

核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究

李汉洋¹, 李建杰^{2,3,+}, 王 帅¹, 徐兴华⁴, 蓝文言¹, 梁宇鹏¹, 张珍兰⁵, 荣瑞芬^{1,*}

(1.北京联合大学食品科学系, 北京 100191;

2.中国海洋大学医药学院, 山东青岛 266003;

3.青岛海洋生物医药研究院, 海洋糖工程药物研发室, 山东青岛 266100;

4.河北省(邢台)核桃产业技术研究院, 河北临城 054300;

5.北京广晟新农科技有限公司, 北京 100193)

摘要:目的:为了提高核桃粕利用价值,阐明核桃多肽抗氧化活性及其构效关系。方法:采用 DA 201-C 大孔树脂和 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶分离纯化核桃粕蛋白酶解液,分析比较不同疏水性和不同分子量核桃多肽抗氧化活性及氨基酸组成特性。结果:经 DA 201-C 大孔树脂分离的多肽组分 I、II、III 的抗氧化活性随洗脱溶剂疏水性增大而增大。组分 III 经 Sephadex G-15 分离纯化得到 a、b、c、d 四个不同分子量多肽组分。分子量分布在 400~700 Da 的组分 c 具有最高的羟自由基清除能力,并含有较高的谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸,与组分 III 在氨基酸组成上具有相似性。结论:具有较好抗氧化活性的核桃多肽分子量小于 800 Da,并具有疏水性较强,谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸组成含量相对较高的结构特性。

关键词:核桃多肽,抗氧化活性,分子量,氨基酸组成

Study on Antioxidant Activity of Walnut Polypeptide and Its Molecular Weight, Amino Acid Composition Characteristic

LI Han-yang¹, LI Jian-jie^{2,3,+}, WANG Shuai¹, XU Xing-hua⁴, LAN Wen-yan¹,

LIANG Yu-peng¹, ZHANG Zhen-lan⁵, RONG Rui-fen^{1,*}

(1.Department of Food Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China;

2.School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3.The Laboratory of Marine Glycodrug Research and Development,

Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266100, China;

4.Walnut Industrial Technology Research Institute of Hebei(Xingtai), Lincheng 054300, China;

5.Beijing Guang-sheng New Agricultural Technology Co., Ltd., Beijing 100193, China)

Abstract: Objective: In order to improve the utilization value of walnut dregs and elucidate the antioxidant activity of walnut peptides and its structure-activity relationship. Methods: DA 201-C macroporous resin and Sephadex G-15 glucan gel were used to isolate and purify the enzymatic hydrolysis of walnut dregs protein by complex protease. The antioxidant activity and amino acid composition of walnut peptides with different hydrophobicities and molecular weights were analyzed and composed. Results: The antioxidant activities of polypeptide fractions I, II and III, which were separated by DA 201-C macroporous resin, increased with the increasing of the eluent hydrophobicity. Four different molecular weight polypeptide components of a, b, c, d were isolated and purified from component III by Sephadex G-15. Component c, which was similar to component III in amino acid composition, had the highest hydroxyl radical scavenging capacity and contained higher glutamate, aspartate, leucine and phenylalanine. Its molecular weight was distributed in 400~700 Da. Conclusion: Walnut polypeptide with better antioxidant activity had a molecular weight of less than 800 Da, it had the characteristics of strong hydrophobicity and relatively high composition contents of glutamic acid, aspartic acid, leucine and phenylalanine.

Key words: walnut polypeptide; antioxidant activity; molecular weight; amino acid composition

收稿日期:2017-10-23 + 并列第一作者

作者简介:李汉洋(1993-),男,硕士研究生,研究方向:农产品贮藏加工及其营养品质保持研究,E-mail:wfyboom@163.com。

李建杰(1986-),女,硕士,中级工程师,研究方向:海洋药物,E-mail:jianjieli@126.com。

* 通讯作者:荣瑞芬(1964-),女,博士,教授,研究方向:农产品贮藏加工及其营养品质保持研究,E-mail:ruifen@buu.edu.cn。

基金项目:北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM200811417010)。

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2018)13-0001-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.001

引文格式:李汉洋,李建杰,王帅,等.核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究[J].食品工业科技,2018,39(13):1-7,13.

核桃是营养价值极高的食物,蛋白质含量为14%~17%,8种必需氨基酸较齐全,核桃蛋白是一种很具开发潜力的植物蛋白^[1]。核桃油因含有丰富的必需脂肪酸和 ω -3脂肪酸,被公认为保健油,而榨油后的副产物核桃粕,虽然蛋白质含量高达30%~53.89%^[2],但因核桃粕含有苦涩味的皮衣一直没有被很好地再利用,造成蛋白质资源浪费。

研究表明,由蛋白质酶解可获得诸如抗氧化^[3]、降血压^[4]、免疫调节^[5]、降低胆固醇^[6]、抗菌^[7]、抗疲劳^[8]等多种生理调节活性的生物活性肽,因此,生物活性肽的开发研究是当前蛋白质、肽开发利用的研究热点,目前研究多集中在活性肽的制备工艺、活性研究方面。张君慧^[9]从糙米蛋白酶解产物中分离纯化出抗氧化活性较强的肽组分F3b(Phe-Arg-Asp-Glu-His-Lys-Lys)和F3c(Lys-His-Asn-Arg-Gly-Asp-Glu-Phe)。李艳红^[10]从鹰嘴豆中鉴定出相对分子量为717.37 Da的抗氧化活性肽(Asn-Arg-Tyr-His-Glu)。舒一梅^[11]在猪股骨酶解液中发现其含有6种氨基酸(Glu、Ala、Val、Leu、Phe、Pro),其分子量为764.8 Da的降血压肽。梁盈^[12]等发现大米活性肽(Leu-Asp-Pro-Glu-Gly-Thr-Gly-Thr-Phe-Pro-Pro)具有较好的抗氧化活性,对DPPH自由基(DPPH·)和OH自由基(·OH)的清除能力分别达46.7%、68.23%。许典以核桃粕为原料经黑曲霉发酵后产生小分子多肽类物质,分子质量小于5000 Da的多肽样品对人的结肠癌细胞和乳腺癌细胞具有较强的抑制作用^[13]。贾靖霖等用不同剂量的核桃多肽给小鼠灌胃,血清中乳酸和尿素氮积累、肌糖原和肝糖原的消耗均降低,表明核桃多肽具有增强小鼠抗疲劳的能力^[14]。Gu X等^[15]从核桃蛋白酶解液中分离纯化得到血管紧张素转换酶抑制肽(Tyr-Glu-Pro)。刘威等^[16]酶解制备的核桃清蛋白抗氧化肽对·OH、DPPH·的具有显著的清除能力。

本论文以核桃粕酶解制备的核桃多肽为原料,通过大孔树脂分离和葡聚糖凝胶分离纯化,研究了核桃多肽的抗氧化活性及其结构特性,以期阐明活性肽的结构特征与作用机理,为开发核桃多肽功能食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃粕 北京大山鑫港农业技术开发中心;DA 201-C 大孔吸附树脂 江阴化工厂;Sephadex G-15 美国 Pharmacia 公司;1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)、三氟乙酸(TFA) 美国 Sigma 公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA) 美国 Fluka 公司;三氯乙酸(TCA) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其他化学试剂 均为分析纯。

HD-3 紫外检测器、BSZ-100 自动部分收集器、

HL-2 横流泵 上海青浦沪西仪器厂;RE-52 型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;DDS-11A 型电导率仪 上海雷磁仪器厂;GL-20G-II 型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;玻璃层析柱(1.8 mm × 60 cm) 上海层析柱;UV-9200 紫外分光光度计 北京瑞利分析仪器公司;LGJ-12 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司;日立 L-8900 氨基酸分析仪 日本日立公司;飞行时间质谱 MALDI TOF/TOF 美国 AB 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃多肽冻干粉的制备 核桃粕经 Alcalase 2.4 L(2.4 AU/g) + 胰蛋白酶(2500 U/g)在复合配比3:1,pH7.4,温度60.46℃,底物质量浓度40 g/L,加酶量5.71%,酶解时间5.05 h的条件下酶解,酶解结束后升温至90℃保持20 min进行灭酶处理,得到核桃粕蛋白酶解液^[17]。将酶解液装入截留分子量为7000 Da的透析袋中,透析袋中装蒸馏水,5 h换一次,所用的蒸馏水全部收集,55℃下旋转蒸发减压浓缩至30%,然后将浓缩的核桃肽溶液于冷冻干燥机中冻干,即得到核桃多肽粉。

1.2.2 核桃多肽大孔树脂初步分离纯化 采用 DA 201-C 型大孔树脂对核桃蛋白酶解物按疏水性进行初步分离纯化。先将树脂用无水乙醇浸泡24 h,然后用无水乙醇洗至220 nm无吸收,再用去离子水洗净后备用。室温下将浓度为50 mg/mL的核桃蛋白肽以0.5 BV/h的流速流经层析柱,用紫外检测器检测流出液的吸光值 A_{220} ,以 $A_{220} = 0.05$ 为穿透点。上样结束后,用去离子水以1 BV/h的流速冲洗层析柱,分管收集洗脱液,测定水的电导率,当电导率降至与去离子水相当时,依次采用25%、50%、75%的乙醇对吸附在大孔吸附树脂上的核桃蛋白肽进行动态梯度洗脱,收集洗脱峰。45℃真空旋蒸浓缩至无乙醇,冷冻干燥得核桃蛋白肽冻干粉。

1.2.3 核桃多肽凝胶过滤色谱分离纯化 对经 DA 201-C 分离得到的最高抗氧化活性组分Ⅲ采用柱尺寸为18 mm × 60 cm的Sephadex G-15凝胶过滤色谱再进行进一步分离纯化。上样量1 mL(50 mg核桃蛋白),洗脱液为去离子水,流速为15 mL/h,检测波长220 nm。

1.2.4 多肽含量的测定

1.2.4.1 标准曲线的绘制 比色管分别加入0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL的标准蛋白质溶液(10 mg/mL),超纯水补足到1 mL,然后加入4 mL双缩脲试剂。充分摇匀后,室温放置30 min,于540 nm处进行比色测定。用未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照液。以蛋白质浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,得到标准曲线 $Y = 0.0518X + 0.0023$, $R^2 = 0.9992$ 。

1.2.4.2 样品的测定 取0.1 mL的样品加入0.9 mL

15% TCA 放置 30 min, 6500 r/min 离心 10 min, 取上清液 0.5 mL 加入 0.5 mL 的超纯水, 加入 4 mL 双缩脲, 在常温下显色 30 min, 540 nm 检测吸光度。对照标准曲线求得样品溶液中的多肽浓度, 根据样品体积算得样品中多肽含量。

1.2.5 核桃多肽抗氧化能力分析测定 本文以酶解之前的核桃蛋白为阴性对照, V_c 作为阳性对照, 采用还原力、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 清除能力三个抗氧化指标, 比较分析了经 DA201-C 大孔吸附树脂和凝胶过滤分离组分的抗氧化能力。

1.2.5.1 还原力的测定 参考 Oyaizu 及 Wu 等^[18-19]的方法并稍作改动: 准确称取一定量的核桃多肽分别配制成 0.25、0.5、1、2、5、10、20 mg/mL, 用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.6) 2 mL 溶解后, 加入 1% 的铁氰化钾溶液 2 mL 混合均匀, 置于 50 °C 水浴锅中反应 20 min, 加入 10% 的 TCA 溶液 2 mL 混合后, 3000 r/min 离心 10 min。取上清液 2 mL, 加入 2 mL MiliQ 水和 0.4 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 静置 10 min 后于 700 nm 测定其吸光值 A_{700} 。吸光值越高表明还原能力越强。

1.2.5.2 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定 本实验参照金鸣^[20]的实验方法, 并作适当改进如下:

按表 1 依次加样, 37 °C 水浴 60 min, 于 536 nm 处测定吸光值。

表 1 清除羟自由基活性测定方法
Table 1 The method of determination of hydroxyl radicals scavenging rate

组别	损伤组 (mL)	未损伤组 (mL)	样品组 (mL)
0.75 mmol/L 邻二氮菲	0.5	0.5	0.5
0.15 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)	1	1	1
蒸馏水	0.5	0.5	
0.75 mmol/L 硫酸亚铁	0.5	0.5	0.5
20 mmol/L 双氧水	0.5		0.5
样品		0.5	0.5

样品对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率按下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (A_{\text{样品组}} - A_{\text{损伤组}}) / (A_{\text{未损伤组}} - A_{\text{损伤组}}) \times 100$$

1.2.5.3 DPPH \cdot 清除率的测定 本实验参照 Parejo^[21]等人的实验方法稍作改进: 在 2 mL 浓度为 1、2、3、4、5、6、7 mg/mL 的样品中加入 2 mL 1×10^{-4} mol/L 的 DPPH \cdot 无水乙醇溶液, 混匀后避光反应 20 min, 517 nm 测定其吸光值。空白组用等量的乙醇代替 DPPH \cdot 溶液, 对照组用等量的去离子水代替样品。清除率按下式计算:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} I(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

式中: A_i - 样品组吸光值 (样品 + DPPH \cdot); A_j - 空白组吸光值 (乙醇 + 样品); A_0 - 对照组吸光值 (蒸馏水 + DPPH \cdot)。

1.2.6 不同洗脱组分氨基酸组成的测定 参照国标 GB 5009.124-2016^[22]。

1.2.6.1 样品预处理 各分离组分置于特制水解管中, 缓慢加入 6 mol/L HCl, 并轻轻转动水解管, 确保样品全部被浸没, 抽真空封口。水解炉中 110 °C 水解 20 h。将水解液转入 50 mL 容量瓶中超纯水定容至刻度。双层滤纸过滤, 吸取 1 mL 滤液于 10 mL 试管中进行蒸酸, 之后用 0.02 mol/L 的 HCl 进行复溶为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的上样液, 以备上样。

色氨酸测定的前处理: 样品置于特制水解管中, 缓慢加入 5 mL 4.2 mol/L 的 NaOH 溶液, 充氮封口, 于 110 °C 进行碱水解 26 h 后, 用 6 mol/L 的 HCl 调 pH 至中性, 之后定容、过滤、复溶同上。

半胱氨酸测定的前处理: 精确称取样品, 用 1~2 mL 氧化剂 (甲酸: 双氧水 = 8: 2) 将半胱氨酸氧化为胱氨酸, 之后采用酸水解, 定容、过滤、蒸干、复溶同上。

1.2.6.2 色谱条件 色谱柱: 磺酸型钠离子柱 (4.6 nm \times 60 mm, 3 μm); 柱温: 50 °C; 流速: 泵① 0.425 mL/min、泵② 0.3 mL/min; 波长: 420、570 nm; 上样量: 50 μL 。

采用外标法, 以保留时间定性, 峰面积定量测定不同洗脱组分的核桃多肽中氨基酸的组成与含量。

1.2.7 肽分子量分布测定 将多肽冻干粉溶于 50% 的乙腈, α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 溶于 0.1% TFA 的 50% 乙腈溶液中, 制成饱和溶液, 离心 (4000 r/min, 10 min), 取上清液。先点 0.5 μL 的样品于 MALDI 不锈钢靶板上, 自然干燥后再点上 0.5 μL 0.5 g/L CHCA 溶液, 在室温下自然干燥。另点 0.5 μL 0.5 g/L CHCA (不点样品) 作为空白对照, 进行质谱检测。

质谱条件: 反射正离子模式; 离子源加速电压 20 kV; 激光器: N_2 ; 激光强度 5000; 波长: 337 nm; 离子延迟提取时间: 390 ns; 离子峰校正: peptide II standard kit (m/z 500~5000); 质量扫描范围: m/z 400~4000。

1.3 数据处理

所有数据均以平均值 \pm 标准差的形式表示, 使用 SPSS 软件进行统计分析, Origin 9.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 DA 201-C 大孔树脂分离各组分核桃多肽含量

DA 201-C 型大孔树脂对核桃蛋白酶液初步分离纯化, 分别得到表 2 中三个多肽组分, 并进行抗氧化活性测定。

表 2 各分离组分的多肽含量 (g/100 g)

Table 2 The peptide content of the various components (g/100 g)			
乙醇浓度 (%)	25	50	75
分离组分	I	II	III
多肽含量 (g)	24.91	26.55	48.54

2.2 DA 201-C 大孔树脂分离核桃多肽的抗氧化活性分析

2.2.1 不同分离组分核桃多肽还原能力分析 从图 1 中看出, 经过大孔树脂分离的多肽组分 I、II、III 及

提取的未酶解核桃蛋白还原能力随浓度的增加均呈现增加趋势,组分Ⅲ的还原能力在 5 mg/mL 浓度时达到最高,之后随浓度增加而保持平稳,组分Ⅱ和Ⅰ随浓度持续增加,但始终低于组分Ⅲ。组分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ在 20 mg/mL 时,吸光值较高,分别为 1.101、1.252、1.605。而未经酶解的核桃蛋白的还原能力也有小幅的增加,表明核桃提取的纯核桃蛋白液具有一定的抗氧化能力,还原能力表现为 $V_C > \text{组分Ⅲ} > \text{组分Ⅱ} > \text{组分Ⅰ} > \text{未酶解的核桃蛋白}$ 。

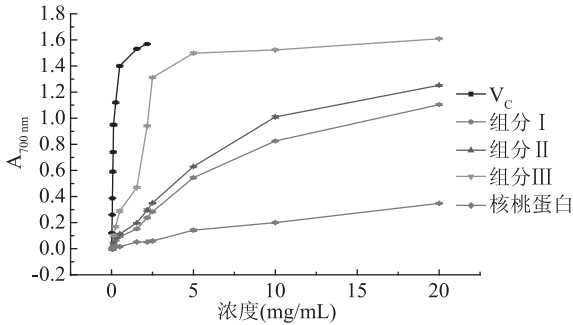


图1 不同组分样品在不同浓度下的还原能力
Fig.1 The reducing ability of different component samples at different concentrations

2.2.2 不同分离组分对·OH清除率分析 测定各组分的·OH清除率,结果见图2。

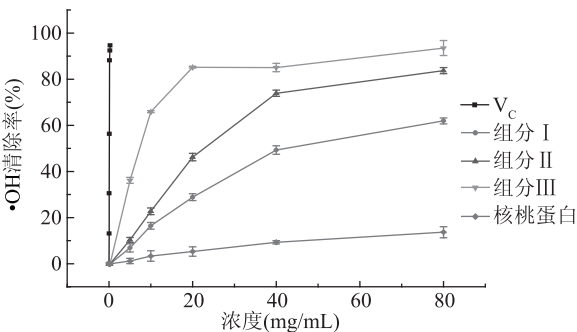


图2 不同浓度的不同组分对·OH清除率的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of different components on the clearance rate of ·OH

实验结果表明经大孔树脂分离得到的各多肽组分对羟自由基均有明显的清除效果,符合二次曲线方程,且具有一定的量效关系。各分离组分浓度与羟自由基清除率之间的拟合方程见表3。

表3 各组分·OH清除率的拟合方程

Table 3 Fitting equation of ·OH clearance rate of each component

组分名称	拟合方程	R^2
V_C	$Y = -0.0017X^2 + 0.8132X - 3.8438$	0.9893
组分Ⅰ	$Y = -0.0115X^2 + 1.7008X - 0.3297$	0.9993
组分Ⅱ	$Y = -0.0207X^2 + 2.7146X - 1.3179$	0.9987
组分Ⅲ	$Y = -0.1195X^2 + 6.8839X$	0.9885
核桃蛋白	$Y = -0.0016X^2 + 0.2968X + 0.0388$	0.9975

经计算清除·OH的 IC_{50} (清除率达到50%时的样品浓度)分别为组分Ⅰ:40.91 mg/mL,组分Ⅱ:22.9 mg/mL,组分Ⅲ:8.52 mg/mL, V_C :79.39 μ g/mL。

可见洗脱液的疏水性越高,分离得到的多肽组分对·OH的清除能力越强。这可能与随梯度洗脱疏水性的升高分离得到的疏水性肽段含量增加有关。组分Ⅲ显示出了相对最强的·OH清除能力,但与 V_C 相比低近两个数量级。相比较,组分Ⅲ的 IC_{50} 低于王弋莎报道的糯米肽(14.5 mg/mL)和粳米肽(12.6 mg/mL)^[23],聂慎德等人报道10 mg/mL的菜籽肽清除·OH清除率46.07%^[24],与周徐慧报道的脱盐后的汉麻籽多肽的 IC_{50} 相当^[25]。对20 mg/mL浓度下·OH清除效果采用SPSS软件进行统计学分析发现,组分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和核桃蛋白肽之间均存在极显著差异($p < 0.01$)。

2.2.3 不同分离组分对DPPH·清除率的分析 测定各组分的DPPH·清除率,结果见图3。

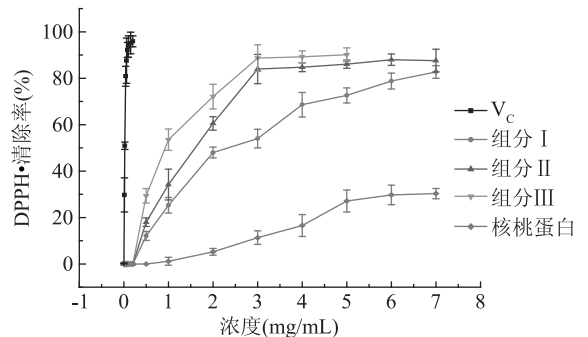


图3 不同浓度的不同组分对DPPH·清除率的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of different components on the clearance rate of DPPH·

不同分离组分对DPPH·均有较强的清除作用,组分Ⅲ的清除能力最强,各组分的清除率随浓度的增加而增大,符合二次曲线方程。各分离组分浓度与DPPH·清除率之间的拟合方程见表4。

表4 各组分DPPH·清除率的拟合方程

Table 4 Fitting equation for DPPH· clearance rate of each component

组分名称	拟合方程	R^2
V_C	$Y = -0.0154X^2 + 2.3773X + 5.3548$	0.9819
组分Ⅰ	$Y = -2.074X^2 + 25.098X + 1.1245$	0.9917
组分Ⅱ	$Y = -3.9591X^2 + 37.79X + 0.5324$	0.9911
组分Ⅲ	$Y = -5.9223X^2 + 45.776X + 5.8171$	0.9807
核桃蛋白	$Y = -0.2899X^2 + 7.7585X - 7.8917$	0.9675

经计算清除DPPH·的 IC_{50} 分别为组分Ⅰ:2.439 mg/mL,组分Ⅱ:1.566 mg/mL,组分Ⅲ:1.131 mg/mL, V_C :21.881 μ g/mL。可见洗脱液的疏水性越高,分离的到的多肽组分对DPPH·的清除能力越强。这可能与随梯度洗脱疏水性的升高分离等到的疏水性肽段含量增加有关。组分Ⅲ显示出了相对最强的DPPH·清除能力,但仍明显低于 V_C 。相比较其他研究结果,该结果表明组分Ⅲ的DPPH·清除能力高于代衍峰等人报道的10 mg/mL玉米蛋白水解物的DPPH·清除能力为35.7%^[26],陈圆圆报道的2 mg/mL的大豆蛋白Alcalase酶解物的DPPH·清除率为15.2%^[27],周徐慧报道的汉麻籽蛋白Alcalase酶解物经DA 201-C脱盐后的 IC_{50} 为2.75 mg/mL^[25],但

低于程云辉报道的麦胚酶解产物的 IC_{50} 1.0 mg/mL^[28]。也低于武万兴报道的固态发酵核桃粕制备活性肽 IC_{50} 0.15 mg/mL^[29]。

2.3 大孔树脂分离核桃蛋白肽的抗氧化活性与其氨基酸组成的相关性分析

取不同浓度乙醇的洗脱组分,经 6 mol/L 盐酸酸解,采用氨基酸自动分析仪测定不同浓度乙醇洗脱液组分中各氨基酸的含量,结果见表 5。

表 5 大孔树脂分离产物的氨基酸组成及含量(%)

氨基酸类别	名称	组分 I	组分 II	组分 III
疏水性氨基酸	丙氨酸	3.37	3.37	2.71
	缬氨酸	3.42	4.96	5.49
	异亮氨酸	3.46	4.07	3.94
	亮氨酸	5.54	9.10	11.96
	酪氨酸	1.9	4.25	5.55
	苯丙氨酸	2.65	6.93	10.42
	色氨酸	0.39	1.9	3.06
	脯氨酸	3.81	4.61	4.50
总量		24.54	39.19	47.63
碱性氨基酸	组氨酸	2.15	2.46	1.87
	赖氨酸	2.89	2.13	0.88
	精氨酸	22.26	16.24	8.06
总量		27.3	20.83	10.81
酸性氨基酸	谷氨酸	17.22	11.39	11.13
	天冬氨酸	6.83	6.38	8.40
	总量	24.05	17.77	19.53
其它氨基酸	苏氨酸	2.4	2.3	2.21
	丝氨酸	3.77	3.63	2.45
	甘氨酸	3.79	2.96	2.54
	甲硫氨酸	2.45	2.06	1.95
	半胱氨酸	0.57	0.89	0.98
总量		12.98	11.84	10.13

由表 5 可见,在大孔树脂分离的 3 个组分中,都含有人体所必需的 8 种必需氨基酸。随乙醇洗脱液浓度的提高,各分离组分中疏水性氨基酸含量在总氨基酸组成中所占的比例增大,由组分 I 中的 24.54% 升至组分 III 中的 47.63%,而极性氨基酸所占比例均减少。亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、缬氨酸含量分别由组分 I 中的 5.54%、2.65%、1.9%、0.39%、3.42% 升至组分 III 中的 11.96%、10.42%、5.55%、3.06%、5.49%。表明氨基酸的疏水性与抗氧化能力相关性较大。随乙醇洗脱液浓度增加,分离组分中疏水性氨基酸的比重增加,而碱性氨基酸明显下降。

2.4 组分 III 凝胶过滤分离

组分 III 经 G-15 凝胶过滤色谱分离得到的 4 个组分,结果见图 4。按出峰先后次序依次命名为组分 a、组分 b、组分 c、组分 d,根据葡聚糖凝胶柱的分离原理,它们的分子量大小为 $a > b > c > d$ 。

2.5 凝胶过滤各分离组分对·OH 清除率的分析

以 G-15 凝胶过滤色谱分离得到的 4 个组分,继

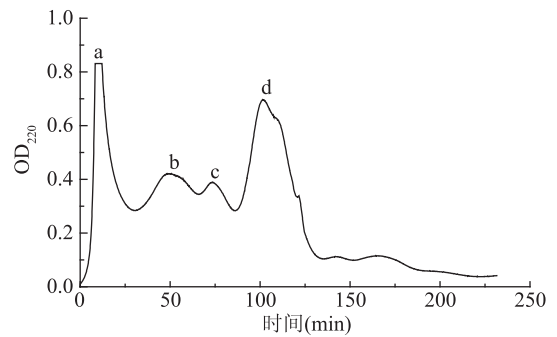


图 4 Sephadex G-15 凝胶过滤色谱图

Fig.4 The gel filtration chromatography of Sephadex G-15

续将羟自由基清除能力作为抗氧化的活性的考察指标。测定各个组分对羟自由基的清除能力,结果如图 5 所示。

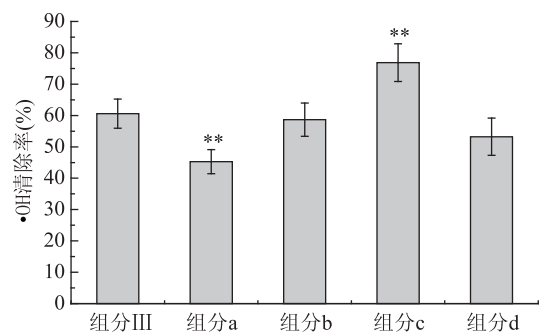


图 5 Sephadex G-15 各洗脱峰对·OH 自由基的清除能力的比较(样品浓度为 10 mg/mL)

Fig.5 The ·OH scavenging activity of fractions separated by Sephadex G-15 (sample concentration of 10 mg/mL)

注: * 表示相较组分 III 差异显著($p < 0.05$), ** 表示相较组分 III 差异极显著($p < 0.01$)。

由图 5 可知,4 个组分对·OH 的清除能力大小依次为组分 c > 组分 b > 组分 d > 组分 a。各分离组分 c 浓度与清除率之间的拟合方程为: $Y = -0.0799X^2 + 5.4324X + 13.72$, $R^2 = 0.9452$, 组分 c 的清除能力最强其 IC_{50} 为: 7.5074 mg/mL。相对分离前的组分 III 其清除能力提高了 13.5%。从 a~c 在一定的分子量范围内,随分子量的降低,·OH 的清除能力呈现上升趋势。但分子量过小的 d 组分抗氧化力反而下降。当肽段过长时,具有抗氧化活性的氨基酸未能断裂成末端氨基酸或肽段折叠而未暴露出来;肽段过短时,能够协助抗氧化的氨基酸被切掉,使其抗氧化活性降低。

2.6 组分 c 的氨基酸组成及分子量分布测定

通过上述抗氧化活性的测定,表明组分 c 有较强的抗氧化活性,为进一步明确活性作用机理,对该组分的氨基酸组成及分子量分布进行进一步测定。

2.6.1 组分 c 的氨基酸组成 采用氨基酸自动分析仪测定组分 c 中氨基酸的含量,结果见表 6。

由表 6 可以看出,组分 c 中共含 16 种氨基酸,不含半胱氨酸和色氨酸。含有 7 种人体必需氨基酸。组分 c 与组分 III 中谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸含量较多,分别为 15.90%、10.27%、12.39%、

表6 G-15分离前后活性组分的氨基酸组成(%)

Table 6 Amino acid composition of supreme active component (%)

氨基酸类别	名称	组分c	组分Ⅲ
疏水性氨基酸	丙氨酸	2.8	2.71
	缬氨酸	5.77	5.49
	异亮氨酸	5.73	3.94
	亮氨酸	12.39	11.96
	酪氨酸	2.08	5.55
	苯丙氨酸	6.48	10.42
	色氨酸	0	3.06
	脯氨酸	5.49	4.50
总量		40.74	47.63
碱性氨基酸	组氨酸	2.78	1.87
	赖氨酸	0.81	0.88
	精氨酸	5.79	8.06
总量		9.38	10.81
酸性氨基酸	谷氨酸	15.9	11.13
	天冬氨酸	10.27	8.40
总量		26.17	19.53
其它氨基酸	苏氨酸	3.35	2.21
	丝氨酸	3.58	2.45
	甘氨酸	3.42	2.54
	甲硫氨酸	2.04	1.95
	半胱氨酸	0	0.98
总量		12.39	10.13

6.48%和11.13%、8.40%、11.96%、10.42%。组分c中含有组氨酸、酪氨酸、亮氨酸等具有抗氧化能力的氨基酸。

2.6.2 组分c的分子量分布测定 为了进一步明确高抗氧化活性组分c的结构特性,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪,对其多肽的分子量分布进行测定。结果如图6所示。

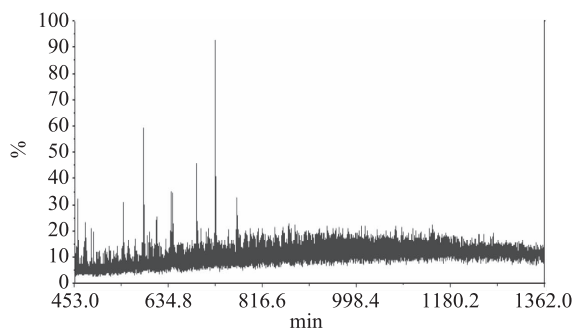


图6 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱图

Fig.6 The mass spectrum determined by MALDI-TOF MS

组分c中所有的多肽分子量均小于800 Da,主要集中在400~700 Da之间,该数据与目前报道的生物活性肽的分子量分布相吻合。按照氨基酸残基评价分子量110 Da估算,组分c主要含有3~6个氨基酸。孙一^[30]通过核桃蛋白水解产物经过多步分离纯化得到具有抗氧化多肽Ala-Gly-Gly-Ala。豆康宁^[31]对经Sephadex G-15凝胶柱层析分离得到的六个大豆肽组分进行抗氧化能力测定,结果表明中等

分子量的组分4(386~654 Da)的抗氧化效果最好。刁静静^[32]等用Sephadex G-25纯化豌豆肽粗品中得到五种多肽,其高活性抗氧化肽级分的相对分子质量在700 Da左右。贾韶千^[33]等采用葡聚糖凝胶Sephadex G-25和Sephadex G-10对酶解得到的银杏抗氧化肽粗品进行初步纯化,并测得抗氧化肽的相对分子质量为452.21 Da。

3 讨论

组分I、II、III均具有抗氧化活性,疏水性氨基酸含量随洗脱液疏水性增大而增大。亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸具有抗氧化能力,并随着洗脱液浓度的增加相对含量均有增加。侧链具有酚羟基结构的酪氨酸,含有苯环的苯丙氨酸、色氨酸,均具有供氢能力,能减慢自由基链反应。半胱氨酸具有巯基,自由基能直接与其作用,而具有抗氧化特性^[34]。碱性氨基酸组氨酸其侧链羧基同金属离子反应,钝化金属离子,减弱自由基链反应。Rajapakse^[35]、Je^[36]等发现含有酸性氨基酸的抗氧化肽的抗氧化活性与酸性氨基酸侧链羧基螯合金属离子有关。亮氨酸在组分III中含量多达11.96%,Rajapakse^[37]从巨型鱿鱼肌肉蛋白中分离得到的两条抗氧化肽为Asn-Ala-Asp-Phe-Gly-Leu-Asn-Gly-Leu-Glu-Gly-Leu-Ala和Asn-Gly-Leu-Glu-Gly-Leu-Lys,亮氨酸分别占肽链中氨基酸总量的23%和29%。Mendis^[38]等从水解鳕鱼皮胶原蛋白得到抗氧化肽His-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu,Leu出现频率较高。Giménez B等^[39]研究鱿鱼明胶水解物发现序列Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ser中的Leu残基与抗氧化活性有关。因此,推测疏水性氨基酸与组分I、II、III的抗氧化活性有关。

组分c与组分III在氨基酸构成上具有相似性,亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸在两个组分中均有较高的氨基酸含量。Rong He等^[40]从油菜籽蛋白分离物水解液中纯化得到的抗氧化肽富含天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸。抗氧化活性多肽中亮氨酸具有重要作用^[39]。Saiga等^[41]从木瓜蛋白酶水解产物中分离抗氧化肽Asp-Ser-Gly-Val-Thr,Ile-Glu-Ala-Glu-Gly-Glu,Asp-Ala-Gln-Glu-Lys-Leu-Glu,Glu-Glu-Leu-Asp-Asn-Ala-Leu-Asn和Val-Pro-Ser-Ile-Asp-Asp-Gln-Glu-Glu-Leu-Met,抗氧化肽的氨基酸构成中都含有谷氨酸或天冬氨酸。天冬氨酸和谷氨酸可以向自由基容易供电子,因而具有一定的抗氧化能力^[42]。因此推断组分c与组分III较强的抗氧化能力可能与其含有这些氨基酸有关。

4 结论

DA 201-C大孔树脂分离得到的三个核桃多肽组分随洗脱溶剂疏水性增大,抗氧化活性增强。其中组分III的羟自由基清除率显著高于组分I、II和核桃蛋白肽($p < 0.01$)。

组分III经Sephadex G-15分离纯化后得到的a、b、c、d四个组分中,组分c具有最高的羟自由基清除能力,其 IC_{50} 为7.5074 mg/mL,其分子量分布集中在

400~700 Da, 为含有 3~6 个氨基酸的肽段。

具有较强抗氧化能力的组分 c 与组分 III, 氨基酸构成上具有相似性, 其谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸含量占比较大, 均在 6.48% 以上。

参考文献

- [1] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003(5): 21-23.
- [2] Raval M. Quality characteristics of California walnuts [J]. Cereal Food World, 1992, 37: 264-266.
- [3] 王璐莎, 张首玉, 黄明, 等. 鸭肉蛋白源抗氧化肽的酶法制备工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 90-96.
- [4] 李慧, 吕莹, 丁轲, 等. 食物源降血压肽的制备与功能评价[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(1): 26-30.
- [5] Hou H, Fan Y, Li B, et al. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame [J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 821-828.
- [6] Takenaka Y, Utsumi S, Yoshikawa M. Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin A1aB1b subunit by site-directed mutagenesis [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2000, 64(12): 2731-2733.
- [7] 杨闯, 王俊玲, 王胜男. 生物抗菌肽研究进展及在植物蛋白饲料中的应用[J]. 产业与科技论坛, 2015, 14(24): 36, 38.
- [8] 糕同友, 丛建民. 大豆生物活性肽的制备及其生物活性研究[J]. 中国酿造, 2007, 26(8): 6-9.
- [9] 张君慧. 大米蛋白抗氧化肽的制备、分离纯化和结构鉴定[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [10] 李艳红. 鹰嘴豆蛋白酶解物的制备及其抗氧化肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [11] 舒一梅. 猪股骨降血压肽分离纯化的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.
- [12] 梁盈, 鲁倩, 方婧杰, 等. 大米活性肽的抗氧化作用及其对 HUVEC 细胞增殖的影响[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(7): 1-6, 17.
- [13] 许典, 吕佼, 于超, 等. 低分子质量核桃多肽抗氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(11): 65-69, 75.
- [14] 贾靖霖, 蒲云峰, 李虎, 等. 核桃多肽抗疲劳作用的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(7): 340-342.
- [15] Gu X, Hou Y K, Li D, et al. Separation, purification, and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from walnut (*Juglans regia* L.) hydrolyzate [J]. International Journal of Food Properties, 2015, 18(2): 266-276.
- [16] 刘威, 闵伟红, 刘春雷, 等. 核桃清蛋白抗氧化肽的制备及其活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17): 40-44.
- [17] 李建杰, 荣瑞芬. 复合酶解制备核桃多肽工艺条件的优化[J]. 中国油脂, 2011, 36(1): 22-26.
- [18] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. Jpn J Nutr Diet, 1986, 44(6): 307-316.
- [19] Wu H C, Chen H M, Shiao C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36(9-10): 949-957.
- [20] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [21] Parejo I, Codina C, Petrakis C, et al. Evaluation of scavenging activity activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH, (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay [J]. Journal of Pharmacological & Toxicological Methods, 2000, 44(3): 507-512.
- [22] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.124-2016 食品安全国家标准, 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [23] 王戈莎. 大米多肽的分离纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [24] 聂慎德. 菜籽肽制备及其抗氧化活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [25] 周徐慧. 汉麻籽蛋白抗氧化肽的制备及其活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [26] 代衍峰. 抗氧化玉米肽的制备及其功能与结构关系的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [27] 陈圆圆. 大豆肽的酶解制备与抗疲劳、抗氧化功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [28] 程云辉. 麦胚蛋白酶解物的制备、结构及生物活性功能的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [29] 武万兴, 陈朝银, 赵声兰, 等. 固态发酵核桃粕制备活性肽及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 266-271.
- [30] 孙一. 核桃多肽的抗氧化活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2013.
- [31] 豆康宁. 酶解大豆分离蛋白制取大豆肽及其抗氧化性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2007.
- [32] 刁静静, 张丽萍. 高活性豌豆抗氧化肽的分离纯化方法[J]. 中国食品学报, 2014, 14(6): 133-141.
- [33] 贾韶千, 吴彩娥, 范龚健, 等. 银杏抗氧化肽的分离纯化及活性鉴定[J]. 农业机械学报, 2011, 42(6): 152-155.
- [34] Qian Z J, Jung W K, Kim S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1690-1698.
- [35] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. Food Research International, 2005, 38(2): 175-182.
- [36] Je J Y, Qian Z J, Kim S K. Antioxidant peptide isolated from muscle protein of bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw [J]. Journal of Medicinal Food, 2007, 10(3): 401-407.
- [37] Rajapakse N, Mendis E, Byun H G, et al. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(9): 562-569.
- [38] Mendis E, Rajapakse N, Kim S K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(3): 581-587.
- [39] Giménez B, Pérez-Santin E, Gómez-Guillén M C, et al. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE- (下转第 13 页)

特性、凝胶特性以及蛋白的结构,提高虾蛄制品的营养价值。

参考文献

- [1] 刘修泽,郭栋,王爱勇.辽东湾海域口虾蛄的资源特征及变化[J].水生生物报,2014,38(3):602-608.
- [2] 范青松,邢坤,刘海映,等.口虾蛄脑部褐脂质分布、组织学和超微结构特征研究[J].大连海洋大学学报,2016,31(2):147-150.
- [3] 夏秀芳,孔保华,张宏伟.肌原纤维蛋白凝胶形成机理及影响因素的研究进展[J].食品科学,2009,30(9):264-268.
- [4] 杨明,孔保华,董和亮,等.马铃薯淀粉对鲤鱼肌原纤维蛋白功能特性的影响[J].食品工业科技,2013,34(14):169-172,186.
- [5] 杨德浙,王永良,马绣同,等.中国北部海洋无脊椎动物[M].北京高等教育出版社,1996:411-412.
- [6] 王有基,胡梦红.鳃鱼增殖产业化初步探讨[J].水产科技情报,2004,31(4):147-153.
- [7] Luo Y K, Shen H X, Pan D D, et al. Gel properties of surimi from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) as affected by heat treatment and soy protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(8):1513-1519.
- [8] 赵春青,彭增起.肌球蛋白功能特性的研究进展[J].肉类研究,2002(1):17-19.
- [9] Leandros P, Voutsinas, Elaine Cheung, Shuryo Nakai. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins[J]. Journal of Food Science, 1983, 48:26-32.
- [10] Elizalde, B E, De Kanterewicz R J, Pilosof A M R, et al. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil-in-water emulsions[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(3):845-848.
- [11] 田少君,李小阳,曾艳菊,等.大豆分离蛋白的磷酸化改性[J].中国粮油学报,2003(2):46-49.
- [12] 李阳阳.大豆分离蛋白磷酸化及功能性质研究[D].天津:天津商学院,2006.
- [13] 王诗萌.虾蛄肌原纤维蛋白凝胶性质的研究[D].天津:天津商业大学,2016.
- [14] 李雨露,刘丽萍,佟丽媛.菊粉的特性及在食品中的应用[J].食品工业科技,2013,34(13):392-394.
- [15] 彭英云,郑清,张涛.菊粉的功能与利用[J].食品研究与开发,2012,33(10):236-240.
- [16] 汤锋,杨武,王丽,等.菊粉功能特性的研究[J].食品工业科技,2010,31(05):318-320.
- [17] 魏凌云.菊粉的分离纯化过程和功能性产品研究[D].杭州:浙江大学,2006.
- [18] Park D, Xiong Y L. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2):607-616.
- [19] 王诗萌,张坤生,任云霞.食用胶对虾蛄中磷酸化肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[J].食品科学,2016(9):56-60.
- [20] 袁程程,张坤生,任云霞.沙蒿胶对虾蛄肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[J].食品科学,2017,38(5):111-115.
- [21] 曹云刚.植物多酚对肉蛋白氧化稳定性和功能特性的影响机理及应用[D].无锡:江南大学,2016.
- [22] 周非白.氧化修饰对猪肉肌原纤维蛋白结构与功能特性的调控研究[D].广州:华南理工大学,2016.
- [23] 李明清.鲤鱼肌原纤维蛋白功能特性的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [24] 周景丽.虾蛄盐溶蛋白性质的研究[D].天津:天津商业大学,2016.
- [25] 彭倩.猪血中血红蛋白的分离、磷酸化及其功能性的研究[D].天津:天津商业大学,2010.
- [26] Agyare K K, Addo K, Xiong Y L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1):72-81.
- [27] Chel I, Gatellier P, Sante-Lhoutellier V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination[J]. Meat Science, 2006, 74(4):681-683.
- [28] 吴菊清,邵俊花,魏朝贵,等.离子强度对猪肉肌原纤维蛋白乳化特性和理化特性的影响[J].食品科学,2014(23):14-19.
- [29] Benjakul S, Visessanguan W, Ishizaki S, et al. Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(9):1311-1318.
- [30] Foegeding E A. Functional properties of turkey salt-soluble protein[J]. Food Science, 1987, 52(6):1495-1498.
- [31] 姜启兴.鲮鱼肉热加工特性及其机理研究[D].无锡:江南大学,2015.
- [32] 曾淑薇,李吉,熊善柏,等.磷酸盐对草鱼肌原纤维蛋白结构的影响[J].食品科学,2014,23:48-51.
- [33] 杨振.魔芋粉、转谷氨酰胺酶和大豆分离蛋白对鲤鱼肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [34] 王未君.多糖对瘦肉丸及肌原纤维蛋白特性影响的研究[D].无锡:江南大学,2014.
- [35] 任丽娜.白鲢鱼肉肌原纤维蛋白冷冻变性的研究[D].无锡:江南大学,2014.
- (上接第7页)
- inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2012, 125(2):334-341.
- [40] Rong He, Abraham T Girgih, Sunday A Malomo, et al. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysate and the membrane ultrafiltration fractions [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1):219-227.
- [41] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12):3661-3667.
- [42] Udenigwe C C, Aluko R E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(5):3148-3161.