

降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽的 分离纯化及结构鉴定

李雪馨, 郑睿, 袁兴宇, 秦那日苏, 白聚春, 包小兰

(内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要:采用 Protease M 对亚麻籽蛋白进行酶解, 制备具有降胆固醇活性的亚麻籽蛋白酶解肽, 对其进行分离纯化及结构鉴定, 并合成相应多肽验证其降胆固醇活性。结果表明, 经 Protease M 对亚麻籽蛋白酶解 4 h 时获得的亚麻籽蛋白酶解肽胆固醇胶束溶解度抑制率最高, 为 47.57%; 继续采用超滤技术将其分离为相对分子质量小于等于 3 kDa、3~5 kDa、5~10 kDa、10~30 kDa 和大于 30 kDa 5 个组分, 发现相对分子质量小于等于 3 kDa 的组分胆固醇胶束溶解度抑制率最高, 为 71.0%; 再经大孔树脂对该组分进行吸附后经过不同体积分数乙醇溶液洗脱, 发现 75% 的乙醇洗脱分离得到的组分胆固醇胶束溶解度抑制率最高, 为 79.8%; 采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 对其进一步分离纯化, 收集到 F9 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最高, 为 85.7%; 最后采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS/MS) 从 F9 组分中鉴定出 6 种降胆固醇亚麻籽肽, 氨基酸序列分别为 Ile-Ile-Pro-Ala-Phe (IIPAF)、Leu-Asn-Phe-Phe (LNFF)、Leu-Leu-Gly-Thr-Leu (LLGTL)、Ile-Pro-Pro-Phe (IPPF)、Ile-Ile-Phe (IIF) 和 Leu-Leu-Gly-Ala (LLGA), 其胆固醇胶束溶解度抑制率分别为 82.8%、77.8%、88.0%、93.5%、80.3% 和 87.1%。

关键词: 亚麻籽蛋白; 亚麻籽肽; 降胆固醇活性; 分离纯化; 结构鉴定

中图分类号: TQ936.1; TS229 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)12-0026-07

Isolation and identification of peptide with cholesterol lowering activity derived from flaxseed protein

LI Xuexin, ZHENG Rui, YUAN Xingyu, QIN Narisu, BAI Juchun, BAO Xiaolan

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Protease M was selected to hydrolyze flaxseed protein to prepare flaxseed protein hydrolysate peptides with cholesterol lowering activity. The peptides were isolated, purified and identified. The corresponding polypeptides were synthesized to verify the cholesterol lowering activity. The results showed that the highest inhibition rates of cholesterol micelle solubility of flaxseed protein hydrolysate peptide was 47.57% when it was hydrolyzed for 4 h by protease M, and it was further separated into five components with molecular weight ≤ 3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa, 10-30 kDa and > 30 kDa by ultrafiltration technology, and inhibition rates of cholesterol micelle solubility of components with molecular weight ≤ 3 kDa was the highest, reaching 71.0%. The fraction with molecular weight ≤ 3 kDa was adsorbed by macroporous resin and then eluted by ethanol of different volume fraction, and it was found that the fraction eluted by 75% ethanol had the highest inhibition rates of cholesterol micelle solubility of 79.8%.

收稿日期: 2021-01-14; 修回日期: 2021-08-24

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目 (2020GG0064); 国家自然科学基金地区科学基金 (31860423)

作者简介: 李雪馨 (1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程 (E-mail) 1127572907@qq.com。

通信作者: 包小兰, 副教授 (E-mail) xlb06@163.com。

RP-HPLC was used to further separate and purify the fraction, and the inhibition rates of cholesterol micelle solubility of F9 fraction was the highest of 85.7%. Finally, six cholesterol lowering flaxseed peptides were identified from F9 fraction by MALDI-TOF-MS/MS, and their

amino acid sequences were Ile - Ile - Pro - Ala - Phe (IIPAF), Leu - Asn - Phe - Phe (LNFF), Leu - Leu - Gly - Thr - Leu (LLGTL), Ile - Pro - Pro - Phe (IPPF), Ile - Ile - Phe (IIF) and Leu - Leu - Gly - Ala (LLGA) with the inhibition rates of cholesterol micelle solubility 82.8%, 77.8%, 88.0%, 93.5%, 80.3% and 87.1%, respectively.

Key words: flaxseed protein; flaxseed peptides; cholesterol micelle solubility; isolation and purification; identification

近年来由于生活条件的日益改善,人们对鸡蛋、肉类等食物的摄入量逐渐增加,导致人体摄入的胆固醇过量^[1-2],从而引发高胆固醇血症等一系列心脑血管疾病的发病率提升。为此,如何有效抑制胆固醇的过量摄入成为亟待解决的问题。近年来国内外科科研人员围绕降胆固醇做了大量研究,发现有些植物蛋白降解产物具有降胆固醇的作用。如: Pedroche 等^[3]从埃塞俄比亚芥菜籽中制备出具有降胆固醇活性的肽,其相对分子质量在 1 400 ~ 1 800 Da 之间;王才立^[4]将小麦胚芽酶解制备出具有降胆固醇活性的小麦胚芽肽,相对分子质量为 300 ~ 600 Da,且在此范围内相对分子质量越小,降胆固醇作用越明显;刘恩岐等^[5]发现氨基酸序列为 Ala - Phe - Pro - Lys - Asp 的黑豆肽具有较强的降胆固醇活性,肽链中含有丙氨酸(Ala)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)等疏水性氨基酸,特别是含有的疏水性氨基酸 Pro 被认为对降胆固醇活性起着重要的作用。以上研究表明,植物源蛋白酶解产物的降胆固醇作用可能与其相对分子质量大小、疏水性氨基酸的组成及肽链结构等有着密切的联系。

亚麻籽蛋白是一种优质的植物蛋白资源^[6-8]。国内外对亚麻籽蛋白进行了大量的研究,发现亚麻籽蛋白具有多种生物活性,且本实验室前期研究发现,亚麻籽蛋白酶解后得到的肽具有降胆固醇作用^[9-10],但具体的降胆固醇组分的结构尚不清楚。为此,本文采用 Protease M 对亚麻籽蛋白进行酶解,制备亚麻籽蛋白酶解肽,再经超滤和大孔树脂分级,对其进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS/MS)结构鉴定,以期降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

低温压榨亚麻籽饼,内蒙古丰吉妙农业产品科技开发有限公司。

正己烷、氢氧化钠、盐酸等,均为分析纯,国药集

团化学试剂有限公司;乙腈(HPLC级),德国 Dikma 公司;牛磺胆酸钠标准品、胆固醇标准品、三氟乙酸(TFA,分析纯)等,美国 Sigma 公司;Protease M (51.5 AU/g),日本天野酶制剂株式会社;DA201-C 型大孔树脂,江苏苏青水处理集团有限公司。

1.1.2 仪器与设备

UV-2300 紫外分光光度计,北京中西远大科技有限公司;IKA-T10 均质机,德国 IKA 公司;日立离心机,日本 Hitachi 公司;FDU-2200 真空冷冻干燥机,东京理化器械株式会社;Kromasil 100-5C18 高效液相色谱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;MALDI-TOF-MS/MS,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;十二通道半自动多肽合成仪,上海强耀生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 低温压榨亚麻籽饼的脱脂

将低温压榨亚麻籽饼粉碎后,过 0.25 mm (60 目)筛,将亚麻籽饼粉与正己烷按料液比 1:3 混合于烧杯中,常温下充分搅拌 2 h,弃去上清液,再加正己烷重复脱脂 3 次,将沉淀放置通风橱自然风干,即为脱脂亚麻籽饼粉。

1.2.2 亚麻籽蛋白的提取

根据许光映等^[11]的方法稍作修改。称取 20 g 脱脂亚麻籽饼粉于烧杯中,以 1:35 的料液比加入蒸馏水混合,调 pH 至 8.5,放入 50℃ 恒温水浴锅中浸提 2 h,于 4 500 r/min 离心 15 min,取上清液,用 0.1 mol/L HCl 将上清液的 pH 调至 4.0,静置 1 h,之后于 4 500 r/min 离心 15 min,取沉淀,用蒸馏水溶解,用 0.1 mol/L NaOH 将 pH 调至 7.0,冷冻干燥即为亚麻籽蛋白。

1.2.3 亚麻籽蛋白酶解肽的制备

称 4 g 亚麻籽蛋白于烧杯中,以 1:50 的料液比加蒸馏水混合,调 pH 至 3.0,放入 50℃ 恒温水浴锅中,加入 1% Protease M (以亚麻籽蛋白质量计)酶解一定时间。酶解结束后于 95℃ 灭酶 15 min,待冷却至室温,在 4 500 r/min 下离心 20 min,收集上清液,调 pH 至 7.0,冷冻干燥即为亚麻籽蛋白酶解肽。

1.2.4 水解度的测定

根据马晓雨等^[12]的方法稍作修改。取灭酶后的亚麻籽蛋白酶解液 3 mL 于 100 mL 烧杯中,加入 60 mL 蒸馏水,用 0.05 mol/L NaOH 滴定至 pH 为 8.20 时,停止搅拌。再加入 10 mL 甲醛(用 0.05 mol/L NaOH 滴定至 pH 为 8.20),用磁力搅拌器混合均匀,继续用 NaOH 溶液滴定至 pH 为 9.20,记录加入甲醛后消耗的 NaOH 溶液体积(V_1)。然后取未经酶解的亚麻籽蛋白溶液 3 mL,处理方法同上,记录加入中性甲醛后所消耗的 NaOH 体积(V_0),按式(1)计算水解度(x)。

$$x = \frac{1\ 000 \times 0.05 \times (V_1 - V_0)}{C \times V} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为样品蛋白质量浓度,mg/mL; V 为酶解液中滴定甲醛的 NaOH 溶液体积,mL;0.05 为 NaOH 摩尔浓度,mol/L; h_{tot} 为每克亚麻籽蛋白中肽键的毫摩尔数。

1.2.5 胆固醇胶束溶解度抑制率测定

本实验以测定胆固醇胶束溶解度抑制率为指标评价样品的降胆固醇活性。胆固醇胶束溶解度抑制率根据廖坤梅等^[13]的方法进行测定。

胆固醇标准曲线的绘制:称取 0.01 g 胆固醇标准品,使用冰乙酸将其定容至 100 mL 得胆固醇标准溶液,备用。分别吸取 0.1、2、3、4、5、6、7、8 mL 胆固醇标准溶液置于 25 mL 具塞试管中,用冰乙酸定容至 8 mL,加入 4 mL 铁矾显色剂(用 100 mL 85% 的磷酸溶解 4.463 g 的硫酸铁铵,溶液待冷却后,取 10 mL 至 100 mL 容量瓶中,并使用浓硫酸定容至 100 mL 作为铁矾显色剂),振荡均匀,静置 30 min,采用紫外分光光度计于 560 nm 波长处测定 OD 值,并绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $Y = 7.362x - 0.1914$, $R^2 = 0.9976$ (Y 为胆固醇质量浓度,mg/mL; x 为 OD 值)。

样品的测定:称取 25 mg 样品于 5 mL 的胶束溶液中,其中胶束溶液中含有 10 mmol/L 的牛磺胆酸钠,1 mmol/L 的油酸,132 mmol/L 的 NaCl,0.4 mmol/L 的胆固醇,15 mmol/L 的 pH 7.4 的磷酸钠缓冲液。使用均质机对胶束溶液进行乳化 20 min,然后在 37℃ 的恒温培养箱中温育 24 h,最后以 10 000 r/min 离心 60 min。收集上清液,按胆固醇标准曲线绘制方法进行显色后,采用紫外分光光度计于 560 nm 波长处测定 OD 值,带入标准曲线方程计算胆固醇质量浓度,即为胆固醇胶束溶解度,以不加样品的溶液为空白组,由式(2)计算胆固醇胶束溶解度抑制率(Y)。

$$Y = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: S_0 表示空白组的胆固醇质量浓度,mg/mL; S_1 表示样品组的胆固醇质量浓度,mg/mL。

1.2.6 超滤法分离亚麻籽蛋白酶解肽

将亚麻籽蛋白酶解液采用截留相对分子质量为 3.5、10 kDa 和 30 kDa 的超滤膜分别进行超滤,共分离出相对分子质量小于等于 3 kDa、3~5 kDa、5~10 kDa、10~30 kDa 和大于 30 kDa 的 5 个超滤组分,称取其质量,计算各级超滤组分的得率,并测定其胆固醇胶束溶解度抑制率。

1.2.7 大孔树脂分离亚麻籽蛋白酶解肽超滤组分

将 DA201-C 型大孔树脂浸入 95% 乙醇中,浸泡 24 h,用 95% 乙醇浸泡至浸泡液在 220 nm 处的吸收峰为零,再用纯净水洗净后备用。称取 50 g 处理好的湿树脂放入 200 mL 三角瓶中,加入 pH 4.0、20 mg/mL 超滤组分溶液 50 mL,将三角瓶放在 25℃ 恒温摇床上以 150 r/min 振荡吸附 2.5 h,超滤组分经大孔树脂吸附完全后,真空抽滤除去未吸附的溶液,用体积分数分别为 25%、50%、75% 和 100% 的乙醇溶液依次进行洗脱,分别收集,冷冻干燥后备用。

1.2.8 RP-HPLC 色谱分离纯化亚麻籽蛋白酶解肽

将 1.2.7 冻干样品溶于含 0.1% TFA 的超纯水溶液中,通过 0.45 μm 微孔膜过滤,取滤液进 RP-HPLC 系统中进行检测,对峰面积较高组分进行重复进样收集后,冷冻干燥。RP-HPLC 条件:ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)和 ZORBAX SB-C18 半制备柱(9.6 mm × 125 mm, 5 μm);时间 45 min;流速 1.0 mL/min;柱温 30℃;检测波长 214 nm;进样量 100 μL。

1.2.9 亚麻籽蛋白酶解肽的鉴定

经过 RP-HPLC 分离纯化后的组分送专业检测机构采用 MALDI-TOF-MS/MS 进行结构鉴定。首先进行一级质谱扫描(扫描范围 1~10 kDa),得到 MALDI-MS 图,从 MALDI-MS 图中选择出待测离子,然后进行 MALDI-MS/MS 分析。质谱仪的原始数据使用软件 Maxquant(1.6.2.10)处理。使用 UniProtKB(<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Linum+usitatissimum&sort=score>)确认亚麻籽蛋白酶解肽的来源。

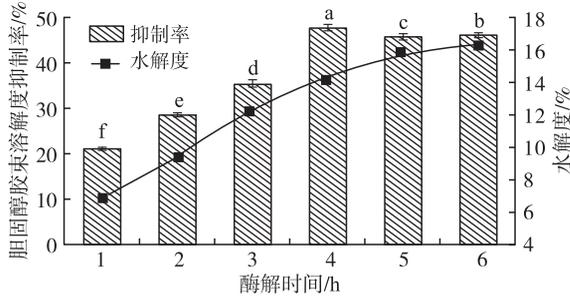
1.2.10 化学固相合成法合成亚麻籽肽

根据已知氨基酸序列的肽段,采用化学固相合成技术在十二通道半自动多肽合成仪上合成多肽。该合成在上海强耀生物科技有限公司完成。

2 结果与讨论

2.1 亚麻籽蛋白酶解时间的确定

按 1.2.3 方法采用 Protease M 分别酶解亚麻籽蛋白 1、2、3、4、5、6 h, 测定水解度及亚麻籽蛋白酶解肽胆固醇胶束溶解度抑制率, 结果如图 1 所示。



注:不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

图 1 不同酶解时间的亚麻籽蛋白酶解肽的水解度与胆固醇胶束溶解度抑制率

由图 1 可知,随着酶解时间的延长,水解度呈上升趋势,而降胆固醇活性呈先上升后下降趋势。当酶解时间为 4 h 时,水解度为 14.25%,胆固醇胶束溶解度抑制率达到最高,为 47.57%,高于亚麻籽蛋白的胆固醇胶束溶解度抑制率(24.49%)。当酶解时间继续延长至 5、6 h 时,水解度持续上升,但此时亚麻籽蛋白酶解肽的胆固醇胶束溶解度抑制率呈下降趋势。因此,选择酶解时间为 4 h 的亚麻籽蛋白酶解肽进行进一步的分离纯化。

陈雪等^[14]用碱性蛋白酶酶解麦胚蛋白,随着水解度的增大,麦胚多肽的胆固醇胶束溶解度抑制率呈先升高后降低趋势,当酶解时间为 4 h 时,水解度达 14.3%,胆固醇胶束溶解度抑制率达到最高,为 53.67%。刘健敏等^[15]用 Alcalase 蛋白酶酶解大豆蛋白,随着酶解时间的延长,水解度持续增加,当水解度为 18% 时,胆固醇胶束溶解度抑制率达到最高,为 48.39%,当水解度继续增大时胆固醇胶束溶解度抑制率反而有所下降。上述结果表明植物蛋白酶解产物的降胆固醇活性需要有适度的水解度,水解度过高或过低均减弱其活性,与本文研究结果一致。

2.2 超滤分离降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽

进一步对酶解时间为 4 h 的亚麻籽蛋白酶解肽(命名为 Y)进行超滤,获得相对分子质量小于等于 3 kDa、3~5 kDa、5~10 kDa、10~30 kDa 和大于 30 kDa 的 5 个超滤组分,分别标记为 Y₁、Y₂、Y₃、Y₄ 和 Y₅,测定其得率及胆固醇胶束溶解度抑制率,结果见表 1。

由表 1 可以看出:经过超滤分离后相对分子质量大于 30 kDa 的组分得率最高,达到 44.3%;相对

分子质量 3~5 kDa 的组分得率最低,仅为 5.7%。同时还发现相对分子质量大于 30 kDa 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最低,为 20.6%;相对分子质量小于等于 3 kDa 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,为 71.0%,与超滤前的亚麻籽蛋白酶解肽相比增加了 23.43 个百分点。由此可见,亚麻籽蛋白酶解肽中起到降胆固醇作用的主要成分是相对分子质量小于等于 3 kDa 的组分。

表 1 超滤分离各组分得率和胆固醇胶束溶解度抑制率

组分	相对分子质量/kDa	得率/%	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
Y	-	-	47.6 ± 1.3 ^b
Y ₅	>30	44.3 ± 1.4 ^a	20.6 ± 2.6 ^e
Y ₄	10~30	12.2 ± 1.3 ^c	34.6 ± 0.9 ^d
Y ₃	5~10	9.2 ± 0.7 ^d	36.5 ± 1.8 ^d
Y ₂	3~5	5.7 ± 0.9 ^e	42.3 ± 2.2 ^e
Y ₁	≤3	28.6 ± 1.9 ^b	71.0 ± 1.3 ^a

注:同列不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。下同

研究表明,相对分子质量较小的多肽具有更高的降胆固醇活性^[16]。Marques 等^[17]发现经过超滤分级处理后获得的豇豆蛋白酶解物相对分子质量小于等于 3 kDa 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最高。周美含等^[18]采用超滤技术从榛仁蛋白酶解物中分离出相对分子质量小于等于 3 kDa 的组分,其胆固醇胶束溶解度抑制率为 58.9%,显著高于相对分子质量 3~10 kDa 和相对分子质量大于 10 kDa 超滤组分。以上研究结果与本文的研究结果一致。

2.3 大孔树脂分离降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽

不同体积分数乙醇溶液的极性不同,与不同疏水性的肽段的亲和力不同,利用不同体积分数的乙醇溶液进行梯度洗脱,可以得到疏水性不同的肽段^[19]。研究表明,大豆肽降胆固醇活性与肽段疏水性的大小有关,随着疏水性的增加大豆肽降胆固醇活性也增加,经用体积分数 75% 的乙醇溶液对大孔树脂吸附的大豆肽洗脱后收集的组分,其降胆固醇活性也明显增加^[20-21]。为此本研究选用 DA201-C 型大孔树脂对超滤分级后相对分子质量小于等于 3 kDa 的组分按 1.2.7 方法进行吸附,并用不同体积分数的乙醇溶液进行洗脱,得到的 4 个组分分别标记为 D₁、D₂、D₃、D₄,测定其得率及胆固醇胶束溶解度抑制率,结果见表 2。

由表 2 可以看出:随着乙醇体积分数的增加,乙醇洗脱分离组分的得率呈下降趋势。当乙醇体积分数为 25% 时,洗脱分离得到的组分得率最高,为 37.1%;当乙醇体积分数为 100% 时,洗脱分离得到

的组分得率最低,为 13.9%。随着乙醇体积分数的增加,胆固醇胶束溶解度抑制率呈先上升后下降的趋势。当乙醇体积分数为 75% 时,洗脱分离得到的组分具有最高的降胆固醇活性,胆固醇胶束溶解度抑制率为 79.8%,但当乙醇体积分数为 100% 时,胆固醇胶束溶解度抑制率又有所下降。因此,选择 D₃ 组分进行下一步的分离纯化。

表 2 不同体积分数乙醇溶液洗脱分离组分的得率及胆固醇胶束溶解度抑制率

乙醇体积分数/%	组分	得率/%	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
25	D ₁	37.1 ± 1.1 ^a	35.2 ± 0.9 ^d
50	D ₂	25.9 ± 0.8 ^b	51.1 ± 1.4 ^c
75	D ₃	16.2 ± 2.1 ^c	79.8 ± 0.6 ^a
100	D ₄	13.9 ± 1.7 ^d	72.7 ± 2.2 ^b

邵素娟^[20]研究表明,经过 DA201 - C 型大孔树脂吸附后,松仁肽得到富集,不同体积分数乙醇溶液洗脱的松仁肽的体外降胆固醇活性有所不同,当乙醇体积分数达到 75% 时,洗脱下来的组分具有最高的胆固醇胶束溶解度抑制率,为 73.53%。张晓梅等^[21]研究发现,大豆蛋白酶解物的降胆固醇活性与肽段疏水性的大小有关,随着疏水性的增加,在乙醇体积分数达到 75% 时洗脱分离得到的组分具有最高的降胆固醇活性,胆固醇胶束溶解度抑制率为 77.48%,但乙醇体积分数达到 100% 时降胆固醇活性又有所下降。以上研究结果与本文的研究结果一致,表明这些肽的降胆固醇活性与其疏水性有关。

2.4 RP - HPLC 分离纯化降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽

按 1.2.8 方法采用 RP - HPLC 对 D₃ 组分进行分离纯化、检测,得到的 RP - HPLC 谱图见图 2。

表 4 降胆固醇亚麻籽肽的氨基酸序列、相对分子质量、蛋白来源和胆固醇胶束溶解度抑制率

序号	肽 (N 端 → C 端)	相对分子质量/Da	蛋白来源	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
I	IPAF	560.349	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) NADH dehydrogenase subunit F (11 - 15) 1MQHXTYSYSWIIPAF TLLVP20	82.8 ± 1.8
II	LNFF	540.288	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) NADH dehydrogenase subunit F (133 - 136) 131KVLNFFGFNGQHVLRFWFAKR150	77.8 ± 0.2
III	LLGTL	516.340	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) NADH dehydrogenase subunit F (114 - 119) 111QSAFLGTLSLCGIPPFACF130	88.0 ± 1.8
IV	IPPF	473.283	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) NADH dehydrogenase subunit F (423 - 426) 418LSLCGIPPFACFW430	93.5 ± 2.3
V	IIF	392.256	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) LINUS Chloroplast envelope membrane protein (17 - 19) 11FYLT SXIIFLPWIS25	80.3 ± 1.4
VI	LLGA	373.247	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) NADH dehydrogenase subunit F (18 - 21) 12VGHTVLLGATLALAQ27	87.1 ± 1.5

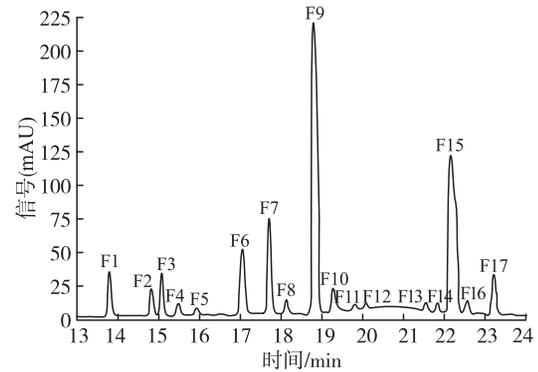


图 2 RP - HPLC 分离纯化 D₃ 组分谱图

由图 2 可知,经过 RP - HPLC 分离后 D₃ 组分被分离成 17 个组分,分别为 F1 ~ F17。由于 F6、F7、F9 和 F15 峰面积较高,为主要成分,因此重复进样,分别收集这 4 组峰,冷冻干燥后测定其胆固醇胶束溶解度抑制率,结果见表 3。

表 3 F6、F7、F9 和 F15 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率

组分	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
F6	36.5 ± 1.7 ^c
F7	55.7 ± 0.6 ^b
F9	85.7 ± 0.4 ^a
F15	14.6 ± 1.3 ^d

由表 3 可知,F15 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最低,F9 组分的胆固醇胶束溶解度抑制率最高,达到了 85.7%。因此,对 F9 组分重复收集进行结构鉴定。

2.5 降胆固醇亚麻籽肽的结构鉴定及活性验证

利用 MALDI - TOF - MS/MS 对 F9 组分进行结构鉴定,从 F9 组分中鉴定出 6 种亚麻籽肽,经人工合成后多肽的氨基酸序列、相对分子质量、蛋白来源及胆固醇胶束溶解度抑制率见表 4。

由表4可知,从降胆固醇亚麻籽肽中鉴定出6种肽(I~VI),相对分子质量在300~600 Da之间,序列分别为Ile-Ile-Pro-Ala-Phe(IIPAF)、Leu-Asn-Phe-Phe(LNFF)、Leu-Leu-Gly-Thr-Leu(LLGTL)、Ile-Pro-Pro-Phe(IPPF)、Ile-Ile-Phe(IIF)和Leu-Leu-Gly-Ala(LLGA),其胆固醇胶束溶解度抑制率分别为82.8%、77.8%、88.0%、93.5%、80.3%和87.1%。这些肽均含有疏水性氨基酸异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)和亮氨酸(Leu)相连的特征序列II、FF、LL、LG和PP。

Yoshikawa等^[22]研究表明,大豆肽的疏水性区域是其具备降胆固醇活性所必需的结构因素,脯氨酸残基是其中一种关键组成,且位于肽链的C端或除N端外的任何区域。Nagaoka等^[23]从乳清球蛋白中分离纯化得到了降胆固醇肽,其氨基酸序列为Ile-Ile-Ala-Glu-Lys(IIAEK),其序列中也含有疏水性肽段II。Makino等^[24]研究发现大豆肽中的疏水性氨基酸可以对胆固醇转化为胆汁酸起到促进作用,从而降低血液中的胆固醇浓度。Park等^[25]发现含有疏水性氨基酸Leu的食物源蛋白源生物活性肽具有较高的胆汁酸结合能力,原因在于这些活性肽的氨基酸残基能与胆汁酸的亲水性部位相互作用,从而起到降胆固醇的作用。Choi等^[26]发现来自大豆球蛋白的六肽Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr(VAWWY)结合胆汁酸活性较高,也主要归因于其序列中疏水性氨基酸的存在。结合本文研究表明,植物蛋白酶解物的降胆固醇活性可能与其与疏水性氨基酸有着一定的关系。

3 结论

本文选用Protease M对亚麻籽蛋白进行酶解,制备出具有降胆固醇活性的亚麻籽蛋白酶解肽,对其进行超滤、大孔树脂吸附分离(75%的乙醇洗脱)以及RP-HPLC分离,最后经质谱鉴定出6种具有降胆固醇活性的亚麻籽肽,其氨基酸序列分别为Ile-Ile-Pro-Ala-Phe(IIPAF)、Leu-Asn-Phe-Phe(LNFF)、Leu-Leu-Gly-Thr-Leu(LLGTL)、Ile-Pro-Pro-Phe(IPPF)、Ile-Ile-Phe(IIF)和Leu-Leu-Gly-Ala(LLGA),其胆固醇胶束溶解度抑制率分别为82.8%、77.8%、88.0%、93.5%、80.3%和87.1%。这些肽均含有疏水性氨基酸异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸相连的特征序列II、FF、LL、LG和PP。

参考文献:

[1] GIUSEPPE D, ALESSANDRO C, PAMELA M, et al.

Lipid-lowering nutraceuticals update on scientific evidence[J]. J Cardiovasc Med, 2020, 21(11): 845-859.

- [2] 李玉清, 雷莉辉, 张孝, 等. 大豆磷脂粉对蛋鸡腹脂率及鸡蛋胆固醇的影响[J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40(8): 4-7.
- [3] PEDROCHE J, YUST M M, LQARI H, et al. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases[J]. Food Res Int, 2007, 40(7): 931-938.
- [4] 王才立. 复合酶法制备小麦胚芽多肽的生物活性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013: 42-44.
- [5] 刘恩岐, 李华, 巫永华, 等. 降胆固醇黑豆肽的分离纯化与结构鉴定[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 128-132.
- [6] SILVA F G D, HERNÁNDEZ-LEDESMA B, AMIGO L, et al. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase[®] hydrolysis: antioxidant activity[J]. LWT - Food Sci Technol, 2017, 76: 140-146.
- [7] MARAMBE H K, WANASUNDARA J P D. Protein from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) [J]. Sustain Protein Sourc, 2017(1): 133-144.
- [8] HWANG C F, CHEN Y A, LUO C, et al. Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02[J]. Int J Food Sci Technol, 2016, 51(3): 681-689.
- [9] 高婕. 具有降胆固醇活性的亚麻籽肽的制备及其对大鼠降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [10] 刘晓静. 亚麻籽肽降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [11] 许光映, 胡晓军, 李群, 等. 亚麻分离蛋白提取工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(3): 45-48.
- [12] 马晓雨, 陈先鑫, 胡振瀛, 等. 限制性酶解对大米蛋白结构、功能特性及体外抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 53-62.
- [13] 廖坤梅, 白天禾, 陈楚华, 等. 高良姜粗多糖体外降胆固醇效果研究[J]. 农产品加工, 2017(10): 4-6, 17.
- [14] 陈雪, 王雪, 张丽萍. 制备麦胚降胆固醇肽的酶解条件优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2013, 24(6): 46-52.
- [15] 刘健敏, 钟芳, 麻建国. 大豆蛋白酶解产物降胆固醇活性的初步研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005(3): 41-44.

(下转第43页)

- [5] 周洋, 杨文婧, 操丽丽, 等. 生育酚抑制油脂氧化机制研究进展[J]. 中国油脂, 2018,43(8):32-38.
- [6] SHI R, ZHANG Q Y, VRIESEKOO P F, et al. Preparation of organogel with tea polyphenols complex for enhancing the antioxidation properties of edible oil[J]. J Agric Food Chem, 2014,62(33):8379-8384.
- [7] 姚强. 食用油脂中合成抗氧化剂的检测分析研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019,10(15):5104-5110.
- [8] 常馨月, 陈程莉, 龚娣, 等. 天然抗氧化剂抑制油脂氧化的研究进展[J]. 中国油脂, 2020,45(4):46-50.
- [9] 崔国梅, 许方方, 魏书信, 等. 复配天然抗氧化剂对人造肉抗氧化性能的研究[J]. 农产品加工, 2019(18):10-13.
- [10] 周旭. 几种油溶性天然抗氧化剂在核桃油、葡萄籽油中的应用研究[J]. 中国油脂, 2017,42(3):64-68.
- [11] 蔡俊秀. 天然抗氧化剂对食用油氧化稳定性的研究[J]. 福建轻纺, 2014(9):45-50.
- [12] 王军凯. 酶法合成L-抗坏血酸脂肪酸酯及其抗氧化性研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2011.
- [13] 刘冰冰. 脂溶性茶多酚衍生物的合成、表征、生物活性及热力学性质的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2019.
- [14] BAGHDADI M, AHMADI S, FARHOODI M, et al. The effect of high-density polyethylene active packages containing rosemary extract powder on oxidative stability of sunflower oil[J]. J Food Measur Character, 2019,13(4):2910-2920.
- [15] WANG X Q, ZENG Q M, CONTRERAS M D M, et al. Profiling and quantification of phenolic compounds in *Camellia* seed oils: natural tea polyphenols in vegetable oil[J]. Food Res Int, 2017,102:184-194.
- [16] KIM H S, QUON J M, KIM J A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate[J]. Redox Biol, 2014(2):187-195.
- [17] YAN Q, WANG M Y, WU Y H, et al. Tea polyphenol as environmentally friendly dopant and thermal stabilizer for polyaniline[J]. Mat Lett, 2016,170:202-204.
- [18] 汪曙晖, 朱俊向, 张莉, 等. 天然抗氧化剂的抗氧化与促氧化作用[J]. 中国食物与营养, 2016,22(8):68-71.
- [19] RAN L, CHI Y L, HUANG Y, et al. Synergistic antioxidant effect of glutathione and edible phenolic acids and improvement of the activity protection by coencapsulation into chitosan-coated liposomes[J/OL]. LWT-Food Sci Technol, 2020,127:109409[2021-01-06]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109409>.
- [20] SHAHIDI F. 贝雷油脂化学与工艺学:第1卷[M]. 6版. 金青哲, 王兴国, 译. 北京:中国轻工业出版社, 2016.

(上接第31页)

- [16] KOHMURA M, NIO N, ARIYOSHI Y. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of human kappa-casein[J]. J Agric Chem Soc Jpn, 2014, 54(4):1101-1102.
- [17] MARQUES M R, FONTANARI G G, PIMENTA D C, et al. Proteolytic hydrolysis of cowpeaproteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity[J]. Food Res Int, 2015, 77: 43-48.
- [18] 周美含, 郭勇, 魏贞, 等. 榛仁降脂活性肽分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 124-129.
- [19] ZHUANG M Z, ZHAO M M, LIN L Z, et al. Macroporous resin purification of peptides with umami taste from soy sauce[J]. Food Chem, 2016, 190: 338-344.
- [20] 邵素娟. 红松松仁降脂肽的分离及其对脂质代谢的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [21] 张晓梅, 钟芳, 麻建国. 大豆降胆固醇活性肽的初步分离纯化[J]. 食品与机械, 2006(2): 33-37.
- [22] YOSHIKAWA M, FUJITA H, MATOBA N, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases[J]. Bio Factors, 2000, 12(1/2/3/4): 143-146.
- [23] NAGAOKA S, FUTAMURA Y, MIWA K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(1): 11-17.
- [24] MAKINO S, NAKASHIMA H, MINAMI K, et al. Bile acid-binding protein from soybean seed: isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(3): 803-809.
- [25] PARK V V, KOO M S, KASYMOVA T D, et al. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity[J]. Chem Natl Comp, 2005, 41(6): 710-714.
- [26] CHOI S K, ADACHI M, UTSUMI S. Improved bile acid-binding ability of soybean glycinin A1a polypeptide by the introduction of a bile acid-binding peptide (VAWWMY)[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(9): 1980-1983.