

混菌发酵茶籽抗氧化肽的分离纯化及其功能活性研究

赵世光^{1,2}, 储欣颖¹, 黎 玮¹, 张 宇¹, 薛正莲^{1,2}

(1. 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 安徽省工业微生物分子育种工程实验室, 安徽 芜湖 241000)

摘要:为促进茶叶籽资源的深度开发利用,采用不同截留分子质量的超滤膜对混菌发酵茶籽多肽产物进行分级分离,比较茶籽多肽的抗氧化活性与其分子质量的对应关系;利用凝胶过滤色谱技术对茶籽多肽逐级纯化,获得特征性茶籽抗氧化肽,对其二级结构组成及相对含量进行分析,并考察其热稳定性和抗消化稳定性;以H₂O₂诱导小鼠胚胎成纤维细胞(MEF细胞)建立氧化损伤模型,评价茶籽抗氧化肽的细胞氧化损伤保护功能。结果表明:经超滤分级后,茶籽多肽的抗氧化活性与其分子质量呈负相关,分子质量小于1 kDa的TSP4组分具有最高的自由基清除能力;TSP4分子质量分布范围在90~849 Da之间,凝胶过滤色谱纯化得到的TSP4-b亚组分平均分子质量为446 Da,其二级结构中的 β -折叠的相对含量从未发酵茶叶籽的16.59%上升至44.43%, α -螺旋则由未发酵茶叶籽的37.61%降至17.57%;TSP4-b经20~60℃热处理以及模拟胃肠消化后,自由基相对清除率仍可分别保持在90%及80%以上,具备良好的热稳定性及抗消化能力;中(0.5 mg/mL)、高(5.0 mg/mL)剂量的TSP4-b的介入可使H₂O₂诱导的MEF细胞存活率分别达到73.8%、82.4%。综上,所分离的茶籽抗氧化肽具有较强的抗氧化活性,对H₂O₂诱导的细胞损伤具有保护作用,在医药、保健食品等领域具有良好的发展潜力。

关键词:茶籽多肽;分离纯化;功能活性;细胞氧化损伤

中图分类号:TQ929;TS229

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)03-0087-08

Isolation and purification of antioxidant peptide from tea seed by mixed fermentation and its functional properties

ZHAO Shiguang^{1,2}, CHU Xinying¹, LI Wei¹, ZHANG Yu¹, XUE Zhenglian^{1,2}

(1. Biology and Food Engineering College, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000,

Anhui, China; 2. Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology

Molecular Breeding, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: To promote the in-depth development and utilization of tea seed resources, tea seed peptides (TSP) from mixed fermentation were classified by ultrafiltration membranes with different molecular weight cut off. Then the corresponding relationship between antioxidant activity and molecular weight of tea seed peptides was compared. Gel filtration chromatography techniques was used to sequentially purify the TSP to obtain the characterized antioxidant peptide. The composition and content of secondary structure, thermal stability and anti-digestion stability of the antioxidant peptide were studied. The oxidative damage model was established with H₂O₂ induced mouse embryonic fibroblasts (MEF) to evaluate the cellular oxidative damage protection function of tea seed antioxidant peptide. The results

收稿日期:2023-01-16;修回日期:2023-11-27

基金项目:安徽省重大科技专项(202104a06020003);安徽省高校自然科学研究项目(KJ2019A0143);大学生创新创业训练计划项目(S201910363219,202110363061)

作者简介:赵世光(1977),男,副教授,博士,主要从事茶产品深加工及高值化开发研究工作(E-mail) zsgahpu@126.com。

showed that the antioxidant activity of TSP was negatively correlated with their molecular weight and TSP4 with molecular weight less than 1 kDa exhibited the highest radical scavenging capacity. The molecular weight distribution of TSP4 ranged from 90 Da to 849 Da. The average molecular weight of the TSP4-b subcomponent purified by gel filtration chromatography was 446 Da, and the

β -fold in the secondary structure increased from 16.59% of no fermented tea seed to 44.43%, the α -helix decreased from 37.61% of no fermented tea seed to 17.57%. The relative radical scavenging rate of TSP4-b remained above 90% and 80%, respectively after heat treatment at 20-60 °C and simulated gastrointestinal digestion, which showed the excellent thermal stability and anti-digestion ability. After the addition of TSP4-b with medium doses (0.5 mg/mL) and high doses (5.0 mg/mL), the H₂O₂-induced MEF survival rate reached 73.8% and 82.4%, respectively. In conclusion, the isolated antioxidant peptide from tea seed has strong antioxidant activity and protective effect against H₂O₂-induced cellular damage, and has good potential for development in the fields of medicine and health food.

Key words: tea seed polypeptide; separation and purification; functional activity; cellular oxidative damage

我国是茶叶生产大国,现有茶园 168.47 万 hm²,产量按 750 kg/hm²计算,每年潜在茶叶籽资源约 126.4 万 t,茶叶籽资源十分丰富^[1]。目前茶叶籽除少量作为有性繁殖育种外,大量茶叶籽散落茶园腐烂,造成极大的资源浪费。茶叶籽以及榨油后的茶籽粕中富含皂素、多糖、多酚及蛋白质等成分,加强茶叶籽资源利用研究,开发高附加值衍生产品,实现资源的绿色综合利用,是当前研究的热点之一^[2]。研究表明,蛋白质经水解后的小分子多肽产物具有降血糖、抗氧化、降血压等生物活性^[3]。通过微生物发酵、酶法水解等工艺,以多种油料蛋白为原料,已开发出血管紧张素转换酶抑制肽^[4]、核桃清蛋白抗氧化肽^[5]、亚麻籽降胆固醇肽^[6]、辣木籽抗菌肽^[7]等生物活性肽,极大地促进了低值废弃物的高值化利用。

活性氧自由基是机体进行有氧呼吸时自身代谢产生的一类氧化自由基,体内自由基增加可导致机体发生氧化应激反应,进而对蛋白质、核酸和脂质等生物大分子造成损伤,最终可能诱发炎症、阿尔茨海默病等慢性疾病^[8]。植物来源的天然活性抗氧化肽因其来源广、生物安全性高,被广泛用于中和自由基、清除氧化剂以减轻或抑制氧化应激对细胞造成的损伤,在功能性食品和生物医药等领域有着广阔的应用前景^[9]。

课题组以茶叶籽为原料,通过双菌顺序发酵,获得了茶籽多肽的微生物发酵法制备工艺,并初步证实了茶籽多肽的体外抗氧化活性^[10]。基于前期基础,本研究采用超滤分级、凝胶过滤色谱分离等方法,系统考察茶籽多肽产物的分子量分布、二级结构与其抗氧化活性间的构效关联,并筛选高活性茶籽抗氧化肽,研究其热稳定性、抗消化性能以及对 H₂O₂ 诱导的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF 细胞) 氧化损伤的保护作用,以期茶籽多肽在保健食品、生物

医药等领域的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

茶叶籽,采自安徽宣城地区的茶园;灵芝菌 (*Ganoderma lucidum*) UIM-281、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefacien*) PI142,均为本实验室保存菌种;DPPH、ABTS,生工生物工程(上海)股份有限公司;氢氧化钠、无水乙醇等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

ZQZY-78BV 恒温振荡培养箱, Multiskan FC 酶标仪, 8050 型超滤装置, IRPrestige-21 傅里叶变换红外光谱仪, AKTA Prime Plus 快速低压液相色谱系统, LC-2030 液相色谱仪。

1.2 实验方法

1.2.1 混菌发酵法制备茶籽多肽

采用灵芝菌 UIM-281 与解淀粉芽孢杆菌 PI142 进行混菌两段液体发酵制备茶籽多肽^[10]。发酵工艺:茶叶籽 75.23 g/L、葡萄糖 4.0 g/L、UIM-281 接种量 1%、初始发酵 pH 9.2,发酵 24 h 后,接种 PI142,接种量 0.5%,继续发酵 24 h,两段发酵温度恒定 40 °C、摇床转速 120 r/min。发酵液中加入 2 倍体积无水乙醇,静置沉淀 12 h 后,于 7 100 × g 离心 10 min,取上清液(茶籽多肽发酵液),经 -20 °C 冻结后,置于冻干机中进行冷冻干燥(冷阱温度 -80 °C,冻干时间 20 h),得到茶籽多肽冻干粉。

同时,按照上述方法在不添加菌种条件下制备未发酵茶籽冻干粉(TS)。

1.2.2 茶籽多肽超滤分级

取茶籽多肽发酵液,以截留分子量(MWCO)分别为 30、5、1 kDa 的超滤膜对茶籽多肽进行分级,获得 4 种组分:TSP1 (> 30 kDa)、TSP2 (5 ~ 30 kDa)、TSP3 (1 ~ 5 kDa)、TSP4 (< 1 kDa)。冷冻干燥

后用去离子水复溶,待测。

1.2.3 茶籽多肽体外抗氧化活性测定

自由基清除率测定参照王婕娉等^[11]的方法并稍作修改。将200 μL不同质量浓度的茶籽多肽溶液分别与800 μL ABTS溶液、400 μL DPPH溶液、300 μL水杨酸-硫酸亚铁-H₂O₂溶液充分混匀,静置反应后,分别在734 nm(ABTS)、517 nm(DPPH)、510 nm(·OH)处测定吸光值,按公式(1)计算自由基清除率(Y)。

$$Y = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:A₀为空白对照组(以去离子水替代多肽样品)的吸光值;A₁为样品组(添加多肽样品)的吸光值;A₂为本底对照组(以去离子水替代各测试溶液)的吸光值。

以样品质量浓度对DPPH、ABTS和羟自由基清除率做回归方程,计算IC₅₀。同时以TS和V_c的IC₅₀作为对照。

1.2.4 茶籽多肽的凝胶过滤色谱分离纯化及分子量分布的测定

将超滤所得抗氧化活性最强的组分配制成10 mg/mL的溶液,吸取1.5 mL上样于预先以去离子水平衡的Smartdex G-10凝胶色谱柱(16 mm × 700 mm),以去离子水为洗脱剂进行常温洗脱,流速1.0 mL/min,检测波长220 nm,每5 min收集一管,分步收集出峰组分,得到茶籽多肽亚组分。

以辅酶I(MW 663.45)、Gly-Gly-Tyr-Arg(MW 451.48)、酪氨酸(MW 181.19)为标准物质,用去离子水配制成质量浓度为1 mg/mL的标准分子量混合溶液,按上述Smartdex G-10凝胶色谱条件进行上样、洗脱,记录相应保留时间,绘制标准相对分子量洗脱曲线,回归方程为 $y = -0.0086x + 3.2473$ (y 为lg(相对分子量), x 为保留时间, $R^2 = 0.9973$),参照标准洗脱曲线推测出分子量分布范围,计算各峰值对应的分子量,并按峰面积归一化计算各组分相对含量。

1.2.5 茶籽抗氧化肽纯度的测定

采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对凝胶过滤色谱分离得到的抗氧化活性最强的茶籽多肽亚组分(抗氧化肽)纯度进行测定。色谱条件:C18分析柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),洗脱液为体积分数10%的乙腈溶液,进样量10 μL,流速0.5 mL/min,紫外检测波长220 nm。

1.2.6 茶籽多肽红外光谱表征

分别取0.1 g TS和茶籽抗氧化肽,在红外灯下

加入烘干后的KBr固体,充分混合研磨后压片,采用傅里叶变换红外光谱仪在400~4 000 cm⁻¹范围内进行扫描,并采用PeakFit软件对红外光谱图的酰胺I带(1 600~1 700 cm⁻¹)进行曲线拟合,计算各二级结构的含量。

1.2.7 茶籽抗氧化肽稳定性研究

1.2.7.1 热稳定性

将质量浓度为0.1 mg/mL的抗氧化肽溶液分别置于20、40、60、80、100℃下保持2 h,待冷却至室温后,按1.2.3的方法测定其自由基清除率,并以20℃下的自由基清除率为100%,计算自由基相对清除率,评估其热稳定性。

1.2.7.2 抗消化稳定性

采用体外模拟胃肠消化实验评估其抗消化稳定性。胃消化:将TSP4-b配制成0.1 mg/mL的溶液,在pH 2、37℃条件下预热5 min,加入3%的胃蛋白酶混匀,在37℃消化3 h后,测定自由基清除率,以未消化的TSP4-b自由基清除率为100%,计算其自由基相对清除率。胃肠消化:将上述经胃蛋白酶消化后的产物调节pH至6.8,加入3%的胰蛋白酶混匀,在37℃继续消化3 h后,采用上述方法计算其自由基相对清除率。

1.2.8 茶籽抗氧化肽对小鼠胚胎成纤维细胞(MEF细胞)的损伤保护作用分析

1.2.8.1 茶籽抗氧化肽对MEF细胞的毒性检测

取对数期的MEF细胞消化后,配制成 5×10^4 个/mL的细胞悬液。在96孔板中,对照组与样品组分别加入100 μL细胞悬液,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养12 h至细胞贴壁。对照组加入10 μL的培养基,样品组每孔加入10 μL不同质量浓度(0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0 mg/mL)的茶籽抗氧化肽,继续培养12 h,采用CCK-8细胞增殖试剂盒测定细胞存活率,比较不同质量浓度茶籽抗氧化肽对MEF细胞的毒性。

1.2.8.2 H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤模型的建立

在96孔板中,按1.2.8.1方法培养MEF细胞24 h,添加不同浓度梯度(0、25、50、100、200、400、600、800 μmol/L)的H₂O₂对MEF细胞诱导30 min,测定细胞存活率,选取细胞存活率接近50%的H₂O₂浓度作为最适浓度,构建诱导MEF细胞氧化损伤模型。

1.2.8.3 茶籽抗氧化肽对H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤的保护作用

按1.2.8.1方法配制MEF细胞悬液。在96孔

板中,设置空白组,损伤组及茶籽抗氧化肽低、中、高剂量组(每组设6个复孔),每组加入100 μL 细胞悬液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养12 h后,空白组、损伤组分别加入10 μL 培养基,剂量组分别加入10 μL 质量浓度为0.05、0.5、5.0 mg/mL 的茶籽抗氧化肽,继续培养12 h后,空白组加入10 μL 培养基,损伤组和剂量组分别加入10 μL 浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 溶液,继续诱导30 min后,测定细胞存活率。

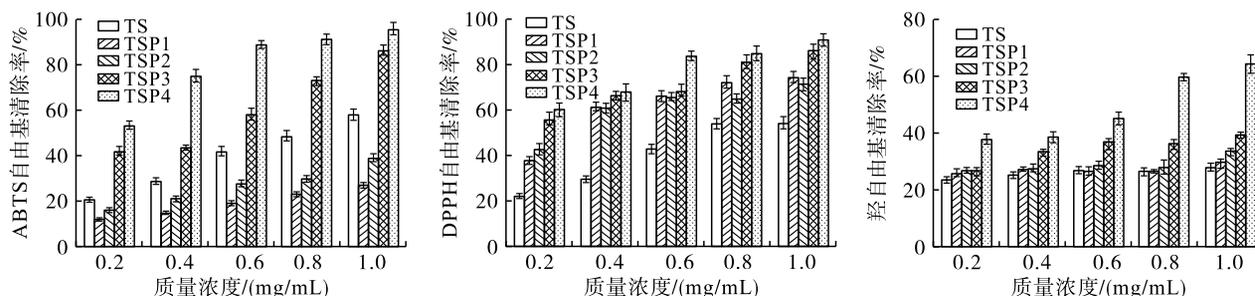


图1 茶籽多肽不同组分的自由基清除活性

由图1可知,茶籽多肽各组分的抗氧化能力整体上对浓度呈现依赖性,随质量浓度的增加其ABTS、DPPH、羟自由基清除能力均逐渐提高。各组分的DPPH、羟自由基清除率均高于TS。随着多肽分子质量的减小,自由基清除能力逐渐提升,即低分

1.2.9 数据统计与分析

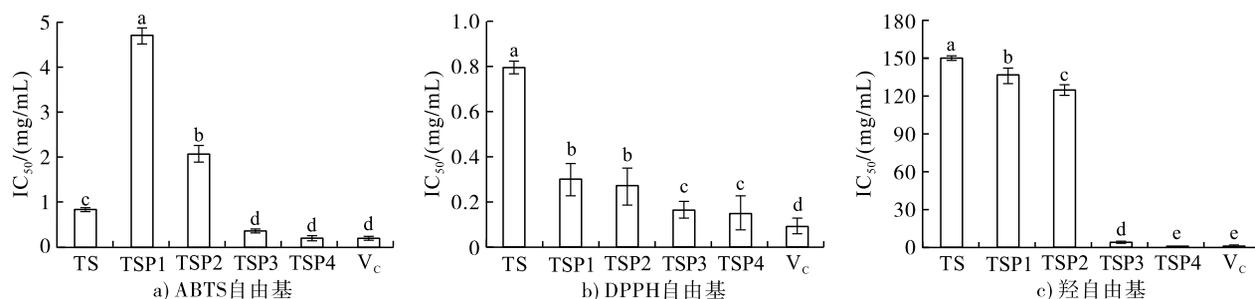
利用GraphPad prime 9.0和OriginPro 2019b进行图表绘制和数据分析, $p < 0.05$ 表示达到显著性差异水平,不同字母代表差异显著;红外光谱图采用PeakFit v4.12分峰拟合。

2 结果与讨论

2.1 超滤分级茶籽多肽的抗氧化活性

茶籽多肽发酵液经不同截留分子质量超滤膜分级后,各组分自由基清除活性如图1所示。

子质量多肽的自由基清除能力强于高分子质量多肽。以TSP4的自由基清除率最高,1.0 mg/mL 质量浓度下其ABTS、DPPH和羟自由基清除率分别达到95.4%、95.1%、64.6%。茶籽多肽各组分自由基清除率的 IC_{50} 如图2所示。



注:同一指标下,不同小写字母表示具有显著差异($p < 0.05$)。下同

图2 茶籽多肽不同组分自由基清除率的 IC_{50}

由图2可知,随着多肽分子质量的减小,对应的 IC_{50} 逐渐减小,分子质量小于5 kDa组分的抗氧化能力与大分子质量组分存在显著差异($p < 0.05$),说明具备抗氧化能力的多肽主要存在于小分子质量肽段。其中,TSP3、TSP4对ABTS自由基清除的 IC_{50} ,以及TSP4对羟自由基清除的 IC_{50} 均达到 V_c 的抗氧化能力水平($p > 0.05$)。

综上,不同分子质量茶籽多肽的抗氧化活性与其分子质量大小呈现宏观负相关,以TSP4具有最高的自由基清除能力。有研究显示,蛋白质水解后的色氨酸残基能有效减缓自由基链式反应^[12],同时苯丙氨酸等疏水性氨基酸残基也有利于羟自由基清除活性发挥^[13],推测TSP4中含有上述两类氨基酸组成,赋予其高抗氧化活性。

2.2 TSP4分子质量分布

使用凝胶过滤色谱对TSP4组分进一步分离纯化,得到TSP4-a、TSP4-b、TSP4-c、TSP4-d种洗脱组分(图3)。根据标准曲线回归方程计算的各洗脱组分分子质量分布如表1所示。

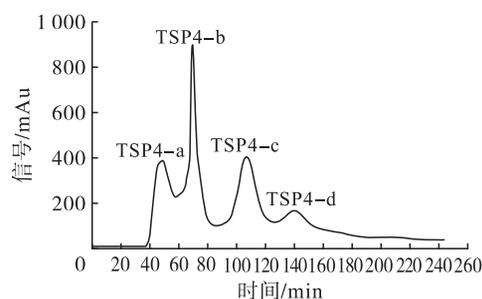


图3 TSP4亚组分洗脱曲线

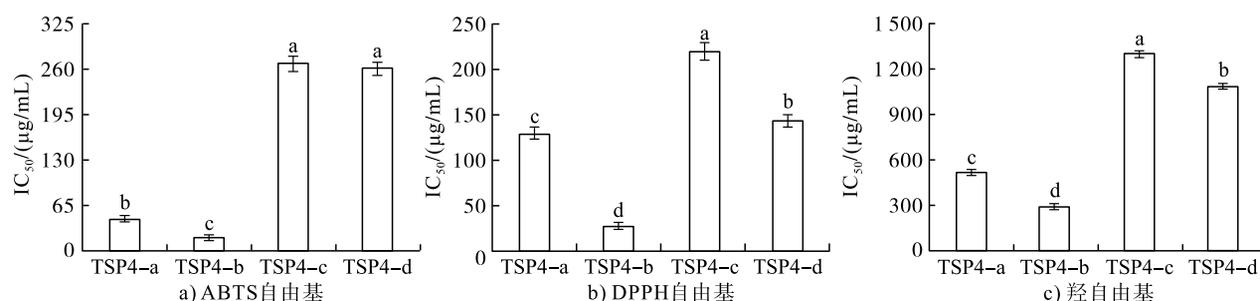
表1 TSP4 分子质量分布

亚组分	始/末时间/min	保留时间/min	分子质量范围/Da	平均分子质量/Da	含量/%
TSP4 - a	37/55	48.5	595 ~ 849	676	16.7
TSP4 - b	60/85	69.5	328 ~ 539	446	28.2
TSP4 - c	90/120	107.0	164 ~ 297	212	25.7
TSP4 - d	130/150	141.0	90 ~ 134	108	12.5

由表1可知,TSP4中的多肽分子质量以164~849 Da之间为主,占70.6%,其中TSP4-a、TSP4-b、TSP4-c的保留时间对应的平均分子质量分别为676、446、212 Da。

2.3 TSP4 亚组分的抗氧化活性

TSP4亚组分对ABTS、DPPH和羟自由基清除的 IC_{50} 如图4所示。

图4 TSP4 亚组分的 IC_{50}

由图4可知,除TSP4-c和TSP4-d对ABTS自由基清除的 IC_{50} 无显著差异外,其他TSP4亚组分对ABTS、DPPH和羟自由基清除的 IC_{50} 均存在显著差异。TSP4-c、TSP4-d较TSP4-a、TSP4-b的分子质量更小,但其抗氧化活性却更弱;TSP4-b的分子质量居中,具有最强的抗氧化活性,其对应的 IC_{50} 分别为17.64 µg/mL(ABTS自由基)、28.54 µg/mL(DPPH自由基)和292.9 µg/mL(羟自由基)。以上结果表明,茶籽多肽的抗氧化能力宏观上表现为小分子质量肽段的抗氧化能力更强(图2),但图4呈现出的抗氧化活性与多肽分子质量大小并无规律性关联,其原因可能是相较于分子质量,肽段的特定氨基酸序列更能对其功能活性起主导作用,这一现象在小麦胚芽肽中也同样存在^[14]。

2.4 TSP4 - b 的纯度

TSP4-b组分经分析型RP-HPLC分离后,呈现一个单峰(图5),纯度上能满足后续光谱表征及功能测定所需。

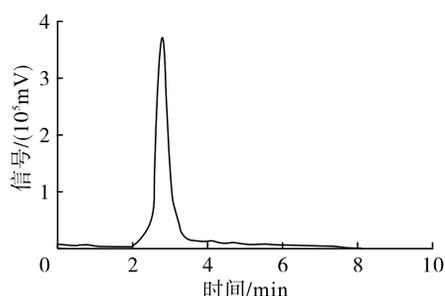


图5 TSP4 - b 的 RP-HPLC 洗脱曲线

2.5 TSP4 - b 的红外光谱表征

蛋白质、多肽等具有特定结构的生物大分子,其特征性二级结构信息常用酰胺I带来解析。TS和TSP4-b的红外光谱图如图6所示。

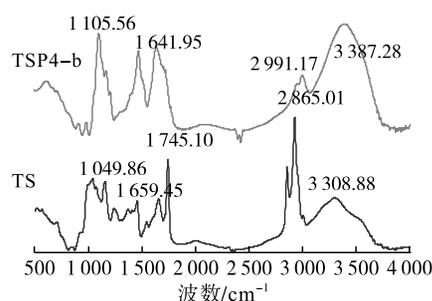


图6 TS 和 TSP4 - b 的红外光谱图

由图6可知,TS和TSP4-b的红外光谱图在酰胺I带(1600~1700 cm⁻¹)均有明显的吸收峰,选取此波段采用PeakFit软件进行曲线拟合,得到酰胺I带图谱(图7)。通过各拟合峰值面积,进行二级结构成分分析,得到TS和TSP4-b二级结构组成及相对含量见表2。由表2可知,TS与TSP4-b的二级结构相对含量存在显著差异,TS经发酵超滤分级及凝胶过滤色谱分离纯化,使β-折叠相对含量从16.59%上升至44.43%,α-螺旋则由37.61%下降至17.57%,无规卷曲、β-转角也均有一定程度下降。王岸娜等^[15]研究发现高含量的β-折叠结构能提高猕猴桃糖蛋白的自由基清除能力,Jiang^[16]、Liang^[17]等研究表明,多肽的α-螺旋、无

规卷曲结构与其抗氧化能力呈负相关。TSP4-b 结构中高比例 β -折叠结构及低比例 α -螺旋结构是其比 TS 具备更高抗氧化活性的原因之一,这可能是因为高 β -折叠、低 α -螺旋二级结构更趋向于展开,从而更易暴露活性位点,提升抗氧化活性。

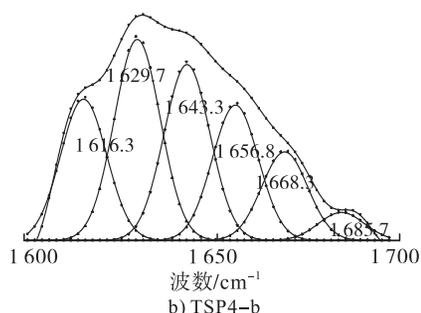
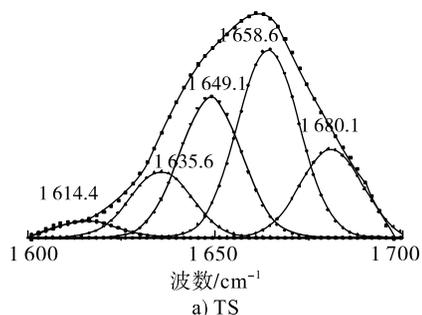


图7 TS 和 TSP4-b 酰胺 I 带图谱

表2 酰胺 I 带拟合 TS 和 TSP4-b 二级结构组成及相对含量 %

样品	β -折叠	无规卷曲	α -螺旋	β -转角
TS	16.59	28.16	37.61	17.65
TSP4-b	44.43	22.84	17.57	15.15

2.6 TSP4-b 的稳定性

2.6.1 热稳定性

不同温度下 TSP4-b 的自由基相对清除率如图 8 所示。

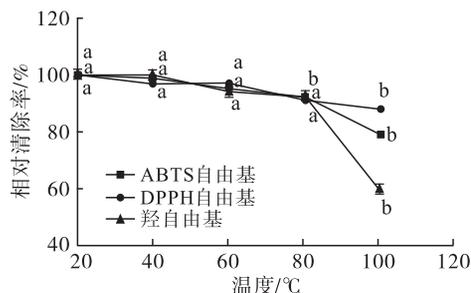


图8 不同温度下 TSP4-b 的自由基相对清除率

由图 8 可知,TSP4-b 经不同温度处理后,在 20 ~ 60 °C 范围内,其 ABTS、DPPH、羟自由基相对清除率均能保持在 90% 以上,呈现出良好的热稳定性。温度高于 80 °C 后,尤其是经 100 °C 处理后,TSP4-b 的自由基相对清除率显著下降。这是高温导致肽段降解失去了部分特征性氨基酸序列以及多肽在高温条

件下变性失活^[18]所致。

2.6.2 抗消化稳定性

TSP4-b 体外模拟胃肠消化结果如图 9 所示。

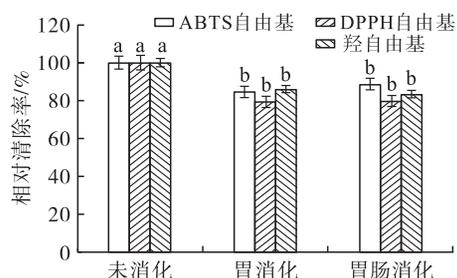


图9 不同消化方式下 TSP4-b 的自由基相对清除率

由图 9 可知,经胃蛋白酶单独消化及胃蛋白酶-胰蛋白酶顺序消化后,TSP4-b 的自由基相对清除率均呈现不同程度的下降,表明胃肠消化可降低 TSP4-b 的抗氧化活性。模拟胃液的酸性极端环境下,TSP4-b 部分变性及因胃蛋白酶水解失去部分特征性氨基酸可能使其抗氧化活性减弱。但经消化后,TSP4-b 的 3 种自由基相对清除率仍能保持 80% 以上,表明 TSP4-b 在胃肠内有潜在的良好抗消化性能。胃蛋白酶消化对 TSP4-b 的自由基相对清除率影响显著,胰蛋白酶的二次消化并未显著降低 TSP4-b 的自由基清除活性($p > 0.05$),表明 TSP4-b 中含有被胃蛋白酶识别的芳香族氨基酸或酸性氨基酸肽键,而相对缺少胰蛋白酶水解的特征性位点。来源于茶渣蛋白的肽段同样具有类似的胃肠消化抵抗性^[19]。

2.7 TSP4-b 对 MEF 细胞氧化损伤的保护作用

2.7.1 TSP4-b 对 MEF 细胞毒性作用

TSP4-b 对 MEF 细胞存活率的影响如图 10 所示。

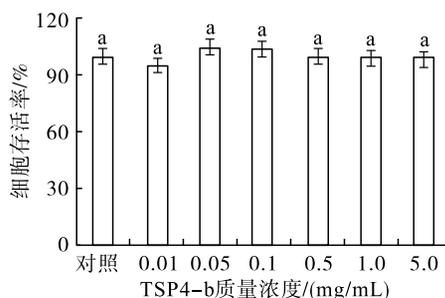


图10 TSP4-b 对 MEF 细胞存活率的影响

由图 10 可知,TSP4-b 在 0.01 ~ 5.0 mg/mL 范围内,各组细胞存活率均在 95% 以上,与对照组没有显著差异($p > 0.05$),表明在该质量浓度范围内 TSP4-b 对 MEF 细胞没有毒性作用,可以选取低(0.05 mg/mL)、中(0.5 mg/mL)、高(5.0 mg/mL)3 个剂量组的 TSP4-b 开展 H_2O_2 诱导细胞损伤保护

作用研究。

2.7.2 H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤模型建立

H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤如图11所示。

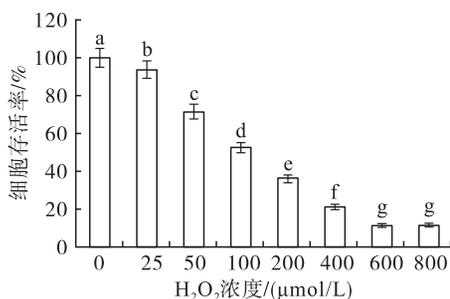


图11 H₂O₂对MEF细胞存活率的影响

由图11可知,细胞存活率与H₂O₂浓度呈现明显的负相关性,随着H₂O₂浓度递增,MEF细胞存活率迅速下降,H₂O₂浓度为100 μmol/L时,细胞存活率为(52.3 ± 1.3)%,与空白组(H₂O₂浓度0 μmol/L)存在显著差异($p < 0.05$),该浓度下的细胞既能满足损伤的需要,同时又具有一定的活性。因此,选择100 μmol/L H₂O₂构建诱导MEF细胞氧化损伤模型。

2.7.3 TSP4-b对H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤的保护作用

TSP4-b对H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤的保护作用如图12所示。

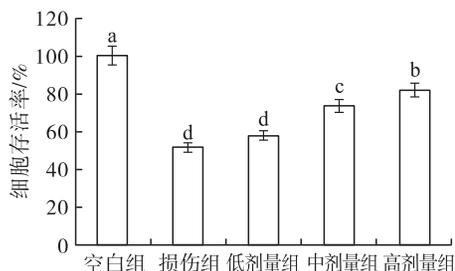


图12 TSP4-b对MEF细胞氧化损伤的保护作用

由图12可知:与空白组相比,损伤组细胞存活率显著下降($p < 0.05$),为51.8%;加入TSP4-b后,各剂量组细胞存活率则相应增加,呈现一定的TSP4-b质量浓度正相关性,低剂量组的细胞存活率提升效果不显著($p > 0.05$),但中、高剂量组的细胞存活率分别达到73.8%、82.4%,显著高于损伤组($p < 0.05$)。以上结果表明,TSP4-b的介入可有效保护MEF细胞,修复H₂O₂诱导的MEF细胞氧化损伤。Jiang等^[16]研究发现,低含量α-螺旋、无规卷曲结构更有利于玉米多肽抗氧化性的发挥,本研究中相对于TS,TSP4-b二级结构组成中的α-螺旋、无规卷曲结构比例均下降(表2),可能是对细胞氧化损伤起到保护作用的重要原因之一。

3 结论

采用超滤分级结合凝胶过滤色谱分离法从茶籽多肽发酵液中纯化得到茶籽抗氧化肽,并研究其抗氧化活性、稳定性及对MEF细胞氧化损伤的保护作用,主要结论如下:

(1)发酵产物经超滤分级后,各组分的抗氧化活性与其分子质量大小呈负相关,分子质量小于1 kDa的TSP4组分具有最高的自由基清除能力。TSP4组分分子质量分布范围在90~849 Da之间,经凝胶过滤色谱纯化后获得了特征性茶籽抗氧化肽TSP4-b,其平均分子质量为446 Da。

(2)TSP4-6经20~60℃热处理后,自由基相对清除率保持在90%以上,经模拟胃肠消化后,其自由基相对清除率可保持在80%以上,显示出良好的热稳定性及抗消化能力;TSP4-b二级结构中高含量的β-折叠及低含量的α-螺旋是其具备高抗氧化活性的原因之一。

(3)TSP4-b具有H₂O₂诱导的细胞损伤保护功能,中(0.5 mg/mL)、高(5.0 mg/mL)剂量TSP4-b介入可使MEF细胞存活率分别达到73.8%、82.4%。

参考文献:

- [1] 全国茶园面积168.47万公顷[J]. 中国茶叶加工,2021(3): 79.
- [2] 罗佳佳,江子涵,黄智爱,等. 茶粕(茶麸或茶籽)资源化现状及发展[J]. 广州化工,2021,49(8): 26-27.
- [3] CRUZ-CASAS D E, AGUILAR C N, ASCACIO-VALDÉS J A, et al. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides[J/OL]. Food Chem, 2021, 3: 100047[2023-01-16]. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>.
- [4] 芦鑫,游静,金璐,等. 活性炭与树脂脱苦芝麻ACE抑制肽的性能比较[J/OL]. 中国油脂,2023: 1-13[2023-01-16]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220722>.
- [5] 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.
- [6] 李雪馨,郑睿,袁兴宇,等. 降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽的分离纯化及结构鉴定[J]. 中国油脂,2021,46(12): 26-31,43.
- [7] 宋贤娟,鲁媛媛,王雪峰,等. 不同储存、加工条件下辣木籽抗菌肽的抑菌稳定性[J]. 中国油脂,2023,48(5): 35-38.
- [8] 张羽,汪芳,翁泽斌,等. 麦胚清蛋白抗氧化肽的筛选及对细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品科学,2021,42(17): 10-18.

(下转第110页)

- 抑制肽大米蛋白水解物的脱苦评价[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 24-28.
- [19] XU B, CHUNG H Y. Quantitative structure; Activity relationship study of bitter di-, tri- and tetrapeptides using integrated descriptors[J/OL]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2846[2022-10-28]. <https://doi.org/10.3390/molecules24152846>.
- [20] SOLTANI S, HAGHAEI H, SHAYANFAR A, et al. QSBR study of bitter taste of peptides: Application of GA-PLS in combination with MLR, SVM, and ANN approaches [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 501310[2022-10-28]. <https://doi.org/10.1155/2013/501310>.
- [21] 杨敏, 张天锡, 史磊, 等. 大孔吸附树脂分离纯化中药成分影响因素探讨[J]. 中草药, 2020, 51(15): 4050-4058.
- [22] 陈兴都, 翟丹云, 杨晓丽, 等. 菊苣菊粉的大孔树脂脱苦工艺研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(4): 132-136.
- [23] 唐辉, 肖仔君, 钟瑞敏, 等. 大孔树脂对长坝柚汁脱苦工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 276-280.
- [24] 刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [25] 杨柳, 彭辉, 叶明. 活性炭和仲丁醇对牛乳蛋白水解液的脱苦效果研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 116-118.
- [26] 隋玉杰, 何慧, 王进, 等. 玉米醒酒肽的脱苦及其对活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(5): 44-48.
- [27] 付光中, 章超桦, 吉宏武, 等. 虾头自溶产物苦味与蛋白平均疏水度的联系及脱苦[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 121-123.
- [28] 赵利, 李雁群, 余世望, 等. 乳蛋白质水解液脱苦方法研究[J]. 天然产物研究与开发, 1998(4): 72-75.
- [29] 贺斯佳, 张硕, 孙昊, 等. 活性炭吸附饮用水中三卤甲烷的实验研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2022, 49(4): 489-497.
- [30] 魏芳, 周祥山, 田守生, 等. 4种大孔吸附树脂对阿胶低聚肽的脱苦效果研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(13): 1-6.
- [31] 苗晓丹, 刘源, 仇春泱, 等. 呈味肽构效关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(6): 357-362.
- [32] SINGH N, PYDI S P, UPADHYAYA J, et al. Structural basis of activation of bitter taste receptor T2R1 and comparison with class A G-protein-coupled receptors (GPCRs)[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(41): 36032-36041.
- [33] ABDELHEDI O, NASRI M. Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: Production, structure-activity relationship and bioavailability[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 88: 543-557.
- [34] TU M L, CHENG S Z, LU W H, et al. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions[J]. *Trac-trend Anal Chem*, 2018, 105: 7-17.
- [35] SAADI S, SAARI N, ANWAR F, et al. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(1): 80-116.
-
- (上接第93页)
- [9] YI F, WU K, YU G, et al. Preparation of Pickering emulsion based on soy protein isolate-gallic acid with outstanding antioxidation and antimicrobial [J/OL]. *Colloids Surf B*, 2021, 206: 111954[2023-01-16]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111954>.
- [10] 赵世光, 谢东宝, 储欣颖, 等. 混菌发酵制备茶籽多肽及其抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(6): 147-153.
- [11] 王婕婷, 刘睿, 丁士勇, 等. 响应面优化混菌发酵蜂王幼虫制备抗氧化肽及其结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(6): 210-217.
- [12] 张新昌, 刘芳, 宋亚蕊, 等. 茶籽蛋白的营养价值评价[J]. 中国油脂, 2013, 38(2): 45-47.
- [13] HU X M, WANG Y M, ZHAO Y Q, et al. Antioxidant peptides from the protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle: Purification, identification, and cytoprotective function on HepG2 cells damage by H₂O₂ [J/OL]. *Mar Drugs*, 2020, 18(3): 153[2023-01-16]. <https://doi.org/10.3390/md18030153>.
- [14] 林童, 张旭, 周灯银, 等. 小麦胚芽肽的制备及抗氧化活性分析[J]. 食品工业, 2021, 42(8): 47-52.
- [15] 王岸娜, 苏子豪, 吴立根, 等. O-糖链对猕猴桃糖蛋白抗氧化能力及构象的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(2): 79-85.
- [16] JIANG Y, ZHANG M, LIN S, et al. Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins[J]. *Food Res Int*, 2018, 105: 836-844.
- [17] LIANG R, ZHANG Z, LIN S. Effects of pulsed electric field on intracellular antioxidant activity and antioxidant enzyme regulating capacities of pine nut (*Pinus koraiensis*) peptide QDHCH in HepG2 cells[J]. *Food Chem*, 2017, 237: 793-802.
- [18] 王玉梅, 张晶, 谢慧慧, 等. 菜籽多肽稳定性及RP-HPLC分离制备高抗氧化活性(ORAC)组分研究[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(5): 36-39.
- [19] 王南南, 王靖蕊, 李璐, 等. 茶渣蛋白抗氧化肽制备及其活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 145-152.