

汉麻籽抗氧化肽的制备与氨基酸序列分析

魏连会¹,董艳¹,石杰¹,宋淑敏¹,孙兴荣²

(1. 黑龙江省科学院大庆分院,黑龙江大庆163319; 2. 黑龙江省农业科学院大庆分院,黑龙江大庆163316)

摘要:为开发具有较好抗氧化活性的植物源蛋白肽,采用木瓜蛋白酶和中性蛋白酶复合酶法水解汉麻籽粕获得汉麻籽蛋白水解物,经膜分离技术得到4种不同分子质量的多肽组分。通过DPPH自由基清除率、总还原力的测定,评价不同多肽组分的抗氧化活性,并对抗氧化活性最强的多肽组分进行氨基酸序列分析。结果显示:低分子质量的汉麻籽多肽组分具有更好的抗氧化活性,其中HP-IV组分(分子质量<1 kDa)的抗氧化活性最强;HP-IV组分中丰度较高的6个肽段的分子质量分别为364.84、539.77、630.30、662.33、718.90、827.41 Da,氨基酸序列分别为NRDDMRER、ANQLDQFSR、NPEDEFEQLRREGGRG、NHNNQLDLTPR、TVNSYNLPILRF、VSLLDTSNVNNQLDDNPRRFY。汉麻籽蛋白水解物,尤其是分子质量小于1 kDa的多肽组分可作为功能性成分用于抗氧化相关功能食品和保健品的开发。

关键词:汉麻籽多肽;抗氧化活性;氨基酸序列

中图分类号:TS201.2;R285

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)04-0036-05

Preparation and amino acid sequence analysis of antioxidant peptides from hemp seeds

WEI Lianhui¹, DONG Yan¹, SHI Jie¹, SONG Shumin¹, SUN Xingrong²

(1. Daqing Branch of the Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319, Heilongjiang, China; 2. Daqing Branches of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to explore plant-derived protein peptides with good antioxidant activities, hemp seed meal was hydrolyzed by papain and neutral protease to obtain hemp seed protein hydrolysate, and four kinds of polypeptide component with different molecular weights were obtained by membrane separation technology. The antioxidant activity of different polypeptide components was evaluated by the determination of DPPH radical scavenging rate and total reducing power. The amino acid sequence of the polypeptide component with the strongest antioxidant activity was analyzed. The results showed that low molecular weight hemp seed polypeptide component had better antioxidant activity, and the antioxidant activity of HP-IV component (molecular weight <1 kDa) was the strongest. Six peptides with high abundance in HP-IV component were 364.84, 539.77, 630.30, 662.33, 718.90, 827.41 Da, and their amino acid sequence were NRDDMRER, ANQLDQFSR, NPEDEFEQLRREGGRG, NHNNQLDLTPR, TVNSYNLPILRF, VSLLDTSNVNNQLDDNPRRFY, respectively. It is suggested that hemp seed meal protein hydrolysates, especially polypeptide component with molecular weight less than 1 kDa, may be used as functional components in the development of antioxidant related functional foods and health care products.

Key words: hemp seed polypeptides; antioxidant activity; amino acid sequence

收稿日期:2021-05-07;修回日期:2021-12-27

基金项目:黑龙江省科学院青年创新基金杰青项目(CXJQ2021DQ01);大庆市指导性科技计划项目(zd-2020-84)

作者简介:魏连会(1983),男,助理研究员,硕士,研究方向为功能性食品及植物蛋白工程(E-mail)wlhctv@126.com。

通信作者:宋淑敏,研究员(E-mail)ssm68@126.com。

活性氧(ROS)参与人体生理代谢过程并起着至关重要的作用,在正常情况下,多余的ROS能够通过生物体内的抗氧化酶和非酶因子被有效消除^[1]。

ROS 过多可导致许多疾病,如糖尿病、冠心病、癌症、肝病和炎症性疾病^[2]。此外,ROS 介导的脂质、蛋白质氧化会导致食物变酸,产生异味,并在食物中产生潜在的毒性^[3]。因此,开发有效的抗氧化剂,对于食品加工和保鲜工业非常重要。目前,一些合成抗氧化剂具有很强的抗氧化性,并且已经广泛用于医药和食品工业。但是合成抗氧化剂具有副作用,如肝损害和致癌,影响其应用^[4]。因此,开发天然抗氧化剂替代合成抗氧化剂具有重要的意义。饮食中的抗氧化成分包括维生素、类胡萝卜素、类黄酮、酚和多肽等^[5],其中功能活性肽具有生物活性高、毒性低的特点,可开发为天然抗氧化剂^[6]。

食物源抗氧化肽在其氨基酸序列中无活性亲本蛋白,具有2~20个氨基酸残基,易于吸收并且没有有害的免疫反应,可以发挥其作为自由基清除剂、过氧化物活性分解剂、金属灭活剂和氧气抑制剂的作用,保护食品和生物免受ROS的侵害^[7]。研究表明,植物蛋白来源的多肽如大豆蛋白肽^[8]、鹰嘴豆多肽^[9]、米糠多肽^[10]、玉米多肽^[11]、核桃仁多肽^[12]具有很强的抗氧化作用,可以用于功能性食品。

汉麻(*Cannabis sativa* L.)也称工业大麻、火麻、汉麻、线麻、黄麻等,是一种一年生草本植物,隶属于大麻科,在中国和加拿大地区广泛种植^[13]。汉麻为无毒品种,四氢大麻酚含量低于0.3%。汉麻籽具有很好的药用价值和食用价值,其药用功效在2000年版的《药典》和2001年“药食同源”名单中均有记载^[14]。汉麻籽脂肪含量为35%~50%,蛋白质含量为20%~40%。汉麻籽蛋白营养价值高,致敏性低,易消化,氨基酸种类齐全,组成均衡,必需氨基酸含量可以与酪蛋白和大豆蛋白相媲美,且精氨酸和谷氨酸含量丰富,是一种极具开发价值的优质蛋白^[15]。目前关于汉麻籽多肽的制备工艺与降血糖、降血脂、抗氧化作用研究已有大量的报道^[13,16-18],而关于汉麻籽抗氧化肽组成分析和结构鉴定的研究较少,因此本研究以汉麻籽粕为原料制备汉麻籽抗氧化肽,并对其组成分析和结构鉴定,以期汉麻籽多肽在功能食品中的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

汉麻籽粕,实验室采用超临界技术由汉麻籽提取油脂后制得;木瓜蛋白酶(酶活力为 8×10^5 U/g)、中性蛋白酶(酶活力为 1.3×10^5 U/g),无锡雪梅酶制剂有限公司;其他试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

MALDI-TOF 基质辅助激光解析飞行时间质谱

仪,AB SCIEX 公司;Pellicon 切向流超滤系统,Millipore 公司;FD-2A-80 型真空冷冻干燥机,上海继谱电子科技有限公司;UV-5100B 紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;Q Exactive 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪、Easy-nLC 1000 纳升级液相色谱,赛默飞世尔公司。

1.2 实验方法

1.2.1 汉麻籽多肽的制备与分离纯化

以汉麻籽粕为原料制备汉麻籽多肽。按质量比1:5将汉麻籽粕加入蒸馏水溶解,然后调整溶液pH为5.0,温度为70℃,加入汉麻籽粕质量3.0%的中性蛋白酶、0.4%的木瓜蛋白酶,酶解3h。95℃水浴灭酶活10min,以10000 r/min离心15min,取上清液,备用。采用不同截留分子量超滤膜(1、3、5 kDa)对上清液进行分离,超滤条件为温度25℃、压力0.15 MPa、转速125 r/min。收集各个组分的多肽液冷冻干燥,计算各组分所占比例。

1.2.2 抗氧化活性测定

1.2.2.1 DPPH 自由基清除率的测定

根据 You 等^[19]的方法测定 DPPH 自由基清除率,略作修改。冷冻干燥的汉麻籽多肽样品用蒸馏水溶解得到质量浓度分别为0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mg/mL的溶液。取100 μL 汉麻籽多肽溶液,与100 μL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液充分混匀后,在37℃水浴中反应1.5 h,测定在517 nm 处的吸光度。空白组为100 μL 乙醇溶液和100 μL 一定质量浓度的汉麻籽多肽溶液,对照组为100 μL 乙醇溶液和100 μL DPPH 溶液。DPPH 自由基清除率(E)按式(1)计算。

$$E = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 为汉麻籽多肽溶液吸光度; A_2 为空白组吸光度; A_3 为对照组吸光度。

1.2.2.2 总还原力的测定

参照 Oyaizu^[20]的方法测定总还原力,略作修改。反应管中依次加入0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mg/mL 的汉麻籽多肽溶液1.0 mL,2.5 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.6)和2.5 mL 10 mg/mL 铁氰化钾溶液,充分混合后,于50℃的水浴中充分反应20 min,以3000 r/min离心10 min,取2.5 mL 上清液与0.1 mL 1 mg/mL FeCl_3 混合,测定在700 nm 处的吸光度,以吸光度的大小表示总还原力的强弱。

1.2.3 汉麻籽抗氧化肽分子质量分布的测定

采用 MALDI-TOF 基质辅助激光解析飞行时

间质谱仪对汉麻籽抗氧化肽的分子质量分布进行测定^[21]。取质量浓度为 1 mg/mL 的汉麻籽多肽溶液 1 μ L, 点至样品靶位上, 自然干燥后, 再取 1 μ L CHCA 基质溶液点至对应靶位上并自然干燥, 用相同方法在样品靶位相邻靶位上点校准标准品 (4700 Proteomics Analyzer Calibration Mixture 1)。采用校准标准品 Calibration Mixture 1 进行外标一级校准, 质量误差小于 0.5 Da。图谱采集条件: 一级质谱 (MS) 范围 (m/z) 100 ~ 5 000, 每张谱图累加 500 个 Laser Shots。

1.2.4 汉麻籽抗氧化肽的氨基酸序列分析

参考文献[21]方法, 采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 对汉麻籽抗氧化肽的氨基酸序列进行分析, 采用 ESI 质谱鉴定及质谱数据分析。

2 结果与分析

2.1 汉麻籽多肽各组分所占比例

对汉麻籽粕酶解液进行分离纯化后得到 4 个多肽组分, 各组分分子质量及所占比例见表 1。

表 1 汉麻籽多肽各组分分子质量及所占比例

组分	分子质量/kDa	所占比例/%
HP-I	≥ 5	1.27 \pm 0.13
HP-II	5 ~ 3	4.23 \pm 0.15
HP-III	1 ~ 3	54.32 \pm 0.21
HP-IV	< 1	40.18 \pm 0.07

由表 1 可知, 得到的 4 个多肽组分中, HP-III 组分 (分子质量为 1 ~ 3 kDa) 所占比例最高, 为 54.32%, 其次为 HP-IV 组分 (分子质量 < 1 kDa), 所占比例为 40.18%。

2.2 汉麻籽多肽的抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除能力

汉麻籽多肽对 DPPH 自由基的清除能力如图 1 所示。

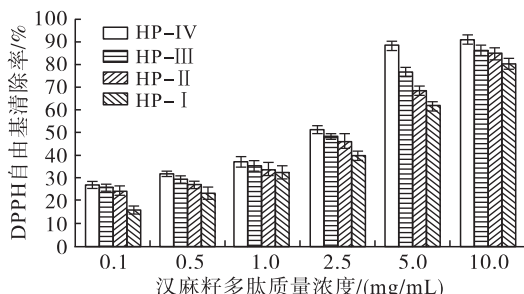


图 1 汉麻籽多肽的 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基在乙醇溶液中稳定, 且在 517 nm 处有最大的吸光度。当 DPPH 自由基遇到提供质子的物质, 如抗氧化剂时, 自由基被清除, 吸光度降低。这个方法可评价抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除能力。由图 1 可见, 汉麻籽多肽对 DPPH 自由基具有

清除能力, 且呈现出剂量相关性。汉麻籽多肽的分子质量越大, 相同质量浓度的汉麻籽多肽对 DPPH 自由基清除能力越小。一般来说, 生物活性肽的分子质量、疏水性、氨基酸组成和序列被认为在抗氧化作用中起关键作用, 抗氧化肽的生物活性高度依赖于其分子大小, 因为小分子的抗氧化剂更有可能与自由基相互作用, 以防止过氧化反应^[22]。

2.2.2 总还原力

汉麻籽多肽的总还原力如图 2 所示。

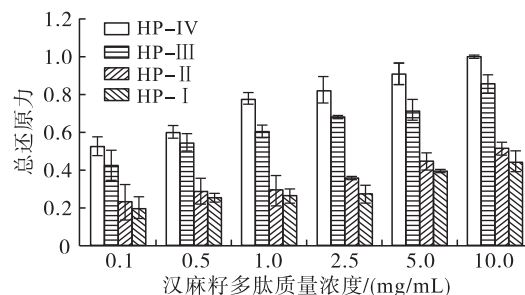


图 2 汉麻籽多肽的总还原力

总还原力是评价活性肽抗氧化活性的重要指标。从图 2 可见, 在 0.1 ~ 10.0 mg/mL 范围内, 汉麻籽多肽的总还原力均随着汉麻籽多肽质量浓度的增加而增强, 并呈现出显著的量效关系, 相同质量浓度条件下, 分子质量越大, 总还原力越低, HP-IV 组分的分子质量 (分子质量 < 1 kDa) 最小, 其总还原力最强。

2.3 汉麻籽抗氧化肽的分子质量分布

经测定, HP-IV 组分丰度较高的 6 个峰对应的肽段分子质量分别为 364.84、539.77、630.30、662.33、718.90、827.41 Da。

2.4 汉麻籽抗氧化肽的氨基酸序列分析

为了确定可能引起抗氧化活性的肽段结构, 根据 HP-IV 组分的分子质量分布, 对 HP-IV 组分丰度较高的 6 个峰对应的肽段进行氨基酸序列分析, 多肽序列分析结果如表 2 所示, 质谱图如图 3 ~ 图 8 所示。

表 2 汉麻籽抗氧化肽肽段的氨基酸序列

序号	分子质量/Da	氨基酸序列
1	364.84	NRDDMRER
2	539.77	ANQLDQFSR
3	630.30	NPEDEFEQLRREGGRG
4	662.33	NHNNQLDLTPR
5	718.90	TVNSYNLPILRF
6	827.41	VSLLDTSNVNNQLDDNPRRFY

注: G. 甘氨酸; A. 丙氨酸; V. 缬氨酸; L. 亮氨酸; I. 异亮氨酸; P. 脯氨酸; F. 苯丙氨酸; Y. 酪氨酸; S. 丝氨酸; T. 苏氨酸; M. 甲硫氨酸; N. 天冬酰胺; Q. 谷氨酰胺; D. 天冬氨酸; E. 谷氨酸; R. 精氨酸; H. 组氨酸。

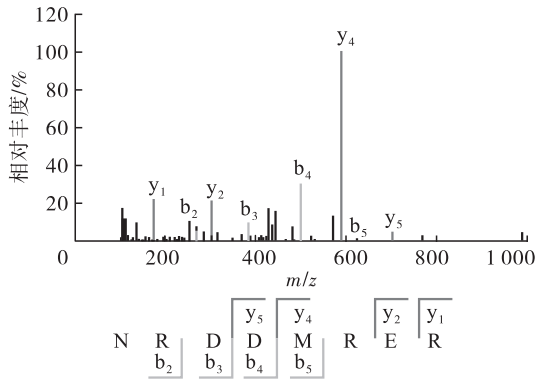


图3 NRDDMRER 质谱图

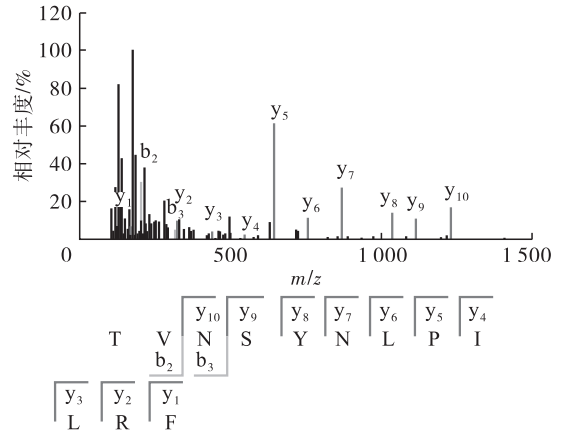


图7 TVNSYNLPILRF 质谱图

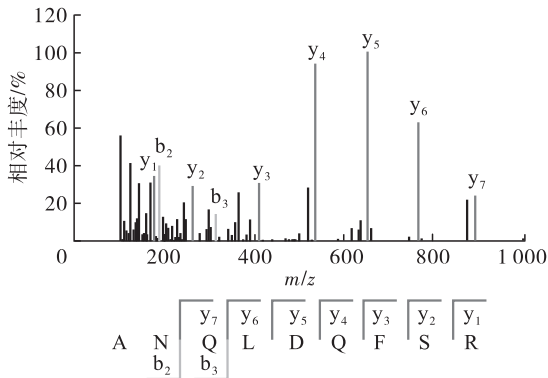


图4 ANQLDQFSR 质谱图

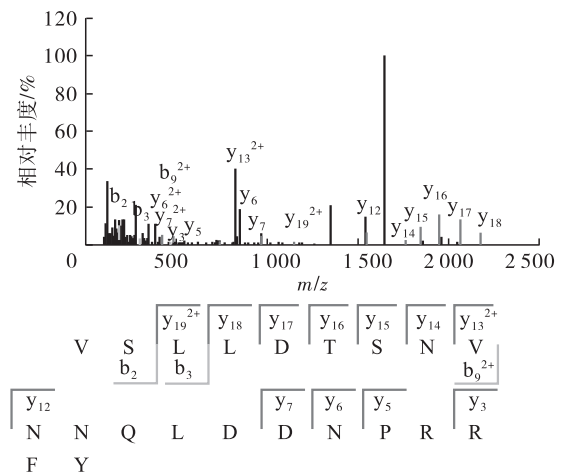


图8 VSLDTSNVNNQLDDNPRRFY 质谱图

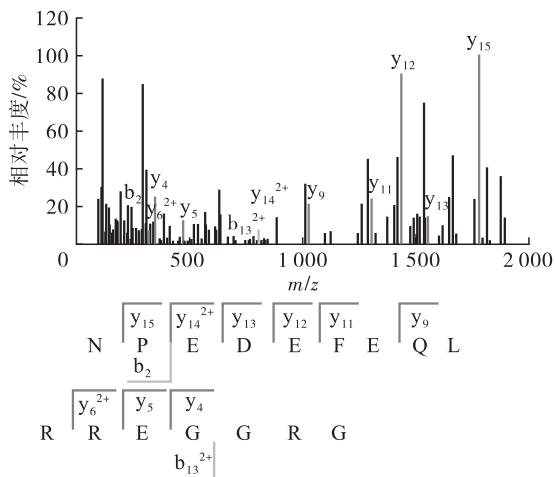


图5 NPEDEFEQLRREGGRG 质谱图

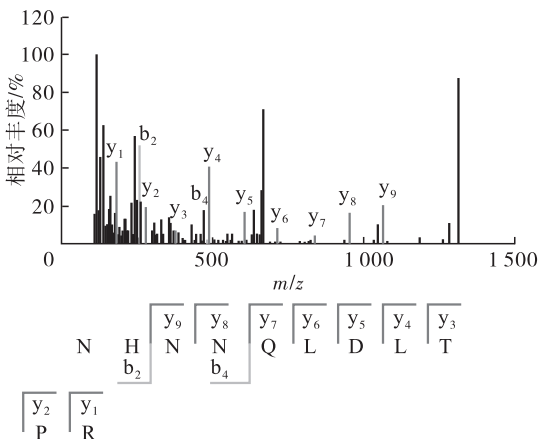


图6 NHNNQLDLTPR 质谱图

据报道,天冬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、赖氨酸、组氨酸、色氨酸、亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸等对肽的抗氧化性有贡献^[23]。由表2和图3~图8可知,鉴定的6个肽段中,均含有具有抗氧化活性的氨基酸。已有研究证明多肽序列中异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸等疏水性氨基酸使其具有较好的抗氧化活性^[24]。因此,研究认为 NRDDMRER、ANQLDQFSR、NPEDEFEQLRR-EGGRG、NHNNQLDLTPR、TVNSYNLPILRF、VSLD-TSNVNNQLDDNPRRFY 多肽序列组成是使分子质量小于 1 kDa 的汉麻籽多肽组分具有较好抗氧化活性的主要因素。

3 结论

本文采用复合蛋白酶法制备了具有较高抗氧化活性的汉麻籽多肽。利用切向流超滤系统分离纯化,通过比较不同组分汉麻籽多肽的抗氧化活性,确定分子质量小于 1 kDa 的汉麻籽多肽具有最强的抗氧化活性。分子质量小于 1 kDa 的汉麻籽多肽组分中丰度较高的 6 个峰对应的肽段分子质量分别为 364.84、539.77、630.30、662.33、718.90、827.41 Da,采用液相色谱-串联质谱对其进行氨基酸序列

分析,得到的氨基酸序列分别为 NRDDMRER、ANQLDQFSR、NPEDEFEQLRREGGRG、NHNNQL-DLTPR、TVNSYNLPILRF、VSLLDTSNVNNQLDDN-PRRFY。研究认为分子质量小于 1 kDa 的汉麻籽蛋白水解物是抗氧化功能食品开发的优良原料。

参考文献:

- [1] RAHMAN M S, CHOI Y H, CHOI Y S, et al. A novel antioxidant peptide, purified from *Bacillus amyloliquefaciens*, showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression[J]. Food Chem, 2018, 239:502-510.
- [2] CAROCHO M, MORALES P, FERREIRA I C F R. Antioxidants: reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives[J]. Trends Food Sci Technol, 2018, 71: 107-120.
- [3] ZHAO W H, LUO Q B, PAN X, et al. Preparation, identification, and activity evaluation of ten antioxidant peptides from protein hydrolysate of swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) [J]. J Funct Foods, 2018, 47: 503-511.
- [4] 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]. J Funct Foods, 2015, 12: 1-10.
- [5] CÖMERT E D, GÖKMEN V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century[J]. Food Res Int, 2018, 105:76-93.
- [6] HU F Y, CHI C F, WANG B, et al. Two novel antioxidant nonapeptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) muscle[J]. Mar Drugs, 2015, 13:1993-2009.
- [7] WANG B, GONG Y D, LI Z R, et al. Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle [J]. J Funct Foods, 2014, 6:176-185.
- [8] DE OLIVEIRA C F, CORREA A P F, COLETTI D, et al. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties [J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(5): 2668-2678.
- [9] 周丽卿. 鹰嘴豆多肽的制备及其改性研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2012.
- [10] REVILLA E, MARIA C S, MIRAMONTES E, et al. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran[J]. Food Res Int, 2009, 42(3): 387-393.
- [11] 朱艳华, 谭军. 玉米多肽抗氧化作用的研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 36-38.
- [12] 包怡红, 盛和静. 山核桃蛋白多肽的制备及对羟自由基的清除作用[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 515-519.
- [13] 魏连会, 宋淑敏, 董艳, 等. 火麻籽多肽对高脂饮食喂养大鼠血脂的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 161-167.
- [14] WEI L H, DONG Y, SUN Y F, et al. Anticancer property of hemp bioactive peptides in Hep3 Bliver cancer cells through Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway [J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(4):1833-1841.
- [15] 王庆玲. 汉麻蛋白改性对蛋白功能性质及营养价值的影响研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2019.
- [16] 朱秀清, 李美莹, 孙冰玉, 等. 复合酶分步水解法制备汉麻多肽及其抗氧化特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2):161-169.
- [17] 梁凯. 汉麻籽粕降血糖肽的酶法制备及其分离纯化[D]. 广州:华南理工大学, 2014.
- [18] 周徐慧. 汉麻籽蛋白抗氧化肽的制备及其活性研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2008.
- [19] YOU L J, ZHAO M M, REGENSTEIN J M, et al. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Food Res Int, 2010, 43: 1167-1173.
- [20] OYAIZU M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. Jpn J Nutr, 1986, 44: 307-315.
- [21] 宋淑敏, 魏连会, 董艳, 等. 汉麻降脂肽氨基酸序列分析[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(3): 51-58.
- [22] YANG X R, ZHANG L, DING D G, et al. Preparation, identification, and activity evaluation of eight antioxidant peptides from protein hydrolysate of Hairtail (*Trichiurus japonicas*) muscle [J/OL]. Mar Drugs, 2019, 17(1):23 [2021-05-07]. <https://doi.org/10.3390/md17010023>.
- [23] 芦鑫, 李若昀, 张丽霞, 等. 芝麻抗氧化肽分离纯化与结构鉴定的研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(3): 45-52, 60.
- [24] 邹智鹏, 王明洁, 刘梦婷, 等. 小米米糠蛋白水解物及其膜分离组分的降血压相关活性研究[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(6): 31-38.