, 但此时 AGIH 的抑制活性的保留率为 90.17% (图 13), 表明 AGIH 有较好的热稳定性。

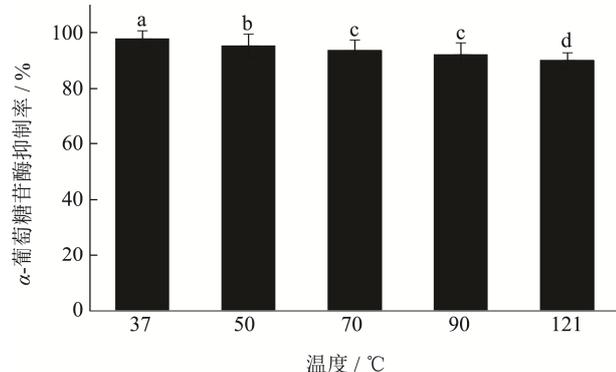


图 13 温度对 AGIH 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

Fig.13 The effect of temperature on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of AGIH

### 2.4.2 pH 稳定性

当酶解液的 pH 值为 7.0 时, AGIH 的抑制率几乎保持不变, 抑制活性高保留率为 98.80% (图 14)。而在 pH 1.0 和 pH 11.0 时, AGIH 的抑制效果最低, 保留率分别为 81.45% 和 83.02%。可见, 强酸和强碱条件会在一定程度上破坏酶解物的功能活性, 甚至使酶解物结构发生降解<sup>[31]</sup>。而 AGIH 的活性在 pH 3.0~9.0 范围内较为稳定, 表明 AGIH 具有较好的 pH 稳定性。

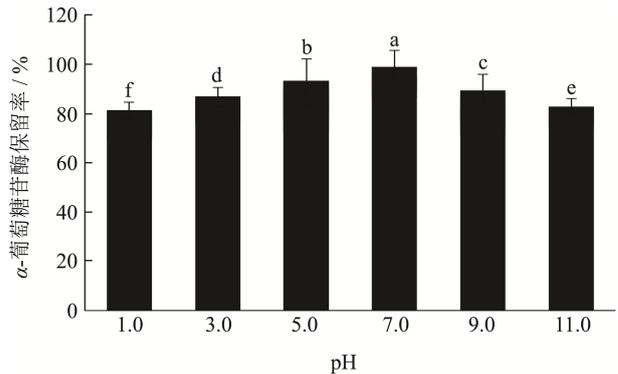


图 14 pH 对 AGIH 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

Fig.14 The effect of pH on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of AGIH

### 2.4.3 体外模拟胃肠道消化稳定性

在模拟消化过程中, AGIH 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果会发生一定程度的改变。在模拟胃阶段时, AGIH 的抑制活性保留率为 75.29%, 而在模拟肠道阶段时, AGIH 的抑制活性保留率有所上升, 为原来的 82.24% (图 15)。这说明酶解物在这两种酶的作用下一定程度上被降解<sup>[32,33]</sup>, 在胃消化后, 可能产生了一些新的活性酶解物, 这些酶解物具有较高的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性, 因此在进入肠道消化后, 抑制率有所上升。因此, 可以认为 AGIH 可以抗胃肠道消化。

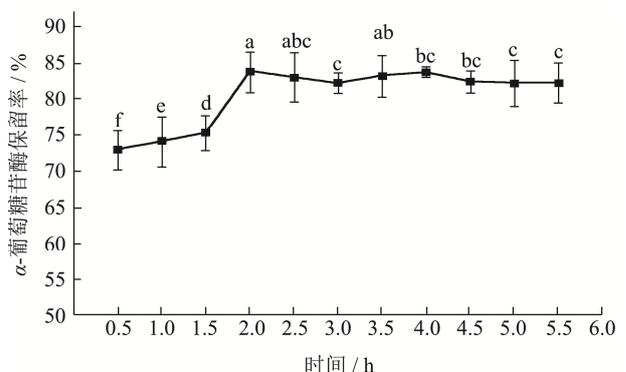


图 15 体外消化对 AGIH 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

Fig.15 The effect of in vitro gastrointestinal digestion on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of AGIH

## 3 结论

基于苦杏仁醇溶蛋白制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制酶解

物的最佳工艺条件为:底物浓度 4.0% ( $m/V$ ), 加酶量 6000 U/g, 酶解温度 55 °C, 酶解 pH 7.0, 酶解时间 6 h。此时得到的 AGIH 的抑制率为 18.10%,  $IC_{50}$  值为 17.66 mg/mL。AGIH 在极端高温、低 pH、高 pH 或胃肠道模拟消化条件下, 其抑制活性保留率较高, 具有较好的稳定性。本研究制备的苦杏仁酶解物因其  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用, 通过后续分离纯化、结构鉴定、功效学评价, 可望在天然降血糖保健食品或者药物开发方面得到应用。

## 参考文献

- [1] Expert Group of Metformin in Clinical Practice. Chinese expert consensus statement on metformin in clinical practice [J]. Chinese Medical Journal, 2020, 133: 1445-1447
- [2] Xu Y, Wang L M, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. The Journal of the American Medical Association, 2013, 310(9): 948-958
- [3] Ely E K, Gruss S M, Luman E T, et al. A national effort to prevent type 2 diabetes: participant-level evaluation of CDC's national diabetes prevention program [J]. Diabetes Care, 2017, 40(10): 162-169
- [4] 朱作艺, 张玉, 王君虹, 等. 蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 45-50, 57  
ZHU Zuoyi, ZHANG Yu, WANG Junhong, et al. Study on preparation, hypoglycemic and antioxidative activity of peptide from royal jelly protein [J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(17): 45-50, 57
- [5] 张灿, 吴彩娥, 范龚健, 等. 酶解银杏蛋白制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 137-141  
ZHANG Can, WU Caie, FAN Gongjian, et al. Preparation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides derived from *Ginkgo biloba* by enzymatic method [J]. Food & Machinery, 2016, 32(11): 137-141
- [6] 邓燕群. 牡蛎活性肽及其复合物降血糖作用的研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2015  
DENG Yanqun. Study on glycosidase inhibitory activity of oyster peptide and its compounds [D]. Shantou: Shantou University, 2015
- [7] 李艳敏, 郁书怀, 全艳军, 等. 裙带菜  $\alpha$ -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  
LI Yanmin, YU Shuhuai, TONG Yanjun, et al. Preparation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides derived from sea mustard [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 127-134
- [8] 王晟, 崔洁, 顾欣, 等. 木瓜蛋白酶制备山杏源降糖肽工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 169-173  
WANG Sheng, CUI Jie, GU Xin, et al. Optimization on preparation of hypoglycemic peptides from apricot (*Armeniaca sibirica*) hydrolyzed by papain [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(9): 169-173
- [9] 袁晓晴. 癩葡萄降血糖肽的制备及其降糖机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007  
YUAN Xiaoping. Study on the preparation and mechanism of hypoglycemic peptide from grape niacin [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007
- [10] 包美丽. 马鹿茸降血糖肽的制备及性质研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017  
BAO Meili. Preparation and properties of hypoglycemic peptides from red deer (*Cervus elaphus*) antlers [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017
- [11] 赵红星. 降血糖活性肽制备及抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性肽纯化与鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018  
ZHAO Hongxing. Preparation of hypoglycemic active peptides and purification and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018
- [12] 李大文. 苦杏仁蛋白提取工艺研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013  
LI Dawen. The study of bitter almond protein extraction technology [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2013
- [13] 李科友, 史清华, 朱海兰, 等. 苦杏仁氨基酸的营养评析[J]. 林业科技开发, 2001, 15(4): 23-24  
LI Keyou, SHI Qinghua, ZHU Hailan, et al. Nutritional evaluation of amino acids in bitter almond [J]. Journal of Forestry Engineering, 2001, 15(4): 23-24
- [14] 李科友, 史清华, 朱海兰, 等. 苦杏仁主要营养成分研究[J]. 西北农业学报, 2003, 12(2): 119-121  
LI Keyou, SHI Qinghua, ZHU Hailan, et al. Study on main nutrient compositions of bitter almond [J]. Acta Agricultural Boreali-occidentalis Sinica, 2003, 12(2): 119-121
- [15] 温馨. 抑制人结肠癌细胞生长的苦杏仁蛋白提取[D]. 北京: 北京林业大学, 2012  
WEN Xin. Extraction of apricot kernel protein inhibiting human colon adenocarcinoma cell growth [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012
- [16] 正亚军, 郝利平. 杏仁蛋白质的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 208-210  
ZHENG Yajun, HAO Liping. Research and advances of bitter almond [J]. Food Research and Development, 2006,

- 27(11): 208-210
- [17] 薛蕾. 苦杏仁蛋白及抗氧化活性肽制备工艺研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012  
XUE Lei. Study on preparation of bitter almond protein and antioxidative oligopeptides [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2012
- [18] El Aal M H, Hamza M A, Rahma E H. *In vitro* digestibility, physicochemical and functional properties of apricot kernel proteins [J]. Food Chemistry, 1986, 19(3): 197-211
- [19] Moussa M M, Abobakr T M. Evaluation of apricot kernel proteins [J]. Alexandria Journal of Agricultural Research, 1980, 28: 133
- [20] Venkatachalam M, Teuber S S, Sathe S K, et al. Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(12): 3544-3548
- [21] 张帆. 苦杏仁蛋白提取及其对人结肠腺癌细胞生长影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2011  
ZHANG Fan. Extraction and effect on human colon adenocarcinoma cell growth of apricot kernel protein [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011
- [22] 盛小娜, 王璋, 许时婴. 甜杏仁蛋白的功能和结构的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 33(5): 133-136  
SHENG Xiaona, WANG Zhang, XU Shiyong. Study on functional properties and structure of sugary almond protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 33(5): 133-136
- [23] Nissen J A. Enzymatic Hydrolysis of Food Protein [M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986
- [24] Boath A S, Stewart D, McDougall G J. Berry components inhibit  $\alpha$ -glucosidase *in vitro*: synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 929-936
- [25] Raju B C, Tiwari A K, Kumar J A, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010, 18(1): 358-365
- [26] Wu J, Ding X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375
- [27] 顾欣, 崔洁, 李迪, 等. 山杏仁蛋白源  $\alpha$ -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): 116-120  
GU Xin, CUI Jie, LI Di, et al. Separation, purification, and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from apricot kernel protein [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(8): 116-120
- [28] 刘萍, 陈黎斌, 杨严俊. 酶解玉米蛋白制备降血压肽的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(5): 117-122  
LIU Ping, CHEN Libin, YANG Yanjun. Study on preparation of antihypertensive peptide by enzymatic hydrolysis corn protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(5): 117-122
- [29] 余敏, 黄晶晶, 付瑞燕, 等. 响应曲面法优化酶解豆粕蛋白制备降糖肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 108-113  
YU Min, HUANG Jingjing, FU Ruiyan, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of hypoglycemic peptide from soybean meal protein by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 108-113
- [30] 侯雅坤, 王晟, 黄昆, 等. 核桃蛋白酶解工艺优化与酶解液抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 99-103, 107  
HOU Yakun, WANG Sheng, HUANG Kun, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of walnut protein and study on antioxidant activities of its hydrolysate [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(4): 99-103, 107
- [31] Yu, Dalsgaard, Trine, et al. Separation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine connective tissue and their stability towards temperature, pH and digestive enzymes [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(5): 1234-1243
- [32] 江明珠. 超声波预处理辅助酶解制备大豆降糖肽及其作用机理[D]. 南京: 江苏大学, 2018  
JIANG Mingzhu. Preparation and hypoglycemic mechanism of soybean peptides by ultrasonic pretreatment with enzymatic hydrolysis [D]. Nanjing: Jiangsu University, 2018
- [33] Rahimi P, Hosseini E, Rousta E, et al. Digestibility and stability of ultrasound-treated fish oil emulsions prepared by water-soluble bitter almond gum glycosylated with caseinate [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 148: 111697