

doi:10.12301/spxb202201049

文章编号:2095-6002(2024)02-0109-11

引用格式:于梦怡,刘世林,黄志远,等.青刺果抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及其分子对接解析[J].食品科学技术学报,2024,42(2):109-119.



YU Mengyi, LIU Shilin, HUANG Zhiyuan, et al. Isolation, purification, structure identification and molecular docking analysis of antioxidant peptide from *Prinsepia utilis* Royle[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(2):109-119.

## 青刺果抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及其分子对接解析

于梦怡, 刘世林, 黄志远, 董文明, 范江平, 王雪峰\*

(云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

**摘要:**采用超滤、强阴离子交换层析法分离并纯化青刺果蛋白酶解物,以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率为评价指标,筛选具有较好抗氧化活性的肽组分。通过LC-MS/MS鉴定肽序列,结合生物信息学方法分析其理化特性,并进一步利用红外光谱、分子对接技术解析其二级结构特征及与Keap1蛋白的对接位点。研究表明,分离得到的4个组分中F-1组分具有更好的抗氧化活性,其DPPH自由基清除率达到27.67%。选择活性更高,且分子质量小于1 kDa的肽组分,测定得到的3条肽(TALDVPPPR、TLS DAGVGGL和DLINGGKDA)的DPPH自由基清除率,其 $IC_{50}$ 值分别为0.43、0.83、0.51 mg/mL,其中TALDVPPPR的抗氧化活性相对较高。二级结构分析结果表明,3条抗氧化肽均由 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角构成,其中TALDVPPPR的 $\alpha$ -螺旋含量相对较低,使其更易与自由基结合。分子对接结果显示,TALDVPPPR、TLS DAGVGGL、DLINGGKDA以氢键和疏水作用与Keap1蛋白紧密结合,释放Nrf2进入细胞核,并激活一系列具有抗氧化和细胞保护作用的蛋白质表达,即激活Keap1-Nrf2/ARE通路而发挥抗氧化作用。因此,TALDVPPPR、TLS DAGVGGL、DLINGGKDA可作为新型抗氧化剂,研究旨在为青刺果功能性肽的开发利用提供理论参考。

**关键词:**青刺果;抗氧化肽;二级结构;Keap1-Nrf2/ARE;分子对接

**中图分类号:**TS201.2

**文献标志码:**A

青刺果(*Prinsepia utilis* Royle)又被称为青刺尖、扁核木、打油果、阿那斯果等,属于蔷薇科扁核木属常绿灌木。青刺果是云南特色植物资源,在海拔高的地方分布比较多,特别是位于海拔2 200~2 700 m的地带。云南的丽江、大理和迪庆等地是青刺果的主要产地,并且这些地区少数民族将青刺果

作为食药用品已有几千年历史<sup>[1]</sup>。在滇西北地区,青刺果一般被用来榨油,有研究发现,食用青刺果油,可以调节血脂和血压、促进血液循环,进而增强人体的抵抗力<sup>[2]</sup>。青刺果内富含黄酮及多酚类化合物<sup>[3-4]</sup>,具有较好的抑菌、抗氧化、降血脂等功效。此外,青刺果含有丰富的蛋白质,是优良的植物蛋白

收稿日期:2022-11-17

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(31960462);云南省农业联合专项重点项目(202101BD070001-013);云南省科协第三届青年科技人才托举工程项目(2022-2024)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China Regional Projects (31960462); Yunnan Agricultural Joint Special Key Projects (202101BD070001-013); The 3rd Young Elite Scientists Sponsorship Program by Yunnan Science and Technology Association(2022-2024)。

第一作者:于梦怡,女,硕士研究生,研究方向为食源性生物活性肽。

\*通信作者:王雪峰,男,副教授,博士,主要从事食品蛋白质资源利用与乳品科学方面的研究。

资源<sup>[5]</sup>。据报道,青刺果脱脂粕中蛋白质含量达到24.6%<sup>[6]</sup>,但这部分常被当作饲料喂养牲畜或者直接丢弃,造成青刺果蛋白质资源的浪费。目前对青刺果的研究主要集中在青刺果油、黄酮、酚类物质上,对蛋白的资源利用率极低。因此,充分利用青刺果蛋白质资源是很有必要的。

生物活性肽是对生物机体的生命活动有积极作用的肽类化合物<sup>[7]</sup>,通常含有2~20个氨基酸残基,分子质量小于6 kDa<sup>[8]</sup>。蛋白质被酶解后可产生多种活性肽,如抗癌肽、抗炎肽、抗氧化肽等<sup>[9]</sup>。活性肽由于具有较短的肽链,适宜于人体吸收而被广泛添加到食品中。抗氧化肽即拥有抗氧化活性的生物活性肽<sup>[10]</sup>,作为天然抗氧化剂,具有抗氧化性高,来源广泛,安全、无毒、高效的特点。目前抗氧化肽主要从水产品、植物中分离得出,如陈卫明等<sup>[11]</sup>从贻贝中制备出抗氧化肽并将其应用于生产功能性食品中,刘红梅等<sup>[12]</sup>从花生粕中发现抗氧化肽并通过复合酶法对制备工艺进行优化。Keap1-Nrf2/ARE信号通路是抗氧化肽在机体内发挥作用的重要通路,抗氧化肽直接作用于Keap1-Nrf2结合位点,使复合物中的Nrf2被释放进入细胞核,激活抗氧化反应元件(ARE),从而激活一系列具有抗氧化和细胞保护作用的蛋白表达,发挥抗氧化功能<sup>[13]</sup>。分子对接技术因为容易识别配体-蛋白质复合物的结合模式,在结构分子生物学和药物化学中得到广泛应用<sup>[14]</sup>。因此,通过分子对接技术研究抗氧化肽与Keap1-Nrf2的结合能力,有望从分子水平阐明其抗氧化活性的潜在作用机制。

课题组前期从青刺果中获得了具有较好抗氧化活性的蛋白水解产物,本研究拟以该蛋白水解产物为对象,采用超滤法、离子交换层析法分离纯化抗氧化肽成分,通过LC-MS/MS结合生物信息学方法探究抗氧化肽理化特性,进一步利用红外光谱、分子对接技术解析其二级结构特征以及与Keap1蛋白的结合位点。本研究旨在从云南特色植物资源青刺果中寻找新型抗氧化肽,希望能够进一步丰富抗氧化肽的来源和序列库,也为青刺果抗氧化肽的开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

青刺果种子(粗蛋白质量比为18.49%),香格里拉

碧罗雪山生物科技公司;碱性蛋白酶(200 U/mL),上海瑞永生物科技有限公司;超滤膜,上海摩速科学器材有限公司;Q-琼脂糖凝胶,北京索莱宝科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海源叶生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

HL-2型恒流泵,上海嘉鹏仪器有限公司;BS1245-CW型电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;SCIENTZ-18N型真空冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;LC20020985型手持pH计,上海力辰邦西仪器科技有限公司;R-BIOPHARMWEL型酶标仪,赛默飞世尔科技有限公司;DHG-9070A型超纯水机,南京易普易达科技发展有限公司;SHZ-D型循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;DBS-100型全自动部分收集器,上海泸西分析仪器厂有限公司;BS224S型电热恒温水浴锅,永光明医疗仪器有限公司;EASY-nLC1200型色谱仪,美国安捷伦公司;IT-07A3型加热型磁力搅拌器,上海一恒科学仪器有限公司;Scientz-50C型多功能恒温超声波萃取仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;UFSC40001型搅拌式超滤装置,上海登宁科技有限公司;RE-52型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 青刺果蛋白提取

参照王雪峰等<sup>[15]</sup>的蛋白提取方法。对青刺果干果进行粉碎处理。称取100 g青刺果粉末与1 L NaCl溶液(0.3 mol/L)混合均匀,并用0.1 mol/L的NaOH和HCl调节pH值至7.15。将校正pH值后的溶液在37℃水浴下孵育40 min,用真空泵抽气过滤去除残留物,置于旋转蒸发器,在40℃浓缩至滤液的1/3,剩余液体冷冻干燥,并于-20℃保存。

#### 1.3.2 青刺果蛋白酶解液制备

青刺果蛋白酶解液制备参照王雪峰等<sup>[15]</sup>的方法。称取2 g样品,在料液比(g/mL)为1:30,碱性蛋白酶添加量为4.6%,酶促水解温度为60℃,pH值为7.0的条件下酶促水解4.5 h。酶促水解后在90℃的水浴锅中灭酶10 min,等待酶解液冷却,放入4℃冰箱保存。

#### 1.3.3 青刺果蛋白的超滤膜分离

使用小型搅拌式超滤装置对酶解产物进行超滤分离,分离温度为4℃,压力小于0.1 MPa,超滤膜的截留分子质量分别为3、5、10 kDa。得到3个组分的

分子质量范围分别为:小于3 kDa、3~5 kDa和5~10 kDa。将超滤得到的各级组分冷冻干燥,并测定各组分的DPPH自由基清除能力。

#### 1.3.4 青刺果蛋白的层析分离

参考李亚会等<sup>[16]</sup>的离子交换层析方法,将DPPH自由基清除活性较高的超滤截留组分和0.05 mol/L、pH值为9.5的Tris-HCl缓冲溶液配成质量浓度为5 mg/mL的样品溶液。上样前将层析柱填充紧实,柱平衡缓冲液为0.05 mol/L的Tris-HCl缓冲液,平衡12 h,上样量为30 mL。分别用0.07、0.18、1.00 mol/L的NaCl溶液进行梯度洗脱,全自动部分收集器收集洗脱组分,透析48 h,冷冻干燥并测量其DPPH自由基清除能力。

#### 1.3.5 肽序列的鉴定

色谱条件:RP-C18型纳米柱(150 μm × 20 mm, 5 μm),流动相A为体积分数为0.1%的甲酸-水溶液,流动相B为体积分数为0.1%的甲酸-乙腈溶液,流速为300 nL/min,LC线性梯度为0 min时B相体积比例为5%,在50 min内B相体积比例线性增加至38%,在2 min内B相体积比例线性增加至100%,并在100%维持8 min。

质谱条件:使用前经标准校正液校正质谱仪,母离子扫描范围 $m/z$ 为350~3 000,在 $m/z$ 为200时MS1的分辨率为70 000,自动增益控制目标(AGC target)设置为 $3 \times 10^6$ ,最大注射时间为100 ms,MS2分辨率设置为17 500,AGC target设置为 $1 \times 10^5$ ,最大注射时间为50 ms。

通过BIOPEP-UWM([https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start\\_biopep.php](https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php))和Bioware(<http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/>)数据库,比对肽氨基酸序列。使用PepDraw(<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw>)预测肽的净电荷和疏水性。使用Innovagen(<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>)预测肽的相对分子质量、溶解度和等电点。

#### 1.3.6 多肽的化学合成

采用固相肽合成法合成多肽以验证其抗氧化活性(合成多肽纯度>95%)。称取一定量的fmoc-丝氨酸羟基的叔丁基保护基树脂倒入反应柱中,加入 $N,N$ -二甲基甲酰胺浸泡30 min,抽干。向反应柱中加入适量脱保护溶液(体积分数为20%的六氢吡啶和体积分数为80%的 $N,N$ -二甲基甲酰胺)均匀混合,通氮气搅拌鼓动30 min,抽干。向反应柱中加

入适量 $N,N$ -二甲基甲酰胺,通氮气鼓动2 min,抽干,重复操作6次。称取一定量的保护氨基酸(物质的量为3倍树脂载量)和 $O$ -苄并三氮唑-四甲基腺六氟磷酸盐(物质的量为285倍树脂载量)(缩剂)加入反应柱中,再加入树脂6倍物质的量的 $N$ -甲基吡啶(有机碱),通氮气搅拌鼓动30 min。多肽合成完毕后洗涤并干燥用于多肽的切割,脱除多肽N端的Fmoc保护基及侧链保护基,并从树脂上切下多肽,洗涤、纯化并干燥得到合成肽。

#### 1.3.7 DPPH自由基清除率及 $IC_{50}$ 值测定

参考尹国友等<sup>[17]</sup>的方法。将0.20 mmol/L的DPPH溶液100 μL(用体积分数95%乙醇溶液配置)加入100 μL的样品溶液中,将其充分混匀后,置于室温条件,避光处理30 min,在波长为517 nm处测定吸光度 $A_1$ ;阴性对照组为100 μL 95%乙醇溶液代替DPPH溶液,加入100 μL样液混合,测定吸光度 $A_2$ ;空白组为100 μL DPPH溶液,加入100 μL蒸馏水混合,测定吸光度 $A_0$ 。DPPH自由基清除率按式(1)计算。抗氧化肽的 $IC_{50}$ 值定义为抑制50%抗氧化活性所需抑制剂的质量浓度,使用Origin软件进行 $IC_{50}$ 值的计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, $A_0$ 为空白组的吸光值, $A_1$ 为样品组的吸光值, $A_2$ 为阴性对照组的吸光值。

#### 1.3.8 二级结构的测定

采用红外光谱仪,对合成肽进行二级结构分析。设置扫描波数为400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率4  $\text{cm}^{-1}$ ,在波数精度0.01  $\text{cm}^{-1}$ 条件下扫描64次。谱图使用PeakFit V4.12软件进行分析,二级结构的相对含量根据红外光谱中各子峰与二级结构对应关系进行计算。

#### 1.3.9 分子对接模拟

采用ChemBioDraw Ultra 14.0构建多肽结构,导入ChemBio3D Ultra 14.0进行能量最小化,将Minimum RMS Gradient设置为0.001,将小分子保存为mol2格式。将优化好的小分子导入AutoDockTools(v1.5.6)进行前期处理。从PDB数据库下载Keap1蛋白结构(PDB ID:4L7B),使用Pymol2.3.0去除蛋白结晶水、原始配体等。采用AutoDock Vina1.1.2进行对接,Keap1蛋白相关参数设置为center\_x = 9.651, center\_y = -16.502, center\_z =

-11.702; 搜索空间为 size\_x:126, size\_y:126, size\_z:126(每个格点的间距为0.375),空间结构变化数:10。

#### 1.4 数据处理

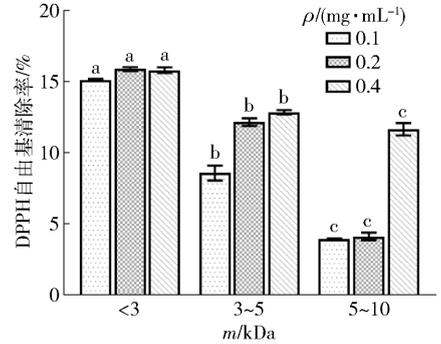
所有实验至少重复3次,实验数据以平均值±标准差表示,采用SPSS 17.0软件进行 $t$ 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 青刺果蛋白酶解物不同超滤组分的抗氧化活性分析

利用截留分子质量分别为3、5、10 kDa的3种超滤膜将青刺果蛋白酶解物截留成4个组分,其分子质量分别为小于3 kDa、3~5 kDa、5~10 kDa和大于10 kDa。高明侠等<sup>[18]</sup>鉴定出大于10 kDa组分的多肽抗氧化活性最低,因此选取小于3 kDa、3~5 kDa、5~10 kDa的3个组分分析超滤组分的抗氧化活性,实验结果见图1。由图1可知,在样品质量浓度为0.1~0.4 mg/mL时,质量浓度为0.4 mg/mL的组分抗氧化活性最高,其次是质量浓度为0.2 mg/mL的组分,说明随着肽质量浓度的增大,其DPPH自由基清除能力增强,因此选择样品质量浓度为0.4 mg/mL进行后续实验。有研究表明,蛋白酶解物超滤组分的分子质量和抗氧化活性具有显著的负相关性<sup>[19]</sup>。图1显示,超滤物的质量浓度为0.1 mg/mL时,分子质量为5~10 kDa,3~5 kDa,小于3 kDa的青刺果蛋白酶解物的DPPH自由基清除率由高到低分别为:4.04%、9.00%、15.10%;质量

浓度为0.2 mg/mL时,3个组分的DPPH自由基清除率分别为4.37%、12.28%、15.81%;质量浓度为0.4 mg/mL时,3个组分的DPPH自由基清除率分别为11.38%、13.00%、15.98%。结果表明,不同质量浓度时,青刺果蛋白酶解物均表现为分子质量越小,其抗氧化活性越高。因此,确定以小于3 kDa的青刺果酶解物组分进行下一步的柱层析分离。



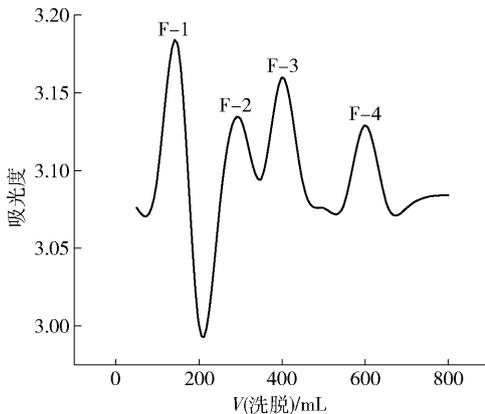
不同小写字母表示组间数据差异显著( $P < 0.05$ )。

图1 不同截留分子质量的青刺果蛋白酶解物DPPH自由基清除率

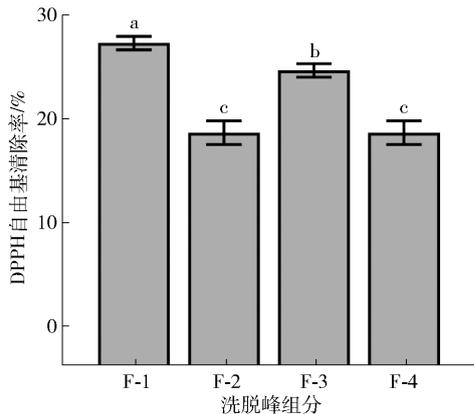
Fig. 1 Scavenging rate of DPPH free radicals by protease hydrolysate of *Prinsepia utilis* Royle with different retention molecular weights

### 2.2 分离纯化肽组分及其抗氧化性分析

由于离子交换能力的不同,可以使用离子交换层析法分离目标化合物,这一方法被广泛应用于分离蛋白质酶解物中的肽段。本研究采用离子交换层析法纯化分子质量小于3 kDa的青刺果酶解物超滤组分,实验结果如图2。由图2(a)可以看出,该组



(a) 强阴离子交换柱层析洗脱峰



(b) 不同洗脱组分的DPPH自由基清除能力

不同小写字母表示组间数据差异显著( $P < 0.05$ )。

图2 离子交换层析洗脱峰和不同洗脱组分的青刺果蛋白酶解物的DPPH自由基清除能力

Fig. 2 Strong anion exchange chromatography elution peak and DPPH free radical scavenging ability of protease hydrolysate of *Prinsepia utilis* Royle with different elution components

分经过离子交换柱分离后,得到4个洗脱峰,分别为峰F-1、F-2、F-3、F-4。收集冻干后分别测定4个组分的DPPH自由基清除率。由图2(b)可知,在肽质量浓度为0.4 mg/mL时,4个洗脱峰组分的DPPH自由基清除率由高到低分别为:F-1最强,F-3次之,F-2与F-4相同。F-1组分的DPPH自由基清除活性为27.67%,并且明显高于2.1中未经纯化的青刺果酶解物超滤组分,说明青刺果中的多肽经过纯化后表现出更好的抗氧化活性。因此选取F-1组分进一步对其进行肽组分鉴定。

### 2.3 青刺果中肽序列的分析

对获得的洗脱峰F-1组分,通过LC-MS/MS确定其分子质量和氨基酸序列,再通过与BIOPEP-UWM和Bioware数据库进行比对,共发现了5条未被报道的新型肽序列,分别为QSTPNPNVGPNYVTGPIMPMGGGGGA, PGSPSSSAPLPNPHVDE, TALDVPPPR, TLS DAGVGGL, DLINGGKDA。5条肽序列的分子质量分布在889.46~2 529.14 Da,含有9~27个氨基酸残基。对5条肽列的水溶性、等电点、相对分子质量、净电荷和疏水性等理化性质进行预测,分析结果见表1。

为进一步筛选出具有更高抗氧化活性的肽段用于合成并验证其活性,对肽的分子质量、特定氨基酸与抗氧化活性的关系进行分析。当多肽分子质量小于1 kDa时,更能表现出强抗氧化性。从F-1组分

中共鉴定到3条分子质量小于1 kDa的肽,分别为TALDVPPPR、TLS DAGVGGL、DLINGGKDA,其分子质量依次为965.54、889.46、903.44 Da,这3条肽可能具有更高的抗氧化活性。有报道称,疏水氨基酸残基(Val、Pro、Tyr、Leu、Ala、Lys和Met)比例高的多肽具有较强的抗氧化活性,因为疏水性氨基酸残基有利于提升其在脂相中的溶解度,并且增加肽与脂质中自由基相互作用<sup>[20]</sup>。由表1可知,3条多肽的疏水性氨基酸占据总氨基酸含量的55.56%~70.00%,推测TALDVPPPR序列中的Ala、Val、Leu和Pro, TLS DAGVGGL序列中的Gly、Ala、Val和Leu, DLINGGKDA序列中的Gly、Ala、Leu和Ile可能帮助其与脂质分子相互作用以清除自由基。Suetsuna<sup>[21]</sup>和Saiga等<sup>[22]</sup>研究表明,多肽中的酸性和碱性氨基酸可以通过带电荷的侧链基团整合促氧化的金属离子, TALDVPPPR、TLS DAGVGGL、DLINGGKDA均含有酸性氨基酸, TALDVPPPR和DLINGGKDA含有碱性氨基酸,也可能使这3条肽具有抗氧化活性。有研究人员发现,多肽中的Glu-Leu序列<sup>[23]</sup>、末端Leu的存在<sup>[24]</sup>和Pro-Pro的叠加作用<sup>[25]</sup>与肽的抗氧化能力相关,而肽TLS DAGVGGL含有Glu-Leu序列和末端的亮氨酸, TALDVPPPR含有Pro-Pro-Pro序列,说明其有较大可能具有抗氧化活性。因此,进一步合成这3条多肽以验证其抗氧化活性。

表1 由青刺果蛋白酶解物分离得到的5种多肽的数据库比对结果

Tab. 1 Database comparison results of five polypeptides isolated from protease hydrolysates of *Prinsepia utilis* Royle

肽序列	氨基酸数	m/Da	净电荷	疏水率/%	酸、碱性氨基酸比率/%	水溶性	等电点(pH)
QSTPNPNVGPNYVTGPIMPMGGGGGA	27	2 529.14	0.0	70.37	0	差	3.32
PGSPSSSAPLPNPHVDE	17	1 687.79	-1.9	52.94	17.64	好	3.92
TALDVPPPR	9	965.54	0.0	66.67	22.22	好	6.33
TLS DAGVGGL	10	889.46	-1.0	70.00	10.00	差	0.69
DLINGGKDA	9	903.44	-1.0	55.56	33.33	好	3.71

### 2.4 青刺果中新型肽的DPPH自由基清除率分析

对LC-MS/MS鉴定筛选出的3条抗氧化肽通过固相合成法获得纯肽,其合成肽纯度和一级质谱如图3。由图3(a)、(c)、(e)可见,在第13.120、9.672、8.772 min出现的目标峰分别代表合成肽TALDVPPPR、TLS DAGVGGL和DLINGGKDA,纯度均大于95%。由图3(b)、(d)、(f)可见, TALDVPPPR、TLS DAGVGGL和DLINGGKDA的分子离子峰的

质量分别为963.45、887.35、900.40 Da,与理论值(表1)相近,表明合成结果可靠。分别测定3条合成肽的DPPH自由基清除能力,结果如图4。由图4可知,3条肽中TALDVPPPR具有最高的DPPH自由基清除能力,清除率为19.93%,计算得 $IC_{50}$ 值为0.43 mg/mL,低于纳豆肽( $IC_{50}$ 值为2.06 mg/mL)<sup>[26]</sup>、长萼堇菜叶蛋白水解肽( $IC_{50}$ 值为1.4 mg/mL)<sup>[27]</sup>和龙须菜抗氧化肽( $IC_{50}$ 值为0.4495 mg/mL)<sup>[28]</sup>,但要高

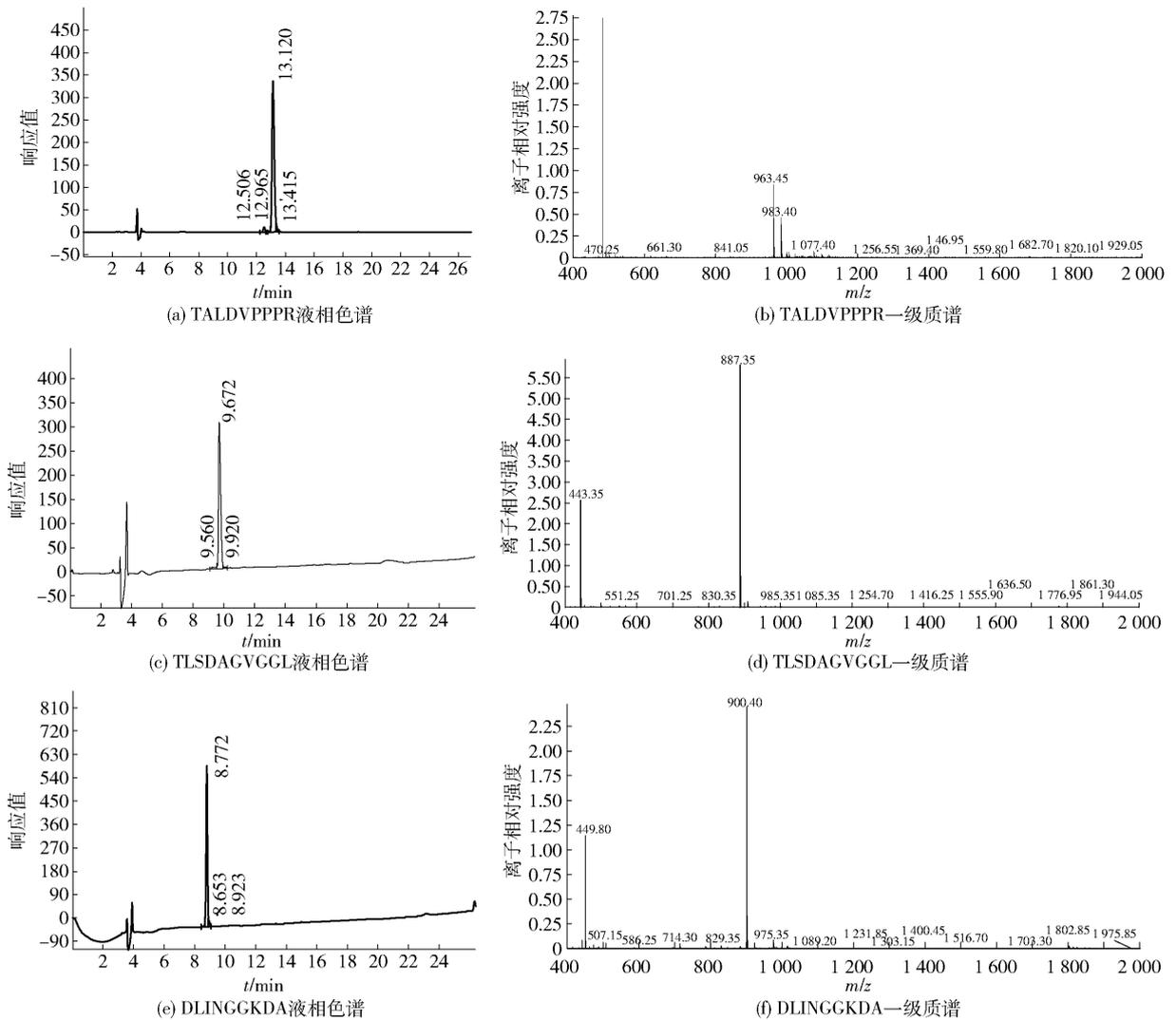
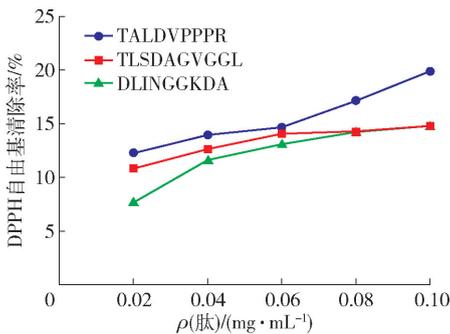


图3 3条抗氧化肽的液相纯度和一级质谱

Fig. 3 Liquid phase purity and primary mass spectrometry of three antioxidant peptides

图4 3条抗氧化肽的DPPH自由基清除率  
Fig. 4 DPPH free radicals scavenging rate of three antioxidant peptides

0.51 mg/mL, 高于肽序列 TALDVPPPR 的  $IC_{50}$  值, 表明肽 TALDVPPPR 相对肽 TLSDAGVGGL、DLINGGKDA 抗氧化能力更强。

## 2.5 青刺果抗氧化肽的二级结构解析

蛋白内部不同的官能团结构会选择性吸收不同的红外波长, 从而在红外光谱中产生不同的特征吸收峰, 3条抗氧化肽红外光谱分峰拟合结果见图5。通常拟合抗氧化肽原始光谱中  $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$  的吸收带, 并利用相对面积来计算蛋白质二级结构相对含量。由图5可见, 在酰胺 I 带范围内, 拟合了7~9个子峰,  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲的波数分别为  $1650 \sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1600 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1660 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1640 \sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 。氨基酸残基的组成影响蛋白质的二级结构, 如 Ala、Met 和 Glu

于发酵苏麻饼粕抗氧化肽 ( $IC_{50}$  值为  $0.17 \text{ mg/mL}$ )<sup>[29]</sup>。TLSDAGVGGL、DLINGGKDA 的  $IC_{50}$  值分别为 0.83、

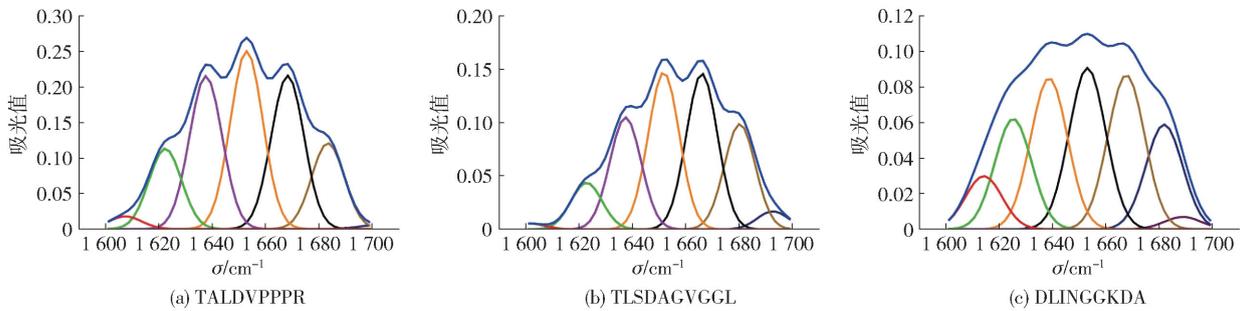


图5 3条抗氧化肽红外光谱的分峰拟合

Fig. 5 Peak fitting of infrared spectra of three bands of antioxidant peptides

残基倾向于形成 $\alpha$ -螺旋结构, Ile 和 Val 残基形成 $\beta$ -折叠结构的能力较强,而 Gly、Pro、Tyr、Cys 和 Asp 残基最有可能形成 $\beta$ -转角构象。TALDVPPPR、TLS-DAGVGGL、DLINGGKDA 含有的甘氨酸有助于其形成 $\alpha$ -螺旋结构, TALDVPPPR、TLS-DAGVGGL 含有的缬氨酸, DLINGGKDA 含有的异亮氨酸利于其形成 $\beta$ -折叠结构, TALDVPPPR 含有的脯氨酸和天冬氨酸,以及 TLS-DAGVGGL、DLINGGKDA 含有的甘氨酸和天冬氨酸,使其倾向于形成 $\beta$ -转角。表2列出了各抗氧化肽的二级结构含量, TALDVPPPR、TLS-DAGVGGL、DLINGGKDA 均由 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角结构组成, $\alpha$ -螺旋所占比例最小,分别为 21.57%、26.00% 和 26.67%。Jiang 等<sup>[30]</sup>发现,较低比例的无规则卷曲和 $\alpha$ -螺旋结构与抗氧化能力增强密切相关, $\alpha$ -螺旋结构含量对抗氧化活性的影响更大。3条抗氧化肽均不含无规则卷曲结构,其中 TALDVPPPR 的 $\alpha$ -螺旋结构含量最低,由 2.4 可知, TALDVPPPR 的 DPPH 自由基清除率最高。 $\alpha$ -螺旋借助氢键作用形成,是蛋白质分子或肽内最为紧密的结构,低 $\alpha$ -螺旋结构可能使肽活性位点暴露,容易与自由基结合,从而达到清除自由基的目的<sup>[31]</sup>。

表2 3条抗氧化肽二级结构相对含量

肽	二级结构相对含量			%
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	
TALDVPPPR	21.57	42.11	36.32	
TLS-DAGVGGL	26.00	28.15	45.85	
DLINGGKDA	26.67	36.90	36.43	

## 2.6 分子对接模拟结果分析

为进一步从分子水平上探究肽 TALDVPPPR、TLS-DAGVGGL、DLINGGKDA 的抗氧化能力,将3条

肽与 Keap1 蛋白 (PDB ID:4L7B) 进行分子对接模拟,分析结果见图6。Keap1-Nrf2/ARE 信号通路是机体减轻外源性氧化损伤必不可少的防御路径,抑制 Keap1-Nrf2 相互作用可以激活该通路下游的抗氧化和细胞保护作用蛋白的相关基因表达,从而提高机体的抗氧化能力。许多研究表明,抗氧化肽可以直接作用于 Keap1-Nrf2 结合位点,与 Keap1 结合并释放 Nrf2 进入细胞核启动抗氧化基因的表达<sup>[32]</sup>。Keap1 蛋白 (PDB ID:4L7B) 自身含有配体,可以根据自带的配体设计适当的结合位点,适宜作为分子对接试验的受体。

Lo 等<sup>[33]</sup>比较了 Keap1 蛋白 Kelch 结构域和 Nrf2 衍生肽之间的氨基酸接触,发现疏水氨基酸和带电氨基酸是 Keap1-Nrf2 复合物结合的主要贡献者,特别是 Keap1 中 Tyr334、Arg380、Asn382、Arg415、Arg483、Tyr525 和 Tyr572。如果小肽能与以上 Keap1 的氨基酸残基产生相互作用,其有干扰 Keap1-Nrf2 相互作用的可能性。图6和表3显示了3条抗氧化肽与 Keap1 蛋白结合的作用方式、结合残基和相互作用能。TALDVPPPR、TLS-DAGVGGL、DLINGGKDA 对 Keap1 蛋白的作用能分别为 -2.20、-1.74、-1.72 kJ/mol,表明3条多肽可以自发地与 Keap1 蛋白结合。TALDVPPPR 可以与 Val465、Arg470、Arg326、Gly564 残基形成4个氢键,与 Gly417、Gly367、Ala366、Val512 等21个残基产生疏水相互作用, TLS-DAGVGGL 可与 Arg483、Arg415、Ser555、Asn414、Tyr334 形成5条氢键,存在12种疏水作用, DLINGGKDA 可与 Arg326、Val369、Val512、Val420、Arg470 形成5条氢键,存在15种疏水作用。TALDVPPPR 和 DLINGGKDA 与 Keap1 蛋白形成 Arg470 和 Arg326 两个共同的氢键结合位点。此外, TALDVPPPR 和 DLINGGKDA 均被关键氨基酸残基 Val467、Leu610、Val608、

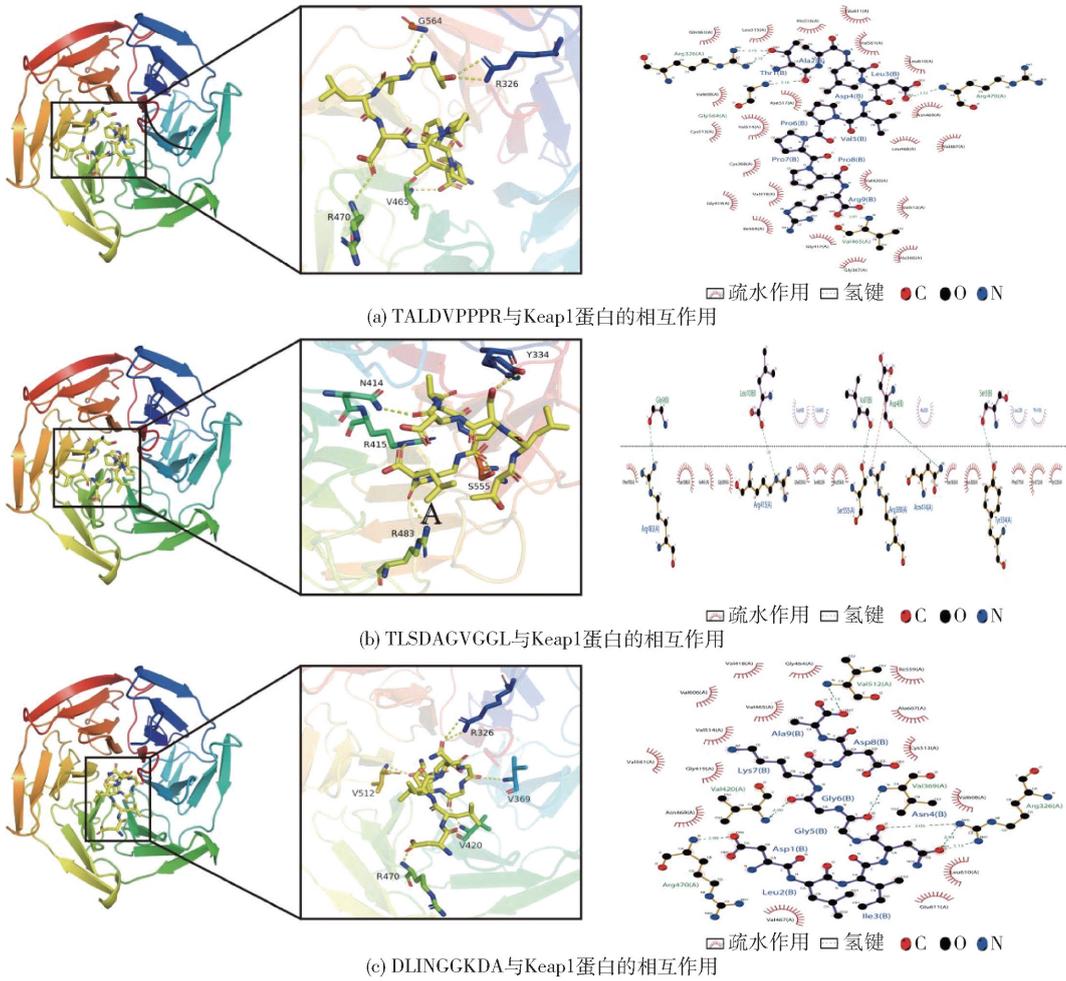


图 6 3 条抗氧化肽与 Keap1 蛋白的相互作用

Fig. 6 Interactions between three antioxidant peptides and Keap1 protein

表 3 3 条抗氧化肽与 Keap1 蛋白的分子对接分析

Tab. 3 Molecular docking analysis of three antioxidant peptides and Keap1 protein

肽	作用方式	Keap1 受体蛋白的氢键残基、疏水残基	相互作用能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )
TALDVPPPR	氢键	Val465 (A)、Arg470 (A)、Arg326 (A)、Gly564 (A)	-2.20
	疏水作用	Gly417 (A)、Gly367 (A)、Ala366 (A)、Val512 (A)、Val420 (A)、Leu468 (A)、Val467 (A)、Asn469 (A)、Leu610 (A)、Val561 (A)、Glu611 (A)、His516 (A)、Leu515 (A)、Gln563 (A)、Val608 (A)、Val514 (A)、Cys513 (A)、Cys368 (A)、Val418 (A)、Gly419 (A)、Ile559 (A)	
TLSDAGVGGL	氢键	Arg483 (A)、Arg415 (A)、Ser555 (A)、Asn414 (A)、Tyr334 (A)	-1.74
	疏水作用	Phe478 (A)、Ser508 (A)、Ile461 (A)、Gly509 (A)、Gly603 (A)、Ser602 (A)、Ala556 (A)、Ser563 (A)、Asn382 (A)、Phe577 (A)、Tyr572 (A)、Tyr525 (A)	
DLINGKKA	氢键	Arg326 (A)、Val369 (A)、Val512 (A)、Val420 (A)、Arg470 (A)	-1.72
	疏水作用	Val467 (A)、Glu622 (A)、Leu610 (A)、Val608 (A)、Cys513 (A)、Ala607 (A)、Ile559 (A)、Gly464 (A)、Val418 (A)、Val606 (A)、Val465 (A)、Val514 (A)、Gly419 (A)、Val561 (A)、Asn469 (A)	

Cys513、Ile559、Val418、Gly419、Val561 和 Asn469 包围,形成稳定的疏水结合。分子对接结果表明,3 条

抗氧化肽均有可能与 Keap1 竞争性结合释放 Nrf2,即通过激活 Keap1-Nrf2/ARE 途径发挥抗氧化活性。

### 3 结 论

本研究采用超滤、离子交换层析法从青刺果蛋白酶解物中分离并鉴定出3条潜在的抗氧化肽 TALDVPPPR、TLSDAGVGGL 和 DLINGGKDA。体外抗氧化活性研究表明, TALDVPPPR 的抗氧化活性最高,其DPPH自由基清除率  $IC_{50}$  值为 0.43 mg/mL。红外光谱分析表明,3条肽的二级结构均由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角构成,其中以肽 TALDVPPPR 的  $\alpha$ -螺旋含量最低。低  $\alpha$ -螺旋结构使肽暴露出更多的活性位点与自由基进行结合,有助于其发挥抗氧化活性。此外,分子对接结果表明,3条肽与 Keap1 蛋白均通过氢键和疏水相互作用产生较强的结合力,起到干扰 Keap1 与 Nrf2 结合的作用,从而激活 Keap1-Nrf2/ARE 通路发挥抗氧化功能。研究结果表明,从青刺果中提取的3条肽 TALDVPPPR、TLSDAGVGGL 和 DLINGGKDA 可以作为新型抗氧化肽被进一步开发和利用。

#### 参考文献:

[1] 谢宗万. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:349.  
XIE Z W. National Chinese herbal medicine compilation (volume one)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975: 349.

[2] 梅文泉,汪禄祥,黎其万,等. 云南青刺果仁、叶微量元素成分分析[J]. 广东微量元素科学,2002(7): 53-56.  
MEI W Q, WANG L X, LI Q W, et al. Analysis on the content of trace elements in kernels and leaves of *Prinsepia utilis* Royle yunnanensis[J]. Guangdong Trace Element Science, 2002(7): 53-56.

[3] 詹素琼,袁定胜,李旭廷,等. 青刺果总黄酮定性分析及含量测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(28): 15580-15582.  
ZHAN S Q, YUAN D S, LI X Y, et al. Identification and determination of total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(28): 15580-15582.

[4] 张璇. 青刺果酚类物质组成及其生物活性研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2019.  
ZHANG X. Study on the composition and bioactivity of phenolics from *Prinsepia utilis* Royle[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2019.

[5] 和丽,熊海涛,王雪峰,等. 响应面试验优化复合酶法制备青刺果抗菌肽的工艺研究[J]. 中国油脂,2021,46(6): 33-37.  
HE L, XIONG H T, WANG X F, et al. Optimization of preparation of antimicrobial peptides from *Prinsepia utilis* Royle by compound enzymes using response surface methodology[J]. China Oil and Fats, 2021, 46(6): 33-37.

[6] 高凡丁,张成庭,蔡圣宝. 青刺果种子和油粕中的营养成分对比及酚类物质组成和抗氧化活性分析[J]. 食品与发酵工业,2019,45(2): 151-158.  
GAO F D, ZHANG C T, CAI S B. Comparative analysis of multiple nutrients, phenolic compounds and antioxidant activities of the seeds and pomace of *Prinsepia utilis* Royle[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(2): 151-158.

[7] CHAKRABARTI S, GUHA S, MAJUMDER K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1738.

[8] KARAMIZ, AKBARI-ADERGANI B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(2): 535-547.

[9] 焦斐,杨倩,杨超,等. 陇藜1号藜麦清蛋白体外消化产物抗氧化活性及结构特征分析[J]. 食品科学技术学报,2023,41(3): 116-126.  
JIAO F, YANG Q, YANG C, et al. Antioxidant activity and structural characteristics of digestion products of Longli 1 quinoa albumin *in vitro*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(3): 116-126.

[10] 张红玉,李会珍,张天伟,等. 抗氧化肽作用机制研究进展[J]. 食品安全质量检测报,2022,13(12): 3981-3988.  
ZHANG H Y, LI H Z, ZHANG T W, et al. Research progress on the mechanism of antioxidant peptides[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(12): 3981-3988.

[11] 陈卫明,尹美丽,钟机,等. 酶解制备贻贝抗氧化肽与功能性鱼糕的研制[J]. 食品科学技术学报,2016,34(6): 24-30.  
CHEN W M, YIN M L, ZHONG J, et al. Development of mussel antioxidant peptides and functional kamaboko gels[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 34(6): 24-30.

[12] 刘红梅,师广波,李向东,等. 复合酶法水解花生粕制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品科学技术学报,

- 2014, 32(3): 59–64.
- LIU H M, SHI G B, LI X D, et al. Optimization of processing of antioxidant peptides from peanut meal using compound enzymes [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(3): 59–64.
- [13] 李良煜. 基于 Keap1–Nrf2 通路的蛋清源抗氧化小肽筛选及其作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- LI L Y. Study on the antioxidative mechanism and screening of antioxidant small peptides from egg white via Keap1–Nrf2 pathway[D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [14] MENG X Y, ZHANG H X, MEZEI M, et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery [J]. *Current Computer-Aided Drug Design*, 2011, 7(2): 146–157.
- [15] 王雪峰, 陈越, 赵琼, 等. 响应面试验优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(1): 173–181.
- WANG X F, CHEN Y, ZHAO Q, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* seed protein by response surface methodology and the antibacterial activity of peptides of protein hydrolysate [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(1): 173–181.
- [16] 李亚会, 李积华, 吉宏武, 等. 远东拟沙丁鱼抗氧化肽的分离纯化及结构解析[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(2): 229–238.
- LI Y H, LI J H, JI H W, et al. Isolation, purification and structural analysis of antioxidant peptides from *Sardinops sagax* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(2): 229–238.
- [17] 尹国友, 孙婕, 澹博, 等. 双水相萃取拟籽粕多糖的工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(2): 134–142.
- YIN G Y, SUN J, TAN B, et al. Study on optimal technology and antioxidant activity of polysaccharide extracted by two aqueous phase from Chinese leek seed meal [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(2): 134–142.
- [18] 高明侠, 苗敬芝, 吕兆启, 等. 超滤技术分离花生抗氧化肽及其性能研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(18): 54–57.
- GAO M X, MIAO J Z, LÜ Z Q, et al. Ultrafiltration separation and properties of peanut antioxidant peptides [J]. *Food Science*, 2009, 30(18): 54–57.
- [19] 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, WENG 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.
- [20] MATSUI R, HONDA R, KANOME M, et al. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 750–755.
- [21] SUETSUNA K. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle [J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(1): 5–10.
- [22] SAIGA A, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3661–3667.
- [23] SUETSUNA K, UKEDA H, OCHI H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11(3): 128–131.
- [24] YMA Y Y, XIONG Y L, ZHAI J J, et al. Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from *in vitro* digests of buckwheat protein [J]. *Food Chemistry*, 2009, 118(3): 582–588.
- [25] AGRAWAL H, JOSHI R, GUPTA M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2016, 204: 365–372.
- [26] 倪庆圆. 纳豆肽的分离纯化及抗氧化活性测定[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2021.
- NI Q Y. Isolation and purification of natto peptides and determination of antioxidant activity [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2021.
- [27] 习雪玲. 药用植物长萼堇菜叶蛋白水解肽的制备及功能表征[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- XI X L. Preparative processes and functional characterizations of protein-hydrolyzed peptides from the medicinal plant *Viola inconspicua* [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020.
- [28] 刘晶. 龙须菜抗氧化肽的制备、分离纯化及结构鉴定[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
- LIU J. Preparation, purification and structure identification of antioxidant peptides from *Gracilaria lemaneiformis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021.
- [29] 龙久铃, 朱秋劲, 白晶, 等. 米曲霉固态发酵苏麻饼粕产抗氧化肽工艺优化 [J]. *轻工学报*, 2021, 36(4): 18–28.

- LONG J L, ZHU Q J, BAI J, et al. Optimization of the process of producing antioxidant peptides from *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation *Perilla* seed meal[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(4): 18–28.
- [30] JIANG Y, ZHANG M, LIN S, et al. Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins[J]. Food Research International, 2018, 105: 836–844.
- [31] 张皓哲, 高春红, 李天铎, 等. 胶原和明胶清除羟基自由基机理探究[J]. 齐鲁工业大学学报, 2022, 36(3): 32–38.
- ZHANG H Z, GAO C H, LI T D, et al. Study on the mechanism of collagen and gelatin scavenging hydroxyl radical[J]. Journal of Qilu University of Technology, 2022, 36(3): 32–38.
- [32] DAMILARE B I, CHIAMAKA D U, ROFIAT A, et al. Direct Keap1–kelch inhibitors as potential drug candidates for oxidative stress-orchestrated diseases: a review on *in silico* perspective[J]. Pharmacological Research, 2021, 167: 105577.
- [33] LO S, LI X, HENZL M T, et al. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling[J]. The EMBO Journal, 2006, 25(15): 3605–3617.

## Isolation, Purification, Structure Identification and Molecular Docking Analysis of Antioxidant Peptide from *Prinsepia utilis* Royle

YU Mengyi, LIU Shilin, HUANG Zhiyuan, DONG Wenming, FAN Jiangping, WANG Xuefeng\*  
(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** Ultrafiltration and strong anion exchange chromatography were used to isolate and purify the protease hydrolysates of *Prinsepia utilis* Royle. The free radical scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was used as the evaluation index to screen the peptide components with better antioxidant activity. The peptide sequence was identified by LC–MS/MS, and its physicochemical properties were analyzed by bioinformatics methods, and the secondary structure characteristics and docking sites with Keap1 protein were further analyzed by infrared spectroscopy and molecular docking technology. The results showed that the F–1 fractions had better antioxidant activity among the four component, and its DPPH free radical scavenging rate reached 27.67%. The peptide components with higher activity and molecular weight less than 1 kDa were selected, and the  $IC_{50}$  values of DPPH free radical scavenging of the three peptides (TALDVPPPR, TLSDAGVGGL, and DLINGGKDA) were 0.43, 0.83, and 0.51 mg/mL, respectively, the antioxidant activity of TALDVPPPR was relatively high. Secondary structure analysis showed that the three antioxidant peptides were composed of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -fold and  $\beta$ -turn, and the content of  $\alpha$ -helix in TALDVPPPR was relatively low, making it easier to bind to free radicals. Molecular docking results showed that TALDVPPPR, TLSDAGVGGL and DLINGGKDA bound to Keap1 protein by hydrogen bond and hydrophobic interaction, and released Nrf2 into the nucleus to activate the expression of a series of proteins with antioxidant and cell protective effects, that is, activate the Keap1–Nrf2/ARE pathway to play an antioxidant role. Therefore, TALDVPPPR, TLSDAGVGGL and DLINGGKDA could be used as new antioxidants. The purpose of this study was to provide theoretical reference for the development and utilization of functional peptides from *Prinsepia utilis* Royle.

**Keywords:** *Prinsepia utilis* Royle; antioxidant peptide; secondary structure; Keap1–Nrf2/ARE; molecular docking