

# 小麦低聚肽的结构特征及其体外抗氧化活性

刘文颖<sup>1,2\*</sup>, 冯晓文<sup>1</sup>, 程青丽<sup>1</sup>, 赵晓涵<sup>1</sup>, 李国明<sup>1</sup>, 谷瑞增<sup>1</sup>

(1. 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)

(2. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

**摘要:** 通过扫描电镜、基础理化成分、相对分子质量分布、氨基酸组成、紫外光谱和圆二色光谱对小麦低聚肽结构特征进行分析, 从羟基自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和氧自由基吸收能力 (ORAC) 4 个方面对其体外抗氧化活性进行考察。结果表明, 小麦低聚肽具有明显的球体颗粒状, 表面有不规则褶皱和气孔, 蛋白质和肽含量分别为 95.86%、83.74% (均以干基计), 分子质量 1000 u 以下的组分占 92.22%, 必需氨基酸和疏水性氨基酸含量分别为 20.46%、33.38%, 在 270 nm 波长处有最大吸收峰。二级结构以多种构象并存,  $\alpha$ -螺旋、平行式  $\beta$ -折叠、反平行式  $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲含量分别为 5.83%、3.14%、37.57%、20.32% 和 33.14%。小麦低聚肽对羟基自由基和 DPPH 自由基的半抑制浓度 (IC<sub>50</sub> 值) 分别为 9.62、1.54 mg/mL, ABTS 自由基清除能力为 3.53 mmol Trolox/g, ORAC 值为 1035.52  $\mu$ mol Trolox/g。因此, 小麦低聚肽具有较强的抗氧化能力, 为其在抗氧化功能食品的开发利用提供一定的理论依据。

**关键词:** 小麦; 低聚肽; 结构特征; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2021)12-72-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0075

## Structural Characteristics and *in vitro* Antioxidative Activity of Wheat Oligopeptides

LIU Wenying<sup>1,2\*</sup>, FENG Xiaowen<sup>1</sup>, CHENG Qingli<sup>1</sup>, ZHAO Xiaohan<sup>1</sup>, LI Guoming<sup>1</sup>, GU Ruizeng<sup>1</sup>

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

(2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The structural characteristics of wheat oligopeptides were elucidated using scanning electron microscopy imaging as well as analyses of their basic physicochemical composition, relative molecular weight distribution, amino acid composition, and ultraviolet and circular dichroism spectra. The *in vitro* antioxidative activity of the oligopeptides was investigated by determining their oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and their abilities to scavenge hydroxyl, DPPH, and ABTS free radicals. The wheat oligopeptides were in the form of spherical granules and had irregular folds and pores on the surface. Their protein and peptide contents were 95.86% and 83.74% (both on a dry basis), respectively, and 92.22% of the components had a molecular weight of less than 1000 u. Their contents of essential amino acids and hydrophobic amino acids were 20.46% and 33.38%, respectively. The maximum absorption peak was at 270 nm. The  $\alpha$ -helix, parallel  $\beta$ -fold, antiparallel  $\beta$ -fold,  $\beta$ -turn, and random coil contents of the oligopeptides were 5.83%, 3.14%, 37.57%, 20.32%, and 33.14%, respectively, indicating the coexistence of multiple secondary structures. The IC<sub>50</sub> values of wheat oligopeptides for hydroxyl and DPPH free radicals were 9.6 and 1.5 mg/mL, respectively. Moreover, their ABTS free radical-scavenging activity was 3.53 mmol Trolox/g and their ORAC was 1035.52  $\mu$ mol Trolox/g. In summary, these findings indicating the strong antioxidative capacity of wheat oligopeptides provide a theoretical basis for their use in the development of antioxidant-containing foods.

**Key words:** wheat; oligopeptides; structural characteristics; antioxidative activity

引文格式:

刘文颖,冯晓文,程青丽,等.小麦低聚肽的结构特征及其体外抗氧化活性[J].现代食品科技,2021,37(12):72-79

LIU Wenying, FENG Xiaowen, CHENG Qingli, et al. Structural characteristics and *in vitro* antioxidative activity of wheat oligopeptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 72-79

收稿日期: 2021-01-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0400604); 国家自然科学基金项目 (31671963); 北京市科技创新基地培育与发展工程专项 (Z191100002819001)

作者简介: 刘文颖 (1984-), 女, 博士生, 高级工程师, 研究方向: 农产品加工工程研究, E-mail: wenyliu888@126.com

小麦是我国主要的经济作物,其加工副产物小麦蛋白,即谷朊粉,主要由麦醇溶蛋白和麦谷蛋白组成,其蛋白含量高达85%左右。小麦蛋白营养丰富,氨基酸组成比较齐全,但由于小麦蛋白具有独特的结构,并且氨基酸主要为疏水性氨基酸和不带电荷的氨基酸,使得分子内疏水作用区域较大,在水中的溶解度较低,使小麦蛋白的应用受到了一定的局限<sup>[1-2]</sup>。因此,通过生物酶解法使蛋白质水解,能够提高其溶解度,同时改善其功能特性。

小麦低聚肽是由小麦蛋白经酶解、喷雾干燥等手段制得的多肽混合物<sup>[3]</sup>。与小麦蛋白相比,小麦低聚肽具有水溶性好、稳定性高、易于消化吸收等优点<sup>[4]</sup>。已有文献报道小麦肽具有抗氧化、保护肠黏膜、调节免疫、降血压、调节血液胆固醇、阿片样活性、抗过敏、抗癌等多种生理功能<sup>[5-7]</sup>。抗氧化作用是一种重要的功能活性,食物来源的抗氧化肽具有天然安全的特点,能够通过减少自由基,抑制氧化反应,降低自动氧化速率,保护细胞抵御氧化应激损伤,从而达到抗衰老的功能。此外,食源性抗氧化肽也不会像人工合成抗氧化剂那样对机体产生毒副作用。近年来大豆肽、玉米肽等天然活性肽具有较强的生物活性和生物安全性已成为国内外的研究热点。而关于小麦低聚肽的结构表征和抗氧化方面系统而全面的研究相对较少。

本试验以小麦低聚肽为研究对象,通过扫描电镜、基础理化成分、相对分子质量分布、氨基酸组成、紫外光谱和圆二色光谱对其结构特征进行表征,并通过羟基自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和氧自由基吸收能力(ORAC)测定对其体外抗氧化活性进行研究,以期小麦低聚肽在食品中的多元化开发提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

谷朊粉,北京中食海氏生物技术有限公司提供;分子质量标准品、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、Trolox(水溶性维生素E)、Fluorescein(荧光指示剂)、偶氮二异丁基盐酸盐(AAPH),美国Sigma公司;碱性蛋白酶( $\geq 400000$  DU/g)、中性蛋白酶( $\geq 1600$  AU/g),杜邦丹尼斯克公司;硫酸亚铁、水杨酸钠,广东汕头市西陇化工有限公司;ABTS 自由基清除能力测定试剂盒,碧云天生物技术研究。

SpectraMax i3x 多功能酶标仪,美国MD公司;QSY-II型凯式定氮仪,北京强盛分析仪器制造中心;LC-20A 高效液相色谱仪,日本SHIMADZU公司;

Phenom ProX 台式扫描电子显微镜,复纳科学仪器(上海)有限公司;UV-1780 紫外可见分光光度计,日本SHIMADZU公司;Chirascan V100 圆二色谱仪,英国Applied Photophysics公司;Spectra MR 多功能酶标仪,美国dynex公司;A300 全自动氨基酸分析仪,德国曼默博尔公司;HH-501 型超级恒温水浴锅,常州国宇仪器制造有限公司;LG10-2.4A 型高速离心机,北京医用离心机厂;FD-1 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小麦低聚肽的制备

将500 g 谷朊粉溶解于蒸馏水中,质量浓度为10% ( $m/m$ ),在水浴锅中调节pH为8.5,温度为50℃,加入碱性蛋白酶4.5 g,酶解2 h。然后用0.1 mol/L的HCl溶液调节pH为7.0,加入中性蛋白酶4.0 g,酶解3 h。酶解结束后,升温至95℃,灭酶10 min,再利用离心机8000 r/min 离心10 min,取上清液,用截留分子质量为 $2 \times 10^6$  u的陶瓷膜过滤,取中间清液,然后利用截留分子质量为1000 u的超滤膜超滤,取滤过液,最后将溶液浓缩并冷冻干燥,得到小麦低聚肽干粉。

#### 1.2.2 扫描电镜

将样品涂抹在样盘双面胶上,然后进行氮吹处理。处理好的样品放入扫描电镜抽真空,施加一定的电压,调整束斑尺寸待聚焦清晰后分别在500倍和1000倍下获取图像,观察区别<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.3 基础理化成分测定

参照国标方法进行基础理化成分测定:GB 5009.5-2016 中的方法测定蛋白质含量;GB/T 22729-2008 中的方法测定酸溶蛋白含量;GB 5009.3-2016 中的方法测定水分含量;GB 5009.4-2016 中的方法测定灰分含量<sup>[9-12]</sup>。

#### 1.2.4 相对分子质量分布测定

利用流动相配制样品溶液为质量浓度1.0 mg/mL,经孔径0.2  $\mu\text{m}$  聚四氟乙烯过滤膜过滤后,使用高效液相色谱仪进行凝胶过滤,紫外检测器进行检测。同时配制0.1% ( $m/V$ ) 肽标准品溶液,过膜后进样,制作相对分子质量校正曲线。四种肽标准品为:乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(分子质量189 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(分子质量451 u)、杆菌酶(分子质量1450 u)、细胞色素C(分子质量12500 u)。色谱条件为:色谱柱:TSKgel G2000 SWXL 300 mm $\times$ 7.8 mm;流动相:乙腈:水:三氟乙酸,45:55:0.1 ( $V:V:V$ );流速:0.5 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:30℃<sup>[13]</sup>。

### 1.2.5 氨基酸组成测定

按照 GB 5009.124-2016 的测定方法,采用全自动氨基酸分析仪进行水解氨基酸和游离氨基酸组成分析<sup>[14]</sup>。

### 1.2.6 紫外光谱扫描

称取样品溶解于超纯水中,配制成 2.0 mg/mL 的溶液,利用紫外可见分光光度计进行紫外光谱扫描,扫描波长 245~320 nm<sup>[13]</sup>。

### 1.2.7 圆二色光谱扫描

将样品配制成 1.0 mg/mL 的溶液,利用圆二色光谱仪测量样品的圆二色光谱。对于波长分析,以 0.2 nm 的步长和 2.0 nm 的带宽扫描样品。光谱范围为 190~250 nm,扫描速度为 200 nm/min。从每个光谱中减去缓冲液的基线光谱,并使用 Jasco 软件内置的分析函数将得到的值转换为摩尔椭圆率 ( $\theta$ )<sup>[8]</sup>。

### 1.2.8 小麦低聚肽的体外抗氧化活性测定

#### 1.2.8.1 羟基自由基清除率测定

依次加入 100  $\mu$ L 不同质量浓度的样品溶液,200  $\mu$ L 5 mmol/L 水杨酸乙醇溶液,200  $\mu$ L 5 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液,实验组以 100  $\mu$ L 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应,测得吸光值 A<sub>x</sub>;对照组以等体积蒸馏水启动反应,测得吸光值 A<sub>0</sub>。空白组以等体积蒸馏水代替样品,测得吸光值 A<sub>1</sub>。涡旋震荡,于 37 °C 水浴锅中反应 1 h 后取 200  $\mu$ L 反应液在 510 nm 处测定吸光值<sup>[13]</sup>。

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

#### 1.2.8.2 DPPH 自由基清除率测定

依次加入 100  $\mu$ L 0.1 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液和 100  $\mu$ L 不同质量浓度的样品溶液于 96 孔板中,混匀,室温避光反应 30 min,然后在波长 517 nm 处测定吸光值 A<sub>x</sub>;将 100  $\mu$ L 不同浓度的样品溶液与 100  $\mu$ L 无水乙醇混合,测得吸光值 A<sub>0</sub>;以蒸馏水代替样品作为空白对照,与 100  $\mu$ L 0.1 mmol/L DPPH-无水乙醇溶液混合,测得吸光值 A<sub>1</sub><sup>[15]</sup>。

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

#### 1.2.8.3 ABTS 自由基清除率测定

将 100  $\mu$ L ABTS 溶液和 100  $\mu$ L 氧化剂溶液混匀,配置成 ABTS 工作母液,避光静置过夜,形成 ABTS 自由基储备液。使用前用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释 35 倍成为 ABTS 工作液。每个孔中加入 200  $\mu$ L ABTS 工作液。向标准曲线检测孔中加入 10  $\mu$ L 不同质量浓度的 Trolox (水溶性维生素 E) 标准溶液,向样品检测孔加入样品 10  $\mu$ L,轻轻混匀后室温孵育 6 min,于 734 nm 处测定吸光值。最终样品的抗氧化能

力以 mmol Trolox / g 表示<sup>[16]</sup>。以 Trolox 标准溶液绘制的 ABTS 标准曲线如图 1 所示,拟合得到方程  $y = -0.3957x + 0.7147$ ,  $R^2 = 0.9963$ 。

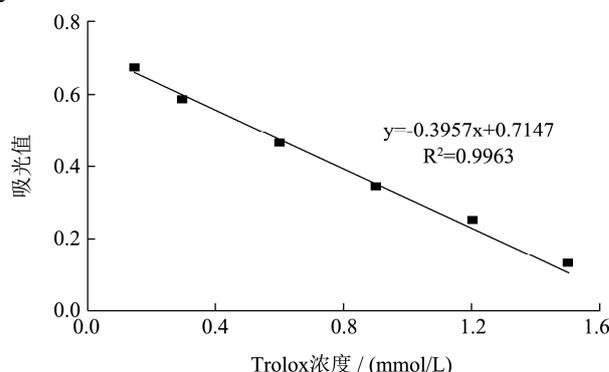


图 1 Trolox 标准曲线

Fig.1 Trolox standard curve

#### 1.2.8.4 ORAC 值测定

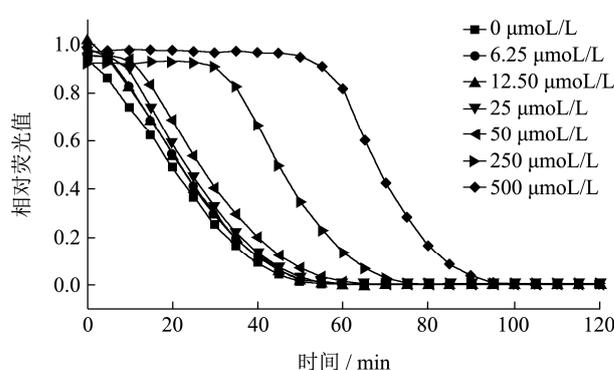


图 2 不同质量浓度 Trolox 的动态荧光衰减曲线

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

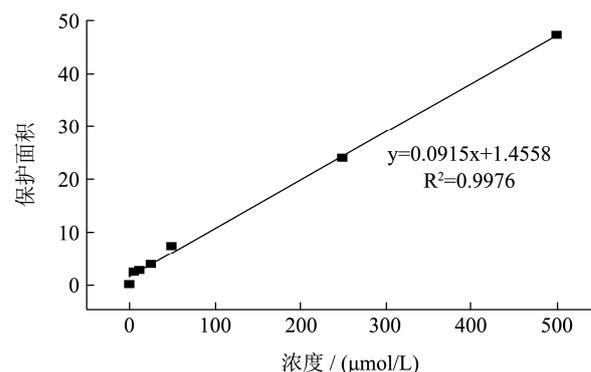


图 3 Trolox 标准曲线

Fig.3 Trolox standard curve

将 25  $\mu$ L 样品溶液和 100  $\mu$ L 的 Fluorescein (荧光指示剂, 0.8  $\mu$ mol/L) 于 96 孔板中混合,然后加入 75  $\mu$ L 150 mmol/L 偶氮类化合物 AAPH 启动反应,此为实验组。分别用 25  $\mu$ L Trolox 标准品 (6.25、12.5、25、50、250、500  $\mu$ mol/L) 代替样品作为阳性对照 (制作标准曲线)、25  $\mu$ L 磷酸缓冲液 (pH=7.4, 75 mmol/L) 代替样品为空白对照,于 37 °C 保温 20 min,荧光酶

标仪激发波长 485 nm, 发射波长 530 nm, 每隔 5 min 测定一次, 测定总时间为 120 min。另外做不加 AAPH 的对照。测样品的 ORAC 值表示为  $\mu\text{mol Trolox/g}^{[17]}$ 。不同质量浓度 Trolox 的动态荧光衰减曲线见图 2, 由此绘制标准曲线如图 3 所示,  $y=0.0915x+1.4558$ ,  $R^2=0.9976$ 。

### 1.2.9 数据处理

每组数据平行测定 3 次, 实验结果用平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 使用 Origin 8.5 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 扫描电镜

由图 4 可见, 在 500 倍和 1000 倍放大倍数下, 小麦低聚肽具有明显的球体颗粒状, 表面有气孔和不规则褶皱。推测可能是由于蛋白质酶解后结构被破坏, 使得粒径变小, 表面暴露出更多的疏水性基团<sup>[18]</sup>。

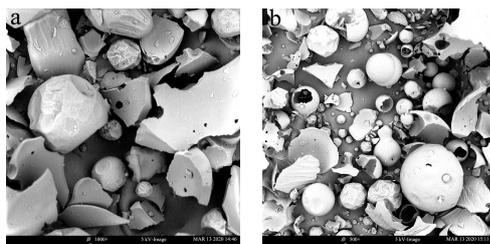


图 4 小麦低聚肽的扫描电镜

Fig.4 Scanning electron microscope of wheat oligopeptides

注: a: 放大 500 倍; b: 放大 1000 倍。

### 2.2 小麦低聚肽的基础理化成分

表 1 小麦低聚肽的基础理化成分

Table 1 Basic physicochemical composition of wheat oligopeptides

成分	总蛋白质	水分	灰分
含量/%	95.86 $\pm$ 2.77	3.38 $\pm$ 0.25	1.59 $\pm$ 0.04

小麦低聚肽中总蛋白质含量高达 95.86%, 水分和

表 2 小麦低聚肽的分子质量分布

Table 2 Molecular weight distribution of wheat oligopeptides

分子质量范围/u	>10000	5000~10000	3000~5000	2000~3000	1000~2000	150~1000	<150
开始时间/min	8.95	13.63	15.04	16.08	16.90	18.31	22.17
结束时间/min	13.63	15.04	16.08	16.90	18.31	22.17	32.37
峰面积百分比/%	0.00	0.10	0.46	1.28	5.94	72.75	19.47

### 2.4 小麦低聚肽的氨基酸组成

由表 3 可知, 小麦低聚肽中谷氨酸、脯氨酸含量很高, 总含量为 49.50 g/100 g。而色氨酸含量很低, 仅为 0.46 $\pm$ 0.06 g/100 g。小麦低聚肽中含有丰富的必

灰分含量很低, 分别为 3.38%和 1.59% (表 1)。酸溶蛋白质含量为 86.17%, 占总蛋白质的 89.88%, 表明小麦低聚肽中小分子蛋白质含量较高。游离氨基酸含量为 2.43%, 经计算, 肽含量为 83.74%。以上成分中, 除水分外, 其他成分均以干基计。酶解过程中蛋白质的溶解、不溶性非蛋白质物质的去除以及水解后油脂等物质的去除, 使得制备的小麦低聚肽中蛋白质和肽含量较高。

### 2.3 小麦低聚肽的相对分子质量分布

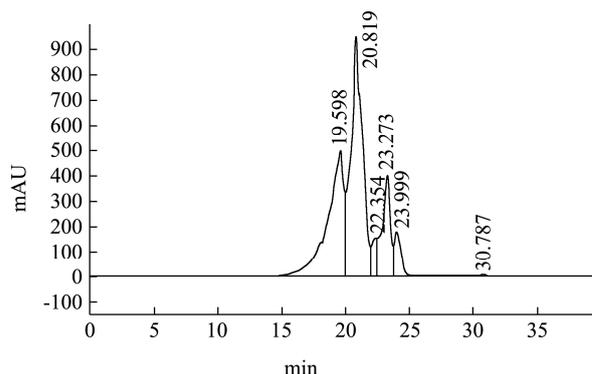


图 5 小麦低聚肽分子质量分布凝胶色谱图

Fig.5 Gel filter chromatogram of molecular weight distribution of wheat oligopeptides

小麦低聚肽洗脱图谱见图 5。使用 GPC 软件处理色谱数据, 如表 2 所示, 小麦低聚肽中大分子蛋白较少, 主要为小分子肽混合物, 分子质量小于 1000 u 的小肽所占比例为 92.22%, 重均分子质量为 439.70 u。其中, 分子质量在 150~1000 u 的小肽占 72.15%, 而 1000~2000, 2000~3000, 3000~5000, >5000 u 的多肽分别为 5.94%、1.28%、0.46%、0.10%。说明小麦低聚肽的主要成分为 1000 u 以下的小肽。研究表明, 肽的抗氧化活性与分子质量大小有关, 活性较强的抗氧化肽分子质量均较小, 氨基酸残基的数目一般在 20 个以内<sup>[19]</sup>。因此, 小麦低聚肽是一种具有潜力的抗氧化物质。

需氨基酸, 含量为 20.92 g/100 g, 组成合理, 具有较高的营养价值。有文献报道, 许多氨基酸具有抗氧化能力, 能够较好地清除自由基, 如脯氨酸、亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、半胱氨酸等<sup>[20,21]</sup>。小麦低聚肽富含

抗氧化性氨基酸，其中脯氨酸、亮氨酸、缬氨酸含量较高。此外，小麦低聚肽中疏水性氨基酸含量为 32.23 g/100 g。低聚肽中高含量的疏水氨基酸能够增加其脂溶性，从而有助于清除脂质自由基，发挥重要的抗氧化作用<sup>[22]</sup>。

表 3 小麦低聚肽的氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of wheat oligopeptides

氨基酸名称	含量/(g/100 g)
谷氨酸 (Glu)	37.93±2.56
脯氨酸 (Pro)	11.57±0.95
亮氨酸 (Leu)	5.68±0.28
苯丙氨酸 (Phe)	4.87±0.29
丝氨酸 (Ser)	4.32±0.41
缬氨酸 (Val)	3.29±0.19
酪氨酸 (Tyr)	2.83±0.10
天冬氨酸 (Asp)	2.72±0.18
甘氨酸 (Gly)	2.71±0.26
精氨酸 (Arg)	2.66±0.15
丙氨酸 (Ala)	2.64±0.23
异亮氨酸 (Ile)	2.50±0.08
苏氨酸 (Thr)	1.81±0.09
组氨酸 (His)	1.69±0.11
半胱氨酸 (Cys)	1.23±0.06
甲硫氨酸 (Met)	1.22±0.13
赖氨酸 (Lys)	1.09±0.09
色氨酸 (Trp)	0.46±0.06

### 2.5 小麦低聚肽的紫外光谱扫描

将配制成质量浓度 2.0 mg/mL 的小麦低聚肽进行紫外光谱扫描，扫描波长 245~320 nm。结果如图 6 所

示。从图中看出，小麦低聚肽在 270 nm 的近紫外区有最大吸收峰，吸光度为 2.0687。羰基的最大吸收波长一般为 200 nm 左右，该吸收峰出现在 270 nm，推测其主要原因是肽键中羰基  $\pi$  电子与相邻氨基的孤对电子发生  $p-\pi$  共轭使电子  $\pi-\pi^*$  跃迁产生的吸收峰发生红移。

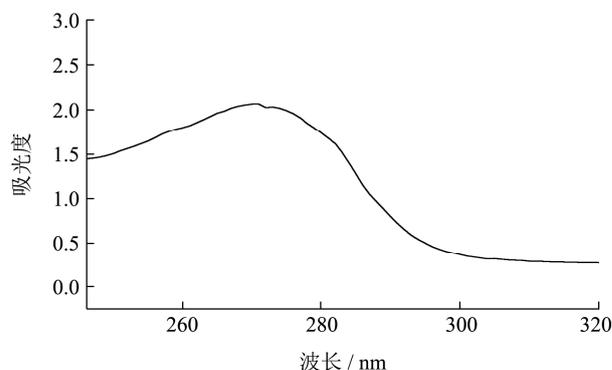


图 6 小麦低聚肽的紫外光谱扫描

Fig.6 UV scanning analysis of wheat oligopeptides

### 2.6 小麦低聚肽的圆二色光谱扫描

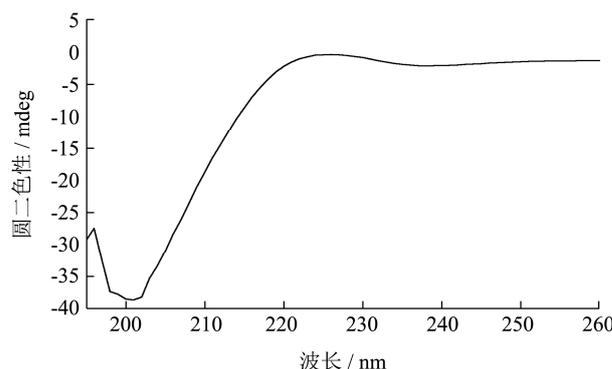


图 7 小麦低聚肽的圆二色光谱扫描

Fig.7 Circular dichroism spectrum of wheat oligopeptides

表 4 小麦低聚肽的二级结构

Table 4 Secondary structure of wheat oligopeptides

类型	$\alpha$ -螺旋	平行式 $\beta$ -折叠	反平行式 $\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	不规则卷曲
含量/%	5.83±0.43	3.14±0.12	37.57±1.95	20.32±2.10	33.14±2.73

肽的结构主要为肽链一级结构和二级结构，与蛋白质的结构相比较为简单<sup>[23]</sup>。圆二色光谱图（图 7）的峰位和峰形显示，小麦低聚肽的二级结构以多种构象并存，小麦低聚肽在 200 nm 左右的远紫外区有负吸收，二级结构主要为  $\beta$ -折叠。利用 CDNN 软件分析得到肽段各二级结构的含量，如表 4 所示。小麦低聚肽的  $\alpha$ -螺旋为 5.83%，平行式  $\beta$ -折叠为 3.14%，反平行式  $\beta$ -折叠为 37.57%， $\beta$ -转角为 20.32%，无规卷曲为 33.14%。小麦低聚肽中  $\beta$ -折叠及无规则卷曲含量较多，紧密且没有空腔的稳定结构即  $\alpha$ -螺旋结构含量较少，因此分子表面疏水性较大<sup>[24]</sup>。推测原因可能是由

于蛋白质酶解后空间结构展开，蛋白质分子内无序结构变多， $\beta$ -折叠和无规卷曲增加，显露出来更多的疏水性位点，从而发挥特定的功能作用<sup>[25]</sup>，这也是小麦低聚肽表现出一定抗氧化能力的原因之一。

### 2.7 小麦低聚肽的体外抗氧化作用

#### 2.7.1 小麦低聚肽的羟基自由基清除能力

如图 8 所示，在质量浓度 0~20 mg/mL 范围内，小麦低聚肽对羟基自由基的清除率呈明显的量效关系，在质量浓度为 20 mg/mL 时，清除率达到 90.53%，表现出很强的羟基自由基清除能力，半抑制浓度  $IC_{50}$

值约为 9.62 mg/mL。小麦蛋白被酶解成低聚肽后,使得更多的活性基团或位点暴露出来,能够终止自由基连锁反应,表现出一定的抗氧化能力<sup>[20]</sup>。阳性对照抗坏血酸对羟基自由基的清除率先迅速增加,然后趋于平缓,IC<sub>50</sub> 值约为 0.08 mg/mL。小麦低聚肽的羟基自由基清除能力弱于单一成分的抗坏血酸,但是作为一种天然的功能活性物质,安全性高,无潜在毒副作用。郑志强<sup>[5]</sup>等通过碱性蛋白酶和风味蛋白酶分步酶解方式酶解小麦蛋白,结果表明,随着酶解物浓度的升高,DPPH 自由基清除能力也增强,与本实验结果一致。

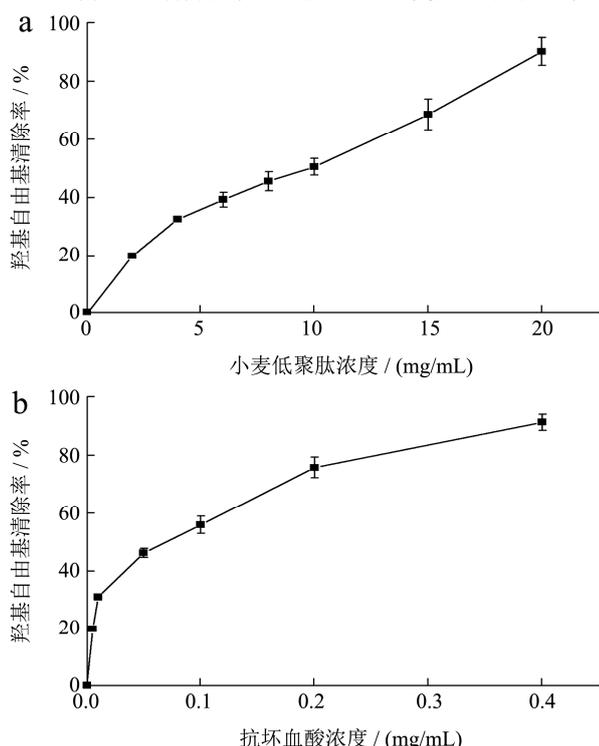


图8 小麦低聚肽 (a) 和抗坏血酸 (b) 对羟基自由基清除率  
Fig.8 Hydroxyl free radical scavenging effects of wheat oligopeptides (a) and ascorbic acid (b)

### 2.7.2 小麦低聚肽的 DPPH 自由基清除能力

由图9可知,在质量浓度 0~10 mg/mL 范围内,小麦低聚肽对 DPPH 自由基清除率与质量浓度呈明显的剂量关系,质量浓度为 2 mg/mL 时,清除率达到 60.27%,质量浓度为 10 mg/mL 时,清除率为 81.54%,IC<sub>50</sub> 值约为 1.54 mg/mL。这表明小麦低聚肽具有降低 DPPH 自由基浓度,阻断脂质过氧化链式反应的能力。抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除作用也呈现出明显的量效关系,IC<sub>50</sub> 值为 4.13 μg/mL。小麦低聚肽的 DPPH 自由基清除能力可能是因为小麦蛋白酶解过程中释放出可作为质子供体的物质,与 DPPH 自由基反应使其转变成稳定的反磁性分子,从而呈现出较强的抗氧化能力<sup>[26]</sup>。代卉等<sup>[27]</sup>通过小鼠模型考察了小麦活性肽清除 DPPH 自由基的能力,其结果表明高剂量肽组(按

100 mg/kg 体重灌胃)小鼠血清的 DPPH 自由基清除率要高于低剂量肽组(按 20 mg/kg 体重灌胃),与本实验小麦低聚肽的 DPPH 自由基清除率变化规律保持一致。

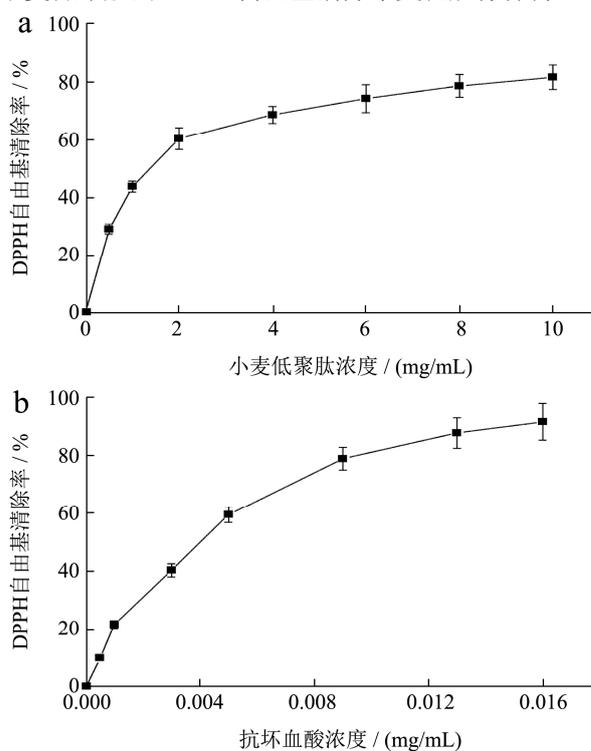


图9 小麦低聚肽 (a) 和抗坏血酸 (b) 对 DPPH 自由基清除率  
Fig.9 DPPH free radical scavenging effects of wheat oligopeptides (a) and ascorbic acid (b)

### 2.7.3 小麦低聚肽的 ABTS 自由基清除能力

经计算可知,小麦低聚肽和抗坏血酸的 ABTS 自由基清除率分别为 3.53、29.36 mmol Trolox/g,由此可见抗坏血酸的 ABTS 自由基清除能力约为小麦低聚肽的 8.32 倍。小麦低聚肽的 ABTS 自由基清除作用可能是由于小麦蛋白酶解后,空间构型、氨基酸组成和分子空间排列等发生变化,产生离子化的氨基或羧基等供氢体。此外,某些氨基酸如酪氨酸(Tyr)含有酚羟基,能提供质子,还原具有氧化性的自由基,从而终止自由基连锁反应,达到清除或抑制自由基的目的<sup>[18]</sup>。多项研究结果表明,小分子质量小麦肽相较于大分子质量的小麦肽具有更强的抗氧化能力。小麦肽中小分子质量的肽所占比例越大,表明其水解程度越高,抗氧化活性也越高<sup>[5,28-29]</sup>。

### 2.7.4 小麦低聚肽的 ORAC 值

结果显示,小麦低聚肽和抗坏血酸的 ORAC 值分别为 1035.52、1056.88 μmol Trolox/g。由此可见,小麦低聚肽与抗坏血酸的 ORAC 值相当。这表明小麦低聚肽能够通过氢转移阻断自由基链式反应过程实现抗氧化作用<sup>[30]</sup>。已有研究表明,高活性的抗氧化肽具有一定的分子质量范围,分子质量小的肽一般具有较强的

抗氧化活性<sup>[31]</sup>。吴明泽等<sup>[32]</sup>通过超滤将中华圆田螺肉酶解产物分离纯化为分子质量<1、1~3、>3 ku 的 3 个组分。分子质量<1 ku 组分的 ORAC 值均显著高于另外两个组分 ( $p<0.05$ ), 具有良好的氧自由基吸收能力。本研究中小麦低聚肽的主要成分为分子质量<1 ku 的小肽, 这可能与具有较高的 ORAC 值有一定关联。

### 3 结论

以谷朊粉为原料通过酶解法制备小麦低聚肽, 蛋白质和肽含量为 95.86%、83.74%, 分子质量 1000 u 以下的组分占 92.22%, 必需氨基酸和疏水性氨基酸含量分别为 20.92、32.23 g/100 g, 主要成分为分子质量小于 1000 u 的小肽, 在 270 nm 波长处有最大吸收峰。二级结构以多种构象并存,  $\alpha$ -螺旋、平行式  $\beta$ -折叠、反平行式  $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲含量分别为 5.83%、3.14%、37.57%、20.32%和 33.14%, 主要为  $\beta$ -折叠。小麦低聚肽对羟基自由基和 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 值分别为 9.62、1.54 mg/mL, ABTS 自由基清除能力为 3.53 mmol Trolox/g, ORAC 值为 1035.52  $\mu$ mol Trolox/g, 具有较强的抗氧化能力, 为其在相关营养健康食品的开发利用提供了一定的参考依据。

### 参考文献

- [1] 郑志强,李宝林,郝利民,等.不同蛋白酶对小麦蛋白酶解物抗氧化活性的影响[J].食品科学,2017,38(7):161-166  
ZHENG Zhiqiang, LI Baolin, HAO Limin, et al. Effects of different proteases on antioxidant activities of wheat gluten hydrolysates [J]. Food Science, 2017, 38(7): 161-166
- [2] 张锐昌,徐志宏,张应龙,等.小麦蛋白酶解物分子量及氨基酸组成的研究[J].食品与机械,2011,27(5):44-47  
ZHANG Ruichang, XU Zhihong, ZHANG Yinglong, et al. Study on molecular weight distribution and amino acid content of wheat protein enzymolysate [J]. Food & Machinery, 2011, 27(5): 44-47
- [3] 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 Zhiqiang, LIU Jin, WEI Xiaojuan, 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
- [4] 张亚卓,姜思萌,魏颖,等.小麦低聚肽对体外肠上皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J].食品与发酵工业,2015,1:46-50  
ZHANG Yazhuo, JIANG Simeng, WEI Ying, et al. The protective effect of wheat oligopeptides on oxidative stress in intestinal epithelial cells *in vitro* [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 1: 46-50
- [5] 郑志强,郝利民,刘晋,等.小麦蛋白双酶酶解制备高抗氧化性小麦肽研究[J].中国食品学报,2019,19(8):78-88  
ZHENG Zhiqiang, HAO Limin, LIU Jin, et al. Preparation of wheat peptide with high antioxidant activity by double enzymes hydrolysis of wheat gluten [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(8): 78-88
- [6] 邵剑钢,钱平,刘晋,等.小麦低聚肽的功能作用研究进展及应用前景展望[J].中国食物与营养,2016,22(10):72-74  
SHAO Jianguang, QIAN Ping, LIU Jin, et al. Research advancement and application prospect of function properties of wheat oligopeptides [J]. Food and Nutrition in China, 2016, 22(10): 72-74
- [7] 刘艳,张海欣,魏颖,等.小麦低聚肽对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致HepG2细胞氧化损伤的保护作用[J].食品与生物技术学报,2015,34(6):599-604  
LIU Yan, ZHANG Haixin, WEI Ying, et al. Protective effect of wheat oligopeptides on hydrogen peroxide-induced HepG2 cell injury [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(6): 599-604
- [8] Qin X, Zhang J, Li G, et al. Structure and composition of a potential antioxidant obtained from the chelation of pea oligopeptide and sodium selenite [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103619
- [9] GB 5009.5-2016,食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]  
GB 5009.5-2016, National Food Safety Standard, Determination of Protein in Foods [S]
- [10] GB/T 22729-2008,海洋鱼低聚肽粉[S]  
GB/T 22729-2008, Oligopeptides Powder of Marine Fish [S]
- [11] GB 5009.3-2016,食品安全国家标准 食品中水分的测定[S]  
GB 5009.3-2016, National Food Safety Standard, Determination of Water in Foods [S]
- [12] GB 5009.4-2016,食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S]  
GB 5009.4-2016, National Food Safety Standard, Determination of Ash in Foods [S]
- [13] Liu W Y, Lu J, Gao F, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides [J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(6): 851-860
- [14] GB 5009.124-2016,食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2016  
GB 5009.124-2016, National Food Safety Standard,

- Determination of Amino Acids in Foods [S]. Beijing: China Standard Press, 2016
- [15] Peng X, Xiong Y L, Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance [J]. Food Chemistry, 2008, 113(1): 196-201
- [16] Corsetto P A, Montorfano G, Zava S, et al. Characterization of antioxidant potential of seaweed extracts for enrichment of convenience food [J]. Antioxidants, 2020, 9(3): 249-264
- [17] 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
- [18] 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 Haiwei, SHI Jufen, WANG Manqi, et al. Antioxidant capacity of placental peptide from Tibetan sheep and its structural characterization [J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 162-169
- [19] 蔡木易.食源性肽研究进展[J].北京工商大学学报(自然科学版),2012,30(5):1-10  
CAI MUYI. Progress of research on food-derived peptides [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Social Sciences), 2012, 30(5): 1-10
- [20] Barbosa E A, Oliveira A, Placido, et al. Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2018, 115: 68-79
- [21] Ma Y, Wu Y, Li L. Relationship between primary structure or spatial conformation and functional activity of antioxidant peptides from *Pinctada fucata* [J]. Food Chemistry, 2018, 264(30): 108-117
- [22] Wang L, Ding L, Yu Z, et al. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells [J]. Food Research International, 2016, 90: 33-41
- [23] Arcan I, Yemencioglu A. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans [J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 301-312
- [24] 王辰,江连洲,魏冬旭,等.不同品种大豆分离蛋白结构与表面疏水性的关系[J].食品科学,2012,33(9):54-57  
WANG Chen, JIAN Lianzhou, WEI Dongxu, et al. Relationship between structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolates from different varieties [J]. Food Science, 2012, 33(9): 54-57
- [25] 吕龙祥,黄锁义,莫斯锐,等.茉莉花茎糖类化合物抗氧化活性及其构效关系和作用机理研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(6):1009-1014  
LYU Longxiang, HUANG Suoyi, MO Sirui, et al. Antioxidant activity, structure-activity relationship and action mechanism of sugar compounds in jasmine stem [J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(6): 1009-1014
- [26] Zhou C, Hu J, Ma H, Y, et al. Antioxidant peptides from corn gluten meal: orthogonal design evaluation [J]. Food Chemistry, 2015, 187(15): 270-278
- [27] 代卉,施用晖,韩芳,等.小麦肽免疫活性及抗氧化作用的研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(3):473-476  
DAI Hui, SHI Yonghui, HAN Fang, et al. Study on wheat peptides on immune modulating and antioxidant effect [J]. Natural Product Research and Development, 2009, 21(3): 473-476
- [28] Zhu K X, Zhou H M, Qian H F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1296-1302
- [29] 王才立,张志国,王成忠,等.不同分子量小麦胚芽多肽的体内抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(7):275-278  
WANG Caili, ZHANG Zhiguo, WANG Chengzhong, et al. Antioxidant activity of polypeptides with different molecular weights from wheat germ [J]. Food Science, 2013, 34(7): 275-278
- [30] 续洁琨,姚新生,栗原博,等.抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J].中国药理学通报,2006,8:1015-1021  
XU Jiekun, YAO Xincheng, LI Yuanbo, et al. Oxygen radical absorbance capacity assay and its application [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 8: 1015-1021
- [31] Cao W H, Zhang C H, Hong P Z, et al. Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with alcalase using response surface methodology [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44(8): 1602-1608
- [32] 吴明泽,王笑,胡祥昊,等.中华圆田螺肉抗氧化肽的分离纯化及小鼠体内外活性研究[J].食品与机械,2019,35(12):151-157  
WU Mingze, WANG Xiao, HU Xianghao, et al. Purification of antioxidant peptides from the meat of *Oncomelania sinensis* and its *in vivo* and *in vitro* of mice activity [J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 151-157

