

大米抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定

赵晓蕾¹ 田甜¹ 胡远亮^{1,2} 赵述森¹ 梁运祥¹

1.华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070;

2.湖北师范大学食用野生植物保育与利用湖北省重点实验室,黄石 435002

摘要 通过高效凝胶过滤层析和反相高效液相色谱先后对大米渣蛋白酶解后的多肽溶液进行分离纯化,分别得到组分2和组分RF9;再经反相高效液相色谱-质谱联用对组分RF9进行分析鉴定得到抗氧化肽氨基酸序列L-Q-P-Y(Leu-Gln-Pro-Tyr),分子质量为520.277 u。合成的抗氧化肽片段L-Q-P-Y质量浓度为1 mg/mL时,对DPPH自由基清除率达到85.84%。

关键词 大米渣;大米抗氧化肽;DPPH自由基;反相高效液相色谱-质谱联用

中图分类号 TS 201 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0102-06

我国是稻谷生产大国,年产稻谷1.8亿t以上,约占世界总产量的42%^[1]。大米渣是味精厂、柠檬酸厂、糖厂等工厂的下脚料,目前,我国约有上千家葡萄糖厂和味精厂,其中一半以上利用大米淀粉发酵生产^[2],大米渣中的蛋白含量高达60%(干基)以上,是大米中蛋白含量的6~10倍^[3]。与谷类蛋白相比,大米蛋白的生物价(BV)和蛋白质效用比率(PER)更高^[4],氨基酸组成配比更合理,含有机体必需氨基酸^[5]。此外,大米蛋白的低过敏性使之非常适合作为特殊人群食品^[6-8]。因此,开发利用大米蛋白,提高大米蛋白附加值,具有重要的应用价值。

酶解大米渣生产多肽,在大米利用率提高的同时还能够研发具有新功能的米多肽产品,对食品和饲料行业的发展意义重大^[9]。大米多肽除了具有一般大米蛋白的营养功能外,还在消化吸收和保健方面有广泛的应用^[10]。抗氧化肽作为一种非酶类自由基清除剂正在兴起^[11],如大豆蛋白抗氧化肽、玉米蛋白抗氧化肽、小麦蛋白抗氧化肽,而大米抗氧化肽是目前的研究热门之一。近年来,研究发现大米被蛋白酶水解时,具有抗氧化活性的肽序列释放出来,它的抗氧化活性强于游离氨基酸和大分子蛋白质,具有清除自由基和抑制生物大分子氧化的能力^[12]。

然而,国内外对大米蛋白抗氧化肽的研究报道

较少^[13]。本研究采用酶法制备大米多肽,研究大米多肽对DPPH自由基的清除率,并对具有抗氧化能力的多肽进行分离纯化和结构鉴定,旨在为大米渣的精深加工及综合利用提供理论基础和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大米渣来自湖北裕丰糖业有限公司;蛋白酶K由笔者所在实验室自主构建工程菌液态发酵获得;DPPH、乙腈和三氟乙酸等为美国Sigma公司生产;其他试剂由国药集团化学试剂有限公司生产。

AKTA purifier 100蛋白质纯化仪,瑞典安玛西亚公司;Synergy HT酶标仪,美国Biotek公司;1260-6540液相色谱-质谱联用仪,美国Agilent Technologies公司。

1.2 大米抗氧化肽的制备

大米渣→粉碎(过孔径0.037 mm网筛)→加入蛋白酶K进行酶解(温度60℃,pH 8.0,料水比1:7(m/V),酶添加量6 000 U/g,酶解时间6 h)→灭酶活(沸水浴10 min)→离心(7 000 r/min,10 min)→取上清→过3 ku超滤膜,取透过液→冷冻干燥,得到大米抗氧化肽粗品。

1.3 大米抗氧化肽的抗氧化性测定

抗氧化剂对DPPH自由基的淬灭能力可有效

收稿日期:2016-05-12

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2015CFC797)

赵晓蕾,硕士研究生。研究方向:发酵工程。E-mail: 626986967@qq.com

通信作者:梁运祥,教授。研究方向:微生物产品及发酵工艺学。E-mail: fa-lyx@163.com

地评价其抗氧化活性,国内外广泛以 DPPH 自由基清除能力来筛选天然抗氧化剂^[14]。DPPH 自由基清除率测定方法依照许明峰等^[15]的方法进行改进,简要过程如下:样品液 100 μL (用双蒸水溶解)与 100 μL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液(用无水乙醇配制)混合均匀,室温下避光反应 30 min,之后在 517 nm 处测样品的吸光度(A_i),空白组(A_j)用等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液,其他条件与试验组相同,对照组(A_0)用等体积无水乙醇代替样品溶液,其他条件相同。DPPH 自由基清除率按下式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

1.4 大米抗氧化肽的分离纯化

1) 高效凝胶过滤层析(GFC)分离纯化大米抗氧化肽粗品。选用 Superdex Peptide 10/300 GL 层析柱分离大米多肽液粗品,收集洗脱峰后冷冻干燥,重复收集,将收集的洗脱峰配制成相同质量浓度的溶液,测其对 DPPH 自由基的清除率,筛选出抗氧化活性最高的组分。

色谱条件为:Superdex Peptide 10/300 GL 层析柱,上样量 300 μL ,流速为 0.5 mL/min,洗脱液为 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液,检测波长为 280 nm^[16]。

2) 反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化大米抗氧化肽。将凝胶过滤层析分离获得的抗氧化活性最强的组分冻干,然后用超纯水溶解后经反相高效液相色谱进一步分离纯化。重复试验收集洗脱峰进行冷冻干燥,将各洗脱峰配制成相同浓度,测其对 DPPH 自由基的清除率,筛选出抗氧化活性最高的组分。

色谱条件:YMC-Pack ODS-AQ(250 mm \times 4.6 mm,5 μm) 色谱柱;检测波长 280 nm;进样量 20 μL ;流速 0.5 mL/min;流动相为超纯水(A,含 0.1% TFA)和乙腈(B,含 0.1% TFA);梯度洗脱:0~5 min,5%~20% B;5~25 min,20%~30% B;25~30 min,30%~5% B。

1.5 大米抗氧化肽的氨基酸序列测定

采用反相高效液相色谱-质谱联用法(RP-HPLC-ESI-MS)测定样品的氨基酸序列。经 RP-HPLC 分析得到最高活性的收集液,以 0.4 mL/min 的速度穿过电喷雾界面进入质谱仪(Agilent 6540 UHD Q-TOF, America)。采用正离子扫描模式,雾化气和干燥气为高纯氮气,质谱仪自动对来自于反相高效液相色谱的洗脱组分交替进行一级质谱

(MS)和二级质谱(MS/MS)处理。

液相色谱条件:检测器 Agilent Technologies 1260 Infinity;色谱柱 ZORBAX Eclipse Plus C18;流速:0.3 mL/min,进样量:2.0 μL ,流动相同本文“1.4”RP-HPLC 中色谱条件。

质谱条件:离子源为 Dual ESI,脱溶剂气体温度 300 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气体流量 9 L/min,毛细管电压 4 000 V,碰撞能量 150 V,锥孔电压 65 V,扫描范围(m/z):50~1 800。

质谱数据解析由软件 ProteinPilot v 4.0 完成(武汉金开瑞生物工程有限公司),其中数据库来自于 Uniprot 中的 rice(下载于 2016 年 2 月 29 日)。

1.6 合成大米抗氧化肽的抗氧化性验证

经质谱分析鉴定的抗氧化肽序列送到上海强耀生物科技有限公司合成,纯度为 99.5%,对合成肽进行分析和抗氧化性测定。

1.7 数据处理及分析

采用 Microsoft Excel 2013 软件和 Spass Statistics 20 软件进行数据处理,每组试验均重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 大米渣酶解前后对 DPPH 自由基清除率的变化

当大米渣、酶解液、还原型谷胱甘肽的质量浓度为 10 mg/mL 时,其对 DPPH 自由基的清除率如图 1 所示,大米渣经酶解后对 DPPH 自由基的清除率从 54% 上升到 85%,还原型谷胱甘肽为 94%。因此,大米渣本身就具有抗氧化性,能够清除 DPPH 自由基,经酶解后大米多肽的抗氧化能力显著提高,清除 DPPH 自由基能力增强,可以作为一种天然的抗氧化剂^[16]。

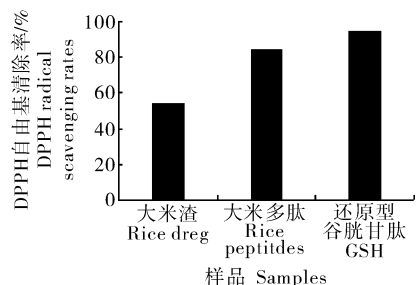


图1 大米渣、大米多肽、还原型谷胱甘肽对 DPPH 自由基的清除率

Fig.1 DPPH radical scavenging rates of rice, rice peptides and GSH

已有研究表明,对 DPPH 自由基的清除能力与大米多肽的浓度之间存在计量效应关系^[17]。将大米多肽配制成质量浓度为 2~100 mg/mL 的溶液,分别测量其对 DPPH 自由基的清除率,结果如图 2 所示,大米多肽随着质量浓度的增大对 DPPH 自由基的清除率呈先升高后趋于稳定的趋势,当其质量

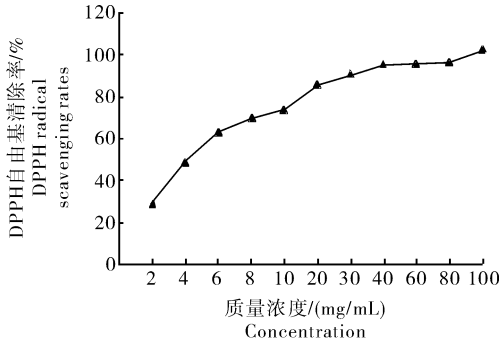


图 2 不同质量浓度大米多肽对 DPPH 自由基的清除率

Fig.2 DPPH radical scavenging rates of different concentrations of rice peptides

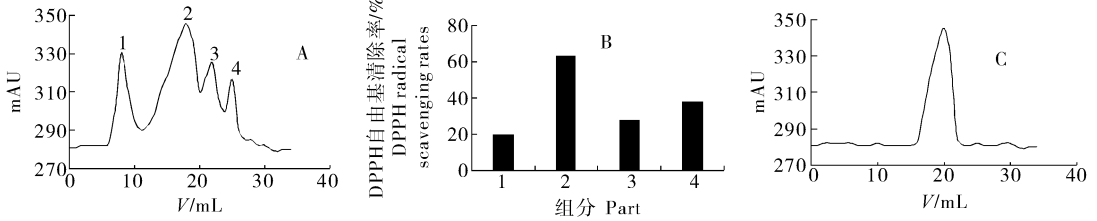


图 3 高效凝胶过滤层析的分离纯化结果

Fig.3 The separation and purification of GFC

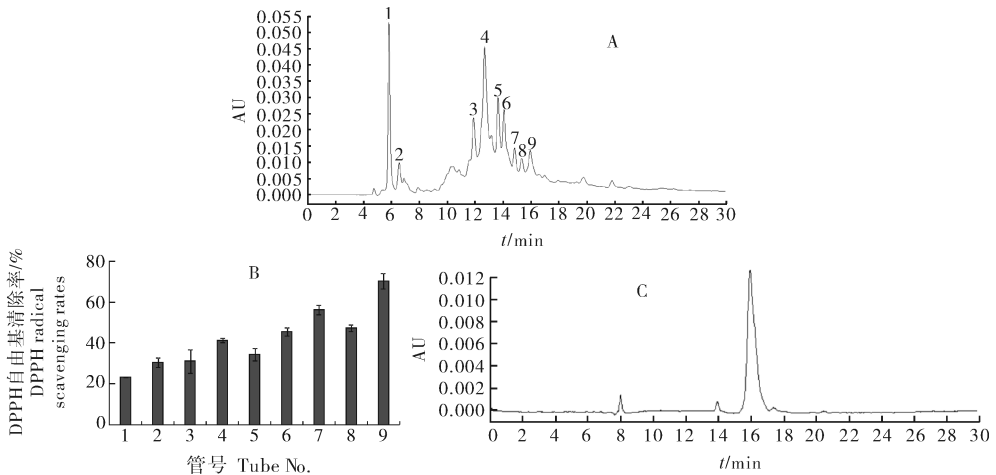


图 4 反相高效液相色谱的分离纯化

Fig.4 The separation and purification of RP-HPLC

浓度达到 40 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率已达到 96%。

2.2 高效凝胶过滤层析分离纯化结果

样品经 Superdex Peptide 10/300 GL 层析柱分离后得到 4 个洗脱峰,按照图 3A 进行重复收集,冷冻干燥,溶解后测定各个组分对 DPPH 自由基的清除率,结果如图 3B 所示。抗氧化能力最高的为组分 2,当蛋白质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 DPPH 自由基清除率达到 62.93%,重复收集组分 2 进行验证,如图 3C 所示,然后进行下一阶段的纯化。

2.3 反相高效液相色谱分离纯化结果

由图 4A 可知,组分 2 经反相高效液相色谱共得到 9 个洗脱峰,对这 9 个洗脱峰进行重复收集,冷冻干燥并测定其抗氧化能力,结果如图 4B 所示。可知 9 号峰的抗氧化能力最高,当蛋白质量浓度为 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 DPPH 自由基清除率达到 70.21%。重复收集 9 号峰,进行单峰验证(图 4C)。

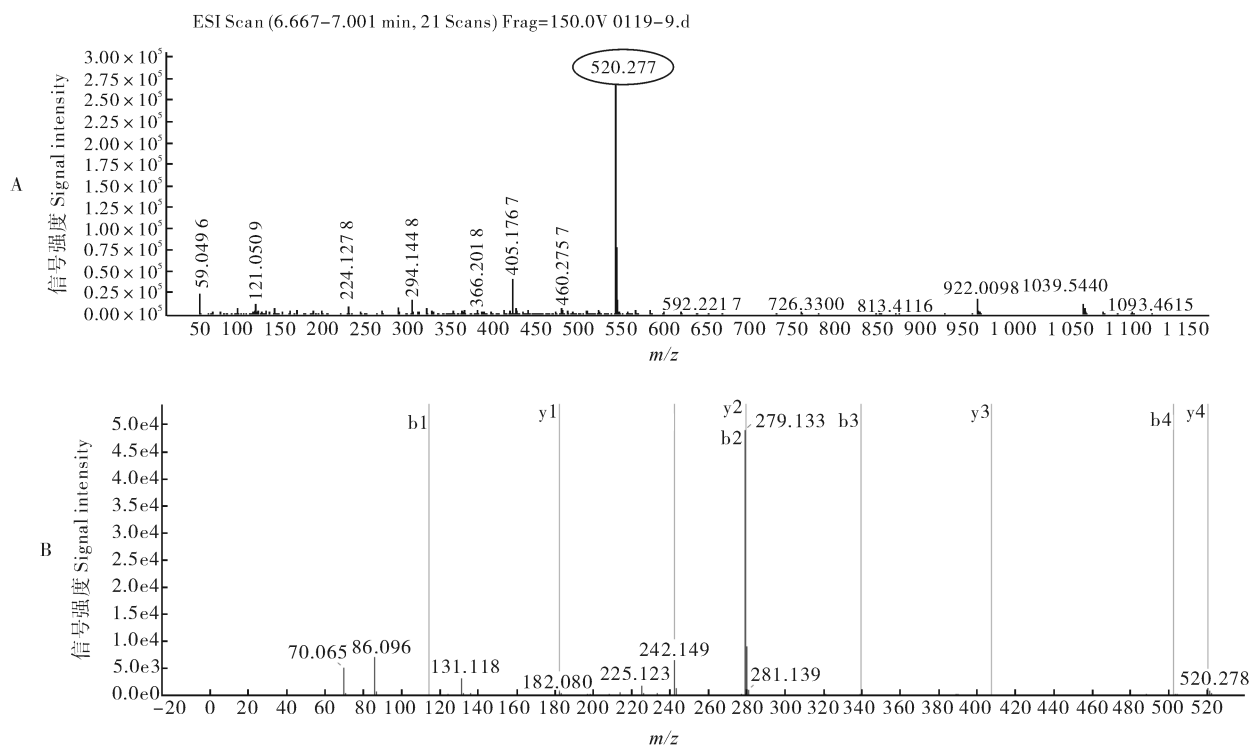
2.4 大米抗氧化肽的氨基酸序列鉴定

组分 RF9 的一级质谱和二级质谱结果分别如

图 5A 和图 5B 所示,b 离子和 y 离子碎裂结果如表 1 所示,使用 Protein Pilot v4.0 软件进行序列分

析,得到该组分的氨基酸序列为 L-Q-P-Y,分子质量为 520.277 u。质谱法测定多肽的氨基酸序列是按照质谱中的碎片离子来进行推导的,肽键断裂形成

质谱中的序列信息碎片,这些碎片还能够形成脱水、脱氨的离子。由丰度较高的 b 型离子和 y 型离子来确定待测组分的氨基酸序列^[18]。



A.组分 RF9 的一级图谱;B.主成分的二级图谱(m/z:520.277)。A.RF9 spectra of fraction; B.The TOF-TOF MS of main constituent.

图 5 组分 RF9 的质谱图

Fig.5 MS of part RF9

表 1 b 离子和 y 离子碎片

Table 1 The fragments of b ion and y ion

残基 Residue	b	b+2	y	y+2
L	114.091 3	57.549 3	520.276 6	260.641 9
Q	242.149 9	121.578 6	407.192 5	204.099 9
P	339.202 7	170.105 0	279.133 9	140.070 6
Y	502.266 0	251.636 6	182.081 2	91.544 2

2.5 合成大米抗氧化肽的抗氧化性验证

将质谱分析推测的肽片段 L-Q-P-Y 送到专业结构公司(上海强耀生物科技有限公司)进行多肽合成,验证该序列的多肽是否具有抗氧化性。图 6 和图 7 为合成的 L-Q-P-Y 验证分析图。图 8 为合成的多肽 L-Q-P-Y 对 DPPH 自由基的清除能力,当质量浓度同为 1 mg/mL,L-Q-P-Y(Leu-Gln-Pro-Tyr)

对 DPPH 自由基清除率为 85.84%,GSH 对 DPPH 自由基清除率为 95.98%,虽然与 GSH 相比仍有一定差距,但作为天然抗氧化剂仍有一定价值。

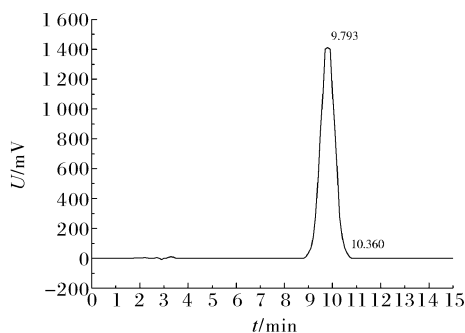


图 6 反相高效液相分析 L-Q-P-Y

Fig.6 RP-HPLC chromatogram analysis of L-Q-P-Y

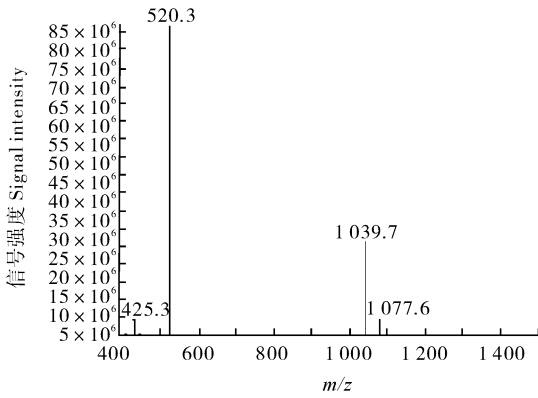


图 7 质谱分析 L-Q-P-Y

Fig.7 MS analysis of L-Q-P-Y

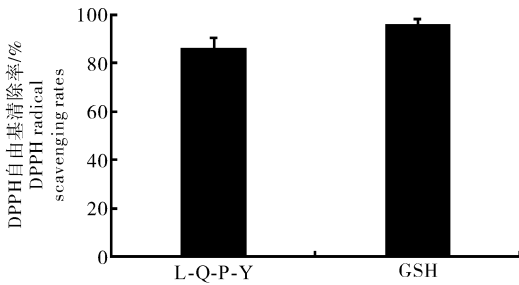


图 8 合成肽(L-Q-P-Y)与抗氧化剂 GSH 的比较

Fig.8 DPPH radical scavenging of synthesized peptide (L-Q-P-Y) and GSH

3 讨论

当今食品安全越来越受到重视,天然抗氧化肽也慢慢走进人们的生活,成为研究热点,目前国内外学者已从不同的蛋白中提取出多种具有抗氧化活性的多肽^[19]。但目前关于大米抗氧化活性肽的研究,大多只通过酶解得到具有抗氧化活性的混合肽,包括各种肽和氨基酸,有些具有抗氧化活性,有些只具有营养功能^[20]。本试验采用酶解法从大米蛋白中制备抗氧化肽,利用蛋白酶对大米蛋白的降解作用以及修饰作用,使较难溶的大米蛋白变成可溶性肽,并将混合肽进行分离纯化,最终得到具有抗氧化活性的多肽序列 L-Q-P-Y。

目前已经报道的各种抗氧化肽的分子质量都较小,唐宁^[21]从玉米蛋白酶解物中分离得到 3 种抗氧化肽 Leu-Pro-Phe (375.46 u)、Leu-Leu-Pro-Phe (488.64 u)和 Phe-Leu-Pro-Phe (522.64 u)。刘恩歧等^[22]从黑豆蛋白酶解物中分离纯化得到的 2 种抗氧化肽 Tyr-Asn-Ile (444 u)和 Trp-Asn-Pro (451 u)都是由 3 到 4 个氨基酸构成,分子质量在 1 000 u 以下。大米多肽中具有抗氧化作用的多肽

也是由一些小分子肽组成,本试验得到的大米抗氧化肽 (Leu-Gln-Pro-Tyr) 分子质量为 520.277 u,与已有的研究相一致^[23-24]。且序列中的 Leu、Pro、Tyr 是已有文献中抗氧化肽普遍含有的氨基酸,这说明某些氨基酸是组成抗氧化肽不可缺少的活性部分,它们本身能够清除自由基,也具有一定的抗氧化能力^[25-26]。

大米抗氧化肽作为食品添加剂,能够改变食品品质,延长食品的保质期,也可以阻止或延缓食品氧化的发生^[27],还能够应用于医药行业和化妆品行业,预防和治疗心血管疾病,有效清除体内多余活性氧自由基,防止发生脂质过氧化^[28]。而且制备大米抗氧化肽的原料是大米加工副产物,成本低,能提高稻米的综合利用率^[29],因此,有着广阔的应用空间和发展前景。

参 考 文 献

- [1] 姚惠源.世界稻米深加工的发展趋势和中国的潜在优势:中国粮油学会第二届学术年会论文选集[C].成都:蓝天出版社,2002.
- [2] 张术臻,王远义,唐金泉.大米多肽的生产及其在食品工业中的应用[J].粮油加工,2008(9):91-93.
- [3] 李明,李赞高,高红艳.大米蛋白研究概述[J].粮食与油脂,2006(8):3-5.
- [4] 邓霄,钟鸣,王菊,等.大米蛋白及其提取、改性的研究进展[J].粮食与饲料工业,2007(9):13-16.
- [5] 余兆海.稻谷综合利用[M].北京:中国农业出版社,1987.
- [6] HASEN L P,HOSEK R,CALLAN M, et al.The development of high-protein rice flour for early childhood feeding[J].Food technology,1981,35(11):38-42.
- [7] NISHITA K D,ROBERTS R L,BEAN M, et al.Development of a yeast-leavened rice-bread formula hydroxypropyl-methylcelluloses[J].Cereal chemistry,1976,53(5):626-629.
- [8] SIEGEL A.Development acceptability and proximate analyses of high-protein rice-based snacks for that children[J].Food Sci,1976,41:1184-1186.
- [9] CHANG K C,LEE C C,BROWN G.Production and nutritional evaluation of high-protein rice flour[J].Journal of food science,1986,51(2):464-467.
- [10] MANN J,TRUSWELL A S.Essentials of human nutrition[M].New York:Oxford University Press,2007.
- [11] 王亚林,刘国志.蛋白活性肽的制备工艺研究[J].粮食与饲料工业,2004(6):46-47.
- [12] 裴小平,唐道邦,肖更生,等.抗氧化肽制备的应用现状及趋势[J].食品工业科技,2009,30(2):319-322.
- [13] 付岩松.米糠抗氧化肽对 D-半乳糖致衰小鼠线粒体损伤的影响[D].沈阳:沈阳农业大学,2010.
- [14] 王巧娥,谢丹,钱洁,等.黑米花色苷的分离纯化及其抗氧化性

- 的研究[J].食品工业科技,2015,36(2):157-160.
- [15] 许明峰,沈莲清,王奎武,等.雷丸多糖的提取分离及其抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2011,11(6):42-46.
- [16] 赵利,王璋,许时婴.Alcalase水解酪蛋白特性的研究[J].中国乳品工业,2005,33(4):15-19.
- [17] 玄国东.米糟蛋白提取及酶法制备抗氧化活性肽及降血压活性肽的研究[D].无锡:江南大学,2005.
- [18] 刘志东,郭本恒,王荫榆,等.乳抗氧化肽的分离纯化与结构鉴定[J].天然产物研究与开发,2010,22(5):740-746.
- [19] 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(2):49-55.
- [20] 郑玉娟,夏宇,周文化.大米抗氧化肽研究进展[J].粮食与油脂,2014,27(1):5-7.
- [21] 唐宁.玉米抗氧化肽的制备分离纯化及结构鉴定[D].长春:吉林大学,2014.
- [22] 刘恩岐,巫永华,高兆建,等.抗氧化黑豆肽的分离纯化与结构鉴定[J].中国粮油学报,2016,31(2):33-37.
- [23] 吴建平,丁霄霖,等.大豆降压肽的研究[J].中国油脂,1998,23(5):22-25.
- [24] LI G H, SI Y H, LE G W. et al. Alcalase hydrolysates of peanut protein isolates inhibit angiotensin i-converting enzyme activity [J]. Food science, 2005, 26(6):55-61.
- [25] PIHLANTO A. Antioxidative peptides derived from milk proteins[J]. International dairy journal, 2006, 16(11):1306-1314.
- [26] 吴慧,卢蓉蓉,沈滢,等.乳清蛋白抗氧化肽的分离纯化及序列分析[J].食品与发酵工业,2010(10):6-10.
- [27] 刘成梅.天然产物有效成分的分离与应用[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [28] 张君慧,张晖,王兴国,等.抗氧化活性肽的研究进展[J].中国粮油学报,2008,23(6):227-233.
- [29] 贾薇.大米肽体外抗氧化活性及应用研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2008.

Isolation, purification and characterization of antioxidant peptides from rice dreg

ZHAO Xiaolei¹ TIAN Tian¹ HU Yuanliang^{1,2} ZHAO Shumiao¹ LIANG Yunxiang¹

1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Key Laboratory of Edible Wild Plants Conservation and Utilization, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China

Abstract Highly purified antioxidant peptides, named as part 2 and part RF9, were isolated and purified from rice peptides with GFC and RP-HPLC methods. The results of RP-HPLC-ESI-MS analyses showed that the amino acid sequence was L-Q-P-Y (520.277 u). The DPPH free radical scavenging rate of 1 mg/mL synthetic fragments L-Q-P-Y reached 85.84%.

Keywords rice dreg; rice antioxidant peptides; DPPH free radical; RP-HPLC-ESI-MS

(责任编辑:张志钰)