

玉米降血糖活性肽制备分离及其氨基酸序列分析

Preparation, separation and amino acid sequence analysis of corn peptides with hypoglycemic activity

胡宇航^{1,2} 戴 军¹ 陈尚卫¹ 朱 松¹ 张学军³ 张 平³
HU Yu-hang^{1,2} DAI Jun¹ CHEN Shang-wei¹ ZHU Song¹ ZHANG Xue-jun³ ZHANG Ping³

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122;

3. 山东天久生物技术有限公司, 山东 菏泽 274108)

(1. The School of Food Science and Technology of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

3. Shangdong Tianjiu Biotechnology Co., Ltd., Heze, Shandong 274108, China)

摘要:以水解度(DH)和游离氨基酸含量为指标优化玉米蛋白粉的酶水解工艺,结果显示,在 pH 8.5, 60 °C 条件下经过正交试验得到最适组合为:酶底物比 3.5 g/100 g,水解时间 2 h,料液比 1:20 (g/mL),在该条件下其 DH 为 27.02%,多肽含量为 85.23%。同时,还优化了玉米肽的脱色工艺,最佳条件为:温度 50 °C, pH 3.5,活性炭用量 1.5 g/100 mL,脱色时间 45 min,该条件下玉米肽得率为 77.86%,脱色率为 87.27%。将脱色脱盐后的玉米多肽经过凝胶色谱分离得到 3 个组分。体外降血糖活性结果显示,CP1 促进正常 HepG2 细胞葡萄糖消耗效果最优,并且其 α -糖苷酶抑制活性也最高(34.64%);CP1 经过 RP-HPLC 制备柱纯化得到含量较高的 14 个组分,其中 CP1-13 的 α -糖苷酶抑制活性最强,达到 39.50%。经 UPLC-Q-TOF-MS/MS 测定,其氨基酸序列为 A-P-A-L-L-P-F。

关键词:玉米肽;水解;降血糖活性;氨基酸序列

Abstract: In this study, the degree of hydrolysis (DH) and polypeptide content were index optimization for corn gluten meal of hydrolysis process. Under the condition of pH 8.5, 60 °C, orthogonal experiment to obtain the optimal combination for: amount of enzyme 3.5 g/100 g, hydrolysis time 2 h, solid-liquid ratio 1:20 (g/mL); on this condition, the DH is 27.02%, peptide content is 85.23%. Meanwhile, optimized the decolorization technology, the best conditions: temperature 50 °C, pH 3.5, activated carbon dosage: 1.5 g/100 mL, decoloring time 45 min; under the condition, corn peptide yield was 77.86%, the decolorization rate was 87.27%. After decoloring and desalination, three components were isolated by

chromatographic separation. The result of hypoglycemic activity in vitro showed that CP1 had the better effect on promoting normal HepG2 cells' glucose consumption, and the α -glycosidic enzyme inhibitory activity reached 34.64%, after RP-HPLC column purification, 14 components were gotten; the thirteenth (CP1-13) had the best α -glycosidic enzyme inhibitory activity, and reached 39.50%. Determined by UPLC-Q-TOF-MS/MS, the amino acid sequence was A-P-A-L-L-P-F.

Keywords: Corn peptide; hydrolysis; hypoglycemic activity; amino acid sequence

近年来,临储价格不断增加使 2012 年后玉米产量和临储量不断增高,同时使中国进口玉米和替代品也大幅增加。据报道^[1],2016 年中国玉米储量超过 2.5×10^8 t,远超 2016 年玉米产量 2.18×10^8 t。虽然目前调整玉米临时收储政策为“市场化收购”加“补贴”的新机制,有效地减少了进口玉米和替代品的量,但要消化掉这些临储玉米难度颇大。玉米蛋白粉水溶性和风味差,是限制性蛋白,多用于饲料工业。酶解玉米蛋白粉,会提高其在食品工业中的应用价值^[2]。

玉米蛋白中含有许多支链氨基酸,疏水氨基酸,水解后会得到大量的含有这些氨基酸的小肽。国内外研究者关于玉米肽的活性也作了大量研究,结果表明^[3]玉米肽对恢复运动疲劳,醒酒护肝,清除自由基抗氧化,降血压都有很好的作用。目前,国内外市场上有许多的玉米肽保健产品,主要分为两大类:① 功能性饮料,包括醒酒护肝类饮品和运动饮品;② 经过水解后的玉米粗肽产品,目前中国已经有几家生物肽公司规模生产玉米粗肽产品。

随着人口老龄化和物质生活水平的提高,糖尿病的发病率呈现迅速增长的趋势。目前国内外对具有降血糖作用的生物活性肽进行了大量研究。Luis Mojica 等^[4]研究显示黑

作者简介:胡宇航,男,江南大学在读硕士研究生。
通信作者:戴军(1957—),男,江南大学研究员,博士。
E-mail: daihplc@163.com
收稿日期:2017-04-26

豆肽可以有效减少 Caco-2 细胞模型的葡萄糖吸收,使口服葡萄糖耐量试验的小鼠餐后葡萄糖水平降低 24.5%。Rim Nasri 等^[5]通过研究发现虾虎鱼蛋白酶解物可以显著减少喂食高脂高糖饲料小鼠的 α -淀粉酶活性和血糖含量。黄景麟等^[6]研究发现抗菌肽 Dybowskin-2CDYa 可以促进胰岛细胞增殖和胰岛素分泌,在高血糖条件下会有效降低血糖水平且不会引起低血糖。关于玉米肽降血糖的研究较少。根据李翔^[7]的研究显示,在饮食中添加玉米肽不仅可以降低肥胖大鼠的胰高血糖素(glucagon)水平,还能降低大鼠体内 MCP-1(单核细胞趋化蛋白-1)的水平,提高 PYY(酪酪肽)的水平,后者被认为与高血糖症密切相关。Taisuke Mochida 等^[8]研究发现玉米蛋白水解物对小鼠可以起到诱导 GLP-1 的分泌和抑制 GPL-1 降解的双重作用,从而增加胰岛素的分泌。Noriyuki Higuchi 等^[9]在此基础上对正常的雄性大鼠和患有糖尿病的 GK 大鼠喂食玉米蛋白水解物,结果显示口服也能够促使 GLP-1 和 GIP 含量的增多;在糖耐量试验中,口服玉米醇溶蛋白水解液可以显著抑制升糖反应,说明其提高了正常和糖尿病大鼠的糖耐量。上述研究表明玉米蛋白肽具有明显的降血糖作用,但中国相关报道很少。本试验首先对玉米蛋白水解工艺进行了优化,然后进一步分离纯化,并进行降血糖活性研究,以筛选出活性组分并测序。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

玉米蛋白粉(CGM):蛋白含量 68.27%,中食都庆(山东)生物技术有限公司;

中温 α -淀粉酶:4 000 U/g,无锡市酶制剂厂;

碱性蛋白酶(Alcalase):2.4 L(2.4 AU/g),丹麦诺维信公司;

767 活性炭、聚丙烯酰胺凝胶、P-2 Gel:美国伯乐医药生命科学产品公司;

HepG2:美国 Ctecbio Science 公司;

FBS、DMEM:生化试剂,美国 Hyclone 公司;

DMSO:分析纯,中国赛默飞世尔科技;

α -糖苷酶:100 UN,西格玛奥德里奇(中国)公司;

乙腈、TFA:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;

NaOH、HCl、NaCO₃、酒石酸钠、酚试剂等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器

冷冻干燥机:SCIENTZ-10N 型,宁波生物科技有限公司;

高速冷冻离心机:Beckman J-26xp 型,美国贝克曼公司;

旋转蒸发仪:RE-52A 型,上海亚荣生化仪器厂;

定时数显恒流泵:HL-2D 型,上海沪西分析仪器厂;

紫外检测器:HD-3 型,上海沪西分析仪器厂;

细胞培养箱:Thermo Scientific 8000 型,美国赛默飞世尔科技公司;

倒置光学显微镜:XDS-1A 型,上海蔡康光学仪器有限公司;

超高效液相色谱仪:Waters Acquity UPLC 型,美国 Waters 公司;

高效液相色谱仪:Waters 2545 型,美国 Waters 公司;

超高液相色谱—飞行时间质谱联用仪:Waters Acquity UPLC-Waters MALDI Synapt Q-TOF 型,美国 Waters 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米低聚肽的制备工艺

玉米蛋白粉→ α -淀粉酶水解→碱性蛋白酶水解→活性炭脱色→过滤(0.22 μ m)→纳滤脱盐→冷冻干燥→玉米低聚肽

1.2.2 玉米蛋白粉组成分析及预处理

(1) 水分含量的测定:按 GB 5009.3—2010 执行。

(2) 灰分含量的测定:按 GB 5009.4—2010 执行。

(3) 蛋白含量的测定:按 GB 5009.5—2010 执行。

(4) 脂肪含量的测定:按 GB/T 14772—2008 执行。

(5) 预处理:取 100 g 玉米蛋白粉原料,过 80 目筛,加入 1 000 mL 水,90 $^{\circ}$ C 糊化 1 h,冷却至 65 $^{\circ}$ C,调 pH 至 5.5,加入 0.5 g/100 g·原料预先在 65 $^{\circ}$ C 下活化的中温淀粉酶,反应 2 h,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再水洗 2 次,沉淀物冷冻干燥。

1.2.3 酶解工艺优化 经过预处理的 CGM 加入一定量的水,预先在 80 $^{\circ}$ C 下水浴 20 min,搅拌,然后在适宜条件下水解,结束后 90 $^{\circ}$ C 加热 20 min 灭酶,离心取上清液。玉米蛋白粉的酶解工艺优化先进行单因素试验,影响因素分别为:pH、温度、料液比、酶底物比[E]/[S]、酶解时间,响应值为水解度(DH)^[10]。单因素试验选出最优 pH 为 8.5,最适温度为 60 $^{\circ}$ C。然后以酶底物比、酶解时间、料液比为因素进行 3 水平的正交试验,见表 1。以水解度^[10]和游离氨基酸^{[11] 16}为指标并参考行业标准(QB/T 4707—2014)选出最优工艺条件,多肽含量由总蛋白质含量减去游离氨基酸含量得出。

表 1 酶解工艺正交试验因素水平设计			
Table 1 Design factors of the orthogonal test about enzymatic process			
水平	A 酶底物比/%	B 酶解时间/h	C 料液比(g/mL)
1	2.5	2.0	1:15
2	3.0	2.5	1:20
3	3.5	3.0	1:25

1.2.4 脱色条件优化 因蛋白水解液中色素的存在导致水解后颜色加深,同时存在一定程度的褐变,影响其品质,所以应进行脱色。参考文献[12]的脱色方法,以得率和脱色率为指标进行脱色优化,采用加权评分法: $Z=0.5X+0.5Y$,其中 X 为脱色率(%),Y 为肽损失率(%)。经过前期单因素试验确定反应温度为 50 $^{\circ}$ C,进行正交试验,因素水平设计见表 2,正交试验筛选最优工艺。

1.2.5 纳滤脱盐 趁热将脱色得到的混合液过滤得到澄清的玉米蛋白水解液,调节 pH 至 6.5。将澄清玉米蛋白水解液使用 180 D 的纳滤膜纳滤脱盐并将其浓缩冻干。

表 2 脱色工艺正交因素水平设计

Table 2 Design factors of the orthogonal test about decoloration process

因素水平	A pH	B 活性炭用量/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	C 时间/ min
1	3.0	1.0	30
2	3.5	1.5	45
3	4.0	2.0	60

1.2.6 聚丙烯酰胺柱分离多肽 将冻干脱色的玉米多肽上聚丙烯酰胺柱(Bio-Gel P-2 Gel,4.5 cm×90 cm)进行分离,在进样前用超纯水进行平衡。取 1 g 多肽样品溶于 30 mL 去离子水中,水膜过滤,然后过聚丙烯酰胺柱分离,流速为 2.5 mL/min,220 nm 紫外检测,按照不同的出峰时间收集,得到 3 个不同的组分。将 3 个组分进行浓缩冻干进行下一步筛选及分离纯化。

1.2.7 降血糖活性研究

(1) α-葡萄糖苷酶抑制活性:测定不同组分的 α-葡萄糖苷酶抑制活性,参考文献[13]的方法,作如下改动,预先加入 300 μL 磷酸缓冲液,再加入 0.2 U 的 α-葡萄糖苷酶 50 μL 和 2 mg/mL 样品 100 μL,振荡混匀后,将其在 37 ℃ 恒温 10 min,快速加入 5 mmol PNPG 100 μL 混匀,37 ℃ 恒温 20 min 后,加入 0.5 mol NaCO₃ 800 μL 混匀,在 405 nm 下测定吸光值 A₁,设置空白对照,另不加样品的对照组吸光值 A₂,不加酶的背景组 A₀。抑制率按式(1)计算:

$$I = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:
I——α-糖苷酶抑制率,%;
A₀——对照组吸光值;
A₁——样品组吸光值;
A₂——背景组吸光值。

(2) 多肽对正常细胞葡萄糖消耗的影响:先进行细胞培养得到对数生长期的 HepG2,倾去培养液,用 PBS 清洗 1 次,然后加适量胰蛋白酶—EDTA 消化液,37 ℃ 消化 1~3 min 变为球形后,加入 10% 胎牛血清 DMEM 培养液终止消化反应。1 000 r/min 离心 5 min,去上清后,调整细胞密度约 4×10⁵ cells/mL,100 μL/孔接种于 96 孔板,然后在 37 ℃,5% CO₂,95% 湿度培养 24 h。在细胞贴壁后,按组进行葡萄糖消耗试验。样品预先用 DMEM 培养基配好试验分为玉米肽高中低剂量组,正常 HepG2 对照组和二甲双胍组(0.01 mg/mL)组,每组 3 个复孔,培养 24 h 后,每孔取细胞上清液用葡萄糖试剂盒测定各组的葡萄糖含量^[14]。

MTT 试验,将上述孔板每孔加入 10 μL MTT,置于培养箱中避光培养 3~4 h,加入 200 μL 的 DMSO,室温震荡 10 min;在 492 nm 处测量同一时间的 OD 值,进行细胞增殖影响分析^[14]。

1.2.8 反相高效液相色谱分离纯化(RP—HPLC) 将冷冻干燥活性最高的组分用制备型反相高效液相色谱(RP—HPLC)分离纯化^[15]。仪器为 Waters2545 制备型高效液相

色谱仪,色谱柱为 Waters xBriidge PrepC₁₈ (250 mm×19 mm,5 μm)。紫外检测波长 220 nm,柱温 20 ℃,多肽样品浓度 50 mg/mL,进样量 500 μL,流速 10 mL/min。流动相:A 为纯乙腈,B 为 0.05% TFA,其二元梯度洗脱条件为:0~40 min,95% A~65% A;40~45 min,65% A~20% A;45~50 min,20% A~20% A;50~55 min,20% A~95% A;55~60 min,95% A~95% A。重复收集其组分进行浓缩冷冻干燥。

1.2.9 降血糖肽氨基酸序列的确定 用 RP—HPLC 分离纯化的组分测定其 α-糖苷酶抑制活性,筛选出活性较高组分,由超高效液相色谱—四极杆—飞行时间串联质谱(UPLC—Q—TOF—MS/MS)测定其氨基酸序列。

(1) 液相色谱条件:色谱仪为 WATERS ACQUITY UPLC 型;检测器为 WATERS ACQUITY PDA 型;检测波长 200~400 nm;色谱柱:BEH C₁₈ (2.1 mm×150 mm,1.7 μm);柱温:45 ℃,流速:0.3 mL/min;样品:浓度 1 mg/mL,进样量 5 μL;流动相:A 0.1% 甲酸,B 乙腈;其二元洗脱曲线为,0~40 min,100% A~70% A;40~45 min,70%~20% A;45~50 min,20%~0% A;50~55 min,0%~100% A。

(2) 质谱条件:仪器为 WATERS MALDI SYNAPT Q-TOF MS 型;离子方式为 ESI+;毛细管电压 3.5 kV;锥孔电压 30 V;离子源温度 100 ℃;脱溶剂气:温度 400 ℃,气流 700 L/h,锥孔气流 50 L/h;碰撞能量 6/20 V;质量范围 20~2 000 m/z;检测器电压 1 800 V。

2 结果与讨论

2.1 玉米蛋白粉组成及预处理结果

由表 3 可知,中温 α-淀粉酶处理后玉米蛋白粉的蛋白含量达到 81.25%(以干基计),为浅黄色固体粉末。预处理有效地提高了蛋白含量,便于水解的进行。

表 3 CGM 与预处理后样品组成成分

Table 3 Composition of CGM and the sample after pretreatment

样品	水分	灰分	蛋白	脂肪
原料	7.80	1.35	67.27	5.52
预处理后	3.41	0.74	81.25	3.28

2.2 酶解工艺优化

由表 4 可知,影响 DH 的因素顺序为:酶底物比>料液比>酶解时间,最优的组合为 A₃B₃C₂。在保证水解度高的前提下,游离氨基酸含量越低,多肽含量就越高,活性肽就越多。影响游离氨基酸含量的因素顺序为:酶底物比>料液比>酶解时间,最优组合为 A₁B₁C₂。综合考虑玉米肽的得率和游离氨基酸含量,选取 A₃B₁C₂ 为最优水解条件,其 DH 为 27.02%,游离氨基酸含量为 1.87%。水解液为深黄褐色液体。

2.3 蛋白水解液的脱色及脱盐

由表 5 可知,影响肽得率和脱色率的因素顺序为:活性炭用量>pH>时间。综合考虑 Z 值、得率与脱色率,选择第

表 4 酶解工艺正交试验结果及分析

Table 4 Results and analysis of orthogonal test about enzymatic process					
组别	A	B	C	DH/%	游离氨基酸含量/%
1	1	1	3	23.86	1.57
2	1	2	1	25.44	1.86
3	1	3	2	25.26	1.71
4	2	1	1	25.44	2.20
5	2	2	2	26.14	1.92
6	2	3	3	25.97	2.08
7	3	1	2	27.02	1.87
8	3	2	3	26.32	1.98
9	3	3	1	27.19	2.08
DH	k ₁	24.85	25.44	26.02	
	k ₂	25.85	25.97	26.14	
	k ₃	26.84	26.14	25.38	
	R	1.99	0.70	0.76	
游离氨基酸含量	k ₁	1.71	1.88	2.05	
	k ₂	2.06	1.92	1.84	
	k ₃	1.98	1.96	1.87	
	R	0.35	0.08	0.21	

表 5 脱色工艺正交结果及分析

Table 5 Results and analysis of orthogonal test about enzymatic process						
组别	A	B	C	X 得率/%	Y 脱色率/%	Z
1	1	1	1	86.78	71.36	0.79
2	2	2	2	77.86	87.27	0.83
3	3	3	3	68.84	91.55	0.80
4	1	2	3	78.51	83.45	0.81
5	2	3	1	69.54	90.36	0.80
6	3	1	2	75.79	78.82	0.77
7	1	3	2	72.23	78.27	0.75
8	2	1	3	78.92	78.82	0.79
9	3	2	1	71.68	82.50	0.77
得率	k ₁	2.38	2.42	2.28		
	k ₂	2.26	2.28	2.26		
	k ₃	2.16	2.11	2.26		
	R	0.21	0.31	0.02		
脱色率	k ₁	2.33	2.29	2.44		
	k ₂	2.56	2.53	2.44		
	k ₃	2.53	2.60	2.54		
	R	0.23	0.31	0.10		

二组为最佳脱色工艺。最终选定脱色条件为:温度 50 ℃, pH 3.5, 活性炭用量:1.5 g/100 mL 的活性炭, 脱色时间 45 min, 此条件下玉米肽得率为 77.86%, 脱色率为 87.27%。经过脱盐, 玉米肽蛋白含量(以干基计)为 90.91%; 多肽含量(以干基计)为 88.85%, 远高于行业标准中的 80% 和 75%,

是一种优质的玉米肽产品。经过水解及脱色脱盐, 其最终产品得率为 37.10%。

2.4 凝胶过滤色谱分离

用聚丙烯酰胺凝胶柱对脱色脱盐后的玉米多肽进行分离, 其洗脱曲线见图 1。按照出峰顺序分成如下 3 个组分, 分别命名为 CP1, CP2, CP3。将 3 组样品进行体外降血糖活性分析, 以进一步筛选和分离。

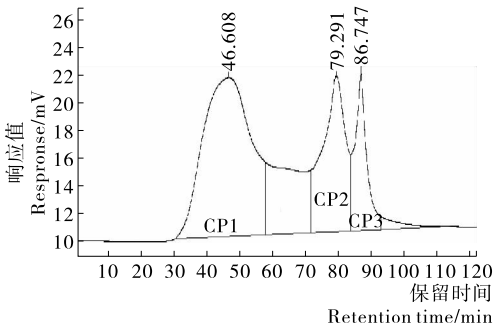


图 1 聚丙烯酰胺凝胶柱分离色谱图

Figure 1 Separation of corn peptides by Polyacrylamide gel column

2.5 体外降血糖活性

如表 6 所示, 各组在经过 MTT 试验矫正后的 GC/OD 与对照组相比较, 显示各组分对葡萄糖的消耗均有一定的促进作用, 其中粗肽、CP1 量效关系较为明显。但是各组的值均未达到二甲双胍组的, 且有部分值低于对照组, 考虑到 MTT 试验结果, 可能为玉米肽具有促进 HepG2 细胞(人体肝癌细胞)凋亡的作用, 在一定程度上影响了其生物活性, 与 Li Jiang-tao 等^[16]的研究结果一致。 α -葡萄糖苷酶抑制活性试验显示, 在 3 个组分中 CP1 的活性最高为 34.59%。表明玉米肽具有较好的降血糖活性。

2.6 制备型反相高效液相色谱分离

将经过凝胶色谱柱(Bio-Gel P-2 Gel)分离的活性较好的组分 CP1 用制备型 RP—HPLC 进行分离制备, 分离的色谱图见图 2。收集的组分中含量较高的组分共 14 个, 其 α -糖苷酶抑制活性见图 3, 其中 CP1-13 的活性最高达到了 39.5%, 对其进行氨基酸序列分析。

2.7 氨基酸序列分析

CP1-13 经过 UPLC—Q—TOF—MS/MS 分析, 二级质谱图见图 4, 用 Biolynx 软件处理后得到该肽组分氨基酸序列为 A-P-A-L-L-P-F。二肽基肽酶(DPP-IV)能够通过特异地断开 X-Ala 和 X-Pro 的 N 末端来调节氨基酸激素循环的生物活动, 如胰高血糖素肽类(GLP-1)的代谢^[17]。Tadashi Hatanaka 等^[16]在文献中提到具有抑制 DPP-IV 活性的小肽, 其氨基酸序列中倒数第二位均为 Pro, 包括抑二肽素类(Ile-Pro-Ile, Val-Pro-Leu)和胶原蛋白肽类(Gly-Pro-X)。从氨基酸序列来看, 七肽与胶原蛋白肽类(Gly-Pro-X)结构相似, DPP-IV 不能特异地断开 X-Pro-Phe 中的 Pro, 推测其可能为 DPP-IV 抑制剂, 需进一步研究来证实。Zhuang Hong 等^[18]在玉米抗氧化肽的研究中曾经发现过一个四肽 L-L-P-F, 其具有很好的抗氧化活性; 黄文浩等^[19]在研究降血压活性中

表 6 玉米蛋白肽的体外降血糖活性[†]
Table 6 The hypoglycemic activity in vitro of the corn peptides($\bar{X} \pm S, n=3$)

样品	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	GC/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	OD(A_{490})	GC/OD/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	α -葡萄糖苷酶 抑制活性/%
粗肽	1.00	3.79 ± 0.53	$0.46 \pm 0.02^{**}$	8.25 ± 1.15	28.75 ± 1.63
	0.10	3.59 ± 0.05	$0.49 \pm 0.04^{**}$	7.41 ± 0.12	
	0.01	3.43 ± 0.09	0.52 ± 0.04	6.56 ± 0.17	
CP1	1.00	4.60 ± 0.70	$0.46 \pm 0.03^{**}$	9.33 ± 1.42	34.59 ± 1.68
	0.10	3.90 ± 0.32	$0.47 \pm 0.01^{**}$	7.73 ± 0.62	
	0.01	3.48 ± 0.11	$0.49 \pm 0.02^{**}$	6.84 ± 0.21	
CP2	1.00	2.55 ± 0.34	$0.49 \pm 0.01^{**}$	5.53 ± 0.74	22.80 ± 1.60
	0.10	$3.32 \pm 0.33^*$	$0.49 \pm 0.04^*$	6.97 ± 0.69	
	0.01	4.24 ± 0.38	0.50 ± 0.01	8.30 ± 0.74	
CP3	1.00	2.88 ± 0.82	$0.46 \pm 0.02^{**}$	6.25 ± 0.82	17.64 ± 1.47
	0.10	2.71 ± 0.17	$0.48 \pm 0.03^{**}$	5.73 ± 0.35	
	0.01	2.44 ± 0.14	0.51 ± 0.03	5.03 ± 0.28	
二甲双胍		$6.30 \pm 0.99^*$	0.52 ± 0.02	11.84 ± 1.47	
CK		3.75 ± 0.59	0.54 ± 0.02	6.87 ± 1.08	

[†] GC 为葡萄糖消耗量,OD 为 MTT 试验中的 OD 值,GC/OD 为校正值;* 为差异显著,P<0.05;* * 为差异极显著,P<0.01。

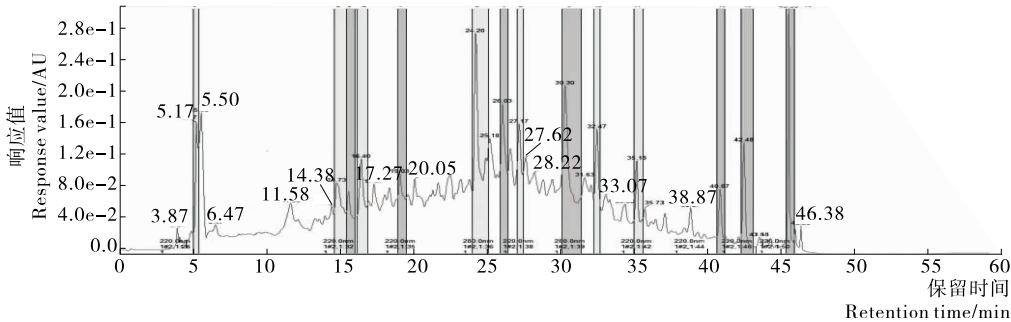


图 2 制备型反相超高压液相色谱分离 CP1 色谱图
Figure 2 The chromatogram of CP1 separated by Preparative RP-HPLC

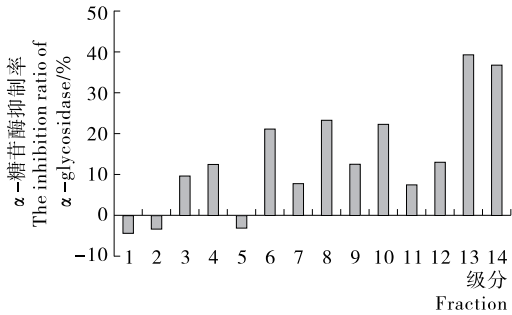


图 3 反相超高压液相色谱仪分离 CP1 组分的 α -糖苷酶抑制活性
Figure 3 The inhibition activity of α -glycosidase of the fractions separated by RP-HPLC

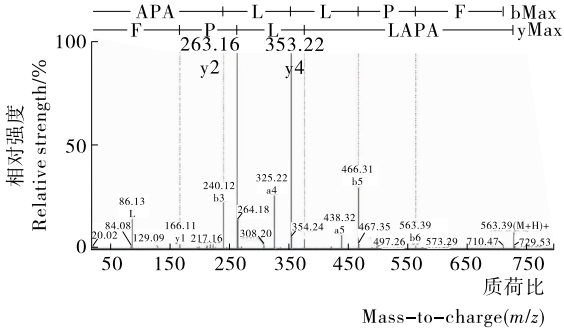


图 4 二级质谱得到 CP1-13 的氨基酸序列图
Figure 4 MS/MS sepctrum of the amino acid sequence of CP1-13

发现的 3 个肽中有一种序列为 Q-Q-L-L-P-F;Ma Zhi-li 等^[20]色谱分离得到醒酒肽单体,序列为 R-L-L-P-F。这 3 种肽与本试验所发现的七肽中后 4 个氨基酸序列相同,说明 X-L-L-P-F 为玉米肽活性组成中的一个特征序列。

3 结论

(1) 经过条件优化,确定了脱色效果好、肽含量较高的最佳水解和脱色工艺,其条件分别为:pH 8.5,温度 60 ℃,酶底物比 3.5 g/100 g,水解时间 2 h,料液比 1 : 20 (g/mL);脱

色温度 50 ℃ ,pH 3.5,活性炭用量 1.5 g/100 mL,脱色时间 45 min。以体外降血糖活性为筛选指标,得到体外降血糖活性较强的 CP1-13 号肽组分,经过二级质谱分析其氨基酸序列为 A-P-A-L-L-P-F,分子量为 727.89。目前国内外关于降血糖玉米肽的研究较少,马伟^[11] 40-41 曾以 α -糖苷酶活性分离出一个八肽为 A-E-P-N-L-S-G-D-A-P,尚无其它具有降血糖活性的玉米肽单体报导。本研究为进一步开发、优化玉米蛋白资源和研究玉米肽的降糖活性提供了新的依据。

(2) 本研究只进行了体外降血糖活性的研究,有待动物试验的进一步验证;另本研究得到了氨基酸序列还需要进一步化学合成,并与分离到的 CP1-13 的质谱进行分析比对,并验证其生物活性。

参考文献

[1] 中国报告大厅. 2016/17 年度中国玉米市场形势: 总消费量为 19 711 万吨 [EB/OL]. (2017-01-13) [2017-01-23]. <http://www.chinabgao.com/stat/stats/81417.html>.

[2] 田京歌, 陈海霞, 陈书涵. 玉米肽的制备及其生物活性研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(3): 754-759.

[3] 刘雪蛟. 玉米低聚肽保肝作用的研究 [D]. 苏州: 江苏大学, 2016: 2-4.

[4] MOJICA L, MEJIA E G D, MENJIVAR M. Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using in silico, in vitro and in vivo approaches[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 31: 274-286.

[5] NASRI R, ABDELHEDI O, JEMIL I, et al. Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet-induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in rats[J]. Chem Biol Interact, 2015, 242: 71-80.

[6] 黄景麟. 抗菌肽 Dybowski-2CDY α 促胰岛素分泌及对二型糖尿病大鼠的降血糖和治疗效果 [D]. 吉林: 辽宁大学, 2015: 48-49.

[7] 李翔, 史仍飞, 娄淑杰. 玉米肽和有氧运动对肥胖大鼠血浆 Glucagon、MCP-1、PP 和 PYY 水平的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(3): 214-218.

[8] MOCHIDA T, HIRA T, HARA H. The Corn Protein, Zein Hydrolysate, Administered into the Ileum Attenuates Hyperglycemia via Its Dual Action on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion

and Dipeptidyl Peptidase-IV Activity in Rats[J]. Endocrinology, 2010, 151(7): 3 095-3 104.

[9] HIGUCHI N, HIRA T, YAMADA N, HARA H. Oral Administration of Corn Zein Hydrolysate Stimulates GLP-1 and GIP Secretion and Improves Glucose Tolerance in Male Normal Rats and Goto- Kakizaki Rats [J]. Endocrinology, 2013, 154(9): 3 089-3 098.

[10] 李秀霞, 韩鲁佳. 玉米抗氧化肽的制备及纯化 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(7): 73-77.

[11] 马伟. 玉米低聚肽的制备、分离及其生物活性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015.

[12] 黄敏, 郑喜群, 刘晓兰. 玉米蛋白酶解液的脱色方法研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2012(4): 25-28.

[13] 包美丽, 杨添植, 张立钢, 等. 双酶法制备马鹿茸降血糖肽条件优化及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果 [J]. 食品科学, 2016(6): 88-95.

[14] YAMASHITA R, SAITO T, SATOH S, et al. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2 [J]. Endocrine Journal, 2005, 52(6): 727-733.

[15] 马伟, 戴军, 陈尚卫, 等. 醒酒玉米低聚肽的分离制备及其氨基酸序列分析 [J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 197-200, 221.

[16] LI Jiang-tao, HE Hui, MA Zhi-li, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 51: 297-305.

[17] HATANAKA T, KAWAKAMI K, URAJI M. Inhibitory effect of collagen-derived tripeptides on dipeptidylpeptidase-IV activity [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2014, 29(6): 823-828.

[18] ZHUANG Hong, TANG Ning, YUAN Yuan. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1 810-1 821.

[19] 黄文浩, 何慧, 董华伟, 等. 酶膜耦合制备高活性 ACE 抑制玉米肽及结构研究 [J]. 中国粮油学报, 2011, 26(4): 24-29.

[20] MA Zhi-li, ZHANG Wen-jun, YU Guo-cai, et al. The primary structure identification of a corn peptide facilitating alcohol metabolism by HPLC-MS/MS [J]. Peptides, 2012, 37(1): 138-143.

(上接第 109 页)

的方向。民间美术作为传统文化的重要组成部分,是现代人情感和审美的源头;现代包装设计民族归属感的缺失,呼唤民间美术情感价值的回归。设计者需要将民族与文化的情感基因与现代设计互相融合并创新发展。

参考文献

[1] 卜祥. 洋品牌入侵传统节日食品 [J]. 财经天下周刊, 2015 (12): 50.

[2] 周旭. 论传统民间美术的语言特征 [J]. 装饰, 2007(5): 113-114.

[3] 尚伟. 民间美术的色彩符号语言 [J]. 芒种, 2014(9): 249-250.

[4] 沈斌, 保彬. 民间美术与图案学习: 谈以情造形 [J]. 南京艺术学院学报: 美术与设计版, 1988(4): 71.

[5] 颜实. 汉字意象: 汉字在装饰图案中的应用 [J]. 大众文艺, 2010

(23): 48-50.

[6] 高秋娟. 论民间工艺 [J]. 科技信息: 科学教研, 2007(29): 299.

[7] 林军. 湖南民间传统印染纹样的文化内涵与色彩特征分析 [J]. 湖南包装, 2017(1): 40-42.

[8] 李鑫莹, 肖小英. 梅山傩面艺术符号琐谈 [J]. 湖南包装, 2015 (3): 57-59.

[9] 王管坤. 中国精神的视觉转换: 包装设计中传统元素的运用案例分析 [J]. 湖南包装, 2015(3): 52-53.

[10] 童玲, 张剑. 传统食品包装设计流程研究 [J]. 食品与机械, 2016(9): 95-98.

[11] 熊逸越, 倪婕妤. 多感官设计在月饼包装中的运用 [J]. 牡丹江大学学报, 2012(2): 15-20.

[12] 杨珏青. “新长发”的栗子情节 [J]. 食品与生活, 2014(11): 21.

[13] 高扬. 现代包装设计的情感表达研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010: 10-18.