

油茶饼粕抗氧化肽的鉴定及其稳定性

朱巧楠¹, 王鹏¹, 杨选², 余琳³, 何志平¹, 吴峰华^{1*}

¹浙江农林大学食品与健康学院 杭州 311300

²浙江省丽水市农林科学研究院 浙江丽水 323000

³杭州千岛湖瑶记实业有限公司 杭州 311700)

摘要 为提高油茶饼粕的附加值,采用复合蛋白酶酶解油茶饼粕蛋白,酶解产物通过超滤、凝胶层析分离纯化,LC-MS/MS 序列鉴定结合 PeptideRanker 数据库筛选,获得具有较高抗氧化活性的肽段。探究不同温度、pH 值、金属离子以及体外模拟胃肠道消化对抗氧化肽活性的影响。结果表明:酶解产物经超滤和 Sephadex G-25 凝胶柱逐级分离后,得到 4 个组分(F1~F4),F4 组分的 ABTS 和 DPPH 自由基清除率最高,分别为(67.56±0.32)%和(52.40±1.64)%。经氨基酸序列鉴定、PeptideRanker 预测与活性验证,得到 3 条抗氧化肽,分别为 LCDQCPPHA(LC-9)、ATNPPCCQP(AT-9)、TSCSSPSYPFQ(TS-11)。AT-9 和 LC-9 具有较好的热稳定性,且在 pH 3~9 范围,ABTS 和 DPPH 自由基清除活性均未发生显著改变。5 种金属离子中,Cu²⁺对 3 条肽活性的影响最为显著,当 Cu²⁺浓度为 2 mmol/L 时,LC-9 的 ABTS 和 DPPH 清除活性保持率分别为(23.47±0.61)%和(44.57±0.58)%。此外,经体外模拟胃肠道消化后,AT-9 的抗氧化活性保持率最高,ABTS 和 DPPH 清除活性保持率均高于 90%。3 条肽中 AT-9 具有较强的抗氧化活性和良好的稳定性,可应用于食品领域。

关键词 油茶饼粕;抗氧化肽;分离纯化;鉴定;稳定性

文章编号 1009-7848(2024)07-0332-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.033

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)是世界四大木本油料作物(油茶、油棕、橄榄、椰子)之一,主要分布在中国、印度、日本和东南亚等国家和地区^[1]。油茶饼粕是茶籽经压榨提油后的副产物,我国每年生产约 200 万 t 油茶饼粕,约占茶籽产量的 50%^[2],其蛋白质含量为 15%~21%,是一种潜在的蛋白质资源^[3]。研究发现,油茶蛋白经水解后得到的肽具有抗氧化、降血糖、降血压等生物活性^[4-6]。

与商业合成的抗氧化剂(如丁基羟基甲苯、没食子酸丙酯)相比,抗氧化肽具有无毒、高效和环保的特性^[7],近年来成为研究热点。多肽作为蛋白质的降解衍生物,其性质与蛋白质类似,容易受到环境因素的影响,且不同的加工条件(加热、pH、金属离子)可使其结构发生变化^[8]。在实际生产及应用过程中,肽类物质会因氧化、水解、脱酰胺或环化等作用而发生降解,从而导致其活性降低,甚至完全失活^[9]。此外,活性肽需要抵抗胃肠道中各种消化酶的水解,保持其生物活性才能在体内发挥

作用^[10-11]。探究不同加工条件及胃肠道消化酶对抗氧化肽稳定性的影响具有现实意义。

本研究采用复合蛋白酶酶解油茶饼粕蛋白制备油茶抗氧化肽,通过超滤、葡聚糖凝胶分离纯化得到具有抗氧化活性的肽段,探究不同温度、pH 值、金属离子以及体外模拟胃肠道消化对抗氧化肽活性的影响,以期为抗氧化肽产品的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油茶籽,购自浙江衢州当地市场。

抗氧化肽 LCDQCPPHA(LC-9)、ATNPPCCQP(AT-9)和 TSCSSPSYPFQ(TS-11)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS),美国 Sigma 公司;复合蛋白酶(120 000 U/g)、胃蛋白酶(3 000 U/g)、胰蛋白酶(250 000 U/g)、G-25 葡聚糖凝胶,北京索莱宝科技有限公司;谷胱甘肽(GSH),上海源叶生物科技有限公司。其它试剂均为分析纯级。

收稿日期:2023-07-15

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2021C02014)

第一作者:朱巧楠,女,硕士生

通信作者:吴峰华 E-mail:wufh@zafu.edu.cn

1.2 仪器与设备

恒温搅拌水浴锅,江苏优卓诺仪器制造有限公司;5804 R 高速台式离心机,艾本德中国有限公司;SCIENTZ-12N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;T6 新锐可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;EASY-nLC 1200 高效液相色谱仪、Orbitrap 质谱仪,美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 油茶饼粕蛋白提取

将粉碎后的油茶饼粕与石油醚 1:5 (M/V)混合,25℃条件下搅拌 2 h,静置收集沉淀(重复 2 次),干燥后得到脱脂油茶饼粕。将脱脂油茶饼粕与 80%乙醇 1:10(M/V)混合,40℃条件下搅拌 2 h,抽滤并收集沉淀(重复 2 次),干燥后过 40 目筛,得到脱脂、脱皂素的油茶饼粕粉末。将脱脂、脱皂素的油茶饼粕粉末与去离子水 1:20 (M/V)混合,在 50℃,pH 10.0 条件下搅拌提取 2 h。冷却至 25℃后,4 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,调 pH 值至 4.0,静置 1 h 后,4 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,加去离子水调 pH 值至 7.0 溶解,冷冻干燥得到油茶饼粕蛋白(CP)。

1.4 油茶饼粕蛋白的水解

参照高云龙等^[12]的方法并稍作修改。将 CP 配制成 10 g/L 的溶液,置于 95℃水浴 15 min,冷却至 25℃后,调 pH 值至 7.0,加入复合蛋白酶(4 300 U/g),置于 50℃水浴酶解 4 h 后,于 95℃水浴 10 min,冷却至 25℃,在 4℃,8 500 r/min 条件下离心 30 min,取上清液,得到油茶饼粕蛋白酶解产物(CPH)。

1.5 自由基清除活性测定

1.5.1 DPPH 自由基清除活性 参照 Luo 等^[13]的方法。用 80%乙醇配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液。取 0.6 mL 样品溶液,加入 5.4 mL DPPH 溶液,充分混匀,避光静置 40 min,在波长 517 nm 处测得吸光值 A_1 ,对照组以溶剂代替样品测得 A_0 。DPPH 自由基清除活性按式(1)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除活性}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_1 和 A_0 分别为样品和对照组在波长 517 nm 处的吸光值。

1.5.2 ABTS 自由基清除活性 参照 Gallego 等^[14]

的方法并稍作修改。ABTS 溶液(7.0 mmol/L)与等体积的过硫酸钾(2.45 mmol/L)混合,避光放置 12~16 h。使用前稀释至吸光值为 0.70 ± 0.02 ,避光放置 30 min。测定时,将 4.0 mL ABTS 溶液加入 0.2 mL 样品中,混匀后 25℃孵育 6 min,测定波长 734 nm 处的吸光值。用溶剂代替样品作为对照。ABTS 清除活性按式(2)计算:

$$\text{ABTS 自由基清除活性}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 和 A_0 分别为样品和对照组在波长 734 nm 处的吸光值。

1.5.3 自由基清除活性保持率 分别测定油茶抗氧化肽处理前和处理后的自由基清除活性,活性保持率按式(3)计算:

$$\text{活性保持率}(\%) = \frac{\text{处理后的自由基清除活性}}{\text{处理前的自由基清除活性}} \times 100 \quad (3)$$

1.6 超滤分离

依次采用截留分子质量为 10 ku 和 3 ku 的超滤膜对 CPH 进行分离,分别得到 >10 ku (CPH-I), 3~10 ku (CPH-II), <3 ku (CPH-III) 的 3 个组分。

1.7 葡聚糖凝胶分离

将抗氧化活性最高的组分用 Sephadex G-25 凝胶柱($\Phi 16 \text{ mm} \times 800 \text{ mm}$)进行分离:将样品配制成 5 mg/mL 的溶液,取 4 mL 过 0.22 μm 水系滤膜,以去离子水为洗脱液,在 0.6 mL/min 的流速下洗脱,每 3 min 收集 1 管,于波长 280 nm 处测定吸光值,收集组分测定抗氧化活性,以 GSH 的抗氧化活性作为对照。

1.8 LC-MS/MS 氨基酸序列测定

抗氧化肽氨基酸序列测定采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS),委托北京百泰派克科技有限公司完成。将样品溶解于 ddH₂O,在 56℃下用 10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)还原 1 h 后,用 50 mmol/L 碘乙酰胺(IAA)在 25℃避光烷基化 40 min,使用自填脱盐柱脱盐,于 45℃真空离心浓缩仪中挥干溶剂。分析前,将肽溶解于 0.1%的甲酸中。流动相:(A)0.1%甲酸水溶液,(B)0.1%甲酸,80%乙腈。使用 PEAKS Studio(8.5)De novo 软件进行数据分析。

1.9 抗氧化肽筛选

利用网站 PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 预测肽段具有生物活性的可能性。

1.10 抗氧化肽的稳定性

1.10.1 温度对抗氧化肽活性的影响 将抗氧化肽配制成 0.5 mg/mL 的溶液,分别置于 20,40,60,80,100 °C 水浴处理 2 h,冷却至 25 °C,测定抗氧化肽的 ABTS 及 DPPH 自由基清除率^[15]。

1.10.2 pH 对抗氧化肽活性的影响 将抗氧化肽溶液(0.5 mg/mL)的 pH 值分别调至 3,5,7,9,11,在 25 °C 下放置 2 h 后,测定 ABTS 及 DPPH 自由基清除率^[16]。

1.10.3 金属离子对抗氧化肽活性的影响 在 0.5 mg/mL 的抗氧化肽溶液中添加浓度为 2,4,6,8 mmol/L 的 K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺,在 25 °C 反应 2 h 后,测定 ABTS 及 DPPH 自由基清除率。

1.10.4 体外模拟胃肠道消化对抗氧化肽活性的影响 体外模拟肠道消化参照 Gallego 等^[17]的方法并稍作修改。将样品溶液(0.5 mg/mL)的 pH 值调至 2.0,加入胃蛋白酶(2%),于 37 °C 水浴 2 h,反应结束后取一半溶液测定 ABTS 及 DPPH 自由基清除率。将剩余样品的 pH 值调至 7.0,并加入胰蛋白酶(2%),于 37 °C 水浴 2 h,反应结束后,将溶液置于 95 °C 水浴 10 min,冷却至 25 °C 后测定活性。

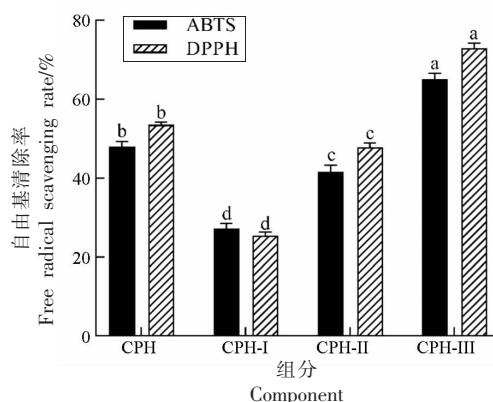
1.11 数据处理

每组试验均重复 3 次,结果以“平均值±标准差”表示。采用 SPSS 23.0 软件进行 Duncan 方差分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 超滤分离结果

如图 1 所示,在相同质量浓度下(2.5 mg/mL),CPH-III 组分抗氧化活性显著高于分离前的 CPH,其 ABTS 与 DPPH 自由基清除率分别为(65.11±1.46)%和(72.95±1.29)%,而 CPH-I 和 CPH-II 的抗氧化活性则显著低于 CPH。大量研究表明,与大分子质量的多肽相比,小分子质量的多肽具有较小的空间位阻,能更好地作为电子供体与自由基发生反应,从而具有更强的抗氧化活性^[8,18-20]。



注:不同小写字母表示不同超滤组分的自由基清除率差异显著($P<0.05$)。

图 1 超滤组分抗氧化活性

Fig.1 Antioxidant activities of the ultrafiltration fractions

2.2 凝胶分离结果

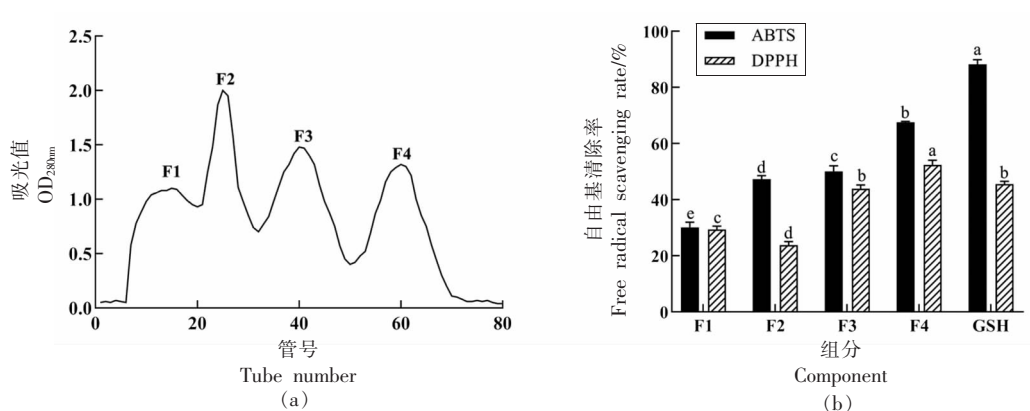
CPH-III 经 Sephadex G-25 分离得到 4 个组分(F1~F4),洗脱曲线如图 2a 所示,抗氧化活性如图 2b 所示。在相同质量浓度下(1 mg/mL),F4 组分的抗氧化活性显著高于其余 3 个组分,其 ABTS 和 DPPH 自由基清除率分别为(67.56±0.32)%和(52.40±1.64)%。

2.3 抗氧化肽的鉴定与筛选

PeptideRanker 是一个较为系统的肽数据库,评分>0.5 的肽段被认为具有生物活性^[21]。F4 组分经 LC-MS/MS 鉴定出 270 条肽段。根据 De novo 肽段打分、峰面积以及 PeptideRanker 评分,筛选出 5 条具有潜在抗氧化活性的肽段,如表 1 所示。LC-9、AT-9、TS-11 呈现出较强的抗氧化活性,ABTS 清除率 IC₅₀ 分别为 0.38,0.29,0.37 mg/mL, DPPH 清除率的 IC₅₀ 分别为 0.24,0.26,1.13 mg/mL,且 AT-9 与 LC-9 的 DPPH 清除活性显著高于 GSH。这 3 条肽具有较强抗氧化活性的原因可能是 Cys、His、Tyr 是形成氢键的有效氢供体或受体,疏水氨基酸(如 Ala、Leu、Pro 等)则能提高肽在脂质相中的溶解度,促进脂质中自由基的相互作用^[22],从而对肽的抗氧化活性产生影响。

2.4 抗氧化肽的稳定性分析

2.4.1 温度对抗氧化肽活性的影响 在食品加工过程中,热处理会影响多肽的生物活性^[7]。由图 4 可知。AT-9、LC-9 经热处理后几乎保留了完整的 ABTS 与 DPPH 清除活性,其中 LC-9 的 ABTS 清



注:不同小写字母表示不同凝胶分离组分的自由基清除率差异显著($P < 0.05$)。

图 2 G-25 葡聚糖凝胶分离谱图(a)及各分离组分的抗氧化活性(b)

Fig.2 Chromatogram of gel filtration column (a) and the antioxidant activity of each component (b)

表 1 抗氧化肽的氨基酸序列和活性

Table 1 Amino acid sequence and activity of antioxidant peptides

肽序列	分子量/u	PeptideRanker	ABTS 清除活性/ (IC ₅₀ mg/mL)	DPPH 清除活性/ (IC ₅₀ mg/mL)
LCDQCPHA	1 096.44	0.643	0.38	0.24
ATNPPCCQP	1 043.42	0.571	0.29	0.26
TSCSSPSYPFQ	1 259.51	0.546	0.37	1.13
AEDLRPRGC	1 072.51	0.672	>2	>2
LPNYHPAPR	1 063.56	0.683	>2	>2
GSH	307.33	—	0.07	1.11

注:—, GSH 无 PeptideRanker 活性评分。

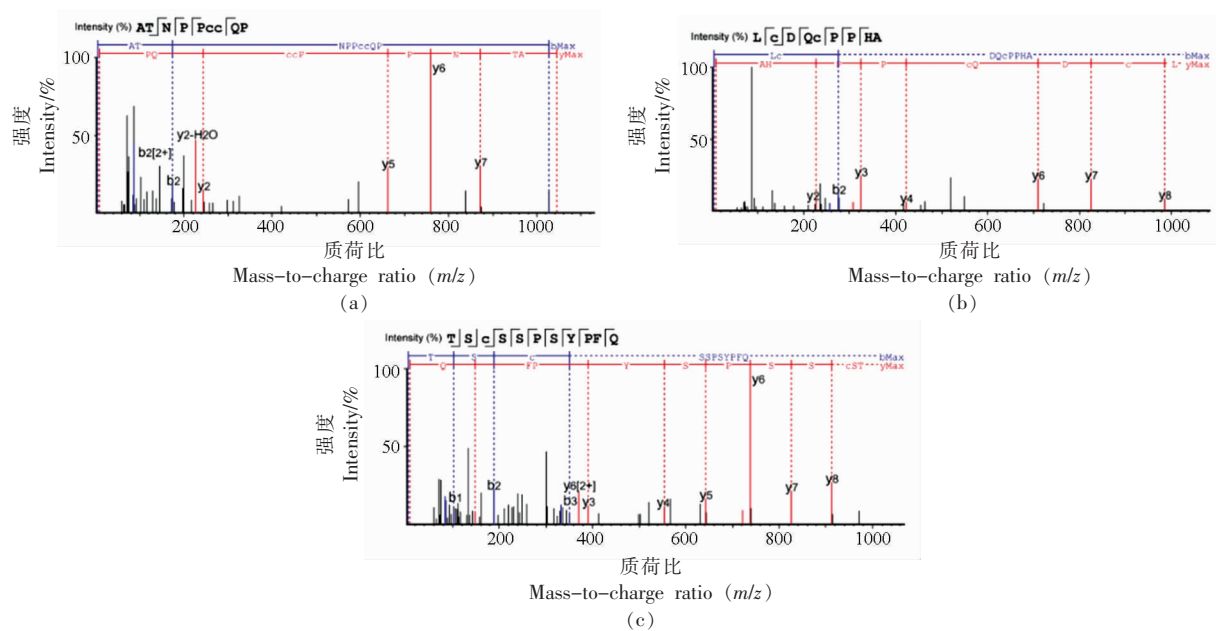
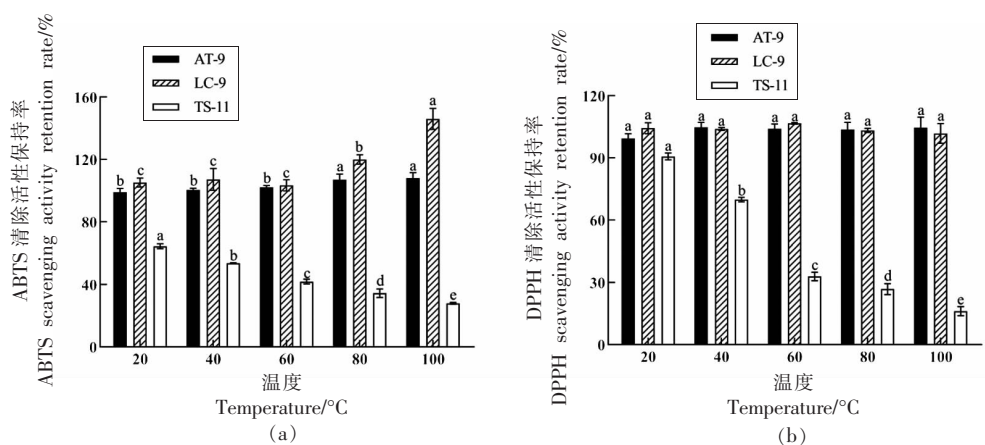


图 3 抗氧化肽二级质谱图

Fig.3 The secondary mass spectrometry of antioxidant peptides

除活性在 80~100 °C 时显著升高,尤其是在 100 °C 时,升高了 45.99%。郑婷婷等^[23]发现鱼鳔胶原肽在 100 °C 加热 2 h 后抗氧化活性也显著提高。原因可能是高温处理并未导致 LC-9 肽键断裂,仅使肽链部分二级结构展开,部分活性位点暴露于分子表面^[24]。与 AT-9 和 LC-9 不同,TS-11 经热处理后,其 ABTS 和 DPPH 清除活性随着温度的升高

显著下降,经 100 °C 加热 2 h 后,其 ABTS 和 DPPH 自由基清除率仅保留了 (27.90±0.52)% 和 (16.15±2.17)%。这可能是高温致使 TS-11 肽链被破坏,氨基酸序列和内部构象发生变化,从而导致其活性降低^[25],因此 TS-11 仅适合在低温条件下进行加工利用。综合分析,AT-9 和 LC-9 具有较好的热稳定性。



注:不同小写字母表示同一样品在不同温度下活性保持率差异显著($P<0.05$)。

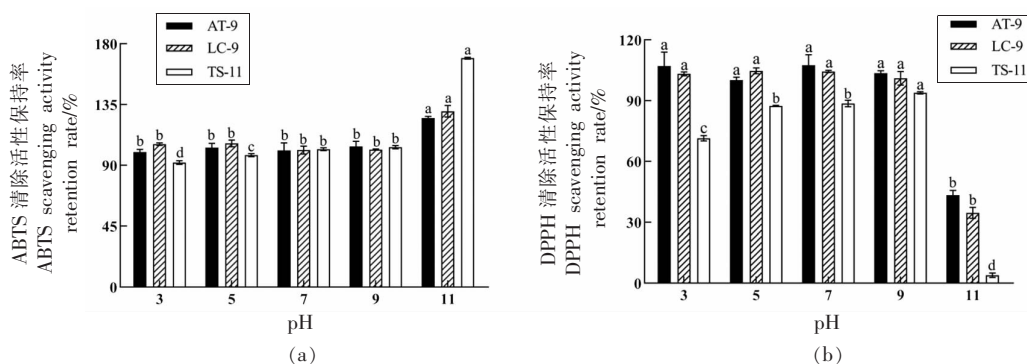
图4 温度对AT-9、LC-9和TS-11抗氧化活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on antioxidant activities of AT-9, LC-9 and TS-11

2.4.2 pH 对抗氧化肽活性的影响 如图 5 所示,在酸性条件下,AT-9 与 LC-9 的 ABTS 和 DPPH 清除活性无显著变化;而 TS-11 的 ABTS 与 DPPH 清除活性则显著下降。可能是酸性或低酸介质降低了 TS-11 的分子溶解度,影响其羟基的有效性,从而减弱其 DPPH 清除活性^[26]。当 pH 值为 11 时,AT-9、LC-9、TS-11 的抗氧化活性变化趋势一致,ABTS 清除活性显著升高,DPPH 清除活性则显著降低,分别仅保留了 (43.34±2.37)%、(34.59±2.68)%、(3.94±1.06)%。与唐宁等^[27]对玉米抗氧化肽稳定性研究结果类似,这可能是由于碱性环境有助于抗氧化肽清除 ABTS 自由基^[27]。此外,研究表明,碱性条件下 Cys、Ser 和 Thr 被破坏会显著降低抗氧化肽的 DPPH 清除活性^[28]。TS-11 中这 3 种氨基酸占比更高,因此其 DPPH 清除活性在强碱条件下受到的影响更为显著。综上所述,AT-9 与 LC-9 适合在酸性及中性环境下加工,而 TS-11 仅适合在中性条件下加工。

2.4.3 金属离子对抗氧化肽活性的影响 金属离

子对油茶抗氧化肽活性的影响如图 6 所示。AT-9 的 ABTS 清除活性受金属离子的影响程度为 $Ca^{2+}>K^{+}>Mg^{2+}>Cu^{2+}>Zn^{2+}$,DPPH 清除活性则受 Cu^{2+} 的影响最为显著。LC-9 的 ABTS 和 DPPH 清除活性经不同金属离子处理后,变化趋势基本一致,添加不同浓度的 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} ,其 ABTS 和 DPPH 清除活性保持率均高于 85%。经 Cu^{2+} 处理后,LC-9 抗氧化活性显著下降。当 Cu^{2+} 浓度为 2 mmol/L 时,其 ABTS 和 DPPH 清除活性保持率分别为 (23.47±0.61)% 和 (44.57±0.58)%。不同金属离子对 TS-11 活性的影响也不同。 K^{+} 使其 ABTS 清除活性显著下降,DPPH 清除活性则显著升高,当 K^{+} 浓度为 8 mmol/L 时,DPPH 清除活性升高近 80%。此外,与 AT-9、LC-9 一致,添加 Cu^{2+} 后,TS-11 的抗氧化活性显著降低。总体而言,5 种金属离子中, Cu^{2+} 对 3 条肽活性的影响最为显著。可能是 Cu^{2+} 与油茶抗氧化肽之间存在特殊的化学力作用,导致抗氧化活性降低^[29],因此在加工过程中要避免与 Cu^{2+} 接触。郑志强等^[30]发现, K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对小麦肽的



注:不同小写字母表示同一样品在不同 pH 下活性保持率差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 pH 对 AT-9、LC-9 和 TS-11 抗氧化活性的影响

Fig.5 Effect of pH environment on antioxidant activities of AT-9, LC-9 and TS-11

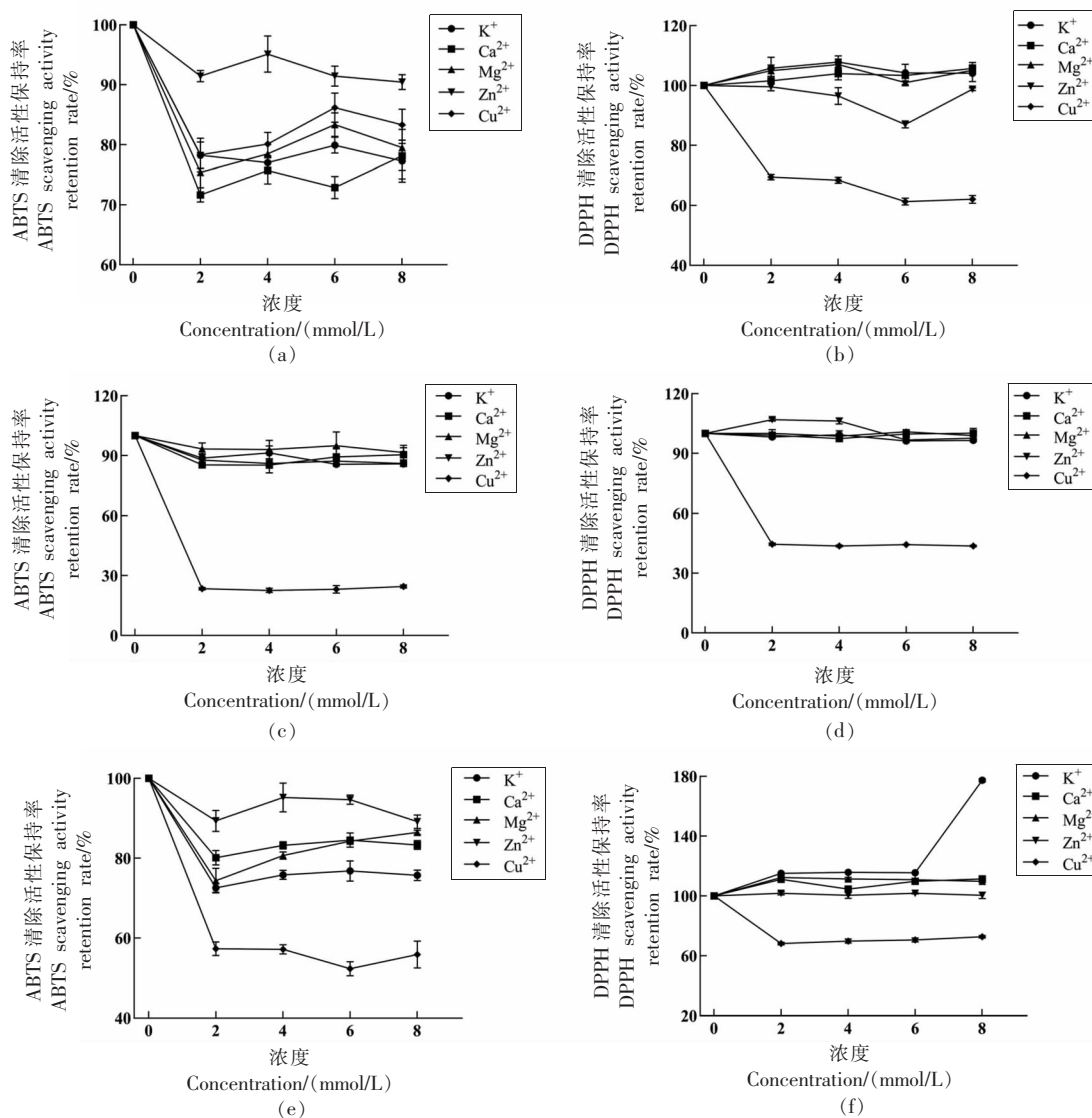


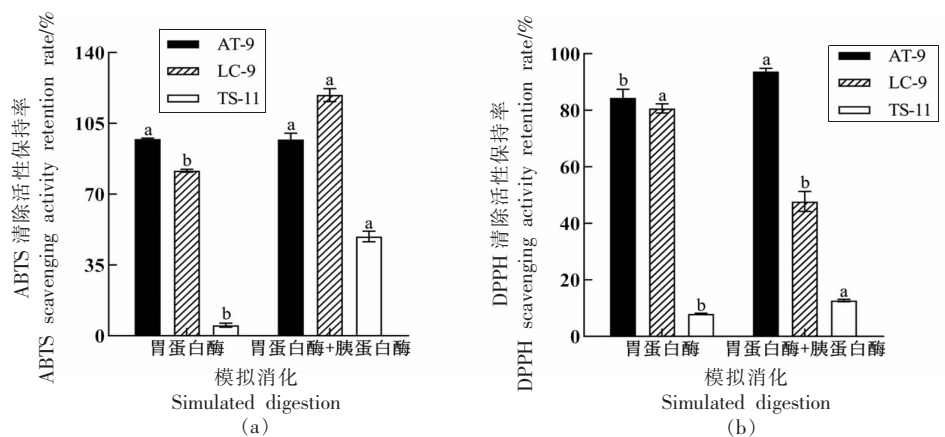
图 6 金属离子对 AT-9(a,b)、LC-9(c,d)和 TS-11(e,f)抗氧化活性的影响

Fig.6 Effect of metal ions on antioxidant activities of AT-9 (a, b), LC-9 (c, d) and TS-11 (e, f)

DPPH 清除活性无显著影响,而 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对其活性有一定的提高作用。刘晓艺等^[8]发现 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对不同分子质量红花籽抗氧化肽活性的影响不一。金属离子对不同抗氧化肽活性的影响程度有差异,可能是由于抗氧化肽氨基酸组成、序列不同,导致其对金属离子的络合能力以及形成的络合物空间结构不同^[31]。

2.4.4 体外模拟胃肠道消化对抗氧化肽的影响 体外模拟胃肠道消化是评价活性肽生物利用度和消化率的有效方法^[32]。如图 7 所示,经胃蛋白酶处理后,3 条肽的抗氧化活性均显著降低。其中,AT-9 和 LC-9 的 ABTS 和 DPPH 清除活性保留了 80% 以上,而 TS-11 的 ABTS 和 DPPH 清除活性仅保

留了 $(5.23 \pm 1.01)\%$ 和 $(7.98 \pm 0.27)\%$ 。这可能是肽段在胃蛋白酶作用下被还原成低活性或无活性的片段引起的^[15]。进一步经胰蛋白酶处理后,AT-9 的 ABTS 和 DPPH 清除活性保持率均高于 90%; LC-9 的 ABTS 清除活性显著升高, DPPH 清除活性则显著降低,仅保留了 $(47.72 \pm 3.53)\%$; TS-11 的 ABTS 和 DPPH 清除活性显著升高,活性保持率分别为 $(49.10 \pm 2.64)\%$ 和 $(12.72 \pm 0.44)\%$ 。出现这种差异的原因可能是,肽段经胰蛋白酶处理后外部基团暴露,结构、氨基酸组成和疏水性发生了改变^[14]。综上所述,3 条油茶抗氧化肽中,AT-9 抵抗胃肠道消化的能力最强。



注:不同小写字母表示同一样品在不同消化阶段的活性保持率差异显著($P < 0.05$)。

图 7 体外模拟消化对 AT-9、LC-9 和 TS-11 抗氧化活性的影响

Fig.7 Effects of *in vitro* simulated digestion on antioxidant activities of AT-9, LC-9 and TS-11

3 结论

油茶饼粕蛋白酶解产物经分离鉴定及 PeptideRanker 数据库预测,获得 3 条具有较高抗氧化活性的肽段,分别为 LC-9、AT-9、TS-11。经热处理后,AT-9 与 LC-9 抗氧化活性未发生损失,LC-9 经 80 °C 及 100 °C 高温处理后活性显著升高,TS-11 的活性则随着处理温度的升高不断下降。在酸性及中性环境中,AT-9 与 LC-9 活性保持稳定。当 pH 值为 11 时,3 条肽的 ABTS 自由基清除活性显著升高, DPPH 自由基清除活性显著下降。金属离子对油茶抗氧化肽的影响不一,其中 Cu^{2+} 的影响最为显著。添加 Cu^{2+} 后,3 条肽的 ABTS 及 DPPH 自由基清除活性均显著下降。经胃肠道消

化酶处理后,TS-11 活性下降最为显著,AT-9 仍保持较高的抗氧化活性,具有一定的抗消化能力。综上所述,AT-9 具有较好的抗氧化活性及加工稳定性,在食品工业中具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

- [1] ZHANG S Y, ZHENG L L, ZHENG X Y, et al. Effect of steam explosion treatments on the functional properties and structure of camellia (*Camellia oleifera* Abel.) seed cake protein[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 189-197.
- [2] YU N X, SHAO S X, HUAN W W, et al. Preparation of novel self-assembled albumin nanoparticles

- from camellia seed cake waste for lutein delivery[J]. Food Chemistry, 2022, 389: 133032.
- [3] ZHENG Y J, SHI P Q, LI Y, et al. A novel ACE-inhibitory hexapeptide from camellia glutelin-2 hydrolysates: Identification, characterization and stability profiles under different food processing conditions[J]. LWT, 2021, 147: 111682.
- [4] 林秀椿, 高刚峰, 陈美高, 等. 油茶饼粕蛋白提取及抗氧化酶解产物的制备[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 219-221.
- LIN X C, GAO G F, CHEN M G, et al. Study on extraction of protein and preparation of antioxidative peptide from *Camellia oleifera* Abel.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(1): 219-221.
- [5] YAO G L, HE W, WU Y G, et al. Purification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from *Camellia oleifera* Abel. seed meal hydrolysate[J]. Journal of Food Quality, 2019, 2019: 7364213.
- [6] FENG J, MA Y L, SUN P, et al. Purification and characterisation of alpha-glucosidase inhibitory peptides from defatted camellia seed cake[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56(1): 138-147.
- [7] WANG K, LUO Q W, HONG H, et al. Novel antioxidant and ACE inhibitory peptide identified from *Arthrospira platensis* protein and stability against thermal/pH treatments and simulated gastrointestinal digestion[J]. Food Research International, 2021, 139: 109908.
- [8] 刘晓艺, 周玉岩, 过利敏, 等. 不同分子量红花籽抗氧化肽稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 94-102.
- LIU X Y, ZHOU Y Y, GUO L M, et al. Study on the stability of antioxidant peptides from safflower seeds with different molecular weight[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 94-102.
- [9] 郭其洪, 李兴丽, 范江平, 等. 辣木籽抗氧化肽的分离鉴定及其稳定性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 41-47.
- GUO Q H, LI X L, FAN J P, et al. Isolation, identification and stability analysis of antioxidant peptides from *Moringa oleifera* Seeds[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 41-47.
- [10] FENG L, PENG F, WANG X J, et al. Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of walnut meal proteins[J]. Food Research International, 2019, 116: 518-526.
- [11] AHMED T, SUN X H, UDENIGWE C C. Role of structural properties of bioactive peptides in their stability during simulated gastrointestinal digestion: A systematic review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 120: 265-273.
- [12] 高云龙, 徐梦豪, 赵祥忠. 响应面优化冰岛刺参内脏团抗氧化肽制备工艺及其组成成分[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 235-243.
- GAO Y L, XU M H, ZHAO X Z. Optimization of preparation process and quality evaluation of *Scomberomorus niphonius* viscera antioxidant peptide effervescent tablets by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 235-243.
- [13] LUO X H, WU S Z, XUE J W, et al. The bioactive peptide screening from *Torreya grandis* meal protein hydrolysates[J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101419.
- [14] GALLEGO M, MORA L, REIG M, et al. Stability of the potent antioxidant peptide SNAAC identified from Spanish dry-cured ham[J]. Food Research International, 2018, 105: 873-879.
- [15] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮 ACE 抑制肽的制备、分离纯化及稳定性[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 225-234.
- CAI J X, XIA S S, MA J W, et al. Preparation, isolation and stability of collagen ACE inhibitory peptides from the skin of *Navodon septentrionalis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(3): 225-234.
- [16] WONG F C, XIAO J B, ONG M G, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from hydrolysate of blue-spotted stingray and their stability against thermal, pH and simulated gastrointestinal digestion treatments [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 614-622.
- [17] GALLEGO M, MAURI L, ARISTOY M C, et al. Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 69: 103956.
- [18] 卢红妍, 杨行, 方丽, 等. 松仁清蛋白抗氧化肽的

- 分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 40-45.
- LU H Y, YANG H, FANG L, et al. Isolation, purification and structural identification of antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysis of pine nut kernel (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) albumin[J]. Food Science, 2019, 40(24): 40-45.
- [19] 白宝清, 贾槐旺, 张锦华, 等. 紫苏籽粕抗氧化肽的纯化、鉴定及降血脂功效研究[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(7): 92-101.
- BAI B Q, JIA H W, ZHANG J H, et al. Effects of *Perilla* seed meal antioxidant peptides on purification, identification, and lipid-lowering[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(7): 92-101.
- [20] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮胶原抗氧化肽的分离制备及稳定性研究[J]. 核农学报, 2021, 35(11): 2569-2577.
- CAI J X, XIA S S, MA J W, et al. Isolation, preparation, and stability of collagen antioxidant peptides from the skin of *Nawodon septentrionalis*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(11): 2569-2577.
- [21] 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.
- ZHANG Y, WANG F, WEN Z B, et al. Screening of wheat germ albumin-derived antioxidant peptides and its protective activity against cellular oxidative damage[J]. Food Science, 2021, 42(17): 10-18.
- [22] ZHU L J, XIONG H G, HUANG X, et al. Identification and molecular mechanisms of novel antioxidant peptides from two sources of eggshell membrane hydrolysates showing cytoprotection against oxidative stress; A combined *in silico* and *in vitro* study[J]. Food Research International, 2022, 157: 111266.
- [23] 郑婷婷, 涂宗财, 唐平平, 等. 鱼鳔胶原肽抗氧化稳定性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 9-14.
- ZHENG T T, TU Z C, TANG P P, et al. Study on antioxidation stability of collagen peptides prepared from swimming bladders[J]. Food & Machinery, 2017, 33(9): 9-14.
- [24] 王晓杰, 刘晓兰, 曲悦, 等. 两步水解法制备玉米抗氧化活性肽及产物的稳定性[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(12): 67-73.
- WANG X J, LIU X L, QU Y, et al. Preparation of corn antioxidant peptides by two-step hydrolysis and evaluation their stability[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(12): 67-73.
- [25] 姚铁俊, 张晶, 鞠兴荣, 等. 菜籽抗氧化肽 WD-HHAPQLR 的环境稳定性研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(8): 54-60.
- YAO Y J, ZHANG J, JU X R, et al. Environment stability of rapeseed antioxidant peptide WD-HHAPQLR[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(8): 54-60.
- [26] PEREIRA A M, LISBOA C R, SANTOS T D, et al. Bioactive stability of microalgal protein hydrolysates under food processing and storage conditions[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(10): 4543-4551.
- [27] 唐宁, 庄红. 玉米抗氧化肽 Leu-Pro-Phe 抗氧化稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 49-55.
- TANG N, ZHUANG H. Studies on the antioxidative stability of corn antioxidant peptide Leu-Pro-Phe[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(2): 49-55.
- [28] LEE S Y, LEE D Y, HUR S J. Changes in the stability and antioxidant activities of different molecular weight bioactive peptide extracts obtained from beef during *in vitro* human digestion by gut microbiota[J]. Food Research International, 2021, 141: 110116.
- [29] 裴云成, 朱丹, 崔采莲, 等. 杏鲍菇柄抗氧化肽的制备及其稳定性初步分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 146-152.
- PEI Y C, ZHU D, CUI C L, et al. Preparation of corn antioxidant from *Pleurotus eryngii* stalk and its stability preliminary analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(4): 146-152.
- [30] 郑志强, 刘晋, 魏晓娟, 等. 加工条件及模拟胃肠消化对小麦肽抗氧化稳定性的影响[J]. 农业机械学报, 2017, 48(9): 330-336.
- ZHENG Z Q, LIU J, WEI X J, et al. Effects of processing conditions and simulated gastrointestinal digestion on antioxidative stability of wheat peptide[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(9): 330-336.
- [31] 刘华勇, 赵强忠, 马彩霞, 等. 加工条件对辣木籽肽抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32

(10): 35–39.

LIU H Y, ZHAO Q Z, MA C X, et al. Effects of different processing conditions on antioxidant activity of *Moringa oleifera* Lam. peptide[J]. Food & Machinery, 2016, 32(10): 35–39.

[32] SINGH B P, VIJ S. *In vitro* stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes[J]. LWT, 2018, 91: 303–307.

Identification and Stability of Antioxidant Peptides from Camellia Seed Cake

Zhu Qiaonan¹, Wang Peng¹, Yang Xuan², Yu Lin³, He Zhiping¹, Wu Fenghua^{1*}

¹College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300

²Lishui Institute of Agriculture and Forestry Sciences, Lishui 323000, Zhejiang

³Hangzhou Qiandao Lake Yaoji Industrial Co., Ltd., Hangzhou 311700)

Abstract In order to improve the added value of camellia seed cake, camellia seed cake protein was hydrolyzed with complex protease, the hydrolysates were purified by ultrafiltration and Sephadex G-25 gel chromatography, and the peptides with high antioxidant activity were obtained by LC-MS/MS sequence identification combined with PeptideRanker database screening. The effects of different temperature, pH, metal ions and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on the activity of antioxidant peptides were explored. The results showed that four components (F1–F4) were obtained by ultrafiltration and Sephadex G-25 gel, the fraction F4 had the highest activity with ABTS and DPPH radical scavenging rates of (67.56±0.32) % and (52.40±1.64) %, respectively. Three antioxidant peptides LCDQCPPHA (LC-9), ATNPPC-CQP (AT-9), and TSCSSPSYPFQ (TS-11) with high activity were obtained after amino acid sequence identification, PeptideRanker prediction and activity verification. AT-9 and LC-9 exhibited good thermal stability, and their ABTS and DPPH scavenging activities do not change significantly in the range of pH 3–9. Among the five metal ions, Cu²⁺ had the most significant effect on the antioxidant activity of three peptides. When Cu²⁺ concentration was 2 mmol/L, the ABTS and DPPH scavenging activity retention rates of LC-9 were (23.47±0.61)% and (44.57±0.58)%, respectively. In addition, AT-9 showed the highest retention of antioxidant activity after simulated gastrointestinal digestion *in vitro*, the ABTS and DPPH scavenging activity retention rates were higher than 90%. In summary, among the three antioxidant peptides, AT-9 showed high activity and stability, which can be applied in the field of food.

Keywords camellia seed cake; antioxidant peptides; separation and purification; identification; stability