

基于肽组学的大豆低聚肽制备稳定性评价

Reproducibility evaluation of soybean oligopeptides based on peptidomic analyses

郁晓艺¹ 徐巨才^{2,3} 伍 莹¹ 刘万顺^{2,3} 郭 丹¹ 李晓敏¹

YU Xiao-yi¹ XU Ju-cai^{2,3} WU Ying¹ LIU Wan-shun^{2,3} GUO Dan¹ LI Xiao-min¹

(1. 完美(广东)日用品有限公司, 广东 中山 528400; 2. 五邑大学生物科技与大健康学院,

广东 江门 529020; 3. 江门市大健康国际创新研究院, 广东 江门 529020)

(1. Perfect (Guangdong) Co., Ltd., Zhongshan, Guangdong 528400, China; 2. School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen, Guangdong 529020, China; 3. International Healthcare Innovation Institute (Jiangmen), Jiangmen, Guangdong 529020, China)

摘要:目的:对多肽原料开展更精准的稳定性评价和品质鉴别。方法:采用高分辨液质联用对不同批次原料进行多肽组学分析,结合热度分析、主成分分析等就样品间共性与差异特性展开探讨。结果:从每批次原料中鉴定到多肽约 1 000 条,肽段长度分布均以短肽为主。多肽集合分析发现批次间除共性多肽 101 条外还有众多差异性多肽。此外,PCA 主成分分析显示第 5 批次原料与其他原料间存在较大差异。结论:在相同工艺条件下不同批次间原料的多肽组成整体表现为共性与差异并存,在实际生产过程中,应加强质控以逐步缩小差异增强共性,进而提升工业制备稳定性。

关键词:大豆;低聚肽;稳定性;肽组学;多肽;主成分分析

Abstract: **Objective:** This study aimed to analyze the peptide composition and evaluate the reproducibility of the soybean oligopeptides. **Methods:** High performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry was employed for peptidomic analysis of the soybean oligopeptides prepared at the same condition at different batches. Generality and individuality of the samples were also discussed based on the heat map analysis and principal component analysis (PCA). **Results:** About 1 000 peptides were identified from each of the materials and most of them were short peptides. From the set analysis, 101 peptides were found of detectability from all samples, but there were also many peptides that could be only detected from part of the samples. Moreover, differences between the fifth sample and other samples were evidently observed from the principal

component analysis. **Conclusion:** Though prepared at the same conditions, commonalities and differences coexisted across the samples from different batches. In practical production of oligopeptides, efforts should be made to narrow the differences and increase the commonalities, so that the reproducibility of the products can be improved.

Keywords: soybean; oligopeptides; reproducibility; peptidomics; peptides; PCA

大豆低聚肽主要指大豆蛋白经深度生物酶解技术处理后所形成的酶解产物,因具有绿色、安全、无毒副作用等多种优良特点,备受广大消费者和科研学者青睐^[1]。大豆低聚肽的分子量大多在 1 000 Da 以下,在人体消化系统中具有较好的消化吸收特性,且基本保留了大豆蛋白原有的优质氨基酸组成,同时还具备了远优于大豆蛋白的溶解性和生理活性^[2]。近年来,研究发现大豆低聚肽具有抗氧化^[3]、降血压^[4]、抗疲劳^[5]等多种生理活性,极大地促进了大豆低聚肽产业的快速发展。与此同时,大豆低聚肽的应用也在一定程度上改善了国内大豆粕或大豆蛋白资源的利用情况,为充分挖掘低值蛋白资源的营养价值、功能价值和经济价值提供了重要途径^[6]。

近年来,国内外相关研究大多聚焦于目标多肽的构效关系和活性作用机理^[7-9],而较少关注制备过程中多肽的组成及变化情况。大豆低聚肽作为较早实现工业化的植源性低聚肽之一,至今仍主要依赖于水解度、氨基酸、肽分子量分布等间接或宏观技术指标进行质量控制或评价^[10-12],而关于其多肽的组成情况一直尚未见相关报道。由于缺失酶解产物中多肽的分子组成信息,上述技术指标在进行原料质控时,常呈现为特异性不足,为多肽原料供应的稳定性评价和品质鉴别带来一定困扰^[13]。

作者简介:郁晓艺,女,完美(广东)日用品有限公司中级工程师,硕士。

通信作者:李晓敏(1971—),女,完美(广东)日用品有限公司高级工程师,学士。E-mail:lixiaomin@perfect99.com

收稿日期:2022-08-11 **改回日期:**2022-12-31

尤其随着近年来多肽制备技术的不断推广和逐渐普及,市场开始出现鱼龙混杂、品质良莠不齐等现象。为保障和促进多肽产业的规范、良性发展,对多肽原料开展更精准的稳定性评价和品质鉴别研究已迫在眉睫。

研究拟以相同工艺不同生产批次的大豆低聚肽为研究对象,利用质谱多肽组学分析技术解析原料的多肽组成,再结合集合分析、主成分分析等探讨批次间原料的共性与差异性,以期多肽原料的制备稳定性评价提供新思路,并为相关原料的精准质控提供理论指导和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆低聚肽(A、B、C、D、E共5批次样品):完美(广东)日用品有限公司;

乙腈、甲酸:质谱纯,美国Sigma公司;

超纯水:实验室自制;

色谱柱:1×100 mm HSS T3 (1.8 μm, 1 mm),美国Waters公司。

1.2 主要仪器设备

十万位分析电子天平:Secura125-1CN型,德国赛多利斯公司;

高分辨液相色谱—飞行时间质谱联用仪:X500 LC-ESI-Q-TOF型,美国AB SCIEX公司;

纯水机:Milli-Q型;德国Millipore公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的制备 以大豆低聚肽为样品,用超纯水配置成2 mg/mL溶液,充分溶解后过0.22 μm滤膜上机分析。

1.3.2 高分辨液质联用检测分析 参照Lenco等^[14]的方法修改如下:流动相由体积比1:999的甲酸水溶液(A)和乙腈(B)组成,洗脱方法为:0.00~4.00 min 5.0% B, 4.00~6.00 min 5.0%~10.0% B, 6.00~30.00 min 10.0%~40.0% B, 30.00~34.00 min 40.0%~90.0% B, 34.00~40.00 min 90% B, 40.00~42.00 min 90.0%~5.0% B, 42.00~52.00 min, 5.0% B, 流速0.05 mL/min, 进样量1 μL, 柱温40℃;质谱检测方法:扫描周期0.642 s, ESI离子源温度500℃, 正离子模式, 喷雾电压5 500 V, TOF一级扫描范围100~1 200 Da, 二级扫描范围50~1 200 Da, 工作模式IDA, 最大候选离子数4, 开启动态排除, 其余参数使用蛋白质组学方法默认值。

1.3.3 多肽组学鉴定与分析 使用ProteoWizard 3.0(美国ProteoWizard公司)对质谱数据(wiff2)进行格式转换(Mgf), 再分别采用Proteome Discoverer 2.4(美国Thermo公司)进行长肽鉴定处理和PepOS多肽组学分析软件1.0(广东省五邑大学)进行短肽鉴定处理。其中Proteome Discoverer 2.4的参数设置为多肽长度6~25, 一级母离子误差0.02 Da, 二级子离子误差0.02 Da, 解谱

引擎为Sequest, 蛋白序列库为从UniProt下载得到(<https://www.uniprot.org/>, 检索关键词“soybean”, 下载日期2021年12月1日), 鉴定离子簇类型为a、b和y离子簇, 错误发现率1%, 其他参数使用默认设置;PepOS参数设置为多肽长度2~5, 一级母离子误差0.02 Da, 二级子离子误差0.02 Da, 解谱引擎为Exhaust, 鉴定离子簇类型为a、b和y离子簇, 评分阈值为100分(须至少匹配一种混和离子簇), 并行CPU核心数12。不同批次间样品多肽序列交、并集运算采用Python 3.8、Matlab 2015A进行。多肽离子批量抽提采用SCIEX OS 2.0(美国AB SCIEX), 高丰度多肽手动序列或结构确认采用Biotools 3.2(德国Bruker公司)。

1.3.4 主成分分析 基于样品在质谱中所检测到的一级母离子, 使用MarkerView 1.3(美国AB SCIEX)对不同样品进行PCA主成分分析(Principal Component Analysis), 保留时间差异阈值设置0.50 min, 质荷比差异阈值0.01 Da, 最大获取峰数量3 000, 丰度阈值设置为2 000, 主成分分析因子权重方法为Logarithm, 评分方法为Range Scale。

1.3.5 数据辅助处理与可视化 采用Excel 2013、Origin 2018、Python 3.8、Matlab 2015a等软件进行数据辅助处理与可视化。

2 结果与讨论

2.1 不同批次低聚肽的液质联用分离

由图1可知, 相同工艺不同批次的大豆低聚肽宏观分布基本一致, 但存在细小差异, 可能是由于色谱峰的漂移或自身组成差异所致。样品在T3色谱柱中的分离区间主要集中于1~25 min, 而在25 min后的高有机相洗脱区域仅极少组分流出, 这主要与食源性低聚肽中极性肽段较多有关。食源性低聚肽在制备过程中, 所用酶制剂常为粗酶, 且作用位点大多广泛, 故酶解产物中多肽的特异性较差, 且产物中易存在大量的极性多肽^[10, 15]。这些多肽在反相色谱分离过程中, 常在洗脱初期出现一簇或多簇强响应洗脱峰。T3色谱柱在常规C₁₈色谱柱的基础上, 采用键合技术敲除柱填料表面的部分烷基疏水

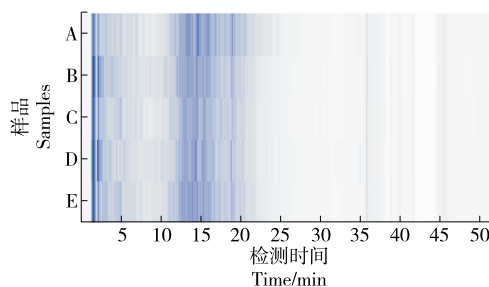


图1 不同批次大豆低聚肽的热度图

Figure 1 Heat maps for soybean oligopeptides from different batches

链,因而较常规 C_{18} 色谱柱更适于食源性低聚肽的液质分离^[16]。此外,试验中,所用 T3 色谱柱为窄内径色谱柱(内径仅为 1 mm),对于提升多肽离子在微升级质谱离子源中的灵敏度亦具有重要作用^[14]。

2.2 多肽组学分析效果评价

对上述质谱数据进行多肽组学分析鉴定,统计各批次样品的谱图和多肽鉴定情况如图 2 所示。其中,谱图鉴定量(Peptide Spectra Matches, PSMs)描述了不同批次

样品在分析过程中所采集到的多肽二级谱图鉴定量,包含重复鉴定为同一肽段的二级谱图^[17];多肽鉴定量描述了不同批次样品经分析鉴定得到的非重复性多肽数量;由图 2 可知,不同批次样品的组学分析效果相近,平均每个样品有约 2 000 张谱图(PSMs)得到鉴定,平均非重复性多肽鉴定数量接近 1 000,平均每条肽段的鉴定支持谱图数量约为 2,说明鉴定结果具有良好的谱图数据支撑,可靠性较高;不同批次样品的制备具有较好的宏观稳定性。

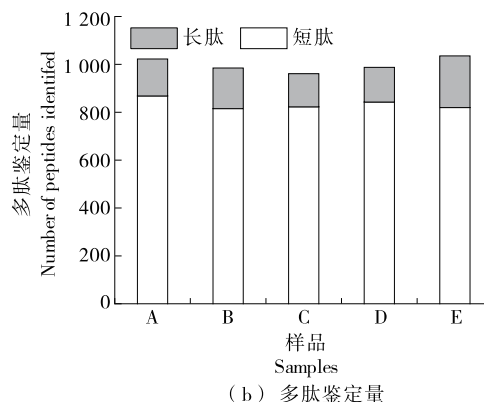
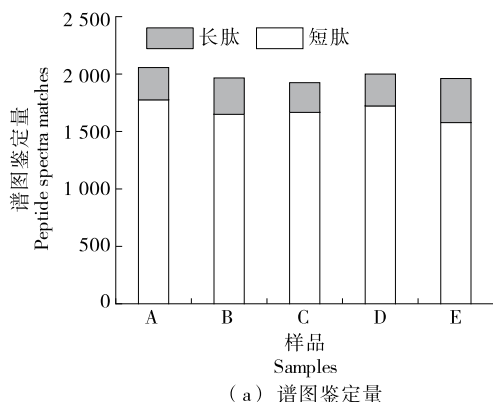


图 2 多肽鉴定效果评价

Figure 2 Performance evaluation of the peptidomic analyses

值得注意的是,上述已鉴定多肽大部分为短肽(长度 2~5),仅有极少部分多肽为长肽。推测这主要与食源性蛋白质在酶解过程中常采用广谱性粗酶有关。广谱性粗酶纯度较低,同时作用位点较为广泛,因而其作用蛋白质后所得产物常呈现为大量的短肽^[18]。为进一步对上述现象进行验证,对样品 A 的多肽组学数据进行进一步统计分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知,低聚肽样品 A 的肽段分布以 2~5 为主,尤以 3~5 居多;低聚肽样品 A 中大部分多肽长度为 2~5,尤以 2~4 的离子峰面积占比较高。这充分验证了上述理论推测,同时,大量短肽的存在亦较好地解释了大豆蛋白经生物酶处理后其溶解性、鲜味特性、消化特性等得以显著提升的原因。

2.3 不同批次间样品的多肽集合分析

由图 4 可知,不同批次样品间存在共性多肽 101 条,其中长肽 10 条,短肽 91 条。与此同时,每个批次样品中均有部分肽段无法在其他批次中被检测到,可能与食源性蛋白质酶解过程的重现性和随机性有关,蛋白酶分子与蛋白底物的相遇和结合在物料反应体系中具有一定的随机性,酶催化位点的断裂亦存在一定的概率随机性,因此其终产物多肽组成分布可能存在一定差异^[19];也可能与质谱检测过程中色谱峰的漂移和离子抑制等有关,当色谱峰存在漂移时,其引发的不同程度的离子抑制可导致多肽质谱检测谱图出现差异,进而导致鉴定结果出现差异^[20]。此外,在质谱离子轰击过程中,亦可能因杂离

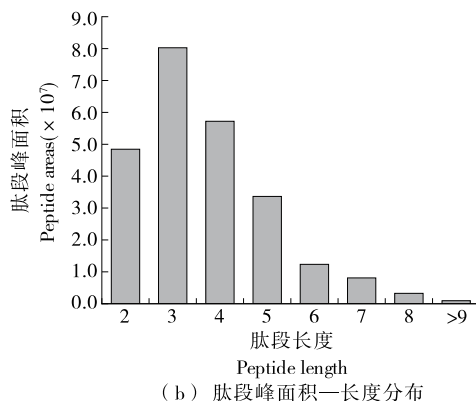
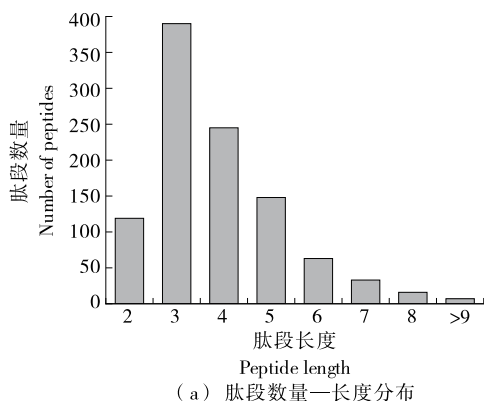


图 3 大豆低聚肽样品的多肽长度分布特性

Figure 3 Length distributions of soybean oligopeptides

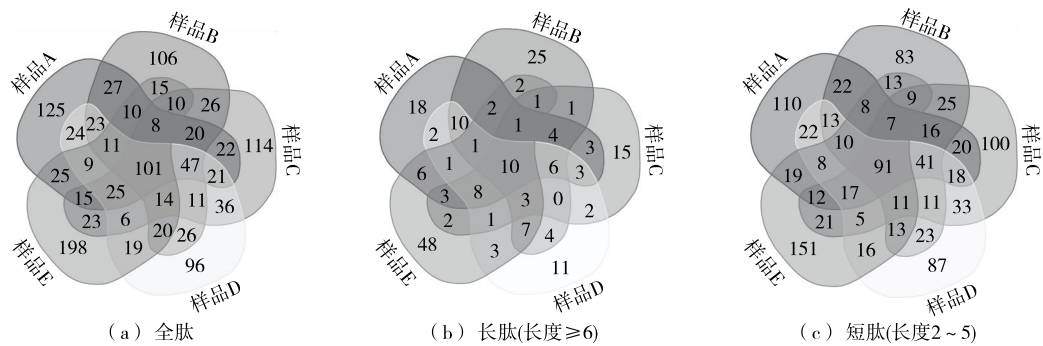


图 4 不同批次间样品的多肽集合分析

Figure 4 Venn diagrams of peptides from samples of different batches

子的干扰导致检测结果出现差异^[21]。目前,消除这些检测差异仍有待质谱技术和多肽组学分析方法的进一步发展。但可以肯定的是,不同批次样品间多肽的组成共性与差异并存。绝对的重现性制备在实际生产中是不存在的,生产过程中任何一种因素的变化都可能导致产物的多肽组成差异。未来,不断提升设备自动化程度和重现性操控能力,将是不断缩小差异提升共性,实现“求同存异”的关键。值得注意的是,样品 E 的独有多肽数量(198)明显高于其他批次样品,在一定程度上反映样品 E 与其他批次样品之间可能存在较大差异。

2.4 不同批次低聚肽的 PCA 主成分分析

对不同批次大豆低聚肽样品进行 PCA 主成分分析,通过对多维质谱数据的降维处理^[22-23],将数据维度和信息简化,并通过得分图中样品间的距离显示样品间差异。图 5 中,样品 A~D 均集中于得分图下半部分,基本形成同类聚集,而样品 E 与其他样品相距较远,在 PC2 轴上显示较大差异,这一现象与图 4 中样品 E 独有多肽数量差异较大的结果相一致。二者均提示样品 E 有别于其他批次样品,反映大豆低聚肽的工业生产稳定性仍有待进一步增强。

2.5 高丰度多肽分析

基于图 4 中所述 5 个批次样品 101 条共性多肽进行离子抽提和峰面积积分,结合非标定量法对上述多肽的

平均相对组成进行简要分析,并对丰度前 10 多肽进行手动序列结构确认,结果见表 1。由表 1 可知,丰度前 10 的多肽大多链长较短,长度以 2~4 居多,但值得注意的是,长肽(SEGLIE)在相对组成中亦占据了不小的比值。说明大豆蛋白经过深度酶促水解处理后,虽然产生了大量的短肽,但与此同时,仍有部分长肽得以保留。这些长肽的保留现象可能与酶制剂的作用特性有关,尽管食品用酶制剂大多为广谱性粗酶,但酶解过程中酶切位点的识别和断裂可能依旧与酶制剂的种类具有一定关联性,不同的酶制剂可能表现出不同的酶切倾向^[6]。研究和掌握这些酶的作用倾向及规律,可为未来活性肽的靶向制备提供关键信息指引。

3 结论

采用肽组学分析技术,对不同批次大豆低聚肽样品中多肽的组成共性与差异展开探讨,评价了大豆低聚肽的工业制备稳定性。不同批次样品的质谱总离子流曲线基本一致,且多肽组学分析效果相近,每种样品的多肽鉴定量均为 1 000 左右,组成均以短肽居多,反映不同批次大豆低聚肽之间具有较好的宏观一致性。然而,进一步

表 1 丰度前 10 共性多肽

Table 1 Top ten abundant peptides presented across the samples of different batches

序号	序列	单电荷离子 质荷比(m/z)	保留时 间/min	相对组成 占比/%
1	FR	322.187 4	4.67	10.61±0.82
2	SGDAL	462.219 4	11.56	5.70±0.53
3	TF	267.134 0	10.27	5.00±0.94
4	LY	295.165 2	11.12	4.83±0.91
5	EDGL	433.192 9	6.60	4.61±0.34
6	VVPQ	442.266 0	6.60	4.03±0.30
7	SEGLIE	704.346 1	15.97	3.31±0.26
8	VVN	331.197 6	2.63	2.77±0.20
9	EFE	424.171 4	11.05	2.64±0.21
10	FQPE	520.240 2	14.33	1.97±0.13

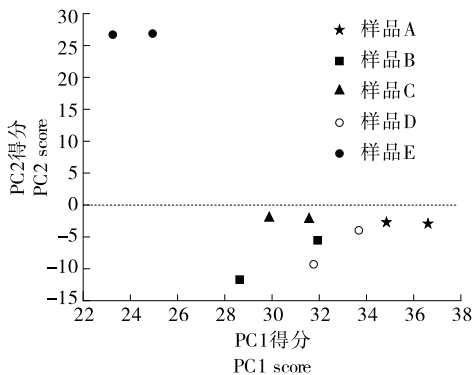


图 5 不同批次低聚肽的 PCA 主成分分析
Figure 5 PCA analysis of samples from different batches

的多肽集合分析和 PCA 分析均提示第 5 批次样品与其他样品间多肽组成差异较大,反映目前大豆低聚肽的工业生产稳定性仍有待进一步加强。相同工艺条件下,不同批次间原料的多肽组成整体表现为共性与差异并存,但在实际生产过程中,应加强质控以逐步缩小差异增强共性,进而提升工业制备的稳定性。未来,在宏观质控的基础上,利用高丰度共性多肽对原料进行精准微观质控,将是多肽质量研究的重要发展方向之一。

参考文献

- [1] LI T N, ZHANG X R, REN Y Y, et al. Antihypertensive effect of soybean bioactive peptides: A review [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2022, 62: 74-81.
- [2] WEN L R, JIANG Y M, ZHOU X S, et al. Structure identification of soybean peptides and their immunomodulatory activity[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 129970.
- [3] ZHANG X, HE H, XIANG J Q, et al. Selenium-containing soybean antioxidant peptides: Preparation and comprehensive comparison of different selenium supplements [J]. *Food Chemistry*, 2021, 358: 129888.
- [4] 应欣. 大豆低聚肽降压功能、结构解析及其双重乳液苦味掩蔽技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020: 30-40.
YING X. Antihypertensive activity and structural analysis of soy oligopeptides and bitterness masking of peptides by double emulsion[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis, 2020: 30-40.
- [5] 杨晓, 王敏, 刘畅, 等. 大豆肽与牛磺酸复合粉的抗疲劳作用[J]. *食品与机械*, 2018, 34(1): 140-143.
YANG X, WANG T, LIU C, et al. Effects of soybean peptide and taurine compound powder on anti fatigue ability in mice[J]. *Food & Machinery*, 2018, 34(1): 140-143.
- [6] CABANOS C, MATSUOKA Y, MARUYAMA N. Soybean proteins/peptides: A review on their importance, biosynthesis, vacuolar sorting, and accumulation in seeds[J]. *Peptides*, 2021, 143: 170598.
- [7] ZHANG C, XIA S Q, ZHANG Y X, et al. Identification of soybean peptides and their effect on the growth and metabolism of *Limosilactobacillus reuteri* LR08[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130923.
- [8] ZHANG C, ZHANG Y X, LIU G R, et al. Effects of soybean protein isolates and peptides on the growth and metabolism of *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 77: 104335.
- [9] REN J, LI S J, SONG C L, et al. Black soybean-derived peptides exerted protective effect against alcohol-induced liver injury in mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 87: 104828.
- [10] MARTINI S, SOLIERI L, TAGLIAZUCCHI D. Peptidomics: New trends in food science[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 39: 51-59.
- [11] 马福建, 高长城, 解迪, 等. 大豆 11S 球蛋白水解肽的制备及抗氧化研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(11): 89-93.
MA F J, GAO C C, XIE D, et al. Preparation and antioxidant activity of soybean 11S globulin hydrolyzed peptide [J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(11): 89-93.
- [12] 王升光, 于帅, 孟凡刚, 等. 酶法制备大豆肽的相对分子量分布及降压作用研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(1): 46-51.
WANG S G, YU S, MENG F G, et al. Study on relative molecular weight distribution and depressor effect of soybean peptide prepared by enzymatic method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(1): 46-51.
- [13] 李莹莹, 康超娣, 张颖颖, 等. 牛肌红蛋白热加工过程中多肽稳定性影响因素分析及其在真实性鉴别中的应用[J]. *食品科学*, 2020, 41(19): 1-8.
LI Y Y, KANG C D, ZHANG Y Y, et al. Peptides derived from bovine myoglobin: Factors affecting their stability during thermal processing and application in meat authenticity identification[J]. *Food Science*, 2020, 41(19): 1-8.
- [14] LENCO J, VAJRYCHOVA M, PIMKOVA K, et al. Conventional-flow liquid chromatography-mass spectrometry for exploratory bottom-up proteomic analyses[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(8): 5 381-5 389.
- [15] CHATTERJEE C, GLEDDIE S, XIAO C W. Soybean bioactive peptides and their functional properties[J]. *Nutrients*, 2018, 9(10): 1-16.
- [16] BAUMANS F, HANOZIN E, BAIWIR D, et al. Liquid chromatography setup-dependent artefactual methionine oxidation of peptides: The importance of an adapted quality control process [J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1 654: 462449.
- [17] LUALDI M, FASANO M. Statistical analysis of proteomics data: A review on feature selection[J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 198: 18-26.
- [18] KLEEKAYAI T, FITZGERALD R J. Protein hydrolysates and peptides [M]// MCSWEENEY P L H, MCNAMARA J P. *Encyclopedia of dairy sciences*. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2022: 154-166.
- [19] YANG J H, GAO Z Q, REN X H, et al. DeepDigest: Prediction of protein proteolytic digestion with deep learning [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(15): 6 094-6 103.
- [20] GRITTI F, DAVID M, BROTHY P, et al. Model of retention time and density of gradient peak capacity for improved LC-MS method optimization: Application to metabolomics[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1 197: 339492.
- [21] NEMANIC V, ZUMER M, LAKNER M. Reduction of measurement error due to the interference effect in a quadrupole mass spectrometer[J]. *Measurement*, 2021, 184: 109987.
- [22] 保丽红. 主成分分析与线性判别分析降维比较[J]. *统计学与应用*, 2020, 9(1): 47-52.
BAO L H. Dimension reduction comparison between PCA and LDA[J]. *Statistical and Application*, 2020, 9(1): 47-52.
- [23] 杨开睿, 孟凡荣, 梁志贞. 一种自适应权值的 PCA 算法[J]. *计算机工程与应用*, 2012, 48(3): 193-195.
YANG K R, MENG F R, LIANG Z Z. Adaptively weighted PCA algorithm[J]. *Computer Engineering and Applications*, 2012, 48(3): 193-195.