DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2026.17.003

葵花籽蛋白抗氧化肽的制备、筛选与鉴定

张艺嘉[1],王歆媛[2],张文瑞[1],翟艺飞[1],孙亚楠[1],李依璇[1*]
(1. 中国农业大学 营养与健康系,北京 100193;2. 天津科技大学 食品科学与工程学院,天津 300457)

摘　要:为探究制备葵花籽蛋白抗氧化肽的最佳蛋白酶组合,并鉴定酶解物中的抗氧化肽段序列,利用不同双蛋白酶或三蛋白酶组合对葵花籽蛋白进行酶解,并通过测定不同酶解物的 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力以及对萎缩 C2C12 肌管中超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量和谷胱甘肽含量的影响,进一步筛选最佳蛋白酶组合及酶解物中抗氧化能力最强的肽段分子量范围,通过肽段鉴定和抗氧化能力预测评分筛选出抗氧化肽段。结果表明,不同复合蛋白酶的酶解多肽中,胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的复合酶解多肽抗氧化作用最强,其中分子量范围小于 1 kDa 的肽段抗氧化能力显著高于其他分子量肽段,并筛选出序列为 LLPYYPN、LLPYYPNT、FSPHWTVN、GVAPGPVWTP 和 AIQSPHWT 的抗氧化肽段。

关键词:葵花籽蛋白;氧化应激;蛋白酶;抗氧化能力;抗氧化肽

Preparation, Screening and Identification of Antioxidant Peptides from Sunflower Seed Protein

ZHANG Yijia[1], WANG Xinyuan[2], ZHANG Wenrui[1], ZHAI Yifei[1], SUN Yanan[1], LI Yixuan[1*]
(1. Department of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To investigate the optimal protease combination for the preparation of antioxidant peptides from sunflower seed protein and to identify antioxidant peptide sequences in the hydrolysates, sunflower seed protein was hydrolyzed using different combinations of dual or triple proteases. The antioxidant activities of the resulting hydrolysates were evaluated by measuring their DPPH free radical scavenging activity and total antioxidant capacity. In addition, their effects on superoxide dismutase activity, malondialdehyde content, and glutathione content in atrophic C2C12 myotubes were assessed to further screen the optimal protease combination and determine the peptide molecular weight fractions with the strongest antioxidant capacity. Antioxidant peptides were subsequently identified by peptide sequencing and antioxidant activity prediction scoring. The results showed that among the hydrolysates generated by different protease combinations, peptides produced by the combined hydrolysis with trypsin, papain, and alkaline protease exhibited the strongest antioxidant activity. Furthermore, peptides with a molecular weight below 1 kDa demonstrated significantly higher antioxidant capacity than those in other molecular weight fractions. Ultimately, five antioxidant peptides were identified, with the sequences LLPYYPN, LLPYYPNT, FSPHWTVN, GVAPGPVWTP, and AIQSPHWT.

Key words: sunflower seed protein; oxidative stress; protease; oxidation resistance; antioxidant active peptide

引文格式:
张艺嘉,王歆媛,张文瑞,等. 葵花籽蛋白抗氧化肽的制备、筛选与鉴定[J]. 食品研究与开发,2026,47(17):16-22.
ZHANG Yijia, WANG Xinyuan, ZHANG Wenrui, et al. Preparation, Screening and Identification of Antioxidant Peptides from Sunflower Seed Protein[J]. Food Research and Development,2026,47(17):16-22.

蛋白质是人体必需的营养素,长期以来,动物蛋白在膳食蛋白供给中占据主导地位,但其生产过程通常伴随较高的温室气体排放和土地与水资源消耗[1]。与动物蛋白相比,植物蛋白在资源利用效率和环境友好

基金项目:中原食品实验室河南省重大创新项目(241110110100);河北省现代农业产业技术体系创新团队建设项目
作者简介:张艺嘉(2001—),女(汉),博士研究生,研究方向:食品功能与营养。
*通信作者:李依璇(1990—),女(汉),副教授,博士,研究方向:功能食品的开发与功能评价。

性方面均表现出明显优势。研究表明，在提供等量蛋白的条件下，植物蛋白的碳足迹和生态负荷显著低于动物蛋白[2]。同时，流行病学研究发现，以植物蛋白部分替代动物蛋白可降低心血管疾病风险及全因死亡率[3-4]。此外，植物蛋白往往伴随较低的饱和脂肪酸水平[5-6]，使其在健康膳食和功能食品开发中具有广阔前景。

葵花籽是我国重要的油料作物之一，在内蒙古、新疆等地区具有较大种植规模[7]。在油脂加工过程中，会产生大量葵花籽粕或饼粕副产物，其中蛋白含量通常为 29%~43%，是极具潜力的植物蛋白资源[8]。通过脱壳、脱酚及蛋白提取等工艺，可获得纯度较高的葵花籽蛋白分离物[9]。葵花籽蛋白主要由球蛋白和白蛋白组成[10]，已有研究对葵花籽蛋白的氨基酸构成进行了系统分析，结果表明，其富含谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸等氨基酸，同时含有较高比例的亮氨酸、缬氨酸以及苯丙氨酸、酪氨酸等疏水性氨基酸和芳香族氨基酸[11-12]。其中疏水性氨基酸和芳香族氨基酸已被证明在自由基清除和氧化反应调控中发挥重要作用，为葵花籽蛋白的抗氧化潜力提供了理论基础[13]。

近年来，对于葵花籽蛋白及其水解物生理活性的研究逐渐增多。多项体外及细胞模型研究表明，葵花籽蛋白分离物或其酶解产物能够显著提高体系或细胞的抗氧化能力，降低活性氧水平[14-15]，也有研究发现，葵花籽蛋白水解物在一定条件下可有效抑制脂质氧化过程，表现出良好的抗氧化活性[16]。总体而言，葵花籽蛋白兼具较高蛋白含量、合理的氨基酸组成以及明确的抗氧化活性等特性，是实现油料加工副产物高值化利用的重要植物蛋白资源。然而，其抗氧化活性与蛋白或肽段的结构特征及加工方式之间的关系仍有待进一步系统研究。因此，本文为探究制备葵花籽蛋白抗氧化肽的最佳蛋白酶组合，并鉴定酶解物中的抗氧化肽段序列，以葵花籽蛋白为原料，通过酶解制备、抗氧化活性评价及肽段序列鉴定等方法系统筛选与鉴定具有高抗氧化潜力的活性肽段，以期为葵花籽蛋白抗氧化肽的制备与筛选提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葵花籽蛋白：渭南东江天成实业有限公司；木瓜蛋白酶（800 000 U/g）、碱性蛋白酶（200 000 U/g）、中性蛋白酶（200 000 U/g）、胰蛋白酶（250 000 U/g）、胃蛋白酶（400 000 U/g）、丝氨酸（纯度≥99.00%）、L-抗坏血酸（纯度≥99.0%）、邻苯二甲醛（纯度≥98.0%）、1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（1，1-diphenyl-2-picrylhydrazyl，DPPH，纯度 97.00%）、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸四肽（纯度≥98%）、还原型谷胱甘肽（γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine，GSH）含量检测试剂盒、十二烷基磺酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS，纯度 95.00%）、二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT，纯度≥99.5%）：北京索莱宝科技有限公司；Dulbecco 改良伊格尔（DMEM）培养基、胎牛血清、马血清：赛默飞世尔科技有限公司；*D*-半乳糖（纯度≥99%）、谷胱甘肽（纯度≥98.0%）：西格玛-奥德里奇公司；总抗氧化能力检测试剂盒{2，2′-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2，2′-azino-bis（3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid），ABTS]法}、总超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性检测试剂盒、脂质氧化[丙二醛（malondialdehyde，MDA）法]检测试剂盒：上海碧云天生物技术股份有限公司；胃消化液、肠消化液：上海源叶生物科技有限公司；C2C12 细胞：国家生物医学实验细胞资源库。以上化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

ALC-210 万分之一电子天平：德国 Acculab 公司；Synergy HTX 多功能微孔检测仪：美国 Biotek 公司；G560E 漩涡振荡器：美国 SCIENTIFIC 公司；H2O3-H 金属浴锅：北京卡尤迪生物科技股份有限公司；5424R 台式低温高速离心机：德国 Eppendorf 公司；SHA-C 摇床：常州市国旺仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 葵花籽蛋白水解多肽的制备

双酶解多肽制备：取 0.4 g 葵花籽蛋白加入 20 mL 的纯水溶解，调节 pH 值，按表 1 首先加入第一种蛋白酶酶解 60 min，立即置于沸水浴中 10 min 以终止酶活；调节酶解温度和 pH 值，加入第二种蛋白酶，继续酶解 60 min，立即置于沸水浴中 10 min 以终止酶活，4 000 r/min 离心 20 min，收集上清液，冷冻干燥后备用。双酶解多肽包括中木双酶解多肽（第一种酶为中性蛋白酶，第二种酶为木瓜蛋白酶）、木碱双酶解多肽（第一种酶为木瓜蛋白酶，第二种酶为碱性蛋白酶）、中碱双酶解多肽（第一种酶为中性蛋白酶，第二种酶为碱性蛋白酶）、胰碱双酶解多肽（第一种酶为胰蛋白酶，第二种酶为碱性蛋白酶）、胰中双酶解多肽（第一种酶为胰蛋白酶，第二种酶为中性蛋白酶）和胰木双酶解多肽（第一种酶为胰蛋白酶，第二种酶为木瓜蛋白酶）。

三酶解多肽制备：取 0.4 g 葵花籽蛋白加 20 mL 的纯水溶解，按表 1 首先加入第一种蛋白酶酶解 60 min，立即置于沸水浴中 10 min 以终止酶活；调节酶解温度和 pH 值，加入第二种蛋白酶，继续酶解 60 min，立即置于沸水浴中 10 min 以终止酶活；再次调节酶解温度和 pH 值，加入第三种蛋白酶，继续酶解 60 min，立即置于沸水浴中 10 min 以终止酶活，4 000 r/min 离心 20 min，收集上清液，冷冻干燥后备用。三酶解多肽包括胰木碱三酶解多肽（第一种酶为胰蛋白酶，第二种酶为木瓜蛋白酶，第三种酶为碱性蛋白酶）、中木碱三酶解多肽

(第一种酶为中性蛋白酶,第二种酶为木瓜蛋白酶,第三种酶为碱性蛋白酶)、胰中碱三酶解多肽(第一种酶为胰蛋白酶,第二种酶为中性蛋白酶,第三种酶为碱性蛋白酶)和胰木中三酶解多肽(第一种酶为胰蛋白酶,第二种酶为木瓜蛋白酶,第三种酶为中性蛋白酶),各蛋白酶的添加量、酶解温度及酶解 pH 值见表 1。

表 1 葵花籽蛋白酶解过程中蛋白酶的种类、添加量、pH 值和温度

Table 1 Types, dosage, pH value, and temperature of proteases during proteolysis of sunflower seed protein

蛋白酶	酶添加量/(U/g)	酶解温度/℃	酶解 pH 值
碱性蛋白酶	5 000	55	9
木瓜蛋白酶	5 000	55	6
中性蛋白酶	5 000	55	7
胰蛋白酶	5 000	37	8

1.3.2 葵花籽蛋白水解度测定

采用邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde,OPA)法对水解度进行测定[17],OPA 试剂配制方法:将 250 mg SDS、83.5 mg DTT 和 2 mL 含 4% OPA 的乙醇溶液完全溶解于 0.25 mol/L 四硼酸钠溶液中,最终定容至 100 mL。取 200 μL 水解上清液与 1.5 mL OPA 试剂混匀并反应 2 min,之后立即在 340 nm 波长下测定其吸光值。以 0.951 6 毫克当量(milliequivalent,meqv)/L 丝氨酸标准溶液的吸光值为参考,去离子水的吸光值为空白对照。水解度的计算公式如下。

$$S = (O_1 - O_0)/(O - O_0) \times 0.951\,6 \times V \times N/(X \times P)$$

$$h = (S - \beta)/\alpha$$

$$D = h/h_{tot} \times 100$$

式中:S 表示每克蛋白质中丝氨酸的含量,meqv/g;O_1 为样品的吸光值;O 为 0.951 6 meqv/L 丝氨酸标准溶液的吸光值;O_0 为离子水的吸光值;V 为水解总体系体积,L;N 为测定水解度时样品稀释倍数;X 为样品质量,g;P 为样品的蛋白质含量,%;h 为每克葵花籽蛋白酶解物所含肽键数量,meqv/g;α 为校正系数,1 meqv/g;β 为未水解蛋白中的氨基的贡献系数,0.4 meqv/g;D 为葵花籽蛋白酶解物的水解度,%;h_{tot} 为每克葵花籽蛋白样品所含肽键数量,7.8 meqv/g。

1.3.3 葵花籽蛋白酶解物肽含量测定

参考胡晓倩等[18]的方法对肽含量进行测定。用纯水配制 1.8 mg/mL 的甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸四肽标准溶液,并分别稀释为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mg/mL 的梯度溶液。取标准溶液或酶解物溶液 2 mL,加入 200 μL 10% 三氯乙酸溶液,室温反应 10 min 后低温离心 10 min(10 000 r/min,4 ℃),取上清液 1.5 mL,加入 1 mL 现配双缩脲试剂室温反应 20 min,于波长 540 nm 处测定吸光值。以四肽标准溶液浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。对于水解物,将吸光值代入标准曲线回归方程计算肽浓度(mg/mL),再乘以料液比得到肽含量(mg/g 蛋白)。

1.3.4 多肽自由基清除率测定

在避光条件下进行 DPPH 自由基清除试验,使用 95% 乙醇溶液配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 工作液(现配现用)。取 1 mL 待测样品溶液与 1 mL 的 DPPH 工作液混合,充分混匀后于室温避光条件下反应 30 min,在 517 nm 处测定混合液的吸光值(A_0)、样品与等体积 95% 乙醇混合液的吸光值(A_1)、95% 乙醇溶液与等体积 DPPH 工作液混合液的吸光值(A_2),DPPH 自由基清除率(D,%)按照如下公式进行计算。

$$D = [1 - (A_0 - A_1)/A_2] \times 100$$

1.3.5 多肽总抗氧化能力测定

根据总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)说明书的步骤测定多肽总抗氧化能力。以水溶性维生素 E 衍生物(Trolox)作为标准抗氧化剂,通过绘制 Trolox 标准曲线定量分析多肽总抗氧化能力,单位为 mmol Trolox/g 蛋白。

1.3.6 体外模拟胃肠道消化试验

采用 Brodkorb 等[19]的方法进行体外模拟胃肠道消化试验。

模拟胃消化阶段:提前预热胃消化液(37 ℃),配制胃蛋白酶溶液(25 000 U/mL)并置于冰上。将 15 mL 酶解物溶液与 12 mL 胃消化液混合,加入 7.5 μL 的 0.3 mol/L 的 $CaCl_2(H_2O)_2$ 溶液和 2.4 mL 胃蛋白酶溶液,之后立即用 6 mol/L 的 HCl 溶液将 pH 值调整到 3.0,用超纯水定容到 30 mL。立即置于 37 ℃水浴摇床振荡反应 2 h,之后立即沸水浴加热 10 min 灭酶。

模拟肠消化阶段:提前预热肠消化液(37 ℃),取 24 mL 肠消化液与胃消化体系混合,加入 60 μL 0.3 mol/L 的 $CaCl_2(H_2O)_2$ 溶液,加入 3 mL 胰酶溶液(2 000 U/mL),立即用 6 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0,加超纯水定容到 60 mL。立即置于 37 ℃水浴摇床中恒温振荡反应 2 h,之后沸水浴加热 10 min 灭酶,冷却至室温,冷冻干燥后备用。

1.3.7 萎缩肌管模型建立与酶解物干预方法

在 12 孔板中培养 C2C12 细胞并诱导分化为肌管,接着利用 20 g/L 的 D-半乳糖诱导 C2C12 肌管萎缩[20]。首先将 D-半乳糖与体外消化后的不同目标肽段分别完全溶解于 DMEM 完全培养基中,使 D-半乳糖终浓度为 20 g/L,不同酶解物的多肽含量为 200 μg/mL,以谷胱甘肽作为阳性对照(浓度 200 μg/mL),将配制好的干预体系加入分化后的 C2C12 肌管中共培养 48 h。

1.3.8 SOD 活性、MDA 和 GSH 含量测定方法

利用总 SOD 活性检测试剂盒、脂质氧化(MDA 法)检测试剂盒和还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒对细胞裂解物中的 SOD 活性、MDA 含量和 GSH 含量进行测定。

1.3.9 不同分子量区间肽段的分离

参考李奕等[21]的方法,利用卷式超滤膜对不同分

子量区间的肽段进行分离，采用截留分子质量分别为 1 kDa 和 3 kDa 的卷式超滤膜，按分子质量<1 kDa、1~3 kDa 和>3 kDa 3 个范围进行分离，冷冻干燥后备用。

1.3.10 肽段序列鉴定

委托上海中科新生命生物科技有限公司对葵花籽蛋白的酶解物进行肽段序列鉴定。

1.3.11 肽段抗氧化活性预测

使用抗氧化数据库（https://services.healthtech.dtu.dk/services/AnOxPePred）评估所鉴定肽段的抗氧化活性，预测得分范围为 0（无抗氧化活性）~1（强抗氧化活性），分数越接近 1 表示肽段抗氧化活性越强[22]。

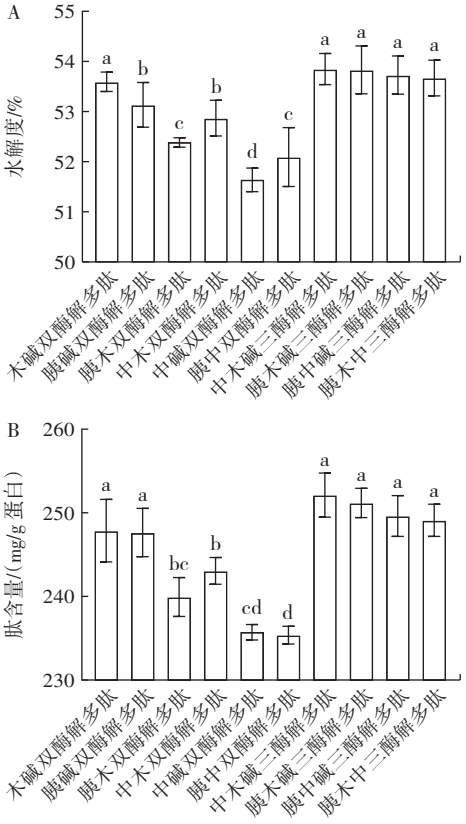
1.4 统计分析

利用 IBM SPSS Statistics 2.5 进行方差齐性检验和单因素方差分析（$P<0.05$），采用 GraphPad Prism 10 进行结果作图。

2 结果与分析

2.1 不同葵花籽蛋白酶解多肽水解度和肽含量结果分析

不同葵花籽蛋白酶解多肽水解度和肽含量结果见图 1。



A. 水解度；B. 肽含量。不同小写字母表示存在显著性差异，$P<0.05$。

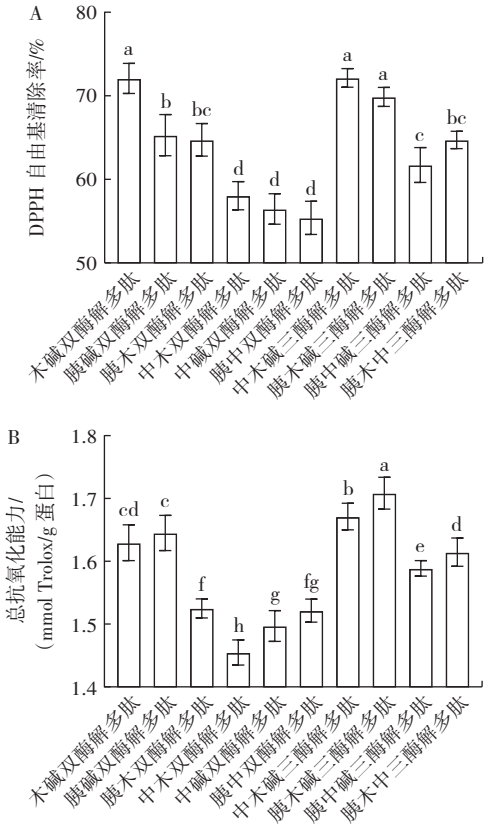
图 1 不同葵花籽蛋白酶解多肽水解度和肽含量

Fig.1 The degree of hydrolysis and peptide content of different sunflower seed protein-hydrolyzed polypeptides

由图 1 可知，经不同蛋白酶复合水解，葵花籽蛋白的水解度和肽含量不同，与双酶复合水解相比，三酶复合水解后葵花籽蛋白的水解率和肽含量有升高趋势，这主要归因于多种蛋白酶复合作用增加了酶切位点，从而提高了整体水解度和肽段的生成[23]。4 种三酶解多肽的水解度和肽含量之间无显著性差异（$P>0.05$），其中中木碱三酶解多肽的水解度和肽含量最高，分别为 53.85% 和 252.13 mg/g 蛋白，双解多肽中，木碱双酶解多肽的水解度和肽含量最高，分别为 53.60% 和 247.87 mg/g 蛋白，并且与三酶解多肽的水解度和肽含量均无显著性差异（$P>0.05$），中碱双酶解多肽的水解度和肽含量较低。

2.2 葵花籽蛋白酶解多肽自由基清除能力和总抗氧化能力结果分析

进一步利用自由基清除率试验和总抗氧化能力测定试验对比不同酶解物的抗氧化活性，结果见图 2。



A. DPPH 自由基清除率；B. 总抗氧化能力。不同小写字母表示存在显著性差异，$P<0.05$。

图 2 葵花籽蛋白酶解多肽自由基清除能力和总抗氧化能力

Fig.2 The free radical scavenging capacity and total antioxidant capacity of sunflower seed protein-hydrolyzed polypeptides

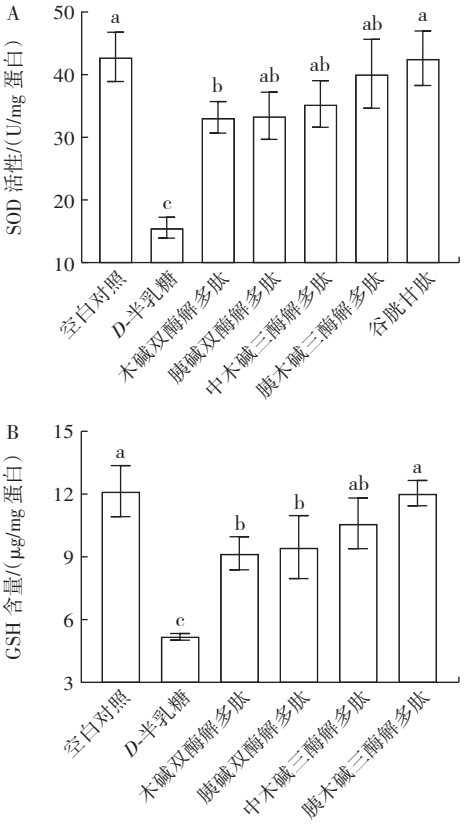
由图 2 可知，三酶解多肽中，中木碱三酶解多肽的 DPPH 自由基清除率最大，为 72.16%；胰木碱三酶解多肽的总抗氧化能力最高，为 1.71 mmol Trolox/g 蛋白，且显著高于其他双酶解多肽或三酶解多肽的总抗氧化

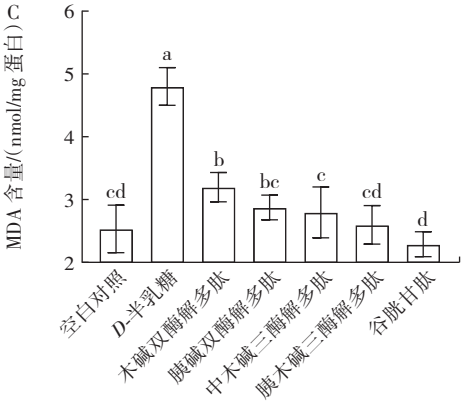
能力（$P<0.05$）。双酶解多肽中，木碱双酶解多肽的 DPPH 自由基清除率最高，为 72.10%，显著高于其他双酶解多肽的 DPPH 自由基清除率（$P<0.05$），并且其 DPPH 自由基清除率与中木碱三酶解多肽和胰木碱三酶解多肽的 DPPH 自由基清除率无显著性差异（$P>0.05$）。胰碱双酶解多肽的总抗氧化能力最高，为 1.65 mmol Trolox/g 蛋白，显著高于除木碱双酶解多肽的其他双酶解多肽的总抗氧化能力（$P<0.05$），因此选取抗氧化能力最高的 4 种酶解物，即木碱双酶解多肽、胰碱双酶解多肽、中木碱三酶解多肽和胰木碱三酶解多肽进行后续试验。经观察发现这几种多肽样品均涉及碱性蛋白酶参与水解，碱性蛋白酶是一种广谱内切蛋白酶，对疏水性肽键和中性肽键具有较高的切割能力[24]，已有研究多次报道碱性蛋白酶水解产物在自由基清除和脂质过氧化抑制方面具有良好表现，这与本研究结果一致[25]。

2.3 葵花籽蛋白酶解多肽对萎缩肌管氧化应激的保护作用分析

为筛选抗氧化能力最强的复合蛋白酶组合，以谷胱甘肽作为阳性对照，利用 4 种酶解多肽干预萎缩 C2C12 肌管，并对不同处理组肌管的 SOD 活性、GSH 含量和 MDA 含量进行测定，结果见图 3。

由图 3 可知，*D*-半乳糖的 SOD 活性和 GSH 含量均显著低于空白对照（$P<0.05$），MDA 含量显著高于空白对照（$P<0.05$）。与 *D*-半乳糖相比，不同酶解物处理





A.SOD 活性；B.GSH 含量；C.MDA 含量。不同小写字母表示存在显著性差异，$P<0.05$。

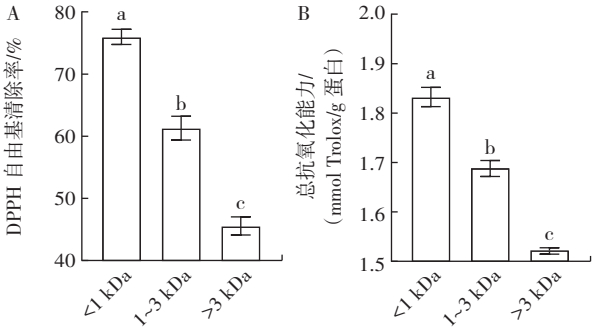
图 3 葵花籽蛋白酶解多肽对萎缩肌管氧化应激的保护作用

Fig.3 The protective effect of sunflower seed protein-hydrolyzed polypeptides on oxidative stress in atrophic myotubes

的 SOD 活性和 GSH 含量均显著升高（$P<0.05$），MDA 含量均显著降低（$P<0.05$），其中胰木碱三酶解多肽的 SOD 活性和 GSH 含量最高，分别为 40.15 U/mg 蛋白和 12.05 μg/mg 蛋白，MDA 含量最低，为 2.60 nmol/mg 蛋白，且与谷胱甘肽处理组的 SOD 活性和 MDA 含量无显著性差异（$P>0.05$）。因此选取胰木碱三酶解多肽进行后续试验。

2.4 不同分子量区间多肽自由基清除能力和总抗氧化能力结果分析

为进一步确定酶解物中发挥抗氧化作用的主要分子量范围，对酶解物中不同分子量区间的多肽进行分离，结果见图 4。



A. DPPH 自由基清除率；B. 总抗氧化能力。不同小写字母表示存在显著性差异，$P<0.05$。

图 4 不同分子量区间多肽自由基清除能力和总抗氧化能力

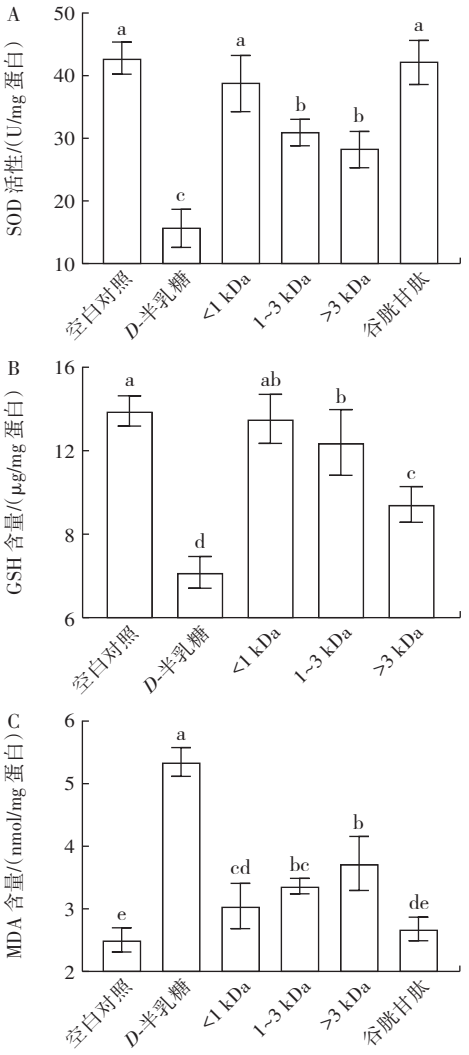
Fig.4 The free radical scavenging capacity and total antioxidant capacity of polypeptides within different molecular weight ranges

由图 4 可知，分子量<1 kDa 的肽段 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力最强，分别为 75.99% 和 1.83 mmol Trolox/g 蛋白，且显著高于其他分子量区间的多肽（$P<0.05$）。分子量>3 kDa 的肽段 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力最弱，且显著低于其他分子量

区间的多肽(P<0.05)。即随着分子量区间的升高,多肽的 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力呈下降趋势。研究表明,低分子量肽(通常<3 kDa)更易表现出较强的抗氧化能力,可能是由于其更高的扩散效率及与自由基和金属离子更充分地接触[26],这与本研究结果一致。

2.5 不同分子量区间多肽对萎缩肌管氧化应激的保护作用分析

利用不同分子量区间的多肽干预萎缩 C2C12 肌管并对比抗氧化能力,结果见图 5。



A. SOD 活性;B. GSH 含量;C. MDA 含量。不同小写字母表示存在显著性差异,P<0.05。

图 5 不同分子量区间多肽对萎缩肌管氧化应激的保护作用

Fig.5 The protective effects of polypeptides within different molecular weight ranges against oxidative stress in atrophic myotubes

由图 5 可知,与空白对照相比,D-半乳糖处理组的 SOD 活性和 GSH 含量显著降低 62.98% 和 55.57%(P<0.05),MDA 含量显著升高 113.15%(P<0.05)。与 D-半乳糖处理组相比,不同分子量区间的多肽干预后,萎缩 C2C12 肌管的 SOD 活性和 GSH 含量均显著升高(P<0.05),MDA 含量显著降低(P<0.05)。不同分子量区间多肽处理组中,分子量<1 kDa 的多肽处理组 SOD 活性和 GSH 含量最高,分别为 38.98 U/mg 蛋白和 13.53 μg/mg 蛋白,其中 SOD 活性显著高于其他分子量区间多肽(P<0.05),且与谷胱甘肽处理组无显著性差异(P>0.05),GSH 含量显著高于分子量>3 kDa 的多肽(P<0.05);分子量<1 kDa 的多肽处理组的 MDA 含量最低,为 3.05 nmol/mg 蛋白,显著低于分子量>3 kDa 的多肽(P<0.05),且谷胱甘肽处理组无显著性差异(P>0.05)。

2.6 抗氧化肽段序列鉴定分析

对酶解物中分子量小于 1 kDa 的多肽进行肽段鉴定并进行抗氧化活性预测,抗氧化活性评分范围为 0~1,数值越大表明抗氧化能力越强。同时根据肽段在混合物中的相对丰度,最终筛选出 5 条抗氧化肽段,结果见表 2。

表 2 抗氧化肽段序列鉴定分析

Table 2 Identification and analysis of antioxidant active peptide sequences

序列	肽段长度	-lg$P$	分子量/Da	相对丰度	抗氧化活性评分
LLPYYPN	7	39.20	878.45	788 000	0.63
LLPYYPNT	8	39.08	979.50	133 000	0.62
FSPHWTVN	8	51.89	986.46	1 050 000	0.52
GVAPGPVWTP	10	46.94	979.51	1 640 000	0.50
AIQSPHWT	8	49.40	938.46	18 200 000	0.50

由表 2 可知,序列为 LLPYYPN、LLPYYPNT、FSPHWTVN、GVAPGPVWTP 和 AIQSPHWT,抗氧化活性评分分别为 0.63、0.62、0.52、0.50 和 0.50。抗氧化肽的氨基酸组成被普遍认为是决定其生物活性高低的重要因素。肽段中芳香族氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)、疏水性氨基酸(如亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸)以及具有金属螯合能力的残基(如组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸)均与抗氧化活性密切相关[27]。本研究筛选得到的 LLPYYPN、LLPYYPNT、FSPHWTVN、GVAPGPVWTP 和 AIQSPHWT 在氨基酸组成上均呈现出典型的抗氧化肽特征:首先,这些肽段普遍富含芳香族残基,尤其是酪氨酸和色氨酸。芳香族侧链能够通过供氢或电子转移稳定自由基中间体,并被认为是抗氧化肽发挥自由基清除作用的核心结构基础[28],其中 LLPYYPN 和 LLPYYPNT 含有连续的酪氨酸残基,有利于形成多位点协同供氢体系,从而增强其抗氧化能力;FSPHWTVN 和 AIQSPHWT 中同时含有组氨酸和色氨酸残基,有研究表明,组氨酸不仅可作为质子供体参与自由基清除,还可通过咪唑环与金属离子形成配位键,抑制金属催化的氧化反应[29],而色氨酸则因其吲哚环结构具有较强的电子供体能力,在多种抗氧化模型体系中表现出较高活性[28]。此外,GVAPGPVWTP 的脯氨酸和谷氨酸含量较

高，这类残基可赋予肽链更大的构象灵活性，有助于肽段在氧化环境中调整构象并与自由基有效结合[30]。

3 结论

综上所述，本研究发现，胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶复合水解所得的葵花籽蛋白水解物具有显著的抗氧化活性，其中分子量小于 1 kDa 的肽段表现出更强的抗氧化能力，并筛选出序列为 LLPYYPN、LLPYYPNT、FSPHWTVN、GVAPGPVWTP 和 AIQSPHWT 的抗氧化肽段，为后续葵花籽蛋白的高值化利用及抗氧化肽制备奠定了理论基础。

参考文献：

[1] POORE J, NEMECEK T. Reducing food′s environmental impacts through producers and consumers[J]. Science, 2018, 360(6392): 987-992.

[2] WILLETT W, ROCKSTRÖM J, LOKEN B, et al. Food in the Anthropocene: The EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems[J]. Lancet, 2019, 393(10170): 447-492.

[3] SONG M Y, FUNG T T, HU F B, et al. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality[J]. JAMA Internal Medicine, 2016, 176(10): 1453-1463.

[4] NAGHSHI S, SADEGHI O, WILLETT W C, et al. Dietary intake of total, animal, and plant proteins and risk of all cause, cardiovascular, and cancer mortality: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies[J]. BMJ, 2020, 370: m2412.

[5] LOVEDAY S M. Food proteins: Technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2019, 10: 311-339.

[6] HEMLER E C, HU F B. Plant-based diets for cardiovascular disease prevention: All plant foods are not created equal[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2019, 21(5): 18.

[7] 郭树春, 李素萍, 孙瑞芬, 等 . 世界及我国向日葵产业发展总体情况分析[J]. 中国种业, 2021(7): 10-13.
GUO Shuchun, LI Suping, SUN Ruifen, et al. Analysis of the overall situation of sunflower industry development in the world and China[J]. China Seed Industry, 2021(7): 10-13.

[8] 秦那日苏 . 葵花籽蛋白脱色工艺及其结构、功能特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
QIN Narisu. Study on the decolorization technology of sunflower seed protein and its structural and functional properties[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.

[9] PICKARDT C, HAGER T, EISNER P, et al. Isoelectric protein precipitation from mild-acidic extracts of de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 31-44.

[10] KAUR R, GHOSHAL G. Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2022, 306: 102725.

[11] PETRARU A, URSACHI F, AMARIEI S. Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient[J]. Plants, 2021, 10(11): 2487.

[12] 史方丹, 周际松, 吴萍, 等 . 葵花籽蛋白的组成、提取、功能特性及其应用的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2025, 40(7): 223-234.
SHI Fangdan, ZHOU Jisong, WU Ping, et al. Research progress in composition, extraction, functionalities and applications of sunflower protein[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2025, 40(7): 223-234.

[13] ZHU Z Q, XU Z W, LI Y H, et al. Antioxidant function and application of plant-derived peptides[J]. Antioxidants, 2024, 13(10): 1203.

[14] HAN R X, HERNÁNDEZ ÁLVAREZ A J, MAYCOCK J, et al. Comparison of alcalase- and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates-Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties[J]. Current Research in Food Science, 2021, 4: 141-149.

[15] LOPES D S, ALMEIDA L G V C, NARDO A E, et al. Antioxidant bioactivity of sunflower protein hydrolysates in Caco-2 cells and in silico structural properties[J]. Food Chemistry, 2025, 487: 144733.

[16] OSPINA-QUIROGA J L, CORONAS-LOZANO C, GARCÍA-MORENO P J, et al. Use of olive and sunflower protein hydrolysates for the physical and oxidative stabilization of fish oil-in-water emulsions[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(9): 5541-5552.

[17] SONG R, LI G, ZHAO L, et al. Decreased amino acid transporter LAT2 is the main determinant of impaired protein utilization during aging[J]. Engineering, 2024, 42: 88-98.

[18] 胡晓倩, 桂子康, 邓军伟, 等 . 大豆发酵食品毛豆腐中活性肽的制备及功效评价[J]. 中国食品学报, 2023, 23(3): 217-228.
HU Xiaoqian, GUI Zikang, DENG Junwei, et al. Preparation and function evaluation of bioactive peptides in hairy tofu of fermented soybean curd[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(3): 217-228.

[19] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1014.

[20] CHEN Q N, FAN Z, LYU A K, et al. Effect of sarcolipin-mediated cell transdifferentiation in sarcopenia-associated skeletal muscle fibrosis[J]. Experimental Cell Research, 2020, 389(1): 111890.

[21] 李奕, 戴新佳, 符禹婷, 等 . 鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的制备、分离和表征[J]. 食品科学技术学报, 2025, 43(5): 56-64.
LI Yi, DAI Xinjia, FU Yuting, et al. Preparation, isolation and characterization of antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin[J]. Journal of Food Science and Technology, 2025, 43(5): 56-64.

[22] LEE C H, HAMDAN N, NYAKUMA B B, et al. Purification, identification and molecular docking studies of antioxidant and anti-inflammatory peptides from Edible Bird′s Nest[J]. Food Chemistry, 2024, 454: 139797.

[23] EWERT J, EISELE T, STRESSLER T. Enzymatic production and analysis of antioxidative protein hydrolysates[J]. European Food Research and Technology, 2022, 248(8): 2167-2184.

[24] VOGELSANG-O′DWYER M, SAHIN A W, BOT F, et al. Enzymatic hydrolysis of lentil protein concentrate for modification of physicochemical and techno-functional properties[J]. European Food Research and Technology, 2023, 249(3): 573-586.

[25] ZHU Y S, LAO F, PAN X, et al. Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability[J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1622.

[26] CARRASCO-CASTILLA J, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ A J, JIMÉNEZ-MARTÍNEZ C, et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1789-1795.

[27] SHI C S, LIU M M, ZHAO H F, et al. A novel insight into screening for antioxidant peptides from hazelnut protein: Based on the properties of amino acid residues[J]. Antioxidants, 2022, 11(1): 127.

[28] POL R, RAHAMAN A, DIWAKAR M, et al. Antioxidant peptide nanohybrid: A new perspective to immobilize bioactive peptides from milk industry wastewater[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2024, 31(27): 38723-38742.

[29] TONOLO F, GRINZATO A, BINDOLI A, et al. From in silico to a cellular model: Molecular docking approach to evaluate antioxidant bioactive peptides[J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 665.

[30] XU B T, DONG Q, YU C X, et al. Advances in research on the activity evaluation, mechanism and structure-activity relationships of natural antioxidant peptides[J]. Antioxidants, 2024, 13(4): 479.

责任编辑：王艳
收稿日期：2025-12-30