

酶法制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制肽的工艺优化

张晓瑞, 章绍兵

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:为促进花生蛋白资源的开发利用及发挥花生肽的降血糖作用,采用碱溶酸沉法制备花生蛋白,并利用不同商品蛋白酶水解花生蛋白制备花生肽。以 α -葡萄糖苷酶抑制率为评价指标,对蛋白酶进行了筛选。在此基础上,采用单因素试验和响应面试验对花生 α -葡萄糖苷酶抑制肽的制备工艺进行了优化。另外,考察了花生蛋白水解度和花生肽 α -葡萄糖苷酶抑制活性的相关性。结果表明:与其他商品蛋白酶相比,胰蛋白酶制备的花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性最高;酶法制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制肽的最优工艺条件为将花生蛋白于95℃加热5 min进行预处理,采用胰蛋白酶水解,水解时间62 min,加酶量8.9%,底物质量浓度4.1 g/100 mL,在最优条件下花生肽 α -葡萄糖苷酶抑制率达到(68.82 ± 0.24)%,此时花生蛋白的水解度为10.09%;水解度在8.0%~11.5%范围内与花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性呈显著正相关。综上,花生蛋白经胰蛋白酶水解后得到的花生肽对 α -葡萄糖苷酶具有显著的体外抑制活性。

关键词:花生肽;酶法; α -葡萄糖苷酶;水解度

中图分类号:TS222+.1;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)01-0043-07

Optimization of enzymatic preparation of peanut α -glucosidase inhibitory peptides

ZHANG Xiaorui, ZHANG Shaobing

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology,
Zhengzhou 450001, China)

Abstract: To promote the utilization of peanut protein resources and explore the hypoglycemic function of peanut peptides, peanut proteins were prepared by alkaline extraction and acid precipitation, and peanut peptides were prepared by hydrolysis of peanut protein using different commercial proteases. The proteases were screened using α -glucosidase inhibition rate as the evaluation index. On this basis, the preparation process of peanut α -glucosidase inhibitory peptides was optimized using single factor experiment and response surface methodology. In addition, the correlation between the hydrolysis degree of peanut protein and α -glucosidase inhibition rate was investigated. The results showed that the peanut peptides prepared by trypsin had the highest α -glucosidase inhibitory activity. The optimal conditions of enzymatic preparation of α -glucosidase inhibitory peptides were obtained as follows: pretreating peanut protein at 95℃ for 5 min, trypsin used for hydrolysis, hydrolysis time 62 min, enzyme dosage 8.9%, and substrate mass concentration 4.1 g/100 mL. Under these conditions, the α -glucosidase inhibition rate of peanut peptides reached (68.82 ± 0.24)%, and the hydrolysis degree was 10.09%. The α -glucosidase inhibitory activity of peanut peptides was significantly and positively correlated with the hydrolysis degree in the range of 8.0% - 11.5%. In conclusion, peanut peptides obtained after trypsin hydrolysis of peanut protein showed significant *in vitro* inhibitory activity against α -glucosidase.

Key words: peanut peptides; enzymatic method;
 α -glucosidase; hydrolysis degree

收稿日期:2022-07-27;修回日期:2023-08-26

作者简介:张晓瑞(1997),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术(E-mail)zhangxiaorui28@163.com。

通信作者:章绍兵,教授,博士(E-mail)shaobingzhang@126.com。

近年来花生蛋白的功能特性受到了极大关注,尤其是花生蛋白经过酶水解后会形成不同分子质量

的混合肽段,其具有比花生蛋白更好的生物活性。刘昭明等^[1]研究发现,花生蛋白肽的抗氧化活性与分子质量有很大关系,小分子质量的花生肽具有更高的抗氧化活性。张宇昊等^[2]研究发现,分子质量在 1 kDa 以下的花生肽对血管紧张素转化酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE)的抑制效果很好,可显著降低原发性高血压大鼠的尾动脉收缩压。Ye 等^[3]从花生蛋白中提取出了抗菌肽 Hypogin,其对花生分枝杆菌、尖孢镰菌等真菌的生长具有明显的抑制作用。

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种常见的代谢紊乱疾病,目前一些治疗糖尿病的药物对身体具有很大的副作用或者潜在危害^[4],因此探索具有降糖功能的天然物质来源成为研究热点。Chen 等^[5]研究发现,相比碱性茶多糖,水溶性茶多糖可以更好地降低糖尿病小鼠的血糖。李丽等^[6]研究发现,四氧嘧啶致糖尿病小鼠每天食用小麦麸膳食纤维,其空腹血糖指数明显降低。不同种类的蛋白经过酶水解得到的活性肽对 α -葡萄糖苷酶的活性也有抑制作用。张玉等^[7]研究发现,采用酸性蛋白酶水解蚕蛹蛋白,所得活性肽对 α -葡萄糖苷酶有较高的抑制率。顾欣等^[8]筛选出两种山杏仁蛋白酶水解后的活性肽,都可抑制 α -葡萄糖苷酶活性,并且对其进行结构分析得出两个有效的氨基酸序列分别是 Trp-Ala 和 Thr-Trp。许婷婷等^[9]研究发现,花生蛋白经过 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶水解后得到的活性肽对 α -葡萄糖苷酶活性有一定的抑制作用,但其并未比较不同商品蛋白酶水解产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,研究有待进一步深入。

本文采用胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶等多种商品蛋白酶制备花生肽,比较不同酶水解产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,优化酶法制备花生肽的工艺条件,分析花生蛋白水解度与花生肽 α -葡萄糖苷酶抑制活性之间的关系,以期为深入开发花生肽的降血糖作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

花生仁,购买于郑州市高新区永辉超市;胰蛋白酶、对硝基苯- α -D-葡萄糖苷(p -Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, p NPG),上海麦克林生化科技有限公司;Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶,丹麦诺维信有限公司;2709 碱性蛋白酶,北京索莱宝科技有限公司;中性蛋白酶、 α -葡萄糖苷酶,上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

TG1850-WS 型高速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;DT5-4B 型低速离心机,北京时代北利离心机有限公司;PHS-3C 型 pH 计,上海大普仪器有限公司;HH-2J 数显恒温水浴锅,上海维诚仪器有限公司;IGJ-10C 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;GL-20G-II 型冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;P9 型分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;Scientz-IID 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 花生蛋白的制备

采用碱溶酸沉法制备花生蛋白。先将花生仁用打浆机破碎,按照料液比 1:6 将花生浆与蒸馏水混匀,并将其 pH 调为 10.0,然后在恒温水浴振荡器中以 150 r/min 的转速振荡 30 min;取出溶液在低速离心机中以 4 000 r/min 的转速离心 15 min,弃油层后将上清液过滤;再将上清液的 pH 调为 4.5 进行酸沉,用蒸馏水洗涤沉淀,随后再以 4 000 r/min 的转速离心 10 min,弃去上清液保留沉淀,然后冷冻干燥得到花生蛋白。

1.2.2 花生肽的制备

1.2.2.1 花生蛋白预处理

配制一定质量浓度的花生蛋白溶液,在 95 °C 下分别加热 0、5、10、15、20 min 进行热处理;另外在热处理的基础上辅助超声处理,设置超声功率为 400 W,超声时间为 5 min。

1.2.2.2 蛋白酶水解制备花生肽

配制一定质量浓度的花生蛋白溶液,加入一定比例的蛋白酶进行水解,水解过程中控制体系的温度和 pH 为蛋白酶的最适条件,不断搅拌且用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液控制体系 pH 恒定。水解结束后将水解液置于 90 °C 的水浴锅中灭酶 15 min,冷却后于高速离心机中以 10 000 r/min 的转速离心 15 min,温度控制在 4 °C,对上清液进行过滤,冷冻干燥得到花生肽。

1.2.3 酶活的测定

商品蛋白酶的酶活按照 GB/T 23527—2009 中附录 B 福林法测定。

1.2.4 水解度的测定

在赵会^[10]的方法的基础上,采用 pH-Stat 法测定水解度,并稍作修改。蛋白质在水解过程中随着质子的释放,溶液的 pH 会迅速下降,此时加入 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液来维持 pH,通过加入的碱液体积可计算出水解度(D),其计算公式见式(1)。

$$D = \frac{C \times V}{\alpha \times m \times h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为NaOH溶液的浓度, mol/L; V 为消耗的NaOH溶液的体积, mL; α 为 α -氨基的解离度; m 为溶液中花生蛋白的质量, g; h_{tot} 为底物蛋白质中肽键总物质的量, mmol/g。花生蛋白的 $h_{\text{tot}} = 7.13$ (根据花生蛋白中氨基酸的组成计算得到^[11]), α 根据式(2)计算。

$$\alpha = \frac{10^{H-K_a}}{1 + 10^{H-K_a}} \quad (2)$$

式中: H 为水解体系的pH; K_a 为氨基的 pK_a 。 K_a 根据式(3)计算。

$$K_a = 7.8 + \frac{298 - T}{298T} \times 2400 \quad (3)$$

式中: T 为热力学温度, K。

1.2.5 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定

按照Kim等^[12]的方法测定 α -葡萄糖苷酶抑制率,并稍作修改。用0.2 mol/L, pH 6.8的磷酸钠缓冲液分别将 α -葡萄糖苷酶和pNPG配成0.2 U/mL、1 mg/mL的溶液。试验组分别加入500 μ L缓冲液、500 μ L pNPG溶液和500 μ L 2 mg/mL的样品溶液,然后置于37 $^{\circ}$ C的恒温水浴锅内预热5 min,取出立即加入100 μ L α -葡萄糖苷酶液启动反应,混匀,置于37 $^{\circ}$ C的水浴锅内30 min;然后立即加入800 μ L、1 mol/L的 Na_2CO_3 溶液终止反应,再采用分光光度计在405 nm波长下测定吸光值。试验另设置空白组、对照组和样品背景组:空白组只添加500 μ L的底物pNPG,其余用等量的缓冲液代替,以排除底物pNPG在预热过程中自发地转变成显色物4-硝基苯酚(p -Nitrophenol, PNP)这一干扰;对照组除了不加入样品溶液外其余都与试验组一样,肽液用等量的缓冲液代替,在相同条件下得到 α -葡萄糖苷酶和底物pNPG反应后生成显色物PNP的最高含量;样品背景组只加入样品溶液,其余用等量的蒸馏水代替。 α -葡萄糖苷酶抑制率(Y)按式(4)计算。

$$Y = \frac{A_c - (A_s - A_d)}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_b 为空白组吸光值; A_c 为对照组吸光值; A_s 为试验组吸光值; A_d 为样品背景组吸光值。

1.2.6 数据分析

所有试验至少重复两次,数据以“平均值 \pm 标准差”表示,使用IBM SPSS软件对数据进行方差分析($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的酶活

按1.2.3测定中性蛋白酶、胰蛋白酶、Alcalase2.4L碱性蛋白酶、2709碱性蛋白酶的酶活分别为 $7.59 \times$

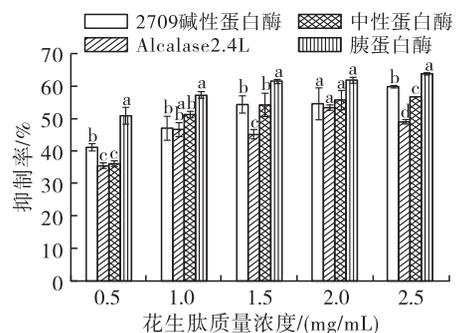
10^3 、 2.99×10^4 、 2.14×10^5 、 2.02×10^5 U/g。

2.2 蛋白酶的筛选

选取中性蛋白酶、胰蛋白酶、Alcalase2.4L碱性蛋白酶、2709碱性蛋白酶4种酶,在底物质量浓度5 g/100 mL、加酶量5% (以底物蛋白的质量计,下同)、各自最适温度和pH(见表1)条件下对未经预处理的花生蛋白进行水解,水解度为10%时停止反应,制备花生肽,并测定不同质量浓度花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率,结果见图1。

表1 不同蛋白酶水解的最适条件

蛋白酶	温度/ $^{\circ}$ C	pH
中性蛋白酶	40	7.0
胰蛋白酶	50	8.0
Alcalase2.4L碱性蛋白酶	55	8.0
2709碱性蛋白酶	50	8.5



注:不同字母代表组内具有显著性差异($p < 0.05$)

图1 不同蛋白酶对花生肽 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

本研究发现,花生蛋白不能抑制 α -葡萄糖苷酶的活性(数据未展示)。由图1可知,4种商品蛋白酶制备的花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性均具有浓度依赖性。花生蛋白被胰蛋白酶水解后的产物具有最高的 α -葡萄糖苷酶抑制活性;中性蛋白酶和2709碱性蛋白酶制备的花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性比较接近;Alcalase2.4L制备的花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性较差。试验进一步提高Alcalase2.4L碱性蛋白酶、2709碱性蛋白酶和中性蛋白酶水解产物的水解度,结果发现此时水解产物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性与10%水解度产物相比均有所降低,说明进一步提高水解度并不能提高花生肽的活性。江明珠^[13]通过对比不同酶水解大豆肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,筛选出了胰蛋白酶为最佳用酶,这与本文的研究结果相符。

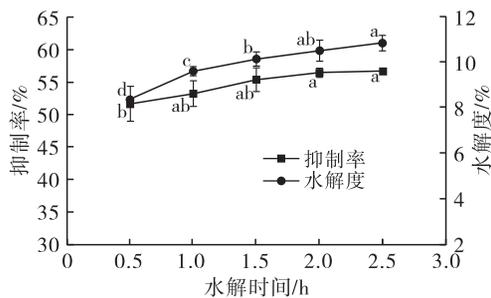
不同蛋白酶的水解产物抑制 α -葡萄糖苷酶活性的差异可能是由于酶切生成肽段的结构和数量不同引起的。Liu等^[14]研究表明,麦胚肽中精氨酸的含量极高,这可能是其抑制 α -葡萄糖苷酶活性的重要原因之一。另外,多肽链中赖氨酸和精氨酸残

基的羧基侧是胰蛋白酶的切割位点^[15],所以精氨酸残基主要存在于这些肽的C端,这可能也是胰蛋白酶水解产物具有更高 α -葡萄糖苷酶抑制活性的原因。因此,最终选择胰蛋白酶制备花生肽,并进一步优化其水解条件。

2.3 花生蛋白水解条件优化的单因素试验

2.3.1 水解时间的影响

采用胰蛋白酶水解未经预处理的花生蛋白,在底物质量浓度5 g/100 mL,加酶量5%条件下研究水解时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)对 α -葡萄糖苷酶抑制率及花生蛋白水解度的影响,结果如图2所示。



注:不同字母代表组间具有显著性差异($p < 0.05$)。下同
图2 水解时间对 α -葡萄糖苷酶抑制率和水解度的影响

由图2可知,随着水解时间的延长, α -葡萄糖苷酶抑制率逐渐升高,水解度与水解时间也呈现出正相关关系。在水解反应的前1.5 h内,胰蛋白酶与底物蛋白充分接触反应,使抑制 α -葡萄糖苷酶的活性肽段暴露出来,因此这一阶段水解度和 α -葡萄糖苷酶抑制率均呈增大趋势,当水解时间达到2.0 h时, α -葡萄糖苷酶抑制率最高(56.4%),之后随着水解时间的延长水解度和 α -葡萄糖苷酶抑制率均趋于稳定。这是因为随着水解反应的进行蛋白质大分子被分解成多肽和氨基酸的混合物,可被酶切的位点逐渐减少,同时酶与底物结合的中间产物和最终产物增多,这些对水解反应都有抑制效应^[16]。

2.3.2 加酶量的影响

采用胰蛋白酶水解未经预处理的花生蛋白,在水解时间2.0 h、底物质量浓度5 g/100 mL条件下研究加酶量(4%、5%、6%、7%、8%)对 α -葡萄糖苷酶抑制率及花生蛋白水解度的影响,结果如图3所示。

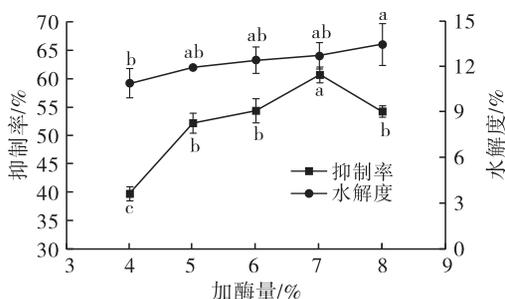


图3 加酶量对 α -葡萄糖苷酶抑制率和水解度的影响

由图3可知:底物浓度保持不变,加酶量越大花生蛋白被水解的程度越高,水解度一直呈上升趋势;而花生肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性并非随着加酶量的增加而增加,当加酶量为7%时 α -葡萄糖苷酶抑制率达到最高(58.5%),当加酶量进一步提高到8%时 α -葡萄糖苷酶抑制率反而下降。原因是当底物浓度固定,加酶量较少时,花生蛋白不能被完全水解,随着加酶量的增加底物蛋白被水解得越彻底,所以水解度逐渐上升直至达到平缓的水平;而适量的胰蛋白酶有利于具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽段的生成,而加酶量过高可能会使生成的高活性肽段进一步被水解成低活性或者没有活性的肽段,所以在加酶量超过7%后花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性降低^[17]。

2.3.3 底物质量浓度的影响

采用胰蛋白酶水解未经预处理的花生蛋白,在水解时间2.0 h、加酶量7%条件下研究底物质量浓度(3、4、5、6、7 g/100 mL)对 α -葡萄糖苷酶抑制率及花生蛋白水解度的影响,结果如图4所示。

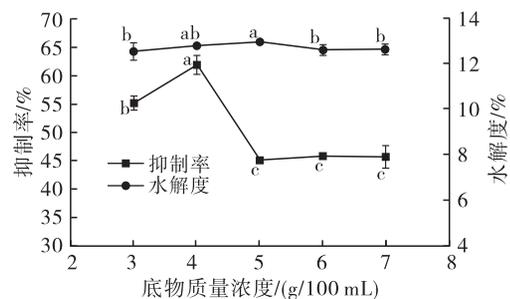


图4 底物质量浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制率和水解度的影响

由图4可知:花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率在底物浓度为4 g/100 mL时达到最高(61.84%),继续增加底物质量浓度,花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性迅速下降;而水解度从整体上看是在一个稳定的范围内波动,底物质量浓度为5 g/100 mL时,水解度最高(12.97%),随后呈幅度较小的下降趋势。花生肽抑制 α -葡萄糖苷酶活性的差异是由于酶切生成肽段的结构和数量不同引起的。底物质量浓度较低时,随着其升高,胰蛋白酶可以与底物充分结合水解出更多的高活性肽段,所以水解度和 α -葡萄糖苷酶抑制率逐渐升高,当底物质量浓度超过最适范围时,酶解体系的黏度显著增大,导致胰蛋白酶与底物的运动和扩散受到限制^[18],水解度下降,且显著影响抑制 α -葡萄糖苷酶活性肽段的有效释放。

2.3.4 花生蛋白酶解前预处理条件的影响

首先对花生蛋白进行加热和超声辅助加热预处理

理,再采用胰蛋白酶水解,在水解时间2.0 h、加酶量7%、底物质量浓度4 g/100 mL条件下研究花生蛋白预处理对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响,结果如图5所示。

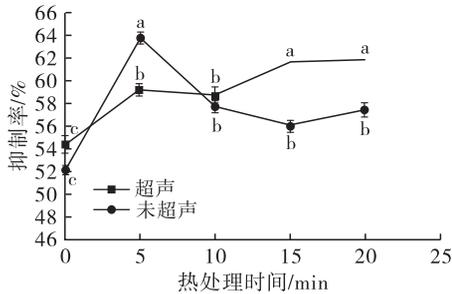


图5 花生蛋白预处理对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

由图5可知,与未进行预处理制备的花生肽相比,水解之前对花生蛋白进行热处理可以显著提高花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,加热5 min时抑制率达到最高,继续延长热处理时间酶解产物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性反而下降。原因是未处理的花生蛋白空间结构紧密,部分酶切位点隐藏在花生蛋白内部很难被蛋白酶识别,此时生成的活性肽段数量较少;对花生蛋白进行适当热处理后其空间结构展开,有利于蛋白酶和暴露的酶切位点结合,活性产物生成量迅速增加,所以 α -葡萄糖苷酶抑制率升高;但是加热时间过长会导致蛋白质通过分子间作用力生成大分子聚合物,不利于胰蛋白酶与蛋白质结合生成有效肽段,所以花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性逐渐降低^[19]。由水解度测定结果可知,热处理5 min时获得花生肽的水解度为11.33%,而随着热处理时间延长,水解度最低降至10.32%。

由图5可知,单独超声预处理制备的花生肽比未经预处理制备的花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率高了2.17个百分点。超声辅助加热预处理后,随着加热时间的延长,花生肽的 α -葡萄糖苷酶活性逐渐增加,热处理15 min后 α -葡萄糖苷酶抑制率处于平缓趋势(61.6%)。与单独长时间加热处理(超过5 min)相比,超声辅助加热处理后花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性均有所提高,但与5 min热处理相比,超声辅助加热处理后花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性反而下降,因此最终确定花生蛋白预处理的条件为95℃加热5 min。

2.4 花生蛋白水解条件优化的响应面实验

在单因素试验的基础上,将花生蛋白于95℃加热5 min进行预处理,按照Box-Behnken试验设计,以 α -葡萄糖苷酶抑制率(Y)为响应值,水解时间(A)、加酶量(B)、底物质量浓度(C)为考察因素,

设计了17组试验,其中12组为析因点试验,5组为中心点试验,以优化花生蛋白水解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制肽的工艺条件,响应面实验因素水平见表2,响应面实验设计及结果见表3。

表2 响应面实验因素水平

水平	A 水解时间/h	B 加酶量/%	C 底物质量浓度/(g/100 mL)
-1	0.5	5	3
0	1.5	7	4
1	2.5	9	5

表3 响应面实验设计及结果

试验号	A	B	C	Y/%
1	-1	-1	0	53.10
2	1	-1	0	61.80
3	-1	1	0	66.54
4	1	1	0	62.19
5	-1	0	-1	59.83
6	1	0	-1	56.33
7	-1	0	1	59.27
8	1	0	1	60.73
9	0	-1	-1	56.33
10	0	1	-1	60.14
11	0	-1	1	61.85
12	0	1	1	65.95
13	0	0	0	63.33
14	0	0	0	65.24
15	0	0	0	66.59
16	0	0	0	64.78
17	0	0	0	64.52

由表3可知,在这17组试验中,花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率最高达66.59%,此时水解度为9.40%, α -葡萄糖苷酶抑制率最低为53.10%,此时水解度为7.05%。在5组中心点试验中, α -葡萄糖苷酶抑制率比较稳定,在65%左右。对 α -葡萄糖苷酶抑制率进行二次多项式回归拟合,得到二次回归方程为 $Y = 64.90 + 0.29A + 2.72B + 1.89C - 3.26AB + 1.24AC + 0.073BC - 3.01A^2 - 0.98B^2 - 2.85C^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果见表4。

由表4可知:模型高度显著($p < 0.01$),失拟项不显著($p > 0.05$),表明回归方程对试验结果的拟合度高,可以用回归方程对实际值进行分析与预测。模型预测值和实际值之间拟合度高的标准是模型决定系数(R^2)大于0.8^[20],而本研究中模型的决定系数为0.9091,即响应值 α -葡萄糖苷酶抑制率的变化有90.91%来源于所选变量,说明模型可以很好

地预测花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。变异系数是表明模型是否可靠与精确的指标,数值越小代表模型越好^[21],本试验模型的变异系数为2.88%,说明模型的可靠度高。另外,该模型的信噪比为8.786,大于4,表明此模型的拟合度良好^[22]。在线性效应中,一次项加酶量(B)对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响高度显著($p < 0.01$),底物质量浓度(C)的影响显著($p < 0.05$),但水解时间(A)的影响不显著($p > 0.05$);在曲面效应中,二次项 B^2 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响不显著($p > 0.05$), A^2 和 C^2 的影响显著($p < 0.05$);交互项 AB 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响高度显著。因此,花生肽对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制效果与各因素之间并不是简单的线性关系,某些因素的二次项和交互作用在很大程度上也影响了响应值的变化。

表4 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	220.55	9	24.51	7.78	0.006 5
残差	22.06	7	3.15		
失拟项	16.48	3	5.49	3.94	0.109 4
纯误差	5.58	4	1.40		
总和	242.60	16			
A	0.67	1	0.67	0.21	0.658 5
B	59.02	1	59.02	18.73	0.003 4
C	28.70	1	28.70	9.11	0.019 4
AB	42.62	1	42.62	13.53	0.007 9
AC	6.17	1	6.17	1.96	0.204 5
BC	0.02	1	0.02	6.83E-03	0.936 4
A^2	38.02	1	38.02	12.07	0.010 4
B^2	4.04	1	4.04	1.28	0.294 5
C^2	34.10	1	34.10	10.82	0.013 3

由响应面回归模型预测出酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制肽的最优工艺条件为水解时间1.03 h、加酶量8.91%、底物质量浓度4.11 g/100 mL,在此条件下制备的花生肽对 α -葡萄糖苷酶抑制率的预测值为67.38%。考虑到操作的可实施性与便利性,将工艺条件调整为水解时间62 min、加酶量8.9%、底物质量浓度4.1 g/100 mL。为了验证该工艺的准确性与可靠性,在调整后的条件下制备花生肽并进行3次平行试验进行验证,得到花生肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为(68.82 ± 0.24)%,与预测值仅相差1.44百分点,说明模型预测值与实际值拟合较好(此时花生蛋白水解度为10.09%)。

2.5 花生蛋白水解度和花生肽 α -葡萄糖苷酶抑制活性的相关性分析

对所有单因素试验中测得的花生肽 α -葡萄糖苷酶抑制率与其相对应花生蛋白水解度进行相关性分析,结果见图6。

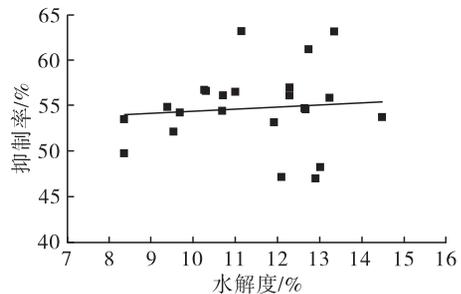


图6 水解度和 α -葡萄糖苷酶抑制率的相关性分析

由图6可知:水解度在8.0%~11.5%低范围内,花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率随着水解度的增加而增加,经分析两者呈显著正相关($p = 0.01 < 0.05$, $r = 0.814$);而水解度超过11.5%时,花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率与水解度之间并没有表现出良好的线性关系($p = 0.598 > 0.05$, $r = 0.162$)。试验结果表明花生肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力与其水解度在一定范围内呈显著正相关。花生肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性主要依赖于其特殊的氨基酸序列,当水解度达到要求后继续过度水解可能会破坏这种有效的结构,导致水解度与 α -葡萄糖苷酶抑制活性没有显著相关性。梁凯^[23]也发现水解度更高的汉麻籽粕酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率反而较低。

3 结论

由单因素试验和响应面试验得到酶法制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制肽的最优工艺条件为:将花生蛋白于95℃加热5 min进行预处理,采用胰蛋白酶水解,水解时间62 min,加酶量8.9%,底物质量浓度4.1 g/100 mL。在最优条件下,制备的花生肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制率达到(68.82 ± 0.24)%,水解度为10.09%。水解度在8.0%~11.5%范围内,与花生肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈显著正相关,超出此范围两者无显著相关性。由于本文制备的花生肽水解度不高,高分子质量肽组分较多,因此采取有效措施使花生肽能够抵抗体内消化酶作用(保持高活性)值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘昭明,黄翠姬.不同链长花生蛋白肽的体外抗氧化活性研究[J].食品与机械,2009,25(6):52-55.
- [2] 张宇昊,马良,王强.花生短肽降血压活性研究[J].食品科学,2008,29(6):399-403.
- [3] YE X Y, NG T B. Hypogin: A novel antifungal peptide

- from peanuts with sequence similarity to peanut allergen [J]. *J Pept Res*, 2001, 57: 330 – 336.
- [4] QASEEM A, BARRY M J, HUMPHREY L L, et al. Oral pharmacologic treatment of type 2 diabetes mellitus: A clinical practice guideline update from the American college of physician[J]. *Ann Int Med*, 2017, 166: 279 – 290.
- [5] CHEN X Q, LIN Z, YE Y, et al. Suppression of diabetes in non – obese diabetic(NOD) mice by oral administration of water – soluble and alkali – soluble polysaccharide conjugates prepared from green tea[J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(1): 28 – 33.
- [6] 李丽, 王红玲. 小麦麸膳食纤维对小鼠降血糖作用的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2010, 17(3): 30 – 32.
- [7] 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, 16(4): 137 – 144.
- [8] 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.
- [9] 许婷婷, 齐宏涛, 于丽娜, 等. 抑制 α – 葡萄糖苷酶的花生蛋白活性肽制备工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(8): 2885 – 2891.
- [10] 赵会. 水酶法同步制备花生油和抗氧化肽的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016.
- [11] 郑静静, 金华丽. 双酶复合酶解制备花生短肽研究[J]. *粮食与油脂*, 2014, 27(9): 41 – 44.
- [12] KIM Y M, WANG M H, RHEE H I. A novel α – glucosidase inhibitor from pine bark[J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339: 715 – 717.
- [13] 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.
- [14] LIU W W, LI H Y, WEN Y Y, et al. Molecular mechanism for the α – glucosidase inhibitory effect of wheat germ peptides [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(50): 15231 – 15239.
- [15] PERUTKA Z, SEBELA M. Pseudotrypsin: A little – known trypsin proteoform [J/OL]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2637 [2022 – 07 – 27]. <https://doi.org/10.3390/molecules23102637>.
- [16] 田应娟. 啤酒糟多肽的分离纯化及降血糖活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [17] 魏光强, 赵娜, 范尧珠, 等. 响应面法优化辣木籽降糖肽的酶法制备工艺及其体外活性评价[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(24): 136 – 143.
- [18] 包美丽, 杨添植, 张立钢, 等. 双酶法制备马鹿茸降血糖肽工艺优化及其对 α – 葡萄糖苷酶的抑制效果[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 88 – 95.
- [19] 陈贵堂, 赵立艳, 丛涛, 等. Alcalase 蛋白酶水解花生蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. *食品工业科技*, 2008(3): 119 – 121, 124.
- [20] CHI G Y, HU S Q, YANG Y H, et al. Response surface methodology with prediction uncertainty: A multi – objective optimisation approach [J]. *Chem Eng Res Des*, 2012, 90(9): 1235 – 1244.
- [21] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. Box – Behnken 响应面优化冷榨花生粕酶解制备花生肽工艺[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(10): 106 – 111, 117.
- [22] 于丽娜, 杜德红, 张初署, 等. 响应面法优化微波辅助酶解制备 α – 葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 117 – 122, 136.
- [23] 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.

(上接第34页)

- [20] PAN F, LIU Y, LIU J, et al. Stability of blueberry anthocyanin, anthocyanidin and pyranoanthocyanidin pigments and their inhibitory effects and mechanisms in human cervical cancer HeLa cells [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(19): 10842 – 10853.
- [21] KRGA I, MILENKOVIC D. Anthocyanins: From sources and bioavailability to cardiovascular – health benefits and molecular mechanisms of action [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(7): 1771 – 1783.
- [22] 周张涛, 高盼, 章景志, 等. 我国不同产区核桃油组成成分与氧化稳定性研究[J]. *粮油食品科技*, 2020, 28(1): 17 – 22.
- [23] DEN HARTIGH L J. Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: A review of pre – clinical and human trials with current perspectives [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 370 [2022 – 08 – 19]. <https://doi.org/10.3390/nu11020370>.
- [24] 李鹏超, 顾学艳. 共轭亚油酸对脂质代谢和身体成分组成影响的研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 373 – 380.