

# 绿豆蛋白 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的制备与鉴定

李永富<sup>1,2</sup>, 王雅茹<sup>1</sup>, 黄金荣<sup>1</sup>, 史 锋<sup>1</sup>

(1.江南大学食品学院, 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2.江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 采用胃-胰蛋白酶水解绿豆蛋白及其分级蛋白, 以水解物 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率为主要指标, 结合水解度、氨基酸组成及分子质量分析其抑制效果差异及原因。结果表明, 绿豆蛋白肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率最高, 为16.51%; 与绿豆分级蛋白相比, 绿豆蛋白的疏水氨基酸含量和水解度最高, 分别为32.68%和6.28%, 水解物的肽分子质量最小, 均小于20 kDa, 因此选用绿豆蛋白制备 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽。然后分离鉴定绿豆蛋白肽, 新发现了17条有潜在 $\alpha$ -淀粉酶抑制效果的肽。本研究表明绿豆蛋白较其分级蛋白具有更强的 $\alpha$ -淀粉酶抑制效果, 能够用于降血糖的功能性食品或药物中。

**关键词:** 绿豆蛋白; 水解;  $\alpha$ -淀粉酶抑制肽; 分离与鉴定

## Preparation and Identification of $\alpha$ -Amylase Inhibitory Peptides from Mung Bean Protein

LI Yongfu<sup>1,2</sup>, WANG Yaru<sup>1</sup>, HUANG Jinrong<sup>1</sup>, SHI Feng<sup>1</sup>

(1. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this study, sequential hydrolysis with pepsin followed by trypsin was conducted on total protein and protein fractions from mung bean. The difference in  $\alpha$ -amylase inhibitory activity among the resulting hydrolysates was compared and the underlying reason was analyzed in terms of degree of hydrolysis, amino acid composition and molecular mass. The results showed that the total protein hydrolysate had the highest  $\alpha$ -amylase inhibitory activity (16.51%). Compared with its fractions, the total protein showed the highest content of hydrophobic amino acids (32.68%) and degree of hydrolysis (6.28%), and the molecular mass of its hydrolysate was the lowest (< 20 kDa). Therefore, the total protein was selected to prepare  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides. Finally, 17 peptides with potential  $\alpha$ -amylase inhibitory activity were discovered by the isolation and identification of peptides from mung bean protein. This study suggests that mung bean protein is a better food source of  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides than its protein fractions, which can be used in blood glucose-lowering functional foods or drugs.

**Keywords:** mung bean protein; enzymatic hydrolysis;  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides; isolation and identification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230314-141

中图分类号: TS214.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0058-07

引文格式:

李永富, 王雅茹, 黄金荣, 等. 绿豆蛋白 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的制备与鉴定[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 58-64. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230314-141. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yongfu, WANG Yaru, HUANG Jinrong, et al. Preparation and identification of  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from mung bean protein[J]. Food Science, 2024, 45(1): 58-64. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230314-141. <http://www.spkx.net.cn>

随着生活水平的提高, 我国糖尿病发病率在1980—2017年增加了15倍以上<sup>[1]</sup>, 其中2型糖尿病占90%以上<sup>[2]</sup>。

目前2型糖尿病的治疗方式包括服用降糖药物和注射胰岛素。部分口服药物可作为 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂, 抑制酶活

收稿日期: 2023-03-14

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0400501)

第一作者简介: 李永富(1969—)(ORCID: 0000-0002-6196-3180), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为全谷物营养与工程、健康主食。E-mail: liyf@jiangnan.edu.cn

性, 阻断淀粉水解, 调控血糖水平<sup>[3]</sup>。然而药物治疗具有副作用大<sup>[4]</sup>、价格昂贵<sup>[5]</sup>、患者依从性差<sup>[6]</sup>等缺点, 因而寻找来自天然产物、安全有效的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂很有必要。

近年来, 食源性降糖肽显示出良好的研究前景, 多种植物已被证明能够产生 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽, 调控血糖水平, 如玉米<sup>[7]</sup>、荞麦<sup>[8]</sup>、大麦<sup>[9]</sup>、竹笋<sup>[10]</sup>等。在众多植物中, 绿豆蛋白具有含量高、提取方式简单等优势。已有研究证明, 食用绿豆蛋白可以有效改善糖脂代谢<sup>[11]</sup>。么杨<sup>[12]</sup>发现绿豆及绿豆芽可以显著降低糖尿病小鼠血糖水平和葡萄糖耐受性; 王琦等<sup>[13]</sup>使用凝胶层析从绿豆中提取并纯化出了蛋白质质量分数为84.7%的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂, 证实了绿豆蛋白作为 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂应用于糖尿病相关治疗中的可能性。

目前, 模拟胃肠道消化制备的绿豆蛋白及其分级蛋白肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制效果的研究较少, 因此本研究首先采用胃-胰蛋白酶水解绿豆蛋白及其分级蛋白(清蛋白、球蛋白、谷蛋白), 以 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率为主要指标, 筛选蛋白水解组分进行深入研究, 然后采用凝胶过滤柱层析(gel filtration column chromatography, GFC)和反相高效液相色谱(reversed phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)对其进行分离纯化, 最后采用纳米液相色谱-串联质谱(Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Nano LC-MS/MS)鉴定出具有 $\alpha$ -淀粉酶抑制效果的绿豆蛋白肽序列, 以为绿豆的降血糖活性提供更多依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

绿豆 无锡市朝阳粮油交易市场。

乙腈、三氯乙酸(均为色谱纯) 国药集团药业股份有限公司; 葡萄糖试剂盒 北京利德曼生化股份有限公司; 胃蛋白酶(2 500 U/mg)、胰蛋白酶(1 500 U/mg)、 $\alpha$ -淀粉酶(14 U/mg) Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司; 糖化酶(10 000 U/mL) 山东隆科特酶制剂有限公司; 所有分析用试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-2100分光光度计 美国UNICO公司; AKTA Avant 25蛋白纯化仪 美国通用电气医疗集团; 半制备HPLC仪 沃特世科技(上海)有限公司; Q-Exactive质谱仪 美国赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 绿豆蛋白及分级蛋白的分离提取

绿豆蛋白的提取参考侯佩琳<sup>[14]</sup>的方法, 略作修改。以脱脂绿豆粉为原料, 料水比1:15(g/mL)、pH 9.0、40 °C条件下提取20 min, 然后5 000 r/min离心10 min;

取上清液调节pH 4.0, 沉淀30 min, 5 000 r/min离心10 min, 保留底层沉淀, 透析、冻干, 即为绿豆蛋白。

绿豆分级蛋白的提取参考乔宁<sup>[15]</sup>的方法, 略作修改。以脱脂绿豆粉为原料, 料水比1:10(g/mL), 以去离子水浸提4 h, 离心, 调节上清液pH值至等电点并沉淀1 h, 离心、透析、冻干获得绿豆清蛋白; 向提取清蛋白后的残渣中以料液比1:10(g/mL)加入1 mol/L NaCl溶液浸提4 h, 离心、透析、冻干获得球蛋白; 向提取球蛋白后的残渣中以料液比1:10(g/mL)加入70%乙醇溶液浸提4 h, 离心、透析、冻干获得醇溶蛋白; 向提取醇溶蛋白后的残渣中以料液比1:10(g/mL)加入0.5 mol/L NaOH溶液浸提4 h, 使用三氯乙酸沉淀得到谷蛋白。蛋白纯度的测定采用凯氏定氮法。

#### 1.3.2 胃-胰蛋白酶水解制备肽

绿豆蛋白及其分级蛋白肽通过胃-胰蛋白酶水解进行制备, 参考Minekus等<sup>[16]</sup>的方法, 略作修改。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)配制分散液, 调节pH 2.0, 加入适量胃蛋白酶, 使体系中胃蛋白酶浓度达到2 000 U/mL, 37 °C水解2 h; 然后调节pH 7.0, 加入适量胰蛋白酶, 使体系中胰蛋白酶浓度达到325 U/mL, 37 °C水解6 h, 沸水浴30 min以灭酶, 冷却后8 000 r/min离心10 min, 上清液-20 °C保存。

#### 1.3.3 绿豆蛋白肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制效果的测定

参考Karimi等<sup>[7]</sup>的方法, 略作修改。样品组取0.5 mL水解液和0.5 mL  $\alpha$ -淀粉酶溶液(10 U/mL), 37 °C温育35 min, 加入2%的可溶性淀粉溶液1 mL, 37 °C反应10 min。取100  $\mu$ L反应液于900  $\mu$ L无水乙醇中灭酶, 10 000 r/min离心5 min, 取200  $\mu$ L上清液与1.5 mL葡萄糖氧化酶溶液混合, 37 °C反应10 min, 于520 nm波长处测定吸光度 $A$ 。对照组用PBS代替样品; 空白组用PBS代替淀粉。以阿卡波糖作阳性对照。 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率按下式计算:

$$\alpha\text{-淀粉酶活性抑制率}/\% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.3.4 水解度的测定

水解度的测定采用甲醛滴定法, 参照张小娟<sup>[17]</sup>的方法略作修改, 并按下式计算。5 mL水解液与60 mL去离子水混合均匀, 用0.1 mol/L NaOH标准溶液滴定至pH 8.2, 加入pH 8.2的甲醛溶液20 mL, 用0.1 mol/L NaOH标准溶液滴定至pH 9.2, 记录下第2次滴定消耗的0.1 mol/L NaOH溶液体积, 将样品换成去离子水后用同样的方法滴定作空白, 计算水解液中的游离氨基氮。采用凯氏定氮法测定样品中的总氮浓度。

$$\text{水解度}/\% = \frac{c}{c_{\text{tot}}} \times 100 \quad (2)$$

$$c = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 0.014 \times 100}{V} \quad (3)$$

式中： $c$ 为样品中的游离氨基氮浓度/(mol/L)； $c_{\text{tot}}$ 为样品中的总氮浓度/(mol/L)； $V_0$ 为滴定去离子水消耗的0.1 mol/L NaOH标准溶液体积/mL； $V_1$ 为滴定样品消耗的0.1 mol/L NaOH标准溶液体积/mL； $V$ 为样品总体积/mL； $N$ 为0.1 mol/L NaOH标准溶液的准确浓度/(mol/L)。

### 1.3.5 蛋白组成分析

参考刘潇等<sup>[18]</sup>的方法，略作修改。样品与上样缓冲液以1:1 (V/V) 配制，沸水浴3~5 min，10 000 r/min离心1 min，取上清液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳结束后，以考马斯亮蓝R-250染色30~40 min后，以去离子水脱色，用凝胶成像仪拍照分析。

### 1.3.6 氨基酸组成测定

根据GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定》进行。

### 1.3.7 肽分子质量的测定

采用HPLC分析水解液中的肽分子质量。色谱柱：TSK Gel 2000 SWXL (300 mm×7.8 mm)；流动相：乙腈、水、三氟乙酸；流速：0.5 mL/min；检测波长220 nm。

### 1.3.8 绿豆蛋白活性肽的纯化与鉴定

选择对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制效果最强的绿豆蛋白肽，采用GFC和RP-HPLC进一步纯化，最终以Nano LC-MS/MS鉴定肽序列。

#### 1.3.8.1 GFC

采用GFC纯化绿豆蛋白肽。凝胶柱：Superdux Peptide 10/300GL (24 mL)；洗脱条件：蒸馏水为洗脱液，洗脱体积1.5 CV，洗脱速率0.3 mL/min；检测波长220 nm。收集各个组分，测定各组分的 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率及肽分子质量，筛选出抑制率最高的组分进一步纯化。

#### 1.3.8.2 RP-HPLC

采用RP-HPLC进一步纯化。色谱柱：Waters Xbridge Prep C<sub>18</sub>柱；流动相A：90%超纯水+10%乙腈(包含0.1%三氟乙酸)；流动相B：90%乙腈+10%超纯水(包含0.1%三氟乙酸)；梯度洗脱程序：0~5 min, 90% A、10% B；5~30 min, 90%~40% A、10%~60% B；30~35 min, 40% A、60% B；35~55 min, 40%~10% A、60%~90% B；流速2 mL/min；进样量1 mL；检测波长220 nm。收集各个组分，测定各组分的 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率，筛选抑制率最高的组分鉴定肽序列。

#### 1.3.8.3 Nano LC-MS/MS鉴定肽序列

系统：串联EASY-Nano LC 1200的Q-Exactive质谱仪；分析柱：Acclaim Pep Map C<sub>18</sub> (75  $\mu$ m×25 cm)；

流动相A：80%乙腈+0.1%甲酸，流动相B：超纯水(含0.1%甲酸)；梯度洗脱程序：0~46 min, 0%~60% A、100%~40% B；46~50 min, 60%~100% A、40%~0% B；50~60 min, 100% A、0% B。流速400 nL/min；柱温40  $^{\circ}$ C；进样量1  $\mu$ L；电喷雾电压2 kV。

质谱仪在数据依赖采集模式下运行，自动在MS和MS/MS采集间切换。MS：扫描范围 $m/z$  200~1 800；分辨率70 000；自动增益控制目标值 $3 \times 10^6$ ；最大注入时间60 ms。高能碰撞解离-串联质谱：分辨率17 500；自动增益控制目标值 $5 \times 10^4$ ；最大注入时间80 ms；碰撞能量27 eV；动态排除时间20 s。

选取可信度在0.5以上的肽序列通过PeptideRanker预测生物活性，评分大于0.8的肽序列进行疏水性筛选，截取数值大于0.5的肽序列，通过BIOPEP等数据库进行查重。

### 1.4 数据分析

所有分析结果3个重复，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿豆蛋白及其分级蛋白的提取

表1显示：绿豆蛋白的纯度最高，为94.24%，其次分别是绿豆清蛋白(84.71%)、绿豆谷蛋白(81.89%)、绿豆球蛋白(75.71%)和绿豆醇溶蛋白(3.11%)。结果同李永武<sup>[19]</sup>的研究相符，在分级蛋白中含量最高的是清蛋白。因为绿豆蛋白中所含的醇溶蛋白较少，且乙醇提取物中会掺杂其他极性成分<sup>[20]</sup>，因此醇溶蛋白不作为本实验研究对象。

表1 绿豆蛋白及其分级蛋白纯度

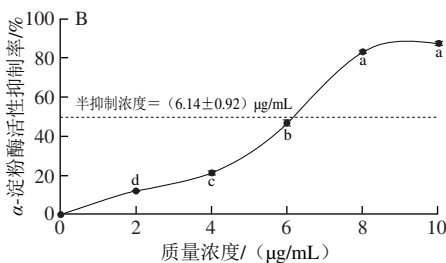
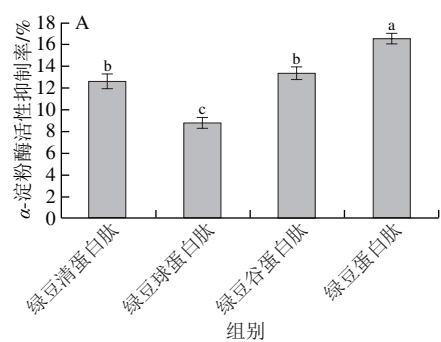
Table 1 Purity of mung bean protein and its protein fractions

蛋白种类	绿豆蛋白	绿豆清蛋白	绿豆球蛋白	绿豆醇溶蛋白	绿豆谷蛋白
蛋白纯度/%	94.24±0.68	84.71±0.20	75.71±0.41	3.11±0.22	81.89±0.32

### 2.2 绿豆蛋白及其分级蛋白肽对 $\alpha$ -淀粉酶抑制效果

采用胃-胰蛋白酶连续水解绿豆蛋白及其分级蛋白(绿豆清蛋白、球蛋白、谷蛋白)，并测定其肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率，结果如图1A所示，相同质量浓度下(4 mg/mL)，绿豆蛋白及其分级蛋白肽均对酶有抑制效果，但与阿卡波糖相比抑制率低(图1B)。其中绿豆蛋白肽对酶的抑制率最高，为16.51%。有研究表明，不同蛋白或肽之间可以通过协同效应来增强作用效果<sup>[21]</sup>，这可能是绿豆蛋白肽比其分级蛋白肽具有更高的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的原因。3个分级蛋白中，清蛋白肽和谷蛋白肽的抑制率较高，分别为12.59%和13.33% ( $P > 0.05$ )，球蛋白肽抑制率最低，为8.78%；这与Ninomiya<sup>[22]</sup>和Bozkurt<sup>[23]</sup>等的研究结果相符，他们发现荞麦清蛋白肽和小麦谷蛋白肽具有良好的降血糖活性。





A. 绿豆蛋白肽及分级蛋白肽; B. 阿卡波糖。不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图1 绿豆蛋白及其分级蛋白肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制效果

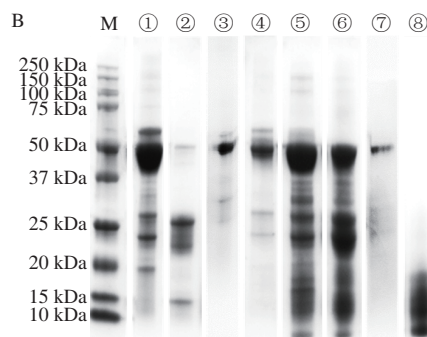
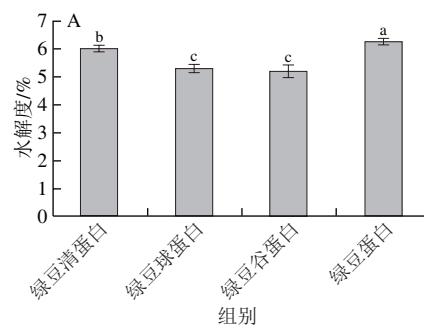
Fig. 1  $\alpha$ -Amylase inhibitory effects of peptides from mung bean protein and from its protein fractions

### 2.3 绿豆蛋白及其分级蛋白的水解程度分析

为了对比绿豆蛋白及其分级蛋白的水解程度, 探究它们在 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制方面产生差异的原因, 本研究测定4种蛋白的水解度及其水解前后的分子质量, 结果如图2所示。图2A显示, 4个蛋白水解度按照降序排列依次是绿豆蛋白(6.28%)、绿豆清蛋白(6.02%)、绿豆球蛋白(5.31%)和绿豆谷蛋白(5.20%)。这表明, 蛋白的水解度与其肽对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制率呈正相关, 水解程度越高, 分子质量越小, 对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率也越高, 这一结果同Vilcacundo等<sup>[24]</sup>的研究结果相近。但谷蛋白可能由于溶解度低而致使水解度较低<sup>[25]</sup>。

蛋白水解前后分子质量分布采用SDS-PAGE测定。由图2B可知, 绿豆蛋白的电泳条带出现在60、50、28、23 kDa, 此结果与曾志红等<sup>[26]</sup>对绿豆蛋白分子质量的测定结果基本相符。经过水解后, 绿豆蛋白肽在20 kDa以下出现均匀连续且颜色清晰的条带, 表明绿豆蛋白中的大分子蛋白被水解为小分子蛋白和肽, 与之相对应的是绿豆蛋白的水解度和其肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率最高。绿豆清蛋白和球蛋白的电泳条带分别出现在56、37~50、26、24、20 kDa和50、20~25、15 kDa。水解后, 绿豆清蛋白和球蛋白的肽在10~50 kDa之间出现连续条带, 表明与绿豆蛋白相比, 它们水解不完全, 仍有少部分大分子蛋白未被水解, 与之对应的是两种蛋白的水解度以及它们的肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率较低。绿豆谷蛋白仅在50 kDa处出现一条电泳条带, 可能是其溶解

度低<sup>[25]</sup>, 导致其含量低<sup>[27]</sup>。水解后, 绿豆谷蛋白肽的分子质量没有明显变化, 同样在50 kDa处出现一条条带, 但是相比于水解前, 条带细且色浅, 表明有部分大分子蛋白被水解, 所以其水解度最低。综上所述, 仅有绿豆蛋白被全部水解成分子质量小于20 kDa的肽段, 与其高水解度以及其肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的高抑制率结果相对应, 该结果支持了小分子肽对 $\alpha$ -淀粉酶具有高抑制率的理论<sup>[28]</sup>。



A. 绿豆蛋白及其分级蛋白的水解度; B. 绿豆蛋白及其分级蛋白的分子质量分布图(SDS-PAGE): M. Marker; ①绿豆清蛋白; ②绿豆球蛋白; ③绿豆谷蛋白; ④绿豆蛋白; ⑤绿豆清蛋白肽; ⑥绿豆球蛋白肽; ⑦绿豆谷蛋白肽; ⑧绿豆蛋白肽。

图2 绿豆蛋白及其分级蛋白的水解程度

Fig. 2 Degree of hydrolysis of mung bean protein and its protein fractions

### 2.4 绿豆蛋白及其分级蛋白中的氨基酸组成

蛋白质及肽的活性与其所含的氨基酸种类及含量密切相关<sup>[29]</sup>, 为进一步探索绿豆蛋白及其分级蛋白 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制差异的原因, 本研究测定了蛋白的氨基酸组成及质量分数, 结果如表2所示。4个蛋白的氨基酸组成及质量分数具有明显差异, 其中精氨酸含量按照降序排列依次是绿豆蛋白(7.23%)、清蛋白(6.48%)、谷蛋白(4.07%)、球蛋白(3.91%), 芳香族氨基酸含量按照降序排列依次是绿豆蛋白(8.73%)、清蛋白(7.92%)、谷蛋白(5.95%)、球蛋白(5.68%), 疏水氨基酸含量按照降序排列依次是绿豆蛋白(32.68%)、清蛋白(29.32%)、球蛋白(23.02%)、谷蛋白(20.77%)。有研究表明, 精氨酸、芳香族氨基酸、疏水氨基酸的高含量与强生物活性功能相关, 包括高抗氧

化、脂肪酶抑制、 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性<sup>[30]</sup>。因此绿豆蛋白中的高精氨酸、芳香族氨基酸和疏水氨基酸含量，可能是其肽具有高 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的原因之一。此外，同3个分级蛋白相比，绿豆蛋白中含有更多的苯丙氨酸、亮氨酸、酪氨酸和精氨酸残基等胃-胰蛋白酶的切割位点，因此绿豆蛋白的水解程度最高，这有助于提升其肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制效果。

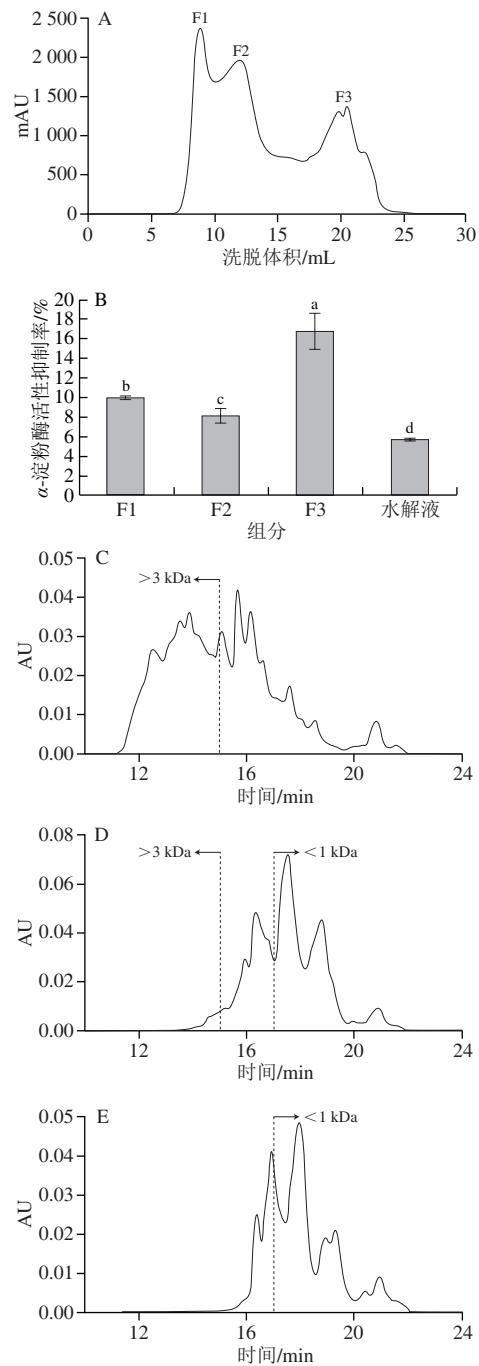
表2 绿豆蛋白及其分级蛋白氨基酸组成  
Table 2 Amino acid composition of mung bean protein and its protein fractions

氨基酸	绿豆清蛋白	绿豆球蛋白	绿豆谷蛋白	绿豆蛋白
天冬氨酸	10.50	5.54	6.39	11.73
谷氨酸	17.28	10.23	9.80	19.32
丝氨酸	3.47	3.39	2.89	3.90
苏氨酸	2.52	1.49	2.02	2.70
半胱氨酸	0.05	0.44	0.11	0.091
蛋氨酸	0.96	1.05	0.96	1.04
组氨酸	2.55	0.80	1.45	2.66
精氨酸	6.48	3.91	4.07	7.23
赖氨酸	6.29	4.04	3.54	6.99
丙氨酸	3.56	3.24	2.95	3.97
缬氨酸	5.58	4.12	3.69	6.25
异亮氨酸	4.57	2.83	3.07	5.09
亮氨酸	7.69	6.85	5.11	8.64
酪氨酸	2.08	1.87	1.80	2.21
苯丙氨酸	5.84	3.81	3.49	6.52
色氨酸	0.29	0.31	0.66	0.36
甘氨酸	3.05	3.36	3.076	3.41
脯氨酸	4.34	5.50	3.78	5.69
氨基酸总质量分数	87.091	62.77	58.86	97.79
芳香族氨基酸质量分数	7.92	5.68	5.95	8.73
疏水氨基酸质量分数	29.32	23.02	20.77	32.68

## 2.5 绿豆蛋白肽的纯化与鉴定

### 2.5.1 GFC测定结果

选择 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性最强的绿豆蛋白肽进行进一步纯化，结果如图3A所示，经过纯化，绿豆蛋白肽被分为3个组分（F1、F2、F3）。在相同质量浓度下（0.18 mg/mL），3个组分对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率均显著高于水解液（ $P < 0.05$ ）（图3B）。其中抑制率最高的组分是F3，为16.80%，显著高于其他组分（ $P < 0.05$ ）。测定3个组分中肽的分子质量，结果如图3C~E所示，分子质量范围为F1（3~7 kDa）> F2（1~3 kDa）> F3（小于1 kDa）。这一结果与Vilcacundo等<sup>[24]</sup>的结果一致，即分子质量是影响肽生理活性，包括 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的重要因素之一，小分子质量的肽更易抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性。因此，选择F3组分进一步纯化。



A. 绿豆蛋白活性肽的GFC图；B. 各组分的 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率；C~E. 分别为F1、F2、F3组分中肽的分子质量分布图。

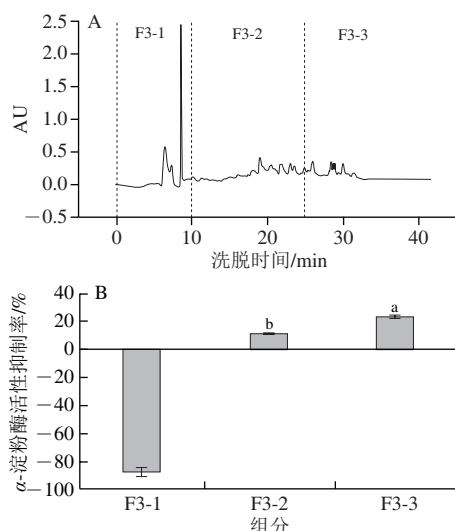
图3 绿豆蛋白水解物的GFC图及3个组分的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性和分子质量分布

Fig. 3 GFC chromatogram of mung bean protein hydrolysate and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity and molecular mass distribution of its three fractions

### 2.5.2 RP-HPLC测定结果

采用Waters Xbridge Prep C<sub>18</sub>柱F3组分进一步纯化，根据时间收集得到如图4A所示的3个组分（F3-1、F3-2、F3-3），测定对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制效果。结果如图4B

所示, 相同质量浓度下 (0.18 mg/mL), 3 个组分对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制效果具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。F3-1 不仅不能抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性, 反而促进了 $\alpha$ -淀粉酶对淀粉的水解, 推测原因可能有两点, 一方面是先出峰的物质疏水性差, 分子质量大, 难以与 $\alpha$ -淀粉酶的活性中心结合, 从而无法对其产生抑制作用; 另一方面是先出峰的物质极性很强, 表面电荷分布不均匀, 其中与 $\alpha$ -淀粉酶带同种电荷的肽段与酶形成一定距离时可能对其产生了微弱的斥力, 使其能更好地发挥催化活性, 从而促进了酶对淀粉的消化<sup>[31-32]</sup>。而F3-2和F3-3组分均对 $\alpha$ -淀粉酶活性产生了抑制作用, 抑制率分别为11.40%和23.37%。其中F3-3组分对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制作用最强。这表明疏水性是影响肽对 $\alpha$ -淀粉酶抑制效果的重要因素之一, 疏水性越强, 肽对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制率可能也就越强。因此, 选择F3-3组分鉴定肽序列。



A. F3组分的RP-HPLC图; B. 各组分的 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率。

图4 F3组分RP-HPLC的纯化及它们的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性

Fig. 4 RP-HPLC chromatogram of fraction F3 and  $\alpha$ -amylase-inhibitory activity of its three subfractions

### 2.5.3 Nano LC-MS/MS测定结果

通过GFC和RP-HPLC将绿豆蛋白水解物分离纯化, 得到了对 $\alpha$ -淀粉酶活性有最高抑制作用的F3-3组分, 通过Nano HPLC-MS/MS对其肽序列进行鉴定。经过置信度 ( $> 50\%$ )、生物活性评分 ( $> 0.8$ )、疏水性数值 ( $> 0.5$ ) 后及BIOPEP数据库查重后, 得到32条肽序列, 其中17条为本研究首次发现。如表3所示, F3-3中检测得到的肽序列的分子质量基本分布在0.3~1.0 kDa。刘欢<sup>[33]</sup>分离纯化得到的茶籽粕 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的分子质量范围同样主要分布在0.3~1 kDa。这一结果表明肽的分子质量与肽的生物活性密切相关, 小分子肽能够与 $\alpha$ -淀粉酶活性中心残基形成稳定的氢键结合, 抑制活性更好。同时, 疏水性也在肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制中发挥了重要作用, 相关研究表明, 含有更多疏水氨基酸,

如苯丙氨酸 (F)<sup>[34]</sup>、亮氨酸 (L)<sup>[35]</sup>残基的肽序列, 具有抑制 $\alpha$ -淀粉酶活性的潜能, F3-3组分的强抑制活性可能与此相关。此外, Ngho等<sup>[34]</sup>对豆类中的 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的研究结果表明, 存在特定二肽 (PP、LL、YY) 组合的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂具有更高的潜力, 与本研究中的肽序列 (ILLLLCCF、LLLLLILFLPMLL、LLAF、ILLLIFPF) 一致。

生物活性肽的另一个重要特性是氨基酸残基在肽序列中的位置。相关研究表明, C/N末端存在亮氨酸 (L)<sup>[36]</sup>或苯丙氨酸 (F)<sup>[24,34]</sup>残基的肽序列具有更高的 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制潜力, 这可能与肽和 $\alpha$ -淀粉酶残基之间的芳香族-芳香族残基相互作用形成的氢键、静电力和范德华力与肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制作用密切相关<sup>[37]</sup>, 本研究中的肽序列 (LILLLLF、LIF、LAFI等) 也符合这一规律。因此, 结合过往诸多研究, 本研究所发现的绿豆蛋白肽具有良好的 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制效果, 有助于为绿豆蛋白在防治糖尿病方面提供新的依据。

表3 F3-3组分中 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的序列  
Table 3 Sequence analysis of  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides in subfraction F3-3

序号	肽序列	生物活性评分	疏水性数值	分子质量/Da	BIOPEP数据库查询
1	IFL	0.902	3.700	391.247	抗菌肽
2	ILF	0.884	3.700	391.247	DPP-III抑制剂
3	LFL	0.945	3.467	391.247	ACE抑制剂
4	LLF	0.939	3.467	391.247	ACE抑制剂
5	FCV	0.874	3.167	367.157	ACE抑制剂
6	MIF	0.967	3.067	409.204	ACE抑制剂
7	ALLF	0.883	3.050	462.284	抗菌肽
8	FALL	0.852	3.050	462.284	抗菌肽
9	IAF	0.820	3.033	349.200	还原抑制剂、ACE抑制剂
10	AIF	0.833	3.033	349.200	Brevinin-1EA
11	VMF	0.907	2.967	395.188	抗氧化、锌结合肽
12	IHW	0.819	2.700	430.258	抗氧化、抗炎肽
13	LPLPL	0.816	1.640	551.717	DPP-IV抑制剂, 抗癌、降压肽
14	QIGLF	0.851	1.440	576.683	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂、ACE抑制剂
15	FAMD	0.816	0.750	482.550	DPP-IV抑制剂
16	LILLLLF	0.801	3.757	843.583	—
17	LIF	0.866	3.700	391.247	—
18	LFI	0.849	3.700	391.247	—
19	IFVF	0.887	3.575	524.299	—
20	ILLLLCCF	0.828	3.438	936.518	—
21	LFVF	0.932	3.400	524.299	—
22	LLLLLILFLPMLL	0.917	3.257	1 637.097	—
23	AILF	0.833	3.225	462.284	—
24	ALIF	0.816	3.225	462.284	—
25	MVLF	0.846	3.175	508.272	—
26	IMF	0.970	3.067	409.204	—
27	ILLLIFPF	0.894	3.050	974.620	—
28	LLAF	0.814	3.050	462.284	—
29	LAFI	0.814	3.050	462.284	—
30	FLA	0.886	2.800	349.200	—
31	SLLF	0.871	2.400	478.279	—
32	FVPP	0.865	0.950	458.253	—

注: DPP-III抑制剂表示二肽基肽酶-III抑制剂; ACE抑制剂表示血管紧张素转换酶抑制剂; DPP-IV抑制剂表示二肽基肽酶-IV抑制剂; —. 该多肽序列在BIOPEP数据库中未发现。



### 3 结论

在本研究中,通过胃-胰蛋白酶水解绿豆蛋白及其分级蛋白(清蛋白、球蛋白、谷蛋白),发现绿豆蛋白肽对 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制率最高(16.51%)。这可能与绿豆蛋白的水解度和疏水氨基酸含量较高有关,进一步对绿豆蛋白肽进行分离纯化与肽序列鉴定,发现了32条具有 $\alpha$ -淀粉酶活性抑制潜力的肽,其中17条是首次发现,这为绿豆的降血糖活性提供了科学依据。

### 参考文献:

- [1] LI Y Z, TENG D, SHI X G, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study[J]. *British Medical Journal*, 2020, 369: m997. DOI:10.1136/bmj.m997.
- [2] 王富军, 王文琦.《中国2型糖尿病防治指南(2020年版)》解读[J]. *河北医科大学学报*, 2021, 42(12): 1365-1371. DOI:10.3969/j.issn.1007-3205.2021.12.001.
- [3] LU Y, ZHOU W, FENG Y, et al. Acteoside and acyl-migrated acteoside, compounds in Chinese kudingcha tea, inhibit  $\alpha$ -amylase *in vitro*[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2017, 20(6): 577-585. DOI:10.1089/jmf.2016.3910.
- [4] 随华, 耿秀琴, 刘纯, 等. 应用磺脲类药物和二甲双胍治疗2型糖尿病失效后补充第3种降糖药的选择[J]. *中国药房*, 2010, 21(2): 152-154. DOI:CNKI:SUN:ZGYA.0.2010-02-030.
- [5] 范丽凤, 陆菊明. 糖尿病口服降糖药的临床应用进展[J]. *实用护理杂志*, 2003(3): 74-76. DOI:10.3760/cma.j.issn.1672-7088.2003.03.053.
- [6] 侯清涛, 李芸, 李舍予, 等. 全球糖尿病疾病负担现状[J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(1): 92-96. DOI:10.3760/cma.j.issn.1672-7088.2003.03.053.
- [7] KARIMI A, AZIZI M H, AHMADI G H. Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: *in vitro* antidiabetic and antioxidant activity[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(5): 2395-2405. DOI:10.1002/fsn3.1529.
- [8] SALAMI M, MOTAHARR S F S, ARIAEENEJAD S, et al. The novel homologue of the human  $\alpha$ -glucosidase inhibited by the non-germinated and germinated quinoa protein hydrolysates after *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(1): e14030. DOI:10.1111/jfbc.14030.
- [9] PATTARATHITIWAT P, CHINVONGAMORN C, SANSENYA S. Evaluation of cyanide content, volatile compounds profile, and biological properties of fresh and boiled sliced thai bamboo shoot (*Dendrocalamus asper* Back.)[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2021, 26(1): 92-99. DOI:10.3746/pnf.2021.26.1.92.
- [10] ALU'DATT M H, EREIFEJ K, ABUZANTOI A, et al. Anti-oxidant, anti-diabetic, and anti-hypertensive effects of extracted phenolics and hydrolyzed peptides from barley protein fractions[J]. *International Journal of Food Properties*, 2012, 15(4): 781-795. DOI:10.1080/10942912.2010.503357.
- [11] KOHNO M, SUGANO H, SHIGIARA Y, et al. Improvement of glucose and lipid metabolism via mung bean protein consumption: clinical trials of GLUCODIA (TM) isolated mung bean protein in the USA and Canada[J]. *Journal of Nutritional Science*, 2018, 7: e2. DOI:10.1017/jns.2017.68.
- [12] 么杨. 绿豆降血糖活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2008: 69-70.
- [13] 王琦, 王荣. 绿豆中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提取工艺研究[J]. *长治学院学报*, 2014, 31(2): 20-23. DOI:CNKI:SUN:JDNS.0.2014-02-006.
- [14] 侯佩琳. 绿豆蛋白水解物制备及其降血脂作用的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2020: 61.
- [15] 乔宁. 绿豆(*Vigna radiata*)蛋白的提取及其功能性质研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2014: 16.
- [16] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus[J]. *Food & Function*, 2014, 5(6): 1113-1124. DOI:10.1039/c3fo60702j.
- [17] 张小娟. 牛皮胶原蛋白的水解及其抗氧化性研究[D]. 西安: 西北大学, 2012: 18-22.
- [18] 刘潇, 秦鉴薪, 李江华, 等. 谷氨酰胺转氨酶对高水分豌豆蛋白挤出物结构及消化特性的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(5): 1-8. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221009-065.
- [19] 李永武. 绿豆清蛋白的提取及其功能特性和理化性质研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014: 7-8.
- [20] 康维良. 绿豆皮黄酮提取纯化及不同储藏条件下黄酮的特性变化[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020: 69.
- [21] 吴丹. 青虾-玉米双源蛋白肽协同改善东莨菪碱诱导记忆损伤的机理研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020: 125-126.
- [22] NINOMIYA K, YAMAGUCHI Y, SHINMACHI F, et al. Suppression of postprandial blood glucose elevation by buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) albumin hydrolysate and identification of the peptide responsible to the function[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(4): 992-998. DOI:10.1016/j.fshw.2022.03.026.
- [23] BOZKURT F, BEKIROGLU H, DOGAN K, et al. Technological and bioactive properties of wheat glutenin hydrolysates prepared with various commercial proteases[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 149: 111787. DOI:10.1016/j.lwt.2021.111787.
- [24] VILCACUNDO R, MARTINEZ V C, HERNÁNDEZ L B. Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 35: 531-539. DOI:10.1016/j.jff.2017.06.024.
- [25] 乔宁, 张坤生, 任云霞. 绿豆中四种蛋白质的分级提取与功能性质研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(17): 83-87. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.17.009.
- [26] 曾志红, 王强, 林伟静, 等. 绿豆蛋白营养及功能特性分析[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(6): 51-55. DOI:10.3969/j.issn.1003-0174.2012.06.011.
- [27] 王海东, 张红印, 曹璐, 等. 五味子四种组分蛋白结构、理化性质和功能特性比较[J/OL]. *食品与发酵工业*, 2022. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033949.
- [28] MUDGIL P, KAMAL H, KILARI B P, et al. Simulated gastrointestinal digestion of camel and bovine casein hydrolysates: identification and characterization of novel anti-diabetic bioactive peptides[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353(1): 129374. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129374.
- [29] 侯娜, 赵莉莉, 魏安智, 等. 不同种质花椒氨基酸组成及营养价值评价[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 113-118. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718018.
- [30] MIRZAPOUR K A, GARCIA V M, EUN J B, et al. Influence of enzymatic hydrolysis and molecular weight fractionation on the antioxidant and lipase/ $\alpha$ -amylase inhibitory activities *in vitro* of watermelon seed protein hydrolysates[J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7897. DOI:10.3390/molecules27227897.
- [31] 刘荣娜. 酶的催化反应规律及不同蛋白质之间相互作用本质研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2017: 24-30.
- [32] 李传博, 鲁明杰, 张庆芳, 等. 人工设计短肽PF1和PF2的克隆表达及其对葡萄糖氧化酶活性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(22): 215-220. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20211223-271.
- [33] 刘欢. 茶籽粕 $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的制备、筛选及活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021: 51.
- [34] NGOH Y Y, GAN C Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto)[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 331-337. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.05.120.
- [35] 苏娜, 伊丽, 吉日本图. 驼乳蛋白淀粉酶抑制活性肽的制备与鉴定[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 148-157. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190926-319.
- [36] ADMASSU H, GASMALLA M A A, YANG R, et al. Identification of bioactive peptides with  $\alpha$ -amylase inhibitory potential from enzymatic protein hydrolysates of red seaweed (*Porphyra* spp.)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(19): 4872-4882. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00960.
- [37] VALENZUELA ZAMUDIO F, SEGURA CAMPOS M R. Amaranth, quinoa and chia bioactive peptides: a comprehensive review on three ancient grains and their potential role in management and prevention of type 2 diabetes[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 62(10): 2707-2721. DOI: 10.1080/10408398.2020.1857683.