

TGase 催化的壳寡糖糖基化修饰玉米肽的抗氧化活性

童 玲, 王晓杰

(齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 为进一步提高玉米肽的抗氧化活性, 以玉米醇溶蛋白源活性肽为原料, 利用谷氨酰胺转氨酶 (TGase) 催化壳寡糖 (分子质量 1 500 Da) 与玉米肽共价结合制备玉米糖肽, 研究壳寡糖的糖基化修饰对玉米肽抗氧化活性的影响, 并对玉米糖肽进行体外模拟胃肠消化, 表征玉米糖肽在体内发挥抗氧化活性的潜力。结果表明: TGase 催化的壳寡糖共价结合使玉米肽的肽含量和体外消化率显著提高; 在质量浓度为 2.0 mg/mL 时, TGase 催化壳寡糖糖基化修饰使玉米肽的 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基清除率, Fe^{2+} 螯合率和还原力提高, 体外消化使玉米糖肽的 DPPH 自由基、羟自由基清除率和还原力提高, 而 Fe^{2+} 螯合率和超氧阴离子自由基清除率降低。综上, TGase 途径的壳寡糖糖基化反应使玉米肽的抗氧化活性显著提高, 且体外消化可以促进玉米糖肽抗氧化活性的释放 (Fe^{2+} 螯合能力和超氧阴离子自由基清除能力除外)。

关键词: 玉米肽; 壳寡糖; 玉米糖肽; 体外消化; 抗氧化活性

中图分类号: TQ936.1; TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-7969(2024)09-0043-07

Antioxidant activity of zein peptides modified by TGase – catalyzed chitosan oligosaccharides glycosylation

TONG Ling, WANG Xiaojie

(College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: To further enhance the antioxidant activity of the zein peptides, the active peptides from zein have been used as raw material, and then zein glycopeptides were prepared by transglutaminase (TGase) – induced chitosan oligosaccharides (molecular weight 1 500 Da) covalent binding onto zein peptides. The effect of chitosan oligosaccharides modification on the antioxidant activities of zein peptides was studied. In addition, zein glycopeptides were simulated by gastrointestinal digestion *in vitro* to characterize its antioxidant potential *in vivo*. The results showed that the covalent binding of chitosan oligosaccharides catalyzed by TGase significantly increased peptide content and *in vitro* digestibility of zein peptides. At the mass concentration of 2.0 mg/mL, the DPPH, hydroxyl and superoxide anion radicals scavenging rates, Fe^{2+} – chelating capacity and reducing capacity of TGase modified zein peptides increased, also the DPPH, hydroxyl radicals scavenging rates and reducing capacity of zein glycopeptides after *in vitro* digestion increased, while the Fe^{2+} – chelating capacity and the superoxide anion radical scavenging rate decreased. In conclusion, TGase – mediated chitosan glycosylation significantly improves the antioxidant activities of zein peptides, and *in vitro* digestion can promote the release of the antioxidant activities of zein glycopeptides (except Fe^{2+} – chelating capacity and superoxide anion radical scavenging ability).

Key words: zein peptides; chitosan oligosaccharides; zein glycopeptides; *in vitro* digestion; antioxidant activity

收稿日期: 2023-05-06; 修回日期: 2024-05-23

基金项目: 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室开放课题 (SPKF202005)

作者简介: 童 玲 (1997), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂与植物蛋白工程 (E-mail) 919719635@qq.com。

通信作者: 王晓杰, 教授 (E-mail) wangxiaojie80@163.com。

机体内的活性氧自由基具有免疫和信号传导等功能, 但过量自由基的产生大都与衰老、癌症或其他

疾病有关^[1]。抗氧化可以有效克服过量自由基所带来的健康危害,已成为保健品、化妆品企业的主要开发方向之一,同样也是市场的一项重要功能性诉求。天然抗氧化剂,如抗氧化活性肽,具有安全性高、活性高、易吸收、副作用小或无副作用、分布广等特点,日益受到人们的关注,具有广阔的发展前景。

玉米肽是以玉米蛋白为原料,主要通过酶解法或微生物发酵法制备得到的一类具有多种生物活性(如抗氧化、促进乙醇代谢、抗炎、抗癌等)的低分子量产物。体外研究发现,玉米肽具有良好的还原力、自由基清除活性以及金属离子螯合能力^[2-4],能够增强细胞内抗氧化酶(如过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶等)活力,从而减轻细胞的氧化应激损伤^[5-6];玉米肽在动物体内也具有抗氧化活性,能够抑制肝脏、心、脑组织的脂质过氧化反应^[7]。因此,玉米肽是一种具有开发潜力的天然抗氧化剂。但是,与常用的抗氧化剂如维生素C相比,玉米肽的抗氧化效果相对较弱,使其在食品工业中的应用受到了限制。

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TGase, EC 2.3.2.13)全名蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰胺转移酶,其能催化蛋白质与胺化的糖或含伯胺基团的糖共价交联。研究表明, TGase 途径的糖基化产物既具备蛋白质的大分子特性,又具备多糖类物质的亲水特性,在蛋白质/多肽改性中显示出良好的应用潜力^[8-9]。王晓杰等^[10]利用 TGase 催化 *D*-氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽,玉米肽的抗氧化活性得到显著提高,在质量浓度 1.0~2.0 mg/mL 内,糖基化产物的还原力和 Fe^{2+} 螯合率显著高于同质量浓度的谷胱甘肽和玉米肽。宋莲军等^[11]利用 TGase 催化氨基葡萄糖对大豆分离蛋白酶解物进行糖基化修饰,与改性前相比,修饰产物的抗氧化和抗菌能力均得到显著提高。壳寡糖是一种部分或完全去乙酰化的几丁质,已被证明具有抗氧化活性,其 C-2 位的游离氨基、C-3 位和 C-6 位的羟基基团能够提供活性氢原子与自由基反应,起到清除自由基的作用^[12]。为了进一步提高玉米肽的抗氧化活性,本文先利用碱性蛋白酶 Alcalase 酶解玉米醇溶蛋白制备玉米肽,再以 TGase 为催化剂,壳寡糖为酰基受体对玉米肽进行糖基化修饰制备玉米糖肽。采用体外化学法研究 TGase 糖基化修饰对玉米肽、体外模拟胃肠消化对玉米糖肽抗氧化活性的影响,为抗氧化活性玉米糖肽产品的研发奠定一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

玉米醇溶蛋白,色谱纯,美国 Sigma 公司;壳寡糖(平均分子量 1 500 Da,去乙酰度 90%),青岛博智汇力生物科技有限公司;碱性蛋白酶 Alcalase (5.72×10^5 U/mL)、2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH),上海源叶生物有限公司;TGase(1 000 U/g),一鸣生物股份(泰兴)有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、菲洛嗪、硫代巴比妥酸、*L*-谷胱甘肽(GSH),分析纯,上海生工生物有限公司;2-脱氧-D-赤戊糖,分析纯,北京 Solarbio 生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

ZNCL-GS 型智能磁力搅拌器,上海凌科实业发展有限公司;BM515 型超低温冷冻储存冰箱、Cr22N 型超速冷冻离心机,上海 Techcomp 有限公司;LD-53 型冷冻干燥机,美国米尔洛克(Millrock)公司;NDA701 型杜马斯燃烧定氮分析仪,意大利威尔普(Velp)公司;UV-2600 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 玉米糖肽的制备

参照本课题组前期确定的玉米肽制备方法及壳寡糖酶法糖基化修饰玉米醇溶蛋白的工艺条件制备玉米糖肽^[13-14]。配制质量浓度 3 g/100 mL 的玉米醇溶蛋白悬浮液,进行酶解反应,反应条件为碱性蛋白酶 Alcalase 0.09 g、温度 60℃、时间 2 h、pH 8.5。酶解反应停止后,100℃水浴 15 min 灭酶,冷却至室温,再进行酶法糖基化反应,反应条件为壳寡糖 2.42 g(玉米醇溶蛋白的酰基供体与壳寡糖酰基受体的物质的量比为 1:3)、TGase 0.18 g(加酶量为 60 U/g,以蛋白质量计)、pH 7.7、温度 37℃、时间 8 h。糖基化反应停止后,85℃水浴 5 min 灭酶,冷却至室温后,4 000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,取上清液,真空冷冻干燥即得玉米糖肽,经测定得率为 $(89.97 \pm 0.39)\%$ 。

1.2.2 玉米糖肽中肽含量的测定

参考文献[14-15]采用三氯乙酸沉淀法进行肽含量测定。10 mL 50 mg/mL 的玉米肽和玉米糖肽溶液分别与 10% 三氯乙酸等体积混合,室温振荡反应 1 h,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用凯氏定氮法测定蛋白质含量^[16]。按公式(1)计算肽含量(*c*)。

$$c = \frac{P_1}{P_{\text{总}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: P_1 为上清液中蛋白质含量, mg; $P_{\text{总}}$ 为总蛋白质含量, mg。

1.2.3 玉米糖肽的体外消化

一步水解(胃蛋白酶水解): 分别取 10 mL 50 mg/mL 的玉米肽和玉米糖肽溶液, 调节 pH 至 2.0, 添加 10 mg 胃蛋白酶, 37 °C 水解 2 h。

二步水解(胃蛋白酶-胰蛋白酶水解): 将一步水解液 pH 调至 8.0, 添加 30 mg 胰蛋白酶, 37 °C 水解 1 h。

分别取一定量一、二步水解结束后的消化液于 90 °C 水浴 5 min 灭酶, 冷却至室温, 分别加入 10 mL 10% 三氯乙酸, 室温水浴振荡 1 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用凯氏定氮法测定可溶性蛋白质含量, 按公式(2)计算体外消化率(x)。

$$x = \frac{P_1}{P_{\text{总}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: P_1 为上清液中蛋白质含量, mg; $P_{\text{总}}$ 为总蛋白质含量, mg。

将玉米肽和玉米糖肽的二步水解液冷冻干燥, 得到玉米肽和玉米糖肽体外消化产物, 用于抗氧化活性的测定。

1.2.4 玉米糖肽及其体外消化产物抗氧化活性的测定

以 GSH 为阳性对照, 测定不同质量浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) 玉米肽、玉米糖肽及二者体外消化产物的抗氧化活性。

1.2.4.1 DPPH 自由基清除活性

利用 Jeong 等^[17]方法进行测定, 略作修改。测定 517 nm 下, 空白组(2 mL DPPH 自由基 + 2 mL 无水乙醇, A_0)、对照组(2 mL 样品 + 2 mL 无水乙醇, A_j)和样品组(2 mL 样品 + 2 mL DPPH 自由基, A_i)的吸光度, 按公式(3)计算 DPPH 自由基清除率(x)。

$$x = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.4.2 羟自由基清除活性

利用 Mauger 等^[18]方法进行测定。测定 532 nm 下, 空白组(0.5 mL 去离子水 + 0.9 mL 磷酸钠缓冲液 + 0.2 mL 2-脱氧-D-赤戊糖, A^-)、对照组(0.5 mL 去离子水 + 0.9 mL 磷酸钠缓冲液 + 0.2 mL 2-脱氧-D-赤戊糖 + 0.2 mL FeSO_4 -EDTA + 0.2 mL H_2O_2 , A^+)和样品组(0.5 mL 样品 + 0.9 mL 磷酸钠缓冲液 + 0.2 mL 2-脱氧-D-赤戊糖 + 0.2 mL FeSO_4 -EDTA + 0.2 mL H_2O_2 , $A_{\text{样}}$)的吸光度。按公式(4)计算羟自由基清除率(x)。

$$x = \frac{A^+ - A_{\text{样}}}{A^+ - A^-} \times 100\% \quad (4)$$

1.2.4.3 还原力

利用 Oyaizu^[19]方法进行测定, 略作修改。测定 700 nm 下, 样品溶液(2 mL 样品 + 2 mL 0.2 mol/L pH 6.6 磷酸盐缓冲液 + 2 mL 1% 铁氰化钾→50 °C 水浴 20 min→加入 2 mL 10% 三氯乙酸→4 000 r/min 离心 10 min→取 2 mL 上清液 + 2 mL 去离子水 + 0.4 mL 0.1% 三氯化铁→50 °C 水浴 10 min)的吸光度, 吸光度越高代表测定样品的还原力越强。以双蒸水代替样品溶液重复以上操作为空白。

1.2.4.4 Fe^{2+} 螯合能力

利用 Kong 等^[20]方法进行测定, 略作修改。取 1 mL 样品加入 2 mL 20 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸亚铁和 2 mL 0.5 mmol/L 菲洛嗪, 摇匀后室温反应 10 min, 于 563 nm 处测定吸光度($A_{\text{样}}$)。用 1 mL 去离子水代替样品, 于 563 nm 处测定吸光度($A_{\text{参}}$)。按公式(5)计算 Fe^{2+} 螯合率(x)。

$$x = \frac{A_{\text{参}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{参}}} \times 100\% \quad (5)$$

1.2.4.5 超氧阴离子自由基清除活性

利用邻苯三酚自氧化法进行超氧阴离子自由基清除率的测定^[21]。对照管中分别加入 10 μL 0.01 mol/L HCl 和 4.5 mL 0.05 mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 溶液; 空白管中加入 10 μL 4.5 mmol/L 的邻苯三酚溶液和 4.5 mL 0.05 mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 溶液, 摇匀反应 30 s, 设置波长为 325 nm, 模式为时间扫描, 检测时间为 4 min, 空白的自氧化速率控制在 (0.070 ± 0.002) A/min, 绘制吸光度随时间变化的曲线, 计算斜率(R_A)。样品管中加入 10 μL 待测样品溶液, 其他操作同空白管, 计算斜率(R_B)。按公式(6)计算超氧阴离子自由基清除率(x)。

$$x = \frac{R_A - R_B}{R_A} \times 100\% \quad (6)$$

1.2.5 数据处理

应用 SPSS Statistics 19.0 统计软件进行数据处理, 所有结果均以“平均值 ± 标准差”表示, 多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验, 各组间多重比较采用 LSD 法, $p < 0.05$ 认为具有显著差异。

2 结果与讨论

2.1 玉米糖肽的肽含量

玉米肽及玉米糖肽的肽含量如表 1 所示。

表 1 玉米肽及玉米糖肽的肽含量

样品	肽含量/%
玉米肽	75.55 ± 0.74 ^b
玉米糖肽	78.36 ± 0.18 ^a

注:不同小写字母表示差异极显著($p < 0.01$)

肽含量与生物利用度直接相关,与蛋白质相比,小分子质量的肽具有可以被胃肠道直接吸收的特点,从而发挥其抗氧化等诸多生物学功能^[22]。肽含量是评估食物营养价值重要指标之一。由表 1 可以看出,经 TGase 糖基化修饰后,玉米肽的肽含量增加了 2.81 百分点($p < 0.01$),说明 TGase 糖基化修饰可以增加小肽的含量。Martinez - Alvarenga 等^[23]研究了乳清分离蛋白和麦芽糊精的美拉德反应,发现与乳清分离蛋白相比,乳清分离蛋白-麦芽糊精缀合物的肽含量提高了 3%。壳寡糖的糖基化修饰使玉米肽的肽含量增加,一方面,可能是由于与玉米肽共价结合的壳寡糖所提供的羟基基团以及部分大分子质量玉米肽在 TGase 的作用下空间结构展开,进一步增加了羟基基团的数量,提高了肽的水溶性,进而使肽含量提高;另一方面,与玉米肽共价结合的壳寡糖分子产生的空间位阻效应阻碍了玉米糖肽分子的聚集,有助于玉米糖肽在水相中的溶解,进而导致肽含量增加。

2.2 玉米肽及玉米糖肽的体外消化率

玉米肽及玉米糖肽的体外消化率见表 2。

表 2 玉米肽及玉米糖肽的体外消化率 %

项目	玉米肽	玉米糖肽
一步消化	89.38 ± 0.39	89.53 ± 1.08 [*]
二步消化	91.27 ± 1.36	92.86 ± 0.85 [*]

注: * 表示同行相比有显著差异($p < 0.05$)

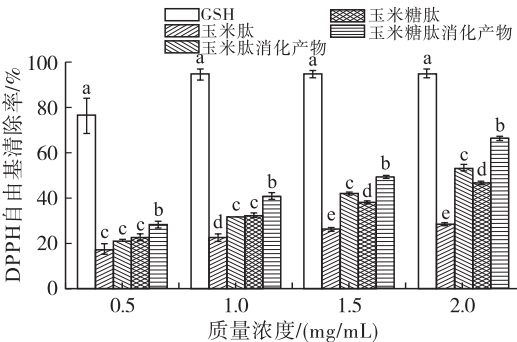
蛋白质消化率也是评估食物营养价值的重要指标之一。由表 2 可以看出,一步消化和二步消化玉米糖肽的体外消化率均高于玉米肽,可能是糖基的导入使大分子质量玉米肽的空间结构展开,胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶切位点增加,提高了玉米肽的体外消化率。付森^[24]利用壳寡糖修饰大豆分离蛋白,也发现糖基化修饰使大豆分离蛋白的体外消化能力提高,与本实验结果一致。

2.3 玉米肽、玉米糖肽及其体外消化产物的抗氧化活性

2.3.1 DPPH 自由基清除活性

GSH、体外消化前后玉米肽及玉米糖肽对

DPPH 自由基的清除能力如图 1 所示。



注:不同小写字母表示组内差异显著($p < 0.05$)。下同

图 1 DPPH 自由基清除能力

由图 1 可以看出,在实验浓度范围内,4 种样品的 DPPH 自由基清除率均随质量浓度的增加而增加,呈剂量-效应关系,且均显著低于同质量浓度的阳性对照($p < 0.05$)。与玉米肽相比,除质量浓度 0.5 mg/mL 外,玉米糖肽的 DPPH 自由基清除率均显著增加($p < 0.05$),经体外消化后,玉米肽(除 0.5 mg/mL 外)和玉米糖肽的 DPPH 自由基清除率也显著增加($p < 0.05$)。在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,消化后玉米糖肽的 DPPH 自由基清除率为 66.13%,比消化前高 19.38 百分点,消化后玉米肽的 DPPH 自由基清除率为 53.21%,比消化前高 24.95 百分点。

糖基化修饰可以显著提高玉米肽对 DPPH 自由基的清除能力。这是因为在 TGase 催化下,具有抗氧化活性的壳寡糖与玉米肽发生共价结合,使 DPPH 自由基形成稳定的 DPPH-H 而被清除。体外消化产物的 DPPH 自由基清除率显著提高,可能的原因是在体外消化过程中,胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶解作用使更多具有抗氧化活性的氨基酸残基暴露出来,供氢能力大大提高,进而提高 DPPH 自由基清除率。这也与 2.1 玉米糖肽的肽含量和 2.2 玉米糖肽的体外消化率高于玉米肽的结果相一致。

2.3.2 羟自由基清除活性

GSH、体外消化前后玉米肽及玉米糖肽对羟自由基的清除能力如图 2 所示。

由图 2 可以看出,质量浓度为 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时,玉米肽和玉米糖肽的羟自由基清除率间差异不显著($p > 0.05$),质量浓度为 1.5 mg/mL 和 2.0 mg/mL 时,糖基化修饰使玉米肽的羟自由基清除率显著增加($p < 0.05$),且与同质量浓度的 GSH 相比差异不显著($p > 0.05$)。经体外消化后,玉米肽和玉米糖肽的羟自由基清除率均升高。当质量浓度为 0.5 mg/mL 时,玉米糖肽消化产物的羟自

由基清除率为 21.77%, 比同质量浓度玉米肽、玉米糖肽和 GSH 分别高 4.81、5.86 百分点和 15.88 百分点。

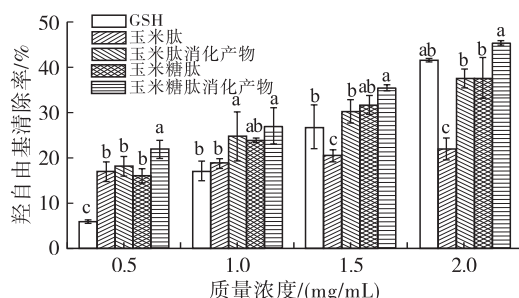


图2 羟自由基清除能力

糖基化修饰可以改善玉米肽的羟自由基清除能力, 可能是壳寡糖分子的结构单元中含有较多的一 NH_2 活性基团, 可以作为氢供体与羟自由基结合形成较为稳定的结构而被淬灭。体外消化后玉米糖肽的羟自由基清除率提高, 可能的原因: 经胃蛋白酶和胰蛋白酶消化后, 玉米糖肽被进一步降解, 体外消化率提高, 使含有活性基团的肽段释放出来, 增加了与羟基反应的机会, 从而增强了其对羟自由基的清除能力。

2.3.3 还原力

GSH、体外消化前后玉米肽及玉米糖肽的还原力如图3所示。

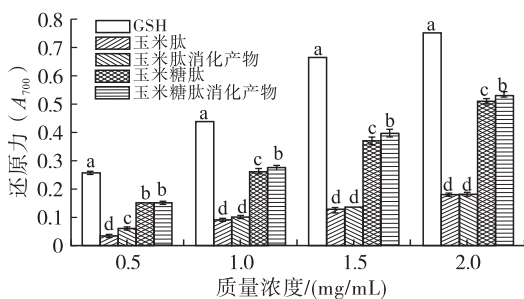


图3 还原力

由图3可以看出, 在实验浓度范围内, 4种样品的还原力均与质量浓度呈剂量-效应关系, 且均显著低于同质量浓度阳性对照的($p < 0.05$)。经壳寡糖糖基化修饰后, 玉米肽的还原力显著提高($p < 0.05$), 可能是与玉米肽共价结合的壳寡糖可以作为电子供体将溶液中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 使还原力增强。经体外消化后, 玉米糖肽的还原力升高, 质量浓度在1.0 mg/mL及以上存在统计学意义($p < 0.05$), 在质量浓度为2.0 mg/mL时, 玉米糖肽消化产物的还原力为0.528, 比消化前增加0.021, 这可能与玉米糖肽的氨基酸组成有关, 因为酸性或碱性氨基酸的羧基和氨基能够参与金属离子的螯合反应^[25]。在胰蛋白酶和胃蛋白酶的作用下, 肽键断裂使玉米糖肽中

极性或带电荷的氨基酸侧链基团暴露出来, 并且与玉米肽共价结合的壳寡糖分子上有氨基、羟基等活性基团, 使消化产物的供电子能力增强, 从而还原能力提高。Zhu等^[26]对玉米醇溶蛋白酶解物体外消化后的还原力进行了测定, 发现消化产物的还原力比消化前增加了2倍。本研究中除质量浓度0.5 mg/mL外, 玉米肽的还原力与消化后相比差异均不显著($p > 0.05$)。

2.3.4 Fe^{2+} 螯合能力

GSH、体外消化前后玉米肽及玉米糖肽的 Fe^{2+} 螯合能力如图4所示。

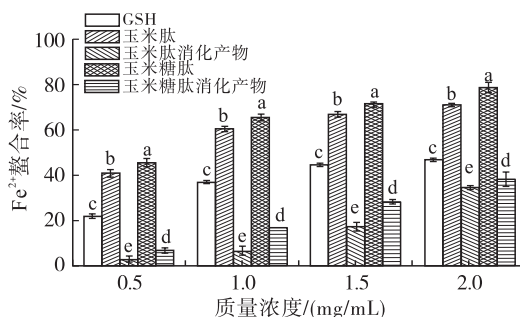


图4 Fe^{2+} 螯合能力

由图4可以看出, 玉米糖肽的 Fe^{2+} 螯合能力显著高于同质量浓度的玉米肽和GSH($p < 0.05$), 且与质量浓度呈正相关, 可能是由于壳寡糖含有大量游离的一 NH_2 和一 OH , 壳寡糖分子内部或其他分子以氢键或离子键形成类似网状结构的笼状分子, 能够与 Fe^{2+} 发生配位作用, 形成壳寡糖- Fe^{2+} 螯合物^[27], 从而使玉米肽的 Fe^{2+} 螯合率提高。经体外消化后, 玉米肽和玉米糖肽的 Fe^{2+} 螯合能力均显著降低($p < 0.05$)。当质量浓度为2.0 mg/mL时, 玉米糖肽的 Fe^{2+} 螯合率为78.95%, 比消化前高40.82百分点, 玉米肽的 Fe^{2+} 螯合率为71.09%, 比消化前高36.73百分点。孙宏^[28]采用胃蛋白酶消化棉籽肽时, 也发现消化产物的金属离子螯合能力显著降低。Decker等^[29]研究表明, 金属离子的螯合能力与抗氧化肽的二级结构有关。因此, 推测胃蛋白酶和胰蛋白酶的专一性酶切使玉米肽、玉米糖肽的二级结构改变, 影响了二者螯合 Fe^{2+} 的特定结构, 从而导致 Fe^{2+} 螯合率降低。

2.3.5 超氧阴离子自由基清除活性

GSH、体外消化前后玉米肽及玉米糖肽的超氧阴离子自由基清除能力如图5所示。

由图5可以看出, 与玉米肽相比, 玉米糖肽的超氧阴离子自由基清除率显著增加($p < 0.05$), 但显著低于同质量浓度阳性对照的($p < 0.05$)。经体外消化后, 玉米肽的超氧阴离子自由基清除率提高, 在

质量浓度为 1.5、2.0 mg/mL 时存在显著差异($p < 0.05$);质量浓度为 2.0 mg/mL 时,玉米糖肽的超氧阴离子自由基清除率显著降低($p < 0.05$),除此之外,玉米糖肽的超氧阴离子自由基清除率虽有升高,但无显著差异($p > 0.05$)。

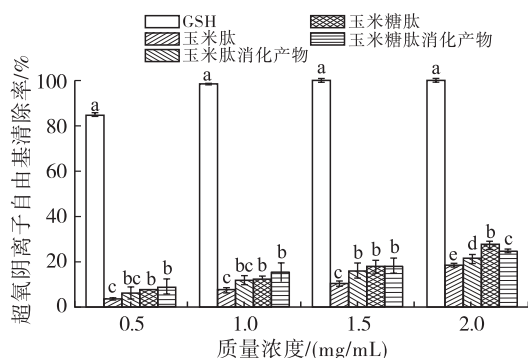


图5 超氧阴离子自由基清除能力

TGase 糖基化修饰改善了玉米肽对超氧阴离子自由基的清除能力,这可能是具有抗氧化活性的壳寡糖与玉米肽的协同作用。壳寡糖分子中含有很多活性基团如氨基离子、还原端羰基和伯、仲—OH^[30],玉米肽的氨基酸组成中含有酚羟基和巯基等给电子基团,这些活性基团可以和超氧阴离子发生氧化还原反应,将其清除。玉米糖肽经胃蛋白酶和胰蛋白酶作用后,其超氧阴离子自由基清除活性整体无显著变化,说明体外消化基本不能破坏玉米糖肽提供氢质子的能力,这为其在生物体内发挥抗氧化活性提供了基础。

综合以上分析,在 TGase 催化下,壳寡糖与玉米肽共价结合,改变了玉米肽的结构特性,壳寡糖分子上的活性基团和玉米肽中的抗氧化氨基酸二者的协同作用,显著提高了玉米肽的抗氧化活性,并且在胃蛋白酶和胰蛋白酶的体外模拟胃肠道消化条件下,玉米糖肽的肽含量和体外消化率的增加,可以进一步释放玉米糖肽的抗氧化活性,使其具有在体内发挥抗氧化活性的潜力。

3 结 论

采用 TGase 催化壳寡糖对玉米肽进行糖基化修饰,发现糖基化修饰能够有效改善玉米肽的营养价值和抗氧化活性,尤其是 Fe^{2+} 螯合能力,显著高于同质量浓度的阳性对照 GSH;质量浓度为 1.5 mg/mL 时,玉米糖肽的羟自由基清除能力与同质量浓度的 GSH 相比无显著差异($p > 0.05$)。除 Fe^{2+} 螯合能力和超氧阴离子自由基清除能力外,体外消化可以促进玉米糖肽抗氧化活性的释放,具有在体内发挥抗氧化活性的潜力。因此,玉米糖肽是一种具有开发潜力的天然抗氧化剂。

参考文献:

- [1] 毕郑妍,刘艳岚. 自由基级联反应调控策略在重大疾病防治中的应用[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2021, 38(5): 574–584.
- [2] 王晓杰,曲悦,丛万锁. 玉米肽的抗氧化活性及其对熟猪肉脂质氧化抑制作用的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(4): 251–257.
- [3] WANG X J, LIU X L, ZHENG X Q, et al. Preparation of corn glycopeptides and evaluation of their antagonistic effects on alcohol-induced liver injury in rats[J/OL]. J Funct Foods, 2020, 66: 103776 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103776>.
- [4] 王晓杰,刘晓兰,曲悦,等. 两步水解法制备玉米抗氧化活性肽及产物的稳定性[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(12): 67–73.
- [5] 王丽英. 玉米抗氧化肽活性氧清除作用与抗氧化基因表达调节作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [6] 王晓杰,曲悦,刘晓兰,等. 玉米肽的纳滤脱盐工艺及脱盐产物抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 39–45.
- [7] JIANG X, CUI Z, WANG L, et al. Production of bioactive peptides from corn gluten meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* MTCC5480 and evaluation of its antioxidant capacity *in vivo* [J/OL]. LWT – Food Sci Technol, 2020, 131: 109767 [2023-05-06]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109767>.
- [8] 王晓杰. 转谷氨酰胺酶途径的酶法糖基化修饰在蛋白质/多肽改性中的研究进展[J]. 中国油脂, 2022, 47(10): 25–32.
- [9] 宋莲军,余留印,黄现青,等. 蛋白质转谷氨酰胺酶途径糖基化研究进展[J]. 中国油脂, 2018, 43(11): 34–38.
- [10] 王晓杰,童玲,刘晓兰. 玉米糖肽的体外抗氧化活性[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(8): 166–173.
- [11] 宋莲军,潘浩东,徐潘,等. 大豆分离蛋白酶解物的氨基葡萄糖糖基化修饰及其生物活性变化[J]. 粮食与饲料工业, 2019(4): 28–31.
- [12] JE J Y, KIM S K. Reactive oxygen species scavenging activity of aminoderivatized chitosan with different degree of deacetylation[J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14(17): 5989–5994.
- [13] 王晓杰,刘晓兰,丛万锁,等. 壳寡糖酶法糖基化修饰对玉米醇溶蛋白功能性质的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 13–20.
- [14] WANG X J, ZHENG X Q, KOPPARAPU N K, et al. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate [J]. Process Biochem, 2014, 49(9): 1562–1569.
- [15] MILÁN-CARRILLO J, VALDÉZ-ALARCÓN C, GUTIÉRREZ-DORADO R, et al. Nutritional properties of

- quality protein maize and chickpea extruded based weaning food[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2007, 62(1): 31–37.
- [16] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 160–168.
- [17] JEONG C H, CHOI G N, KIM J H, et al. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum* [J]. *Food Chem*, 2010, 118(2): 278–282.
- [18] MAUGERI F, MALTESE A, WARDK W, et al. Hydroxyl radical scavenging activity of a new ophthalmic viscosurgical device[J]. *Curr Eye Res*, 2007, 32(2): 105–111.
- [19] OYAZU M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin – layer chromatography [J]. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1988, 35(11): 771–775.
- [20] KONG B, XIONG Y L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(16): 6059–6068.
- [21] MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *Eur J Biochem*, 1974, 47(3): 469–474.
- [22] 张红玉, 李会珍, 张天伟, 等. 抗氧化肽作用机制研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3981–3988.
- [23] MARTINEZ – ALVARENGA M S, MARTINEZ – RODRIGUEZ E Y, GARCIA – AMEZQUITA L E, et al. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate – maltodextrin conjugates [J]. *Food Hydrocolloid*, 2014, 38: 110–118.
- [24] 付森. TGase 诱导的壳寡糖糖基化与交联对两种蛋白质的性质影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [25] AI S, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(12): 3661–3667.
- [26] ZHU L, CHEN J, TANG X, et al. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of Alcalase – treated zein hydrolysate [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(8): 2714–2721.
- [27] WANG P, JIANG X, JIANG Y, et al. *In vitro* antioxidative activities of three marine oligosaccharides [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(7): 646–654.
- [28] 孙宏. 菌酶协同处理棉籽粕的营养特性、棉籽肽的制备及其抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [29] DECKER E A, CRUM A D, CALVERT J T. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(5): 756–759.
- [30] 王鑫, 林强, 田平芳, 等. 低分子量壳寡糖改善 II 型糖尿病大鼠症状及其作用机制研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(11): 529–532.
-
- (上接第 27 页)
- [50] 齐宝坤, 江连洲, 李杨, 等. 挤压膨化后微体化预处理水酶法提取大豆油脂工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 196–200.
- [51] WALAYAT N, YURDUNUSEVEN – YILDIZ A, KUMAR M, et al. Oxidative stability, quality, and bioactive compounds of oils obtained by ultrasound and microwave – assisted oil extraction [J/OL]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023: 1–18 [2023–12–04]. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2219452>.
- [52] MARTÍNEZ – PADILLA L P, HERNÁNDEZ – ROJAS F S, SOSA – HERRERA M G, et al. Novel application of ultrasound and microwave – assisted methods for aqueous extraction of coconut oil and proteins [J]. *J Food Sci Technol*, 2022, 59(10): 3857–3866.
- [53] 孙禹凡, 齐宝坤, 廖一, 等. 微波辅助生物解离法提取大豆油工艺及作用机理研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(7): 16–22.
- [54] 杨柳, 江连洲, 李杨, 等. 超声波辅助水酶法提取大豆油的研究[J]. *中国油脂*, 2009, 34(12): 10–14.
- [55] KIM I H, YOON S H. Effect of extraction solvents on oxidative stability of crude soybean oil [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1990, 67(3): 165–167.
- [56] 韩宗元, 李晓静, 江连洲. 水酶法提取大豆油脂的中试研究[J]. *农业工程学报*, 2015, 31(8): 283–289.
- [57] 冯雪, 钱珊珊, 于彤, 等. 提取方法对大豆油脂体组成及氧化稳定性的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 148–156.
- [58] 李杨, 张雅娜, 王欢, 等. 水酶法提取大豆油与其他不同种大豆油品质差异研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(6): 46–52.
- [59] 冯红霞, 隋晓楠, 齐宝坤, 等. 挤压膨化参数对水酶法提取大豆油品质的影响[J]. *中国油脂*, 2016, 41(4): 51–55.