

小麦蛋白源 5 种活性肽的抗氧化作用及分子机制

刘文颖¹, 任杰², 吴晗硕², 韩鲁佳^{1*}, 谷瑞增^{2*}

(¹ 中国农业大学工学院 北京 100083

² 中国食品发酵工业研究院有限公司 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心 北京 100015)

摘要 为了探讨小麦蛋白源活性肽的抗氧化作用及分子机制,从小麦蛋白中分离鉴定出 5 种活性肽:Leu-Tyr(LY)、Pro-Tyr(PY)、Tyr-Gln(YQ)、Ala-Pro-Ser-Tyr(APSY)、Arg-Gly-Gly-Tyr(RGGY)。通过 DPPH 自由基清除能力、羟基自由基清除能力、氧自由基吸收能力(ORAC 值)、还原能力和总抗氧化能力(FRAP 法)5 种抗氧化评价指标研究其抗氧化作用。结果表明:LY、PY、YQ、APSY 和 RGGY 均具有良好的抗氧化活性,其中 PY 的抗氧化能力最为突出,活性值分别为(88.90±2.25)%, (5 143.68±65.45) $\mu\text{mol Trolox/g}$, (55.64±1.12)%, 0.27±0.02 和(0.68±0.01) mmol/L。采用量子化学方法对小麦蛋白源活性肽的化学结构进行分子模拟,获得稳定的优势构象,其分子能量分别为-2 792 298.02, -2 490 523.05, -2 831 549.24, -3 977 343.70, -4 111 743.04 kJ/mol。采用分子对接技术获得 5 种活性肽与 DPPH 的最优对接构型,LY 和 RGGY 通过氢键和 Π -阳离子静电相互作用与 DPPH 结合,PY 通过 Π - Π 堆积、 Π -阳离子静电相互作用和 Π -阴离子静电相互作用与 DPPH 结合,YQ 通过 Π -阳离子静电相互作用和 Π -阴离子静电相互作用与 DPPH 结合,APSY 通过氢键、 Π - Π 堆积、 Π -阳离子静电相互作用和 Π -阴离子静电相互作用与 DPPH 结合。

关键词 小麦蛋白源肽; 抗氧化活性; 分子机制; 量子化学计算; 分子对接技术

文章编号 1009-7848(2024)10-0062-09 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.10.006

机体在正常生理状态下具备一定的抗氧化防御系统,使体内自由基的产生和消除维持平衡状态。当自由基的代谢失去平衡时,多余的自由基导致细胞凋亡甚至损伤,进而引起机体的功能紊乱与病变^[1-2]。人工合成抗氧化剂,如二丁基羟基甲苯(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)、特丁基对苯二酚(TBHQ)等虽然具有较强的抗氧化作用,但是具有潜在的毒副作用,其安全性受到广泛质疑^[3]。食源性蛋白肽不仅天然安全,可以为机体提供营养,还具有好的生理活性,近年来受到人们的青睐和关注^[4-5]。

小麦肽是由小麦蛋白经生物酶解、分离纯化等工艺制得的蛋白肽混合物。有研究表明,小麦肽具有较好的抗氧化作用^[6-7]。Karami 等^[6]利用不同蛋白酶酶解小麦胚芽蛋白制备出 3 种小麦肽,DPPH 自由基清除能力测定结果表明,EC₅₀ 值分别

为 1.56, 1.78, 1.83 mg/mL。Zhang 等^[7]利用 Alcalase 2.4L 水解小麦胚芽蛋白以获得小麦肽(分子质量< 1 000 u),其 DPPH 自由基清除活性的 EC₅₀ 为 2.77 mg/mL。小麦肽的氨基酸组成和空间结构复杂,有必要研究其发挥抗氧化作用的构效关系和机制。

本实验室前期从小麦肽中分离鉴定出 5 种活性肽:Leu-Tyr(LY)、Pro-Tyr(PY)、Tyr-Gln(YQ)、Ala-Pro-Ser-Tyr(APSY)和 Arg-Gly-Gly-Tyr(RGGY),并对其含量进行分析^[8],然而尚未对活性肽的抗氧化活性进行全面和系统的研究,抗氧化肽的作用机制也有待进一步阐明。本研究通过 DPPH 自由基清除能力、氧自由基吸收能力(ORAC 值)、羟基自由基清除能力、总抗氧化能力(FRAP 值)和还原能力 5 种体外抗氧化评价指标研究小麦蛋白源活性肽的抗氧化作用,并利用量子化学计算方法对活性肽进行分子模拟,然后通过分子对接技术探讨其与 DPPH 结合的最优构型、作用位点及模式,以期揭示小麦蛋白源活性肽发挥抗氧化作用的关键结构位点及作用机制,为小麦肽功能性产品的开发和生产提供理论依据。

收稿日期: 2023-10-15

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目
(2021BEG02027)

第一作者: 刘文颖,女,博士生

通信作者: 韩鲁佳 E-mail: hanlj@cau.edu.cn

谷瑞增 E-mail: guruizeng@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦蛋白源活性肽 Leu-Tyr (LY)、Pro-Tyr (PY)、Tyr-Gln (YQ)、Ala-Pro-Ser-Tyr (APSY)、Arg-Gly-Gly-Tyr (RGGY) (纯度>98%), 上海强耀生物科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH)、荧光素、Trolox (水溶性维生素 E), 美国 Sigma 公司; 总抗氧化能力检测试剂盒 (FRAP 法), 碧云天生物技术有限公司; 硫酸亚铁、水杨酸钠、三氯化铁、铁氰化钾 (均为分析纯级), 广东汕头市西陇化工有限公司; 三氯乙酸 (分析纯级), 国药集团化学试剂。

1.2 仪器与设备

ST2100 实验室 pH 计, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; EL104 电子天平, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; Millipore Elix 15 纯水仪, 默克化工有限公司; ChemBioOffice, 美国 CambridgeSoft 公司; MOE 软件, 加拿大 Chemical Computing Group 公司; Discovery Studio 2019, 美国 BIOVIA 公司; SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Spectra MR 多功能酶标仪, 美国 DYNEX 公司。

1.3 方法

1.3.1 活性肽的固相合成 小麦蛋白源5种活性肽, 上海强耀生物科技有限公司合成。利用多肽固相合成法 (Fmoc 方法), 使用半自动多肽合成仪从序列 C 端到 N 端合成粗肽, 然后, 用高效液相色谱仪将粗肽提纯至 98% 以上, 将纯化好的液体放入冻干机中浓缩, 冻干成白色粉末, 检测合成好的多肽纯度。

1.3.2 DPPH 自由基清除能力测定 用无水乙醇配制 0.1 mmol/L DPPH 溶液, 加入 100 μ L DPPH 溶液于 96 孔板中, 再加入 100 μ L 样品溶液, 在波长 517 nm 处测定吸光值 A_x 。将 100 μ L 无水乙醇与 100 μ L 样品溶液混合, 测定吸光值 A_0 ; 将 100 μ L 0.1 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液与 100 μ L 蒸馏水混合, 测定吸光值 A_1 ^[9]。DPPH 自由基清除率按公式 (1) 计算。

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

1.3.3 ORAC 值测定 取 25 μ L 样品溶液与 100

μ L 0.8 μ mol/L 荧光素溶液于黑色 96 孔板中混合, 37 $^{\circ}$ C 保温 20 min, 然后快速加入 75 μ L 150 mmol/L AAPH 溶液启动反应。以 25 μ L 不同浓度的 Trolox 溶液代替样品溶液, 用于制作标准曲线。用 25 μ L 75 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 代替样品溶液作为空白对照。另做不加 AAPH 的对照。设置荧光酶标仪的激发波长为 485 nm, 发射波长为 530 nm, 时间间隔为 5 min。ORAC 值以 μ mol Trolox/g 来表示^[10]。

1.3.4 羟基自由基清除能力测定 加入 100 μ L 样品溶液于 EP 管中, 然后加入 200 μ L 5 mmol/L 水杨酸乙醇溶液、200 μ L 5 mmol/L FeSO₄ 溶液和 100 μ L 5 mmol/L H₂O₂ 溶液, 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 1 h, 取 200 μ L 反应液于 96 孔板中, 测定波长 517 nm 处吸光值 A_x ; 以 100 μ L 蒸馏水代替 H₂O₂ 溶液, 测定吸光值 A_0 ; 以 100 μ L 蒸馏水代替样品溶液, 测定吸光值 A_0 ^[11]。羟基自由基清除率按公式 (2) 计算。

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_x - A_0}{A_1}) \times 100 \quad (2)$$

1.3.5 还原能力测定 依次将 100 μ L 样品溶液、100 μ L 磷酸盐缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 6.6) 和 100 μ L 铁氰化钾 (质量分数 1%) 混合, 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴 20 min 后, 加入 100 μ L 三氯乙酸 (质量分数 10%)。取 100 μ L 反应液于 96 孔板中, 然后加入 100 μ L 蒸馏水、20 μ L FeCl₃ 溶液 (质量分数 0.1%) 反应 10 min, 测定波长 700 nm 处的吸光值^[12]。

1.3.6 FRAP 值测定 采用总抗氧化能力检测试剂盒 (FRAP 法) 测定, 依次加入 7.5 mL 三吡啶基三嗪 (TPTZ) 稀释液、750 μ L TPTZ 溶液和 750 μ L 检测缓冲液, 以此作为 FRAP 工作液。取 180 μ L FRAP 工作液和 5 μ L 样品溶液混匀后放入样品检测孔, 37 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后, 测定波长 593 nm 处吸光值; 标准曲线检测孔以 5 μ L FeSO₄ 标准溶液代替样品溶液; 空白对照孔以 5 μ L 蒸馏水代替样品溶液。结果以 mmol/L 计^[13]。

1.3.7 量子化学测定 用 ChemBioOffice2014 系列软件构建并优化小麦蛋白源5种活性肽 (Leu-Tyr, Pro-Tyr, Tyr-Gln, Ala-Pro-Ser-Tyr, Arg-Gly-Gly-Tyr) 的二维结构。使用 Gamess Interface minimize (Energy/Geometry) 对活性肽的构型进行

能量最小化,然后采用哈特里-福克(Hartree-Fock method, HF)计算方法中的 Sto-3g 和 6-31G 基组对抗氧化肽进行全分子几何构型优化,最后使用 MFF94 力场算法执行 MMFF94 最小化^[14]。

1.3.8 分子对接测定 使用 Molecular Operating Environment 中的刚性对接程序进行活性肽与 DPPH 的分子对接,将抗氧化肽设置为受体, DPPH 设置为配体,其中 DPPH(CID:2735032)的三维结构从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得,创建覆盖整个活性肽的对接口袋,选取最优构像进行对接分析,使用 Discovery studio 2019 软件对活性肽与配体的相互作用类型进行评估^[15]。

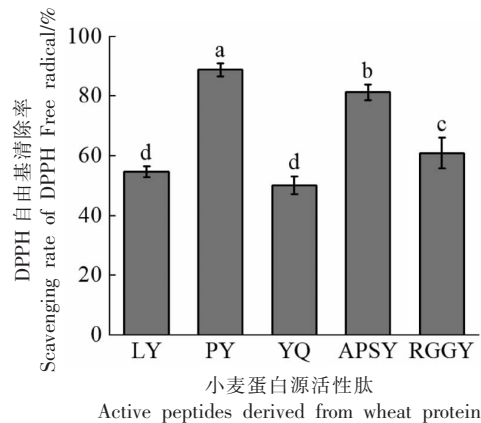
1.4 数据处理

数据用“平均值±标准偏差”($\bar{x} \pm s$)表示,试验平行测定 3 次,使用 Origin 2018 软件分析数据显著性($P < 0.05$)并作图。

2 结果与分析

2.1 小麦蛋白源活性肽的 DPPH 自由基清除能力

DPPH 法是评价抗氧化物自由基清除能力常用的方法,该方法基于电子转移机制,能较全面地评价物质的抗氧化活性。DPPH 自由基在波长 517 nm 处有强吸收,当有抗氧化物存在时,与 DPPH 的单电子配对,使其醇溶液颜色变浅,从而实现对抗氧化物的 DPPH 自由基清除能力的定量分析^[16]。由图 1 可知,在质量浓度为 1 mg/mL 时,5 种活性肽都具有一定的 DPPH 自由基清除活性。其中, PY 的 DPPH 自由基清除能力最强,显著高于其它 4 种活性肽($P < 0.05$),清除率为(88.90±2.25)%,其次是 APSY、RGGY、LY 和 YQ,清除率分别为(81.35±2.57)%、(61.00±5.14)%、(54.75±1.89)%和(50.23±2.97)%。Zhang 等^[17]在对西班牙鲭鱼皮水解物部分的 8 种胶原蛋白肽进行抗氧化活性评估时,发现存在疏水性氨基酸残基和芳香族氨基酸残基的肽段清除 DPPH 自由基效果好。Yang 等^[18]在对鲑鱼抗氧化肽的制备和表征研究中亦得出此结论。本研究中 5 种活性肽具有疏水性氨基酸残基 Leu、Gly、Pro、Ala 和芳香族氨基酸残基 Tyr,可通过供氢与 DPPH 自由基发生反应,猝灭自由基,从而呈现出较强的自由基清除能力^[19-20]。



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$),下同。

图 1 小麦蛋白源活性肽的 DPPH 自由基清除能力

Fig.1 DPPH free radical scavenging effects of active peptides derived from wheat protein

2.2 小麦蛋白源活性肽的 ORAC 值

ORAC 反应是一种基于氢原子转移机制的氧化过程,通过测定 ORAC 值可以直接反映抗氧化物对自由基链式反应的阻断能力,接近于人体生理系统的真实反应情况,是目前抗氧化能力评价国际上公认的方法^[21-22]。Trolox 是水溶性维生素 E,是一种常用的自由基清除剂。Trolox 溶液的动态荧光衰减曲线如图 2 所示。分别计算小麦蛋白源活性肽的 ORAC 值,结果如图 3 所示。PY 的 ORAC 值最高,为(5 143±65.45) $\mu\text{mol Trolox/g}$,其次是 LY[(4 858.32±97.87) $\mu\text{mol Trolox/g}$]、RGGY [(4 823.30 ± 109.30) $\mu\text{mol Trolox/g}$]、YQ [(4 795.66±62.25 $\mu\text{mol Trolox/g}$)]和 APSY [(3 833.36±429.83) $\mu\text{mol Trolox/g}$]。前 4 种活性肽的 ORAC 值均无显著性差异($P > 0.05$),高于 APSY 的 ORAC 值($P < 0.05$)。整体来说,5 种活性肽均表现出较强的 ORAC 值,表明这些活性肽能够抑制氢质子转移反应,终止自由基链式反应,达到清除自由基的目的^[23]。张燕等^[16]测定了蛋清源 4 种抗氧化肽的 ORAC 值,发现其较高的 ORAC 值可能与抗氧化肽中均含有芳香族氨基酸有关,其具有特殊结构,容易在反应中失去氢原子,从而达到猝灭自由基的目的。本研究中的 5 种活性肽均含有芳香族氨基酸 Tyr,可对其抗氧化活性起到积极作用。

2.3 小麦蛋白源活性肽的羟基自由基清除能力

羟基自由基属于活性氧自由基,是机体活动

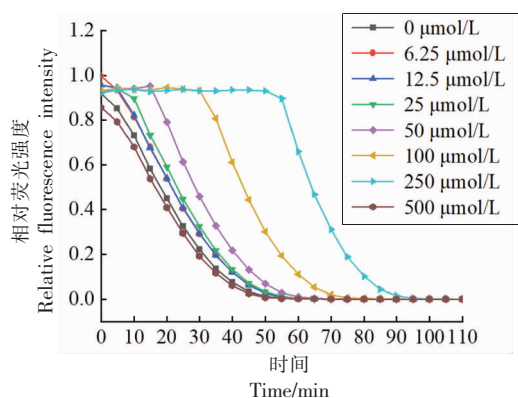


图 2 不同浓度 Trolox 的动态荧光衰减曲线

Fig.2 Dynamic fluorescence attenuation curve of Trolox at different concentrations

中多种反应的中间代谢产物,对人体毒性极大,反应速度很快,是活性最强、最活跃的一种自由基,易与机体内分子发生氧化反应,导致心脑血管、肿瘤等疾病的发生^[24]。本研究通过水杨酸钠方法评价小麦蛋白源 5 种活性肽的羟基自由基清除能力,结果如图 4 所示。其中,羟基自由基清除活性最强的是二肽 PY,在质量浓度为 2 mg/mL 时,其自由基清除率为(55.64±1.12)%,显著高于其余 4 种活性肽 ($P<0.05$),LY、YQ、APSY 和 RGGY 的自由基清除率分别为(42.85±2.72)%,(37.57±1.60)%,(23.50±5.44)%和(16.15±1.60)%。这表明小麦蛋白源活性肽可作为供氢体,提供质子使自由基还原,从而终止自由基连锁反应^[25]。有研究表明,肽的抗氧化能力与其分子质量大小有较强的相关性,小分子肽具有比大分子肽更强的抗氧化活性^[26]。本研究中的 5 种活性肽均为分子质量小于 1 000 u 的小分子肽,有利于呈现出较强的抗氧化活性。Niu 等^[27]通过酶解法制备脱脂小麦胚芽肽,经测定其羟基自由基清除活性的 EC_{50} 值为 6.04 mg/mL,自由基清除率低于本研究中活性肽的自由基清除率,表明蛋白肽混合物经分离纯化出单一肽段后,可有效提高其抗氧化功能。

2.4 小麦蛋白源活性肽的还原能力

还原能力是评价活性肽抗氧化活性的重要指标,抗氧化肽将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,通过测定反应液在波长 700 nm 处的吸光度,可评价活性肽的还原能力,吸光度越大代表活性肽的还原能力越强,抗

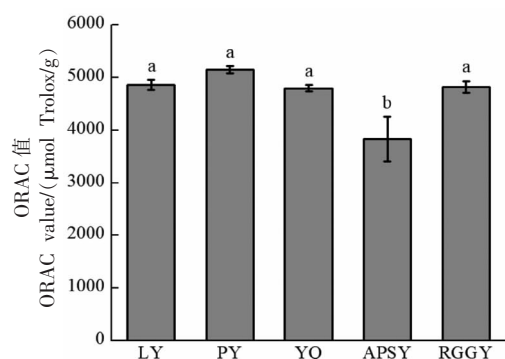


图 3 小麦蛋白源活性肽的 ORAC 值

Fig.3 ORAC values of active peptides derived from wheat protein

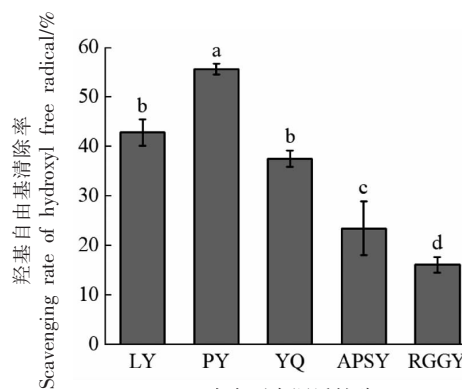


图 4 小麦蛋白源活性肽的羟基自由基清除能力

Fig.4 Hydroxyl free radical scavenging effects of active peptides derived from wheat protein

氧化活性也就越强^[28]。质量浓度为 1 mg/mL 时,5 种活性肽都具有一定的还原能力,如图 5 所示。其中,PY 和 RGGY 的还原能力最强,显著高于其它 3 种活性肽 ($P<0.05$),吸光值分别为 $0.27±0.02$, $0.27±0.01$,其次是 LY、APSY 和 YQ,吸光值分别为 $0.23±0.02$, $0.23±0.03$ 和 $0.16±0.01$ 。有研究表明 Tyr、Pro、Ala、Leu 等抗氧化氨基酸可通过充当氢供体或质子供体来发挥抗氧化功能^[29]。5 种活性肽中具有这些抗氧化氨基酸残基,对其抗氧化活性产生一定的积极作用。Siow 等^[30]研究表明含有重复单元氨基酸残基的肽段具有更高的生物学特性,可发挥更好的生物作用。本研究中的四肽 RGGY 具有“二肽”成分 Gly-Gly(GG),呈现较高的抗氧化能力。另外,N 末端的 Leu 对活性肽的抗

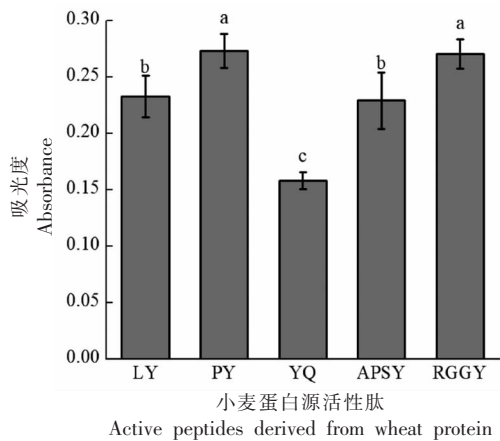


图5 小麦蛋白源活性肽的还原能力

Fig.5 Reducing power of active peptides derived from wheat protein

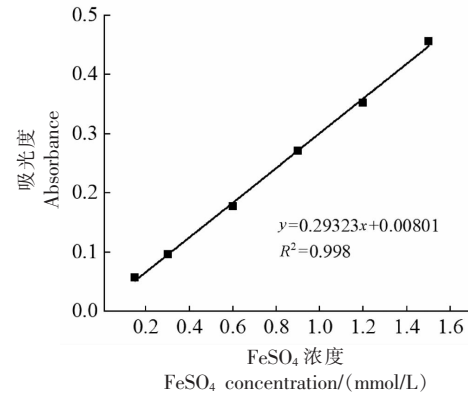


图6 FeSO₄标准曲线

Fig.6 FeSO₄ standard curve

氧化能力也起到促进作用^[31-32],二肽 LY 的 N 末端具有 Leu,这对其抗氧化活性有一定影响。

2.5 小麦蛋白源活性肽的 FRAP 值

FRAP 法是测定物质总抗氧化能力的一种方法,其原理是在酸性条件下抗氧化物质将 Ferric-tripyridyltriazine(Fe³⁺-TPTZ)还原生成蓝色的 Fe²⁺-TPTZ,通过在波长 593 nm 处测定其 FRAP 值,便可得到物质的总抗氧化能力。利用不同质量浓度 FeSO₄ 标准品绘制的标准曲线如图 6 所示,公式为 $y = 0.29323x + 0.00801$, $R^2 = 0.998$ 。根据 FeSO₄ 标准曲线,计算得到 5 种活性肽的 FRAP 值(图 7)。当质量浓度为 5 mg/mL 时,活性肽 LY、PY、YQ、APSY 和 RGGY 的 FRAP 值分别为 (0.53 ± 0.02) , (0.68 ± 0.01) , (0.34 ± 0.04) , (0.51 ± 0.03) , (0.53 ± 0.01) mmol/L,其中二肽 PY 的 FRAP 值最高,并且显著高于其它 4 种活性肽($P < 0.05$)。5 种活性肽通过氢原子转移,阻断自由基链式反应,从而呈现出抗氧化作用^[33]。Silva 等^[34]对亚麻籽蛋白肽经反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化的 6 个组分进行 FRAP 值测定,结果发现分子质量较低的组分 FRAP 值较高。5 种活性肽为分子质量较小的短肽,并具有一些疏水性氨基酸残基,这些肽段的特定结构可提高活性肽的抗氧化能力。张文敏等^[35]对亚麻籽粕肽 FRAP 值的研究也得出类似的结论。

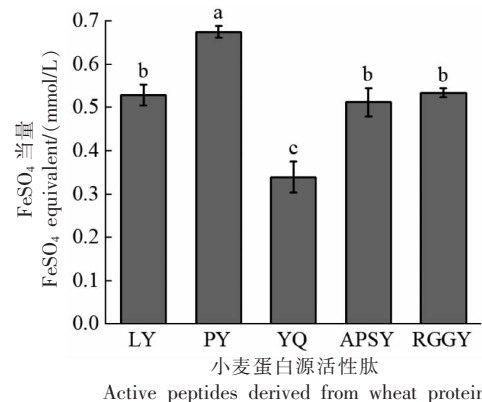


图7 小麦蛋白源活性肽的 FRAP 值

Fig.7 FRAP value of active peptides derived from wheat protein

2.6 小麦蛋白源活性肽的优势构象和分子能量

抗氧化肽的活性与其氨基酸残基种类和空间构象等有关,研究抗氧化肽的构效关系有助于阐明抗氧化肽的作用机制。量子化学可用于研究分子的结构、性能以及分子与分子之间的相互作用等,近年来被应用于活性肽的构效关系研究^[36]。其中,MMFF94 非常适合于蛋白质及其它生物结构的能量计算^[14]。通过量子化学方法优化小麦蛋白源 5 种活性肽的几何结构,获得活性肽的优势构象和分子能量。如表 1 所示,5 种活性肽 LY、PY、YQ、APSY 和 RGGY 的分子能量分别为 $-2\ 792\ 298.02$, $-2\ 490\ 523.05$, $-2\ 831\ 549.24$, $-3\ 977\ 343.70$,

表 1 小麦蛋白源肽的分子能量

Table 1 Molecular energy of wheat protein-derived peptides

活性肽	LY	PY	YQ	APSY	RGGY
$E_{\text{RHF}}/(\text{kJ/mol})$	-2 792 298.02	-2 490 523.05	-2 831 549.24	-3 977 343.70	-4 111 743.04

-4 111 743.04 kJ/mol, 其中 RGGY 的分子能量最小,其次是 APSY、YQ、LY 和 PY。根据量子化学理论,分子能量越小,分子的结构相对越稳定^[37]。四肽 APSY 和 RGGY 的肽链长度较其余 3 种二肽要长,有利于形成氢键以及其它疏水作用力。

2.7 小麦蛋白源活性肽与 DPPH 的分子对接和相互作用

分子对接是一种基于配体和受体之间的空间匹配和能量匹配原理,预测配体在受体结合位点的最佳位置和亲和力的方法^[14],其具有潜在的应用前景,可广泛应用于研究抗氧化肽与自由基的相互作用,抗氧化药物的研究、设计和合成^[15]。图 8 展示 DPPH 的三维结构,通过分子对接技术获得 5 种活性肽和 DPPH 的最佳结合构型,解析活性肽与自由基的相互作用模式(图 9)。其中,LY 的 Leu 与 DPPH 形成两种作用力,分别是 1 个氢键和 2 个 Π -阳离子静电相互作用;PY 的 Tyr 与 DPPH 形成 3 种作用力,分别是 1 个 Π - Π 堆积、1 个 Π -阳离子静电相互作用和 1 个 Π -阴离子静电相互作用;YQ 的 Tyr 与 DPPH 形成 2 种作用力,分别是 3 个 Π -阳离子静电相互作用和 1 个 Π -阴离子静电相互作用,此外,Gln 还与 DPPH 形成 1 个氢键;APSY 的 Ala、Ser 与 DPPH 形成 2 个氢键,Tyr 与 DPPH 形成 1 个 Π - Π 堆积、1 个 Π -阳离子静电相互作用和 1 个 Π -阴离子静电相互作用;RGGY 的 Arg 与 DPPH 形成 1 个氢键和 2 个

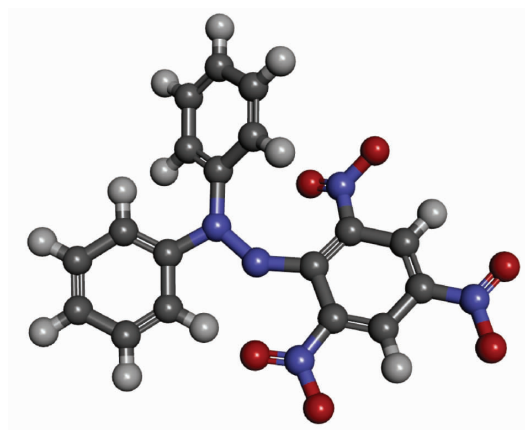


图 8 DPPH 的三维结构

Fig.8 Three-dimensional structure of DPPH

Π -阳离子静电相互作用,此外,Gly 还与 DPPH 形成 1 个氢键。

基于以上结果可知,5 种活性肽与 DPPH 分子之间均存在较强的相互作用力,这些活性肽均为分子质量较低的短肽,低分子质量有利于活性肽与目标分子的结合^[32]。本研究中的活性肽与 DPPH 分子具有强氢键、静电相互作用和疏水相互作用,这使得 5 种活性肽具有很强的 DPPH 自由自由基清除活性。这与文超婷^[32]对西瓜籽源抗氧化肽 Arg-Asp-Pro-Glu-Glu-Arg (RDPEER)与 DPPH 分子对接研究的结果一致。Agrawal 等^[38]也发现小米源抗氧化肽 Thr-Ser-Ser-Ser-Leu-Asn-Met-Ala-Val-Arg-Gly-Gly-Leu-Thr-Arg

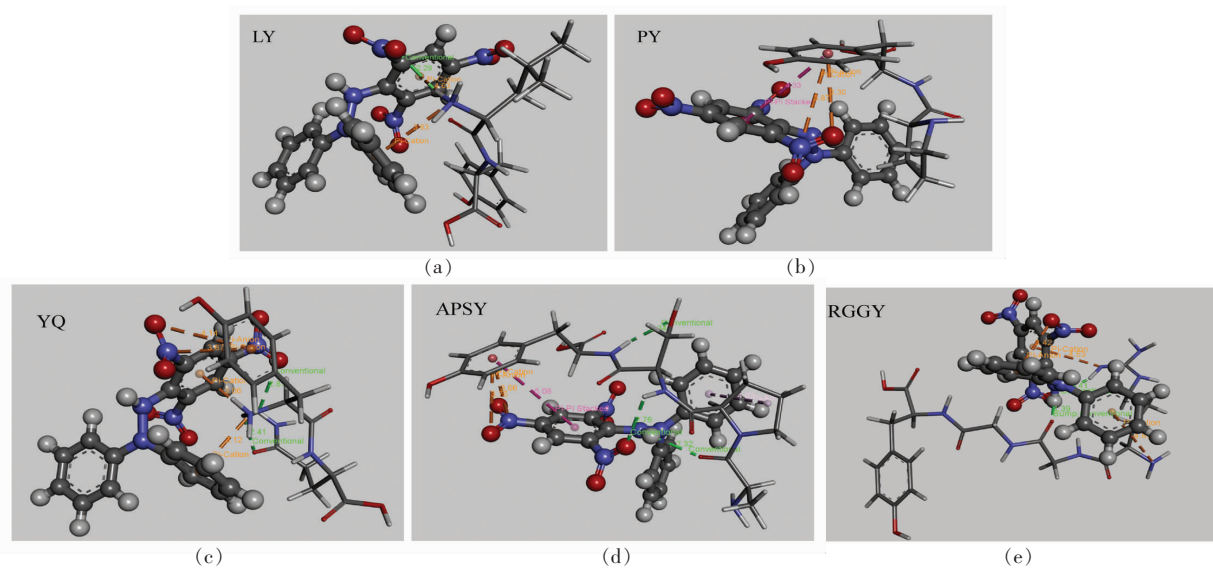


图 9 小麦蛋白源肽活性和 DPPH 对接的最优模型

Fig.9 Optimal docking model of active peptides derived from wheat protein and DPPH

(TSSSLNMAVRGGLTR)和 Ser-Thr-Thr-Val-Gly-Leu-Gly-Ile-Ser-Met-Arg-Ser-Ala-Ser-Val-Arg (STTVGLGISMRSASVR)中的 Ser 能够与 DPPH 形成氢键,具有较强的抗氧化作用。

3 结论

小麦蛋白源 5 种活性肽 LY、PY、YQ、APSY 和 RGGY 具有良好的 DPPH 自由基清除能力、羟基自由基清除能力、氧自由基吸收能力、还原能力和总抗氧化能力。PY 在 5 种评价体系中的抗氧化能力均最强,试验浓度下的活性值分别为(88.90±2.25)%, (5 143.68±65.45) μmol Trolox/g, (55.64±1.12)%, 0.27±0.02 和 (0.68±0.01) mmol/L。LY、PY、YQ、APSY 和 RGGY 的分子能量分别为 -2 792 298.02, -2 490 523.05, -2 831 549.24, -3 977 343.70, -4 111 743.04 kJ/mol。5 种活性肽与 DPPH 分子之间均存在较强的相互作用力,包括强氢键、静电相互作用和疏水相互作用。后续研究将基于动物模型研究小麦蛋白源 5 种活性肽的体内抗氧化作用,进一步明确活性肽在体内的抗氧化功效及其作用机理。

参 考 文 献

- [1] LUSHCHAK V I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2014, 224: 164-175.
- [2] 李婷, 翁武银. 鲍鱼内脏蛋白肽的理化性质及其抗氧化活性[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(12): 76-82. LI T, WENG W Y. Physicochemical properties and antioxidant activity of abalone visceral peptide [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(12): 76-82.
- [3] 张强, 李伟华. 抗氧化肽的研究现状[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(2): 298-304. ZHANG Q, LI W H. Research progress of antioxidant peptides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(2): 298-304.
- [4] YI G, DIN J U, ZHAO F, et al. Effect of soybean peptides against hydrogen peroxide induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signaling[J]. *Food & Function*, 2020, 11(3): 2725-2737.
- [5] NORDBERG J, ARNER E S J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1312.
- [6] KARAMI Z, PEIGHAMBARDUST S H, HESARI J, et al. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates [J]. *Food Bioscience*, 2019, 32: 100450.
- [7] ZHANG J X, WEN C T, LI C Z, et al. Antioxidant peptide fractions isolated from wheat germ protein with subcritical water extraction and its transport across Caco-2 cells[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(8): 2139-2146.
- [8] LIU W Y, ZHANG J T, TAKUYA M, et al. Antioxidant properties and inhibition of angiotensin-converting enzyme by highly active peptides derived from wheat gluten[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 5206.
- [9] PENG X Y, XIONG Y L, KONG B H. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance[J]. *Food Chemistry*, 2008, 113(1): 196-201.
- [10] BIER M C J, MEDEIROS A B P, KIMPE N D, et al. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp [J]. *Biotechnology Research and Innovation*, 2019, 3(1): 168-176.
- [11] NIU L Y, JIANG S T, PAN L J. Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 50(1): 53-61.
- [12] SHEN Q, OU A N, LIU S, et al. Effects of ion concentrations on the hydroxyl radical scavenging rate and reducing power of fish collagen peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(4): e12789.
- [13] SILVA F G D E, HERNÁNDEZ-LEDESMA B, AMIGO L, et al. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by alcalase hydrolysis: antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 76: 140-146.
- [14] WEN C T, ZHANG J X, ZHANG H H, et al. Study on the structure-activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular

- simulations[J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130432.
- [15] 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.
- [16] 张燕, 陈志飞, 赵颂宁, 等. 蛋清源抗氧化肽对 HEK293 细胞氧化应激损伤的抑制作用及机制[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 11-22.
- ZHANG Y, CHEN Z F, ZHAO S N, et al. The anti-oxidative effects and mechanism of antioxidant peptides from egg white against oxidative stress injury in human embryonic kidney 293 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(10): 11-22.
- [17] ZHANG J B, ZHAO Y Q, WANG Y M, et al. Eight collagen peptides from hydrolysate fraction of Spanish mackerel skins: Isolation, identification, and *in vitro* antioxidant activity evaluation[J]. Marine Drugs, 2019, 17(4): 224.
- [18] YANG X R, ZHAO Y Q, QIU Y T, et al. Preparation and characterization of gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) bone stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Marine Drugs, 2019, 17(2): 78.
- [19] ZHOU C S, HU J L, MA H L, et al. Antioxidant peptides from corn gluten meal: Orthogonal design evaluation[J]. Food Chemistry, 2015, 187(15): 270-278.
- [20] 吉正梅, 张晓春, 彭钰迪, 等. 鸭胚源抗氧化肽 TD12 对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 141-148.
- JI Z M, ZHANG X C, PENG Y D, et al. Protective effect of duck embryo-derived antioxidant peptide TD12 on oxidative stress damage in HepG2 cells[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 141-148.
- [21] 马思彤, 刘静波, 张婷, 等. 体外模拟胃肠消化及碱性蛋白酶处理后蛋清肽抗氧化活性差异及肽序列解析[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 113-120.
- MA S T, LIU J B, ZHANG T, et al. Differences in antioxidant activity and sequence analysis of egg white peptides derived from simulated gastrointestinal digestion and alkaline protease treatment[J]. Food Science, 2020, 41(21): 113-120.
- [22] 于亚莉, 宋雪梅, 关玉, 等. 玉米肽 Tyr-Phe-Cys-Leu-Thr 对酒精性 HepG2 细胞的保护作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 43-52.
- YU Y L, SONG X M, GUAN Y, et al. Protective effect of corn peptide Tyr-Phe-Cys-Leu-Thr on alcoholic HepG2 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 43-52.
- [23] CHEN H, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.
- [24] GLIGOROVSKI S, STREKOWSKI R, BARBATI S, et al. Environmental implications of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) [J]. Chemical Reviews, 2015, 115(24): 13051-13092.
- [25] 任海伟, 石菊芬, 王曼琪, 等. 藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力及结构表征[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 162-169.
- REN H W, SHI J F, WANG M Q, et al. Antioxidant capacity of placental peptide from tibetan sheep and its structural characterization[J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 162-169.
- [26] FENG C J, WANG B N, ZHAO A Q, et al. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp[J]. Food Chemistry, 2019, 277(30): 238-245.
- [27] NIU L Y, JIANG S T, PAN L J. Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(1): 53-61.
- [28] QIN X Y, ZHANG J T, LI G M, et al. Selenium-chelating corn oligopeptide as a potential antioxidant supplement: Investigation of the protein conformational changes and identification of the antioxidant fragment composition[J]. International Journal of Food Engineering, 2020, 16(4): 20190166.
- [29] WONG F C, XIAO J B, WANG S Y, et al. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 44-57.
- [30] SIOW H L, GAN C Y. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from parkia speciosa seeds[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4):

- 3435–3442.
- [31] WANG L S, HUANG J C, CHEN Y L, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of duck meat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(13): 3437–3444.
- [32] 文超婷. 西瓜籽肽的抗氧化构效关系及其分子机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
WEN C T. Study on the structure–activity relationship and molecular mechanism of watermelon seed antioxidant peptides[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- [33] PRIOR R L, WU Xianli, SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(10): 4290–4302.
- [34] SILVA F G D E, HERNÁNDEZ–LEDESMA B, AMIGO L, et al. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by alcalase hydrolysis: Antioxidant activity [J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2017, 76: 140–146.
- [35] 张文敏, 张健, 周浩纯, 等. 亚麻籽粕制备小分子抗氧化活性肽[J]. *食品科学*, 2020, 41(8): 36–44.
ZHANG W M, ZHANG J, ZHOU H C, et al. Preparation of small molecular antioxidant peptides from flaxseed meal[J]. *Food Science*, 2020, 41(8): 36–44.
- [36] WU R B, HUANG J F, HUAN R, et al. New insights into the structure–activity relationships of antioxidative peptide PMRGGGGYHY[J]. *Food Chemistry*, 2021, 337: 127678.
- [37] ANOURE E, CALLISTEC C A, KOSINOVA P, et al. Free radical scavenging properties of guaiacol oligomers: A combined experimental and quantum study of the Guaiacyl–moiety role [J]. *Journal of Physical Chemistry A*, 2009, 113(50): 13881–13891.
- [38] AGRAWAL H, JOSHI R, GUPTA M. Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate[J]. *Food Research International*, 2019, 120: 697–707.

Antioxidant Effect and Molecular Mechanism of Five Active Peptides Derived from Wheat Protein

Liu Wenying¹, Ren Jie², Wu Hanshuo², Han Lujia^{1*}, Gu Ruizeng^{2*}

¹College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

²Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing 100015)

Abstract In order to explore the antioxidant effect and molecular mechanism of five active peptides derived from wheat protein, five active peptides [Leu–Tyr (LY), Pro–Tyr (PY), Tyr–Gln (YQ), Ala–Pro–Ser–Tyr (APSY), Arg–Gly–Gly–Tyr (RGGY)] were isolated and identified from wheat protein. Five antioxidant evaluation systems including DPPH free radical scavenging capacity, hydroxyl free radical scavenging capacity, oxygen free radical absorption capacity (ORAC value), reducing capacity and total antioxidant capacity (FRAP method) were used to investigate their antioxidant effects. The results showed that LY, PY, YQ, APSY and RGGY had good antioxidant activity in five evaluation systems, among which PY had the most prominent antioxidant activity, and the activity values were (88.90±2.25)%, (5143.68±65.45) μmol Trolox/g, (55.64%±1.12)%, 0.27±0.02 and (0.68±0.01)mmol/L, respectively. The chemical structure of wheat protein–derived active peptides was simulated by quantum chemistry, and stable dominant conformation was obtained. The molecular energies were –2 792 298.02, –2 490 523.05, –2 831 549.24, –3 977 343.70 and –4 111 743.04 kJ/mol. The optimal docking configurations of five active peptides and DPPH were obtained by molecular docking technology. LY and RGGY bound to DPPH through hydrogen bonds and Π –cationic electrostatic interaction, PY bound to DPPH through Π – Π accumulation Π –cationic electrostatic interaction and Π –anionic electrostatic interaction, YQ bound to DPPH through Π –cationic electrostatic interaction and Π –anionic electrostatic interaction, and APSY bound to DPPH through hydrogen bond, Π – Π accumulation, Π –cationic electrostatic interaction and Π –anionic electrostatic interaction.

Keywords wheat protein–derived peptides; antioxidant activity; molecular mechanism; quantum chemical calculation; molecular docking technology