

超滤亲和结合液相色谱-质谱联用和分子对接技术筛选茶叶中 α -葡萄糖苷酶抑制肽

昝丽霞，王威威，张文夷，李新生，陈小华，燕飞，付静

Screening of α -Glucosidase Inhibitory Peptides from Tea Leaves using Ultrafiltration Affinity Combined with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Molecular Docking Technology

ZAN Lixia, WANG Weiwei, ZHANG Wenyi, LI Xinheng, CHEN Xiaohua, YAN Fei, and FU Jing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030066>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于分子对接虚拟筛选含酪氨酸残基的ACE抑制三肽

Virtual Screening of ACE Inhibitory Tripeptides Containing Tyrosine Residues Based on Molecular Docking

食品工业科技. 2021, 42(16): 20-27 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030111>

液相色谱质谱联用技术在植物蛋白及多肽研究中的应用

Application of liquid chromatography-mass spectrometry in research of plant proteins and peptides

食品工业科技. 2017(17): 310-318 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.061>

基于网络药理学与分子对接技术探讨益肝草凉茶解酒保肝的作用机制

Mechanism of Relieving Alcohol and Protecting Liver of Yiganceao Herbal Tea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2021, 42(8): 8-18 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070092>

裙带菜 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的制备

Preparation of α -Glucosidase Inhibitory Peptides Derived from Sea Mustard

食品工业科技. 2020, 41(20): 127-134 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.021>

基于体外药效学结合网络药理学和分子对接对人参-桑椹改善骨质疏松的机制研究

Mechanism of Ginseng-Mulberry Treating Osteoporosis Based on Pharmacodynamics *in Vitro* Combined with Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2021, 42(20): 1-13 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010155>

马氏珍珠贝来源DPP-IV抑制活性肽的虚拟筛选及其作用机制

Virtual Screening and Mechanism of Action of DPP-IV Inhibitory Peptides from *Pinctada fucata* (*P. fucata*)

食品工业科技. 2021, 42(16): 1-7 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120273>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

昝丽霞, 王威威, 张文夷, 等. 超滤亲和结合液相色谱-质谱联用和分子对接技术筛选茶叶中 α -葡萄糖苷酶抑制肽 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 300–306. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030066

ZAN Lixia, WANG Weiwei, ZHANG Wenyi, et al. Screening of α -Glucosidase Inhibitory Peptides from Tea Leaves using Ultrafiltration Affinity Combined with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Molecular Docking Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 300–306. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030066

· 工艺技术 ·

超滤亲和结合液相色谱-质谱联用和分子对接 技术筛选茶叶中 α -葡萄糖苷酶抑制肽

昝丽霞^{1,2,3,4,5,6,*}, 王威威¹, 张文夷¹, 李新生^{1,5,6}, 陈小华^{1,5,6}, 燕 飞^{1,5,6}, 付 静^{1,5,6}

(1. 陕西理工大学, 陕西汉中 723001;

2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723001;

3. 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西汉中 723001;

4. 陕西理工大学秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育), 陕西汉中 723001;

5. 茶叶种植与加工研究所, 陕西汉中 723001;

6. 陕西省四主体一联合茶产业校企联合研究中心, 陕西汉中 723001)

摘要: 目的: 筛选茶叶中具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的肽段。方法: 采用响应面法优化茶叶酶解产物制备工艺, 超滤亲和法分离与 α -葡萄糖苷酶结合的茶多肽, 液相色谱-质谱联用对分离肽段进行序列测定, 生物信息学方法进行虚拟筛选。结果: 茶叶酶解产物最佳制备工艺为碱性蛋白酶解温度 50 ℃, 酶解时间 3 h, 液料比 10:1 (mL/g), 对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 57.29%, 从中鉴定出 624 条肽段, 筛选出一条四肽 LIGF 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 在 5 mg/mL 的浓度下对 α -葡萄糖苷酶的最大抑制率为 88.13%, IC₅₀ 值为 1.22 mg/mL。分子对接显示, LIGF 与 α -葡萄糖苷酶能形成 5 个氢键, 结合能为 -3.51 kJ, 具有高的亲和力、稳定性以及与 α -葡萄糖苷酶结合的能力。结论: LIGF 具有成为 II 型糖尿病治疗药物的潜在价值。

关键词: 超滤亲和, 液质联用, 分子对接, 茶叶, α -葡萄糖苷酶抑制肽

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)18-0300-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030066



本文网刊:

Screening of α -Glucosidase Inhibitory Peptides from Tea Leaves using Ultrafiltration Affinity Combined with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Molecular Docking Technology

ZAN Lixia^{1,2,3,4,5,6,*}, WANG Weiwei¹, ZHANG Wenyi¹, LI Xinsheng^{1,5,6}, CHEN Xiaohua^{1,5,6}, YAN Fei^{1,5,6}, FU Jing^{1,5,6}

(1. Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;

2. Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong 723001, China;

3. Qinba Mountain Area Collaborative Innovation Center of Bioresources Comprehensive Development, Hanzhong 723001, China;

4. Qinba State Key Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment (Incubation), Hanzhong 723001, China;

5. Tea Planting and Processing Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;
6. Shaanxi Provincial Joint Research Center for Tea Industry, Hanzhong 723001, China)

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 陕西省教育厅重点项目 (21JY007); 陕西省科技厅项目 (2022NY-041); 秦巴生物资源与生态环境国家重点实验室(培育)“市校共建”科研专项 (SXC-2112); 陕西省 2021 年中央引导地方科技创新专项资金计划 (2021ZY2-JD-19)。

作者简介/通信作者*: 昝丽霞 (1977-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 功能性食品开发利用, E-mail: zanlx@126.com。

Abstract: Objective: To screen for tea peptides with inhibitory activity against α -glucosidase. Methods: The response surface method was used to optimize the preparation process of tea peptides. Affinity ultrafiltration was used to isolate tea peptides that bind with α -glucosidase, and liquid chromatography-mass spectrometry was used to determine the sequence of the isolated peptides. Virtual screening was performed using bioinformatics methods. Results: The optimal preparation process of tea leaf enzymatic hydrolysis products was alkaline protease hydrolysis temperature of 50 °C, enzymatic hydrolysis time of 3 h, and a liquid-to-solid ratio of 10:1 (mL/g). The α -glucosidase inhibitory rate was 57.29%. From this, 624 peptide segments were identified, and LIGF was selected for its α -glucosidase inhibitory activity. At a concentration of 5 mg/mL, LIGF exhibited a maximum inhibition rate of 88.13% against α -glucosidase and an IC₅₀ value of 1.22 mg/mL. Molecular docking showed that LIGF could form 5 hydrogen bonds with α -glucosidase, and the binding energy was -3.51 kJ, indicating a high affinity, stability and ability to bind to α -glucosidase. Conclusion: LIGF had potential value as a therapeutic drug for type II diabetes.

Key words: ultrafiltration affinity; liquid chromatography-mass spectrometry; molecular docking; tea leaves; α -glucosidase inhibitory peptide

糖尿病(Diabetes Mellitus)是一种复杂的代谢紊乱疾病, 其特征是由胰岛素分泌不足或胰岛素作用受损而导致血糖水平较高^[1]。截至 2021 年, 全球成人糖尿病患者人数已达到 5.37 亿, 其中 90% 以上属于Ⅱ型糖尿病(T2DM)^[2]。在健康人体内, 胰岛素帮助细胞从血液中吸收葡萄糖, 以维持正常的血糖水平, 而 T2DM 患者的胰岛素功能障碍阻止细胞对葡萄糖的吸收, 导致高血糖症状的发生。

α -葡萄糖苷酶抑制剂和肠上皮细胞钠葡萄糖共转运蛋白(SGLT1)抑制剂均可用于治疗 T2DM^[1]。葡萄糖苷酶抑制剂通过减缓小肠中碳水化合物的消化而延缓餐后血糖水平上升, 对餐后血糖水平难以控制的患者更有效^[3]。然而, 患者对这类药物有严重的不良反应, 如胃肠道气胀、腹泻、肠壁囊肿和低血糖等^[4]。因此, 开发更有效的生物活性剂作为合成药物的替代品, 预防和治疗 T2DM 至关重要。

Zhang 等^[5]通过液相色谱电喷雾串联质谱分析、虚拟筛选和鉴定合成, 从山茶籽饼蛋白中制备具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用的活性肽(LLVLYYEF 和 LLLLPSYSEF), IC₅₀ 值分别为 0.33 和 1.11 mmol/L。绿茶, 白茶和葡萄茶籽, 凤凰丹丛茶以及红茶中提取的肽均可对 T2DM 型糖尿病 α -葡萄糖苷酶具有抑制潜力^[6-8]。经过酶解处理后产生的肽段, 如绿茶和乌龙茶在碱性酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用下, 可以产生具有抗氧化和抗菌活性的肽段^[9-10]。茶渣蛋白中也获得了抗菌肽、抗氧化肽、降血脂肽和具有 ACE 抑制活性的茶多肽^[11-14]。目前生物信息学技术已广泛应用于抗菌肽、抗氧化肽、肽激素、肽药物等领域。然而, 关于茶叶蛋白 α -葡萄糖苷酶抑制肽的分子对接和活性预测方面的信息仍然有限。 α -葡萄糖苷酶抑制肽的信息较少^[15-17]。本研究采用响应面法优化茶叶酶解产物制备工艺, 结合亲和超滤-液相色谱-质谱技术和生物信息学技术, 筛选出具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的茶多肽, 旨在为治疗糖尿病的肽段开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

茶树鲜叶(平阳特早) 采自陕西省西乡县东裕

茶园; α -葡萄糖苷酶(10 万 U/mg) 美国 Sigma 有限公司; 乙腈(色谱纯) 天津科密欧化工有限公司; 磷酸氢二钾(分析纯) 天津晶科化工有限公司; 磷酸二氢钾(分析纯)、三氟乙酸(分析纯) 天津大茂化工有限公司; 碱性蛋白酶(20 万 U/g) 河南美罗实业有限公司; 对-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、阿卡波糖 分析纯, 南京都莱生物技术有限公司; 乙腈(质谱级) 美国费雪化学有限公司; 甲酸、碳酸氢铵、二硫苏糖醇、碘乙酰胺 质谱级, 美国西格玛奥德里奇有限公司。

FA2104 分析天平 上海恒平科技有限公司; Multifuge-X3R 高速冷冻离心机 美国热电科技有限公司; DK-98-II A 恒温水浴锅 天津泰斯特有限公司; 1260 高效液相色谱仪 美国安捷伦有限公司; Ultimate 3000 毛细管高效液相色谱仪、Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer 电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪 美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 粗茶多肽的制备工艺 称取茶叶粉末, 按照 40:1(mL/g) 的液料比加入蒸馏水, 90 °C 提取 40 min, 过滤, 弃去提取液。取茶叶渣烘干后, 按照一定液料比加入蒸馏水, 用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 为 8.5, 加入 2% 碱性蛋白酶, 调节温度酶解一定时间, 结束后于沸水浴中灭酶, 冷却至室温, 用 0.1 mol/L HCl 将提取液 pH 调整为 7, 8000 r/min 离心 15 min, 取上清液冷冻干燥, 备用。

1.2.2 单因素实验 固定液料比为 30:1(mL/g), 分别在 45、50、55、60、65 °C 提取 3 h, 考察提取温度对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响; 固定液料比为 30:1 (mL/g), 提取温度 55 °C, 提取时间分别为 1.5、2.0、2.5、3、3.5 h 的条件下, 考察时间对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响; 固定提取温度 55 °C, 提取时间 3 h, 考察液料比分别为 5:1、10:1、20:1、30:1、40:1(g/mL) 的条件下, 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响。

1.2.3 响应面试验 在单因素实验基础上, 选取提取温度(A)、提取时间(B)和液料比(C)三个因素为自

变量,以茶叶酶解产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率(α -glucosidase inhibition rate, GIR)为响应值,使用Design-Expert 8.0 软件中 Box-Behnken 进行三因素三水平响应面设计,因素水平编码表见表 1。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in response surface experiments

水平	A: 提取温度(℃)	B: 提取时间(h)	C: 液料比(mL/g)
-1	50	2.5	10:1
0	55	3	20:1
1	60	3.5	30:1

1.2.4 粗茶多肽 GIR 测定 GIR 的测定参照 Wu 等^[18]的方法,并做适当修改。将响应面法得到的粗茶多肽制备成 5 mg/mL 的样品溶液,与 α -葡萄糖苷酶(10 U/mL)和 10 mmol/L PBS(pH6.8)缓冲液按照 1:1:4(v:v:v)混匀,37 ℃水浴 5 min;加入与样品溶液等体积的 pNPG(1 mmol/L)37 ℃水浴 5 min,加入 1 mL 0.2 mmol/L Na₂CO₃ 溶液中止反应,冷却至室温后,405 nm 测定吸光值。阿卡波糖溶液作为阳性对照,计算公式如下:

$$GIR(\%) = 1 - (A - A_0)/A \times 100$$

其中, A 为样品组的吸光值; A₀ 为空白组的吸光值。

1.2.5 超滤亲和法分离 α -葡萄糖苷酶抑制肽组分参考 Chen 等^[19]的研究,采用超滤亲和法分离 α -葡萄糖苷酶抑制肽。取 100 μL 2 mg/mL 粗茶多肽溶液与 200 μL 10 U/mL α -葡萄糖苷酶,37 ℃搅拌 30 min 使其混合,30 kDa 超滤离心,10000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,沉淀加入 200 μL 50% 乙腈,将结合后的多肽溶解,10000 r/min 离心 10 min,取上清,冷冻干燥,得到 α -葡萄糖苷酶的抑制肽组分,使用 HPLC-MS/MS 系统分析。

1.2.6 HPLC-MS/MS 分析条件 采用 HPLC-MS/MS 对分离的 α -葡萄糖苷酶抑制肽进行序列测定。HPLC 条件为:色谱柱 Acclaim Pe C₁₈(150 μm×150 mm, 1.9 μm);柱温 25 ℃;A 相(0.1% 甲酸),B 相(80% 乙腈),流速为 0.6 mL/min,进样量 10 μL。电喷雾质谱条件:正离子电离模式,扫描范围 m/z 100~1500 Da,毛细管电压 2 kV,ESI⁺离子源温度 320 ℃,碰撞气为氮气。一级质谱参数设置:分辨率 70000(FWHM);自动增益控制(AGC)目标值 3×10⁶;最大注射时间 100 ms;扫描范围为 100~1500 m/z。二级质谱参数设置:分辨率 75000(FWHM);AGC 目标值 1×10⁵;最大注射时间 50 ms;选择前 20 个离子进行碎裂;碰撞能量值 28。质谱原始文件使用 Byonic 蛋白质组学分析软件,检索蛋白质数据库,得到氨基酸序列。

1.2.7 分离后肽段 GIR 测定 将分离后不同分子量区间的多肽样品冷冻干燥后,用 PBS 配制成 5 mg/mL 的样品溶液,同“1.2.4”项下方法测定 GIR。将阿卡

波糖、LIGF 和 EFGAF 用 PBS 分别配制成 1、2、3、5 mg/mL 的样品溶液,同“1.2.4”项下方法测定 GIR。

1.2.8 生物活性及理化性质预测 使用多种生物信息学工具对肽段进行性质预测和评估。首先采用 Peptide Ranker 对肽段的一级结构进行分析,预测其稳定性^[20],其次使用 ToxinPred(<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>)、Innovagen(<https://www.innovagen.com/service/peptide-property-calculator>) 和 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>) 等在线工具,预测肽段的潜在毒性、水溶性、等电点和稳定性^[19]。最后,使用 ADMETLab 2.0(<http://admet.scbdd.com>)服务平台,对肽段在人体内的吸收、分布、代谢、排泄和毒性等性质进行模拟评价^[21]。

1.2.9 分子对接 在 PDB 蛋白数据库中选取 α -葡萄糖苷酶晶体蛋白(PDB ID: 3AJ7)^[2]。使用 Autodock 软件对蛋白结构进行优化,并定义活性位点。进行多肽与葡萄糖苷酶的分子对接,并根据几何和能量匹配做出评价分析^[22]。采用 Consensus score 对多肽-酶的结合模型进行打分排序,以筛选出最佳结合模型。最后使用 PyMOL 软件对最佳结合模型进行作图,以便更好地观察和分析结合情况。

1.3 数据处理

每组实验设置 3 次平行测定,实验结果表示为平均值±标准差。使用 IBM SPSS Statistics 进行数显著性分析,采用 GraphPad Prism 9.4 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

考察了茶叶酶解产物制备工艺中提取温度、提取时间和料液比对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响,结果如图 1 所示。

图 1A 可知,酶解温度在 50 和 55 ℃时,产物的 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 52.13% 和 52.54%,温度降低或升高会显著降低产物活性,这可能是由于温度过低使反应不完全,温度过高导致蛋白酶变性和失活^[23]。因此,酶解温度选择为 50、55、60 ℃。

在图 1B 中可见,随着时间的延长,酶解产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率逐渐升高,在 3 h 时达到最高 50.51%,超过 3 h 后,产物活性开始下降,说明提取时间过长,茶渣底物的浓度会降低,这可能会影响酶促反应,导致反应速率下降,降低产品活性^[24],所以时间选择 2.5、3 和 3.5 h。如图 1C 所示,当液料比为 20:1,产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最高为 50.06%,但在 20:1~40:1(g/mL)之间,产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率变化并不显著。但当液料比为 40:1(g/mL)时,可能因为酶的相对浓度降低导致产物酶解效率和活性较低^[24],因此选择 10:1, 20:1 和 30:1(g/mL) 进行响应面试验。

2.2 响应面结果分析

通过响应面法对茶叶酶解产物制备工艺进行优

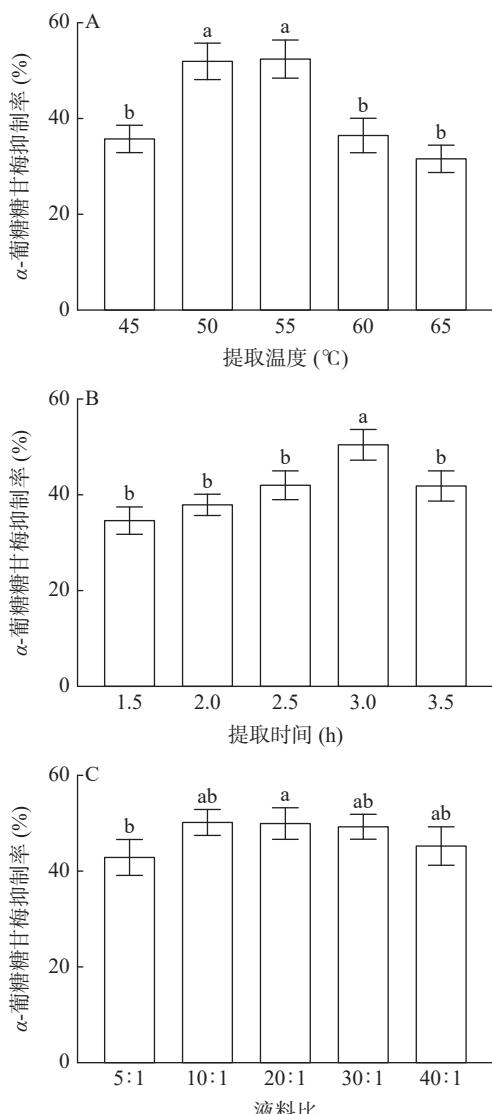


图 1 提取温度、提取时间和液料比对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.1 Influence of extraction temperature, extraction time and solvent-to-substrate ratio on the inhibition rate of α -glucosidase

注: 不同字母表示 $P<0.05$ 时, 不同组之间差异显著。

化, 共进行了 17 组实验, 结果见 2。

从表 2 可知, 以 α -葡萄糖苷酶的抑制率为响应值, 回归分析得到二次回归方程: $Y=50.83-10.25A-1.48B-0.48C-0.17AB+0.57AC+1.48BC-5.64A^2-10.57B^2+0.60C^2$ 。对方程进行方差分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 模型 $P<0.0001$, 回归模型极其显著; 失拟项 $P=0.9585$, 不显著, 决定系数 $R^2=0.9949$, 预测值 $R^2=0.9883$ 与调整后的 R^2 差值小于 0.2, 说明模型拟合程度良好, 能够较准确地预测和分析实际情况。模型的一次项 A、B, 二次项 A^2 、 B^2 对响应值的影响极其显著($P<0.01$); 交互项 AB 对响应值的影响显著($P<0.05$); 影响茶多肽提取的因素的作用顺序为 $A>B>C$, 即酶解温度>提取时间>液料比。

响应面法预测粗茶叶酶解产物的最佳制备工艺为: 酶解温度 50 °C, 酶解时间 3 h, 液料比 15:1(mL/g), 对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 58.2%。实际实验组中最

表 2 茶叶酶解产物制备工艺的响应面试验结果
Table 2 Response surface experimental results for tea peptide preparation process

实验号	A	B	C	Y: GIR(%)
1	0	0	0	51.53±2.86
2	1	-1	0	28.95±1.96
3	-1	0	1	54.32±3.03
4	-1	1	0	55.72±2.13
5	1	1	0	36.25±1.07
6	0	0	0	53.48±1.98
7	0	1	1	48.68±2.88
8	-1	0	-1	57.61±3.35
9	-1	-1	0	55.34±2.5
10	0	0	0	52.4±2.65
11	0	1	-1	49.72±3.37
12	0	-1	-1	45.89±3.62
13	0	-1	1	43.48±2.75
14	0	0	0	50.87±1.97
15	1	0	1	36.55±2.7
16	1	0	-1	37.09±1.69
17	0	0	0	50.64±1.76

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for regression models

方差来源	自由度	平方和	均方差	F值	P值	显著性
模型	1086.06	9	120.67	65.62	<0.0001	**
A温度	885.15	1	885.15	481.30	<0.0001	**
B时间	34.90	1	34.90	18.98	0.0033	**
C液料比	6.62	1	6.62	3.60	0.0995	
AB	11.97	1	11.97	6.51	0.0380	*
AC	1.89	1	1.89	1.03	0.3444	
BC	0.4692	1	0.4692	0.2551	0.6290	
A^2	71.98	1	71.98	39.14	0.0004	**
B^2	54.10	1	54.10	29.42	0.0010	**
C^2	6.65	1	6.65	3.62	0.0989	
残差	12.87	7	1.84			
失拟项	7.41	3	2.47	1.81	0.2854	
纯误差	5.46	4	1.37			
总误差	1098.93	16				

注: *代表 $P<0.05$; **代表 $P<0.01$ 。

佳工艺为酶解温度 50 °C, 酶解时间 3 h, 液料比 10:1(mL/g), 酶解产物对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 57.41%。为检验该模型的可靠性, 根据优化所得到最佳条件, 开展 3 组验证实验, 得到对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 56.82%±2.27%, 与预测值无显著差异。

2.3 肽段分子量的筛选

经超滤亲和分离-液相色谱-质谱技术分离并鉴定, 得到 624 条分子量在 400~2800 Da 的肽段。图 2 展示了茶叶酶解产物中肽段分子量和对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。这些肽段主要为低聚肽, 其中 266 条肽段的分子量为 800~1200 Da, 平均分子量为 988 Da, 占总肽段的 42.63%, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性为 67.04%。有 157 条 400~800 Da 的肽段, 平均分子量为 670 Da, 抑制率显著降低至 45.86% ($P<0.05$)。1600~2000 和 2000~2800 Da 肽段, 对 α -

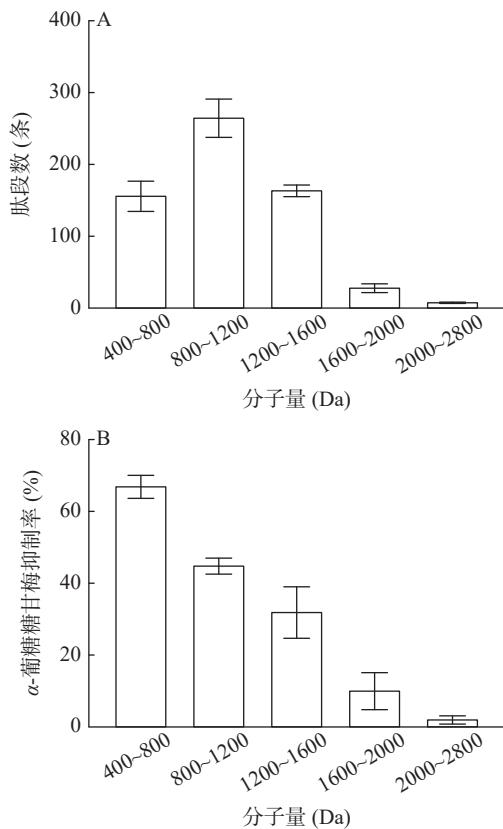


图 2 茶叶酶解产物中肽段分子量分布(A)及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性(B)

Fig.2 Peptide segments in the tea leaf enzymatic hydrolysis products molecular weight distribution (A) and its inhibition activity on α -glucosidase (B)

葡萄糖苷酶的抑制活性分别为 9.84% 和 3.04%。因此,400~800 Da 的肽段具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

2.4 生物活性及理化性质评估

结合分子量小于 800 Da 和氨基酸残基小于 7 个的生物活性肽筛选标准^[25],选择具有较强 α -葡萄糖苷酶抑制活性的低聚肽(400~800 Da)进行生物信息学虚拟筛选。使用 Peptide Ranker 预测,结果显示可能具有生物活性的肽段为 35 条。采用 Toxinpred 和 Innovagen 在线工具判断 35 条肽段的毒性、溶解性、等电点和稳定性,结果显示所有肽段均无毒,但仅有 9 条肽段水溶性较好。根据 Expasy 预测,筛选出 6 条肽段稳定性指数数小于 40 且等电点在 0.7~4.9 之间的肽段,该性质肽段有助于多肽酶抑制剂的活性和稳定性^[26~27]。

采用 ADMET 服务平台评估 6 条肽段的人体胃肠道吸收(HIA)和血脑屏障穿透(BBB)等特性^[28]。结果表明,6 条肽段的 BBB 特性、肠道稳定性都较好,均不是 CYP4503A4 酶的抑制剂。这表明这些多肽具有穿过血脑屏障的能力,在通过肠道吸收后,不会被代谢酶 CYP4503A4 降解,能够保持稳定性,也不会干扰其他药物的代谢。结合 HIA 和 30% 口服利用度分析,选择表现优秀的两个茶肽 LIGF 和 EPDAF

进行分子对接。

2.5 质谱分析

一级质谱确定肽段 LIGF 和 EPDAF 的相对分子质量分别为 448.28 和 569.26。通过 UniProt 数据库查询,两个肽段分别来源于山茶(Camellia sinensis) Spatacsin_C (UniProtKB:A0A7J7I5Q8) 和 Peptidase_S8 (UniProtKB:A0A7J7HMN5) 的结构域蛋白,分别由基因 HYC85_001559 和 HYC85_011168 编码。

二级质谱图提供肽段的碎片离子质荷比(m/z),完整肽段在质谱中从肽键位置被打碎为碎片离子,靠近肽段 N 端的为 b 离子,靠近 C 端的为 y 离子。**图 3A** 通过 b 离子(m/z 113.09, 227.18, 284.20)和 y 离子(m/z 166.09, 223.10, 336.19),确定肽段序列为 LIGF (Leu-Ile-Gly-Phe)。**图 3B** 通过 b 离子(m/z 130.05, 227.12, 342.13, 413.17)和 y 离子(m/z 166.09, 237.12),确定肽段序列为 EPDAF(Glu-Phe-Gly-Ala-Phe)。

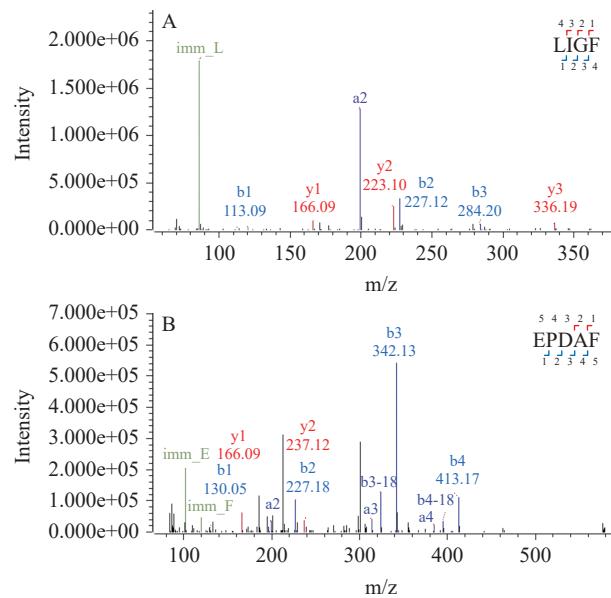


图 3 肽段的二级质谱图(A)LIGF(B)EPDAF
Fig.3 Secondary mass spectrometry (A) LIGF (B) EPDAF

2.6 配体与受体的分子对接

采用分子对接技术构建两种茶肽配体与 α -葡萄糖苷酶蛋白受体的结合模型,结果如**图 4** 所示。

图 4A 展示了配体 LIGF 与 α -葡萄糖苷酶受体对接后的复合物整体外部构象。在**图 4a** 中,结合多肽 N 端的苯丙氨酸(F)与 α -葡萄糖苷酶上的 Pro-488 和 Lys-568 残基形成 2 个氢键,亮氨酸(L)与 Glu-570 残基形成 3 个氢键。该对接结果的 Dockingscore 为 -3.51 kJ。**图 4B** 展示了配体 EPDAF 与 α -葡萄糖苷酶受体对接后的复合物整体外部构象。在**图 4b** 中,复合物多肽 N 端谷氨酸(E)与 α -葡萄糖苷酶的 Asn-401 残基形成 1 个氢键。该对接结果的 Dockingscore 为 -1.31 kJ。通过对比对接结果可知,LIGF 序列形成的氢键较多,与 α -葡萄糖苷酶结合的能力更强,能够形成更加稳定的复合体^[25,29]。

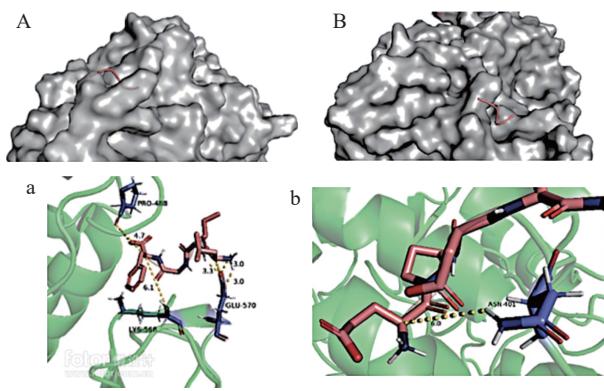
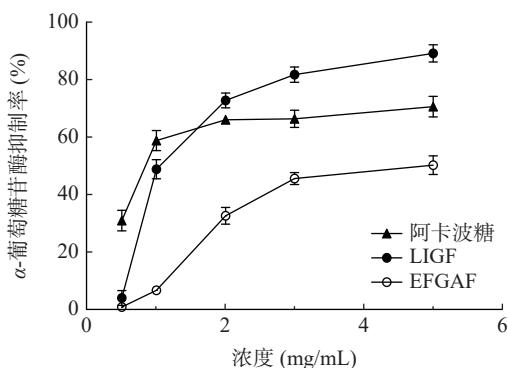
图 4 肽段与 α -葡萄糖苷酶分子对接模型

Fig.4 Molecular docking model of peptides with α -glucosidase
注: A: LIGF 与受体对接复合物的整体构象; B: EPDAF 与受体对接复合物的整体构象; a: LIGF 与受体对接复合物的局部空间构象; b: EPDAF 与受体对接复合物的局部空间构象。绿色为 α -葡萄糖苷酶受体, 红色为配体肽段, 黄色为氢键, 蓝色为亲电性区域, 紫色为亲核性区域, 白色为疏水性区域等。

2.7 茶肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

图 5 展示了茶肽和阿卡波糖在不同浓度下对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。结果显示 LIGF 对 α -葡萄糖苷酶的最大抑制率为 88.13%, 比阿卡波糖的最大抑制率高 19.59%。阿卡波糖、LIGF 和 EFGAF 的 IC₅₀ 值分别为 0.98、1.22 和 4.10 mg/mL。当浓度高于 2 mg/mL 时, LIGF 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率高于阿卡波糖, 这表明在一定浓度范围内, LIGF 具有比阿卡波糖更强的 α -葡萄糖苷酶抑制作用。

图 5 茶肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用Fig.5 Inhibition of α -glucosidase by tea polypeptides

3 结论

本研究采用响应面法确定了茶叶酶解产物的最佳制备工艺。结果表明, 碱性蛋白酶解温度 50 °C, 酶解时间 3 h, 液料比 10:1(g/mL)条件下, 酶解液对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 57.61%。经超滤亲和分离-液相色谱-质谱技术分离并鉴定, 得到 624 条分子量在 400~2800 Da 的肽段。选择具有较强 α -葡萄糖苷酶抑制活性的低聚肽(400~800 Da)进行生物信息学虚拟筛选, 得到茶肽 LIGF 和 EPDAF。5 mg/mL LIGF 对 α -葡萄糖苷酶的最大抑制率为 88.13%, 比阿卡波糖的最大抑制率高 19.59%, IC₅₀ 值为 1.22 mg/mL。

分子对接分析显示, LIGF(亮氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸)与 α -葡萄糖苷酶能形成 5 个氢键, 结合能为 -3.51 kJ, 具有高的亲和力、稳定性、以及与 α -葡萄糖苷酶结合的能力。LIGF 具有成为 II 型糖尿病治疗药物的潜在价值。

参考文献

- LEHMANN A, HORNBY P J. Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2016, 310(11): 887–898.
- THAO T T P, BUI T Q, HAI N T T, et al. Newly synthesised oxime and lactone derivatives from Dipterocarpus alatus dipterocarpol as anti-diabetic inhibitors: Experimental bioassay-based evidence and theoretical computation-based prediction[J]. RSC Advances, 2021, 11(57): 35765–35782.
- 崔艳荣. 大柴胡汤对 2 型糖尿病模型大鼠氧化应激致胰岛 β 细胞损伤的影响[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2019. [CUI Y R. Effect of Dachaihu decoction on oxidative stress induced beta-cell injury of islet rats with type 2 diabetes[D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2019.]
- 田文国, 刘毅, 盖晓红, 等. 地黄治疗 2 型糖尿病作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(23): 7575–7584. [TIAN W G, LIU Y, GAI X H, et al. Research progress on mechanism of rehmanniae radix in treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(23): 7575–7584.]
- ZHANG Y, WU F, HE Z, et al. Optimization and molecular mechanism of novel α -glucosidase inhibitory peptides derived from camellia seed cake through enzymatic hydrolysis[J]. Foods, 2023, 12(2): 393.
- 祝子坪, 欧燕清, 刘家全, 等. 超声辅助酶解茶渣蛋白制备抗氧化活性肽[J]. 分子植物育种, 2020, 18(2): 573–578. [ZHU Z P, OU Y Q, LIU J Q, et al. Preparation of antioxidant peptides from proteins in tea residues through ultrasonic-assisted enzymolysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(2): 573–578.]
- PATIL S P, GOSWAMI A, KALIA K, et al. Plant-derived bioactive peptides: A treatment to cure diabetes[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(2): 955–968.
- WANG R, ZHAO H, PAN X, et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(5): 1848–1856.
- LIN Y C, HSU P K. Evidence based study of hypoglycemic potential of bitter melon peptide[J]. American Journal of Biomedical Science & Research, 2020, 9(1): 60–63.
- AYIM I, MA H, ALI Z S, et al. Preparation of antioxidant peptides from tea (*Camellia sinensis* L.) residue[J]. Journal of food Measurement and Characterization, 2018, 12(3): 2128–2137.
- ZHANG H, CHEN Y, GUO Y, et al. Label-free quantification proteomics reveals the active peptides from protein degradation during anaerobic fermentation of tea[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 150(39): 111950.
- LAI X, PAN S, ZHANG W, et al. Properties of ACE inhibitory peptide prepared from protein in green tea residue and evaluation of its anti-hypertensive activity[J]. Process Biochemistry, 2020, 92(5): 277–287.
- 代成, 谭梓铭, 张阳, 等. 超声波预处理酶解制备茶渣蛋白 ACE 抑制肽及其活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 192–200. [DAI C, TAN Z M, ZHANG Y, et al. Ultrasonic pre-treatment for the preparation of ACE-inhibitory peptides from the tea

- residue protein through enzymatic hydrolysis and its stability[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(16): 192–200.]
- [14] 杜梦珂. 富硒碱性茶蛋白 ACE 抑制肽的制备、分离纯化及结构鉴定[D]. 上海: 上海师范大学, 2018. [DU M K. Study on the preparation, purification and identification of ACE inhibitory activity peptides from Se-enriched tea protein[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2018.]
- [15] WEN Y. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 105(1): 308–322.
- [16] 叶灏锋, 苗建银, 李龙星, 等. 劲库大叶茶蛋白降血脂肽的酶解制备及活性分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(9): 212–221.
- [YE H D, MIAO J Y, LI L X, et al. Preparation and activity of hypolipidemic peptides from Mengkudayecha protein by enzymatic hydrolysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(9): 212–221.]
- [17] 颜宇, 胡锦灵, 赵宏飞, 等. 基于生物信息学定向制备柠条籽蛋白抗氧化肽的工艺优化[J]. *食品科学*, 2020, 41(20): 278–284.
- [JIE Y, HU J L, ZHAO H F, et al. Optimization of bioinformatics-based directional preparation of antioxidant peptide from *Caragana* seed protein[J]. *Food Science*, 2020, 41(20): 278–284.]
- [18] WU J L, WEI Z J, CHEN G, et al. Rapid screening for α -glucosidase inhibitors from *gymnema sylvestre* by affinity ultrafiltration-HPLC-MS[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 8: 228.
- [19] CHEN G, GUO M. Rapid screening for α -glucosidase inhibitors from *gymnema sylvestre* by affinity ultrafiltration-HPLC-MS[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 228.
- [20] HASSAN N M, ALHOSSARY A, MU Y, et al. Protein-ligand blind docking using quickvina-W with inter-process Spatio-Temporal integration[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 15451.
- [21] CATHERINE M, HASLA N J, GIANLUCA P, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: Common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45012.
- [22] JI D, XU M, AGYEI D, et al. Physicochemical characterisation, molecular docking, and drug-likeness evaluation of hypotensive peptides encrypted in flaxseed proteome[J]. *Current Research in Food Science*, 2020, 3: 41–50.
- [23] 陈海君, 秦惠玉, 龙飞, 等. 超滤亲和结合液相色谱-质谱联用和分子对接技术筛选毛菊苣种子中高亲和性 α -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. *分析化学*, 2017, 45(6): 889–897. [CHEN H J, QIN H Y, LONG F, et al. Screening of high-affinity α -glucosidase inhibitors from *cichorium glandulosum* Boiss. et hout seed based on ultrafiltration liquid chromatography-mass spectrometry and molecular docking[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(6): 889–897.]
- [24] REZAUL K, SHAHEEN S, AMARCHAND C M. Anti-amyloytic activity of fresh and cooked okra (*Hibiscus esculentus* L.) pod extract[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2014, 3(4): 373–377.
- [25] SPIGNO G, TRAMELLI L, DMD F. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 81(1): 200–208.
- [26] CUI Q, XING N I, ZENG L, et al. Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2017, 3(4): 172–176.
- [27] 李志明, 张舒, 孟维洪, 等. 食源性 α -葡萄糖苷酶抑制肽: 构效关系、安全性及生物利用度[J/OL]. *食品科学*: 1–18 [2023-07-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221101.1612.020.html>]
- [28] 张晓红, 曹新志, 刘芳, 等. 蚕丝蛋白水解液中多肽相对分子质量分布的测定[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(7): 95–99. [LI L L, CAO X Z, LIU F, et al. Determination of molecular weight distribution of peptides in silk protein hydrolysate[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(7): 95–99.]
- [29] MELISSA R P, STEPHANIE M C, et al. Isoelectric point separations of peptides and proteins[J]. *Proteomes*, 2017, 5(1): 4.