

## 食源性低聚肽体外抗氧化活性研究\*

任 玮, 金振涛, 陈 亮, 蔡木易, 易维学

(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027)

**摘 要** 对工业化生产的食源性低聚肽进行了清除 DPPH 自由基、抑制亚油酸自氧化 2 种体系下的体外抗氧化活性的研究。结果表明:在清除 DPPH 自由基体系中,卵白肽和大豆肽的抗氧化活性最高,其  $IC_{50}$  分别为 5.767, 6.268 mg/mL。在抑制亚油酸自氧化体系中,大豆肽和海洋胶原蛋白肽对于亚油酸自氧化的抑制率分别达到了 75.16% 和 58.69%。几种食源性低聚肽均有不同程度的抗氧化活性。

**关键词** 食源性低聚肽, 抗氧化活性, DPPH, 亚油酸

食源性低聚肽是以食物蛋白为原料,经过酶解制成的新型蛋白水解产品,其中分子量在 1 000u 以下的短肽达 90% 以上。小分子的肽类不但具有比原蛋白和游离氨基酸更易被人体吸收的特点<sup>[1]</sup>,而且还具有许多生理活性。食源性低聚肽的抗氧化活性是研究较为普遍的一种生理活性。荣建华等人<sup>[2,3]</sup>发现以大豆分离蛋白为原料,采用酶解、超滤等方法制备出的大豆肽具有还原能力和抗氧化活性,并发现大豆肽在 Fenton 体系中对  $\cdot OH$  的清除效果明显。周之辉等人<sup>[4]</sup>发现,牛初乳提取物(BCE)能提高老年人体内血清总 SOD 活力与 SOD 活力,降低脂质过氧化物,增强抗氧化能力,而且初乳制品中的抗衰老作用很可能和活性肽有关。Kunio Suetsuna<sup>[5]</sup>发现,经过胃蛋白酶消化制得的对虾多肽有很强的清除自由基能力。郭瑶等人<sup>[6]</sup>发现罗非鱼皮胶原肽对  $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$  和  $H_2O_2$  的清除作用及其还原能力均与浓度呈量效关系,对  $Fe^{2+}$  诱发的卵黄脂蛋白的过氧化有较好的抑制作用;对花生油和猪油的氧化也有一定的抑制作用。保健食品原料及终端产品的保健功能检验一般包括动物试验和体外试验。与体内活性试验相比,体外活性试验具有成本低、周期短、简单易行等优点,可以在进行动物和临床试验之前,进行简易预测,避免盲目性,节省试验费用。抗氧化性的体外试验方法主要分为以抗氧化剂抑制脂质氧化为基础的方法和清除自由基的方法两大类<sup>[7]</sup>,根据不同的试验需求,选择不同的试验底物、检测方法和评价方法。本

研究从清除自由基能力和抑制油脂自氧化能力 2 方面评价了几种食源性低聚肽的抗氧化活性,并与已知的抗氧化剂进行对比,旨在确立一种对于食源性低聚肽较为通用、快速、准确的抗氧化活性体外评价方法。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

海洋胶原肽、海洋骨原肽、海洋蛋白肽、乳清肽、卵白肽:中食海氏(北京)生物技术有限公司;大豆肽:中食都庆(山东)生物技术有限公司;玉米肽:实验室自制。DPPH(二苯代苦味酰基)、亚油酸均购自 Sigma 公司;Vc:100 mg/片,天津力生制药公司;绿茶提取物(含茶多酚 1%~10%)、葡萄籽提取物(含原花青素 1%~10%)、大豆异黄酮(40%);均购自北京嘉康源科技发展有限公司;曲酸:实验室自制。

## 1.2 实验方法

1.2.1 DPPH 自由基清除能力测定<sup>[8]</sup>

准确称取 20 mg DPPH 用体积分数 95% 乙醇溶解并定容于 250 mL 容量瓶中,则 DPPH 浓度为  $2 \times 10^{-4}$  mol/L,取等体积待测液及  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 溶液加入同一具塞试管中,摇匀。30 min 后用 95% 乙醇做参比在 517 nm 下测定其吸光度  $A_i$ ,同时测定  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 溶液与等体积 95% 乙醇混合液的吸光度  $A_c$ ,以及待测液与等体积 95% 乙醇混合液的吸光度  $A_j$ 。计算清除率:

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$$

1.2.2 亚油酸乳化体系-硫氰酸铁(FTC)法<sup>[9]</sup>

在 10 mL 具塞玻璃管中,向 1.5 mL 0.05 mol/L 的 PBS(pH 7)中加入试样 100  $\mu$ L,再加入 100  $\mu$ L 20 mmol/L 的亚油酸的乙醇溶液,25  $\mu$ L 20 mmol/L 的  $FeCl_2$ -EDTA,在漩涡分散器上混匀,于 50℃ 暗处水

第一作者:硕士研究生(蔡木易教授级高工为通讯作者)。

\*“863”国家高技术研究发展计划(No. 2007AA10Z327)、“十一五”国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD27 B08)

收稿日期:2008-08-05,改回日期:2008-09-16

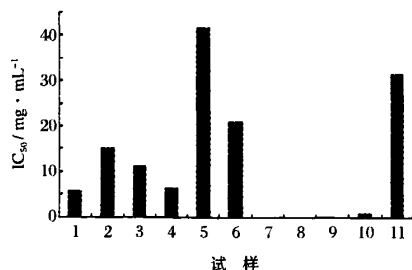
浴保温 2 h。检测时,向 2 mL 75% 乙醇中加入 100  $\mu$ L 反应液,及 100  $\mu$ L 30%  $\text{NH}_4\text{SCN}$  溶液,最后加入 50  $\mu$ L 20 mmol/L 的  $\text{FeCl}_2$  溶液(用质量分数 3.5%  $\text{HCl}$  溶解),采用漩涡分散器振荡后,立即计时,3 min 后用体积分数 75% 乙醇作为参比,在 480 nm 处测定溶液的吸光度。抗氧化剂空白的吸光度为  $A_0$ ,加抗氧化剂时吸光度为  $A_s$ ,抗氧化活力 AA(antioxidative activity)可用公式表示:

$$\text{AA}/\% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 食源性低聚肽及对照物对 DPPH 自由基的清除作用

DPPH 是一种稳定的自由基,其无水乙醇溶液呈深紫色,在 517 nm 处有强吸收,由于自由基清除剂与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,在一定范围内褪色程度与其所接受的电子有定量关系,可以反映出试样清除稳定自由基的能力,因此已经成为评价抗氧化剂清除自由基能力的常用方法<sup>[10~12]</sup>。由图 1 可知,几种食源性低聚肽试样均表现出明显的清除 DPPH 稳定自由基能力,均具有一定的抗氧化活性。在本实验条件下,卵白肽的半清除浓度  $\text{IC}_{50}$  最低,为 5.767 mg/mL,大豆肽的  $\text{IC}_{50}$  与之相当,为 6.268 mg/mL,是清除 DPPH 自由基能力较强的 2 种肽。玉米肽的清除自由基能力相对较弱。与肽试样一起进行实验的对照物样品,则表现出了应有的抗氧化活性。



1—卵白肽;2—海洋蛋白肽;3—海洋骨原肽;4—大豆肽;  
5—玉米肽;6—海洋胶原肽;7—绿茶提取物;8—葡萄  
籽提取物;9—VC;10—曲酸;11—大豆异黄酮。

图 1 肽及对照物对 DPPH 的清除效果

### 2.2 食源性低聚肽及对照物对亚油酸体系的抗氧化作用

亚油酸体系是检验抗氧化剂抗氧化效果很常用的 1 种方法,此方法从抑制油脂过氧化方面来评价抗氧化活性。脂质过氧化作用的中间产物  $\text{LO} \cdot$ 、 $\text{LOO} \cdot$ 、

$\text{LOOH}$  等是生物系统中脂质体、脂蛋白、微粒体、细胞膜等的氧化作用所产生,同样会对生物机体产生一系列的有害作用<sup>[13]</sup>。因此清除脂质过氧化的能力也是衡量抗氧化剂性能的一个重要指标。从图 2 可以看出,肽样品均表现出一定的抗氧化活性。在本实验条件下,当食源性低聚肽试样均取 10 mg/mL 时,2 h 内大豆肽和海洋胶原肽对于亚油酸自氧化的抑制率分别达到了 75.16% 和 58.69%,两者均表现出了很好的抗氧化活性。玉米肽和海洋蛋白肽的抗氧化活性相对较弱,海洋骨原肽的抑制率为 45.66%,抗氧化活性一般。实验同时用绿茶提取物(0.2 mg/mL)和 TBHQ(0.02 mg/mL)进行对照试验,两者的抑制率分别为 42.09% 和 73.59%,表现出了其应有的抗氧化特性。

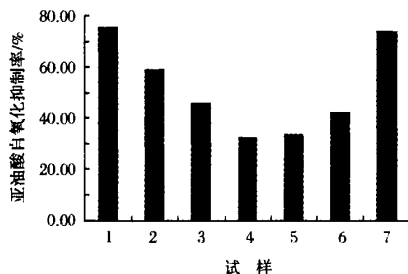


图 2 肽及对照物对亚油酸自氧化的抑制效果

1—大豆肽;2—海洋胶原肽;3—海洋骨原肽;4—玉米肽;  
5—海洋蛋白肽;6—绿茶提取物;7—TBHQ。

文中选用的食源性低聚肽是工业化生产的食品原料,选用的对照物为市售的功能食品添加剂,这样更具有可比性。活性物质的抗氧化活性主要表现在清除自由基、抑制脂质(也可以是蛋白质或 DNA)的氧化降解、抑制促氧化剂(如螯合过渡金属)和还原能力等几方面。各种方法测的都是抗氧化性的一个方面。为了能综合、客观、快速地评价食源性低聚肽的抗氧化活性,实验选用了最为常用的 2 种实验方法来评价抗氧化剂的抗氧化活性——DPPH 稳定自由基清除实验和亚油酸乳化体系-硫氰酸铁(FTC)法。2 种测定方法在一定程度上形成了互补。实验中部分食源性低聚肽表现出了 DPPH 自由基清除活性和亚油酸自氧化的抑制活性,例如大豆肽、海洋胶原肽、海洋骨原肽、海洋蛋白肽以及玉米肽,其中,大豆肽、海洋胶原肽、海洋骨原肽的 2 方面抗氧化能力均较为明显,玉米肽的 2 方面抗氧化能力均较低。卵白肽只表现出 DPPH 清除能力,对于亚油酸自氧化则没有表现出活性。这种结果有可能是由于卵白肽结合了自由基后,本身又作为新的自由基参与脂质氧化。而

那些具有良好抗氧化活性的低聚肽,由于富含供氢体,具有提供氢质子的能力,可使具有高度氧化性的自由基还原,从而终止自由基连锁反应,起到清除或抑制自由基的目的。相关研究中有类似的结果,玉米抗氧化肽对  $O_2^{\cdot-}$  和  $\cdot OH$  都表现出很强的清除自由基能力,且清除  $O_2^{\cdot-}$  能力与清除  $\cdot OH$  能力间存在显著的相关性关系<sup>[14]</sup>;荣建华等人<sup>[3]</sup>研究发现,大豆肽具有较强的抗氧化活性,在浓度 0.1~250 mg/mL 范围内对  $\cdot OH$  都有明显的清除作用,且在上述浓度下无助氧化作用。可见,食源性低聚肽的抗氧化活性正在越来越多的研究中被证实。

### 3 结 论

食源性低聚肽具有明显的抗氧化活性,并且由于其来源于天然食物,可将其作为保健食品的功能配料。食源性低聚肽是 1 种混合肽,有必要进一步对食源性低聚肽进行分离提纯,将抗氧化活性高的肽类提取出来,实现更广阔的应用。DPPH 自由基清除法和亚油酸自氧化的抑制活性法由于机理的不同,在检验活性物质时产生的效果是不一样的,任何单一的方法都不能全面地检测出活性物质的抗氧化活性。然而当这 2 种方法结合使用时,形成了一定程度的互补,可作为食源性低聚肽等活性物质的抗氧化活性体外评价体系的基础。

### 参 考 文 献

- 李 勇. 生物活性肽研究现况和进展[J]. 食品发酵与工业, 2007, 33(1): 3~9
- 王兰芬. 抗氧化剂清除自由基的机理与结构-活性关系的理论研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2004
- 荣建华, 李小定. 大豆肽体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118~120
- 周之辉, 史奎雄. 牛初乳提报物(BCE)对老年人抗衰老作用的研究[J]. 营养学报, 1994, 16(2): 169~173
- Kunio Suetsuna. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle[J]. Mar Bio technol, 2000, 2: 5~10
- 郭 瑶. 罗非鱼皮胶原蛋白的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006
- 王 会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(3): 92~98
- 陈奕, 谢明勇, 弓晓峰. 黑灵芝提取物清除 DPPH 自由基的作用[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 28~32
- Hua Ming Chen, Koji Muramoto, Fumio Yamauchi. Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean  $\beta$ -conglycinin[J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 574~578
- Cotcllen, Bernier J L, Cattcau J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones[J]. J Fre Rad Bio Med, 1998, 20(1): 35~43
- McIlors A, Tappel A L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol [J]. J Biol Chem, 1996, 241(19): 4 353~4 356
- Cavin A, Hostettmann K, Dyatmko, et al. Antioxidant and lipophilic constituents of tinospora crispa[J]. J Plan-ta Med, 1998, 64: 393~396
- 孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999: 19~20
- 张 强, 阙国仕. 玉米抗氧化肽的分离制备及其体外抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(5): 36~39

## Antioxidant Activity of Food-derived Peptides

Ren Wei, Jin Zhentao, Chen Liang, Cai Muiyi, Yi Weixue

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industry, Beijing 100027, China)

**ABSTRACT** DPPH radicals scavenging activities and linoleic acid autoxidation inhibiting activities of food-derived peptides were studied. The results indicated that the DPPH radicals scavenging activities of albumen peptide and soybean peptide were the highest, with  $IC_{50}$  5.767 mg/mL, 6.268 mg/mL respectively; The linoleic acid autoxidation inhibiting activities of soybean peptide and marine collagen peptide were as high as 75.16% and 58.69% respectively. In addition, all peptides samples showed different levels of antioxidant activities.

**Key words** food derived peptides, antioxidation, DPPH, linoleic acid