

文章编号: 1674-5566(2023)06-1155-10

DOI: 10.12024/jsou.20230104059

## 脱脂南极磷虾粉中降血糖与抗氧化肽的分离纯化与鉴定

赵 侠, 李 燕, 孙慧敏, 郑昌亮, 宋益善

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘 要:** 食源性二肽基肽酶 IV (Dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV) 抑制肽和抗氧化肽分别有助于清除体内自由基和调节机体血糖。为实现脱脂南极磷虾粉的高值化利用, 以及为糖尿病治疗寻找新方法, 本研究从脱脂南极磷虾粉酶解产物中制备 DPP-IV 抑制肽和抗氧化肽段。使用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和胰酶水解脱脂南极磷虾粉, 探究时间与水解度、活性、产率的关系, 并分离纯化多肽, 最后通过分子对接确定抑制作用位点。结果表明, 酶解液经超滤、Sephadex G15 分离纯化和液相-质谱联用技术鉴定后, 得到了 4 条具有 DPP-IV 抑制和抗氧化作用的肽, 氨基酸序列分别为 WPPLSPFRCPR、IPDWFLNRQ、FLWLKKTPLPL 和 DTVPWFPR。其中 IPDWFLNRQ 具备较高的 DPP-IV 抑制活性, DPP-IV 抑制活性  $IC_{50}$  值为  $(0.616 \pm 0.097)$  mmol/L; WPPLSPFRCPR 具有较高的抗氧化活性, DPPH  $EC_{50}$  值为  $(0.0983 \pm 0.011)$  mmol/L, ABTS  $EC_{50}$  值为  $(0.116 \pm 0.073)$  mmol/L。分子对接结果表明这 4 个肽主要通过氢键与 DPP-IV 活性中心及其以外的位点相结合, 从而达到抑制 DPP-IV 活性的作用。本研究基于脱脂南极磷虾粉制备食源性 DPP-IV 抑制肽和抗氧化肽, 以期为南极磷虾粉的开发利用提供理论依据。

**关键词:** 脱脂南极磷虾粉; 二肽基肽酶 IV 抑制肽; 抗氧化肽; 分子对接

**中图分类号:** TS 254.1 **文献标志码:** A

糖尿病是一种以高血糖为主要特征的代谢性疾病, 会引发肾功能衰竭、心脏病变等糖尿病并发症, 多数是由于患者体内活性氧自由基水平升高, 导致氧化应激而引发的<sup>[1-2]</sup>。抗氧化剂可以通过减少自由基的产生、直接淬灭体内自由基及增强机体的抗氧化能力等途径来减少氧化损伤, 从而达到预防糖尿病及其并发症的作用。DPP-IV (二肽基肽酶 IV) 抑制剂目前普遍用于临床降血糖治疗, 常用的抑制剂有西格列丁、沙格列丁等, 但是长期服用会引起一系列的副作用<sup>[3]</sup>。据报道, 活性肽具有无毒、温和、易吸收的特点, 一些抗氧化肽除了具有抗氧化功能活性, 还可通过抑制 DPP-IV 的活性来延迟人体对葡萄糖的吸收达到降血糖的目的<sup>[4]</sup>。这使得从天然蛋白质中提取得到的食源性 DPP-IV 抑制肽和抗氧化肽具有突出优势而备受关注。

南极磷虾 (*Euphausia superba*) 生物资源量为

3.42 亿~3.56 亿 t。南极磷虾氨基酸种类丰富、蛋白质含量高, 是世界上最大的动物蛋白质资源, 其蛋白质中含有 8 种必需氨基酸, 被认为是未来海洋食品和保健品中最合适和最丰富的资源<sup>[5]</sup>。脱脂南极磷虾粉是南极磷虾油加工的副产物, 其蛋白质含量超过 65%, 具有高蛋白低脂肪的特点。目前, 南极磷虾蛋白水解物表现出多种生物活性, 是提取生物活性肽的优质原料。ZHAO 等<sup>[6]</sup>从南极磷虾蛋白水解物中分离出 8 种抗高血压肽; SUN 等<sup>[7]</sup>发现锌与南极磷虾肽螯合后比硫酸锌和葡萄糖酸锌在胃肠道中更稳定; PARK 等<sup>[8]</sup>发现胃蛋白酶酶解南极磷虾 4 h 得到的水解产物具有最高的 DPPH 清除活性和 ACE (血管紧张素 I 转换酶) 抑制活性。然而, 关于从脱脂南极磷虾粉中提取到同时具有 DPP-IV 抑制活性和抗氧化活性的多肽研究很少。

因此, 本研究以脱脂南极磷虾粉为原料, 通

收稿日期: 2023-01-06 修回日期: 2023-04-13

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0902000)

作者简介: 赵 侠(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产品副产物综合利用。E-mail: 1508184993@qq.com

通信作者: 宋益善, E-mail: yssong@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

过酶解法提取多肽,以 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力以及 DPP-IV 抑制能力为标准,采用超滤和凝胶层析技术进行纯化。最后对活性肽进行结构鉴定,并通过分子对接研究 DPP-IV 抑制肽的抑制机理,以期为脱脂南极磷粉的高值化利用和降血糖、抗氧化药物的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脱脂南极磷虾粉由山东康境海洋生物工程有限公司(山东,中国)于2022年2月提供。其中,水分含量为5.98%,粗蛋白含量为72.26%,粗脂肪含量为3.02%,灰分含量为10.23%。碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶均来自天津诺奥酶促有限公司(天津,中国)。DPP-IV 抑制剂筛选试剂盒、邻苯二甲醛(OPA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(上海,中国)。其他试剂均为分析级,来自北京百灵威科技有限公司(北京,中国)。

### 1.2 仪器与设备

主要仪器与设备:GL-21M 高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;HDB-7L 核酸蛋白检测仪、CBA-A 程控多功能全自动部分收集器,上海沪西分析仪器有限公司;FD-1PF 冷冻干燥机,北京德天游有限公司;FLEXSTATION3 多功能读板机,美国 Molecular Devices 公司;ULTIMATE3000 毛细管高效液相色谱仪、Q EXACTIVE 四级杆-静电场轨道阱高分辨液相色谱-质谱联用仪,赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 脱脂南极磷虾酶解液的制备

脱脂南极磷虾粉放入8倍体积的蒸馏水中,水浴加热至55℃保持30 min,然后加入碱性蛋白酶、胰酶和中性蛋白酶,每种酶的剂量为1%(质量分数)。在分别反应1、2、3、4、5、6 h后,将水解物取出再次加热到90℃保持20 min,使酶失活,然后离心30 min(10 000×g,4℃)。上清液冻干后在-20℃保存(最长保存期限为3个月)。在冻干后,肽的得率(Y)的计算公式:

$$Y(\%) = \frac{W_1}{W_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $W_1$ 和 $W_2$ 分别为冻干后肽粉的质量和虾粉蛋白的质量,g。

参考TANG等<sup>[9]</sup>的方法,使用OPA法对酶解液的水解度进行测定。将1.91 g四硼酸钠,100 mg 十二烷基硫酸钠,88 mg二硫苏糖醇,溶于50 mL 蒸馏水中制备OPA试剂。然后,在避光环境中将80 mg OPA试剂溶解在2 mL无水乙醇中。用蒸馏水定容至100 mL。使用甘氨酸标准品与OPA试剂反应,绘制标准曲线。将水解产物稀释至4 mg/mL。取500 μL样品与3 mL OPA试剂混合,反应2 min后,用紫外分光光度计测定其在335 nm处的吸光度。水解度( $D_H$ )计算公式:

$$D_H(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $h$ 为通过甘氨酸标准曲线计算断裂肽键数; $h_{\text{tot}}$ 为单位重量的肽键总数。

#### 1.3.2 DPP-IV抑制活性的测定

将肽溶解在Tris-HCl缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0)中制备样品溶液,50 μL DPP-IV (10 U/L)和25 μL样品在96孔板37℃孵育10 min。然后加入25 μL Gly-Pro-pNA(1.6 mmol/L)底物,37℃孵育15 min后测定其荧光强度。DPP-IV抑制率( $W_{\text{DPP-IV}}$ )计算公式:

$$W_{\text{DPP-IV}}(\%) = \frac{F_{\text{control}} - (F_{\text{sample}} - F_{\text{blank}})}{F_{\text{control}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $F_{\text{control}}$ 为对照组的荧光值; $F_{\text{sample}}$ 为样品组的荧光值; $F_{\text{blank}}$ 为空白组的荧光值。

#### 1.3.3 DPPH自由基清除活性

首先,将1.5 mL肽溶液(5 mg/mL)与等体积5 mg/100 mL浓度的DPPH溶液混合,并在避光的环境中保存30 min。使用紫外分光光度计在517 nm测量。DPPH自由基清除率( $W_{\text{DPPH}}$ )计算公式:

$$W_{\text{DPPH}}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: $A_{\text{sample}}$ 为样品组的吸光度; $A_{\text{blank}}$ 为空白组的吸光度。

#### 1.3.4 ABTS自由基清除活性

7 mmol/L ABTS与2.45 mmol/L过硫酸钾混合,在黑暗中保存16 h后,用0.2 mol/L PBS (pH 7.4)稀释该混合物制备ABTS溶液,此时ABTS溶液的吸光度在734 nm处为 $0.70 \pm 0.02$ 。然后,将30 μL肽溶液(5 mg/mL)与3 mL ABTS溶液混匀,在避光的环境中放置6 min。然后在734 nm处读

取吸光度。ABTS 自由基清除活性( $W_{ABTS}$ )计算公式:

$$W_{ABTS}(\%) = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100\% \quad (5)$$

式中: $A_{sample}$  为样品组的吸光度; $A_{blank}$  为空白组的吸光度。

### 1.3.5 酶解液超滤分离

脱脂南极磷虾粉酶解液经过超滤,在不同的分子量  $\geq 10$  ku,  $10 \text{ ku} > MW \geq 5$  ku,  $5 \text{ ku} > MW \geq 3$  ku 和  $< 3$  ku 范围内收集,收集的 4 个组分被浓缩、冻干并保存在  $-20^\circ\text{C}$  进一步分析。

### 1.3.6 凝胶过滤层析

将目标超滤组分溶于去离子水 ( $20 \text{ mg/mL}$ ) 中。将  $5 \text{ mL}$  样品注入 Sephadex G-15 凝胶柱然后使用去离子水洗脱样品。按照每  $6 \text{ min}$  收集一次,用核酸蛋白检测仪在  $254 \text{ nm}$  下测定样品洗脱曲线的吸光度。肽段按照得到的 6 个峰进行分组。收集不同的组分,冻干,然后存储在  $-20^\circ\text{C}$  以进一步分析。

### 1.3.7 质谱鉴定

参考 LANG 等<sup>[10]</sup>的方法,使用 LC-MS/MC 测定脱脂南极磷虾肽的氨基酸序列。

### 1.3.8 分子对接

通过同源对比和检索从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获取 DPP-IV (PDB ID: 5y7h) 的三维晶体结构,使用 AutoDock 软件对 DPP-IV 受体蛋白进行处理,多肽的 3D 结构采用 PyMol 2.5.4 构建,将多肽配体和 DPP-IV 受体进行对接<sup>[11]</sup>。来研究所鉴定的肽与 DPP-IV 的抑制机制。

### 1.3.9 肽的筛选与合成

通过 PeptideRanker 软件 (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>) 预测多肽的潜在生物活性,使用 iDPPIV-SCM 软件 (<http://camt.pythonanywhere.com/iDPPIV-SCM>) 对多肽的 DPP-IV 抑制活性进行评分,根据 CONWAY 等<sup>[12]</sup>的方法对多肽的抗氧化活性进行了评分。从 LC-MS/MS 鉴定结果中筛选出的多肽由杭州丹港有限公司合成。通过反相高效液相色谱-质谱联用分析,合成的多肽纯度在 95% 以上。

## 1.4 数据分析

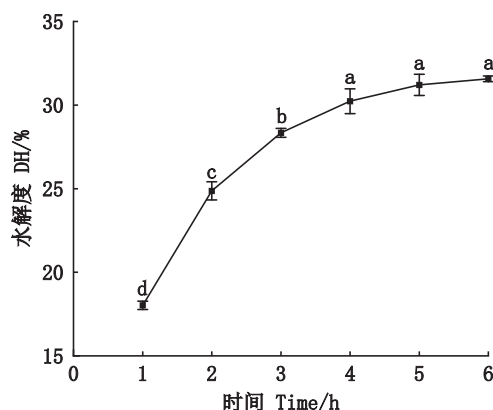
所有的测定进行 3 次。每组数据使用 IBM SPSS Statistics 23 进行方差分析,以多重比较法进

行显著性分析 ( $P < 0.05$ )。采用 Originpro 2020 进行绘图,图中标有不同字母表示组间有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脱脂南极磷虾粉酶解液的产率、水解度和活性

水解度能反映肽键的裂解程度,与肽链的长度有关,也会影响其结构中氨基酸的暴露情况和生物活性。如图 1 所示,在水解的初始阶段,即前  $2 \text{ h}$ ,大量肽键被裂解水解,水解度迅速上升。后面趋于平缓,是因为酶解前期大量肽键被切断,释放出大量短肽。JIN 等<sup>[13]</sup>在使用 4 种不同的酶处理大西洋鲑鱼皮时水解度在前  $60 \text{ min}$  时急剧增加,随后水解度开始平缓。HONG 等<sup>[14]</sup>通过风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶水解鲑鱼鱼鳔发现,水解度在第 1 小时内快速增长。在本实验中酶解脱脂南极磷虾粉时,水解度上升时间较长,其原因可能是虾粉蛋白质含量高且水分含量较少,在酶解初始阶段,部分蛋白质未与溶剂接触,但是经过长时间的浸泡后,未接触部分开始暴露,故水解度在  $3 \text{ h}$  前持续上升。由图 2 也可得知,酶解时间越久,肽的产率也会逐渐升高,这是因为一些难溶的蛋白开始溶解后被酶酶解。



相同小写字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

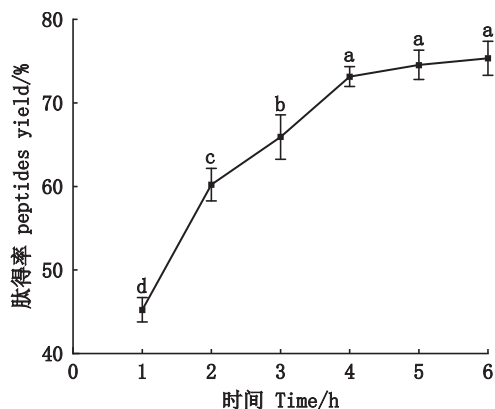
图 1 酶解时间与水解度之间的关系

Fig. 1 Effect of hydrolysis time on degree of hydrolysis

脱脂南极磷虾粉酶解液的活性测定见图 3 和图 4。在水解  $4 \text{ h}$  后,酶解产物表现出较高的抗氧



化性能(ABTS 自由基清除率为  $34.35\% \pm 1.30\%$ , DPPH 自由基清除率为  $43.50\% \pm 1.20\%$ , 肽质量为  $5 \text{ mg/mL}$ )。肽的抗氧化性能与分子量、氨基酸组成和疏水性相关。在刘辉等<sup>[15]</sup>的研究中,从大豆蛋白中纯化鉴定出抗氧化肽 IPPGVPIY,其分子质量为  $741.4 \text{ u}$ ,并且具有较多的疏水性氨基酸。同时,在  $4 \text{ h}$  时酶解液的 DPP-IV 抑制活性也达到了一个较高的水平,这是因为 DPP-IV 抑制肽和抗氧化肽具有一定的共性,即多肽的疏水性以及较低的分子量,因此在酶解时间  $4 \text{ h}$  时,酶解产物的生物活性都达到了一个较高水平。

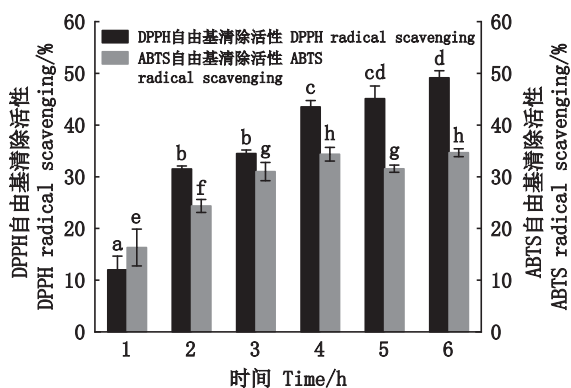


相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图2 酶解时间与肽得率之间的关系

Fig. 2 Effect of hydrolysis time on peptides yield

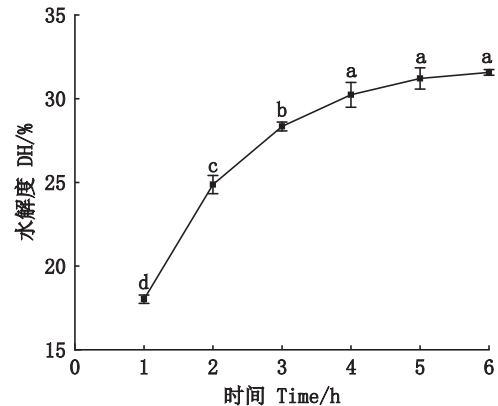


相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图3 脱脂南极磷虾水解物酶解时间与DPPH和ABTS自由基清除活性的关系( $5 \text{ mg/mL}$ )

Fig. 3 Effect of hydrolysis time on DPPH and ABTS free radical scavenging of Antarctic krill hydrolysates ( $5 \text{ mg/mL}$ )



相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图4 酶解时间与肽得率之间的关系脱脂南极磷虾水解物酶解时间与DPP-IV抑制活性的关系( $20 \text{ mg/mL}$ )

Fig. 4 Effect of hydrolysis time on DPP-IV inhibitory activity of Antarctic krill hydrolysates ( $20 \text{ mg/mL}$ )

## 2.2 脱脂南极磷虾粉酶解液超滤分离

超滤是一种根据溶液中分子大小来分离溶液中分子的技术<sup>[16]</sup>。酶解  $4 \text{ h}$  的水解物具有较高的生物活性,将其通过超滤分为4个组分: $\geq 10 \text{ ku}$ 、 $10 \text{ ku} > \text{MW} \geq 5 \text{ ku}$ 、 $5 \text{ ku} > \text{MW} \geq 3 \text{ ku}$  和  $< 3 \text{ ku}$ 。其体外抗氧化能力、DPP-IV 抑制活性如表1所示。如表所示, $< 3 \text{ ku}$  的多肽组分具有明显高于原水解物和其他3个超滤组分生物活性的特点,相比原始酶解产物, $< 3 \text{ ku}$  组分 DPP-IV 抑制活性提高了6%, DPPH 自由基清除活性提高了27%, ABTS 自由基清除活性提高了16%。WANG等<sup>[17]</sup>从鲭鱼中提取抗氧化肽,通过超滤发现分子量低于  $3 \text{ ku}$  的肽表现出最高的 DPPH 自由基清除活性。尹剑等<sup>[18]</sup>酶解鲟鱼皮胶原蛋白,发现超滤得到的  $< 3 \text{ ku}$  的组分具有更高的 DPP-IV 抑制活性,这些研究结果与本研究结果类似。通过超滤富集了低分子量的多肽组分,提高了多肽抗氧化活性和 DPP-IV 抑制活性<sup>[19]</sup>,进一步表明了较低分子量的肽具有较高的生物活性。因此,将水解物中  $< 3 \text{ ku}$  的超滤组分进行下一阶段的纯化。

## 2.3 葡聚糖 Sephadex-G15 分离

与超滤不同的是葡聚糖凝胶过滤可以更精细的方式分离不同分子量的水解物。在本实验中,分子量  $< 3 \text{ ku}$  的馏分通过 Sephadex G-15 柱后被分离成6个组分(M1、M2、M3、M4、M5和M6,见图5)。如图6~8所示,M3与其他各组相比表现出最高的抗氧化活性,

其DPPH自由基清除率为77.99%±1.20%,ABTS自由基清除率为84.60%±0.20%。M3的DPP-IV抑制活性也高于其他2个馏分,其抑制率为57.23%±0.48% (肽质量浓度:5 mg/mL)。这些结果表明,M3同时具有较高的抗氧化和DPP-IV抑制活性。ZHANG等<sup>[20]</sup>

也发现采用凝胶色谱法分离鳙鱼肌肉水解物后的一种成分中同时具有较高的DPP-IV抑制活性和DPPH自由基清除活性。这些发现证实了分子大小在决定多肽的生物活性方面起着关键作用。因此,收集M3馏分用于进一步分析肽的序列。

表1 超滤组分的抗氧化活性和DPP-IV抑制活性

Tab. 1 Antioxidant activity and DPP-IV inhibitory activity of ultrafiltration fractions.

超滤组分 Ultrafiltration fractions	DPP-IV抑制率 20 mg/mL DPP-IV inhibitory activity /%	DPPH自由基清除活性 5 mg/mL DPPH free radical scavenging /%	ABTS自由基清除活性 5 mg/mL ABTS free radical scavenging /%
≥10 ku	45.67±1.20 <sup>a</sup>	16.73±2.10 <sup>a</sup>	27.48±1.10 <sup>b</sup>
10 ku>MW≥5 ku	52.73±0.14 <sup>b</sup>	34.68±0.75 <sup>b</sup>	20.37±0.73 <sup>a</sup>
5 ku>MW≥3 ku	70.94±0.78 <sup>c</sup>	42.29±1.20 <sup>c</sup>	40.33±2.20 <sup>c</sup>
< 3 ku	83.12±0.77 <sup>d</sup>	55.40±0.45 <sup>d</sup>	40.25±1.10 <sup>d</sup>

注:相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Notes: Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

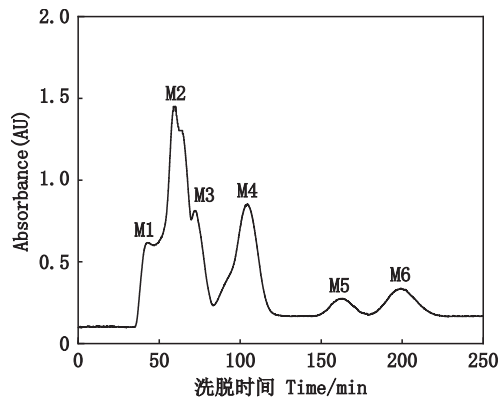
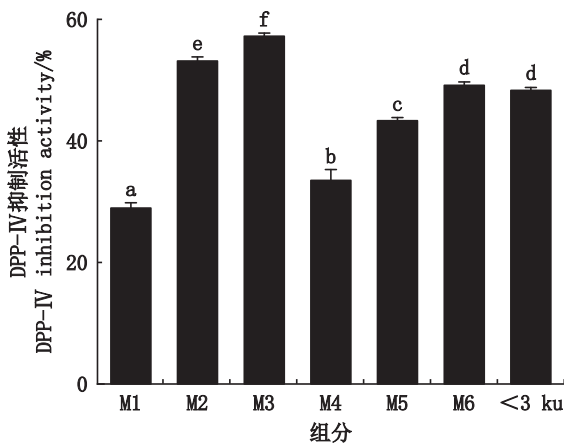


图5 Sephadex G-15凝胶色谱图

Fig. 5 Sephadex G-15 gel chromatogram



相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

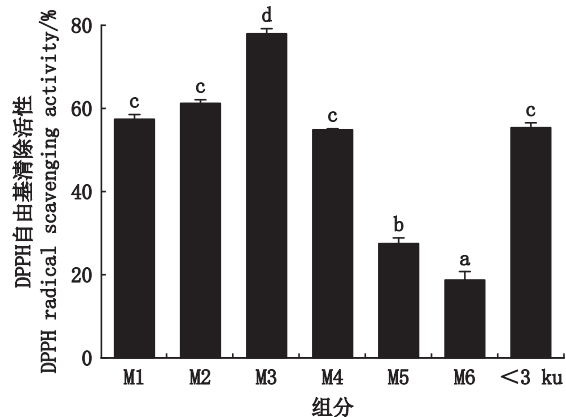
Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图6 各组分DPP-IV抑制活性

Fig. 6 Inhibition activity of DPP-IV of fraction

## 2.4 LC-MS/MS质谱鉴定

通过LC-MS/MS共鉴定了128条来自M3组分的肽。在所有的肽段中,根据肽段的MS/MS谱的得分、PeptideRanker软件的预测分数、iDPP-IV-SCM软件评分并根据CONWAY等<sup>[12]</sup>的方法对多肽序列进行了评分。根据评分结果,模拟筛选出6条(Trp-Pro-Pro-Leu-Ser-Pro-Phe-Arg-Cys-Pro-Arg, Asn-Arg-Pro-Ile-Pro-Trp-Ile, Ile-Pro-Asp-Trp-Phe-Leu-Asn-Arg-Gln, Pro-Phe-Gly-Leu-Tyr-Val-His-His-Ser-Trp-Phe, Phe-Leu-Trp-Leu-Lys-Lys-Thr-Pro-Leu, Asp-Thr-Val-Pro-Trp-Phe-Pro-Arg)具有潜在高抗氧化和降血糖活性的肽,其MS/MS图谱见图9。

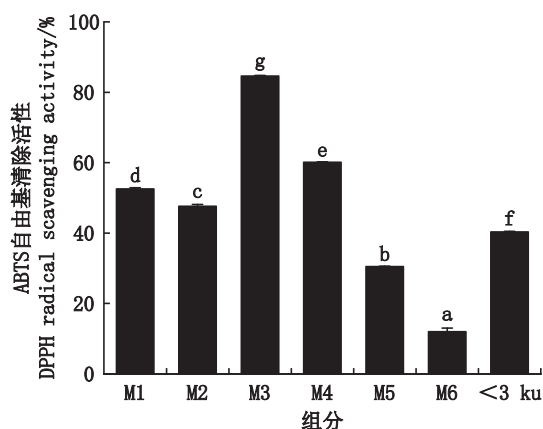


相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图7 各组分DPPH自由基清除活性

Fig. 7 DPPH radical scavenging activity of fractions



相同小写字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), while with different lowercase letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图8 各组分 ABTS 自由基清除活性

Fig. 8 ABTS radical scavenging activity of fractions

多肽的生物活性往往与它们所含的特定氨基酸的比例和这些氨基酸的位置有关<sup>[12,21]</sup>。研究<sup>[22]</sup>表明,一些具有较高抗氧化活性的肽序列,其结构中一般含有这几种氨基酸 Leu、Val、Gly、Ala 和 Pro。MEDNDIS 等<sup>[23]</sup>纯化了来自巨型鱿鱼皮明胶的多肽,发现疏水氨基酸含量高的多肽显示出强大的抗氧化活性。同样,RANATHUNGA 等<sup>[24]</sup>发现,来自海鳗的高抗氧化肽也含有高比例的疏水性氨基酸,包括 Leu、Gly 和 Val。这些发现表明,疏水氨基酸的比例可以决定多肽的抗氧化活性。在我们筛选出 6 个多肽序列中,除了 PFGLYVHHSWF 外,其他都有 2~6 个上述特征氨基酸,WPPLSPFRCPR 具有最高的抗氧化活性 [DPPH  $EC_{50}$ : (0.098 3±0.011) mmol/L, ABTS  $EC_{50}$ : (0.116±0.073) mmol/L], 可能是因为它具有计较多数量的 Pro,这进一步证实了特定氨基酸对抗氧化活性的重要性。

一般来说,具有高疏水性氨基酸残基的肽可以抑制 DPP-IV 的活性<sup>[25]</sup>,特别是 N 端有 Trp 的多肽<sup>[18]</sup>。WPPLSPFRCPR 具有这种特征结构,因此显示出较高的 DPP-IV 抑制活性<sup>[26]</sup>。其他 DPP-IV 抑制肽的有关的结构特征包括肽中第二位氨基酸为 Pro 或 Ala,以及 N 端氨基酸为 Leu 或 Ile。WPPLSPFRCPR 和 IPDWFLNRQ 具有这些典型结构。在分析的 6 个序列中,有 4 个序列的 DPP-IV  $IC_{50}$  小于 5 mmol/L,这与以前的研究一致<sup>[27]</sup>。为了进一步研究 DPP-IV 抑制肽

的活性机制,对这 4 条 DPP-IV 抑制肽进行了分子对接研究。

## 2.5 分子对接

在这项研究中,AutoDock Vina 软件用来模拟 DPP-IV 单体与 4 个选定的肽的对接。亲和力分数是基于各种因素,包括空间效应、排斥、氢键、疏水相互作用和受体-配体复合物之间的灵活性,反映了配体与受体有效结合的可能性。较低的对接分数表明肽和 DPP-IV 之间有更好的结合构象<sup>[28]</sup>。亲和力为负值表明有结合的可能性,一般来说,小于 -6 kcal/mol 的值表明有很大的结合可能性。在这项研究中,多肽 IPDWFLNRQ 的对接分数最低 (-8.6 kcal/mol),这与体外实验的结果一致。

图 10 是 4 种肽和 DPP-IV 组合的三维图,可以更清楚地看到对接模式。DPP-IV 有 3 个结合袋, S1 活性位点由 Tyr547、Ser630、Tyr631、Val656、Trp659、Tyr662、Asn710、Val711 和 His740 组成; S2 活性位点由 Glu205、Glu206 和 Tyr662 组成; S3 活性位点由 Ser209、Arg358 和 Phe357 组成<sup>[29]</sup>。对接能量得分列于表 3。一般来说,与反应中心的一个口袋结合的亲和能量较低的肽更有可能成为抑制剂,而亲和能量较高的肽则不太可能成为抑制剂。从图 10a 和 10b 可以看出,WPPLSPFRCPR 结合在蛋白质的内部空腔中。相互作用细节图宣布,短肽 WPPLSPFRCPR 上的 Trp1、Pro3、Ser5、Pro6、Arg8、Arg11 与 DPP-IV 蛋白上的 Asp545、Tyr752、Ser630、Arg125、Asp556、Tyr456 氢键结合。IPDWFLNRQ 上的 Ile1、Pro2、Asp3、Arg8、Gln9 与 DPP-IV 蛋白上的 Tyr585、Cys551、Tyr456、Gln553、Tyr547、Glu206 和 His740 氢键结合。FLWLKKTPLPL 上的 Phe1、Lys5、Lys6、Pro8、Pro10 分别与 DPP-IV 蛋白上的 His126、Gly741、Ile742、His748、Val546、Asp545、Arg560、Gln553 氢键。DTVPWFPR 上的 Asp1、Pro4 和 Arg8 分别与 DPP-IV 蛋白上的 Tyr662、Gln553、Tyr631、Gly741、Ser630 和 Tyr752 氢键。除 FLWLKKTPLPL 外,其他 3 种肽都与 DPP-IV 的活性口袋形成氢键。然而,根据图 10c, FLWLKKTPLPL 的结合点也在 DPP-IV 活性部位附近。因此,除了氢键与 DPP-IV 功能位点结合外,可能还有其他相互作用,需要进一步探索。

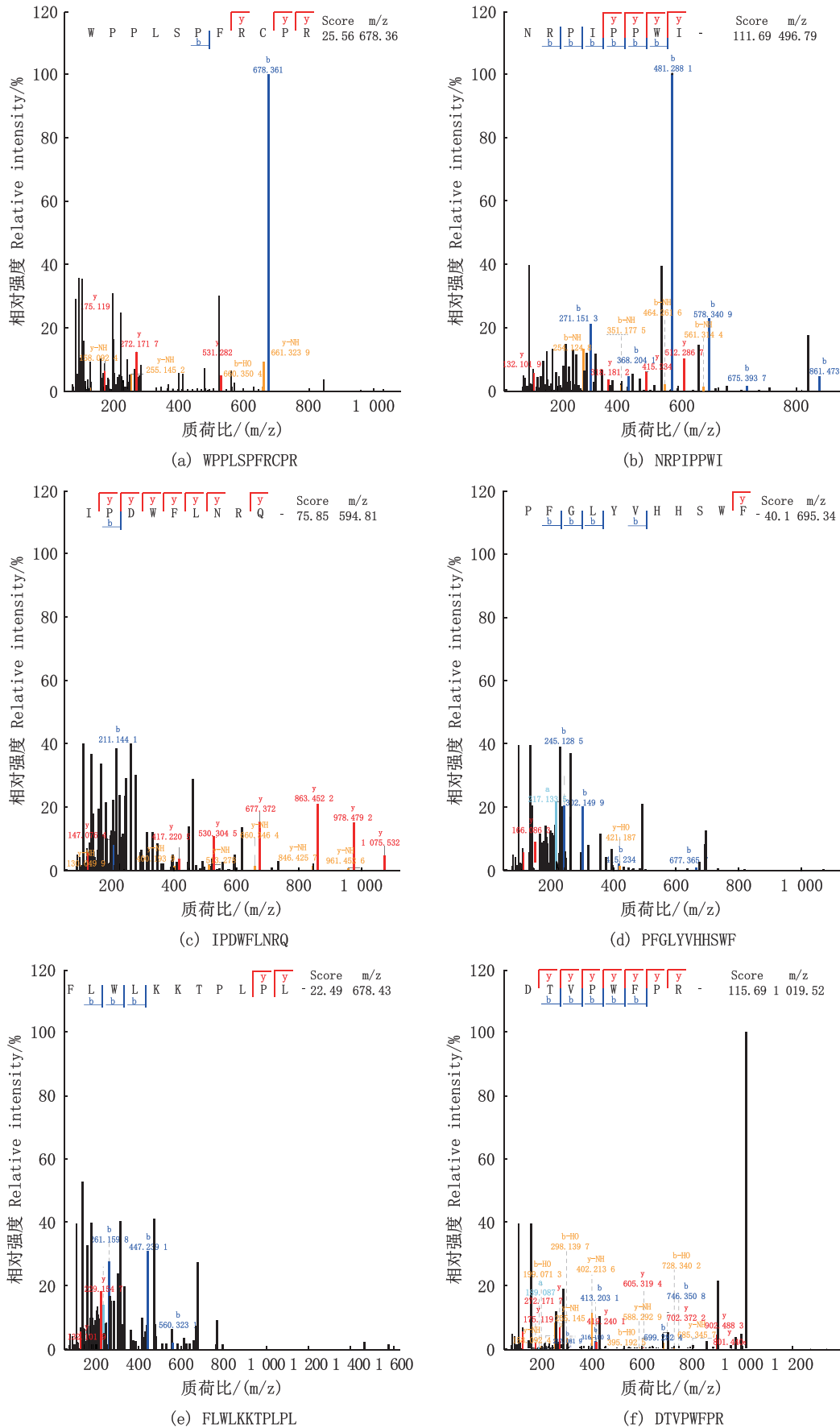


图 9 M3组分的6条多肽MS/MS图谱

Fig. 9 Sequence profile of six of the peptides identified from M3 fraction



表 2 脱脂南极磷虾肽序列及对 DPP-IV 的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ )、DPPH 和 ABTS 自由基清除活性 ( $EC_{50}$ )

Tab. 2 Peptides identified in collected fractions M3 were synthesized to evaluate their DPP-IV inhibitory activity, DPPH free radical scavenging and ABTS free radical scavenging

肽序列 Peptide sequence	分子量 Molecular weight/u	DPP-IV $IC_{50}$ /(mmol/L)	DPPH $EC_{50}$ /(mmol/L)	ABTS $EC_{50}$ /(mmol/L)
WPPLSPFRCPR	1 355	2.121±0.31	0.098 3±0.011	0.116±0.073
NRPIPPWI	991.6	>5	1.249±0.044	4.123±0.067
IPDWFLNRQ	1 188	0.616±0.97	3.083±0.038	1.466±0.040
PFGLYVHHSWF	1 389	>5	1.416±0.076	>5
FLWLKKTPLPL	1 355	1.158±0.71	2.083±0.053	4.663±0.022
DTVPWFPR	1 017	4.923±2.0	0.802±0.078	2.471±0.043

表 3 多肽与 DPP-IV 分子对接模拟的能量参数

Tab. 3 Molecular docking binding energy score of for peptides and DPP-IV

蛋白 Protein	结合能 Binding energy/(kcal/mol)			
DPP-IV	WPPLSPFRCPR	IPDWFLNRQ	FLWLKKTPLPL	DTVPWFPR
	-8.4	-8.6	-8.4	-8.3

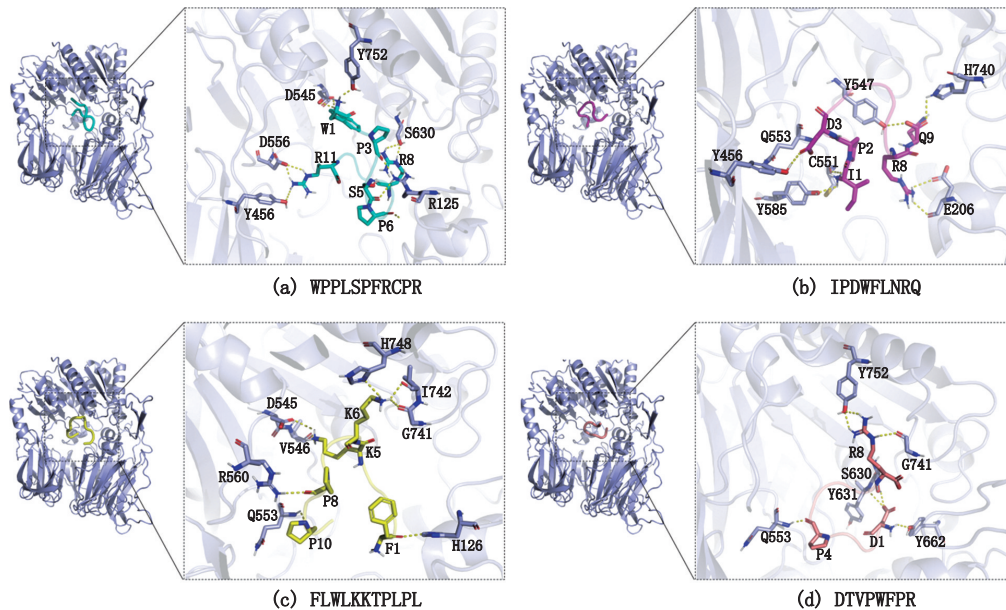


图 10 四条肽与 DPP-IV 结合的 3D 图

Fig. 10 3D diagrams of the combination of the four superior peptides and DPP-IV

### 3 结论

该研究首次从脱脂南极磷虾粉中提取并鉴定出具有双重生物活性的肽序列。研究得出,低分子量的肽组分具有更强的 DPP-IV 抑制活性和抗氧化活性。通过超滤、Sephadex G-15 和 LC-MSMS,从活性最高的组分中确定了 4 种新的、高效的生物活性肽。分子对接证实 4 种肽都能通过氢键与 DPP-IV 的活性部位结合。因此,从脱脂南极磷粉中提取的多肽可以为降血糖、抗氧化药物的开发提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] HAYDEN M R, TYAGI S C. Uric acid: a new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: the urate redox shuttle[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2004, 1(1): 10.
- [2] LOURENÇO S C, MOLDÃO-MARTINS M, ALVES V D. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications [J]. *Molecules*, 2019, 24 (22) : 4132.
- [3] DESAI S, BRINKER A, SWANN J, et al. Sitagliptin-associated drug allergy: review of spontaneous adverse event reports [J]. *Archives of Internal Medicine*, 2010, 170(13): 1169-1171.



- [4] NONGONIERMA A B, LE MAUX S, DUBRULLE C, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with *in vitro* dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties [J]. *Journal of Cereal Science*, 2015, 65: 112-118.
- [5] LAN C, ZHAO Y Q, LI X R, et al. High fischer ratio oligopeptides determination from antarctic krill: preparation, peptides profiles, and *in vitro* antioxidant activity [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(5): e12827.
- [6] ZHAO Y Q, ZHANG L, TAO J, et al. Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. *Food Research International*, 2019, 121: 197-204.
- [7] SUN R N, LIU X F, YU Y, et al. Preparation process optimization, structural characterization and *in vitro* digestion stability analysis of Antarctic krill (*Euphausia superba*) peptides-zinc chelate [J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 128056.
- [8] PARK S Y, JE J Y, AHN C B. Protein hydrolysates and ultrafiltration fractions obtained from krill (*Euphausia superba*): nutritional, functional, antioxidant, and ACE-inhibitory characterization [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2016, 25(8): 1266-1277.
- [9] TANG S T, ZHOU X, GOUDA M, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on the solubility of egg yolk powder from the changes in structure and functional properties [J]. *LWT*, 2019, 110: 214-222.
- [10] LANG M, SONG Y S, LI Y, et al. Purification, identification, and molecular mechanism of DPP-IV inhibitory peptides from defatted Antarctic krill powder [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(9): e13872.
- [11] DELANO W L. PyMOL: an open-source molecular graphics tool [J]. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, 2002, 40(1): 82-92.
- [12] CONWAY V, GAUTHIER S F, POULIOT Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(2): 364-372.
- [13] JIN R T, TENG X Y, SHANG J Q, et al. Identification of novel DPP-IV inhibitory peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin [J]. *Food Research International*, 2020, 133: 109161.
- [14] HONG H, ZHENG Y Y, SONG S J, et al. Identification and characterization of DPP-IV inhibitory peptides from silver carp swim bladder hydrolysates [J]. *Food Bioscience*, 2020, 38: 100748.
- [15] 刘辉, 张会生, 童火艳, 等. 酶解大豆蛋白抗氧化肽的分离纯化与鉴定 [J]. *食品科学*, 2022, 43(20): 191-197.
- [16] LIU H, ZHANG H S, TONG H Y, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed soybean protein [J]. *Food Science*, 2022, 43(20): 191-197.
- [17] CHI C F, WANG B, WANG Y M, et al. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12: 1-10.
- [18] WANG X Q, XING R G, LIU S, et al. Purification and characterization of novel antioxidant peptides of different molecular weights from mackerel *Pneumatophorus japonicus* protein hydrolysate [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(1): 159-168.
- [19] 尹剑, 武瑞赞, 胡锦蓉, 等. 鲟鱼皮中二肽基肽酶-IV抑制肽的分离纯化与鉴定 [J]. *食品科学*, 2022, 43(6): 195-203.
- [20] YIN J, WU R Y, HU J R, et al. Purification and identification of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptide from sturgeon skin collagen [J]. *Food Science*, 2022, 43(6): 195-203.
- [21] ZHI T X, LI X Y, SADIQ F A, et al. Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Argopecten irradians*) mantle using enzymatic and microbial methods: preparation, purification, identification and characterization [J]. *LWT*, 2022, 164: 113636.
- [22] ZHANG C, ZHANG Y Q, WANG Z Y, et al. Production and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibition and dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) muscle hydrolysate [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 35: 224-235.
- [23] MA Y K, WU Y Y, LI L H. Relationship between primary structure or spatial conformation and functional activity of antioxidant peptides from *Pinctada fucata* [J]. *Food Chemistry*, 2018, 264: 108-117.
- [24] 颜阿娜, 陈声漾, 陈旭, 等. 一种新型抗氧化五肽的纯化、鉴定与表征 [J]. *食品科学*, 2019, 40(10): 43-49.
- [25] YAN A N, CHEN S Y, CHEN X, et al. Purification, identification and characterization of a novel antioxidant pentapeptide [J]. *Food Science*, 2019, 40(10): 43-49.
- [26] MENDIS E, RAJAPAKSE N, BYUN H G, et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects [J]. *Life Sciences*, 2005, 77(17): 2166-2178.
- [27] RANATHUNGA S, RAJAPAKSE N, KIM S K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*) [J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 222(3/4): 310-315.

- [25] NONGONIERMA A B, MAZZOCCHI C, PAOLELLA S, et al. Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis [J]. Food Research International, 2017, 94: 79-89.
- [26] 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.
- [27] TULIPANO G, FAGGI L, NARDONE A, et al. Characterisation of the potential of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: in silico and *in vitro* comparative studies [J]. International Dairy Journal, 2015, 48: 66-72.
- [28] UTOMO D H, WIDODO N, RIFA'I M. Identifications small molecules inhibitor of p53-mortalin complex for cancer drug using virtual screening [J]. Bioinformation, 2012, 8(9): 426-429.
- [29] XU F R, YAO Y J, XU X Y, 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.

## Purification and identification of antidiabetogenic and antioxidant peptide from defatted Antarctic krill powder hydrolysates

ZHAO Xia, LI Yan, SUN Huimin, ZHENG Changliang, SONG Yishan

(College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Food-derived dietary dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory peptides and antioxidant peptides can contribute to scavenge free radicals *in vivo* and regulate blood sugar. In order to realize the high-value application of the defatted Antarctic krill powder and explore new ways to cure diabetes, DPP-IV inhibitory peptide and antioxidant peptide were prepared from defatted Antarctic krill powder by enzymolysis with alkaline protease, neutral protease and pancreatic enzyme. The relationships between time and hydrolysis degree, bioactivity and peptide yield rate respectively were investigated. Polypeptide was purified and analyzed, and the inhibitory sites were ascertained by molecular docking. The results illustrated that four peptides with both DPP-IV inhibitory activity and antioxidant activity were acquired by ultrafiltration, Sephadex G15 separation and purification and liquid-mass spectrometry, whose amino acid sequences were WPPLSPFRCPR, IPDWFLNRQ, FLWLKKTPLPL and DTVPWFPR, respectively. IPDWFLNRQ had the highest DPP-IV inhibitory activity among these four peptides, and its  $IC_{50}$  value was  $(0.616 \pm 0.097)$  mmol/L. WPPLSPFRCPR possessed the higher antioxidant activity, whose DPPH  $EC_{50}$  was  $(0.0983 \pm 0.011)$  mmol/L and ABTS  $EC_{50}$  was  $(0.116 \pm 0.073)$  mmol/L. Molecular docking results demonstrated that these four peptides mainly bind to the active center of DPP-IV and other sites through hydrogen, resulting in achieving inhibitory effect. This study prepared food-borne DPP-IV inhibitory and antioxidant peptides based on the defatted Antarctic krill powder, which provided references for the development and utilization of aquatic protein-derived hypoglycemic functional food and the research of novel hypoglycemic and antioxidant peptides.

**Key words:** defatted Antarctic krill powder; dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptide; antioxidant peptide; molecular docking