

油料蛋白

桃仁多肽的分离及其抗氧化性能研究

季晓彤, 孙培冬

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:桃仁是一种优质的油料和蛋白质资源,为获得具有高抗氧化活性的桃仁多肽,通过超滤技术对酶解法制备的桃仁多肽(PSP)进行分级分离,得到3种相对分子质量分布不同的组分PSP-1、PSP-2和PSP-3,并以4种不同的抗氧化能力实验为指标进行评定。结果表明:相对分子质量分布不同的桃仁多肽其抗氧化能力差异明显,其中相对分子质量低于1 kDa的PSP-1具有最高的DPPH·清除能力($IC_{50} = 1.44$ mg/mL)、OH·清除能力($IC_{50} = 1.04$ mg/mL)、 O_2^- ·清除能力和还原能力。因此,采用截留相对分子质量为1 kDa的超滤膜可有效分离得到具有高抗氧化活性的桃仁多肽。

关键词:桃仁;多肽;抗氧化性能;超滤;相对分子质量

中图分类号:TS209;TS225.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2018)07-0077-05

Isolation of peach kernel polypeptide and its antioxidant capacities

JI Xiaotong, SUN Peidong

(School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Peach kernel is a high-quality resource of oil and protein. To obtain polypeptide with high antioxidant activities from peach kernel, ultrafiltration was used to isolate peach kernel polypeptide (PSP) prepared by enzymolysis method. And three constituents (PSP-1, PSP-2, PSP-3) with different relative molecular weight distribution were separated and collected. Then the antioxidant capacities of these constituents were investigated through four evaluation systems. The results showed that antioxidant capacities of peach kernel polypeptide with different relative molecular weights had significant differences. PSP-1 with relative molecular weight below 1 kDa showed the highest DPPH radical scavenging activity ($IC_{50} = 1.44$ mg/mL), hydroxyl radical scavenging activity ($IC_{50} = 1.04$ mg/mL), superoxide anion radical scavenging activity and reducing power. So ultrafiltration membrane with retention relative molecular weight 1 kDa could be applied to the isolation of peach kernel polypeptide with high antioxidant capacity.

Key words: peach kernel; polypeptide; antioxidant capacity; ultrafiltration; relative molecular weight

桃仁是蔷薇科植物桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch) 或山桃 (*Prunus davidiana* (Carr.) Franch) 的干燥成熟种子^[1], 富含油脂、蛋白质, 以及黄酮、甾体等生物活性物质^[2-3]。桃仁中油脂含量约为50%, 蛋白质含量约为30%, 其油脂中不饱和脂肪酸含量达到90%以上, 蛋白质中含有7种人体必需

的氨基酸, 是一种优质的油料及蛋白质资源^[4-8]。然而桃仁作为桃加工产业的下脚料, 除少部分作为中药使用, 其余大多被废弃, 造成了大量的资源浪费。

近年来, 通过酶解蛋白提高食品营养价值以及获取功能性多肽已经受到广泛关注, 尤其是对抗氧化肽的研究已成为热点^[9-11]。多肽组成复杂分离困难, 因而多肽构效关系的确定存在较大的难度。而超滤作为一种新兴的膜分离技术, 具有操作方便、条件温和等优点, 目前已被广泛应用于蛋白质和多肽的分离^[12-14]。王才立等^[15]发现, 通过超滤分离小麦胚芽多肽得到的不同组分中, 相对分子质量小

收稿日期: 2017-10-09; 修回日期: 2018-03-21

作者简介: 季晓彤 (1993), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物与化妆品化学 (E-mail) jixiaotong006@163.com。

通信作者: 孙培冬, 副教授 (E-mail) sunpeidong2004@126.com。

于 2 kDa 的多肽具有更高的抗氧化活性。Wiriyaphan 等^[16]在研究金线鱼鱼骨及鱼皮酶解产物时发现,相对分子质量在 1~5 kDa 的组分具有最高的抗氧化活性和细胞保护作用,并具有抑制乳酸脱氢酶(LDH)的泄露以及活性氧(ROS)生成的作用。可见,多肽的相对分子质量与抗氧化性能存在相关性。

本文以碱性蛋白酶对桃仁蛋白进行酶解,利用超滤技术对桃仁多肽进行分级分离,比较相对分子质量分布不同的桃仁多肽的抗氧化能力,以期为桃仁的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

桃仁蛋白粉,桃仁经碱提酸沉法制得(桃仁购自安徽亳州乐春堂中药材批发零售店);碱性蛋白酶,购自青岛吉宝中新国际贸易有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),购自 Sigma 公司;氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、邻苯三酚、水杨酸、双氧水、硫酸亚铁、铁氰化钾、三氯化铁均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

TU-1900 紫外分光光度计, H-850 台式高速离心机, LYOQUEST-85 冷冻干燥机, UF-1812 超滤系统, Waters 600 高效液相色谱仪。

1.2 实验方法

1.2.1 桃仁多肽的制备

取桃仁蛋白粉,加入去离子水使底物的质量分数达到 4%,按酶底比 3:100 加入碱性蛋白酶,维持体系 pH 为 10.0,在 50℃ 酶解 2 h,反应结束后煮沸 15 min 进行灭酶。冷却至室温,转移至离心管中,7 500 r/min 离心 12 min,收集上清液,调节体系 pH 至等电点 4.5,离心收集上清液,冷冻干燥后得到桃仁多肽冻干粉 PSP。

1.2.2 桃仁多肽相对分子质量分布的测定

取 PSP,用超纯水配成 5 mg/mL 的溶液,过 0.22 μm 的微孔滤膜,采用高效液相空间排阻色谱(SEC-HPLC)测定其相对分子质量分布,条件如下:TSK gel 2000 SWXL 色谱柱(300 mm × 7.8 mm);柱温 30℃;流动相为乙腈-水-三氟乙酸(体积比 45:44:0.1);流速 0.5 mL/min;检测波长 220 nm。

1.2.3 桃仁多肽的超滤分离

将 PSP 用去离子水配制成 10 mg/mL 的溶液,调节 pH 为 7.0,依次通过 0.45 μm 及 0.22 μm 的微

孔滤膜。根据相对分子质量分布的测定结果,将滤液分别通过 6 kDa 和 1 kDa 的超滤膜,调节超滤压力为 0.1~0.2 MPa,常温超滤 5 次。分别收集各组分多肽溶液,旋蒸后冷冻干燥,得到 3 种相对分子质量分布不同的多肽。

1.2.4 桃仁多肽各组分得率的测定

通过双缩脲法,以 0~20 mg/mL 的牛白蛋白溶液绘制标准曲线,将质量分数为 10% 的三氯乙酸加入等体积的多肽溶液中,将蛋白质进行沉淀,对上清液中多肽的质量进行测定。按公式(1)计算 PSP 的多肽得率,按公式(2)计算超滤后各组分的多肽得率:

$$\text{PSP 的多肽得率} = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{各组分的多肽得率} = \frac{m_4}{m_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_1 为桃仁蛋白的质量,mg; m_2 为酶解液中多肽的质量,mg; m_3 为 PSP 中多肽的质量,mg; m_4 为超滤后各组分中多肽的质量,mg。

1.2.5 桃仁多肽抗氧化性能的测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率的测定

样品组取 2 mL 质量浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1、2、4 mg/mL 的多肽溶液,加入 2 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液,以去离子水代替多肽溶液作为对照组,以无水乙醇代替 DPPH 作为空白组,以相同质量浓度的谷胱甘肽(GSH)作为阳性对照,在室温下避光反应 45 min,测其 517 nm 处吸光度,平行测定 3 次,按公式(3)计算 DPPH·清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = \left(1 - \frac{A_s - A_0}{A_c}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_s 为样品组吸光度; A_c 为对照组吸光度; A_0 为空白组吸光度。

1.2.5.2 羟基自由基(OH·)清除率的测定

依次向试管中加入 0.5 mL 9 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、0.5 mL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液和 1 mL 质量浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 的多肽溶液,用去离子水补齐至 7 mL,摇匀后加入 0.5 mL 8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液启动反应,在 37℃ 保温 15 min,同时以去离子水代替样品作为对照组,以去离子水代替 H₂O₂ 溶液作为空白组,以相同质量浓度的 GSH 为阳性对照,测定溶液在 510 nm 处的吸光度,平行测定 3 次,按公式(4)计算 OH·清除率:

$$\text{OH} \cdot \text{清除率} = \left(1 - \frac{A_s - A_0}{A_c}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_s 为样品组吸光度; A_c 为对照组吸光度; A_0 为空白组吸光度。

1.2.5.3 超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)清除率的测定

通过邻苯三酚自氧化法测定 $O_2^- \cdot$ 清除率。向 10 mL 具塞试管中加入 0.5 mL 质量浓度分别为 0.5、1、2、3、4、5 mg/mL 的多肽溶液与 5 mL Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲溶液,在 37 °C 下水浴保温 20 min。向试管中加入 0.3 mL 7.5 mmol/L 的邻苯三酚溶液,振荡均匀,立即在 320 nm 处每隔 5 s 测其吸光度 1 次,反应 80 s。以吸光度对时间作图,斜率即为样品组邻苯三酚自氧化速率。用 0.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液代替样品,按上述方法测得空白组邻苯三酚自氧化速率,以相同质量浓度的 GSH 作为阳性对照,平行测定 3 次,按公式(5)计算 $O_2^- \cdot$ 清除率:

$$O_2^- \cdot \text{清除率} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_0 为空白组邻苯三酚自氧化速率; A_s 为样品组邻苯三酚自氧化速率。

1.2.5.4 还原力的测定

向试管中依次加入 1 mL 质量浓度分别为 0.5、1、2、3、4、5 mg/mL 的多肽溶液,2.5 mL 质量分数为 1% 的铁氰化钾和 2.5 mL 磷酸缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6),混合均匀后在 50 °C 保温 20 min。将该溶液放入 4 °C 冰箱 5 min 暂停反应,之后加入 2.5 mL 质量分数为 10% 的三氯乙酸溶液,放置 10 min 后离心,取上清液 2.5 mL 加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 质量分数为 1% 的 $FeCl_3$,混合均匀测其在 700 nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 桃仁多肽的相对分子质量分布

利用高效液相空间排阻色谱对 PSP 及超滤各级组分的相对分子质量分布进行测定,结果如图 1 及表 1 所示。从图 1 可以看出,PSP 的相对分子质量分布范围较广,但相对分子质量皆小于 10 kDa,这表明碱性蛋白酶能充分将桃仁蛋白酶解为桃仁多肽。根据 PSP 的相对分子质量分布,选用孔径为 6 kDa 和 1 kDa 的滤膜对 PSP 进行超滤分离,得到 3 个组分 PSP-1、PSP-2、PSP-3。从图 1 和表 1 可以看出,超滤膜能有效截留大于孔径尺寸的肽段,其中 PSP-1 中相对分子质量小于 1 kDa 的多肽约占 99.69%,PSP-2 中未检测出相对分子质量大于 6 kDa 的多肽,而在 PSP-3 中检测出相对分子质量大于 6 kDa 的多肽。

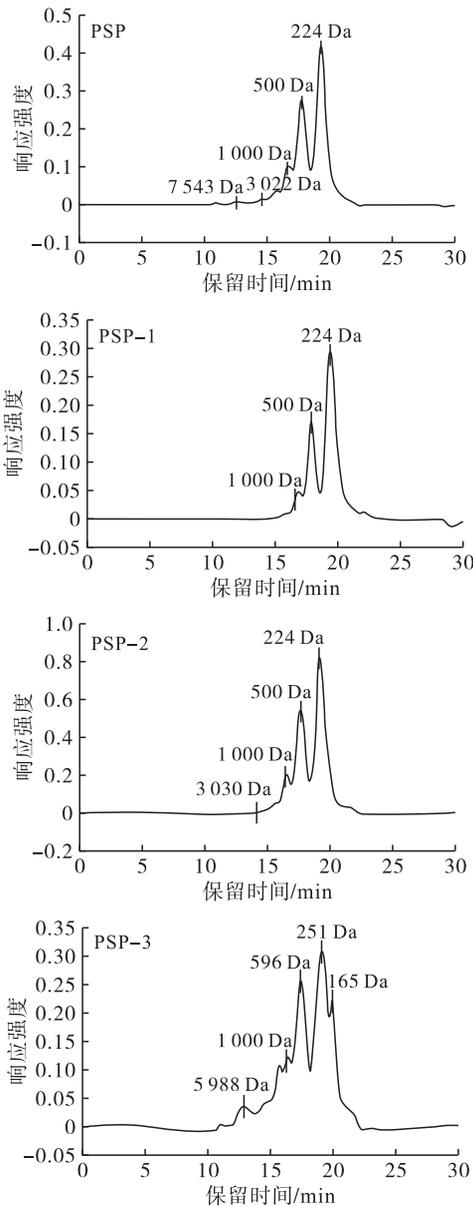


图 1 各组分相对分子质量分布图

表 1 各组分相对分子质量分布 %

多肽	<1 kDa	1~6 kDa	6~10 kDa
PSP	89.59	8.82	1.60
PSP-1	99.69	0.31	-
PSP-2	97.14	2.86	-
PSP-3	86.99	10.77	2.23

2.2 桃仁多肽各组分得率

桃仁蛋白经酶解得到 PSP,经超滤分级得到 PSP-1、PSP-2 和 PSP-3,桃仁多肽各组分得率如表 2 所示。

表 2 桃仁多肽各组分得率

多肽	得率/%
PSP	67.32 ± 0.14
PSP-1	28.26 ± 0.21
PSP-2	34.02 ± 0.12
PSP-3	27.24 ± 0.14

从表2可以看出,PSP的多肽得率达到 $67.32\% \pm 0.14\%$,结合PSP的相对分子质量分布图,充分证明通过碱性蛋白酶酶解能成功将桃仁蛋白酶解为桃仁多肽。PSP经超滤后各组分多肽得率大小依次是:PSP-2 > PSP-1 > PSP-3,各组分得率之和为89.52%,说明超滤过程中损失的多肽较少。

2.3 桃仁多肽的抗氧化性能

为了筛选抗氧化能力强的多肽,分别通过DPPH自由基清除率、羟基自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和还原力实验对PSP及超滤后各组分PSP-1、PSP-2和PSP-3的抗氧化性能进行测定,结果如图2~图5所示。

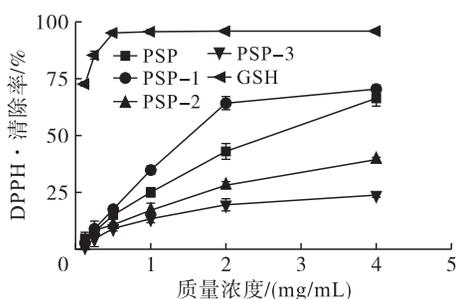


图2 各组分对DPPH自由基的清除能力

从图2可以看出,各组分均表现出对DPPH·清除效果,且均对质量浓度有依赖性。在质量浓度低于0.5 mg/mL时,各组分清除DPPH·的效果并不明显,然而随着质量浓度的不断升高,各组分间差异明显,DPPH·清除能力由大到小依次为:PSP-1 > PSP > PSP-2 > PSP-3,其中相对分子质量最小的PSP-1表现出的清除能力最强,半抑制浓度(IC_{50})达到1.44 mg/mL。结果表明,相对分子质量小于1 kDa的肽段具有更强的DPPH·清除能力,这是由于低相对分子质量的多肽具有较小的空间位阻,可以作为更好的电子供体,与自由基发生反应,将其转化为更稳定的最终产物^[17]。而其他组分与PSP-1相比,相对分子质量分布范围更广,高于1 kDa的肽段具有较大的空间位阻,可能会阻碍相对分子质量低的肽段与DPPH·接触,导致其清除率的降低。

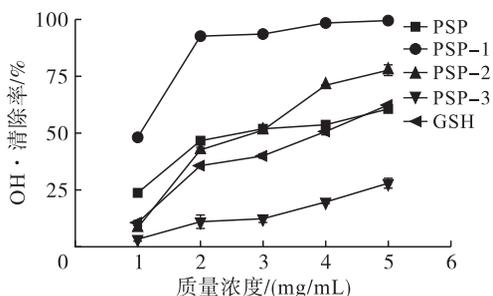


图3 各组分对羟基自由基的清除能力

从图3可以看出,随着质量浓度的升高,各组分对OH·的清除率均有明显上升,呈现出浓度量效关系。其中PSP-1在所有质量浓度都表现出最强的OH·清除能力,其 IC_{50} 达到1.04 mg/mL,与3.94 mg/mL的GSH相当,PSP-2和PSP与GSH的OH·清除能力较为接近,而PSP-3的OH·清除能力明显低于GSH。这是由于相对分子质量小于1 kDa的肽段可作为质子供体阻断自由基链式反应,促使自由基转化成更加稳定的物质^[18],而PSP-1中的肽段相对分子质量有99.69%小于1 kDa。

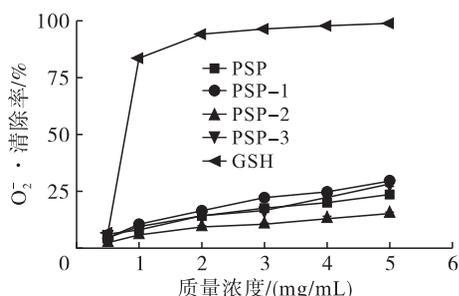


图4 各组分对超氧阴离子自由基的清除能力

从图4可以看出,随着多肽质量浓度的增加,各组分的 $O_2^{\cdot-}$ 清除率均呈现不断上升的趋势。其中,PSP-1清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力最强,PSP-2最弱,而PSP和PSP-3在质量浓度低于4 mg/mL时,有着相近的 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力,但与GSH相比各组分清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力较弱。

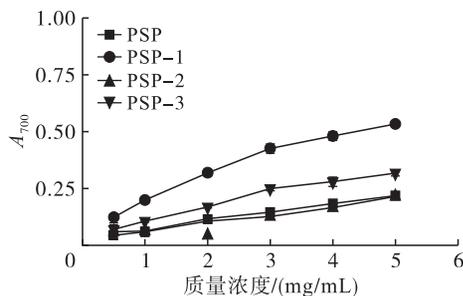


图5 各组分的还原能力

从图5可以看出,各组分多肽在低质量浓度时吸光度较低,说明其还原能力较低,随着质量浓度的增加,吸光度也逐渐增加,说明其还原能力也逐渐升高。各组分还原能力的大小依次为:PSP-1 > PSP-3 > PSP > PSP-2。其中PSP-1的还原能力最强,在质量浓度为4 mg/mL时,PSP-1在700 nm处的吸光度是PSP的2.61倍。这是由于桃仁蛋白结构中具有还原能力较强的基团,而随着酶解的发生,这些基团不断分散到低相对分子质量的多肽中,经超滤截留后,相对分子质量低的活性肽被富集,因而还原能力较高。而相对分子质量高的肽段可能具有较多电子致密的基团暴露在外,转移电子的能力

也较强,因而 PSP-3 的还原力高于不含大于 6 kDa 相对分子质量肽段的 PSP-2。

3 结论

通过碱性蛋白酶酶解得到的桃仁多肽 PSP,经 6 kDa 和 1 kDa 的超滤膜超滤后得到 3 种相对分子质量分布不同的多肽 PSP-1、PSP-2 和 PSP-3。桃仁多肽各组分在体外抗氧化实验中均表现出抗氧化能力,且其抗氧化能力与其相对分子质量分布密切相关,其中相对分子质量小于 1 kDa 的多肽具有最强的抗氧化能力。因此,通过超滤技术可有效截留大分子肽段,富集相对分子质量小于 1 kDa 的抗氧化活性多肽,这一结果可为桃仁的综合利用提供依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:277.

[2] 陈晓燕. 桃仁、桑叶化学成分及生物活性研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.

[3] 方美善,张红英. 桃仁提取物对痴呆模型小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):236-238.

[4] 林小明. 桃仁化学成分和药理作用研究进展[J]. 蛇志,2007,19(2):130-132.

[5] 颜永刚,雷国莲,刘静,等. 中药桃仁的研究概况[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2262-2264.

[6] YOLANDA S V, ALBERTINA C, JUAN A R R, et al. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol[J]. J Supercrit Fluid, 2009,49(2):167-173.

[7] 易建华,李静娟,朱振宝,等. 桃仁清蛋白与大豆分离蛋白功能特性比较研究[J]. 中国油脂,2011,36(3):28-32.

[8] 郭婷婷,万楚筠,黄凤洪,等. 油料饼粕中活性肽的提取及生理功能研究进展[J]. 中国油脂,2017,42(2):120-124.

[9] 唐蔚,宁奇,孙培冬. 南瓜籽抗氧化肽的制备及分离纯化[J]. 中国油脂,2016,41(2):20-24.

[10] CRISTINA T F, MARÍADEL M C, ISIDRA R, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates[J]. Food Chem,2015,180:194-202.

[11] SHANMUGAMABV P, KAPILAA S, SONFACKA T K, et al. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein[J]. Int Dairy J,2015,42:1-5.

[12] TODD S. Isolated ultrafiltration: its origin and early development[J]. Artif Organs,2013,37(10):841-847.

[13] PANSARE V J, TIEN D, THONIYOT P, et al. Ultrafiltration of nanoparticle colloids[J]. J Membrane Sci,2017,538:41-49.

[14] 邓成萍,薛文通,孙晓琳,等. 超滤在大豆多肽分离纯化中应用[J]. 食品科学,2006,27(2):192-195.

[15] 王才立,张志国,王成忠,等. 不同分子量小麦胚芽多肽的体内抗氧化活性[J]. 食品科学,2013,34(7):275-278.

[16] WIRIYAPHAN C, XIAO H, DECKER E A, et al. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration[J]. Food Chem,2015,167:7-15.

[17] 齐希光,陆晓婷,张晖,等. 不同相对分子量黑籽瓜种子多肽抗氧化能力的研究[J]. 食品工业科技,2016,37(9):74-80.

[18] LIU J B, YAN J, JIN Y, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities[J]. Food Chem,2015,175:258-266.

(上接第 71 页)

structured lipid from *Cinnamomum camphora* seed oil and camellia oil by Lipozyme RM IM[J]. Int J Food Sci Technol, 2014, 49(2):453-459.

[26] KHODADADI M, KERMASHA S. Modeling lipase-catalyzed interesterification of flaxseed oil and tricaprilyn for the synthesis of structured lipids[J]. J Mol Catal B-Enzy, 2014, 102(4):33-40.

[27] ZHOU S, WANG Y, JIANG Y, et al. Safety assessment of medium- and long-chain triacylglycerols containing 30% (w/w) medium-chain fatty acids in mice and rats[J]. Regul Toxicol Pharm, 2017, 86:42-48.

[28] KOH S P, ARIFIN N, LAI O M, et al. Oxidative stability of palm- and soybean-based medium- and long-chain triacylglycerol (MLCT) oil blends[J]. J Sci Food Agric, 2009, 89(3):455-462.

[29] ADHIKARI P, SHIN J A, LEE J H, et al. Crystallization, physicochemical properties, and oxidative stability of the interesterified hard fat from rice bran oil, fully hy-

drogenated soybean oil, and coconut oil through lipase-catalyzed reaction[J]. Food Bioprocess Technol, 2012, 5(6):2474-2487.

[30] 赵国志,刘喜亮,中里真人,等. 中碳链脂肪酸甘油酯的研究概况(II)以 MCT 为主要构成成分的结构油脂的合成[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(3):17-20.

[31] 吴炜亮. 固定化脂肪酶促酯交换反应制备低能量可血脂的研究[D]. 广州:华南理工大学,2012.

[32] MCNEILL G P, SONNET P E. Low-calorie triglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification of monoglycerides[J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, 72(11):1301-1307.

[33] 林海冠,李宁. 静脉用脂肪乳剂的应用进展[J]. 肠外与肠内营养, 2011, 18(4):244-246.

[34] CHAMBRIER C, LAUVERJAT M, BOULETREAU P. Structured triglyceride emulsions in parenteral nutrition[J]. Nutr Clin Pract, 2006, 21(4):342-350.

[35] 吴肇汉. 脂肪乳剂的应用现状及其进展[J]. 中华临床营养杂志, 2001, 9(4):203-204.