

具 α -葡萄糖苷酶抑制作用的蚕豆蛋白酶解物的制备

王 洁¹, 陈思佳¹, 高 哲², 丁 轲¹, 韩 涛¹

(1. 北京农学院 食品科学与工程学院, 北京 102206; 2. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071000)

摘要:以蚕豆为原料,通过碱溶酸沉法得到蚕豆蛋白,再通过酶解制备具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用的蚕豆蛋白酶解物。以 α -葡萄糖苷酶抑制率与水解度为指标,考察蛋白酶种类、酶解温度、酶解 pH、料液比、加酶量与酶解时间对蚕豆蛋白酶解的影响,在此基础上采用响应面法对工艺参数进行优化。结果表明:酶解蚕豆蛋白制备具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用酶解物的最优工艺条件为以碱性蛋白酶为最适用酶、酶解温度 50 °C、酶解 pH 8.5、酶解时间 4.3 h、料液比 1:10、加酶量 14 000 U/g,在此条件下酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率为 $(38.58 \pm 0.87)\%$,蛋白水解度为 22.87%。

关键词:蚕豆蛋白;酶解; α -葡萄糖苷酶抑制作用

中图分类号:TS201.2; TS214.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)09-0028-05

Preparation of *Vicia faba* proteolysate with α -glucosidase inhibition

WANG Jie¹, CHEN Sijia¹, GAO Zhe², DING Ke¹, HAN Tao¹

(1. College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract: *Vicia faba* protein was prepared from *Vicia faba* by alkaline solution and acid precipitation method, then enzymolyzed to prepare *Vicia faba* proteolysate with α -glucosidase inhibition. The effects of protease type, enzymolysis temperature, enzymolysis pH, solid-liquid ratio, enzyme dosage and enzymolysis time on the enzymatic hydrolysis of *Vicia faba* protein were investigated using α -glucosidase inhibition rate and hydrolysis degree as indicators. Then the process conditions of preparing proteolysate with α -glucosidase inhibition from *Vicia faba* protein were optimized by response surface methodology. The results showed that the optimal conditions of preparing *Vicia faba* proteolysate with α -glucosidase inhibition from *Vicia faba* protein were obtained as follows: with alkaline protease as enzyme, enzymolysis temperature 50 °C, enzymolysis pH 8.5, enzymolysis time 4.3 h, solid-liquid ratio 1:10, enzyme dosage 14 000 U/g. Under the optimal conditions, the α -glucosidase inhibition rate of the proteolysate was $(38.58 \pm 0.87)\%$, and the hydrolysis degree of *Vicia faba* protein was 22.87%.

Key words: *Vicia faba* protein; enzymolysis; α -glucosidase inhibition

糖尿病作为长期代谢性疾病,2017 年全球患者已达 4.15 亿^[1],且呈逐年增加趋势。 α -葡萄糖苷酶抑制类药物是控制高血糖的方法之一,但对药物控制的副作用存疑较多。人们尝试从天然物质中提取具有降血糖的活性成分用于替代药物。研究表明,从牦牛乳^[2]、麦芽^[3]、女贞子^[4]、汉麻籽粕^[5]、白

蛋白^[6]、海洋胶原肽^[7]、红豆叶^[8]、牛奶^[9]等中可提取出具有降血糖的活性成分,其通过抑制碳水化合物分解为葡萄糖的酶的活性,而有助于控制糖尿病与减少并发症^[10-12],但由于来源少、提取率低、成本高等问题,仅少部分有产品问世,许多仍在探索中。还有研究表明,来自豆类中的肽可用于阻断与糖尿病有关的酶^[13]。大豆^[14]、鹰嘴豆^[15]、白芸豆^[16]等多种豆类显示了抑制 α -葡萄糖苷酶、二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 或 α -淀粉酶的作用。

在我国,豆类来源广泛。与其他豆类相比,蚕豆

收稿日期:2020-11-03;修回日期:2021-06-08

作者简介:王 洁(1995),女,在读硕士,研究方向为食品加工与安全(E-mail) wangjie19950529@163.com。

通信作者:韩 涛,教授(E-mail) taohan00@163.com。

(*Vicia faba* L.)蛋白质含量平均高达30.7%^[17],且氨基酸种类多。已有研究发现,蚕豆具有改善高血压的作用^[18],其蛋白酶解物具有体外抗氧化^[19]、降胆固醇^[20]等功能特性,而其是否具有降血糖功能尚未见报道。

食物来源的蛋白酶解物及肽类具有易吸收、溶解度高、安全性好及消费者认可度高等特点,是功能性产品的重要组成部分。本研究以蚕豆为原料, α -葡萄糖苷酶抑制率为评价指标,水解度为参考指标,探讨不同因素(酶种类、酶解温度、酶解pH、料液比、加酶量与酶解时间)对蚕豆蛋白酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率和蛋白水解度的影响,优化蚕豆蛋白酶解工艺参数,为降血糖蚕豆蛋白肽相关新产品的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蚕豆,市售;碱性蛋白酶(200 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、中性蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(20 U/mg),北京索莱宝科技有限公司; α -葡萄糖苷酶,美国Sigma试剂公司;4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷,河北百灵威超精细材料有限公司;其他试剂均为分析纯。

FW135型粉碎机;HWCL-3集热式恒温磁力搅拌浴;FE28型pH计,上海梅特勒托利多仪器有限公司;BS224S型电子分析天平;5810R台式离心机,德国艾本德股份公司;T6型新世纪紫外可见分光光度计;DHG-9036A型电热恒温鼓风干燥箱。

1.2 试验方法

1.2.1 蚕豆蛋白的提取

取一定量蚕豆在水中浸泡、剥皮,干燥后粉碎,过0.25 mm(60目)筛后,称取适量蚕豆粉加水溶解,调节pH至8.0,50℃浸提20 min,离心,收集滤液,调节pH至4.2,静置30 min,收集沉淀物,调pH至中性,于-18℃冷冻干燥得蚕豆蛋白,备用。

1.2.2 蚕豆蛋白的酶解

称取5 g蚕豆蛋白,用pH 8.0的磷酸盐缓冲液溶解并调节pH,添加适量蛋白酶于一定温度下搅拌酶解一定时间,期间通过滴加NaOH溶液使反应体系pH恒定,记录滴加NaOH溶液体积以计算水解度。沸水浴灭酶,调pH至中性,离心得到酶解物。

1.2.3 指标的测定

水解度采用pH-stat法^[21]进行测定。

α -葡萄糖苷酶抑制率的测定参照李昱菲^[15]的方法。具体为:用pH 6.8磷酸盐缓冲液配制0.1 U/mL的 α -葡萄糖苷酶溶液和0.003 mol/L

的4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液。分别加入0.5 mL磷酸盐缓冲液、样品溶液及0.003 mol/L的4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液于试管中混合搅拌均匀,在37℃恒温水浴10 min,加入0.5 mL α -葡萄糖苷酶溶液并保持40 min后,加入1.5 mL 0.2 mol/L的碳酸钠溶液终止反应,测定反应溶液在405 nm的吸光度。用0.5 mL蒸馏水作空白试验。按式(1)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率(y)。

$$y = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 、 A_2 分别为样品组和空白组在405 nm处吸光度。

1.2.4 数据处理

用Origin 2018pro和Design-Expert 12.0软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 酶的筛选

分别以中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶为酶解用酶,按1.2.2方法,在料液比1:20、各蛋白酶最适pH与温度(见表1)、加酶量10 000 U/g、反应时间16 h条件下进行蚕豆蛋白的酶解,测定蚕豆蛋白酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率和蚕豆蛋白的水解度,结果见图1。

表1 4种蛋白酶的最适反应条件

酶	温度/℃	pH
胰蛋白酶	37	8.0
碱性蛋白酶	45	9.0
中性蛋白酶	45	7.0
风味蛋白酶	50	7.0

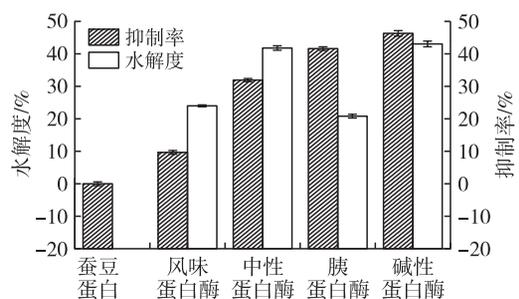


图1 不同蛋白酶对蚕豆蛋白水解度及酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

由图1可看出,蚕豆蛋白本身不具有抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,采用蛋白酶酶解后,其酶解物具有明显的抑制 α -葡萄糖苷酶作用,4种蛋白酶对蚕豆蛋白酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率大小排序为碱性蛋白酶>胰蛋白酶>中性蛋白酶>风味蛋白酶。4种蛋白酶的蚕豆蛋白水解度也存在一定差

异,且与 α -葡萄糖苷酶抑制率大小顺序不一致。

不同蛋白酶的蚕豆蛋白酶解物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率表现较大差异,可能与不同蛋白酶切位点位置不同有关^[22]。碱性蛋白酶和胰蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶家族,碱性蛋白的主要酶切位点是Ala-、Leu-、Val-等,胰蛋白酶的主要酶切位点是Arg-、Lys-,属于极性碱性氨基酸,而Ala-、Leu-、Val-属于非极性脂肪族氨基酸,比较对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,预示酶解物可能是呈中性的小分子肽。

综上,本研究选取碱性蛋白酶作为蚕豆蛋白的酶解用酶。

2.2 蚕豆蛋白酶解的单因素试验

2.2.1 酶解温度对蚕豆蛋白酶解的影响

在料液比 1:20、加酶量 10 000 U/g、酶解 pH 10.0、酶解时间 8 h 条件下,探讨不同酶解温度对蚕豆蛋白酶解的影响,结果见图 2。

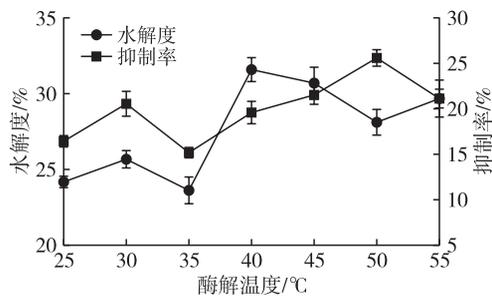


图 2 不同酶解温度对蚕豆蛋白水解度及酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

由图 2 可看出,在 25 ~ 50 °C 范围内,随酶解温度的升高,酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈波动增加趋势,在 50 °C 时达到峰值,50 °C 后继续升高酶解温度,酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率下降。随酶解温度升高水解度呈波动变化趋势。碱性蛋白酶的最适温度为 40 ~ 50 °C,高于或低于此温度范围,酶活性减弱,影响产物的活性。综合 α -葡萄糖苷酶抑制率与蛋白水解度,选择 50 °C 作为本研究的合适酶解温度。

2.2.2 酶解 pH 对蚕豆蛋白酶解的影响

在料液比 1:20、酶解温度 50 °C、加酶量 10 000 U/g、酶解时间 8 h 条件下,探讨不同酶解 pH 对蚕豆蛋白酶解的影响,结果见图 3。

由图 3 可看出,随酶解 pH 的增大,酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈先升后降的趋势,在酶解 pH 8.5 时达到峰值。蚕豆蛋白水解度也呈先上升后下降趋势。以 α -葡萄糖苷酶抑制率作重要考量,参考水解度,选择 pH 8.5 作为本研究的合适酶解 pH。

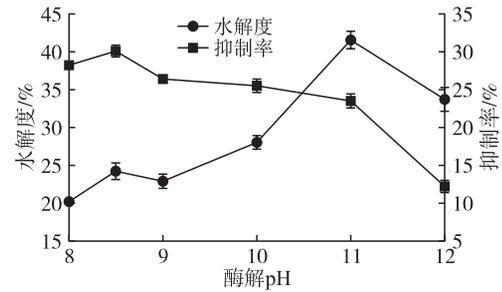


图 3 不同酶解 pH 对蚕豆蛋白水解度及酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

2.2.3 加酶量对蚕豆蛋白酶解的影响

在料液比 1:20、酶解温度 50 °C、酶解 pH 8.5、酶解时间 8 h 条件下,探讨不同加酶量对蚕豆蛋白酶解的影响,结果见图 4。

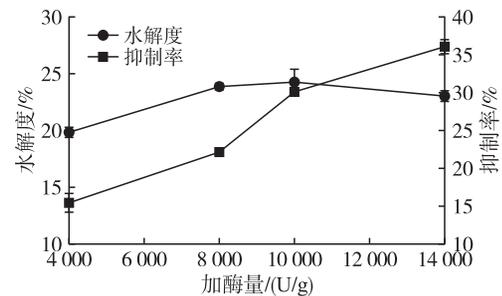


图 4 不同加酶量对蚕豆蛋白水解度及酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

由图 4 可看出:随加酶量的增加,酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈明显大幅上升趋势;水解度总体呈上升趋势,但是加酶量在 8 000 ~ 14 000 U/g 之间变化不大。 α -葡萄糖苷酶抑制率的上升可能是加酶量增加,使底物与酶分子结合的概率增大,反应充分所致。以 α -葡萄糖苷酶抑制率作重要考量,选择 14 000 U/g 作为本研究的合适加酶量。

2.2.4 料液比对蚕豆蛋白酶解的影响

在加酶量 14 000 U/g、酶解温度 50 °C、酶解 pH 8.5、酶解时间 8 h 条件下,探讨不同料液比对蚕豆蛋白酶解的影响,结果见图 5。

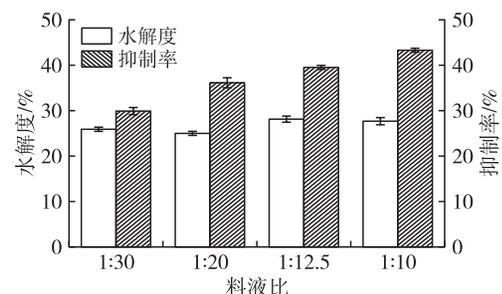


图 5 不同料液比对蚕豆蛋白水解度及酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

由图 5 可看出:随料液比的增加,酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率明显上升,在料液比为 1:10 时,

酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率达到最高;水解度随料液比的增加变化不明显。一般地,化学反应通常在合适浓度反应充分。以 α -葡萄糖苷酶抑制率作重要考量,选择1:10作为本研究的合适料液比。

2.2.5 酶解时间对蚕豆蛋白酶解的影响

在料液比1:10、酶解温度50℃、酶解pH 8.5、加酶量14 000 U/g条件下,探讨不同酶解时间对蚕豆蛋白酶解的影响,结果见图6。

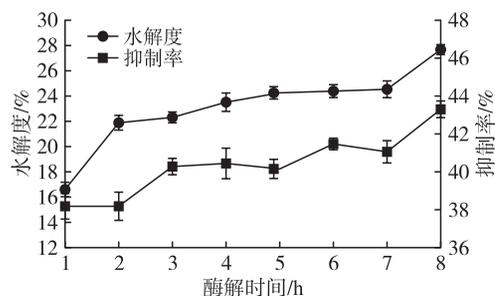


图6 不同酶解时间对蚕豆蛋白水解度及酶解物 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

由图6可看出,随酶解时间的延长, α -葡萄糖苷酶抑制率和蛋白水解度整体呈上升趋势,且4h后上升幅度不大。因此,综合实际应用和生产成本的考虑,选取4h作为本研究的合适酶解时间。

2.3 蚕豆蛋白酶解响应面优化试验

2.3.1 响应面试验设计与结果

基于单因素试验结果,利用Box-Behnken中心组合原理,控制加酶量为14 000 U/g、料液比为1:10,选择酶解温度、酶解pH、酶解时间为因素,以酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率(Y)为响应值,设计三因素三水平响应面优化试验,各组试验重复3次。响应面试验因素和水平见表2,响应面试验设计及结果见表3。

表2 响应面试验因素和水平

水平	A 酶解温度/℃	B 酶解 pH	C 酶解时间/h
-1	45	8.0	2
0	50	8.5	4
1	55	9.0	6

表3 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	Y/%
1	-1	-1	0	29.66
2	1	-1	0	30.71
3	-1	1	0	28.08
4	1	1	0	25.84
5	-1	0	-1	31.04
6	1	0	-1	30.83
7	-1	0	1	32.94

续表3

试验号	A	B	C	Y/%
8	1	0	1	31.48
9	0	-1	-1	30.88
10	0	1	-1	26.93
11	0	-1	1	31.56
12	0	1	1	33.26
13	0	0	0	39.56
14	0	0	0	42.30
15	0	0	0	39.56
16	0	0	0	39.84
17	0	0	0	40.94

利用Design-Expert 12.0对表2数据进行处理,得到回归方程为: $Y = 40.44 - 0.36A - 1.09B + 1.20C - 0.82AB - 0.31AC + 1.41BC - 5.48A^2 - 6.39B^2 - 3.39C^2$ 。

2.3.2 模型显著性分析结果(见表4)

表4 模型的显著性分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	417.26	9	46.36	31.28	<0.000 1	**
A	1.02	1	1.02	0.69	0.433 6	
B	9.46	1	9.46	6.38	0.039 4	*
C	11.42	1	11.42	7.71	0.027 4	*
AB	2.71	1	2.71	1.83	0.218 7	
AC	0.39	1	0.39	0.26	0.623 5	
BC	7.98	1	7.98	5.38	0.053 4	
A ²	126.32	1	126.32	85.22	<0.000 1	**
B ²	172.05	1	172.05	116.07	<0.000 1	**
C ²	48.45	1	48.45	32.69	0.000 7	**
残差	10.38	7	1.48			
失拟项	4.72	3	1.57	1.11	0.442 3	
纯误差	5.66	4	1.41			
总和	427.64	16				

注:** 差异极显著($P < 0.01$), * 差异显著($P < 0.05$); $R^2 = 0.975 7, R_{Adj}^2 = 0.944 5$ 。

由表4可知,模型 P 小于0.000 1,说明该模型回归极显著,失拟项 P 为0.442 3,不显著,且该模型 R^2 为0.975 7, R_{Adj}^2 为0.944 5,说明该模型拟合度良好。由 P 值可得3个因素对 α -葡萄糖苷酶抑制率影响大小排序为 $C > B > A$,即酶解时间 > 酶解pH > 酶解温度。

2.3.3 最佳工艺条件的确定

经响应面优化得最适酶解参数为酶解温度49.84℃、酶解pH 8.47、酶解时间4.33 h,预测 α -葡萄糖苷酶抑制率为40.58%。为了便于操作,将酶解参数调整为酶解温度50℃、酶解pH 8.5、酶解

时间4.3 h、料液比1:10、加酶量14 000 U/g,在此条件下进行6次平行试验,得到的酶解产物对 α -葡萄糖苷酶的平均抑制率为 $(38.58 \pm 0.87)\%$,与预测值接近,蚕豆蛋白水解度为22.87%。

碱性蛋白酶酶解鹰嘴豆蛋白制备的 α -葡萄糖苷酶抑制肽的抑制率达32.97%^[15],与非大豆类的鹰嘴豆相比,本研究得到的蚕豆蛋白酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制能力高出约17%。

3 结论

来源于食物原料的各种生物活性肽分子具有安全性高等特点,是未来生物活性药物和功能性产品开发的核心。本研究首次发现蚕豆蛋白酶解物在体外具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用,填补了蚕豆蛋白降血糖功能利用潜力的空白。通过对比常用的4种蛋白酶,发现碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白的酶解物具有最好的 α -葡萄糖苷酶抑制效果;在此基础上以 α -葡萄糖苷酶抑制率为考察指标,采用单因素试验和响应面优化得到最适的碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白的工艺条件为酶解温度50℃、酶解pH 8.5、酶解时间4.3 h、料液比1:10、加酶量14 000 U/g,在此条件下酶解物对 α -葡萄糖苷酶抑制率可达 $(38.58 \pm 0.87)\%$,蚕豆蛋白水解度为22.87%,相比于由鹰嘴豆蛋白制备的 α -葡萄糖苷酶抑制肽的抑制率(32.79%)有明显提升,说明蚕豆蛋白也可能适宜用来开发具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的产品,丰富了生物活性肽的原料来源,为蚕豆的精深加工提供了新思路和新途径。

本文初步确认了制备具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的蚕豆蛋白酶解物的工艺参数,酶解物对抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用机制、分子的结构特征、量效关系等尚待进一步探究。

参考文献:

[1] GONG X, JI M, XU J, et al. Hypoglycemic effects of bioactive ingredients from medicine food homology and medicinal health food species used in China[J]. Crit Rev Food, 2020, 60(14):2303-2326.

[2] 白函瑜, 宋佳佳, 宋珏, 等. 牦牛乳酪蛋白肽分离组分对DPP-4活性的抑制作用[J]. 食品科技, 2015, 40(8): 16-20.

[3] 沈佳奇. 麦芽根多肽制备及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.

[4] YU Z, GAO H, ZHANG Z, et al. Inhibitory effects of *Ligustrum robustum* (Roxb.) Blume 295 extract on α -amylase and α -glucosidase[J]. J Funct Food, 2015, 19: 204-213.

[5] 梁凯. 汉麻籽粕降血糖肽的酶法制备及其分离纯化

[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.

[6] YU Z, YIN Y, ZHAO W, et al. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase[J]. Food Chem, 2012, 135:2078-2085.

[7] 彭宏斌. 海洋胶原蛋白辅助降血糖和免疫营养功能的效果研究[D]. 北京: 北京大学, 2008.

[8] YONEMOTO R, SHIMADA M, GUNAWAN P, et al. α -Amylase inhibitory triterpene from *Abrus precatorius* leaves[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62:8411-8414.

[9] PRATLEY R, SALSALI A. Inhibition of DPP-4: a new therapeutic approach for the treatment of type 2 diabetes[J]. Current Med Res, 2007, 23:919-950.

[10] PATIL P, MANDAL S, TOMAR S, et al. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes[J]. Eur J Nutr, 2015, 54(6):863-880.

[11] 刘莹. α -葡萄糖苷酶活性检测及抑制剂筛选新方法研究[D]. 上海: 上海大学, 2015.

[12] SOMSAK L. Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase[J]. CR Chim, 2011, 14(2):211-223.

[13] URBANA I. Production, characterization and evaluation of anti-diabetes peptides from proteins of improved common bean cultivars using bioinformatic tools, enzymatic systems, and in vitro and in vivo models[D]. Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign, 2016.

[14] 赵红星. 降血糖活性肽制备及抑制 α -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.

[15] 李昱菲. 鹰嘴豆 α -葡萄糖苷酶抑制肽的酶法制备及其稳定性初探[D]. 新疆 石河子: 石河子大学, 2016.

[16] 杨明珠. 白芸豆中 α -淀粉酶抑制剂糖蛋白的提取纯化、组成结构及生物活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.

[17] 叶茵. 中国蚕豆学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.

[18] 申士富, 钱静, 刘廷, 等. 青海蚕豆中原花青素和左旋多巴的含量测定和品种间差异的比较[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(9): 36-40.

[19] 李雪芬, 韩涛, 夏晓楠, 等. 铜螯合亲和层析分离抗氧化活性蚕豆蛋白酶解物[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1): 119-124.

[20] 陈丹阳, 韩涛, 杜斌, 等. 酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化[J]. 中国油脂, 2018, 43(10): 46-52.

[21] 宋晓敏. 蚕豆蛋白的提取、功能特性及酶水解研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2013.

[22] 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]. 江苏 镇江: 江苏大学, 2018.