陶莉, 王俊彤, 李冠龙, 等. 玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的酶法制备及其性质研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 289−299. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010123

TAO Li, WANG Juntong, LI Guanlong, et al. Enzymatic Preparation and Characterization of DPP-IV Inhibitory Peptides Derived from Corn Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 289−299. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010123

·工艺技术·

玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的酶法制备及其性质研究

陶　莉[1], 王俊彤[1,2], 李冠龙[3], 姜彩霞[4], 郑喜群[1,2,3,*], 刘晓兰[3,*]

（1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;
2.粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心, 黑龙江大庆 163319;
3.齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;
4.黑龙江八一农垦大学国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319）

摘　要: 本文以玉米蛋白粉为原料制备对二肽基肽酶（Dipeptidyl peptidase-IV，DPP-IV）具有抑制作用的生物活性肽。采用酶法制备技术筛选出对 DPP-IV 抑制效果最佳的蛋白酶，通过单因素及响应面优化试验确定最佳酶解条件，并进一步对制得的抑制肽进行分子量分布、超滤分级及氨基酸组成等分析。结果表明：中性蛋白酶制备玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的效果最佳，工艺优化得到的最佳酶解条件为底物浓度 10%（w/v）、酶添加量 640 U/g、酶解时间 157 min、酶解温度 45 ℃、酶解 pH7.0。该条件下得到的抑制肽对 DPP-IV 的半抑制浓度（Half-inhibitory concentration，IC_{50}）值为 0.53±0.06 mg/mL。超滤分级后小于 1 kDa 组分分子量占原抑制肽的 58.9%，对 DPP-IV 的抑制活性高于原抑制肽，这与其氨基酸组成有关。酶促反应动力学分析结果表明制备的抑制肽对 DPP-IV 的抑制类型属于竞争性可逆抑制。本研究结果为玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的开发利用提供了理论依据，为玉米蛋白的高值化利用提供新思路。

关键词: 玉米蛋白源抑制肽, 中性蛋白酶, 二肽基肽酶-IV（DPP-IV）, 2 型糖尿病（T2DM）
中图分类号: TS210.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0289−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010123　　本文网刊:

Enzymatic Preparation and Characterization of DPP-IV Inhibitory Peptides Derived from Corn Protein

TAO Li[1], WANG Juntong[1,2], LI Guanlong[3], JIANG Caixia[4], ZHENG Xiqun[1,2,3,*], LIU Xiaolan[3,*]

（1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2.Engineering Research Center of Processing and Utilization of Grain By-products and Utilization of Ministry of Education, Daqing 163319, China;
3.College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;
4.National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China）

Abstract: In this work, bioactive peptides with inhibitory effect on dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) were prepared from corn protein meal. The protease with the best inhibitory effect on DPP-IV was selected by enzymatic preparation technique,

收稿日期: 2025−01−14
基金项目: 中央引导地方科技发展专项（ZY23QY06）; 黑龙江省自然科学基金资助项目（YQ2020C036）; 黑龙江八一农垦大学学成、引进人才科研启动计划项目（XYB201916）。

作者简介: 陶莉（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程, E-mail: 18345958635@163.com。
*** 通信作者:** 郑喜群（1963−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程, E-mail: zhengxiqun@126.com。
刘晓兰（1962−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程, E-mail: liuxiaolan001@126.com。

and the optimal enzymatic hydrolysis conditions were determined by single factor and response surface optimization experiments. The molecular weight distribution, ultrafiltration classification and amino acid composition of the obtained inhibitory peptides were further analyzed. The results showed that the neutral protease had the best effect on the preparation of DPP-IV inhibitory peptide from corn protein source. The optimal enzymolysis conditions were substrate concentration of 10% (w/v), enzyme dosage of 640 U/g, enzymolysis time of 157 min, enzymolysis temperature of 45 ℃ and enzymolysis pH of 7.0. The half-inhibitory concentration (IC_{50}) value of DPP-IV for the inhibitory peptide obtained under this condition was 0.53±0.06 mg/mL. After ultrafiltration, the molecular weight of components less than 1 kDa accounted for 58.9% of the original inhibitory peptide, and the inhibitory activity against DPP-IV was higher than that of the original inhibitory peptide, which was related to its amino acid composition. The results of enzymatic reaction kinetics showed that the inhibition type of DPP-IV was competitive and reversible. The results of this study provide a theoretical basis for the development and utilization of DPP-IV inhibitory peptide from corn protein source, and suggest a new idea for the high-value utilization of corn protein.

Key words: corn-protein-derived inhibitory peptides; neutral protease; dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV); type 2 diabetes (T2DM)

糖尿病是一种以持续性高血糖为特征的代谢性疾病, 主要包括 1 型和 2 型糖尿病两大类, 其中 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)占比高达 90%~95%[1]。T2DM 是由于胰岛素分泌不足、敏感度低或二者协同作用引起的机体营养代谢紊乱[2]。研究发现, 目前治疗 T2DM 的办法主要有以下几种途径: 合成钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂、α-葡萄糖苷酶抑制剂、胰高血糖素样肽-1(Glucagon-like peptide-1, GLP-1)受体激活剂和二肽基肽酶-IV(Dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)抑制剂等[3−4]。GLP-1 是一种重要的肠促胰岛素激素, 能够刺激胰岛素的分泌, 降低血糖水平, 同时还具有抑制食欲、减缓胃排空等功能。但 DPP-IV 可以快速降解 GLP-1, 使机体胰岛素分泌量降低, 进而导致机体血糖水平较高[5]。通过抑制 DPP-IV 的活性可以减少体内 GLP-1 的降解, 延长 GLP-1 在机体内的半衰期, 从而维持机体正常的血糖水平[6]。基于此, DPP-IV 的抑制已成为治疗 T2DM 的一个重要靶点。

DPP-IV 是一种广泛存在于人体中的丝氨酸蛋白酶, 目前市面上常见的 DPP-IV 抑制剂有西格列汀(Sitag liptin)、维格列汀(Vildagliptin)、沙格列汀(Saxag liptin)等, 但药物治疗往往伴随一定的副作用, 通过食源性生物活性肽干预抑制 DPP-IV 活性则具有稳定性好, 副作用小等优点[7]。Nongonierma 等[8]总结了 50 种对 DPP-IV 半抑制浓度(Half-inhibitory concentration, IC_{50})值小于 100 μmol/L 的多肽物质, 其长度均在 2~17 个氨基酸残基之间。这些有效的 DPP-IV 抑制肽广泛来源于乳(牛、马和骆驼)、鱼、小麦和棕榈藻等食物蛋白。王凤[9]结合体外和计算机生物信息学分析研究了燕麦酶解产物的 DPP-IV 抑制活性, 从中分离纯化并鉴定出新型肽 LQAFEPLR 对 DPP-IV 具有较高的体外抑制活性。Amin 等[10]将玉米胚芽粕经 3 种蛋白酶水解得出的玉米胚芽蛋白水解物(CGPH)及其组分具有良好的抗氧化活性、α-葡萄糖苷酶和 DPP-IV 抑制活性。至此寻找食源性 DPP-IV 抑制肽依旧是人们关注并不断努力的方向。

玉米蛋白粉是玉米湿法生产淀粉过程中的主要副产物之一, 富含蛋白质, 主要由醇溶蛋白和谷蛋白组成, 但二者致密的蛋白结构导致其水溶性差, 生物利用度低[11]。研究发现, 玉米蛋白一级结构中存在许多具有潜在生物活性的特征序列, 是制备生物活性肽的优质原料。Narasimha 等[12]发现玉米蛋白源生物活性肽具有抗氧化、降血压、醒酒护肝等活性。Mochida 等[13]研究发现玉米醇溶蛋白水解物(ZeinH)可刺激小鼠产生胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的肠内分泌细胞系以及大鼠小肠(尤其是回肠)中 GLP-1 的分泌。同时可以降低回肠静脉血浆中 DPP-IV 的活性。由此推测玉米蛋白可能是 DPP-IV 抑制肽的潜在来源, 但目前关于玉米蛋白源 DPP-IV 生物活性抑制肽的研究鲜有报道。因此, 本研究以玉米蛋白粉为原料, 采用酶法修饰制备 DPP-IV 活性抑制肽, 并对抑制肽的性质进行了研究。本研究为拓宽玉米蛋白利用提供新出路, 为增加玉米蛋白源功能食品种类提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

玉米蛋白粉(总蛋白 64.2%) 京粮龙江生物工程有限公司; α-淀粉酶(≥3700 U/g) 北京奥博星生物技术责任有限公司; 碱性蛋白酶(240000 U/mL)、中性蛋白酶(80000 U/mL)、复合蛋白酶(200000 U/mL)、风味蛋白酶(150000 U/mL) 丹麦诺维信生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶(8000 U/g) 上海源叶生物科技有限公司; 二肽基肽酶-IV(DPP-IV)、甘氨酰-脯氨酰-对硝基苯胺对甲苯磺酸盐(Gly-Pro-pNA) 美国 Sigma 公司; 多肽 IPI(阳性对照) 青岛奎羚生物科技有限公司。

MT70 双螺杆挤压膨化机 济南美腾机械有限公司; BA124S 电子天平 赛多利斯科学仪器有限责任公司; ZNCL-GS 磁力加热搅拌器 荣华仪器制造有限公司; PC/PLC-LD-53 冷冻干燥机 美国 MILLROCK; TD 离心机 湖南湘仪实验室仪器开

发有限公司; PB-10 pH 计　上海精密科学仪器有限公司; EnSpire 多功能酶标仪　珀金埃尔默股份有限公司; TU-810 紫外可见分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司; HYM-Multi-RN 多功能实验分离机　厦门昊源膜科技有限公司; AKTA avant 智能蛋白质纯化色谱仪　GE 生命科学有限公司; L-8900 全自动氨基酸分析仪　日本日立公司。

1.2　实验方法

1.2.1　玉米蛋白粉预处理　参考 Li 等[14] 的处理方法, 将挤压膨化后的玉米蛋白粉进行脱淀粉处理。调节玉米蛋白粉含水量至 16%, 采用双螺杆挤压膨化机在 160~180 ℃, 1.0~1.5 MPa 条件下进行膨化。膨化后的玉米蛋白粉在室温下干燥、粉碎后, 过 60 目筛。称取 200 g 膨化处理后的玉米蛋白粉原料, 加入 2000 mL 去离子水, 玻璃棒搅拌使其充分混匀制得 10%(w/v)的悬浮液, 用 1 mol/L 稀盐酸溶液调节溶液 pH 至 6.5。将烧杯放置于智能磁力搅拌器中, 在 65 ℃、转速 900 r/min 条件下进行去淀粉处理, α-淀粉酶加酶量为 1%(w/w), 反应过程中通过加入 1 mol/L NaOH 维持溶液 pH 稳定在 6.5, 反应时间 2 h, 反应结束后放置在沸水浴中灭酶 15 min, 然后冷却至室温, 在 10000 r/min 条件下离心 10 min, 用去离子水洗涤离心沉淀 3 次, 将沉淀晾干, 备用。预处理后的玉米蛋白粉的总蛋白质含量为 80.57%。

1.2.2　玉米蛋白抑制肽的制备　参考韦雅虹等[15] 酶解方法, 将预处理后的玉米蛋白粉按 10%(w/v)固液比分散于去离子水中。采用恒温水浴并在磁力搅拌的作用下, 将溶液体系加热至蛋白酶的最适温度, 用 1 mol/L NaOH 调节至蛋白酶的最适反应 pH 后加入相应蛋白酶, 开始计算反应时间。反应期间用 1 mol/L NaOH 调节溶液的 pH, 使其始终保持在最适反应 pH, 并记录 NaOH 的用量。反应结束后, 进行沸水浴灭酶 15 min, 冷却后离心, 保留上清液, 即为玉米蛋白抑制肽。

1.2.3　蛋白酶的筛选　根据 1.2.2 中抑制肽的制备方法, 分别选用表 1 中五种蛋白酶酶解玉米蛋白, 酶解体系为 200 mL, 酶添加量 1000 U/g, 酶解温度和 pH 如表 1。以碱性蛋白酶为例, 将预处理后的玉米蛋白粉按 10%(w/v)料液比分散于去离子水中, 采用恒温水浴并在磁力搅拌的作用下将溶液加热至 50 ℃, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.5 后加入碱性蛋白酶, 开始计时, 反应 4 h。反应期间用 1 mol/L NaOH 调节溶液的 pH, 使溶液始终保持 pH8.5, 记录 NaOH 的用量。反应结束后, 对溶液进行灭酶、冷却、离心, 保留上清液, 即为玉米蛋白-碱性蛋白酶抑制肽。并结合 1.2.4~1.2.6 的评价指标进行蛋白酶的筛选。

表 1　不同蛋白酶的最适反应条件

Table 1　Optimal reaction conditions of different proteases

蛋白酶种类	温度(℃)	pH
碱性蛋白酶	50	8.5
中性蛋白酶	45	7.0
复合蛋白酶	50	7.5
木瓜蛋白酶	50	7.0
风味蛋白酶	50	7.0

1.2.4　可溶性蛋白含量的测定　采用 Folin-酚法测定样品中可溶性蛋白含量[9]。以牛血清蛋白(标准蛋白)浓度(μg/mL)为横坐标, 反应吸光度($Abs_{650\ nm}$)为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线为 y=2.0131x+0.0751(R^2=0.9987), 依据测得的吸光度值即可计算样品中的可溶性蛋白含量。

1.2.5　玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 抑制率的测定　抑制肽对 DPP-IV 抑制率的测定根据 Matheeussen 等[16] 的方法略有改动。本试验使用的缓冲液均为 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0), DPP-IV 的浓度为 100 ng/mL, 发光底物 Gly-Pro-pNA 的浓度为 100 μmol/L。依据酶解液中可溶性蛋白含量测定结果, 将酶解液稀释至蛋白浓度 1 mg/mL, 然后进行 DPP-IV 抑制率的测定[17], 多肽 IPI 作为阳性对照(IPI 是已报道的高效 DPP-IV 抑制肽[18])。

分别于 96 孔板中加入 50 μL 缓冲液(对照空白组)、40 μL 缓冲液+10 μL DPP-IV 酶(对照组)、40 μL 样品+10 μL 缓冲液(样品空白组)、40 μL 样品+10 μL DPP-IV 酶(样品组), 每组三个平行, 37 ℃ 培养 10 min 后分别向各孔内加入 50 μL 底物, 继续 37 ℃ 培养 1 h 后在 405 nm 处测定各孔吸光值。

$$\text{DPP-IV抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照组}-\text{对照空白})-(\text{样品组}-\text{样品空白组})}{\text{对照组}-\text{对照空白}}\times 100$$

1.2.6　水解度的测定　采用 pH-stat 法测定玉米蛋白的水解度[19]。根据 1.2.2 中抑制肽的制备方法, 在酶解过程中以 1 mol/L NaOH 溶液调节酶解 pH, 使 pH 始终保持在蛋白酶最适 pH, 记录 NaOH 溶液的用量, 根据水解度公式计算玉米蛋白的水解度(DH):

$$DH(\%) = \frac{V_{NaOH}\times C_{NaOH}}{\alpha\times Mp\times htot}\times 100$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}}$$

式中: V_{NaOH}: 消耗的 NaOH 溶液体积; C_{NaOH}: NaOH 溶液浓度; pH: 蛋白酶的最适 pH; pK: 氨基酸的解离常数, 取 7.0 进行计算; Mp: 参与反应的玉米蛋白总量(g); htot: 每克蛋白质中肽键的总数(mmol/g), 玉米蛋白的 htot 为 8.38 mmol/g。

1.2.7　单因素实验设计　以反应体系 200 mL、底物浓度 10%(w/v)、酶添加量 800 U/g、酶解时间 180 min、酶解温度 45 ℃、pH7.0 为初始条件。分别优化酶添加量(400、600、800、1000、1200 U/g); 酶解时间(15、30、45、60、90、120、150、180、210、

240 min)；酶解温度(35、40、45、50、55 ℃)，酶解 pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)进行单因素实验，以可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率、水解度为指标对各因素进行优化。

1.2.8 响应面法优化试验 在上述单因素实验结果基础上，根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理，以样品对 DPP-IV 抑制率作为响应值，对酶添加量(A)、酶解时间(B)和酶解温度(C)设计三因素三水平的响应面分析试验，各因素水平见表 2，通过响应面曲线分析对玉米蛋白酶解条件进行优化，并采用 Design Expert 13.0.1.0 数据分析软件对结果进行处理分析，得到最佳的玉米蛋白酶解条件。

表 2 响应面试验的因素与水平

Table 2 Factors and levels of the response surface experiment

水平	因素		
	A酶添加量(U/g)	B酶解时间(min)	C酶解温度(℃)
−1	480	135	42
0	600	150	45
1	720	165	48

1.2.9 玉米蛋白抑制肽分子量分布测定 参考 Ren 等[20] 的方法使用 AKTA avant 智能蛋白质纯化色谱仪及凝胶色谱柱(Superdex Peptide 10/300 GL)对所得的玉米蛋白抑制肽进行分子量分布的测定。本试验洗脱液为含 0.15 mol/L NaCl, pH7.0 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液，称取玉米蛋白抑制肽样品，用洗脱液配制蛋白浓度为 2 mg/mL 的样品 1 mL。在 4 ℃、10000 r/min 的条件下离心 5 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜后上样。色谱柱用蓝色葡聚糖 2000(2000 kDa)测定外水体积，标准蛋白为抑肽酶(6511 Da)、杆菌肽(1422 Da)、氧化型谷胱甘肽(612 Da)和还原型谷胱甘肽(307 Da)，以有效分配系数(Kaw)为横坐标，标准蛋白相对分子质量对数(lg Mr)为纵坐标绘制标准曲线，得到标准曲线为 y=−3.6725x+4.839(R^2=0.9893)，计算玉米蛋白抑制肽的分子量分布情况。

1.2.10 玉米蛋白抑制肽超滤分级 参考丛万锁等[21] 的方法，采用 HYM-Multi-RN 多功能实验分离机进行超滤分级，选取 1 kDa 超滤膜进行分离，将一定体积的酶解上清液注入超滤分离装置的储槽中，出膜压力不超过 20 bar，在泵提供的动力下，样品溶液经微滤后进入截断分子量为 1 kDa 的超滤膜中，样品溶液中分子量小于 1 kDa 的组分将通过超滤膜内部流出，分子量大于 1 kDa 的大分子物质得以保留并得到浓缩，返回到储槽中，如此反复循环，分别收集分子量大于 1 kDa 和小于 1 kDa 组分进行 DPP-IV 抑制率的测定。

1.2.11 玉米蛋白抑制肽氨基酸组成的测定 参考王晓杰等[22] 的方法测定样品的氨基酸组成。精准称取蛋白含量 60 mg 玉米蛋白酶解物于 20 mL 的安瓿管中，加入 9 mL 的 6 mol/L 盐酸溶液，氮吹 5 min 以排出管内的空气，然后用酒精喷灯进行封管处理。将封管后的安瓿管放置在 110 ℃ 的烘箱中酸水解 24 h 后，将安瓿管中的样品溶液转移到 50 mL 小烧杯中，用 6 mol/L 的氢氧化钠溶液调节样品溶液 pH 至 2.2 左右，过滤，然后用 pH2.2 的柠檬酸钠缓冲溶液定容至 100 mL。取 1 mL 的样品溶液，用 0.22 μm 的针头式过滤器过滤样品至样品瓶中。处理好的样品采用 L-8900 全自动氨基酸分析仪进行分析。

1.2.12 玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 抑制类型的测定 采用酶抑制动力学方法研究玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 酶的抑制作用类型。参考吉薇[23] 的实验方法略有改动，使用 Tris-HCl 缓冲液分别配制玉米蛋白抑制肽蛋白浓度为 0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL；DPP-IV 酶浓度为 20、40、60、80、100 ng/mL；Gly-Pro-pNA 浓度为 50、75、100、250、500 μmol/L 备用。

判断玉米蛋白抑制肽是否可逆：将实验分为无抑制剂组和有抑制剂组，固定 Gly-Pro-pNA 浓度(100 μmol/L)和玉米蛋白浓度(1 mg/mL)不变，改变 DPP-IV 酶浓度，无抑制剂组用 Tris-HCl 缓冲液代替。判断玉米蛋白抑制肽竞争性-非竞争性抑制：实验均为有抑制剂组，固定 DPP-IV 酶浓度(100 ng/mL)，分别探究浓度为 0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的玉米蛋白抑制肽在浓度为 50、75、100、250、500 μmol/L 的 Gly-Pro-pNA 下对 DPP-IV 的抑制情况，具体添加量如表 3 所示。使用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法分析并判断玉米蛋白抑制肽的抑制类型。

表 3 玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 抑制类型

Table 3 Inhibition types of corn protein inhibitory peptides on DPP-IV

试剂(μL)	无抑制剂组		有抑制剂组	
	空白	对照	空白	对照
Tris-HCl	50	40	10	0
DPP-IV	0	10	0	10
Gly-Pro-pNA	50	50	50	50
玉米蛋白抑制肽	0	0	40	40

1.3 数据处理

本实验的所有数据均通过 IBM SPSS Statistics 27 软件进行统计学分析，采用单因素方差分析法对实验数据进行分析，用 Duncan 法进行数据间的差异显著性分析，显著性水平为 P<0.05，每个实验重复三次，结果以平均数±标准差表示。数据通过 Origin 2022 软件进行作图。响应面部分通过 Design-Expert 13.0.1 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶种类对抑制肽 DPP-IV 抑制率的影响结果

玉米蛋白粉中主要包括醇溶蛋白和谷蛋白两部分，两种蛋白质溶解性较差，通过加入蛋白酶酶解可将其转化为可溶性蛋白。因酶的专一性存在差异，不同种类的蛋白酶对蛋白质的酶切作用位点均具有明

显差异性，导致酶解后产生的多肽序列组成及生物活性存在一定的差异性[24]。因此，本研究首先探究了不同蛋白酶水解得到的抑制肽对 DPP-IV 的抑制作用，选择效果最好的蛋白酶进行后续实验。图 1 为不同蛋白酶酶解离心后得到的上清液样品，从左到右依次为碱性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶酶解上清液。

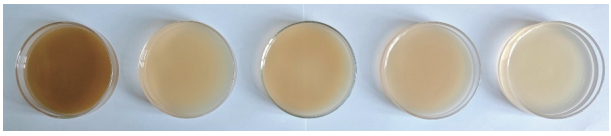


图 1　不同蛋白酶酶解样品图

Fig.1　Samples hydrolyzed by different proteases

从图 2 中可以看出，相同条件下，不同蛋白酶酶解得到的玉米蛋白酶解液可溶蛋白含量和水解度具有显著差异性（P<0.05）。其中碱性蛋白酶酶解得到的产物可溶性蛋白含量和水解度最高，说明有大量的底物不溶性蛋白被剪切成小分子肽，碱性蛋白酶的水解能力最强。风味蛋白酶酶解的抑制肽可溶性蛋白含量和水解度最低，相比之下其水解能力最弱。风味蛋白酶主要剪切蛋白或多肽 N/C 末端的疏水性氨基酸，通常与剪切能力较强的碱性蛋白酶复合使用，以减少碱性蛋白酶酶解过程中产生的苦味肽[25]。

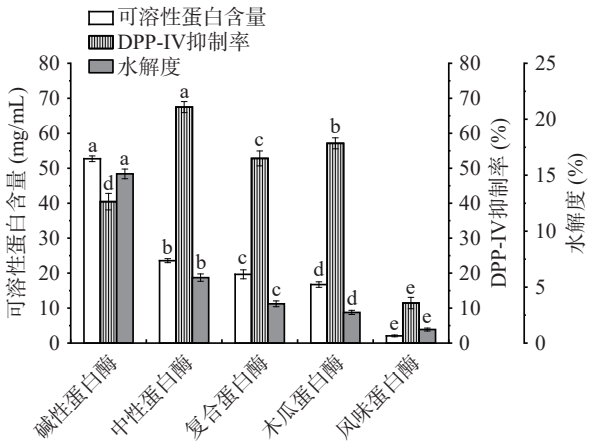


图 2　不同蛋白酶对抑制肽可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度的影响

Fig.2　Effects of different proteases on the content of soluble protein, DPP-IV inhibition rate and DH of inhibitory peptides

注：图中字母表示同组柱状图之间的差异显著性，不同组间的字母不通用。不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05），图 3~图 6 同。

不同蛋白酶酶解得到的玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 抑制率与蛋白酶的水解能力无明显相关关系。中性蛋白酶酶解的抑制肽对 DPP-IV 抑制率最高，说明中性蛋白酶能在酶解过程中使玉米蛋白释放出更多的 DPP-IV 抑制肽，是将玉米蛋白转化为潜在的 DPP-IV 抑制肽最有效的蛋白酶。张颖[26] 在牛、羊乳酪蛋白源实验中也发现了中性蛋白酶酶解的抑制肽对 DPP-IV 的抑制效果最好，其可能与底物蛋白种类的不同有关，不同的蛋白酶适用于不同的蛋白源来生产 DPP-IV 抑制活性肽产物。且图中中性蛋白酶的水解度仅次于碱性蛋白酶。故综合考虑选择中性蛋白酶进行后续实验。

2.2　中性蛋白酶对抑制肽 DPP-IV 抑制率的单因素实验结果

2.2.1　中性蛋白酶添加量的确定　根据 2.1 结果选取中性蛋白酶进行酶解实验，探究酶添加量对玉米蛋白抑制肽可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度的影响，结果如图 3 所示。

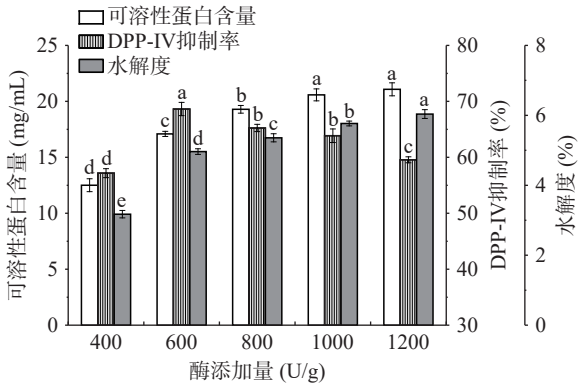


图 3　酶添加量对玉米蛋白抑制肽可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度的影响

Fig.3　Effects of enzyme dosage on the content of soluble protein, DPP-IV inhibition rate and DH of inhibitory peptides

由图 3 可知，酶添加量与可溶性蛋白含量和水解度呈正相关，随着酶添加量的增加，可溶性蛋白含量和水解度也逐渐增加。酶添加量大于 600 U/g 时可溶性蛋白含量和水解度增加变慢。酶添加量为 1200 U/g 时抑制肽的可溶性蛋白含量和水解度达到最高。酶添加量为 1000 U/g 和 1200 U/g 时，可溶性蛋白含量无显著差异（P>0.05）。依据酶反应动力学原理，底物与酶的结合逐渐达到饱和状态会使反应速度变慢，这可能是水解度无明显变化的主要原因。

随着酶添加量的增加，DPP-IV 抑制率呈先增高后降低的趋势。酶添加量为 600 U/g 时 DPP-IV 抑制率最高，为 68.63%±1.19%。而随着酶添加量的继续升高，DPP-IV 抑制率又逐渐降低，说明在一定范围内提高酶添加量可以促使玉米蛋白生成更多的 DPP-IV 抑制肽。酶添加量过多时，中性蛋白酶可能会对玉米蛋白剪切过度，剪切掉对 DPP-IV 抑制较好的活性位点，从而导致一些具有抑制活性的蛋白被分解成无活性肽序列，导致抑制率降低[15]。故选取最佳酶添加量 600 U/g 进行后续实验。

2.2.2　酶解时间的确定　在 2.2.1 基础上建立反应体系，底物浓度、酶添加量、酶解温度、酶解 pH 同上。酶解时间分别为 15、30、45、60、90、120、150、180、210、240 min，结果如图 4 所示。

从图 4 可知，随着反应时间延长，玉米蛋白抑制肽的可溶性蛋白含量和水解度整体呈上升趋势。反应前 150 min 酶解速率最大，150 min 后反应速率逐

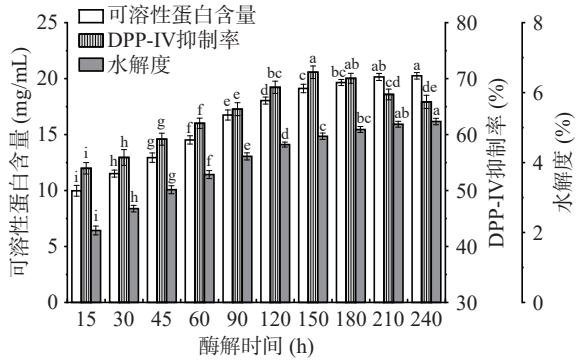


图 4 酶解时间对玉米蛋白抑制肽可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度的影响

Fig.4 Effects of enzymatic hydrolysis time on the content of soluble protein, DPP-IV inhibition rate and DH of inhibitory peptides

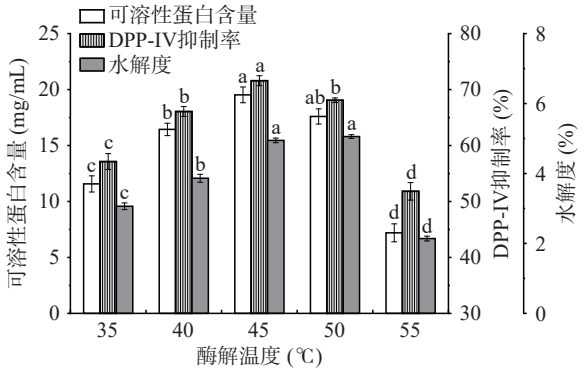


图 5 酶解温度对玉米蛋白抑制肽可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度的影响

Fig.5 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on the content of soluble protein, DPP-IV inhibition rate and DH of inhibitory peptides

渐降低，表明在酶解前期酶活力逐渐升高，蛋白酶与底物反应充分，而酶解 150 min 后，反应体系中底物逐渐减少，导致酶与底物的可结合位点减少，使反应逐渐趋于饱和状态。同时研究表明抑制肽增多会对反应产生抑制作用，也是反应速率变慢的原因之一[27]。

随着时间的延长，抑制肽对 DPP-IV 的抑制率呈先增加后降低的趋势。在反应前 150 min，抑制肽对 DPP-IV 的抑制率逐渐增高，说明在酶解过程中逐渐释放了更多的玉米蛋白 DPP-IV 抑制肽，反应 150 min 时抑制肽对 DPP-IV 抑制率最高。随着反应时间的进一步延长，反应速率变慢，反应逐渐达到饱和状态，具有抑制 DPP-IV 作用的肽段释放量降低。此外，反应时间过长可能会导致酶解前期产生的对 DPP-IV 抑制活性较好的肽进行过度酶解，破坏了其多肽结构，使酶解液对 DPP-IV 的抑制率降低[28]。由此可见，适宜的酶解时间对玉米蛋白抑制 DPP-IV 活性肽的制备也十分重要。因此，考虑时间成本，选择酶解时间 150 min 进行后续实验。

2.2.3 酶解温度的确定 根据 2.2.2 结果进行下一步优化实验，反应体系、底物浓度、酶添加量、酶解时间、酶解 pH 同上，酶解温度分别为 35、40、45、50、55 ℃，结果如图 5 所示。

酶解温度是影响酶催化活性的主要因素，在特定的温度条件下，酶的催化活性达到最高[29]。从图 5 可以看出，不同酶解温度下得到的玉米蛋白抑制肽的可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度均以先上升后下降的趋势变化。不同酶解温度下得到的产物对 DPP-IV 抑制率有显著差异（P<0.05）。酶解温度达到 45 ℃ 时，抑制肽的可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度均达到峰值。随着酶解温度的升高，这 3 个指标的值开始逐渐下降。温度为 55 ℃ 时，可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度均为最低值。这可能是因为酶解温度超出中性蛋白酶的最适温度范围，改变了酶的构象和活性中心，导致酶的活性降低，影响多肽与目标分子的相互作用，进而使酶与底物反应速率降低，降低了抑制肽的生物活性[30]。由此可以看出酶解温度对玉米蛋白抑制肽的影响很大，故选择 45 ℃ 进行下一步实验。

2.2.4 酶解 pH 的确定 结合 2.2.3 的因素优化结果，反应体系、底物浓度、酶添加量、酶解时间、酶解温度同上，选取 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 进行酶解反应，结果如图 6 所示。

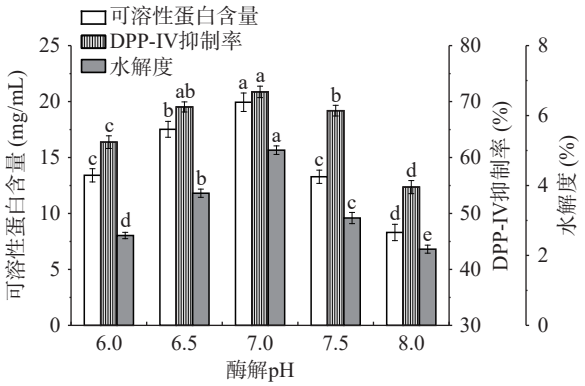


图 6 酶解 pH 对玉米蛋白抑制肽可溶性蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度的影响

Fig.6 Effects of enzymatic hydrolysis pH on the content of soluble protein, DPP-IV inhibition rate and DH of inhibitory peptides

酶解 pH 不仅会影响中性蛋白酶的酶活力，也会影响原料蛋白的酶解状态，进而影响原料的水解度[31]。由图 6 可知，随着酶解 pH 的增加，玉米蛋白抑制肽的可溶蛋白含量、DPP-IV 抑制率及水解度均呈现先上升后下降的趋势。酶解 pH 小于 7.0 时，可溶性蛋白含量、对 DPP-IV 的抑制率及水解度均呈上升趋势。酶解 pH 为 7.0 时，这三个指标均达到峰值，此时玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 的抑制率为 71.72%±1.22%。马诗文[32] 研究中性蛋白酶酶解绿豆蛋白时，同样发现中性蛋白酶的最适 pH 为 7.0。酶解 pH 大于 7.0 时，三个指标开始呈下降趋势，且各组之间差异显著（P<0.05），可溶性蛋白含量和水解度下降明显，酶解 pH 为 8.0 时，三个指标均为最低

值，说明超过了中性蛋白酶的最适 pH，导致部分中性蛋白酶的酶解能力减弱甚至失活，因此选择 pH7.0 进行酶解实验。由于酶解 pH6.5~7.5 时，玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 抑制率差异不明显，故选择酶添加量、酶解时间和酶解温度进行响应面优化试验。

2.3　响应面法对玉米蛋白源抑制肽的工艺优化试验结果分析

2.3.1　回归模型的建立及显著性分析　在单因素实验结果的基础上，以酶添加量(A)、酶解时间(B)、酶解温度(C)为 Box-Behnken 试验的自变量，抑制肽对 DPP-IV 抑制率(Y)为响应值，进行三因素三水平响应面优化试验，试验设计的因素水平及结果如表 4 所示。

表 4　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4　Box-Behnken experimental design and results

试验号	A酶添加量	B酶解时间	C酶解温度	Y抑制率(%)
1	−1	0	−1	58.06
2	0	1	1	68.49
3	1	0	−1	65.05
4	0	−1	−1	62.08
5	1	1	0	69.23
6	0	0	0	71.32
7	−1	−1	0	59.25
8	0	−1	1	60.93
9	0	0	0	71.02
10	0	1	−1	65.17
11	−1	0	1	61.83
12	1	−1	0	62.32
13	0	0	0	72.37
14	−1	1	0	62.89
15	0	0	0	73.25
16	0	0	0	72.54
17	1	0	1	63.59

利用 Design Expert 13 设计软件，对所选的因素和水平进行设计后，测定所有设定组响应值，拟合并优化出以响应值为函数的二次多元回归方程：$Y=72.10+2.27A+2.65B+0.56C+0.8175AB-1.31AC+1.12BC-5.36A^2-3.32B^2-4.61C^2$。回归模型方差分析结果如表 5 所示。

结合表 4、5 结果分析发现，该模型的 P 值小于 0.0001，这表明该回归模型的显著性极高，具有统计学意义。失拟项(P=0.9945>0.05)差异不显著，表明该回归方程可用于代替试验的真实点进行结果分析。回归系数 R^2=0.9915，表明回归方程模型的建立是合理的，模型校正决定系数 R^2_{adj}=0.9806，表明此回归方程表示响应值变化具有可行性[33]，可用于预测制备玉米蛋白 DPP-IV 抑制肽的最佳工艺条件。在模型中，A、B、AC、A^2、B^2、C^2 对响应值的影响极显著(P<0.01)。F 值可以反映出各因素对试验指标的重要性，F 越大表明此因素对试验指标的影响越大。因此，从表 5 中可以看出，各因素对 DPP-IV 抑制率影响程度大小顺序为：酶解时间(B)>酶添加量(A)>酶解温度(C)。

表 5　回归模型方差分析

Table 5　Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值(Prob>F)	显著性
模型	399.9	9	44.43	90.89	<0.0001	**
A	41.22	1	41.22	84.33	<0.0001	**
B	56.18	1	56.18	114.92	<0.0001	**
C	2.51	1	2.51	5.13	0.0579	
AB	2.67	1	2.67	5.47	0.0520	
AC	6.84	1	6.84	13.99	0.0073	**
BC	5.00	1	5.00	10.22	0.0151	*
A^2	120.8	1	120.8	247.11	<0.0001	**
B^2	46.45	1	46.45	95.01	<0.0001	**
C^2	89.53	1	89.53	183.15	<0.0001	**
残差	3.42	7	0.489			
失拟项	0.058	3	0.019	0.023	0.9945	不显著
纯误差	3.36	4	0.841			
总离差	403.33	16				
R^2	0.9915					
R^2_{adj}	0.9806					

注：P<0.05表示差异显著，用*表示；P<0.01表示差异极显著，用**表示。

2.3.2　响应面图谱结果与分析　利用 Design-Expert 13 软件对回归模型构建响应面和等高线图，分析各因素对 DPP-IV 抑制率的影响，结果如图 7 所示。

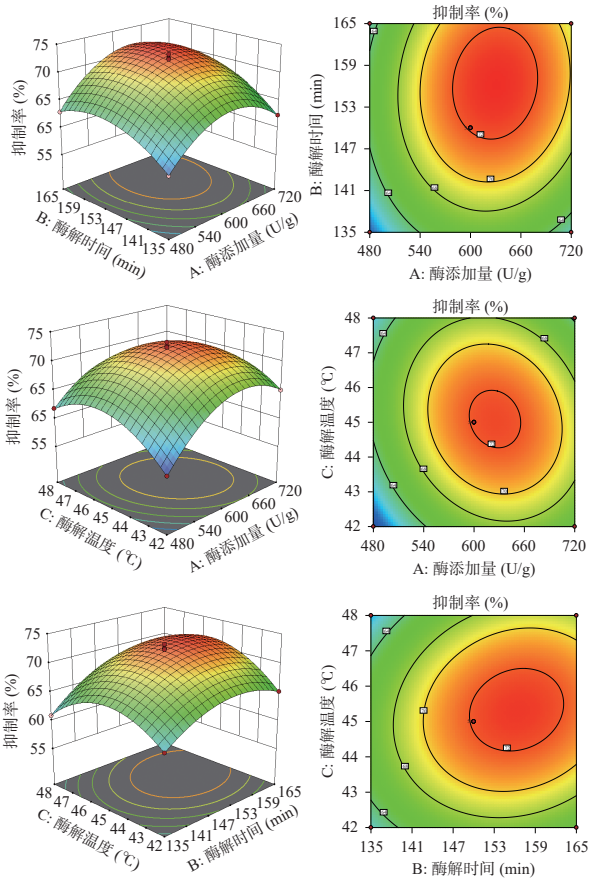


图 7　各因素交互作用对 DPP-IV 抑制率影响的响应面图

Fig.7　Response surface plots of the effects of the interaction of various factors on the DPP-IV inhibition rate

图 7 为酶添加量(A)、酶解时间(B)、酶解温度(C)各因素间的交互作用对 DPP-IV 抑制率的影响。两因素交互响应面 3D 图的趋势越陡，说明因素之间

的交互作用越明显，反之则不明显。从图中可以看出三个因素所呈现的图像均为凸型，表明 DPP-IV 的抑制率存在极值[34]。等高线形状和变化趋势可以反映各因素之间交互作用的强弱。通过等高线可以看出 AB、AC、BC 其形状均为椭圆形，说明酶添加量、酶解时间、酶解温度对 DPP-IV 的抑制率影响复杂，各因素之间均有交互作用。且酶添加量和酶解温度的交互作用最显著，结合回归模型方差分析表可以看出交互作用 AC>BC>AB。通过等高线的变化趋势可得，各因素对 DPP-IV 抑制率的影响的大小顺序为 B(酶解时间)>A(酶添加量)>C(酶解温度)，这与方差分析结果一致。通过 Design-Expert 软件运行结果得到预测的玉米蛋白最优改性工艺条件参数：中性蛋白酶添加量 638.261 U/g、酶解时间 156.634 min，酶解温度 45.244 ℃，预估 DPP-IV 抑制率为 72.975%。

2.3.3 工艺优化验证实验 结合实际工艺设置的可行性，对优化的玉米蛋白的酶解条件进行修正：中性蛋白酶添加量 640 U/g、酶解时间 157 min、酶解温度 45 ℃；以此工艺参数进行三次验证试验，以 IPI 为阳性对照(IC_{50} 为 0.0024±0.0004 mg/mL)，测得 DPP-IV 抑制率均值为 73.59%±2.34%，IC_{50} 为 0.53±0.06 mg/mL。结果与模型预测值相差较小，从而得出该模型优化参数可靠性较高。

2.4 玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的分子量分布情况

通过凝胶色谱对工艺优化得到的抑制肽的分子量分布情况进行测定，其结果如图 8、图 9 所示。

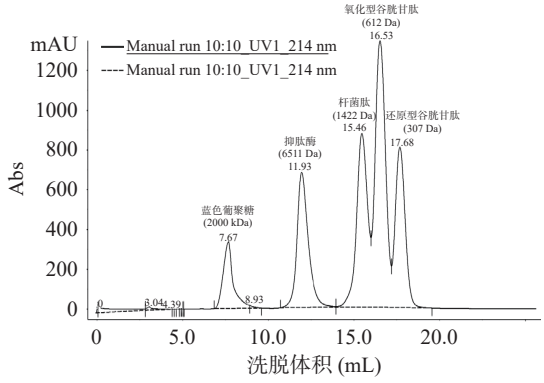


图 8 标准蛋白分子量分布洗脱图

Fig.8 Elution profile of the molecular weight distribution of standard proteins

图 9 为未超滤的玉米蛋白抑制肽分子量分布洗脱图，根据面积归一法[35]计算得出分子量大于 6.5 kDa 的组分占总组分的 41.1%，分子量小于 1 kDa 的组分占 58.9%。其中分子量在 1 kDa 以下的分布情况如表 6 所示，该抑制肽分子量主要集中在 0.6 kDa 以下，其中 0.2~0.4 kDa 占比最高，说明在该条件下中性蛋白酶酶解得到的玉米蛋白抑制肽主要是由小分子肽段构成。Capriotti 等[36]研究发现，活性肽的降糖作用与其结构(如分子量和肽链长度)密切相关，降糖肽通常由 2~15 个氨基酸残基组成，分子量为 0.228~1.656 kDa，其氨基酸残基数小于 7(分

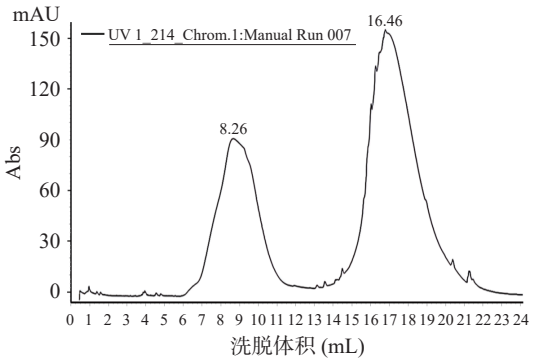


图 9 玉米蛋白抑制肽分子量分布洗脱图

Fig.9 Elution profile of molecular weight distribution of corn protein inhibitory peptides

子量小于 0.7~0.8 kDa)时活性最强，肽链越长肽的活性越弱。这是因为相较于大分子肽，小分子肽段能更快更好地被人体吸收，更容易发挥其生物活性功能。因此，本研究制备的玉米蛋白生物活性肽对 DPP-IV 的抑制活性较好可能是这些小分子多肽起到了关键作用。

表 6 小于 1 kDa 玉米蛋白抑制肽的相对分子质量分布

Table 6 Relative molecular mass distribution of corn protein inhibitory peptides less than 1 kDa

相对分子质量(kDa)	峰面积百分比(%)
1.0~0.8	0.67
0.8~0.6	4.91
0.6~0.4	17.20
0.4~0.2	22.45
<0.2	13.16

2.5 超滤分级对玉米蛋白源抑制肽 DPP-IV 抑制率的影响

依据分子量分布的结果，进一步采用超滤分级分析多肽组分的 DPP-IV 抑制率。

通过超滤分级试验，得到分子量大于 1 kDa 和小于 1 kDa 两个组分，分别测得不同组分对 DPP-IV 的抑制率并与原液对比，结果如图 10 所示。从图中可以看出对 DPP-IV 的抑制率大小依次为：小于 1 kDa>原液>大于 1 kDa，各组之间差异显著(P<0.05)，说明

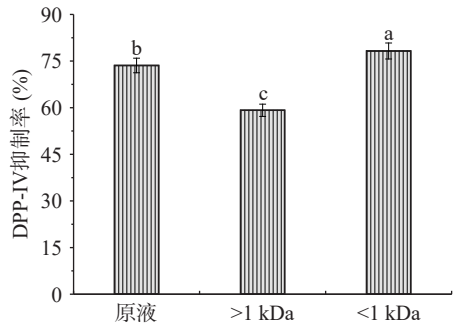


图 10 不同分子量组分的抑制肽对 DPP-IV 抑制率的影响

Fig.10 Effects of inhibitory peptides in different molecular weight fractions on the DPP-IV inhibition rate

注：图中图标(a~c)不同表示各组间 DPP-IV 抑制率差异显著(P<0.05)。

超滤膜分级对具有较强抑制 DPP-IV 活性的玉米蛋白肽组分起到富集的作用，该组分多以小分子的形式存在，分子量主要集中在 1 kDa 以下。昝蓉[37]研究发现小分子肽比大分子肽的活性高，分子量小于 1 kDa 的肽具有更高的生物活性。

2.6　玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的氨基酸组成分析

利用全自动氨基酸分析仪对超滤分级后得到的不同组分的玉米蛋白抑制肽进行氨基酸组成的测定，不同氨基酸含量具有显著差异性，结果如表 7 所示。

表 7　玉米蛋白抑制肽及其超滤分级组分氨基酸组成(g/100 g)

Table 7　Amino acid composition of corn protein inhibitory peptides and their ultrafiltration fractionation components (g/100 g)

氨基酸种类	原液	>1 kDa	<1 kDa
Asp(天冬氨酸)	4.85±0.11	5.26±0.14	2.48±0.09
Thr*(苏氨酸)	2.81±0.08	3.11±0.09	1.97±0.06
Ser(丝氨酸)	4.48±0.15	4.43±0.12	3.04±0.07
Glu(谷氨酸)	19.35±0.79	18.77±0.52	9.79±0.12
Gly(甘氨酸)	1.96±0.10	2.45±0.07	2.13±0.05
Ala(丙氨酸)	7.42±0.12	6.97±0.17	9.80±0.23
Cys(半胱氨酸)	0.50±0.02	0.51±0.01	0.07±0.01
Val*(缬氨酸)	3.07±0.11	3.14±0.09	2.94±0.08
Met*(甲硫氨酸)	1.72±0.02	0.47±0.01	1.58±0.07
Ile*(异亮氨酸)	2.91±0.06	2.96±0.08	2.66±0.06
Leu*(亮氨酸)	14.10±0.27	12.78±0.41	15.20±0.32
Tyr*(酪氨酸)	4.09±0.08	3.83±0.11	4.53±0.09
Phe*(苯丙氨酸)	5.05±0.11	4.73±0.13	6.02±0.14
Lys*(赖氨酸)	0.92±0.05	1.26±0.03	1.97±0.05
His(组氨酸)	1.31±0.03	1.30±0.04	1.65±0.04
Arg(精氨酸)	1.84±0.12	2.20±0.06	4.12±0.10
Pro(脯氨酸)	7.30±0.21	6.03±0.09	5.14±0.12
氨基酸总量	83.67±0.86^{a}	80.18±2.17^{b}	75.09±1.68^{c}
必需氨基酸总量	34.67±0.50^{b}	32.27±0.95^{c}	36.86±0.87^{a}
非必需氨基酸总量	49.01±1.02^{a}	47.91±1.22^{a}	38.23±0.81^{b}
疏水性氨基酸总量	41.58±0.36^{b}	37.07±0.99^{c}	43.34±1.01^{a}

注：*代表必需氨基酸；不同字母表示同一指标差异显著(P<0.05)。

从表 7 可以看出，玉米蛋白酶解液原液、分子量大于 1 kDa、分子量小于 1 kDa 组分都富含人体所需的必需氨基酸，说明其具有良好的营养价值。其中必需氨基酸总量由大到小依次是分子量小于 1 kDa>原液>分子量大于 1 kDa 组分。影响 DPP-IV 抑制活性的强弱除分子量大小外还取决于各组分中特征氨基酸的含量[38]。研究发现，DPP-IV 的结合位点具有特异性，当肽链 N 端第二位为 Pro 或 Ala(即 X-Pro 或 X-Ala，X 代表任意氨基酸)时，DPP-IV 能高效结合并发挥作用。若底物肽 N 端第一位氨基酸是疏水氨基酸(如 Leu、Phe 等)也会增强底物与 DPP-IV 的结合力，即 X 为疏水氨基酸，形成的 X-Pro 或 X-Ala 序列与 DPP-IV 的结合更紧密，这是因为 DPP-IV 活性位点附近存在疏水区域，可与这些疏水氨基酸发生疏水相互作用，稳定结合构象[39]。而中性蛋白酶通常对 Leu 和 Phe 等由疏水氨基酸组成的序列之间的肽键有较高的特异性，这些疏水氨基酸有助于肽段与 DPP-IV 的疏水口袋相互作用，形成稳定抑制肽-酶复合物[40]。从表 7 可以看出，三个氨基酸组分中疏水氨基酸的含量由大到小依次为：分子量小于 1 kDa>原液>分子量大于 1 kDa 组分；其中 Leu 的含量比较：分子量小于 1 kDa>原液>分子量大于 1 kDa 组分；Phe 的含量比较：分子量小于 1 kDa>原液>分子量大于 1 kDa 组分。结合 DPP-IV 的特异性结合位点分析这可能是对 DPP-IV 抑制率大小分子量小于 1 kDa>原液>分子量大于 1 kDa 组分的原因。且玉米蛋白抑制肽中 Pro 和 Ala 的含量也较高，其存在形式是否符合 DPP-IV 的特异性切割位点需后续进行肽序列鉴定等试验进行验证。因此，这些氨基酸的存在可能是导致玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 抑制能力较强的关键因素。

2.7　玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 的抑制类型的分析

按照抑制剂与酶结合的反应过程是否可逆，可将抑制剂分为可逆抑制剂和不可逆抑制剂两大类。试验过程中抑制剂的量是恒定的，因此直线通过原点的为可逆性抑制剂，直线不经过原点则为不可逆抑制剂。玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 的抑制动力学曲线如图 11 所示。

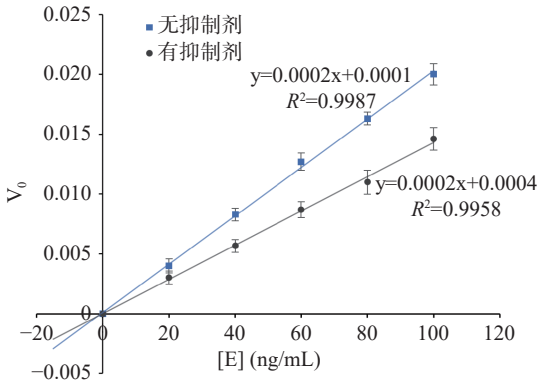


图 11　玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 的抑制动力学曲线

Fig.11　Inhibition kinetic curves of corn protein inhibitory peptides on DPP-IV

图中无抑制剂组为不同浓度的 DPP-IV(20、40、60、80、100 ng/mL)与底物(100 μmol/L)的抑制动力学曲线，有抑制剂组为玉米蛋白抑制肽(蛋白浓度 1 mg/mL)与不同浓度的 DPP-IV(20、40、60、80、100 ng/mL)和底物(100 μmol/L)的抑制动力学曲线。图中两条直线均过原点，可以推断该优化条件下得到的玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 的抑制类型是可逆性抑制。

抑制剂对酶的可逆性抑制又可分为竞争性抑制、非竞争性抑制、竞争-非竞争混合型抑制三种类型，可以通过 Lineweaver-Burk 双倒数图来确定。

判断抑制剂属于竞争性或非竞争性抑制剂也可通过不同浓度拟合曲线的交点表示，拟合曲线交点的位置不同代表不同的结合方式[41]。当拟合曲线交于

$1/V_0$ 轴时，表现为竞争性抑制剂；当拟合曲线交于 1/[S] 轴时，表现为非竞争性抑制剂；当拟合曲线交于第二象限，即 $1/V_0$ 轴与 1/[S] 轴之间时，表现为竞争-非竞争混合型抑制剂[42]。从图 12 中可以看出不同浓度的玉米蛋白抑制肽对应的拟合曲线在 $1/V_0$ 轴正半轴相交于一点，说明玉米蛋白抑制肽主要表现为竞争性抑制，且随着蛋白浓度的增大，斜率也随之增大，反应速率加快。

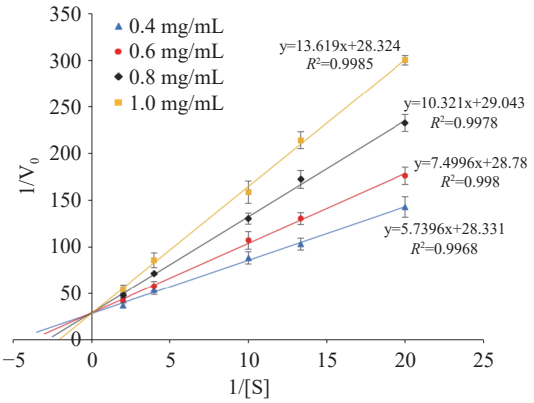


图 12 不同浓度玉米蛋白抑制肽 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.12 Lineweaver-Burk double reciprocal plots of corn protein inhibitory peptides at different concentrations

3 结论

本文以玉米蛋白粉为原料，采用中性蛋白酶酶解制备具有 DPP-IV 高抑制活性的玉米蛋白抑制肽，最佳酶解工艺条件为底物浓度 10%(w/v)、酶添加量 640 U/g、酶解时间 157 min、酶解温度 45 ℃、酶解 pH7.0，此条件下制备的玉米蛋白酶解产物对 DPP-IV 抑制 IC_{50} 值为 0.53±0.06 mg/mL。对其理化性质分析发现该条件下得到的酶解产物分子量小于 1 kDa 组分占总组分的 58.9%。且其具有独特的氨基酸组成可能是其具有较高活性的主要原因。此外，玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 的抑制类型属于竞争性-可逆抑制。综上所述，玉米蛋白抑制肽对 DPP-IV 具有良好的抑制作用，本研究结果为玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的开发利用提供了理论依据，为玉米蛋白的高值化利用提供新思路。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] SHIRZAIY M, DALIRSANI Z, PEYMANKAR P, et al. Relationship between salivary levels of interleukin-8 and HbA1c in patients with type 2 diabetes[J]. Endocrinology, Diabetes & Metabolism, 2023, 6(6): e455.

[2] 李言, 侯笑笑, 杨姿, 等. 全谷物食品、生酮食品对控制Ⅱ型糖尿病的最新研发进展[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(2): 50−58. [LI Yan, HOU Xiaoxiao, YANG Zi, et al. The recent research progress of whole grain diet and ketogenic diet in regulating type 2 diabetes mellitus[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(2): 50−58.]

[3] HUSSEIN H, ZACCARDI F, KHUNTI K, et al. Efficacy and tolerability of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and glucagon-like peptide-1 receptor agonists: A systematic review and network meta-analysis[J]. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2020, 22(7): 1035−1046.

[4] MOHAJAN D, MOHAJAN H K. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors: New oral medications for the treatment of type 2 diabetes[J]. Innovation in Science and Technology, 2024, 3(3): 31−35.

[5] DAS A, GEETHA K M, HAZARIKA I. Contemporary updates on the physiology of glucagon like peptide-1 and its agonist to treat type 2 diabetes mellitus[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(3): 1211−1221.

[6] ZHANG Mingkai, ZHU Ling, WU Gangcheng, et al. Food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: Production, identification, structure-activity relationship, and their potential role in glycemic regulation[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(8): 2053−2075.

[7] 王晗, 侯殿志, 付永霞, 等. 谷物蛋白及多肽调控 2 型糖尿病靶点研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 310−316. [WANG Han, HOU Dianzhi, FU Yongxia, et al. Progress in the study of the role of grain proteins and peptides in regulating the therapeutic targets for type 2 diabetes[J]. Food Science, 2022, 43(9): 310−316.]

[8] NONGONIERMA A B, FitzGERALD R J. Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12451.

[9] 王凤. 燕麦多肽的结构特征及 DPP4 抑制作用[D]. 北京: 北京林业大学, 2016. [WANG Feng. The structural characterization and DPP4 inhibition of oat globulin peptides[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016.]

[10] AMIN K, AZIZI M H, AHMADI GAVLIGHI 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.

[11] 李云亮, 王晓静, 阮思煜, 等. 玉米多肽制备方法及其功能活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 434−441. [LI Yunliang, WANG Xiaojing, RUAN Siyu, et al. Research progress on preparation and functional activity of corn polypeptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 434−441.]

[12] NARASIMHA K K, DUAN Yajie, HUANG Linhua, et al. Review on utilisation of corn gluten meal, a by-product from corn starch industry for production of value-added products[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(9): 5592−5599.

[13] 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): 3095−3104.

[14] LI Guanlong, LIU Xiaolan, MIAO Zhengfei, et al. Preparation of corn peptides with anti-adhesive activity and its functionality to alleviate gastric injury induced by *Helicobacter pylori* infection *in vivo*[J]. Nutrients, 2023, 15(15): 3467.

[15] 韦雅虹, 刘康乾, 王皓毅, 等. 响应面法优化碱性蛋白酶解制备核桃抗氧化肽[J]. 食品工业, 2024, 45(6): 19−24. [WEI Yahong, LIU Kangqian, WANG Haoyi, et al. The optimization of antioxidant peptide preparation from walnut through basic protease hydrolysis using response surface methodology[J]. The Food Industry, 2024, 45(6): 19−24.]

[16] MATHEEUSSEN V, LAMBEIR A M, JUNGRAITHMAYR W, et al. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing re-

versible inhibitors[J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413(3-4): 456−462.
[17] 徐飞, 成向荣, Riyadh, 等. 双酶水解玉米醇溶蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(21): 218−222,227. [XU Fei, CHENG Xiangrong, RIYADH, et al. Optimization of dual- enzymatic preparation of antioxidant peptides from zein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(21): 218−222, 227.]
[18] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. An *in silico* model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides[J]. Food Chemistry, 2014, 165(1): 489−498.
[19] 梁凯, 雷灼贵, 赖富饶, 等. 火麻仁粕蛋白酶解工艺的优化[J]. 食品科技, 2014, 39(6): 174−181. [LIANG Kai, LEI Zhuogui, LAI Furao, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of hemp seed meal protein[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(6): 174−181.]
[20] REN Jian, LI Sijin, SONG Chunli, et al. Black soybean-derived peptides exerted protective effect against alcohol-induced liver injury in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104828.
[21] 丛万锁, 王晓杰. 超滤膜分级玉米糖肽的抗氧化和乙醇脱氢酶激活活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 29−35. [CONG Wansuo, WANG Xiaojie. Antioxidant and alcohol dehydrogenase activating activities of corn glycopeptide by ultrafiltration membrane classification[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 29−35.]
[22] 王晓杰, 刘晓兰, 曲悦, 等. 两步水解法制备玉米-大豆复合抗氧化肽及其稳定性研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 39−47. [WANG Xiaojie, LIU Xiaolan, QU Yue, et al. Preparation of compound antioxidant peptide from zein-soy protein isolated by two-step hydrolysis and evaluation on its stability[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(3): 39−47.]
[23] 吉薇. 南极磷虾蛋白源二肽基肽酶-Ⅳ(DPP-Ⅳ)抑制肽的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017. [JI Wei. Study on dipeptidyl peptidase-Ⅳ(DPP-Ⅳ)inhibitory peptides derived from Antarctic krill protein[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2017.]
[24] 刘妍兵, 陶阳, 苗雪, 等. 绿豆蛋白酶解物抗氧化活性与其结构、氨基酸组成的相关性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 50−58. [LIU Yanbing, TAO Yang, MIAO Xue, et al. Correlation between antioxidant activity and structure and amino acid composition of protease hydrolysates from mung bean[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 50−58.]
[25] WEI Yunjin, LIU Boye, ZHANG Hanxiao, et al. Isolation and identification of bitter peptides during sequential hydrolysis of wheat gluten by enzyme preparations with *endo*-and *exo*-activities[J]. Food Chemistry, 2024, 460: 140491.
[26] 张颖. 牛、羊乳酪蛋白源 DPP-Ⅳ抑制肽的制备、鉴定及抑制机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016. [ZHANG Ying. Enzymatic preparation, identification and inhibition mechanism of DPP-Ⅳ inhibitory peptides derived from bovine and caprine milk casein[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.]
[27] 韦雅虹. 酶解法制备核桃肽及其相关产品开发[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2024. [WEI Yahong. Enzymatic preparation of walnut peptide and related product development[D]. Alar: Tarim University, 2024.]
[28] 赵忠祥, 王家林. 酶解法制备油莎豆粕抗氧化肽工艺优化[J]. 现代农业科技, 2024(17): 154−158. [ZHAO Zhongxiang, WANG Jialin. Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from *Cyperus esculentus* soybean meal[J]. Modern Agricultural Technology, 2024(17): 154−158.]
[29] 金城. 酶: 生物化学反应的 催化剂[J]. 新农村, 2016(7): 38. [JIN Cheng. Enzymes: Catalysts for biochemical reactions[J]. New Countryside, 2016(7): 38.]
[30] ARCAN I, YEMENICIOĞLU A. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 301−312.
[31] 高颖, 吴海霞, 孙元琳, 等. 小米糠蛋白提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(1): 60−66. [GAO Ying, WU Haixia, SUN Yuanlin, et al. Study on the optimization of extraction process of millet bran protein and its antioxidant activity[J]. Cereals & Oils, 2025, 38(1): 60−66.]
[32] 马诗文. 复合酶法制备绿豆抗氧化活性多肽及其应用研究[D]. 鞍山: 辽宁科技大学, 2020. [MA Shiwen. Preparation and application of antioxidant peptides from mung bean by complex enzyme method[D]. Anshan: University of Science and Technology Liaoning, 2020.]
[33] 张建峰, 高鹏龙, 阮紫灵, 等. 响应面法优化带壳冷榨红花籽油的工艺[J]. 食品工业, 2019, 40(12): 37−40. [ZHANG Jianfeng, GAO Penglong, RUAN Ziling, et al. Optimization of cold pressed safflower seed oil with shell by response surface methodology[J]. The Food Industry, 2019, 40(12): 37−40.]
[34] 刘聪, 尹乐斌, 罗鑫阳, 等. 响应面法优化辣椒籽抗氧化肽的酶解制备工艺[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(2): 111−115. [LIU Cong, YIN Lebin, LUO Xinyang, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of antioxidant peptides from *Capsicum annuum* seeds by response surface method[J]. Cereals & Oils, 2024, 37(2): 111−115.]
[35] DEEM M C, HEIN J E. A method for converting HPLC peak area from online reaction monitoring to concentration using nonlinear regression[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2023, 88(2): 1292−1297.
[36] CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, FOGLIA P, et al. Development of an analytical strategy for the identification of potential bioactive peptides generated by *in vitro* tryptic digestion of fish muscle proteins[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(3): 845−854.
[37] 昝蓉. 酶解制备鹰嘴豆肽及其生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. [ZAN Rong. Preparation of chickpea peptide by enzymolysis and study on its biological activity[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]
[38] TENG Dike, FANG Yuan, SONG Xiaoyan, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta[J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(3): 202−208.
[39] TULIPANO G, FAGGI L, NARDONE A, et al. Characterisation of the potential of β-lactoglobulin and α-lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: *In silico* and *in vitro* comparative studies[J]. International Dairy Journal, 2015, 48: 66−72.
[40] LI Hongbo, ZHANG Shuhua, XU Siyuan, et al. Enzymatic hydrolysis of milk protein by complex enzyme mixture of alcalase and neutrase: Kinetic model and hydrolysis control[J]. International Journal of Dairy Technology, 2023, 76(1): 93−101.
[41] XU Feiran, YAO Yijun, XU Xiaoying, et al. Identification and quantification of DPP-IV-inhibitory peptides from hydrolyzed-rapeseed-protein-derived napin with analysis of the interactions between key residues and protein domains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(13): 3679−3690.
[42] 谢玉霞, 葛武鹏, 李国薇, 等. 驼乳乳铁蛋白 DPP-IV 抑制肽的筛选验证及其防治糖尿病潜在作用机制探究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 384−395. [XIE Yuxia, GE Wupeng, LI Guowei, et al. *In silico* analysis of novel DPP-IV inhibitory peptides released from camel milk lactoferrin and the possible pathways involved in diabetes protection[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 384−395.]