

小麦水解蛋白肽段组成及结构序列分析

方磊¹, 夏羽菡², 任杰¹, 崔硕³, 吴晗硕¹,
卢知浩¹, 马永庆¹, 张新雪¹, 刘文颖^{*1}

(1. 中国食品发酵工业研究院有限公司 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015; 2. 宁夏医科大学总医院, 宁夏 银川 750004; 3. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100083)

摘要: 对小麦水解蛋白的基础理化成分、相对分子质量分布和氨基酸组成进行分析, 并利用 LC-MS/MS 法鉴定小麦水解蛋白肽段组成及其序列。结果显示, 小麦水解蛋白的总蛋白质质量分数为 (80.53±8.06)%, 相对分子质量主要集中在小于 2 000 的范围, 必需氨基酸的质量分数为 52.4%。根据 Q3 扫描、PIS 扫描以及 MRM 定量共鉴定出 8 条肽段: 亮氨酸谷氨酰胺二肽(leucyl-glutamine, LQ)、缬氨酸谷氨酰胺二肽(valanyl-glutamine, VQ)、异亮氨酸异亮氨酸二肽(isoleucyl-isoleucine, II)、亮氨酸亮氨酸二肽(leucyl-leucine, LL)、丙氨酸异亮氨酸二肽(alanyl-isoleucine, AI)、缬氨酸亮氨酸二肽(valanyl-leucine, VL)、亮氨酸甲硫氨酸二肽(leucyl-methionine, LM)和异亮氨酸甲硫氨酸二肽(isoleucyl-methionine, IM), 质量分数分别为 385.0、32.5、30.0、122.8、8.9、5.9、134.9、147.0 μg/g。它们可能在体内发挥功能活性, 成为小麦水解蛋白应用于营养保健食品的物质基础。

关键词: 小麦; 水解蛋白; 相对分子质量; 氨基酸; 肽段鉴定; 质谱

中图分类号: TS 253.9 文章编号: 1673-1689(2024)06-0104-08 DOI: 10.12441/spyswjs.20221104003

Composition and Structural Sequence Analysis of Hydrolyzed Wheat Protein Peptides

FANG Lei¹, XIA Yuhuan², REN Jie¹, CUI Shuo³, WU Hanshuo¹,
LU Zhihao¹, MA Yongqing¹, ZHANG Xinxue¹, LIU Wenyong^{*1}

(1. Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing 100015, China; 2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. School of Biomedicine, Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: Hydrolyzed wheat protein was analyzed by basic physicochemical components, relative molecular mass distribution, and amino acid composition. The peptide composition and sequence were identified by LC-MS/MS. The results showed that the total protein mass fraction of hydrolyzed wheat protein was (80.53±8.06)%, with the relative molecular mass mainly below 2 000 and a mass fraction of essential amino acids approximately 52.4%. Eight peptides were identified by Q3 scanning, PIS scanning, and MRM quantification, including leucyl-glutamine (LQ), valanyl-glutamine (VQ), isoleucyl-isoleucine (II), leucyl-leucine (LL), alanyl-isoleucine (AI), valanyl-leucine

收稿日期: 2022-11-04 修回日期: 2022-12-25

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEG02027)。

* 通信作者: 刘文颖(1984—), 女, 硕士, 高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事食源性低聚肽研究。E-mail: wenyongliu888@126.com

(VL), leucyl-methionine (LM) and isoleucyl-methionine (IM), with mass fractions of 385.0, 32.5, 30.0, 122.8, 8.9, 5.9, 134.9, 147.0 $\mu\text{g/g}$, respectively. These peptides may exhibit functional activities *in vivo* and serve as the material foundation for the application of hydrolyzed wheat protein in nutritional health food.

Keywords: wheat, hydrolyzed protein, relative molecular mass, amino acid, peptide identification, mass spectrometry

小麦蛋白经酶解后的产物具有抗氧化、免疫调节和降血压等多种生物活性,此外,小麦蛋白中的高谷酰胺具有有效调节神经和改善肠功能障碍的作用^[1-3]。小麦水解蛋白是不同相对分子质量肽段组成的混合物,除了自身带来的营养价值外,还可产生多种生理功能活性。目前研究较多的相对分子质量分布、水解度、氨基酸组成等,都与其生理功能活性的发挥相关,而肽段结构直接决定了相应的功能活性,其中一级结构更是生物学功能的基础。因此,有必要对小麦水解蛋白进行结构鉴定,为明确小麦水解蛋白结构与功能之间的关系奠定基础。作者主要利用 HPLC-MS/MS 鉴定小麦水解蛋白中肽段的一级结构,筛选小麦水解蛋白中特征性肽段。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小麦水解蛋白粉:北京中食海式生物技术有限公司;低聚肽标准品(质量分数 $\geq 99\%$):苏州强耀生物科技有限公司;乙腈(色谱纯):德国 Merck 公司;甲酸(色谱纯):迪马科技公司;三氟乙酸(色谱纯):美国 Fisher 公司。

QSY-II 型凯式定氮仪:北京强盛分析仪器制造中心;A300 全自动氨基酸分析仪:德国曼默博尔公司;Superdex Peptide 10/300 GL 色谱柱:GE Healthcare 公司;HPLC-MS/MS 8060 高效液相色谱-串联质谱仪:日本 Shimadzu 公司;Inertsil ODS-3 色谱柱:日本 GL Sciences 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基础理化成分测定 小麦水解蛋白的蛋白质质量分数、水分质量分数以及灰分质量分数的测定分别参考 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》、GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》和 GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》^[4]。

1.2.2 相对分子质量分布的测定 首先将小麦水解蛋白配制为质量浓度为 1 g/L 的小麦水解蛋白样品溶液,通过 0.2 μm 孔径的过滤膜将样品溶液进行过滤,再通过高效液相色谱来确定小麦水解蛋白的相对分子质量分布。此外,用质量浓度为 1 mg/mL 的不同肽标准品溶液进行校正曲线的制作。肽标准品共有 4 种,分别为乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(相对分子质量为 189)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(相对分子质量为 451)、杆菌酶(相对分子质量为 1 450)以及细胞色素 C(相对分子质量为 12 500)^[4]。层析具体参数:色谱柱为 300 mm \times 7.8 mm,流动相中 V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=45:55:0.1,进样体积 10 μL ,流量 0.5 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 220 nm^[5]。

1.2.3 氨基酸组成测定 小麦水解蛋白氨基酸组成测定参考 GB 5009.124—2016 中的方法,使用 A300 全自动氨基酸分析仪进行测定。

1.2.4 Q3 扫描(一级扫描) 小麦水解蛋白的肽段序列鉴定参考 Chen 等采用液相色谱串联质谱进行肽段序列鉴定的方法^[6-8]。首先将小麦水解蛋白样品配制成 2 mg/mL 的水溶液,然后使用蒸馏水将样品水溶液稀释至 20 $\mu\text{g/mL}$,并利用孔径为 0.22 μm 的尼龙膜过滤,过滤完成后即可进行后续测定工作。测定时首先将 Inertsil ODS-3 色谱柱连接在液相色谱仪,取 5 μL 待测样品进样。在正离子模式下,将样品进行 Q3 扫描,设置质荷比扫描范围为 100~600。液相色谱具体参数:流动相 A 为含有体积分数 0.1% 的甲酸-水溶液,流动相 B 为含有体积分数 0.1% 的甲酸-乙腈溶液,流量为 0.2 mL/min。采用流动相 B 按以下梯度程序洗脱:0~15 min,0~40%;15~20 min,40%~80%;20~25 min,80%;25~35 min,80%~0%^[9],柱温箱温度设定为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱具体参数如下:采用 ESI 的离子化模式,雾化气流量 3.0 L/min,加热

气流量 10 L/min,干燥气流量 10 L/min,离子喷雾电压 4.5 kV,脱溶剂管温度 250 ℃,加热模块温度 400 ℃,离子源温度 300 ℃^[10]。

1.2.5 PIS 扫描(二级扫描) 将待测样品再次进行 PIS 扫描,进样 5 μL。母离子根据 Q3 扫描分析的结果输入,碰撞能量设置为 -25 eV 和 -35 eV,液相色谱、质谱条件同 Q3 扫描分析,然后对碰撞后生成的产物离子进一步分析。

1.2.6 肽段的 MRM 定量 利用 HPLC-MS/MS 检测小麦水解蛋白中主要肽段的质量分数。在 HPLC-MS/MS 不连色谱柱的情况下,对合成的标准肽段(配制成 1 μg/mL 溶液)的前体离子、产物离子、碰撞能量进行优化,从而确定各标准肽段的保留时间。将标准肽段混合后用去离子水稀释,稀释后标准肽段工作液最终质量浓度分别为 1.95、3.91、7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/L,然后对测定条件进行优化,并在优化状态下进样测定,设定进样量为 5 μL,并以外标法来定量,最后标准曲线的 *x* 轴和 *y* 轴分别为质量浓度与峰面积。

1.3 统计学分析

采用 Origin 9 软件对实验数据进行处理,试验结果以平均值±标准差($X\pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 小麦水解蛋白的基础理化成分

小麦水解蛋白中总蛋白质质量分数为 (80.53±8.06)%,其中小麦水解蛋白中的酸溶蛋白质质量分数为 (53.94±3.98)%,占总蛋白质的 (66.98±1.60)%。此外,小麦水解蛋白的水分和灰分的质量分数非常低,分别为 (1.98±0.13)%和 (0.81±0.05)%,以上成分除水分外均以干基计数。综上所述可知,小麦水解蛋白的总蛋白质质量分数很高。经酶水解处理后,小麦水解蛋白中可溶性或不可溶性的非蛋白质物质得以去除,因此从基础理化成分可以看出,小麦水解蛋白是一种优质蛋白质。

2.2 小麦水解蛋白的相对分子质量分布

小麦水解蛋白中大分子蛋白质相对较少,主要为相对分子质量小于 10 000 的小分子蛋白质,其中相对分子质量小于 2 000 的蛋白质组分质量分数为 68.05%。小麦水解蛋白的重均相对分子质量为 2 652.88,其中相对分子质量小于 1 000 的蛋白质组分质量分数为 54.16%。而有研究报道,小麦低聚肽

相对分子质量小于 1 000 组分的质量分数为 94.33%,占比高于小麦水解蛋白相对分子质量小于 1 000 的组分,这与小麦蛋白的酶解时间长短有关^[11]。相对分子质量为 1 000~2 000、2 000~5 000、5 000~10 000、>10 000 的小麦水解蛋白质量分数分别为 13.89%、9.84%、16.97%、5.15%。综上所述,小麦水解蛋白的主要成分为相对分子质量小于 2 000 的蛋白质组分。

2.3 小麦水解蛋白的氨基酸组成

表 1 为小麦水解蛋白的氨基酸组成。其中,亮氨酸(Leu,L)、苯丙氨酸(Phe,F)、酪氨酸(Tyr,Y)、缬氨酸(Val,V)、精氨酸(Arg,R)和谷氨酸(Glu,E)质量分数较高,共占 63.7%,然而脯氨酸(Pro,P)、组氨酸(His,H)和苏氨酸(Thr,T)的质量分数较低,仅为 5.7%;小麦水解蛋白中富含人体必需氨基酸,质量分数为 52.4%,其中赖氨酸质量分数为 4.3%;因此,小麦水解蛋白的氨基酸组成丰富。周伟等通过复合酶酶解处理小麦蛋白,得到了纯度较高的小麦低聚肽;在复合酶作用下,小麦蛋白水解反应较为剧烈,从而较大地影响了其氨基酸组成,特别是谷氨酸的含量^[12]。这与本研究中的小麦水解蛋白氨基酸组成有差异,这是因为不同种类酶的处理以及不同的水解程度,使得最终小麦水解蛋白中氨基酸组成有所不同。从表 1 可知,小麦水解蛋白中的支链氨基酸(Val,Ile,Leu)质量分数为 26.8%,谷氨酸质量分数为 7.7%,谷氨酸质量分数小于此前文献中报道的小麦低聚肽质量分数^[11]。相关研究表明,吸收和利用谷氨酰胺(Gln,Q)的器官主要是肠道,并且谷氨酰胺具有改善胃肠蠕动以及促进肠道营养吸收的作用^[13]。支链氨基酸作为一类可以参与供能的物质,其在长时间耐力运动中参与供能方面具有重要作用^[14]。因此,小麦水解蛋白中可能存在潜在的支链氨基酸和谷氨酰胺肽段,使其发挥生物活性。

2.4 小麦水解蛋白主要肽段的鉴定

Q3 扫描可以采集待测样品的质荷比信息,也就是前体离子信息。不同的质荷比具有不同的丰度,可以选取相对丰度较高的质荷比所对应的前体离子进行 PIS 扫描分析。在 PIS 扫描中,对选取的高丰度前体离子进行裂解,采集肽段碎片离子信息,以获得产物离子信息。由于肽段在质谱中的断裂有一定规律,可产生特征离子,如肽键断裂后可分别得到 N 端系列的碎片离子(*b* 离子)和 C 端系列的碎片离子(*y* 离子),这些碎片离子还可以进一步形成

表 1 小麦水解蛋白的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of hydrolyzed wheat protein

氨基酸名称及缩写	质量分数/%	氨基酸名称及缩写	质量分数/%
天冬氨酸(Asp,D) ^a	3.6	异亮氨酸(Ile,I)	3.6
苏氨酸(Thr,T)	2.2	亮氨酸(Leu,L)	14.2
丝氨酸(Ser,S)	4.1	酪氨酸(Tyr,Y)	10.8
谷氨酸(Glu,E) ^b	7.7	苯丙氨酸(Phe,F)	14.1
甘氨酸(Gly,G)	3.6	组氨酸(His,H)	2.3
丙氨酸(Ala,A)	6.8	赖氨酸(Lys,K)	4.3
缬氨酸(Val,V)	9.0	精氨酸(Arg,R)	7.9
半胱氨酸(Cys,C)	3.3	脯氨酸(Pro,P)	1.2
甲硫氨酸(Met,M)	5.0		

注:a表示天冬氨酸+天冬酰胺(Asp+Asn);b表示谷氨酸+谷氨酰胺(Glu+Gln)。

脱水、脱氨的离子,因此通过分析前体离子和产物离子中的特征离子,即可初步确定肽段结构序列。

Q3 扫描获得质荷比为 260.2 的前体离子,在正离子模式下碰撞能量分别为-25 eV 和-35 eV,得到质荷比为 260.2 前体离子的产物离子质谱图,如图 1 所示。在产物离子质谱图中观察到 86.1 是 L 的亚胺离子,130.1 和 147.2 分别是 Q 的 z1 和 y1 离子,经分析主要肽段序列为 Leu-Qln(LQ);在质荷比为 231.2 前体离子的产物离子质谱图中观察到 72.1 是 V 的亚胺离子,86.1 和 132.2 分别是 L 的亚胺离子和 y1 离子,经分析主要肽段序列为 Val-Leu(VL)。以此类推,结合前体离子和产物离子信息来确定肽段的序列结构,最终从小麦水解蛋白中共鉴定出 8 条肽段序列,见表 2。

2.5 小麦水解蛋白主要肽段的定量

利用 HPLC-MS/MS 自动优化功能对标准品进行了定量离子对和电压的优化,得到的 MRM 优化参数如表 3 所示。然后利用 MRM 优化参数对 3 个批次小麦水解蛋白的 8 条肽段进行了定量,以 LQ 肽段定量色谱图为例,如图 2 所示;8 条肽段的校准曲线方程如表 4 所示。肽段 LQ 的质量分数最高,为 385.0 μg/g;肽段 VL 的质量分数最低,为 5.9 μg/g,如表 5 所示。

LQ 和 VQ 两条肽段的 C 端氨基酸均为谷氨酰胺,属于谷氨酰胺短肽。在血浆中,谷氨酰胺含量丰富,参与人体多种代谢途径;此外,谷氨酰胺是细胞正常代谢的氮源,也是合成谷胱甘肽的原料之一,并且辅助改善肠黏膜形态和增加机体免疫力^[15-18]。谷氨

酰胺肽由于具有水溶性好和吸收性好的特点,在人体内可以快速分解成谷氨酰胺;当人体处于应激状态时,谷氨酰胺是能为机体提供重要能源的营养物质^[19]。Bertrand 等发现谷氨酰胺通过增加肠易激综合征患者结肠黏膜的连接蛋白表达,从而对肠道损伤起到保护作用^[20]。LQ 和 VQ 两条肽段的 N 端分别是 L 和 V,均属于支链氨基酸,它们在肝脏外进行代谢作用,从而减轻肝脏的负担,有利于肝病患者消除水肿和促进肝细胞生长恢复,并且能调节体内氨的代谢,从而预防或缓解肝性脑病^[21-22]。因此,小麦水解蛋白含有的 LQ 和 VQ 肽段有助于发挥其保肝、护肝的功效。

II、LL、VL 这 3 条肽段的 N 端和 C 端均由支链氨基酸组成,且 AI、IM、LM 这 3 条肽段也含有支链氨基酸。支链氨基酸属于必需氨基酸,在体内通过参与氧化功能、保护线粒体、抑制脂质过氧化、清除体内自由基等活动来减轻运动性疲劳以及促进运动后机体的恢复^[23-24]。此外,机体在长时间运动下,补充支链氨基酸既能抑制因运动时间长导致的蛋白质降解,又能促进肌肉蛋白质合成,从而促进机体肌肉的生长^[25]。

综上,从小麦水解蛋白中鉴定出的 8 条肽段,在 N 端和 C 端均有特征氨基酸。谷氨酰胺短肽和支链氨基酸短肽分别对于保护肠黏膜、胃黏膜和缓解运动疲劳有一定的作用,因此,这些肽段可能是小麦水解蛋白发挥功效的特征成分。后续可对特征肽段进行构效评价,进一步揭示小麦水解蛋白的保肝、护肝作用。

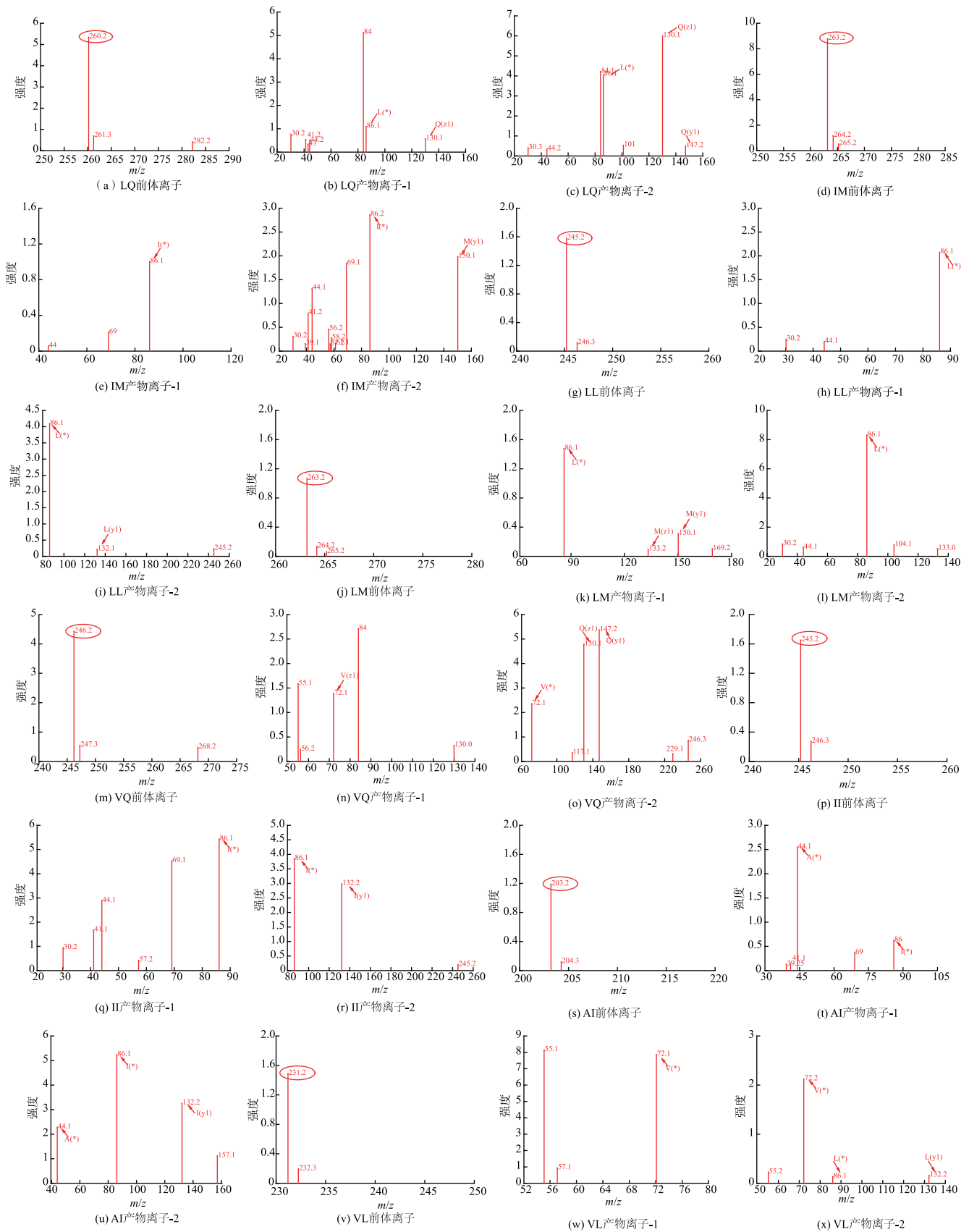


图 1 肽段序列的前体离子及产物离子质谱图

Fig. 1 Mass spectrometry of precursor ions and product ions of peptide sequence

表 2 小麦水解蛋白中鉴定出的 8 条肽段序列

Table 2 Sequences of eight peptides identified in hydrolyzed wheat proteins

序号	质荷比	序列	相关的碎片离子信息
1	260.2	Leu-Qln(LQ)	86.05-L(*),130.05-Q(z1),147.15-Q(y1)
2	231.2	Val-Leu(VL)	72.1-V(*),86.05-L(*),132.15-L(y1)
3	263.2	Ile-Met(IM)	86.1-I(*),150.1-M(y1)
4	245.2	Leu-Leu(LL)	86.1-L(*),132.1-L(y1)
5	263.2	Leu-Met(LM)	86.1-L(*),133.2-M(z1),150.1-M(y1)
6	246.2	Val-Qln(VQ)	72.1-V(*),130.1-Q(z1),147.15-Q(y1)
7	245.2	Ile-Ile(II)	86.1-I(*),132.2-I(y1)
8	203.2	Ala-Ile(AI)	44.1-A(*),86.0-I(*),132.2-I(y1)

表 3 肽段序列的 MRM 优化参数

Table 3 Parameters of peptide sequences optimized by MRM

序列	前体离子 质荷比	产物离子 质荷比	Q1 预电压/V	碰撞能量/eV	Q3 预电压/V
LQ	260.2	86.1	-10	-20	-10
	260.2	130.1	-14	-20	-27
VL	231.2	72.1	-26	-21	-17
	231.2	86.1	-21	-24	-19
IM	263.2	86.2	-29	-25	-19
	263.2	150.1	-29	-23	-18
LL	245.2	86.1	-28	-13	-18
	245.2	132.1	-18	-13	-29
LM	263.2	86.1	-13	-22	-26
	263.2	150.1	-18	-33	-21
VQ	246.2	72.1	-29	-24	-28
	246.2	130.1	-25	-23	-27
II	245.2	86.1	-13	-15	-18
	245.2	132.2	-28	-11	-21
AI	203.2	44.1	-23	-33	-18
	203.2	86.1	-11	-11	-16

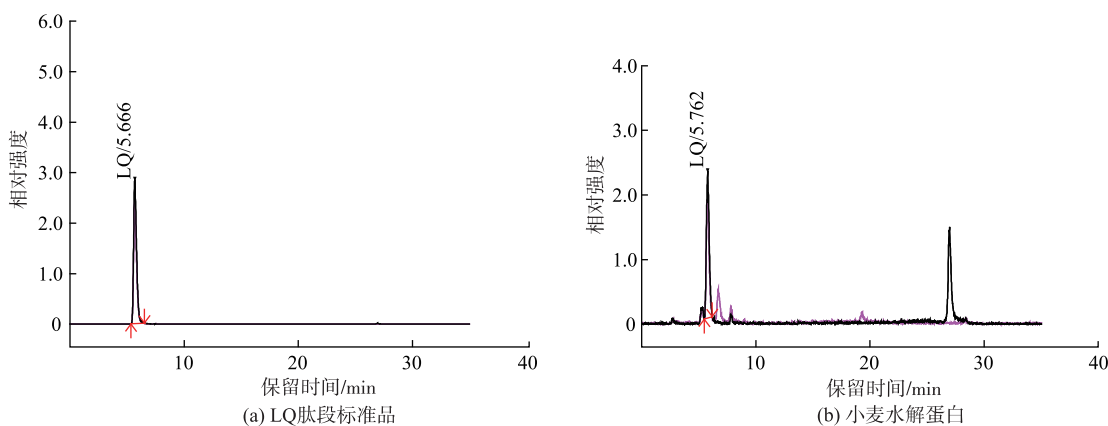


图 2 LQ 肽段标准品和小麦水解蛋白的定量色谱图

Fig. 2 Quantitative chromatograms of LQ peptide standard and hydrolyzed wheat protein

表 4 8 条肽段的标准曲线方程

Table 4 Standard curve equations for eight peptides

肽段名称	标准曲线	R ² 值
LQ	$y = 50\ 847.5x - 19\ 089.7$	0.999
IM	$y = 4\ 081.86x + 4\ 073.23$	0.998
LL	$y = 325\ 384x + 52\ 077.9$	0.993
LM	$y = 4\ 753.59x + 4\ 604.72$	0.999
VQ	$y = 44\ 206.9x + 2\ 404.14$	0.999
II	$y = 206\ 862x - 20\ 493.8$	0.998
AI	$y = 33\ 537.8x + 32\ 291.8$	0.999
VL	$y = 6\ 430.54x + 7\ 690.45$	0.999

表 5 不同批次小麦水解蛋白肽段质量分数

Table 5 Mass fraction of hydrolyzed protein peptides in different batches of wheat

肽段	质量分数/($\mu\text{g/g}$)	肽段	质量分数/($\mu\text{g/g}$)
LQ	385.0	VQ	32.5
IM	147.0	II	30.0
LL	122.8	AI	8.9
LM	134.9	VL	5.9

3 结 语

小麦水解蛋白粉的总蛋白质质量分数为(80.53±8.06)%,相对分子质量分布主要集中在小于2 000 的范围,重均相对分子质量为2 652.88;小麦水解蛋白中富含人体必需氨基酸,质量分数为52.4%,其中作为限制性氨基酸的赖氨酸质量分数

为4.3%。经超快速液相色谱串联三重四极杆质谱对小麦水解蛋白进行Q3 扫描、PIS 扫描以及MRM 优化定量,从中分离鉴定出8 条肽段,包括2 条谷氨酰胺二肽和6 条支链氨基酸二肽,为小麦水解蛋白保护胃肠黏膜的营养保健应用提供了一定的理论支持,但对于8 条肽段保护胃肠黏膜的作用机制尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 魏颖,马勇,鲁军,等. 小麦低聚肽抗氧化活性研究[J]. 食品科技,2015,40(4):206-208.
WEI Y, MA Y, LU J, et al. The effect of wheat oligopeptides on antioxidant activity in oxygen radical absorbance capacity assay [J]. **Food Science and Technology**, 2015, 40(4):206-208, 214. (in Chinese)
- [2] YANG H L, SHEN Z Q, LIU X, et al. Two novel antimicrobial peptides from skin venoms of spadefoot toad *Megophrys minor*[J]. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2016, 14(4):294-298.
- [3] SOLSTAD R G, LI C, ISAKSSON J, et al. Novel antimicrobial peptides EeCentrocins 1, 2 and EeStrongylocin 2 from the edible sea urchin *Echinus esculentus* have 6-Br-Trp post-translational modifications[J]. **PLoS One**, 2016, 11(3):e0151820.
- [4] 刘文颖,冯晓文,程青丽,等. 大米低聚肽的制备和结构表征及体外抗氧化作用[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2021, 49(11):47-56.
LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Preparation, structure characterization and *in vitro* antioxidant activity of rice oligopeptides[J]. **Journal of South China University of Technology(Natural Science Edition)**, 2021, 49(11):47-56. (in Chinese)
- [5] LIU W Y, LU J, GAO F, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides[J]. **European Food Research and Technology**, 2015, 241(6):851-860.
- [6] CHEN L, EJIMA A, GU R Z, et al. Presence of exopeptidase-resistant and susceptible peptides in a bacterial protease digest of corn gluten[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019, 67(43):11948-11954.
- [7] 陈亮,王雨晴,冀峰,等. 玉米低聚肽中焦谷氨酰亮氨酸(pEL)二肽的研究[J]. 食品与发酵工业,2021,47(3):49-52.
CHEN L, WANG Y Q, JI F, et al. Study on pEL dipeptide in corn oligopeptides[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2021, 47(3):49-52. (in Chinese)
- [8] 王雨晴,毕园,张瑞雪,等. 豌豆低聚肽中具有发挥功能活性潜力的结构研究[J]. 食品与发酵工业,2020,46(17):54-59.

- WANG Y Q, BI Y, ZHANG R X, et al. Study on the structures of pea oligopeptides with potential functional activities[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2020, 46(17):54-59. (in Chinese)
- [9] 戴建英, 尤巍, 田甜, 等. HPLC-ELSD 法同时测定知母药材中 5 种成分的含量[J]. 药学实践杂志, 2022, 40(1):34-37.
DAI J Y, YOU W, TIAN T, et al. Simultaneous determination of five components in Anemarrhenae Rhizoma by HPLC-ELSD[J]. **Journal of Pharmaceutical Practice**, 2022, 40(1):34-37. (in Chinese)
- [10] 董恒涛, 张亚锋, 艾芸, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方奶粉中的高氯酸盐和氯酸盐残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16):6522-6527.
DONG H T, ZHANG Y F, AI Y, et al. Determination of perchlorate and chlorate residues in infant formula milk powder by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2021, 12(16):6522-6527. (in Chinese)
- [11] 刘艳, 张海欣, 魏颖, 等. 小麦低聚肽对 H₂O₂ 所致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(6):599-604.
LIU Y, ZHANG H X, WEI Y, et al. Protective effect of wheat oligopeptides on hydrogen peroxide-induced HepG2 cell injury[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(6):599-604. (in Chinese)
- [12] 周伟, 赵泽龙, 张丽萍. 小麦低聚肽的结构及抗氧化能力分析[J]. 食品工业, 2017, 38(9):196-200.
ZHOU W, ZHAO Z L, ZHANG L P. Structure and antioxidant capacity of wheat oligopeptide[J]. **The Food Industry**, 2017, 38(9):196-200. (in Chinese)
- [13] 马洪龙, 韩飞, 李爱科, 等. 碱性蛋白酶水解小麦面筋蛋白制取谷氨酰胺肽的研究[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(1):54-57.
MA H L, HAN F, LI A K, et al. Study on the production of glutamine-bioactive peptides by hydrolysis of wheat gluten with alkaline protease[J]. **Science and Technology of Cereals, Oils and Foods**, 2014, 22(1):54-57. (in Chinese)
- [14] 唐芳, 张蕴琨. 补充支链氨基酸对运动能力影响的研究进展[J]. 南京体育学院学报(自然科学版), 2012, 11(2):150-152.
TANG F, ZHANG Y K. Research development on branched-chain amino acid supplement and exercise capacity[J]. **Journal of Nanjing Institute of Physical Education(Natural Science)**, 2012, 11(2):150-152. (in Chinese)
- [15] 林杰茹, 常惠礼, 冯正富, 等. 谷氨酰胺对肠道损伤药理作用研究[J]. 岭南现代临床外科, 2020, 20(5):664-667, 671.
LIN J R, CHANG H L, FENG Z F, et al. Study on pharmacological effects of glutamine on intestinal injury[J]. **Lingnan Modern Clinics in Surgery**, 2020, 20(5):664-667, 671. (in Chinese)
- [16] YI D, HOU Y Q, WANG L, et al. L-glutamine enhances enterocyte growth *via* activation of the mTOR signaling pathway independently of AMPK[J]. **Amino Acids**, 2015, 47(1):65-78.
- [17] 杨贤. 小麦活性肽对胃肠保护的动物实验研究及其机制探讨[D]. 南京:东南大学, 2016.
- [18] 薛建波. 谷氨酰胺强化肠内营养对胃癌患者术后营养、免疫及预后的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2011.
- [19] 崔亚平, 赵锐, 王勇, 等. 早期含 ω -3 多不饱和脂肪酸肠内营养联合静脉补充丙氨酰谷氨酰胺对胃癌根治术后患者炎症反应及免疫功能的作用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 26(7):785-791.
CUI Y P, ZHAO R, WANG Y, et al. Effects of early enteral nutrition containing ω -3 polyunsaturated fatty acids combined with intravenous infusion of alanyl-glutamine on inflammatory response and immune function of postoperative gastric cancer patients[J]. **Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery**, 2019, 26(7):785-791. (in Chinese)
- [20] BERTRAND J, GHOZALI I, GUÉRIN C, et al. Glutamine restores tight junction protein claudin-1 expression in colonic mucosa of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 2016, 40(8):1170-1176.
- [21] 林双双, 张文青, 李小玲, 等. 强化支链氨基酸和谷氨酰胺的肠内营养支持对肝硬化病人的治疗作用[J]. 肠外与肠内营养, 2016, 23(6):354-357.
LIN S S, ZHANG W Q, LI X L, et al. Intervention study of branched chain amino acids and glutamine nutrients enriched enteral nutrition on patients with cirrhosis[J]. **Parenteral & Enteral Nutrition**, 2016, 23(6):354-357. (in Chinese)
- [22] 李晓芳. ARTP+UV 复合诱变结合异源 *ybgE* 基因表达构建 L- 异亮氨酸高产菌株的研究[D]. 银川:宁夏大学, 2021.
- [23] NIE C X, HE T, ZHANG W J, et al. Branched chain amino acids:beyond nutrition metabolism[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018, 19(4):954.
- [24] 罗钧秋, 陈代文, 余冰, 等. 支链氨基酸和胰岛素对大鼠骨骼肌细胞蛋白质代谢的分子调控机制研究[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(6):1010-1016.
LUO J Q, CHEN D W, YU B, et al. The effect of branched chain amino acid and insulin on protein synthesis and proteolysis in L6 myotubes[J]. **Journal of Nanjing Agricultural University**, 2016, 39(6):1010-1016. (in Chinese)
- [25] 刘斯汝. 支链氨基酸缓解小鼠运动疲劳及其对骨骼肌的影响[D]. 兰州:西北民族大学, 2021.

(责任编辑:周玥)