

小米糠谷蛋白-2 抗氧化肽的制备、纯化与鉴定

郭 帅¹, 郑新雨², 武鑫怡², 霍新宇², 宋昕凌², 孟欣月², 郑亚军²

(晋中学院生物科学与技术系¹, 晋中 030619)

(山西师范大学食品科学学院², 太原 030092)

摘要:为了提高小米糠中蛋白质的综合利用率,本研究以小米糠谷蛋白-2为原料制备抗氧化肽。依次用单因素实验和正交实验对小米糠谷蛋白-2的酶解工艺进行了优化,以抗氧化能力为评价指标,得到的最佳酶解工艺为:最佳蛋白酶为风味蛋白酶、温度55℃、pH 6.0、酶用量为3.5 g/100 g和时间2 h。验证实验表明,最佳工艺下小米糠谷蛋白-2酶解产物(MBG-2H)的ABTS⁺·清除率为93.14%,水解度为15.96%。然后采用Sephadex G-25凝胶色谱对最佳工艺下MBG-2酶解产物进行分离纯化,得到小米糠谷蛋白-2酶解产物-1(MBG-2H-1)、酶解产物-2(MBG-2H-2)和酶解产物-3(MBG-2H-3)3个多肽组分。其中,MBG-2H-3的抗氧化能力最强。经Sephadex G-15色谱柱进一步分离后,得到MBG-2H-3-a和MBG-2H-3-b这2个多肽组分,其中MBG-2H-3-a表现出较强的还原力(0.423)、ABTS⁺·(97.60%)和超氧根离子自由基清除能力(68.35%)。经ESI-LC-MS/MS分析,MBG-2H-3-a和MBG-2H-3-b分别含8个和12个寡肽,分子质量分布在610.45~1 057.58 u,富含谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和芳香族氨基酸。*In silico*预测显示,HFSSL、SWPFGESR、RPFNLFHK等8条寡肽具有抗氧化性。采用固相合成法对这8条寡肽进行合成并用于抗氧化性验证。结果表明,这8条多肽具有良好的羟基自由基清除能力(79.54%~99.67%)、亚铁离子络合能力(51.05%~93.48%)、ABTS⁺·清除能力(45.12%~92.48%)和还原力。因此,小米糠谷蛋白-2酶解产物有开发为天然抗氧化剂的潜力。

关键词:小米糠谷蛋白-2;抗氧化肽;制备;纯化;鉴定;*In silico*预测

DOI:10.20048/j.cnki.issn.1003-0174.001264

中图分类号:TS21 文献标识码:A 文章编号:1003-0174(2026)01-0081-11

网络首发时间:2025-11-17 14:47:01

网络首发地址:<https://link.cnki.net/urlid/11.2864.TS.20251117.1358.002>

Preparation, purification and identification of antioxidant peptides from millet bran gluten-2

Guo Shuai¹, Zheng Xinyu², Wu Xinyi², Huo Xinyu², Song Xinling², Meng Xinyue², Zheng Yajun²

(Department of Biological Science and Technology, Jinzhong University¹, Jinzhong 030619)

(Food Science College, Shanxi Normal University², Taiyuan 030092)

Abstract: In this study, antioxidant peptides from millet bran gluten-2 were prepared to improve the comprehensive utilization of proteins in millet bran. The enzymatic hydrolysis conditions of millet bran gluten-2 for preparing antioxidant peptides were optimized by single-factor experiments and orthogonal experiments. The antioxidant capacity was the main evaluation index, and the optimal enzymatic hydrolysis conditions were obtained that flavor protease was selected as the optimal protease, with a temperature of 55 °C, pH 6.0, enzyme dosage of 3.5 g/100 g,

基金项目:山西省自然科学基金面上项目(202203021221139),山西师范大学研究生教育创新计划项目(2023XJG012),山西师范大学2025年大学生创新创业计划项目(2025DCXM-71)

收稿日期:2025-04-26

第一作者:郭帅,男,1981年出生,实验师,功能性食品研究与开发,jzxygs@yeah.net

通信作者:郑亚军,男,1980年出生,教授,天然产物开发与功能性食品研究,zhengyajun200705@163.com

and enzymatic hydrolysis time of 2 h. The verification experiments showed that the $ABTS^+ \cdot$ scavenging rate and hydrolysis degree of the millet bran gluten - 2 hydrolysates (MBG - 2H) prepared from the optimal experiment conditions were 93.14% and 15.96%, respectively. Subsequently, the MBG - 2H obtained from the optimal process was separated and purified by Sephadex G - 25 gel chromatography, and three peptide fractions were obtained, including millet bran gluten - 2 hydrolysate - 1 (MBG - 2H - 1), millet bran gluten - 2 hydrolysate - 2 (MBG - 2H - 2) and millet bran gluten - 2 hydrolysate - 3 (MBG - 2H - 3). Among them, the MBG - 2H - 3 showed the strongest antioxidant capacity. After further separation for MBG - 2H - 3 by Sephadex G - 15 chromatographic column, two peptide fractions were obtained, including MBG - 2H - 3 - a and MBG - 2H - 3 - b. MBG - 2H - 3 - a showed strong reducing power (0.423), $ABTS^+ \cdot$ scavenging capacity (97.60%), and superoxide anion radical scavenging activity (68.35%). Eight kinds of peptides were identified from MBG - 2H - 3 - a and twelve kinds of peptides from MBG - 2H - 3 - b were identified via ESI - LC - MS/MS analysis. These oligopeptides have molecular weight distribution of 610.45 - 1 057.58 u and were rich in glutamic acid (Glu), arginine (Arg), aspartic acid (Asp), and aromatic amino acids. The silico prediction showed that eight oligopeptides, such as HFSSL, SWPFGESR and RPFN-LFHK, possessed antioxidant activity. These oligopeptides were synthesized by solid - phase synthesis and used for antioxidant activity verification. The results showed that all eight oligopeptides exhibited high hydroxyl radical scavenging activity (79.54% - 99.67%), ferrous ion chelating ability (51.05% - 93.48%), $ABTS^+$ scavenging activity (45.12% - 92.48%), and reducing power. Therefore, the enzymatic hydrolysate from millet bran gluten - 2 has the potential to be developed as a natural antioxidant.

Key words: millet bran glutenin - 2; antioxidant peptides; preparation; purification; identification; *in silico* prediction

人体中自由基的产生与淬灭总体上保持着平衡,当体内的自由基失衡时,过量的羟基自由基、超氧根离子自由基等会攻击细胞中的大分子物质进而引发一系列氧化反应,最终形成大量的过氧化物,从而造成细胞和器官损伤^[1]。氧化反应也是导致食品腐败的主要原因之一,如油脂酸败、VC氧化、天然色素的氧化褐变等,都可以破坏食品的感官品质,并降低食品的营养价值和安全性^[2]。因此,抑制过度的氧化反应是保持机体健康与防止食品腐烂变质的共同需求。抗氧化剂可以清除自由基的产生并抑制氧化反应,有助于延缓人体衰老、缓解高血压、高血糖等慢性病,以及减慢食品腐败的速度^[1,3]。目前使用的抗氧化剂多为化学合成,安全性较差,而绿色、天然的抗氧化剂因安全性更高而颇受关注。食源性抗氧化肽的结构与内源性抗氧化肽类似,具有低抗原性、安全、易吸收等特点,部分食源性抗氧化肽有益于降血压、降血糖等,已成为近年来的研究热点^[4]。

小米糠是小米在加工过程中产生的一种副产品,它包括小米的皮、种皮、糊粉层、少量胚以及胚乳^[5]。小米糠含有丰富的蛋白质、纤维素和维生素,其中蛋白质质量分数约为16%。我国是小米的主产国之一,其中小米糠年产约50万t,是丰富和优质的蛋白质资源。然而,我国大部分地区将小米糠直接

或简单加工后作为畜禽饲料使用,蛋白质、膳食纤维等活性成分并未开发利用,因此造成小米的综合利用率低,产业经济效益差^[6]。小米糠蛋白按溶解性可划分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、酸溶性谷蛋白(谷蛋白-1)、碱溶性谷蛋白(谷蛋白-2)和难溶性蛋白,其中谷蛋白-2的含量最高(34.45 g/100 g)。小米糠谷蛋白-2是一种必需氨基酸含量丰富、配比合理、营养价值较高的蛋白质^[7],部分研究从小米糠蛋白酶解物中分离鉴定出降血压肽、抑菌肽、金属离子螯合肽等活性多肽^[7-12]。然而,目前关于小米糠谷蛋白-2抗氧化肽的研究鲜见报道。本实验以小米糠为原料制备小米米糠谷蛋白-2,然后对其酶解工艺进行优化,再使用葡聚糖凝胶色谱等对小米糠谷蛋白-2酶解产物(MBG-2H)进行分离纯化,以期得到活性较强的抗氧化多肽,为进一步开发天然抗氧化肽产品与促进小米的精深加工提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料与试剂

小米糠; EDTA、硫酸亚铁、Ferrozine、铁氰化钾、氯化铁、没食子酸、甲醛、盐酸羟胺、邻菲罗啉、乙酸钠均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

RE-52AA 旋转蒸发器、CP214 电子天平、TGL-15B离心机、透析袋、真空冷冻干燥机、pHS-3C pH计、XR 53648 数显恒温水浴锅、柱层析凝胶色谱柱、UV-1800PC 紫外可见分光光度计、SHA-B 多功能数显恒温振荡器。

1.3 实验条件

1.3.1 小米糠谷蛋白-2 的制备

参考高颖等^[10]的方法,略有改动,小米糠在45℃的鼓风干燥箱中干燥4h,粉碎,过100目筛。然后称取干燥小米糠粉末于三角瓶中,按照 $m_{\text{小米糠粉}}:V_{\text{石油醚}}$ 为1:30 g/mL加入石油醚(沸点60~90℃),封口后进行振荡脱脂,过滤,收集滤渣。在滤渣中再次加入石油醚,重复脱脂2~3次,石油醚回收后收集滤渣,在45℃的鼓风干燥箱中烘干4h后备用。称取30g脱脂小米糠粉于三角瓶中,加入0.1 mol/L的NaOH振荡提取2h,过滤后收集滤液;在滤渣中再次加入0.1 mol/L NaOH进行2次振荡提取。过滤后合并滤液,在10 000×g下,离心20 min,收集上清液,转移至透析袋(截留分子量3 ku)中,在4℃蒸馏水中透析48 h,期间蒸馏水2 h更换1次。最后将透析液真空冷冻干燥,得到小米糠谷蛋白-2, -20℃下保藏备用。

1.3.2 小米糠谷蛋白-2 的酶解工艺研究

1.3.2.1 酶解工艺

将小米糠谷蛋白-2溶液(2 g/L)置于锥形瓶中^[11],每瓶200 mL,按照表1调节各组pH和温度,加入蛋白酶后,振荡酶解2 h,灭酶(置于100℃下煮沸10 min)。将酶解液冷却至室温后,离心(10 000×g, 25 min),收集上清液,冷冻干燥后得到小米糠谷蛋白-2酶解产物(MBG-2H)。

表1 各组酶水解时的条件

酶	pH	温度/℃	酶用量/g/100 g	水解时间/h
酸性蛋白酶	3.0	45	2	2
中性蛋白酶	7.0	50	2	2
碱性蛋白酶	8.0	55	2	2
风味蛋白酶	7.0	55	2	2
木瓜蛋白酶	7.5	55	2	2
复合蛋白酶[m(风味):m(碱性蛋白酶)=1:1]	8.0	50	2	2

1.3.2.2 最佳蛋白酶的筛选

在6个锥形瓶中,分别加入200 mL的小米糠谷蛋白-2溶液(2 g/L)后,按照表1调节各瓶中溶液的pH,加入酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶

等,按照表1中各自的温度和时间进行水解。然后在100℃下加热10 min进行灭酶,再按照1.3.2.1的方法将水解液离心,收集上清液,分别采用甲醛滴定法测定所得酶解物的水解度(DH)^[13]和ABTS⁺·清除能力^[14],重复3次,取平均值。

1.3.2.3 不同温度对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

在5个锥形瓶中,将200 mL小米糠谷蛋白-2溶液(2 g/L)置于锥形瓶中,调节至pH 7.0,加入风味蛋白酶(2.0 g/100 g),分别在45、50、55、60、65℃下酶解2 h,灭酶后离心,测定酶解物的DH与ABTS⁺·清除能力,重复3次取平均值^[14]。

1.3.2.4 不同酶用量对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

在5个锥形瓶中,将200 mL小米糠谷蛋白-2溶液(2 g/L)置于锥形瓶中,调节至pH 7.0,加入不同风味蛋白酶(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/100 g),在55℃下酶解2 h,灭酶后离心,测定酶解物的DH与ABTS⁺·清除能力,重复3次取平均值^[15]。

1.3.2.5 不同 pH 对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

在5个锥形瓶中,各将200 mL小米糠谷蛋白-2溶液(2 g/L)置于锥形瓶中,分别调节至pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,加入风味蛋白酶(2.0 g/100 g),在55℃下酶解2 h,灭酶后离心,测定酶解物的DH与ABTS⁺·清除能力,重复3次取平均值^[16]。

1.3.2.6 不同时间对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

在5个锥形瓶中,各将200 mL小米糠谷蛋白-2溶液(2 g/L)置于锥形瓶中,调节至pH 7.0,加入风味蛋白酶(2.0 g/100 g),在55℃下分别酶解1、2、4、6、8 h,灭酶后离心,测定酶解物的DH与ABTS⁺·清除能力,重复3次取平均值。

1.3.2.7 正交实验

在分析单因素实验结果后,采用L₉(3⁴)正交实验^[17]对MBG-2的酶解工艺参数进行优化,其因素和水平见表2。

表2 小米糠谷蛋白-2 酶解实验因素与水平表

水平	因素			
	A(温度)/℃	B(pH)	C(酶用量)/g/100 g	D(水解时间)/h
1	50	5	2.5	1
2	55	6	3.0	2
3	60	7	3.5	3

1.3.3 小米糠谷蛋白-2 抗氧化肽的纯化

采用正交实验所得最佳工艺条件对小米糠谷蛋白-2 进行酶解,灭酶(100 ℃、10 min)后将酶解液在 10 000 × g 下离心 25 min,收集上清液,冷冻干燥后得到 MBG-2H 粉末,从而进行分离纯化。

1.3.3.1 Sephadex G-25 凝胶色谱分离

以 dH₂O 为溶剂,配制 10 mg/mL 的 MBG-2H 溶液,过 0.45 μm 的滤膜后,上样 2 mL,以 dH₂O 为流动相洗脱,流速为 2.6 mL/min,检测波长 280 nm,每 5 min 收集 1 管,共收集 40 管。监测波长 280 nm,分别收集各吸收峰,重复多次后,冷冻干燥后测定各组分的抗氧化能力^[18]。选取抗氧化能力最高的组分用于后续的 Sephadex G-15 凝胶色谱分离。

1.3.3.2 Sephadex G-15 凝胶色谱分离

将 Sephadex G-25 分离所得的抗氧化能力最强样品的制成 10 mg/mL,上样量 2 mL 过 Sephadex G-15 凝胶色谱柱,以 dH₂O 为流动相洗脱,设置流速为 2.6 mL/min,每 5 min 收集 1 管,共收集 25 管^[19]。监测波长 280 nm,分别收集各吸收峰,重复多次后,分别对各峰的收集液进行冷冻干燥,然后测定各组分的抗氧化能力。

1.3.4 多肽序列鉴定与活性预测

经 Sephadex G-15 分离所得的抗氧化能力最强的多肽组分,参考 Zheng 等^[20]的方法,采用高效液相串联质谱(HPLC-MS/MS),耦合 Nano LC 和 LTQ 线性离子阱质谱仪鉴定序列。使用生物信息学搜索引擎 Mascot version 2.1.0 (Matrix Sciences)对获取的 MS/MS 数据进行比对分析。以 *In silico* 技术,使用数据库 Peptide Ranker server (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 预测所得各多肽序列的抗氧化性。

1.3.5 多肽序列的合成与抗氧化性验证

参考 Zheng 等^[7]的方法,将预测得到的抗氧化寡肽序列用固相合成法进行合成,所得寡肽纯度 > 99.5%。然后对合成寡肽(质量浓度为 100 μg/mL)的还原力、对 ABTS⁺·、超氧根离子自由基和羟基自由基的清除能力进行测定,以此验证活性预测结果的准确性。

1.3.6 水解度的测定

使用甲醛滴定法测定其水解度^[13]:取 6 mL 酶解产物加入 3 mL 蒸馏水置于试管中,向每个试管

中加入 pH 8.2 的甲醛溶液 3 mL,混匀,用 0.01 mol/L NaOH 溶液滴至 pH 9.2,记录滴定所用溶液的体积。

制作完全水解的 MBG-2H 溶液:称取 MBG-2 样品 0.15 g,加入 75 mL、6 mol/L 的盐酸于带塞试管中,于 100 ℃的水浴锅水解 24 h。

制作不经水解的小米糠谷蛋白-2 溶液:称取 MBG-2 样品 0.15 g,加入 75 mL 蒸馏水。

水解度(y)按式(1)计算:

$$y = \frac{H_s - H_0}{H_a - H_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: y 为水解度/%; H_s 为蛋白质水解液滴定至 pH 9.2 时所消耗的 0.01 mol/L NaOH 体积数/mL; H_0 为水解 0 h 的蛋白质溶液滴定至 pH 9.2 时所消耗的 0.01 mol/L NaOH 体积数/mL; H_a 为蛋白质溶液在 6 mol/L HCl 中水解 24 h (105 ~ 110 ℃)后滴定至 pH 9.2 时所消耗的 0.01 mol/L NaOH 体积数/mL。

1.3.7 抗氧化能力的测定

1.3.7.1 ABTS⁺·清除能力

50 μL 样液与 2 mL、7 mmol/L ABTS 工作液在 30 ℃下暗反应 6 min,于 734 nm 波长下测定吸光值^[14]。空白实验:dH₂O 代替样品;对照实验:dH₂O 代替 ABTS 工作液。

1.3.7.2 羟基自由基(·OH)的清除能力

样液 100 μL 与 FeSO₄-EDTA-2Na (10 mmol/L、100 μL) 和 100 μL 2-D-脱氧核糖 (10 mmol/L) 混匀,加 pH 7.4、0.1 mol/L 磷酸缓冲液 1.4 mL,加双氧水 10 mmol/L 100 μL,37 ℃水浴 1 h,再加入 1 mL 质量分数为 28% 的三氯乙酸,加质量分数为 1% 的硫代巴比妥酸(50 mmol/L NaOH 溶解)1 mL,100 ℃下水浴 20 min,冷却到室温 532 nm 比色^[16]。空白实验:dH₂O 代替样液;对照实验:dH₂O 代替 2-D-脱氧核糖试剂。

1.3.7.3 超氧根离子自由基的清除能力

0.1 mL 样液,加入 3 mmol/L 邻苯三酚 1.5 mL、0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0、1.5 mL),摇匀,立即在 320 nm 下测定吸光值,5 min 内每 30 s 记录 1 次。对照实验:dH₂O 代替邻苯三酚^[14]。

1.3.7.4 DPPH 自由基(DPPH·)的清除能力

样液 50 μL,加入 50 μL 的 DPPH、1.9 mL 体积分数 95% 的无水乙醇,暗反应 30 min 后,在 517 nm 下测量其吸光值^[20]。空白实验:dH₂O 代替样液;对照实验:dH₂O 代替 DPPH。

1.3.7.5 还原力

取 0.5 mL 样液于试管中,加入 1.25 mL、0.2 mol/L pH 为 6.6 的磷酸缓冲液,1.25 mL 质量分数为 1% 铁氰化钾,50 ℃ 下水浴 20 min,再加入 1.25 mL 质量分数为 1% 的三氯乙酸,3 000 × g 下离心 10 min,取上清液 1.25 mL,加 1.25 mL dH₂O 和 0.25 mL 质量分数为 1% 的氯化铁,静置 5 min 后于 700 nm 比色^[20]。空白实验:dH₂O 代替样液;对照实验:dH₂O 代替氯化铁。

1.3.8 数据分析

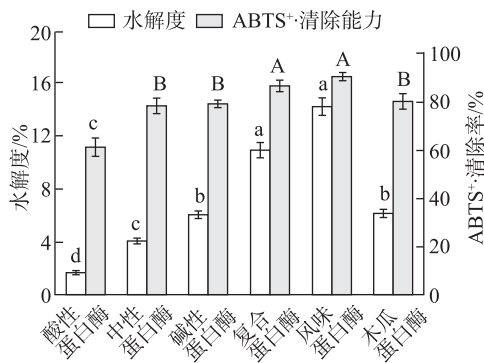
各实验至少重复 3 次,取平均值,并用 SPSS 软件进行显著性分析($P < 0.05$),Origin 8.60 软件作图。

2 结果与分析

ABTS⁺·清除能力可以反映物质总抗氧化能力^[8,20,21],因此本实验以 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力为主要指标进行酶解工艺研究,同时以水解度为辅助指标。

2.1 小米糠谷蛋白-2 最优蛋白酶的筛选

风味蛋白酶、复合蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与水解度的影响见图 1。



注:图中不同大写字母代表 ABTS⁺·清除能力显著性差异($P < 0.05$);小写字母代表水解度显著性差异($P < 0.05$);下同。

图1 不同蛋白酶对 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力的影响

由图 1 可见,各蛋白酶水解后,MBG-2H 的水解度以风味蛋白酶为最高,复合蛋白酶次之,酸性蛋白酶最小;MBG-2H 对 ABTS⁺·的清除能力,也以风味蛋白酶为最高,酸性蛋白酶最低。酸性蛋白酶处理后,MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力和水解度均最低,可能是由于其最适 pH 为 2.5,而在这一 pH 值下,小米糠谷蛋白-2 的溶解性较差,无法融入到反应体系^[21]。按 m (风味蛋白酶): m (碱性蛋白酶) =

1:1 处理后,MBG-2H 的水解度均最高。风味蛋白酶属于外切酶,碱性蛋白酶属于内切酶,虽然有研究表明二者的复合酶在水解蛋白时更有效^[17,19],但本实验表明,复合酶与风味蛋白酶对小米糠谷蛋白-2 的水解效果并无显著差异,这可能是由于小米糠谷蛋白-2 独特的氨基酸序列导致。因此从经济和操作便捷的角度出发,风味蛋白酶为本实验水解小米糠谷蛋白-2 的最佳蛋白酶。

2.2 小米糠谷蛋白-2 单因素酶解实验

2.2.1 酶用量对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

在 pH 6.0、水解温度 55 ℃ 和时间 2 h 的条件下,风味蛋白酶的用量对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与水解度的影响如图 2 所示。

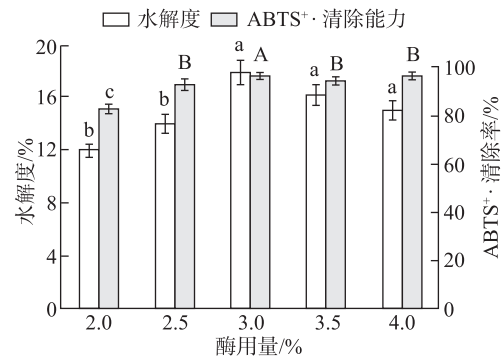


图2 酶用量对 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力的影响

由图 2 可见,不同酶用量对 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力均有显著影响。在酶用量为 2.0 ~ 3.0 g/100 g 时,随着酶用量增加,MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力均逐渐增大;但当酶用量为 3.5 ~ 4.0 g/100 g 时,随着酶用量的增加,MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力均无显著性变化。在蛋白质的酶解反应中,酶用量的增加意味着更多的酶加入反应,可有效推动反应的发生,产生更多的酶解产物,从而使 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力都显著增加^[22]。当酶用量为 3.5 g/100 g 后,反应中的酶趋于饱和,酶解反应接近平衡值,因此 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力变化不大。综合考虑经济因素,选择 3.0 g/100 g 为木瓜蛋白酶的最佳用量。

2.2.2 温度对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

温度是影响蛋白酶活性的关键因素,也是影响蛋白质酶解效果的重要因素^[21]。当酶的用量为 3.0 g/100 g、pH 6.0、水解时间 2 h 的条件下,不同温度

对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与水解度的影响如图 3 所示。

在 45~55 °C 下酶解 2 h 后, MBG-2H 的水解度和 ABTS⁺·清除能力均随温度的升高而显著提高。55 °C 下酶解所得 MBG-2H 的水解度和 ABTS⁺·清除能力均达到最高值。在 60~65 °C 下酶解 2 h 后, MBG-2H 的水解度和 ABTS⁺·清除能力都显著降低。这是因为在适宜的温度范围内, 升温会提高风味蛋白酶的活性进而使 MBG-2H 的水解度增大, 释放出更多的抗氧化肽段, 使 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力增大; 而在 60~65 °C 的较高温度下, 风味蛋白酶会发生热变性, 导致结构改变, 酶活下降, 从而使 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力和水解度都降低^[22], 这与 Xu 等^[19] 与和继刚等^[23] 的研究报道一致。因此, 选择 55 °C 为本实验的最佳酶解温度。

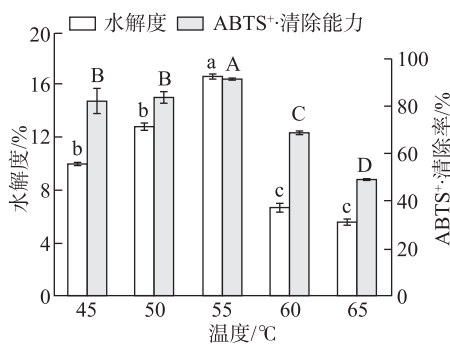


图 3 酶解温度对 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力的影响

2.2.3 不同 pH 对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

不同 pH 对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响见图 4。

pH 6.0 时, MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 均显著高于其他 pH 值下的样品。在 pH 7.0~

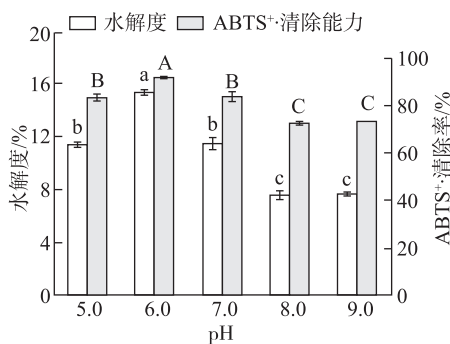


图 4 不同 pH 对 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力影响

pH 9.0 时, 随着 pH 增大, MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 反而变小。故选择 pH 6.0 为最适 pH。适宜的环境 pH 是蛋白酶发挥最大活性的前提条件之一, 同时 pH 通过改变蛋白质的解离状态、溶解性来影响蛋白质的酶解^[24]。Hu 等^[25] 的研究表明, 风味蛋白酶在 pH 6.0~pH 7.5 时的活性较高。Xu 等^[19] 的研究发现, 在 pH 6.0~pH 7.0 时小米糠谷蛋白具有较好的溶解性。

2.2.4 酶解时间对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响

不同时间对 MBG-2H 的 ABTS⁺·清除能力与 DH 的影响见图 5。在 pH 7.0、酶解温度 55 °C、酶用量 2.0 g/100 g 的条件下, 当酶解时间为 0.5~2.0 h 时, MBG-2H 的水解度随时间的延长而增大。水解度的增大意味着更多的活性多肽从小米糠谷蛋白-2 中被释放出来, 使 MBG-2H 对 ABTS⁺·的清除能力也相应升高。当酶解时间为 4~6 h 时, MBG-2H 的水解度随时间的延长并未有显著变化, 表明此时小米糠谷蛋白-2 的水解已经基本结束, 由于没有更多的多肽释放出来, 因此 MBG-2H 对 ABTS⁺·的清除能力也没有发生显著变化。在蛋白质的酶解反应中, 不同蛋白酶有选择地对多肽链位点进行水解, 因此, 每一种蛋白酶对蛋白质的水解度影响是有限的, 这一限制无法通过延长酶解时间来增加水解率^[4,20]。因此, 选择 2 h 为本实验风味蛋白酶酶解小米糠谷蛋白-2 的最佳时间。

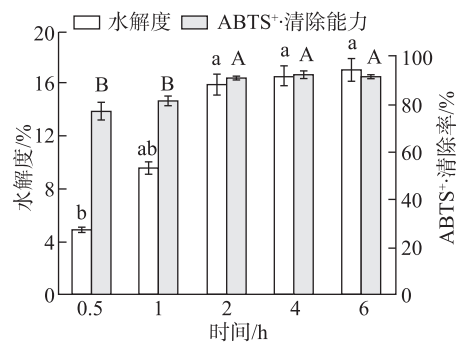


图 5 酶解时间对 MBG-2H 的水解度与 ABTS⁺·清除能力的影响

2.3 小米糠谷蛋白-2 酶解工艺参数的优化

单因素实验之后, 选取温度、pH、酶用量和酶解时间为因变量, 设计 L₉(3⁴) 正交实验, 对小米糠谷蛋白-2 的酶解工艺进行优化, 实验结果与方差分析分别见表 3 和表 4。

表3 小米糠谷蛋白-2 酶解工艺的正交实验结果

实验号	A pH	B 温度	C 酶用量	D 时间	ABTS ⁺ ·清除率/%	水解度/%
1	1	1	1	1	61.14	6.28
2	1	2	2	2	77.21	7.90
3	1	3	3	3	89.36	14.74
4	2	1	2	3	70.53	4.78
5	2	2	3	1	91.25	16.74
6	2	3	1	2	77.59	8.38
7	3	1	3	2	82.14	10.72
8	3	2	1	3	69.33	6.41
9	3	3	2	1	83.01	12.73
K_{1j}	2.28	2.14	2.08	2.35	701.56	88.68
K_{2j}	2.39	2.38	2.31	2.37		
K_{3j}	2.34	2.50	2.63	2.29		
K_{1j}	5.18	4.57	4.33	5.54		
K_{2j}	5.73	5.65	5.32	5.61		
K_{3j}	5.50	6.23	6.90	5.25		
R_j	0.12	0.36	0.55	0.08		

表4 小米糠谷蛋白-2 酶解工艺的正交实验的方差分析

因素	自由度	平方和	方差	F	F*
A	2	0.002 285 562	0.001 142 781	2.053 670 839	$F_{0.05} = 6.94$
B	2	0.022 555 242	0.011 277 621	20.266 804 710*	
C	2	0.050 331 469	0.025 165 734	45.224 876 800*	
D	2	0.001 112 916	0.000 556 458	0.486 932 950	
	8	0.076 285 189			

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

从表3中极差(R值)可以看出,各因素对小米糠谷蛋白-2酶解效果的影响次序为:C(酶用量) > B(pH) > A(温度) > D(时间)。方差分析进一步表明,在4个因素中,只有C(酶用量)和B(pH)对小米糠谷蛋白-2酶解效果的影响均达到显著水平。根据“达到显著性差异的因素选取最大水平,而未达到显著性差异的水平结合实际情况考虑”的原则,小米糠谷蛋白-2的酶解工艺的最佳方案为 $A_2B_3C_3D_2$,即酶解温度为55℃、pH为6.0、酶用量3.5 g/100 g和酶解时间2 h。在最佳工艺条件下进行验证实验,结果表明,MBG-2H的ABTS⁺·清除率为93.14%,水解度为15.96%,符合本实验预期值。

2.4 MBG-2H的抗氧化能力分析

采用最优酶解工艺所制备的小米糠谷蛋白-2酶解产物(MBG-2H),首先用于抗氧化性分析,包括自由基(ABTS⁺·、DPPH·、超氧根离子和·OH)清除能力和还原力,结果见表5。

MBG-2H的ABTS⁺·清除率较高,显著高于常用抗氧化剂BHT($P < 0.05$)。与BHT相比,MBG-2H表现出较低的·OH清除能力和较高的超氧根离子自由基清除能力($P < 0.05$)。然而,MBG-2H对

DPPH·的清除能力较差,可能是因为其中醇溶体系中的溶解度较低导致的。BHT是食品工业,尤其是油脂工业广泛使用的抗氧化剂,在清除自由基、延缓食品氧化方面效果显著^[10,27]。本实验结果表明,MBG-2H较高的抗氧化性,因此,对其进行进一步的分离纯化。

2.5 MBG-2H的Sephadex G-25分离

在Sephadex G-25凝胶色谱中,分子量较大的多肽,由于洗脱路程短而被较早洗出;而小分子肽由于洗脱路程长而被最后洗出,从而使多肽得到有效分离^[21]。MBG-2H的Sephadex G-25分离效果见图6。

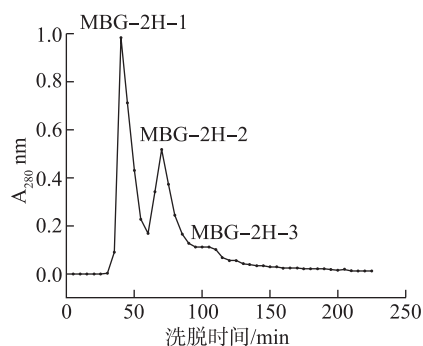


图6 MBG-2H的Sephadex G-25分离效果

由图6可见,MBG-2H经过Sephadex G-25分离后共出现3个峰,分别为MBG-2H-1、MBG-2H-2和MBG-2H-3。分别测定这3个多肽组分的抗氧化性,结果如表5所示,MBG-2H-3具有最高的还原力,对ABTS⁺·和超氧根离子自由基的清除能力均最高,这些抗氧化性也显著高于BHT($P < 0.05$)。然而,MBG-2H-3未表现出·OH清除能力。与之相反,MBG-2H-1表现出较高的·OH清除能力。可能是因为经过Sephadex G-25分离后,对·OH清除能力较强的肽段被分离到MBG-2H-1中。此外,这3种多肽组分的DPPH·清除能力都较差,可能是由于它们在醇溶液体系中溶解性较差所导致,而DPPH可溶解于无水乙醇中。研究表明,氨基酸的组成决定多肽的抗氧化性,而氨基酸组成决定多肽的分子量、极性、表面疏水性,这些性质又决定了多肽与油脂、糖类等物质的结合能力和清除自由基的能力^[11,19]。其中,分子量越小,多肽的抗氧化性越高。目前所报道的抗氧化多肽,多为小于3 ku的低分子量肽^[4,26]。在凝胶色谱分离中,最后被洗出的MBG-2H-3的分子量最小,表现出最强的抗氧化性。因此,3个组分中,MBG-2H-3的抗氧化性最强,将其用于进一步分离纯化。

表 5 MBG-2H 及其 G-25 凝胶色谱所分离组分的抗氧化能力

抗氧化性	MBG-2H	MBG-2H-1	MBG-2H-2	MBG-2H-3	BHT
ABTS ⁺ ·清除能力/%	93.14 ± 2.75a	14.35 ± 1.66c	40.84 ± 2.37b	96.60 ± 5.54a	63.67 ± 3.46b
DPPH·清除能力/%	6.67 ± 0.33b	5.32 ± 1.27b	0.52 ± 0.04c	7.01 ± 0.27a	75.89 ± 1.99a
超氧根离子自由基清除能力/%	29.99 ± 2.73b	11.62 ± 0.12c	13.95 ± 0.21c	61.67 ± 3.26a	4.79 ± 1.05d
还原力	0.19 ± 0.01c	0.18 ± 0.12c	0.23 ± 0.01b	0.37 ± 0.01a	0.25 ± 0.02b
·OH清除能力/%	48.39 ± 1.89b	50.00 ± 0.09b	13.95 ± 0.21c	0.00 ± 0.00d	98.06 ± 4.23a

注: BHT/100 μg/mL 为对照; 表中同一行不同小写字母代表显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.6 MBG-2H-3 的 Sephadex G-15 分离纯化

由图 7 可见, MBG-2H-3 经 Sephadex G-15 分离后共得到 2 个组分: MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b。分别测定二者的抗氧化性, 结果如表 6 所示。

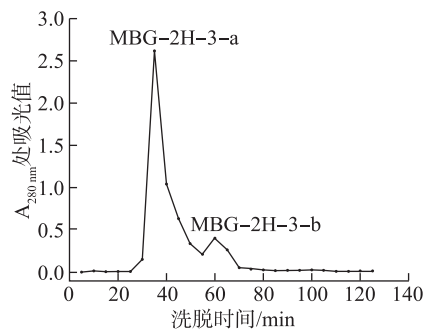


图 7 MBG-2H-3 的 Sephadex G-15 分离图

表 6 MBG-2H-3-a and MBG-2H-3-b 抗氧化能力对照表

抗氧化性	MBG-2H-3-a	MBG-2H-3-b	BHT
ABTS ⁺ ·清除能力/%	97.60 ± 4.11a	72.14 ± 1.97b	63.67 ± 3.46b
DPPH·清除能力/%	9.21 ± 3.46b	0.31b ± 3.46c	75.89 ± 1.99a
超氧根离子自由基清除能力/%	68.67 ± 3.46a	35.75b ± 3.46b	4.79 ± 1.05c
还原力	0.42 ± 3.46a	0.43 ± 3.46a	0.25 ± 0.02b
·OH清除能力/%	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	98.06 ± 4.23a

注: 表中同一行不同小写字母代表显著性差异 ($P < 0.05$)。

MBG-2H-3-a 对 ABTS⁺·与超氧根离子自由基的清除能力均高于 MBG-2H-3-b 和 BHT ($P < 0.05$)。而 MBG-2H-3-a 与 MBG-2H-3-b 的还原力均显著高于 BHT ($P < 0.05$)。还原力是指物质提供质子的能力, 即淬灭氧对电子自由基的能力^[26]。此外, MBG-2H-3-a 与 MBG-2H-3-b 对 DPPH·和·OH 的清除能力均较弱, 这可能与氨基酸组成有关。结果表明, MBG-2H-3-a 的抗氧化性最强; 而 MBG-2H-3-b 具有较强的还原力, 二者均具有开发为天然抗氧化剂的潜力。大量研究还表明, 疏水性氨基酸利于多肽与油脂的结合, 在多肽抑制油脂氧化中具有重要作用; 而某些多肽中的半胱氨酸和甲硫氨酸, 能对油脂氧化反应中的金属

离子催化剂进行有效整合, 从而提高多肽的抗氧化性^[16,28]。Xu 等^[19]的研究表明, 小米糠谷蛋白-2 中含有较多的极性氨基酸, 尤其是谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸的含量较高, 但缺乏含硫氨基酸和疏水性氨基酸, 这可能是导致其 DPPH·和·OH 清除能力均较弱的原因。

2.7 氨基酸序列的鉴定

采用 ESI-LC-MS/MS 对 MBG-2H-3-a 与 MBG-2H-3-b 所含多肽序列进行鉴定, 结果如表 7 所示。

目前, 抗氧化肽绝大多数是分子质量小于 3 ku 的寡肽, 所含氨基酸残基数量不超过 12 个^[7,16]。也有研究发现大于 13 个氨基酸残基的抗氧化肽, 然而, 由于分子质量较大, 在人体胃肠道中的稳定性很

表 7 MBG-2H-3-a and MBG-2H-3-b 中多肽序列的鉴定与抗氧化性预测

多肽组分	氨基酸序列	分子质量/u	预测值	预测抗氧化性 ^a
MBG-2H-3-a	HFSSL	649.34	0.552 572	Antioxidative
	DTHELR	725.38	0.116 823	
	EDKLER	788.40	0.068 017	
	ACTIVSFANR	1 034.55	0.244 013	
MBG-2H-3-b	SWPFGESR	964.44	0.777 456	Antioxidative
	RPFNLFHK	1 057.58	0.790 764	Antioxidative
	GREEEEGR	960.43	0.082 907	
	DWLDGR	702.38	0.763 480	Antioxidative
	HIETR	612.36	0.085 058	
	DWIETR	768.46	0.335 239	
	QFEEAGR	803.46	0.236 076	
	ENILR	643.36	0.156 338	
	ELQER	703.38	0.053 956	
	IKQNGDPR	1 039.58	0.270 710	
	QNIGDPR	798.40	0.457 662	Antioxidative
EIDVFNPR	973.51	0.431 747	Antioxidative	
FADYNPR	817.41	0.758 772	Antioxidative	
THEIDR	648.40	0.078 826		
DPILR	610.45	0.598 392	Antioxidative	
ITTLNSEK	904.49	0.037 460		

注: ^a 活性预测来源于数据库 Peptide Ranker server (<http://distill-deep.ucd.ie/PeptideRanker/>), 抗氧化肽的阈值为 0.4。

差;而且,大分子质量的多肽无法被小肠上皮细胞吸收,因此,有效的食源性抗氧化肽分子质量较小。本实验主要鉴定和分析出了 MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b 中含 2~12 个氨基酸参加的多肽序列。可以看出,MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b 分别含 8 个和 12 个小分子肽。这些小分子肽含有 5~10 个氨基酸残基,分子质量分布在 610.45~1 057.58 u 之间,大部分多肽含有谷氨酸(E)、精氨酸(R)、天冬氨酸(D)和天冬酰胺(N),但这些寡肽中含硫氨基酸的含量较少,这与前人的报道一致^[16,28,29]。采用 *In silico* 技术结合 Peptide Ranker server (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 数据库对鉴定出的 20 条多肽进行活性预测,结果表明,8 条寡肽 HFSSL、SWPFGESR、RPFNLFHK、DWLDGR、QNIGDPR、EIDVFNPR、FADYNPR 和 DPILR 的预测值超过 0.4 表明具有潜在的抗氧化性^[20]。此外,这 8 条抗氧化肽都含有芳香族氨基酸(F、Y 或 W)、支链氨基酸(L、V 和 I)、脯氨酸(P)和精氨酸(R)。其中,芳香族氨基酸尤其是酪氨酸和色氨酸具有较强的给出质子能力,因此有较强的抗氧化性^[19];精氨酸所含胍基和脯氨酸所含亚氨基都可以快速猝灭孤对电子^[30],而支链氨基酸属于疏水性氨基酸,可以显著抑制油脂自氧化反应^[30]。因此,这些多肽的氨基酸组成特点是 MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b 具有较强抗氧化性的主要原因。然而,这些多肽的抗氧化性还需要进一步研究。

2.8 抗氧化性验证

采用固相合成法对从 MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b 中鉴定的活性寡肽 HFSSL 等进行合成,合成后的寡肽进行抗氧化性验证。

由表 8 中可见,合成的 8 条寡肽(HFSSL、SWPFGESR、RPFNLFHK、DWLDGR、QNIGDPR、EIDVFN-

PR、FADYNPR 和 DPILR)均显示出较好的抗氧化性。HFSSL 等 8 条寡肽的亚铁离子络合能力均高于 BHT ($P < 0.05$),其中 DWLDGR 和 EIDVFNPR 的亚铁离子络合能力最高,这是因为这 3 条寡肽中富含谷氨酸(Glu, E)和天冬氨酸(Asp, D)。天冬氨酸和谷氨酸为酸性氨基酸,含有 γ -羧基,与亚铁离子具有很强的螯合能力^[7],因此 DWLDGR 和 EIDVFNPR 表现出很高的亚铁离子络合能力。除 DPILR 外,其余 7 条寡肽对羟基自由基的清除能力均显著高于 BHT ($P < 0.05$);而 SWPFGESR、RPFNLFHK、QNIGDPR、EIDVFNPR 和 FADYNPR 对 $ABTS^+ \cdot$ 的清除能力均显著高于 BHT ($P < 0.05$)。此外,SWPFGESR、QNIGDPR、FADYNPR 和 DWLDGR 还表现出较高的超氧根离子自由基清除能力。这是因为 SWPFGESR、FADYNPR 和 EIDVFNPR 等寡肽富含苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)和脯氨酸(P)。苯丙氨酸和酪氨酸的酚羟基具有良好的抗氧化性,可以快速猝灭自由基,而丝氨酸的侧链羟基,也是良好的自由基猝灭剂^[15,29];精氨酸所含胍基和脯氨酸所含亚氨基都可以快速猝灭孤对电子^[30],因此,这些寡肽表现出良好的羟基自由基和 $ABTS^+ \cdot$ 清除能力。RPFNLFHK、HFSSL 和 FADYNPR 表现出较强的还原力,这与它们所含组氨酸(H)、苯丙氨酸(F)和丝氨酸(S)有关。组氨酸的咪唑基、苯丙氨酸的酚羟基和丝氨酸的侧链羟基都具有很强的提供质子能力^[17],因此 RPFNLFHK、HFSSL 和 FADYNPR 具有很强的还原力。从 MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b 中鉴定出的 8 条寡肽均有较好的抗氧化性,其中,RPFNLFHK、FADYNPR、SWPFGESR 和 EIDVFNPR 的自由基清除能力、亚铁络合能力和还原力均很高,可以开发为抗氧化多肽。然而,这些多肽的体内抗氧化性还需要进一步研究。

表 8 MBG-2H-3-a 和 MBG-2H-3-b 中活性寡肽的抗氧化性验证

氨基酸序列	ABTS ⁺ · 清除率/%	亚铁离子 络合率/%	羟基自由基 清除率/%	超氧根离子 自由基清除率/%	还原力
HFSSL	45.12 ± 1.14f	82.12 ± 1.37bc	89.76 ± 1.55b	0.00 ± 0.00f	0.345 ± 0.017c
SWPFGESR	75.18 ± 1.56cd	80.77 ± 2.87c	92.55 ± 0.62b	74.67 ± 2.43ab	0.198 ± 0.022f
RPFNLFHK	92.48 ± 3.37a	51.05 ± 0.12f	99.47 ± 5.55a	19.22 ± 0.27e	0.426 ± 0.011a
DWLDGR	37.25 ± 2.00g	93.48 ± 0.72a	97.62 ± 3.66a	70.00 ± 1.79b	0.238 ± 0.034e
QNIGDPR	79.34 ± 4.01c	71.85 ± 3.36d	95.00 ± 2.00ab	81.35 ± 3.25a	0.149 ± 0.025g
EIDVFNPR	86.54 ± 3.19b	90.05 ± 2.14a	92.79 ± 4.24b	46.09 ± 2.54c	0.285 ± 0.017d
FADYNPR	88.46 ± 1.17b	60.44 ± 3.68e	99.67 ± 0.09a	79.05 ± 3.45a	0.389 ± 0.029b
DPILR	58.46 ± 0.32e	85.76 ± 4.04b	79.54 ± 3.36c	0.00 ± 0.00f	0.276 ± 0.011d
BHT	65.04 ± 2.76d	40.33 ± 1.67g	77.31 ± 0.85c	34.55 ± 0.12d	0.353 ± 0.023c

注:表中寡肽与 BHT 的测试质量浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;表中同一列不同小写字母代表显著性差异($P < 0.05$)。

3 结论

本研究通过单因素结合正交实验,确定酶解小米糠谷蛋白-2的最佳蛋白酶为风味蛋白酶,而最佳酶解工艺条件为55℃、pH 6.0、酶用量3.5 g/100 g和酶解2 h。在此条件,MBG-2H的ABTS⁺·清除率为93.14%,水解度为15.96%。MBG-2H依次经过Sephadex G-25和Sephadex G-15凝胶色谱分离后,得到MBG-2H-3-a和MBG-2H-3-b这两个多肽组分,其中MBG-2H-3-a对ABTS⁺·与超氧根离子自由基的清除能力高于MBG-2H-3-b和BHT;而MBG-2H-3-b具有较强的还原力。同时分别从MBG-2H-3-a和MBG-2H-3-b中鉴定出8、12个寡肽,这些寡肽由5~10个氨基酸残基构成,分子质量分布在610.45~1 057.58 u之间。HFSSL等8条多肽具有较高的羟基自由基清除能力、亚铁离子络合能力、ABTS⁺·清除能力和还原力;其中RPFNLFHK、FADYNPR、SWPFGESR和EID-VFNPR的抗氧化性最高。小米糠谷蛋白-2的多肽组分具有开发为新型天然抗氧化肽的潜力。

参考文献

- [1]尹国友,王梦迪,刘招军,等. 韭菜多酚提取工艺优化及抗氧化性分析[J]. 食品科技, 2024, 49(2):211-219
Yin G, Wang M, Liu Z, et al. Optimization of extraction process of polyphenols from leek and analysis of antioxidant activity[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(2): 211-219
- [2]刘芳芳,张晶. 紫苏籽抗氧化肽对高脂饮食小鼠脂代谢及氧化应激的影响[J]. 食品科技, 2023, 48(10):210-218
Liu F, Zhang J. Effects of *Perilla frutescens* seed antioxidant peptide on lipid metabolism and oxidative stress in mice fed high-fat diet[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(10):210-218
- [3]肖争红,杜宣利,唐佳芮,等. 小米糠开发利用的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2017, 24(2):15-18
Xiao Z, Du X, Tang J, et al. Research progress on development and utilization of millet bran[J]. Cereal & Food Industry, 2017, 24(2):15-18
- [4]俞明伟,张名位,孙远明,等. 米糠蛋白及其活性肽的研究与利用进展[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(5):154-159
Yu M, Zhang M, Sun Y, et al. Research and application advance of rice bran protein and active peptides[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(5): 154-159
- [5]Zhu Y, He C H, Fan H X, et al. Modification of foxtail millet (*Setaria italica*) bran dietary fiber by xylanase-catalyzed hydrolysis improves its cholesterol-binding capacity[J]. LWT - Food science and Technology, 2019, 101:463-468
- [6]Yousaf L, Hou D, Liaqat H, et al. Millet: a review of its nutritional and functional changes during processing[J]. Food Research International, 2021, 142:110197
- [7]Zheng X, Ma J, Zhang A, et al. Bioactive peptides from millet bran glutelin-2: identification, virtual screening, inhibitory mechanism towards angiotensin-I- Converting enzyme, stability, antihypertension, and ferrous-transmembrane absorption[J]. Food Bioscience, 2025, 63:105595
- [8]Gu H, Gao J, Shen Q, et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of millet protein peptides and the related mechanisms revealed by molecular docking[J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 138:110587
- [9]马骏,石晓丹,王家林. 酶解法制备啤酒糟抗氧化肽工艺优化[J]. 食品科技, 2021, 46(9):73-78
Ma J, Shi X, Wang J. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of antioxidant peptide from the brewer's spent grains [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(9):73-78
- [10]高颖,吴海霞,孙元琳,等. 小米糠蛋白提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(1): 60-66
Gao Y, Wu H, Sun Y, et al. Study on the optimization of extraction process of millet bran protein and its antioxidant activity[J]. Cereals & Oils, 2025, 38(1):60-66
- [11]张佳丽,刘敬科,赵巍,等. 小米糠多肽制备及DPPH·清除能力的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2019(4): 23-27
Zhang J, Liu J, Zhao W, et al. Preparation and DPPH radical scavenging capacity of millet bran polypeptides[J]. Cereal & Feed Industry, 2019(4):23-27
- [12]王贤. 小米糠多肽-亚铁螯合物的制备、结构表征与稳定性研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2021: 30
Wang X. Study on preparation, structure characterization and stability of millet bran peptide-iron chelate[D]. Linfen: Shanxi Normal University, 2021: 30
- [13]李皖光,汪桃花,王新文,等. 4种大米蛋白水解度测定方法比较[J]. 粮食科技与经济, 2017, 42(5):35-37
Li W, Wang T, Wang X, et al. The comparison of four methods in testing degree of hydrolysis[J]. Food Science and Technology and Economy, 2017, 42(5):35-37
- [14]韦涛,周启静,陆兆新,等. 纳豆芽孢杆菌固态发酵小米糠产抗氧化肽工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(10):66-73
Wei T, Zhou Q, Lu Z, et al. Optimization of solid state fermentation conditions for production of antioxidant peptides from millet bran by *Bacillus natto*[J]. Food Science, 2017, 38(10):66-73

- [15]季晓彤,孙培冬. 桃仁多肽的分离及其抗氧化性能研究[J]. 中国油脂, 2018,43(7):77-81
Ji X, Sun P. Isolation of peach kernel polypeptide and its antioxidant capacities[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(7):77-81
- [16]刘友明,赵思明,熊善柏,等. 米糠的蛋白酶水解提取物抗氧化活性及分子量分布研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(2):1-4
Liu Y, Zhao S, Xiong S, et al. Anti-oxidative activity and molecular weight distribution of extracts from hydrolysates of rice bran with proteases[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2006, 21(2):1-4
- [17]刘梁,孙维矿,赵玲,等. 正交设计优化米糠抗氧化肽的制备工艺[J]. 2015(2):98-101
Liu L, Sun W, Zhao L, et al. Optimization of preparation technology of antioxidant peptides from rice bran by orthogonal design[J]. Food Research and Development, 2015(2):98-101
- [18]靳菊情,丁东宁,边晓丽,等. 银杏叶多糖的化学及清除羟自由基作用[J]. 西安医科大学学报, 2000, 21(5):417-419
Jin J, Ding D, Bian X, et al. Chemistry of *Ginkgo biloba* polysaccharide and its scavenging effect on hydroxyl radical[J]. Journal of Xi'an Medical University, 2000, 21(5):417-419
- [19]Xu B, Wang X, Zheng Y, et al. Novel antioxidant peptides identified in millet bran glutelin-2 hydrolysates: purification, *in silico* characterization and security prediction, and stability profiles under different food processing conditions[J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 164:113634
- [20]Zheng Y, Guo M, Cheng C, et al. Structural and physico-chemical characteristics, stability, toxicity and antioxidant activity of peptide-zinc chelate from coconut cake globulin hydrolysates[J]. LWT - Food Science and Technology, 2023, 173:114367
- [21]Li Y, Yang Y, Feng C, et al. Identification, *in silico* screening, inhibition mechanisms to Keap1 and angiotensin-I-converting enzyme, and ferrous-transport capacity of a multifunctional octapeptide from *Camellia oleifera* globulin[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2025, 80(2):109
- [22]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
- [23]和继刚,杨庆华,李文道,等. 藜麦抗氧化肽制备工艺研究[J]. 2019(14):230-232
He J, Yang Q, Li W, et al. Study on preparation technology of quinoa antioxidant peptide[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2019(14):230-232
- [24]Li Y, Shi P, Zheng Y, et al. Millet bran protein hydrolysates derived peptides-zinc chelate: structural characterization, security prediction *in silico*, zinc transport capacity and stability against different food processing conditions[J]. Journal of Food Science, 2023, 88(1):477-490
- [25]Hu S, Yuan J, Gao J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion of germinated and heat-treated foxtail millet (*Setaria italica*) proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(35):9415-9426
- [26]Wei G, Zhao Q, Wang D, et al. Novel ACE inhibitory, antioxidant and α -glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubing cheese through peptidomic and molecular docking[J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 159:113196
- [27]胡莉丽. 麦胚清蛋白的酶法水解及其产物的抗氧化性研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2017:33
Hu L. Proteolysis of wheat germ albumin and antioxidant activity of the hydrolysate[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017:33
- [28]Villanueva A, Rivero-Pino F, Martin M E, et al. Identification of the bioavailable peptidome of *Chia* protein hydrolysate and the *in silico* evaluation of its antioxidant and ACE inhibitory potential[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(6):3189-3199
- [29]Zhang Y, He S D, Bonneil É, et al. Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin: *in vitro* activity, de novo sequencing, and *in silico* docking for *in vivo* function prediction[J]. Food Chemistry, 2020, 306:125581
- [30]Wang Y, Sun Y, Wang X, et al. Novel antioxidant peptides from Yak bones collagen enhanced the capacities of anti-aging and antioxidant in *Caenorhabditis elegans*[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 89:104933.