

泥鳅抗氧化活性肽的制备、鉴定及其生物活性

窦宝杰^{1,2}, 翁南海^{1,2}, 卢静^{1,2}, 郭全友³, 吕明生^{1,2*}, 王淑军^{1,2}

¹江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏连云港 222005

²江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏连云港 222005

³中国水产科学院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 泥鳅是亚洲常见的淡水鱼,具有较高的营养和药用价值。本研究采用短小芽孢杆菌 4SP5 分泌的蛋白酶水解泥鳅肉糜,超滤获得不同分子质量的水解产物。其中,分子质量小于 5 ku 的组分的抗氧化活性最强。经 G25 色谱过滤纯化,LC-MS/MS 测序和鉴定过滤组分,获得 6 种潜在的生物活性肽。其中寡肽 AFRVPTP 具有良好的 DPPH 自由基清除活性(IC₅₀ 37 μg/mL)、羟自由基清除活性、超氧阴离子清除活性(IC₅₀ 0.73 mg/mL)。此外,该寡肽还具有抑制 α-葡萄糖苷酶的作用,IC₅₀ 为 15.86 mg/mL。经在线预测,该寡肽无毒性 and 致敏性。分子对接结果表明,AFRVPTP 通过与 α-葡萄糖苷酶催化域的关键氨基酸结合而发挥作用,其可与 Keap1 活性口袋中的关键氨基酸残基(Asn387、Arg415、Tyr334、Arg380、Gln530、Tyr525、Arg483 和 Ser508)相互作用,表明该寡肽具有调节体内抗氧化作用的潜力。研究结果为泥鳅的精深加工提供参考依据。

关键词 泥鳅; 生物活性肽; 抗氧化; α-葡萄糖苷酶抑制; 分子对接

文章编号 1009-7848(2024)05-0223-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.018

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)广泛分布于中国、韩国、日本等东亚地区,是一种常见的淡水鱼^[1]。泥鳅富含优质蛋白质、透明质酸、多糖、维生素、矿物质和必需氨基酸等,具有极高的营养价值和药用价值,被称为“水中人参”^[2-3]。泥鳅脂肪和胆固醇含量低,属高蛋白、低脂肪食品,是潜在的优质动物蛋白资源^[2]。目前,市场上泥鳅加工产品仍以直接加工为主,如泥鳅干、麻辣泥鳅、泥鳅粉等^[4]。随着泥鳅产量的逐年提高,其进一步精深加工技术和应用亟需研究。

抗氧化剂可以防止或减少机体代谢产生的自由基和活性氧(ROS),从而减少其对 DNA、蛋白质和脂类等生物大分子的损伤^[5]。活性肽被确定为优质的抗氧化剂和降血糖分子,已从不同来源的蛋白质水解产物中分离和鉴定^[6-7]。动、植物和微生物来源的蛋白酶可用于水解蛋白质并获得抗氧化活性肽^[8]。微生物产的蛋白酶具有易于制备、低成本、

酶学性质多样化等特点^[9]。水产品蛋白资源丰富、营养高、氨基酸组成合理,是重要的功能性食品原料,具有深加工的潜力^[10]。

本试验对泥鳅蛋白进行酶解,选用从海洋泥样中筛选的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)4SP5 发酵产生的碱性蛋白酶,对酶解产物进行分离,检测产物的抗氧化活性。经 G25 凝胶分离纯化,对产物进行鉴定。研究寡肽的抗氧化活性和 α-葡萄糖苷酶抑制活性。通过分子对接研究寡肽的作用机制。研究结果为泥鳅的精深加工及其开发应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泥鳅,连云港金水湾食品有限公司;菌株短小芽孢杆菌 4SP5,江苏省海洋生物资源与环境重点实验室保藏;α-葡萄糖苷酶、对硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷,美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Multiskan FC 全波长酶标仪,美国 Thermo fisher 公司;Eppendorf 高速冷冻离心机,艾本德中国有限公司;ALPH4 真空冷冻干燥机,江苏海企国标有限公司;DK-8D 恒温水浴锅,上海一恒科学。

收稿日期: 2023-05-28

基金项目: 江苏省连云港市 521 项目(LYG06521202107);
江苏省海洋资源与环境重点实验室基金项目
(SH20201204)

第一作者: 窦宝杰,男,硕士生

通信作者: 吕明生 E-mail: msllyu@jou.edu.cn

1.3 方法

1.3.1 蛋白酶的制备 产蛋白酶菌株短小芽孢杆菌 4SP5 接种 2216E 培养基上,30 ℃、200 r/min 培养 12 h,然后按 5%接种量接种到产酶培养基(鱼粉蛋白胨 1 g/L、牛肉粉 5 g/L、NaCl 5 g/L、干酪素 20 g/L)中,30 ℃、200 r/min 培养 30 h,发酵液在 5 000×g、4 ℃下离心 30 min,上清液经 8 ku 超滤管浓缩后为粗酶,冻干备用。

1.3.2 泥鳅肉糜的酶解 泥鳅带骨均质,以 600 U/g 泥鳅肉糜的添加量加入蛋白酶,加入去离子水使泥鳅肉与水的质量比为 1:20,50 ℃、pH 8.0 条件下酶解 24 h。然后,将水解产物在沸水浴中加热 15 min 使酶失活。将样品在 5 000×g、4 ℃下离心 30 min,离心上清液过滤后备用^[11]。

1.3.3 酶解产物的纯化

1.3.3.1 超滤 泥鳅水解液的上清液(Supernatant of loach, SL)分别通过分子质量(M_w)为 10 ku 和 5 ku 的膜进行超滤,并收集每个膜的截留和渗透溶液。得到 3 个不同分子质量的组分溶液,即超滤组分-1(SL-1,小于 5 ku)、超滤组分-2(SL-2,5~10 ku)和超滤组分-3(SL-3,大于 10 ku),并将 3 个组分冻干^[12]备用。

1.3.3.2 G25 色谱纯化 采用 Sephadex G-25 分子排阻柱进一步纯化。柱子的空隙体积为 15 mL。SL-1 (50 mg/mL)用 0.22 μm 滤膜过滤后装入柱中,用去离子水进行平衡。洗脱流速为 1.5 mL/min,收集 300 个组分。在 280 nm 下测量每个组分的吸光度。在 0.35 mg/mL 的质量浓度下,测量每个吸收峰的羟自由基清除活性^[13]。

1.3.4 多肽的鉴定 收集羟自由基清除率最高的组分,测定多肽序列:先对样品进行还原烷基化处理,再进行 LC-MS/MS 分析,得到原始质谱结果的原始文件,通过软件 Byonic 数据库进行搜索和分析,以匹配结果。

1.3.5 多肽的物理化学性质预测 计算机技术可以预测生物活性肽的性质^[14-15]。计算机在线工具可以预测肽的等电点、亲水平均指数、不稳定性(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)、pH 值为 7 时的净电荷(<https://pepcalc.com/>)、潜在毒性(<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>)与致敏性(<http://www.ddg-pharmfac.net/>)。

AllergenFP/)

1.3.6 多肽的合成 多肽由武汉丹港生物科技有限公司采用固相法合成。用 HPLC 对合成的多肽进行纯化。用 LC-MS 测定纯化后的多肽的纯度和质量,确认每个合成的多肽的纯度都在 98%以上。

1.3.7 抗氧化活性的测定

1.3.7.1 DPPH 自由基清除作用 采用陈敏等^[16]的方法略有改动,将样品稀释成不同浓度梯度,将 0.2 mL 样品与 0.2 mL 的 DPPH (0.1 mmol/L)依次加入,置于暗处,30 min 后测量 OD_{517nm} 值。计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = [1 - (A_x - A_{x_0})/X] \times 100 \quad (1)$$

式中, A_x ——DPPH 与样品反应的吸光度; A_{x_0} ——乙醇与样品反应的吸光度; X ——DPPH 与水的吸光度。

1.3.7.2 羟自由基清除作用 采用唐裕芳等^[17]的方法略有改动,将样品稀释成不同浓度梯度,将 0.1 mL 样品,0.1 mL 9 mmol/L FeSO₄,0.1 mL 9 mmol/L 水杨酸(无水乙醇溶液),0.1 mL H₂O₂ 混合,37 ℃水浴 15 min,测量 OD_{510nm} 值。计算公式如下:

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - (A_y - A_{y_0})/Y] \times 100 \quad (2)$$

式中, A_y ——样品的吸光度; A_{y_0} ——空白试剂的吸光度; Y ——不含样品的对照的吸光度。

1.3.7.3 超氧阴离子清除活性的测定 采用 Zhang 等^[18]的方法,将样品稀释成不同浓度梯度,将 0.2 mL M1 与 1 mL Tris-HCl (50 mmol/L)混合,25 ℃温育 10 min,立即加入 30 μL 邻苯三酚(6 mmol/L),室温放置 30 min,测量 OD_{320nm} 值。计算公式如下:

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = [1 - (A_z - A_{z_0})/Z] \times 100 \quad (3)$$

式中, A_z ——样品+Tris-HCl+邻苯三酚的吸光度; A_{z_0} ——样品+Tris-HCl+HCl 的吸光度; Z ——水+Tris-HCl+邻苯三酚的吸光度。

1.3.7.4 还原力的测定 参考 Zhang 等^[18]的方法略有修改,将样品稀释成不同浓度梯度,0.2 mL 样品,0.2 mL PBS (0.2 mol/L,PH 6.6) 和 0.2 mL 的 1%铁氰化钾混合,50 ℃孵育 20 min,然后加入 0.2 mL 10% 三氯乙酸(TCA),混合后 5 000×g 离心,将 0.5 mL 上清液,2.5 mL 蒸馏水与 0.1 mL 的氯化

铁混合,测量 OD_{700nm} 值^[18]。

1.3.8 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定 α -葡萄糖苷酶抑制率测定是在体外测定模型的基础上略有修改^[19]。96孔板中加入 50 μ L 浓度为 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.7),30 μ L 0.5 mmol/L 对硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(PNPG)底物溶液,50 μ L 样品溶液,20 μ L α -葡萄糖苷酶溶液(0.3 U/mL),37 $^{\circ}$ C反应 30 min,随后加入 0.67 mol/L 的 Na₂CO₃ 50 μ L 终止反应,混匀后在波长 405 nm 处测定吸光度值。空白组用磷酸盐溶液代替 PNPG 底物溶液和酶液,对照组用磷酸盐缓冲液代替样品溶液。计算公式如下:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = [1 - (A_a - A_b) / A_c] \times 100 \quad (4)$$

式中, A_a——样品组的吸光度值; A_b——空白组的吸光度值; A_c——对照组的吸光度值。

1.3.9 多肽的分子对接 通过多肽与 Keap1 的分子对接,预测多肽的体内抗氧化作用。具体步骤如下:从 RCSB 蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)中获得了人源 Keap1 的 X 射线晶体结构(PDB 代码:4I7B)。用 PyMOL 2.5 软件去除受体分子中的水分子和原始配体,保存为 PDB 文件。Autodock Tools 1.5.6 软件打开经过 PyMOL 处理的受体分子进行加氢处理,并保存为 PDBQT 文件。ChemDraw 20.0 绘制所选肽的二维结构,Chem3D 20.0 绘制三维结构,并进行能量最小化优化。使用 Autodock Vina 1.1.2 进行对接(中心网格盒: x=-2.636, y=3.267, z=-27.433; 40 \times 40 \times 40 网格点,

0.375 \times 间距)^[20]。除已标注的,其它参数采用默认值。最后,使用 ligplot plus 2.2.5 来直观地分析分子对接结果。相同的,采用 Autodock Vina 1.1.2 与 α -葡萄糖苷酶进行分子对接(PDB 代码:3WY1; 中心网格盒: x=-6.665, y=-12.514, z=21.514; 120 \times 120 \times 120 网格点,0.375 \times 间距)^[21],解析多肽的作用机制。

1.3.10 数据的统计分析 所有试验均设 3 个平行样,计算平均值及标准差。采用 Origin 2018 制图,SPSS Statistics 26 对数据的差异性进行分析。

2 结果与讨论

2.1 泥鳅蛋白的酶解与超滤

泥鳅肉糜经短小芽孢杆菌 4SP5 蛋白酶水解(水解度 28%)并超滤后,对水解产物及超滤组分的抗氧化活性进行检测,结果见表 1。4 个组分的抗氧化活性差异显著。在质量浓度为 10 mg/mL 时,SL-1 的 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率、超氧自由基清除率、还原力均明显高于其它 3 个组分,分别达到 58.34%, 34.15%, 49.39%, 0.106。这表明,抗氧化肽主要存在于分子质量小于 5 ku 的组分中。这与 Ding 等^[13]的结果相似,即分子质量较小的多肽或寡肽具有更强的抗氧化活性^[13]。Zhi 等^[22]水解扇贝蛋白发现其中低分子质量的组分具有更强的氧自由基吸收能力。根据结果,选择分子质量小于 5 ku 的超滤组分(SL-1)进行进一步纯化。

表 1 泥鳅水解物各组分的抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activity of various fractions of hydrolysates of the *M. anguillicaudatus*

组分 (质量浓度 10 mg/mL)	抗氧化活性			
	DPPH 自由基清除率/%	羟自由基清除率/%	超氧自由基清除率/%	还原力
SL	34.98 \pm 2.58 ^b	17.00 \pm 2.10 ^b	47.74 \pm 1.58 ^b	0.090 \pm 0.005 ^b
SL-1	58.34 \pm 2.97 ^a	34.15 \pm 2.70 ^a	49.39 \pm 3.96 ^a	0.106 \pm 0.010 ^a
SL-2	33.70 \pm 1.24 ^b	12.13 \pm 1.23 ^c	45.28 \pm 1.78 ^b	0.071 \pm 0.006 ^c
SL-3	18.30 \pm 1.45 ^c	8.08 \pm 3.29 ^c	41.14 \pm 2.94 ^c	0.067 \pm 0.003 ^c

注:不同小写字母表示存在显著性差异, P<0.05。

2.2 超滤液的分离纯化

图 1 显示了 SL-1 通过 G25 色谱柱根据分子大小分离样品的结果。SL-1 分离出 5 个组分(5 个峰),这些组分的羟自由基清除活性图 2 所示。结

果显示,组分 F2(质量浓度为 0.35 mg/mL)的羟自由基清除作用最强。Wang 等^[23]通过色谱凝胶过滤的方法纯化出较小分子质量的 CPH-3,其具有更强的羟自由基清除与 Fe²⁺螯合能力。为了阐明活

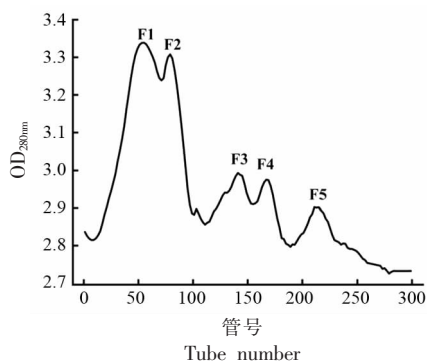


图1 G25色谱中SL-1的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve for SL-1 in G25 chromatography

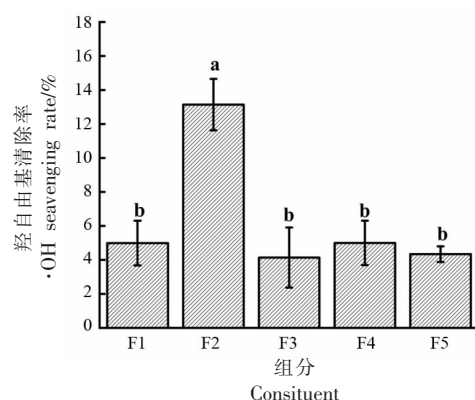


图2 各洗脱峰的羟自由基清除活性

Fig.2 Hydroxyl radical scavenging activity of each elution peak

性肽的功能性质和结构之间的关系,通过 LC-MS/MS 进一步鉴定了组分 F2 中的氨基酸序列。

2.3 多肽的鉴定

在 LC-MS/MS 多肽序列分析的基础上,鉴定 F2 中的生物活性肽,如表 2 所示,F2 峰共鉴定出 6 个可信肽段,根据搜索 Bionic 的得分,对这些肽段进行排序。经 BIOPEP 数据库(<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>)查询,这 6 个肽段均为未报道过的潜在生物活性肽序列。肽段所具有的生物活性功能与肽段的氨基酸的组成、序列、氨基或羧基末端的氨基酸的类型和大小相关^[24]。这些特性决定了多肽的可溶性和疏水性,并直接影响到多肽的活性和被人体吸收的能力^[25]。

表 2 通过 LC-MS/MS 鉴定 F2 中的多肽结果

Table 2 Identification of peptide results in F2 by LC-MS/MS

序号	序列	分子质量/u	得分	保留时间/min	丰度
1	AFRVPTP	787.45	444.60	31.85	4 081 200
2	VPEFAPDKTY	1 166.30	396.50	29.86	15 478 000
3	LDNYPVEV	948.04	394.30	37.03	7 116 500
4	ILGYTE	695.36	393.40	31.09	69 357 000
5	DSFIP	578.28	390.30	40.23	4 124 500
6	STGVFTT	712.35	377.10	26.85	18 967 000

2.4 多肽的物理化学性质预测

生物活性肽的物理化学性质预测结果如表 3 所示。其中 AFRVPTP 是一种无毒性和致敏性的寡

肽。随着研究者对活性肽关注度的提高,无论是作为功能性食品还是药物制剂,对其致敏性和毒性评价是极为重要的^[26]。研究表明肽的分子质量以

表 3 F2 中多肽的理化性质预测结果

Table 3 Predicted results of physicochemical properties of peptides in F2

序号	序列	等电点(PI)	pH 值为 7 时的静电荷	亲水平均指数	不稳定性指数	毒性	致敏性
1	AFRVPTP	9.79	1	0.06	36.09	无	非
2	VPEFAPDKTY	4.37	-1	-0.73	48.87	无	非
3	LDNYPVEV	3.67	-2	-0.15	48.25	无	可能
4	ILGYTE	4.00	-1	0.40	44.23	无	可能
5	DSFIP	3.80	-1	0.28	40.76	无	非
6	STGVFTT	5.24	0	0.53	-3.56	无	可能

及氨基酸组成与其致敏性有一定联系^[27]。根据 Maeno 等^[28]的报道,乳源性生物活性三肽 Val-Pro-Pro 已经被证明没有对特定靶器官的毒性。Gao 等^[29]的研究表明肽的不稳定性指数低于 40 时被认为是稳定的,而高于 40 则是不稳定的。

AFRVPTP 的不稳定性指数为 36.09,具有一定的稳定性。因此,寡肽 AFRVPTP 可能会更容易在功能性食品领域得到应用,所以后续试验选择 AFRVPTP 进一步研究。AFRVPTP 的合成与鉴定见图 3 和图 4。

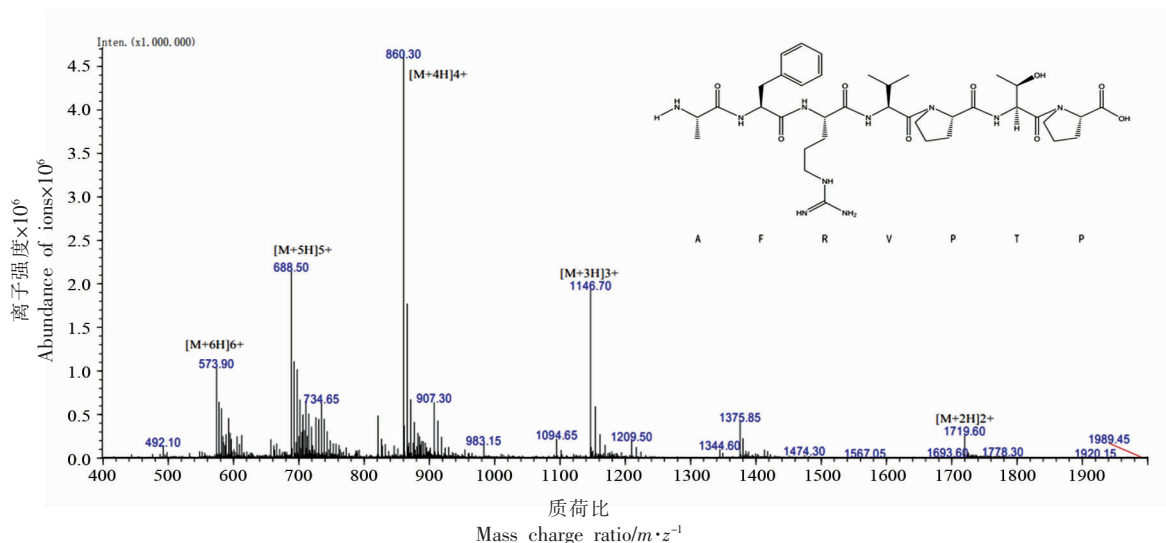


图 3 AFRVPTP 的质谱图

Fig.3 Mass spectrometry of AFRVPTP

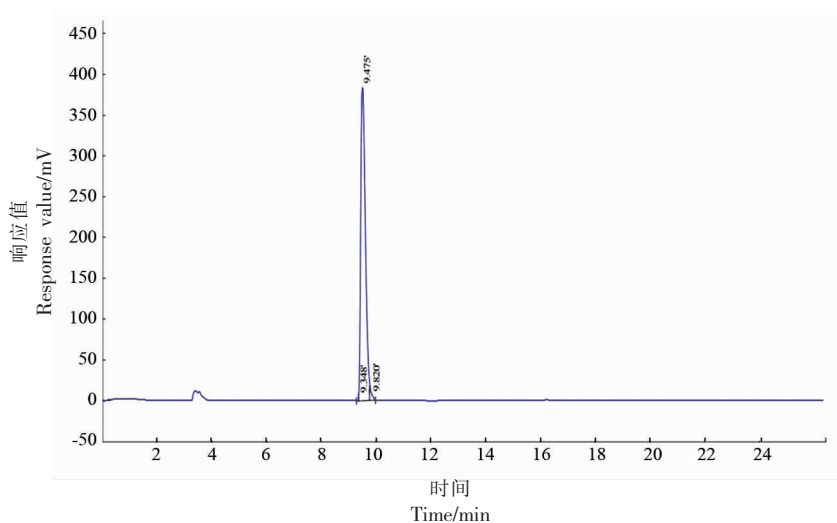


图 4 AFRVPTP 的 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of AFRVPTP

2.5 寡肽 AFRVPTP 的体外抗氧化活性

AFRVPTP 的体外抗氧化活性如图 5 所示。随着 AFRVPTP 质量浓度的增加,其 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子清除活性不断增强,DPPH 自由基和超氧自由基清除活性的 IC_{50} 值分别为 $37 \mu\text{g/mL}$ 和 0.73 mg/mL 。肽的抗氧化活性受其分

子质量、氨基酸组成和结构特征的影响^[29]。研究表明,多肽的抗氧化活性与其含有的疏水性氨基酸密切相关,疏水性氨基酸含量越高,抗氧化作用越强^[23]。You 等^[30]使用木瓜蛋白酶酶解泥鳅分离纯化得到的抗氧化肽 PSYV 与本试验得到的寡肽 AFRVPTP 中均含有脯氨酸(P)、缬氨酸(V)。泥鳅

多肽 AFRVPTP 中的丙氨酸(A)、苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)和脯氨酸为疏水性氨基酸,这可能是其具有较好抗氧化活性的原因。此外,有研究表明肽段中的芳香环(F)在淬灭自由基过程中起重要作用^[31]。

2.6 寡肽 AFRVPTP 抑制 α -葡萄糖苷酶作用

经检测,AFRVPTP 具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性(图 6)。抑制活性与 AFRVPTP 的质量浓度呈良好的线性关系。当质量浓度为 1 mg/mL 时抑制率为 16.79%,这与中华鳖蛋中筛选出的寡肽 HNKPEVEVR(1.25 mg/mL)抑制率相当^[7]。AFRVPTP

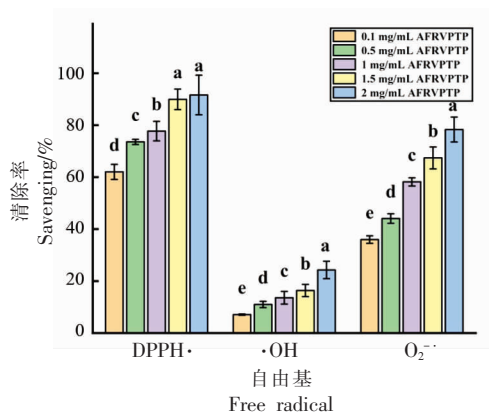


图 5 寡肽 AFRVPTP 的抗氧化活性
Fig.5 Antioxidant activity of AFRVPTP

2.7 寡肽 AFRVPTP 的体内抗氧化性预测

寡肽 AFRVPTP 具有体外抗氧化活性,通过分子对接技术研究 AFRVPTP 在体内抗氧化的潜力。Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是人类细胞减轻外源性氧化损伤的重要防御途径^[23]。通过抑制 Keap1-Nrf2 相互作用,可激活下游抗氧化和细胞保护蛋白相关基因的表达,从而提高机体的抗氧化能力^[32]。对接结果表明,AFRVPTP 与 Keap1 对接能量为 -9.0 kcal/mol (-37.656 kJ/mol)。如图 7 所示,AFRVPTP 与 Keap1 共生成 8 个氢键,其中与 Keap1 活性残基 Asn387、Arg415 各生成 2 个氢键。此外,AFRVPTP 还会与 Keap1 的活性残基 Tyr334、Arg380、Gln530、Tyr525、Arg483 和 Ser508 形成疏水作用。一些水产品生物肽也被发现有与 Keap1 竞争性结合并抑制 Keap1-Nrf2 的潜力。Xia 等^[20]从水解牡蛎中得到的 3 种富硒肽与 Keap1 蛋白的关键氨基酸残基形成稳定的氢键和疏水键,

抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 为 15.86 mg/mL,高于 Wei 等^[31]从发酵 Rubin 奶酪中得到的寡肽 QPHQ-PLPP 的 IC₅₀ 值。Zhao 等^[19]从水牛酪蛋白水解物中筛选出的 4 种肽 (P1:RNAVPITPLNR、P2:TKVIPYVRYL、P3:YLGYLEQLLR、P4:FALPQYLK) 均表现出较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。研究表明, α -葡萄糖苷酶抑制肽分子质量一般在 1 500 u 以下,且疏水性氨基酸(P、Y、M、L、V、I)比例高^[31]。AFRVPTP 的分子质量为 787.45 u,且序列中疏水氨基酸的比例高于 70%,符合此特征。

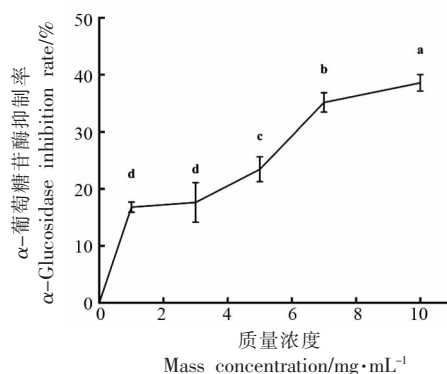


图 6 寡肽 AFRVPTP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性
Fig.6 α -Glucosidase inhibitory activity of AFRVPTP

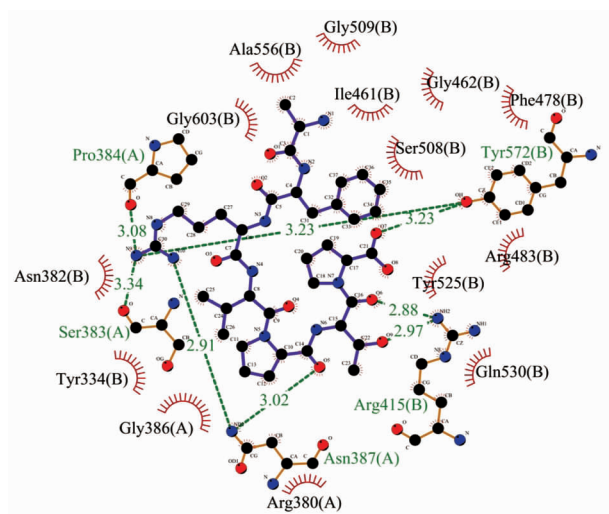
从而调节 Keap1-Nrf2 途径。在 Zhang 等^[32]的研究中,蛇头鱼 (*Channa argus*) 新型抗氧化肽的抗氧化机制是通过激活细胞中 Keap1-Nrf2 信号通路实现的。结果表明,泥鳅寡肽 AFRVPTP 可能与 Keap1 竞争性结合,具有通过激活 Keap1-Nrf2-ARE 途径来提高体内抗氧化活性的应用潜力。

2.8 寡肽 AFRVPTP 抑制 α -葡萄糖苷酶作用解析

α -葡萄糖苷酶是治疗 II 型糖尿病的重要靶标^[19],寡肽 AFRVPTP 可以抑制 α -葡萄糖苷酶,通过分子对接研究其作用机制。分子对接结果表明,AFRVPTP 与 α -葡萄糖苷酶的结合能为 -7.1 kcal/mol (-29.7064 kJ/mol)。结合能小于 0 意味着小分子可以自由结合到靶蛋白,且结合能越小,与靶蛋白结合的可能性越高^[21]。如图 8 所示,AFRVPTP 与 α -葡萄糖苷酶的残基 Glu231、Ala378、Lys398 和 Gly402 共形成 4 个氢键,键长分别为 2.93, 2.96, 3.30, 3.14 Å。此外,AFRVPTP 还与 α -葡萄糖苷酶

的氨基酸残基产生疏水作用。寡肽与酶的结合位点多,可增加抑制 α -葡萄糖苷酶的可能性^[9]。多肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制主要归因于肽和 α -葡萄糖苷酶活性残基之间形成了强大的氢键,以及其

它分子间的相互作用^[7]。因此,寡肽 AFRVPTP 与 α -葡萄糖苷酶氨基酸活性残基之间形成的氢键与疏水作用可能是其发挥作用的重要原因。



注:(A)表示受体的 A 链,(B)表示受体的 B 链,下同。

图 7 AFRVPTP 与 Keap1 分子对接结果

Fig.7 Results of molecular docking of AFRVPTP to Keap1

3 结论

泥鳅蛋白经蛋白酶水解、超滤、G25 色谱纯化和 LC-MS/MS 鉴定,获得了 6 个新型生物活性肽。其中寡肽 AFRVPTP 具有较好的 DPPH 自由基(IC_{50} 37 μ g/mL)、羟自由基和超氧阴离子(IC_{50} 0.73 mg/mL)的清除作用。同时,该寡肽具有抑制 α -葡萄糖苷酶作用,其 IC_{50} 为 15.86 mg/mL,且无毒性及致敏性。分子对接显示寡肽可以结合 keap1 活性口袋中的氨基酸残基(Asn387、Arg415、Tyr334、Arg380、Gln530、Tyr525、Arg483 和 Ser508),表明其具有提高机体抗氧化活性的作用潜力;其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用是通过与活性位点的关键氨基酸残基形成氢键(Glu231、Ala378、Lys398 和 Gly402)和疏水作用实现的。泥鳅肽的研究为泥鳅在营养、保健和功能食品方面的精深加工提供了参考依据。

参 考 文 献

[1] YOU L J, ZHAO M M, LIU R H, et al. Antioxi-

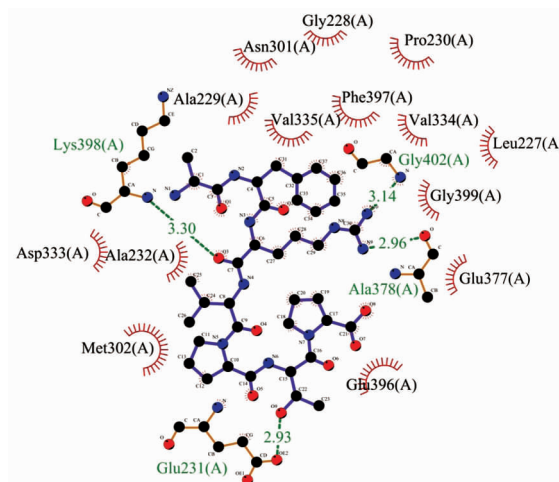


图 8 寡肽 AFRVPTP 与 α -葡萄糖苷酶分子对接结果

Fig.8 Results of molecular docking of AFRVPTP to α -glucosidase

dant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7948-7953.

[2] 韩淙琳, 刘珈铭, 李茜, 等. 泥鳅多糖的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4411-4419.

HAN C L, LIU J M, LI X, et al. Research progress of *Misgurnus anguillicaudatus* polysaccharide[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2021, 12(11): 4411-4419.

[3] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

YOU L J. Isolation and purification of antioxidant peptides from loach proteins and their anti-fatigue and anti-cancer effects[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.

[4] 王梦杰, 王海华, 陈建华. 泥鳅营养成分和营养需求研究进展[J]. 江西水产科技, 2018(6): 10-13.

WANG M J, WANG H H, CHEN J H. Research progress on nutrient composition and nutritional requirements of loach[J]. Jiangxi Aquatic Science and

- Technology, 2018(6): 10–13.
- [5] LI M Y, FAN W L, XU Y. Identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant peptides derived from Pixian broad bean paste[J]. LWT–Food Science and Technology, 2021, 151: 11221.
- [6] MIRZAEI M, MIRDAMADI S, SAFAVI M, et al. The stability of antioxidant and ACE-inhibitory peptides as influenced by peptide sequences[J]. LWT–Food Science and Technology, 2020, 130: 109710.
- [7] QIU L Y, DENG Z Y, ZHAO C D, et al. Nutritional composition and proteomic analysis of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) egg and identification of oligopeptides with alpha-glucosidase inhibitory activity [J]. Food Research International, 2021, 145: 110414.
- [8] BASHIR K M I, SOHN J H, KIM J S, et al. Identification and characterization of novel antioxidant peptides from mackerel (*Scomber japonicus*) muscle protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126809.
- [9] 向泽敏, 葛俊驿, 邱晓挺, 等. 鲭科鱼类活性肽的酶法制备及其生理功能研究进展[J]. 生物学杂志, 2017, 34(1): 65–69.
- XIANG Z M, GE J Y, QIU X T, et al. Progress in bioactive peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Scombridae proteins [J]. Journal of Biology, 2017, 34(1): 65–69.
- [10] GAO R C, YU Q Q, SHEN Y, et al. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 687–699.
- [11] 王志, 赵峰, 王珊珊, 等. 大菱鲆鱼皮抗氧化胶原肽的制备及特性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8267–8275.
- WANG Z, ZHAO F, WANG S S, et al. Preparation and characteristic analysis of antioxidant collagen peptides from turbot skins[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(22): 8267–8275.
- [12] ZHONG H, ABDULLAH, ZHANG Y P, et al. Exploring the potential of novel xanthine oxidase inhibitory peptide (ACECD) derived from *Skipjack tuna* hydrolysates using affinity-ultrafiltration coupled with HPLC–MALDI–TOF/TOF–MS[J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129068.
- [13] DING J, LIANG R, YANG Y Y, et al. Optimization of pea protein hydrolysate preparation and purification of antioxidant peptides based on an *in silico* analytical approach[J]. LWT–Food Science and Technology, 2020, 123: 109126.
- [14] FU Z Y, LIN J. An overview of bioinformatics tools and resources in allergy [J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1592: 223–245.
- [15] JUNG E, KIM J, KIM M, et al. Artificial neural network models for prediction of intestinal permeability of oligopeptides [J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 1–9.
- [16] 陈敏, 高广春, 田新朋, 等. 皱纹盘鲍内脏抗氧化肽的制备及活性分析[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 159–166.
- CHEN M, GAO G C, TIAN X P, et al. Preparation and activity analysis of antioxidant peptides from the viscera of the wrinkled disc abalone [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(6): 159–166.
- [17] 唐裕芳, 梁帆, 石宇, 等. 黑藻抗氧化肽制备及其活性表征[J]. 湘潭大学学报 (自然科学版), 2021, 43(6): 24–35.
- TANG Y F, LIANG F, SHI Y, et al. Preparation of antioxidant peptides from black algae and characterization of their activities [J]. Journal of Xiangtan University (Natural Science Edition), 2021, 43(6): 24–35.
- [18] ZHANG N, ZHAO Y D, SHI Y X, et al. Polypeptides extracted from *Eupolyphaga sinensis* walker via enzymic digestion alleviate UV radiation-induced skin photoaging [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108636.
- [19] ZHAO Q, WEI G Q, LI K L, et al. Identification and molecular docking of novel α -glucosidase inhibitory peptides from hydrolysates of *Binglangjiang buffalo* casein[J]. LWT–Food Science and Technology, 2022, 156: 113062.
- [20] XIA Z, MIAO J Y, CHEN B B, et al. Purification, identification, and antioxidative mechanism of three novel selenium-enriched oyster antioxidant peptides [J]. Food Research International, 2022, 157: 111359.
- [21] SUN Y Y, SUN H Q, PAN L C, et al. Preparation, structure and α -glucosidase inhibitory of oligosaccharides by enzymatic hydrolysis from

- Annona squamosa* polysaccharide[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 177: 114468.
- [22] ZHI T X, LI X Y, SADIQ F A, et al. Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Argopecten irradians*) mantle using enzymatic and microbial methods: Preparation, purification, identification and characterization[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 164: 113636.
- [23] WANG L Y, MA M T, YU Z P, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins[J]. Food Chemistry, 2021, 352: 129399.
- [24] MANZOOR M, SINGH J, GANI A. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: *In vitro*, *in silico* and *in vivo* studies[J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131395.
- [25] UDENIGWE C C, FOGLIANO V. Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin?[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 9–12.
- [26] CHALAMAIAH M, KESKIN ULUG S, HONG H, et al. Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 58: 123–129.
- [27] AGYEI D, POTUMART R, DANQUAH M K. Food-derived multifunctional bioactive proteins and peptides: Sources and production[J]. Biotechnology of Bioactive Compounds, 2015, 19: 483–506.
- [28] MAENO M, NAKAMURA Y, MENNEAR J H, et al. Studies of the toxicological potential of tripeptides (*L*-valyl-*L*-prolyl-*L*-proline and *L*-isoleucyl-*L*-prolyl-*L*-proline): III. Single- and/or repeated-dose toxicity of tripeptides-containing *Lactobacillus helveticus*-fermented milk powder and casein hydrolysate in rats[J]. International Journal of Toxicology, 2005, 24: 13–23.
- [29] GAO J X, LI T G, CHEN D D, et al. Identification and molecular docking of antioxidant peptides from hemp seed protein hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147: 111453.
- [30] 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 Research International, 2010, 43(4): 1167–1173.
- [31] WEI G Q, ZHAO Q, WANG D D, et al. Novel ACE inhibitory, antioxidant and α -glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubbing cheese through peptidomic and molecular docking[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 159: 113196.
- [32] ZHANG J, LI M, ZHANG G N, et al. Identification of novel antioxidant peptides from snakehead (*Channa argus*) soup generated during gastrointestinal digestion and insights into the anti-oxidation mechanisms[J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127921.

Preparation, Identification and Activity of Antioxidant Active Peptides from *Misgurnus anguillicaudatus*

Dou Baojie^{1,2}, Weng Nanhai^{1,2}, Lu Jing^{1,2}, Guo Quanyou³, Lü Mingsheng^{1,2*}, Wang Shujun^{1,2}

¹Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu

²Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu

³East China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090

Abstract *Misgurnus anguillicaudatus* (loach) is a common freshwater fish in Asia, which has higher nutritional and medical value. In this study, the loach was hydrolyzed with protease secreted by *Bacillus pumilus* 4SP5 and the hydrolysis products of different molecular weights were obtained by ultrafiltration. Among them, the fractions smaller than 5 ku showed the strongest antioxidant activity. The filtration components were purified by G25 chromatography filtration and sequenced and identified by LC-MS/MS, and 6 potential bioactive peptides were obtained. Among them, the oligopeptide AFRVPTP had good DPPH scavenging activity (IC_{50} 37 μ g/mL), hydroxyl radical scavenging activity, and superoxide an-

ion scavenging activity (IC_{50} 0.73 mg/mL). The oligopeptide was also shown to inhibit α -glucosidase with an IC_{50} of 15.86 mg/mL and was predicted to be non-toxic and non-sensitizing online. The results of molecular docking showed that AFRVPTP acted by binding key amino acids in the catalytic domain of the enzyme. It could interact with key amino acids residue of the active domain of Keap1, which indicated that the AFRVPTP had the application potential to regulate the antioxidation (Asn387, Arg415, Tyr334, Arg380, Gln530, Tyr525, Arg483, Ser508) *in vivo*. The results provided experimental basis for the intensive processing of loach.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; bioactive peptides; antioxidant; α -glucosidase inhibition; molecular docking