

预酶解对玛咖蛋白胃肠消化及免疫调节活性的影响

潘蕾蔓, 张祎, 贺萍, 张艺哲, 林政立, 杨锦熹, 张丽娜, 吴晖*, 张猛猛*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为探究不同蛋白酶预酶解对玛咖蛋白胃肠消化程度及消化产物免疫调节活性的影响, 该研究选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶以及复合蛋白酶分别对玛咖蛋白进行预酶解, 再经模拟胃肠消化得到五组消化产物。利用 TNBS 法、福林酚法等测定消化产物的得率、水解度、可溶性肽含量及游离氨基酸含量, 再以小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 为模型探究消化产物的免疫调节活性。结果表明, 经五种蛋白酶的预酶解, 玛咖蛋白消化产物的水解度、可溶性肽含量和游离氨基酸含量分别提高了 35%、5%~16%及 37%~92%, 且消化产物促进巨噬细胞分泌 TNF- α 的作用无明显降低。经菠萝蛋白酶预酶解得到的消化产物的免疫调节活性最高, 该消化产物含有 15 154 条分子量小于 3 000 u 的肽段; 在经活性评分及分子对接预测的与 TLR2 和 TLR4 受体存在相互作用最强的 10 个肽段中, NPYPFFGFSI 的免疫调节活性最高; HOMO 分析结果表明该肽的活性位点位于酪氨酸上。上述结果表明预酶解可在不影响玛咖蛋白免疫调节活性的条件下提高玛咖蛋白的可消化性。

关键词: 玛咖; 蛋白消化产物; 肽; 免疫调节; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2023)02-253-263

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0395

Effects of Pre-hydrolysis on the Gastrointestinal Digestion and Immunomodulatory Activity of Maca Proteins

PAN Leiman, ZHANG Yi, HE Ping, ZHANG Yizhe, LIN Zhengli, YANG Jinxi, ZHANG Lina, WU Hui*,
ZHANG Mengmeng*

(School of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of pre-hydrolysis using different proteases on the degree of gastrointestinal digestion of maca proteins and the immunomodulatory activity of their digestion products were explored. Dispace, alcalase, papain, bromelain, and protamex were selected to pre-hydrolyze maca proteins, and the final five digestion products after subsequent *in vitro* simulated gastrointestinal digestion were obtained. The yield, degree of hydrolysis, soluble peptide content, and free amino acid content of the digested products were determined using the TNBS method and Folin-Ciocalteu assay. Mouse macrophages RAW 264.7 were used as the model to explore the immunomodulatory activity of the digestion products. Following pre-hydrolysis with the five proteases, the degree of hydrolysis, soluble peptide content, and free amino acids content of the maca protein digestion products were augmented by respectively 35%, 5%~16% and 37%~92%, while no significant inhibitory effect of their promotion on the secretion of TNF- α by macrophages was observed. The digestion products obtained via bromelain pre-hydrolysis showed the highest immunomodulatory activity and comprised 15 154 peptides, with a molecular weight of <3 000 u. Among the top 10 peptides with the strongest interactions with TLR2 and TLR4 predicted based on activity scores and molecular docking, NPYPFFGFSI exhibited the highest immunomodulatory activity. HOMO analysis revealed that the active site of this peptide is located at tyrosine. Therefore, the digestibility of maca proteins can be improved via pre-hydrolysis without compromising their immunomodulatory activity.

引文格式:

潘蕾蔓,张祎,贺萍,等.预酶解对玛咖蛋白胃肠消化及免疫调节活性的影响[J].现代食品科技,2023,39(2):253-263

PAN Leiman, ZHANG Yi, HE Ping, et al. Effects of pre-hydrolysis on the gastrointestinal digestion and immunomodulatory activity of maca proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 253-263

收稿日期: 2022-04-06

基金项目: 中国博士后科学项目基金 (2019M662931); 广州市科学技术局基础与应用基础研究项目 (202102020773)

作者简介: 潘蕾蔓 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: leimanpan@outlook.com

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: fehwi@scut.edu.cn; 共同通讯作者: 张猛猛 (1989-), 男, 博士, 研究方向: 天然产物的结构与功能活性, E-mail: zhangmengmengscut@126.com

Key words: maca; digestion products of proteins; peptides; immunomodulatory activity; molecular docking

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp.) 是一种十字花科独行菜属的一年生草本植物,原产于秘鲁安第斯高原,亦被称为“秘鲁人参”^[1]。上世纪末,玛咖受到联合国粮农组织的推荐种植^[2]。玛咖于 2000 年首次被引入国内;玛咖粉在 2011 年获批为新资源食品^[3,4]。研究表明玛咖具有多种生物活性,如提高生育力与性欲、抗疲劳、提高免疫力、抗氧化、提高记忆力、抗肿瘤以及降血糖等功能^[5-7]。目前的研究认为玛咖的这些活性主要与其中的多糖、玛咖烯和玛咖酰胺等物质有关。事实上,玛咖还含有丰富的蛋白质(9.56%~21.90%),而蛋白质经胃肠消化后可产生各种活性肽,因此蛋白质可能在玛咖的功能活性中也发挥了一定作用。然而,据报道,玛咖蛋白经模拟胃肠消化的水解度^[8]明显低于一些常见的植物蛋白,如大豆蛋白、玉米蛋白等,这意味着玛咖蛋白较难被胃肠道消化,直接食用的利用率不高。目前有很多研究利用外源蛋白酶,如碱性蛋白酶、复合蛋白酶等,通过预酶解的方法处理各种难消化蛋白的酶解物,以达到充分利用蛋白质的目的,但尚未有研究探究这种方法对玛咖蛋白可消化性的影响。此外,实验室前期研究表明玛咖蛋白经胃肠消化后产生的肽具有良好的免疫调节活性^[8],而预酶解的加工处理方式对玛咖蛋白胃肠消化产物的免疫调节活性的影响尚不明确。

本研究采用单酶酶解与模拟胃肠道消化相结合的方式,研究经不同蛋白酶预酶解后的玛咖蛋白可消化性的变化,并以小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 为模型探究预酶解对玛咖蛋白胃肠消化后的免疫调节活性的影响,解析活性最强的消化产物中肽的序列,然后对其中免疫活性较强的肽进行活性验证和构效分析。本研究在为玛咖蛋白的深加工利用方式提供技术支撑的同时,也将深化人们对玛咖蛋白免疫调节活性的认识。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玛咖根茎粉末(黄玛咖),购于云南种植基地;中性蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(100 U/mg)、木

瓜蛋白酶(800 U/mg)、菠萝蛋白酶(300 U/mg)、复合蛋白酶(120 U/mg),上海源叶生物科技有限公司;胃蛋白酶(≥ 250 units/mg)、胰酶($8\times$ USP),美国 Sigma 公司;5% TNBS 水溶液,美国 Sigma 公司;福林酚,北京索莱宝科技有限公司;小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒,欣博盛生物科技有限公司;细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8),大连美仑生物科技有限公司;胎牛血清,上海吉泰依科赛生物科技有限公司;其它试剂均为市售分析纯;小鼠巨噬细胞 RAW 264.7,实验室保存。

1.2 主要仪器与设备

集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司;低速离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;冷冻干燥机,上海继谱电子科技有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;紫外可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;多微孔板检测仪,新加坡 PerkinElmer 公司;Q Exactive 质谱仪,美国 Thermo Fisher 科技有限公司;Dionex Ultimate 3000 RSLCnano 液相色谱,美国 Thermo Fisher 科技有限公司;全自动氨基酸分析仪,日本 HITACHI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 玛咖蛋白的制备

在 Wu 等^[9]的方法基础上改进,具体为:取玛咖根茎粉末为原料,以 Tris-HCl 溶液(0.05 mol/L, pH 值 9.0)为提取液,料液比 1:30 (g/mL),超声(60 °C, 250 W, 20 min),提取时间 30 min,提取温度 60 °C。离心(4 000 r/min, 5 min)、过滤(500 目滤布)取上清液,加入 1 mol/L HCl 溶液至上清液 pH 值达到 3.75,静置 30 min 后再次离心(4 000 r/min, 10 min),用 0.6 mol/L NaOH 溶液复溶沉淀,透析脱盐(5 000 u),冻干得玛咖蛋白,蛋白含量为 87.02% $\pm$ 1.58%。

1.3.2 玛咖蛋白消化产物的制备

1.3.2.1 玛咖蛋白消化产物制备流程图

玛咖蛋白经模拟胃肠消化、单酶预酶解与模拟胃肠消化结合制备消化产物的工艺如图 1 所示。



图 1 玛咖蛋白消化产物制备流程

Fig.1 Flow chart of preparation of maca protein digestion products

1.3.2.2 单酶预酶解

取 0.5 g 玛咖蛋白配成 1% (m/V) 的蛋白溶液, 加酶至总酶活为 2.0×10^4 U, 酶解 3 h。沸水浴加热 10 min, 使玛咖蛋白中蛋白酶抑制剂失活。将温度和 pH 值调至表 1 各值, 预热 10 min。在酶解过程中, 前 30 min, 每 5 min 调节一次 pH 值, 随后每 20 min 调节一次 pH 值, 使其保持恒定。反应结束后, 将酶解液置于沸水

浴中 10 min 以终止反应。

各酶的活力测定方法为: 中性蛋白酶及碱性蛋白酶酶活的测定方法参照 GB/T 23527-2009^[10]紫外分光光度法; 木瓜、菠萝及复合蛋白酶酶活的测定方法参照 T/CCCMHPIE 1.18-2016^[11]; 胃蛋白酶及胰酶酶活的测定方法参照《中华人民共和国药典》^[12]。

表 1 七种酶的最适酶解条件

Table 1 Optimal hydrolysis conditions of the seven enzymes

序号	蛋白酶种类	最适温度/℃	酶解温度/℃	最适 pH 值	酶解 pH 值	酶活/(U/mg)	酶添加量/mg
1	中性蛋白酶	10~60	45	7.5	7.5	114	438.60
2	碱性蛋白酶	40	40	10.5	10.5	258	193.80
3	木瓜蛋白酶	37~60	55	5.5~7.5	7.0	423	118.20
4	菠萝蛋白酶	50~60	55	5.0~8.0	7.0	369	135.50
5	复合蛋白酶	40~50	45	5.0~8.0	7.0	62	806.50
6	胃蛋白酶	37	37	1.5~2.0	3.0	250	143.90
7	胰酶	37	37	7.0~7.2	7.0	8	625.00

1.3.2.3 体外模拟胃肠消化

参照 Brodorb 等^[13]的方法: ①模拟胃消化阶段: 滴加 1 mol/L 的 HCl 溶液使 pH 值达到 3.0, 在温度达到 37 ℃后加入胃蛋白酶, 磁力搅拌反应 2 h; ②模拟肠消化阶段: 滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液使 pH 值达到 7.0 终止模拟胃消化, 加入胰酶, 37 ℃磁力搅拌反应 2 h。随后将溶液 pH 值调至 7.0, 煮沸 10 min 使反应完全结束, 冷却后离心 (4 000 r/min, 20 min), 取上清液透析 (截留量 100 u), 再冷冻干燥得体外模拟胃肠消化产物, 并将所得各组消化产物按表 1 次序命名为 B1、B2、B3、B4 及 B5。

1.3.3 消化产物得率的测定

体外模拟消化产物及预酶解后体外模拟消化产物的得率计算如下:

$$D = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——模拟胃肠消化产物得率, %;

m_1 ——模拟胃肠消化产物干粉质量, g;

m_0 ——所用玛咖蛋白质量, g。

$$D_1 = \frac{m_2}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D_1 ——预酶解后模拟胃肠消化产物得率, %;

m_2 ——预酶解后模拟胃肠消化产物干粉质量, g;

m ——所用玛咖蛋白质量, g。

参照 Bandyopadhyay 等^[14]的方法, 取 10 mg 玛咖蛋白, 加入 4.00 mL 的 HCl 溶液 (6 mol/L), 混匀后密封于安瓿瓶中, 在 110 ℃下水解 24 h, 得玛咖蛋白完全水解液。

1.3.4.2 水解度 (DH) 的测定

采用 J. Adler-Nissen^[15]的方法 (TNBS 法) 测定水解度, 即取含有 $0.25 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3}$ amino equiv/L 的酶解液 (用 1% SDS 溶液稀释), 加入 2.00 mL 磷酸缓冲液 (pH 值 8.2), 加入 2.00 mL 的 0.1% TNBS 溶液, 振荡摇匀, 水浴 60 min (50 ± 1 ℃), 铝箔避光; 最后加入 4.00 mL 的 0.10 mol/L 的 HCl 溶液终止反应, 并于室温下静置 30 min 后在波长 340 nm 下完成吸光值的测定。

水解度的计算公式^[16]如下:

$$DH = \frac{h_s - h_0}{h_t - h_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

DH ——水解度, %;

h_s ——玛咖蛋白的氨基酸含量, mmol/L;

h_0 ——消化产物的氨基酸含量, mmol/L;

h_t ——玛咖蛋白经过酸水解后的氨基酸含量, mmol/L, 为 1.55 mmol/L。

以 L-亮氨酸为标准品, 用 1% SDS 溶液配制浓度为 0~2.0 mmol/L^[17]的标准品溶液, 按上述方法测定, 并以在波长 340 nm 下测定的吸光值为纵坐标, 以 L-亮氨酸浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.3.5 可溶性肽得率 (YSP) 的测定

采用福林酚法测定可溶性肽含量, 按照说明书方

法进行测定:

称取 2.0 mg 预酶解消化产物配制浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液, 加入 5.0 mL 试剂甲, 混匀后静置 10 min, 再加入 0.5 mL 试剂乙, 立即摇匀, 保温 30 min, 最后于波长 500 nm 比色。整个反应过程温度应控制在 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 。

可溶性肽得率的计算公式为:

$$YSP = \frac{T_s}{T_p} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

YSP——可溶性肽得率, %;

T_s ——可溶性肽含量, $\mu\text{g/mL}$;

T_p ——底物中的蛋白含量, 为 153.55 $\mu\text{g/mL}$ 。

以牛血清白蛋白为标准品, 配制 1.0 mL 浓度为 0~250 $\mu\text{g/mL}$ 的标准液, 按上述方法测定, 并以波长 500 nm 下吸光值为纵坐标, 以牛血清白蛋白浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.3.6 游离氨基酸含量的测定

测定方法参照 GB/T 30987-2020^[18]全自动氨基酸分析仪法。色谱条件: 色谱柱为磺酸型阳离子交换柱; 按标准配制流动相 B₁~B₆, 分离流动相流量为 0.35 mL/min, 检测流动相流量为 0.30 mL/min; 进样量为 20 μL ; 检测波长为 570 nm 和 440 nm。分别吸取不同浓度的系列混合氨基酸标准工作溶液得到 21 种氨基酸的峰面积, 建立标准工作曲线, 并通过保留时间识别各氨基酸出峰顺序。将样品中各氨基酸色谱峰面积代入标准工作曲线计算含量, 以水为空白样品, 得各样品中氨基酸净含量。

1.3.7 分子量分布测定

测定方法参照 GB/T 22729-2008^[19]: 采用 Waters 1525 高效液相色谱系统测定各玛咖蛋白消化产物的分子量。称取 100 mg 样品于 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 经 0.22 μm 微孔过滤膜过滤后进样。色谱柱: TSKgel 2000 SWXL (300 mm $\times$ 7.8 mm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈/水/三氟乙酸 (45/55/0.1, V/V/V); 检测波长: UV 220 nm; 流速: 0.5 mL/min。

称取细胞色素 C (M_w 12 400 u)、杆菌酶 (M_w 1 450 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (M_w 451 u) 和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (M_w 189 u) 标准品用流动相溶解配制成 0.2 mg/mL 左右的标准分子量溶液。以标准品的 log M_w 及洗脱时间绘制标准曲线:

$$y = -0.2677x + 6.1322, R^2 = 0.9933$$

1.3.8 免疫调节活性的评价

1.3.8.1 消化产物及肽对 RAW 264.7 细胞的毒性

取对数生长期的巨噬细胞 RAW 264.7, 以每

孔 1.0×10^5 个的数量接种于 96 孔板, 用 DMEM 培养液 (含 1% 双抗, 10% 胎牛血清, V/V) 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中培养 24 h 后弃去上清液, 加入 100 μL 含不同浓度样品的新鲜培养液 (玛咖蛋白消化产物所用浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$, 玛咖肽所用浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$), 以正常培养液为阴性对照, 培养 24 h。弃去上清液, 加入 100 μL 含 10% CCK-8 试剂的培养液, 培养 1 h 后于波长 450 nm 处测定吸光值。

细胞存活率的计算公式为:

$$X = \frac{A_s}{A_c} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

X——细胞存活率, %;

A_s ——样品吸光值;

A_c ——阴性对照组吸光值。

1.3.8.2 细胞因子 TNF- α 的测定

取对数生长期的巨噬细胞 RAW 264.7, 以每孔 1.0×10^5 个的数量接种于 96 孔板, 用 DMEM 培养液 (含 1% 双抗, 10% 胎牛血清, V/V) 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中培养 24 h 后弃去上清液, 加入 100 μL 含不同浓度样品的新鲜培养液, 以正常培养液为阴性对照, 培养 24 h。收集上清液, 用小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒测定细胞因子 TNF- α 的表达量, 具体操作按说明书进行。

1.3.9 消化产物中肽序列的测定

1.3.9.1 消化产物的超滤分组

称取 25 mg 免疫调节活性最高的玛咖消化产物, 配制浓度为 0.25 mg/mL 的溶液, 并超滤 (5 000 r/min 离心, 60 min) 取分子量小于 3 ku 的部分。为尽量避免截留量为 3 ku 的超滤膜被堵塞, 在进行 3 ku 超滤分组前先将样品溶液经过截留量为 10 ku (5 000 r/min 离心, 30 min) 的超滤管分组。最后经蒸发浓缩、冷冻干燥得分子量小于 3 ku 部分消化产物。

1.3.9.2 消化产物中肽序列的测定

用样品溶解液 (含 $\varphi=0.1\%$ 甲酸、 $\varphi=2\%$ 乙腈) 溶解 1.3.9.1 所得消化产物, 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 13 200 r/min, 20 min), 取上清, 进入液相色谱分离, 分离后的肽段直接进入质谱仪进行在线检测。质谱原始文件经过 MM File Conversion 软件处理转换, 得到 MGF 格式文件, 然后用 MASCOT 检索 UniProt 数据库 (Mascot: <http://www.matrixscience.com/>)。

1.3.10 免疫调节肽的筛选

1.3.10.1 预筛选

根据免疫调节活性肽具有肽链短、一般由 2~10 个氨基酸组成的特点^[20,21], 对 1.3.9.2 所得肽段进行筛选。

1.3.10.2 生物活性评估

将 1.3.10.1 筛选所得肽段导入 Bioware 网站的 PeptideRanker 程序^[22] (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 预测肽段具有生物活性的可能性, 并选择可能性评分大于 0.5 的肽段。

1.3.11 HPEPDOCK 分子对接筛选

将 1.3.10.2 筛选得到的肽段导入 HPEPDOCK 网站^[23], 与模式识别受体 TLR2(PDB ID:1FYW)及 TLR4(PDB ID:5IJJ) 进行分子对接, 筛选分子对接亲和力最强的 10 个肽段进行合成。

1.3.12 肽段合成

采用 Fmoc 固相合成法合成 1.3.10.2 筛选得到的 10 个肽段, 该步骤委托吉尔生化(上海)有限公司完成。

1.3.13 AutoDock 分子对接分析

利用软件 ChemBio3D Ultra 14.0 及 AutoDockTools-1.5.6 对 1.3.11 筛选所得肽段经进行设计及处理。根据受体蛋白的 ID 从 PDB 数据库下载蛋白结构, 利用 PyMOL 2.3.0 AutoDockTools-1.5.6 处理受体蛋白。最后, 利用 PyMOL 2.3.0 和 LIGPLOT V 2.2.4 分析对接结果的相互作用模式。

1.3.14 HOMO 分析

使用 GaussView 5.0 以及 Gaussian 09 进行密度泛函理论计算; 使用 Gaussian 09 以 B3LYP/6-31 制图并分析活性位点。

1.3.15 数据处理

使用 SPSS 26.0 软件进行显著性差异分析, 将

$P<0.05$ 视为差异显著; 使用 Origin 2021 进行制图。

2 结果与讨论

2.1 预酶解对玛咖蛋白可消化性的影响

以 L-亮氨酸为标准品测定的水解度标准曲线为 $y=0.286\ 1x-0.000\ 3$ ($R^2=0.999\ 6$); 根据牛血清蛋白测定的可溶性肽得率标准曲线为 $y=0.000\ 6x+0.000\ 9$ ($R^2=0.999\ 7$)。

以仅经过体外模拟胃肠消化所得的消化产物 MCPH 为阴性对照, 消化产物 B1~B5 的得率、水解度 (DH) 及可溶性肽得率 (YSP) 如表 2。

表 2 六组消化产物的得率、水解度及可溶性肽得率

Table 2 Yields, DHs, YSPs of the six digestion products

消化产物	消化产物 得率/%	水解度 DH/%	可溶性肽 得率 YSP/%
MCPH	28.00±2.83	22.91±0.57	17.20±1.17
B1	40.00±5.66*	56.84±0.16*	23.23±3.47**
B2	47.00±4.24*	56.61±0.16*	28.39±1.23 ^{b*}
B3	42.00±2.83*	56.38±0.16*	27.19±1.63 ^{c*}
B4	39.00±1.41*	56.50±0.00*	26.55±2.62 ^{d*}
B5	56.00±2.83*	57.06±0.16*	33.45±0.63 ^{a*}

注: *表示样品与阴性对照 (MCPH) 之间存在显著性差异 ($P<0.05$), 同一列中不同字母上标 (a-e) 表示各数值之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

表 3 六组消化产物的游离氨基酸含量 (mg/100 g 玛咖蛋白)

Table 3 Free amino contents of the six digestion products (mg/100 g maca proteins)

氨基酸	MCPH	B1	B2	B3	B4	B5
丙氨酸	42.74±0.48 ^e	62.11±2.39 ^{cd}	73.57±0.11 ^b	64.22±1.22 ^c	59.12±1.79 ^d	85.00±0.22 ^a
精氨酸	52.46±1.24 ^e	73.76±2.62 ^{cd}	86.17±0.49 ^b	77.01±0.52 ^c	70.63±0.49 ^d	99.09±1.42 ^a
天冬酰胺	33.09±0.41 ^d	45.04±1.81 ^c	53.96±0.05 ^b	47.01±0.88 ^c	44.09±2.34 ^c	63.94±0.15 ^a
天冬氨酸	23.29±0.80 ^d	34.13±1.52 ^c	40.40±0.65 ^b	35.11±0.85 ^c	32.65±1.34 ^c	47.91±1.51 ^a
胱氨酸	7.03±0.29 ^e	10.70±0.31 ^c	12.12±0.28 ^b	10.04±0.50 ^c	9.23±0.13 ^d	13.49±0.19 ^a
γ -氨基丁酸	29.04±0.67 ^d	41.81±0.61 ^c	50.38±1.72 ^b	43.82±1.05 ^c	41.11±2.23 ^c	56.03±0.25 ^a
谷氨酰胺	41.44±0.15 ^e	57.79±0.91 ^{cd}	69.63±2.48 ^b	59.95±0.48 ^c	55.19±1.19 ^d	77.67±0.72 ^a
谷氨酸	5.22±0.07 ^e	7.22±0.06 ^c	8.83±0.02 ^b	7.41±0.22 ^c	6.83±0.09 ^d	10.10±0.26 ^a
甘氨酸	15.32±0.39 ^d	22.58±0.38 ^c	26.81±0.93 ^b	23.33±0.07 ^c	22.19±0.74 ^c	29.91±1.41 ^a
组氨酸	11.54±0.28 ^e	16.78±0.34 ^c	19.69±0.30 ^b	16.87±0.14 ^c	15.52±0.74 ^d	21.64±0.32 ^a
异亮氨酸	17.67±0.40 ^e	24.87±1.02 ^{cd}	29.50±0.60 ^b	25.49±0.91 ^c	23.70±0.25 ^d	32.80±0.35 ^a
亮氨酸	13.73±0.11 ^e	19.37±0.44 ^c	22.45±0.64 ^b	19.38±0.89 ^c	17.64±0.62 ^d	24.59±0.34 ^a
赖氨酸	7.37±0.14 ^e	10.52±0.11 ^{cd}	12.45±0.07 ^b	11.10±0.49 ^c	10.03±0.31 ^d	13.99±0.15 ^a
蛋氨酸	2.95±0.17 ^e	4.00±0.13 ^d	4.97±0.09 ^b	4.45±0.09 ^c	4.21±0.03 ^{cd}	5.79±0.19 ^a
苯丙氨酸	7.00±0.11 ^e	9.91±0.11 ^c	1.46±0.38 ^b	10.09±0.30 ^c	8.94±0.49 ^d	12.67±0.45 ^a
脯氨酸	37.13±0.68 ^e	54.31±0.48 ^{cd}	65.17±1.27 ^b	56.60±1.54 ^c	52.57±2.66 ^d	71.66±1.00 ^a

续表 3

氨基酸	MCPH	B1	B2	B3	B4	B5
丝氨酸	4.53±0.05 ^c	6.34±0.25 ^b	8.27±0.08 ^a	6.88±0.36 ^b	6.40±0.31 ^b	8.76±0.04 ^a
茶氨酸	7.75±0.39 ^d	10.92±0.14 ^c	12.97±0.27 ^b	11.60±0.55 ^c	11.07±0.17 ^c	14.97±0.34 ^a
苏氨酸	14.64±0.50 ^d	21.32±0.21 ^c	25.65±0.97 ^b	22.12±0.31 ^c	20.41±1.04 ^c	27.83±0.98 ^a
酪氨酸	14.08±0.40 ^d	19.75±0.16 ^c	23.33±1.31 ^b	20.13±0.49 ^c	18.63±0.67 ^c	25.65±0.54 ^a
缬氨酸	7.77±0.22 ^e	11.28±0.09 ^d	13.16±0.09 ^b	11.92±0.26 ^c	10.75±0.37 ^d	15.28±0.32 ^a
必需氨基酸	82.44±4.59 ^e	118.05±2.04 ^c	139.32±0.10 ^b	121.41±1.71 ^c	111.20±3.84 ^d	154.59±0.84 ^a
总和	395.56±4.59 ^f	564.51±3.25 ^d	670.49±7.50 ^b	584.53±5.93 ^c	540.89±12.97 ^e	758.76±3.38 ^a

注：同一行中不同字母上标（a~f）表示各数值之间存在显著性差异（ $P<0.05$ ）；测定对象不包括色氨酸。

水解度是用于监控及描述蛋白水解程度的重要指标。玛咖蛋白经模拟胃肠消化后所得 MCPH 的水解度为 22.91%，低于一些常见食物蛋白质消化产物的水解度，如小麦胚芽蛋白的为 40.25%^[24]，豌豆蛋白的为 53.62%^[25]，非洲核桃蛋白的为 73.47%^[26]。其原因可能是玛咖蛋白为碱溶蛋白，水溶性较差，在肠液中的分散性较低，难以与蛋白酶发生相互作用^[27]。与 MCPH 相比，B1~B5 的消化产物得率及水解度得到了显著提高（ $P<0.05$ ），其中消化产物得率的提高幅度为 10%~30%，水解度提高约 35%。蛋白质经酶解后会产生分子量不同的肽以及游离氨基酸；酶解程度越高，产生的可溶性肽和游离氨基酸的含量也越高。因此，可溶性肽和游离氨基酸的得率也可用于评价蛋白质的可消化性。MCPH 的可溶性肽得率为 17.20%，低于常见食物蛋白的数值，如小麦胚芽蛋白的为 40.25%^[24]，大豆蛋白的为 88%^[28]以及卵清蛋白的为 99%^[29]，而 B1~B5 的可溶性肽得率皆明显高于 MCPH，增长幅度为 5%~16%。由此可见，预酶解能显著提高玛咖蛋白经胃肠消化后产生的可溶性肽的含量。从表 3 可知，五组经预酶解处理所得产物的游离氨基酸总量皆明显高于 MCPH 的，增长幅度为 37%~92%；其中 B5 的增长幅度最大，游离氨基酸总量的增长率约为 92%，说明预酶解处理能提高玛咖蛋白胃肠消化产生的游离氨基酸含量。

综上，经过预酶解处理后，玛咖蛋白胃肠消化产物的水解度、可溶性肽得率及游离氨基酸含量皆得到了显著提高（ $P<0.05$ ），意味着预酶解处理能使玛咖蛋白具有更高的消化率和生物可及性^[30]，更易被人体所吸收利用。

2.2 各组消化产物的免疫调节活性

巨噬细胞是先天性免疫的重要组成部分，其发挥免疫功能的途径包括吞噬病原体、分泌细胞毒性分子（如 NO）以及分泌细胞因子（如 TNF- α 、IL-6 等）^[21]。小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 是评价天然产物免疫调节活性最常用的细胞模型，故本研究采用该模型探究 MCPH 及

B1~B5 各组消化产物的免疫调节活性，具体为各组消化产物对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的存活率和 TNF- α 分泌情况的影响。由图 2 可见，500 $\mu\text{g/mL}$ 的各组消化产物对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 无明显毒性作用。在该浓度下，六组消化产物皆能提高 TNF- α 的分泌量。相比于 MCPH，经相同质量浓度的 B1~B5 刺激的 RAW 264.7 细胞的 TNF- α 表达水平没有明显变化或略有降低，但由于 B1~B5 各组的消化产物得率比 MCPH 高 10%~30%，即经预酶解后，玛咖蛋白通过胃肠消化所产生的具有免疫活性的消化产物更多。因此，预酶解实际上增强了玛咖蛋白的免疫活性，这与 Cian 等^[31]的发现相同。

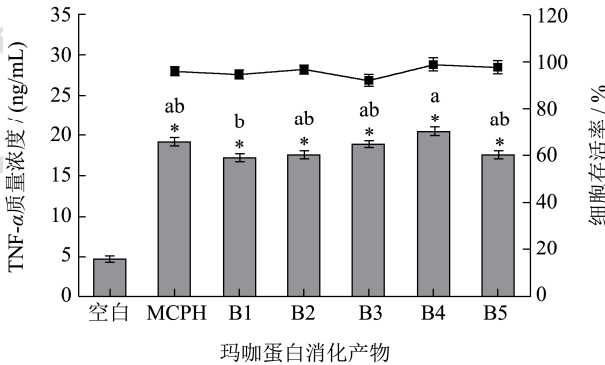


图 2 玛咖蛋白消化产物对 RAW 264.7 细胞的存活率及 TNF- α 分泌量的影响

Fig.2 Effects of maca digestion products on the viability and secretion of TNF- α of cell line RAW 264.7

注：*表示与空白对照具有显著性差异（ $P<0.05$ ），同一浓度间的不同字母上标 a、b 表示各数值之间存在显著性差异（ $P<0.05$ ）。

蛋白质消化产物中的主要活性物质为小分子肽。一般认为，生物活性肽多为含 2~10 个氨基酸残基的短肽。在对食源免疫调节肽的研究中，Ahn 等^[32]发现鲑鱼副产物中的免疫调节肽分子量集中在 1 000~2 000 u，Ndiaye 等^[33]发现黄豌豆种子免疫调节肽为小分子肽（1 000 u），而 Wu 等^[34]从小麦胚芽蛋白中获得的免疫调节肽的分子量范围为 300~1 450 u。由表 4 可知，经过预酶解处理后，玛咖蛋白模拟胃肠消化产物中分子量为 500~2 000 u 的小分子肽含量略有提高，

其中 B4 中分子量处于 500~2 000 u 范围的小分子肽占比最大, 这可能是 B4 活性更高的原因。

表 4 六组消化产物的分子量分布

Table 4 Molecular weight distributions of the six digestion products

消化产物	分子量分布/%		
	>2 000 u	500~2 000 u	<500 u
MCPH	12.62 ^d	33.11 ^f	54.27 ^a
B1	14.92 ^c	34.89 ^d	50.19 ^d
B2	11.68 ^e	34.43 ^e	53.89 ^b
B3	11.11 ^f	36.27 ^b	52.62 ^c
B4	17.46 ^a	37.15 ^a	45.39 ^e
B5	17.02 ^b	35.54 ^c	47.44 ^f

注: 同一列中不同字母上标 (a-f) 表示各数值之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

2.3 预酶解消化产物 B4 中肽段的序列及免疫调节活性

由于 B4 展现出的免疫调节活性最高, 因此后续选择预酶解消化产物 B4 进行肽段序列测定及免疫调节活性肽的筛选。多项研究表明, 免疫调节肽为分子量在 3 000 u 以下的小分子肽^[35], 故本实验选择超滤后分子量小于 3 000 u 的组分进行肽段的测序, 而该超滤组分冻干物的得率为 65.10%。经鉴定, B4 中分子量小于 3 000 u 的组分中共含有 15 154 个肽, 其中符合免疫活性肽组成氨基酸数量一般规律(2~10 个)^[20,21]的有 2 546 个肽段。将符合条件的肽段导入 Peptide Ranker 程序评分, 其中分数>0.5 (具有生物活性的可能性>50%, 一般可被认为具有生物活性) 的肽段数

量为 437, 占比为 17.17%。另外, 实验室前期从 MCPH 中经超滤小于 3 000 u 活性组分经测定含有 3 345 条肽, 数量较 B4 的少。有研究指出, 免疫活性肽激活巨噬细胞的机制包括了激活其细胞膜表面的 toll-like 受体 (TLRs)^[31], 其中 TLR2 和 TLR4 是免疫活性肽最为常见的受体。HPEPDOCK 能预测蛋白质-肽段的相互作用力, 并给出结合模型的评分, 分数的负值越大, 表明该肽段与蛋白质受体的亲和力越强^[23]。因此, 肽段最后被导入 HPEPDOCK 网站分别与模式识别受体 TLR2、TLR4 进行分子对接, 而评分在前 10 名的肽段如表 5 所示。免疫调节肽往往是富含疏水性氨基酸、芳香族氨基酸及带电荷^[20]的小分子肽。由表 5 可知, 10 个最终筛选得到的肽段分子量集中在 900~1 300 u, 皆带有电荷, 并都富含疏水性氨基酸及芳香族氨基酸, 其中, 疏水性的芳香族氨基酸 (苯丙氨酸及色氨酸) 占各肽段氨基酸个数的 12.50%~33.33%, 这可能暗示着 10 个肽段具有较强免疫调节活性。

为进一步验证这 10 个肽段的免疫活性, 本研究随后对其进行了合成, 并利用 RAW 264.7 细胞探究了其免疫调节活性。由图 3 结果可知, 在 250 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 10 条肽段皆对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 无毒性, 且皆能不同程度地促进 RAW 264.7 细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 。其中 No.1 肽 NPYPFFGFSI 展现出的免疫调节活性最强, 这与分子对接评分的结果一致, 但其他肽段活性的高低与分子对接的结果之间存在一定的差异; 很多其他研究^[36,37]也发现分子对接的结果与活性肽实际验证的结果并不完全一致。事实上, 分子对接是利用计算机进行的一种理想化实验, 化合物的活性在实际环境中还会受溶解度、溶液中离子强度和 pH 值等多种因素的影响, 因此会与实际结果有一定的出入。

表 5 十个筛选肽段的基本信息

Table 5 Basic informations of the ten selected peptides

序号	序列	TLR2 分子对接评分	TLR4 分子对接评分	分子量/u	电荷数	疏水性氨基酸个数	芳香族氨基酸个数
No.1	NPYPFFGFSI	-200.17 ^a	-303.67 ^a	1 187.572 7	2	6	4
No.2	VSMWRYGIW	-194.49 ^b	-290.72 ^c	1 212.567 5	2	5	3
No.3	LFNPIFSIF	-190.72 ^c	-281.60 ^d	1 096.592 1	3	7	3
No.4	SVPWVARF	-183.34 ^d	-272.28 ^e	960.514 7	2	5	2
No.5	AIIFIFIRR	-180.67 ^e	-263.89 ^j	1 147.743 9	2	7	2
No.6	LSVDFVFVMC*	-176.76 ^f	-300.21 ^b	1 215.552 2	2	7	2
No.7	IGFWNSNGSF	-174.75 ^g	-280.46 ^e	1 127.515 7	2	4	3
No.8	KFGDLFHLRM*	-172.43 ^h	-265.65 ⁱ	1 278.670 9	2	5	2
No.9	CGRTPFLVWG	-171.19 ^j	-272.67 ^f	1 191.570 6	2	5	2
No.10	SMHLPRPF	-166.93 ^j	-270.17 ^h	999.509 3	2	5	1

注: *表示该肽段含有酸性氨基酸; 同一列中不同字母上标 (a-j) 表示各数值之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

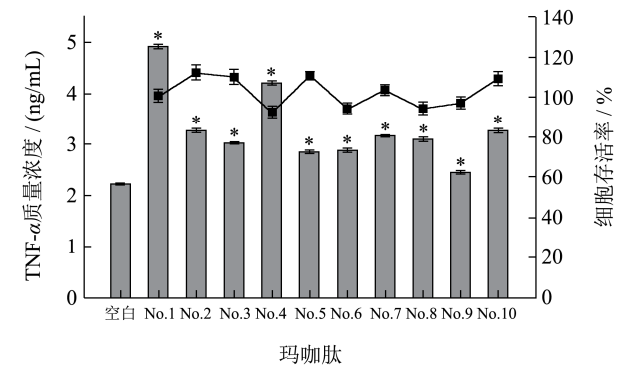


图3 玛咖肽对 RAW 264.7 细胞的存活率及 TNF- α 分泌量的影响

Fig.3 Effects of maca peptides on the viability and secretion of TNF- α of cell line RAW 264.7

注：*表示与空白对照具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.4 玛咖免疫调节肽的构效关系

2.4.1 玛咖免疫调节肽与受体的相互作用模式

在分子相互作用的研究中，如 AutoDock 的分子

模拟软件常备用于模拟、分析配体-蛋白的结合情况。由于筛选打分结果仅反映肽段与受体结合程度的相对排名情况，并未体现活性肽与受体的相互作用模式，故通过 AutoDock 探究 No.1 肽 NPYPFFGFSI 与 TLR2 和 TLR4 的相互作用模式。由表 6 可知，No.1 肽 NPYPFFGFSI 与 TLR2、TLR4 的结合亲和力皆小于 -5.0 kcal/mol，说明其能与两个受体发生相互作用^[8]；本实验室前期发现玛咖胃肠消化产物中活性最强的肽段为 RNPFLP，而 No.1 肽与 TLR2 的亲合结合力强于 RNPFLP 的-6.9 kcal/mol，与 TLR4 的亲合结合力则不及 RNPFLP 的-10.7 kcal/mol^[8]。由图 4 可知，No.1 肽与 TLR2、TLR4 之间的作用力主要为氢键及疏水作用力：与 TLR2 之间共存在 3 个氢键和 22 个疏水位点，与 TLR4 之间共存在 8 个氢键与 12 个疏水位点。另外，No.1 肽与 TLR2 的结合亲和力更高，则其倾向于通过激活 TLR2 来刺激 RAW 264.7 细胞分泌更多的 TNF- α 。

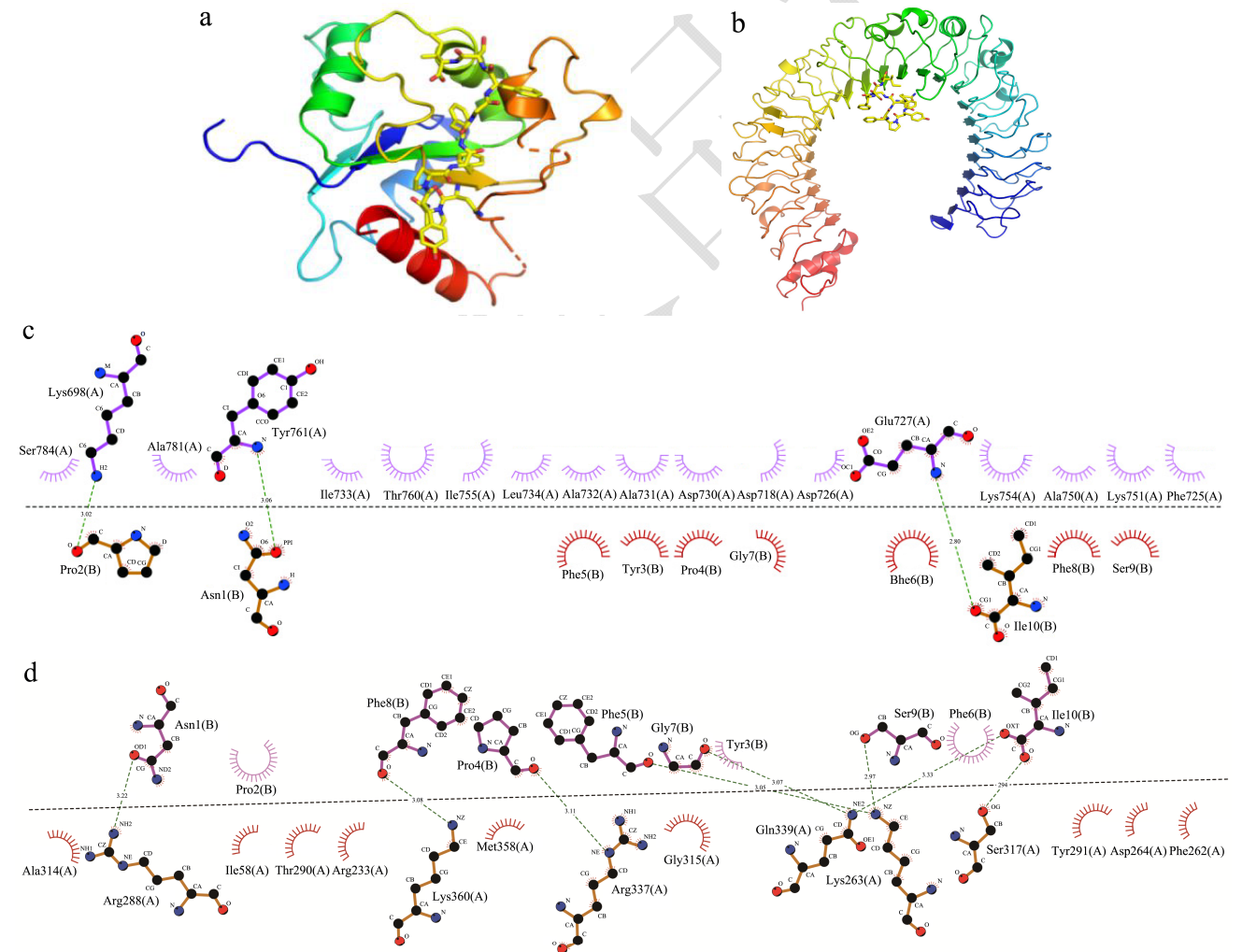


图4 No.1 肽与 TLR2 (a, c)、TLR4 (b, d) 的相互作用模式

Fig.4 Interaction patterns between peptide No.1 and TLR2 (a, c)/TLR4 (b, d)

表 6 No. 1 肽与 TLR2、TLR4 的结合亲和力

Table 6 Binding affinities between peptide No.1 and TLR2, TLR4

序号	序列	TLR2		TLR4	
		结合亲和力/(kcal/mol)	亲和程度	结合亲和力/(kcal/mol)	亲和程度
No.1	NPYPFFGFSI	-7.8	++	-7.3	++

注：结合亲和力<-10.0 kcal/mol 表示亲和程度高 (+++); 结合亲和力为-10.0~-5.0 kcal/mol 表示亲和程度一般 (++)；结合亲和力>-5.0 kcal/mol 表示无结合亲和 (-)。

表 7 No. 1 肽中各原子对 HOMO 的贡献比例

Table 7 Contribution rates of atoms of peptide No.1

序号	原子	比例/%	序号	原子	比例/%	序号	原子	比例/%	序号	原子	比例/%	序号	原子	比例/%
1	H	0.005	34	C	0.018	67	O	0.005	100	H	0.000	133	H	0.001
2	O	0.000	35	C	0.032	68	C	0.051	101	H	0.000	134	H	0.001
3	C	0.003	36	O	0.032	69	C	0.001	102	H	0.000	135	H	0.000
4	C	0.007	37	C	0.008	70	C	0.000	103	H	0.165	136	H	0.002
5	C	0.001	38	C	0.004	71	N	0.008	104	H	0.059	137	H	0.005
6	N	0.063	39	N	0.051	72	O	0.000	105	H	0.970	138	H	0.001
7	O	0.000	40	O	0.010	73	C	0.000	106	H	0.344	139	H	0.000
8	C	0.001	41	C	0.000	74	C	0.000	107	H	0.702	140	H	0.184
9	N	0.000	42	C	0.001	75	C	0.002	108	H	0.680	141	H	0.023
10	O	0.005	43	C	0.001	76	C	0.001	109	H	0.404	142	H	0.001
11	C	0.130	44	C	0.002	77	H	0.001	110	H	0.805	143	H	0.012
12	N	0.001	45	C	0.004	78	C	0.000	111	H	0.302	144	H	0.004
13	C	0.009	46	C	0.002	79	C	0.001	112	H	0.012	145	H	0.001
14	C	0.003	47	C	0.003	80	C	0.000	113	H	0.001	146	H	0.000
15	C	0.001	48	C	0.000	81	N	0.004	114	H	0.007	147	H	0.001
16	C	0.000	49	C	0.002	82	O	0.000	115	H	0.002	148	H	0.000
17	O	0.337	50	N	0.000	83	C	0.000	116	H	0.005	149	H	0.000
18	C	2.245	51	O	0.003	84	C	0.000	117	H	0.011	150	H	0.000
19	C	0.543	52	C	0.009	85	C	0.000	118	H	0.006	151	H	0.003
20	N	0.368	53	C	0.070	86	C	0.000	119	H	0.003	152	H	0.003
21	O	0.854	54	N	0.006	87	C	0.000	120	H	0.004	153	H	0.000
22	O	16.779	55	O	0.212	88	C	0.000	121	H	0.000	154	H	0.003
23	C	6.302	56	C	0.017	89	H	0.000	122	H	0.000	155	H	0.000
24	C	10.233	57	C	0.019	90	H	0.001	123	H	0.000	156	H	0.000
25	C	16.442	58	C	0.004	91	H	0.004	124	H	0.003	157	H	0.000
26	C	10.009	59	C	0.020	92	H	0.004	125	H	0.005	158	H	0.001
27	C	7.129	60	C	0.026	93	H	0.004	126	H	0.001	159	H	0.000
28	C	19.314	61	C	0.005	94	H	0.000	127	H	0.001	160	H	0.000
29	C	2.693	62	C	0.002	95	H	0.000	128	H	0.000	161	H	0.000
30	C	0.040	63	C	0.133	96	H	0.003	129	H	0.000	162	H	0.000
31	N	0.400	64	C	0.025	97	H	0.000	130	H	0.000	163	H	0.000
32	C	0.084	65	N	0.326	98	H	0.013	131	H	0.007			
33	C	0.019	66	O	0.080	99	H	0.001	132	H	0.003			

2.4.2 玛咖免疫调节肽的活性位点判断

根据前线轨道理论,分子的反应活性随 HOMO (最高占据分子轨道) 能量的升高而增强,即位于 HOMO 的基团更有可能发生亲核反应,活性更高^[38]。No.1 肽 NPYPFFGFSI 中对 HOMO 贡献最大的原子是 C₂₈ (表 7), 贡献比例为 19.314%, 则 No.1 肽的活性位点最有可能位于 C₂₈, HOMO 主要分布在酪氨酸

酸上 (图 5), 酪氨酸与 TLR2 之间存在疏水作用, 与 TLR4 之间形成了氢键 (图 4); 另外, 酪氨酸也被认为与肽的抗氧化^[39]、抗癌^[20]活性有关。No.1 肽的 HOMO 都主要分布在芳香族氨基酸上, 与免疫调节肽一般都含有芳香族氨基酸的规律^[20,21]相符。另外, No.1 肽的可能活性位点还包括 O₂₂-H₁₀₅、C₂₅、C₂₄-H₁₀₇ 和 C₂₆-H₁₀₈。

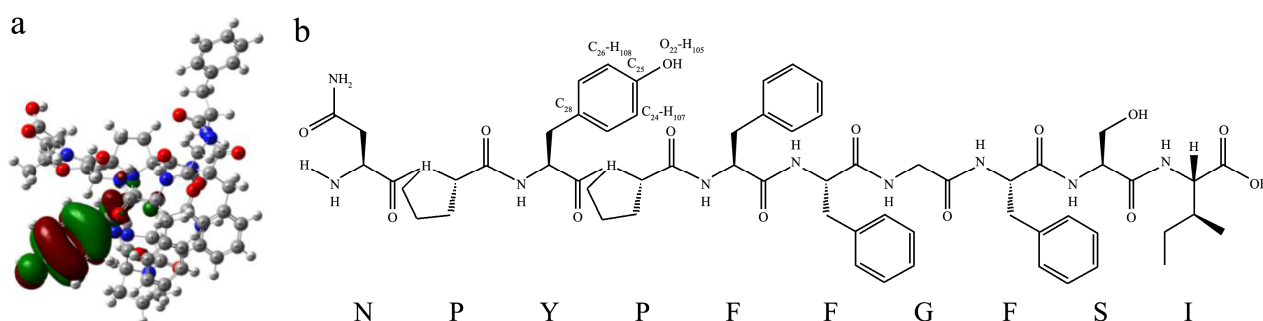


图 5 No.1 肽的 HOMO 轨道分布图 (a) 及分子结构式 (b)

Fig.5 HOMO distribution (a) and molecular formula (b) of peptide No.1

3 结论

本研究发现预酶解的加工处理方式能有效增强玛咖蛋白的可消化性, 以及提高玛咖蛋白经胃肠消化后产生的活性肽和游离氨基酸的含量。其中, 经菠萝蛋白酶预酶解处理得到的消化产物的免疫调节活性最强; 该消化产物中活性最强的肽段为 NPYPFFGFSI, 而该肽段的免疫调节活性与所含的酪氨酸密切相关。本研究的结果表明预酶解的处理方式能够改善玛咖蛋白的可食用性, 提高其营养学价值。

参考文献

- [1] 金文闻. 药食两用植物玛咖(*Lepidium meyenii*)的功效物质研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007
- [2] 梁姝敏. 玛咖多肽的制备工艺优化及其理化性质研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2018
- [3] Chen L, Li J, Fan L. The nutritional composition of maca in hypocotyls (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivated in different regions of China [J]. Journal of Food Quality, 2017, 3749627
- [4] 高大方, 张泽生. 新资源食品玛咖中功能成分的 UPLC-MS/MS 研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(2): 830-832, 912
- [5] Bhat Z F, Kumar S, Bhat H F. Bioactive peptides of animal origin: a review [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2015, 52(9): 5377-5392
- [6] Chalamaiah M, Kumar B D, Hemalatha R, et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 3020-3038
- [7] Garcia M C, Puchalska P, Esteve C, et al. Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities [J]. Talanta, 2013, 106: 328-349
- [8] He P, Pan L, Wu H, et al. Isolation, identification, and immunomodulatory mechanism of peptides from *Lepidium meyenii* (maca) protein hydrolysate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(14): 4328-4341
- [9] Wu L, Zhang M, Xin X, et al. Physicochemical and functional properties of a protein isolate from maca (*Lepidium meyenii*) and the secondary structure and immunomodulatory activity of its major protein component [J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2894-2905
- [10] GB/T 23527-2009, 蛋白酶制剂[S]
- [11] T/CCCMHPIE 1.18-2016, 植物提取物木瓜蛋白酶[S]
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版, 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 901, 1397
- [13] Brodtkorb A, Egger L, Alming M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion [J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1014
- [14] Bandyopadhyay K, Misra G, Ghosh S. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal [J]. Journal of Oleo Science, 2008, 57(1): 47-52
- [15] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1256-1262

- [16] Pena-Ramos E A, Xiong Y L. Antioxiutive activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system [J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(12): 2577-2583
- [17] Spellman D, Mcevoy E, O'cuinn G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(6): 447-453
- [18] GB/T 30987-2020,植物中游离氨基酸的测定[S]
- [19] GB/T 22729-2008,海洋鱼低聚肽粉[S]
- [20] Chalamaiah M, Yu W, Wu J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 205-222
- [21] 李富强,张廷新,朱丽萍,等.食物蛋白源免疫调节肽研究进展[J].食品与发酵工业,2022,48(1):308-314
- [22] Mooney C, Haslam N J, Pollastri G, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity [J]. Plos One, 2012, 7(10): e45012
- [23] Zhou P, Jin B, Li H, et al. HPEPDOCK: a web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W443-W450
- [24] Wu W, Zhang M, Ren Y, et al. Characterization and immunomodulatory activity of a novel peptide, ECFSTA, from wheat germ globulin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(27): 5561-5569
- [25] Jadhav S B, Gaonkar T, Rath A. *In vitro* gastrointestinal digestion of proteins in the presence of enzyme supplements: Details of antioxiunt and antidiabetic properties [J]. Lwt - Food Science and Technology, 2021, 147: 111650
- [26] Gbaumosi S O, Abiose S H, Aluko R E. Amino acid profile, protein digestibility, thermal and functional properties of conophor nut (*Tetracarpidium conophorum*) defatted flour, protein concentrate and isolates [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(4): 731-739
- [27] Moreno-Fernandez S, Garces-Rimon M, Miguel M. Egg-derived peptides and hydrolysates: A new bioactive treasure for cardiometabolic diseases [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 104: 208-218
- [28] Santos-Hernandez M, Alfieri F, Gallo V, et al. Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol [J]. Food Research International, 2020, 137: 109708
- [29] Santos-Hernandez M, Miralles B, Amigo L, et al. Peptidomic ut a of egg white gastrointestinal digests prepared using the infogest harmonized protocol [J]. Data in Brief, 2020, 31: 105932-105932
- [30] Kaur L, Mao B, Singh Beniwal A, et al. Alternative proteins vs animal proteins: the influence of structure and processing on their gastro-small intestinal digestion [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 122: 275-286
- [31] Cian R E, Hernandez-Chirlaque C, Gamez-Belmonte R, et al. Green alga *Uva* spp. hydrolysates and their peptide fractions regulate cytokine production in splenic macrophages and lymphocytes involving the TLR4-NF kappa B/MAPK pathways [J]. Marine Drugs, 2018, 16(7)
- [32] Ahn C B, Je J Y, Cho Y S. Antioxiunt and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 92-98
- [33] Ndiaye F, Tri V, Duarte J, et al. Anti-oxiunt, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds [J]. European Journal of Nutrition, 2012, 51(1): 29-37
- [34] Wu W, Zhang M, Sun C, et al. Enzymatic preparation of immunomodulatory hydrolysates from defatted wheat germ (*Triticum vulgare*) globulin [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2016, 51(12): 2556-2566
- [35] Li L L, Li B, Ji H F, et al. Immunomodulatory activity of small molecular (3 ku) *Coix* glutelin enzymatic hydrolysate [J]. Cyta-Journal of Food, 2017, 15(1): 41-48
- [36] 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
- [37] 魏睿婷.油用牡丹籽粕降血糖肽的制备、鉴定及基于分子对接的序列设计[D].西安:西北大学,2021
- [38] 曾知音.基于量子化学的抗氧化寡肽构效关系的研究[D].长沙:长沙理工大学,2013
- [39] Matemu A, Nakamura S, Katayama S. Health benefits of antioxiutive peptides derived from legume proteins with a high amino acid score [J]. Antioxiunts, 2021, 10(2): 316