DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250702004
引用格式: 潘静怡, 杨悦, 王方. 核桃粕酶解多肽的抗氧化与抗疲劳活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 305–315.
PAN JY, YANG Y, WANG F. Study on the antioxidant and anti-fatigue activities of enzymatic hydrolyzed peptides from walnut meal [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 305–315. (in Chinese with English abstract).

核桃粕酶解多肽的抗氧化与抗疲劳活性研究

潘静怡[1], 杨　悦[2], 王　方[2*]

(1. 绍兴职业技术学院, 绍兴　312000; 2. 河南工业大学漯河工学院, 漯河　462000)

摘　要: 目的　探讨核桃粕酶解多肽的两步酶解制备工艺, 研究其体外抗氧化与抗疲劳活性。**方法**　利用单因素实验及响应面实验找出最优两步酶解制备桃粕酶解多肽方法, 并进行二苯基苦基肼基自由基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, DPPH)、羟基自由基、超氧阴离子自由基与总还原力的测定判定其抗氧化能力; 采用小鼠游泳力竭实验来评估核桃粕酶解多肽的抗疲劳效果。**结果**　得到制备核桃粕酶解多肽的两部酶解法最优组合为: 碱性蛋白酶 2000 U/g, 碱性蛋白酶 pH 为 9.0, 风味蛋白酶用量 1000 U/g。与抗坏血酸进行对比得到 DPPH 自由基清除能力的半抑制浓度为(0.25±0.01) mg/mL、羟基自由基清除能力的半抑制浓度为(0.96±0.01) mg/mL、超氧阴离子自由基清除能力的半抑制浓度为(0.25±0.01) mg/mL, 说明核桃粕酶解多肽具有一定的体外抗氧化活性。经过小鼠实验发现, 核桃粕酶解多肽对小鼠无负面作用, 且可有效延长小鼠游泳时间, 维持体内糖原及抗氧化酶含量, 降低血清代谢废物及过氧化物的积累, 起到一定的抗疲劳效果。**结论**　通过两步酶解法制备出具有体外抗氧化体内抗疲劳的核桃粕酶解多肽, 其在开发具有抗氧化抗疲劳功能的健康食品或功能性食品配料方面具有巨大的应用潜力。

关键词: 核桃粕; 复合酶解; 多肽; 抗氧化活性; 抗疲劳活性

Study on the antioxidant and anti-fatigue activities of enzymatic hydrolyzed peptides from walnut meal

PAN Jing-Yi[1], YANG Yue[2], WANG Fang[2*]

(1. *Shaoxing Vocational & Technical College*, *Shaoxing* 312000, *China*;
2. *Luohe Institute of Technology*, *Henan University of Technology*, *Luohe* 462000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To explore the two-step enzymatic hydrolysis process for preparing walnut meal enzymatic peptides, and study their *in vitro* antioxidant and anti-fatigue activities. **Methods**　Single-factor experiments and response surface experiments were used to determine the optimal two-step enzymatic hydrolysis method for preparing walnut meal enzymatic peptides. The antioxidant capacity was evaluated by determining the scavenging effects on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, hydroxyl radicals, and superoxide anion radicals, as well as the total reducing power. The anti-fatigue effect was assessed using a mouse swimming exhaustion test. **Results**　The optimal combination for preparing walnut meal enzymatic peptides through two-step

收稿日期: 2025-07-02
第一作者: 潘静怡(1989—), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品营养。E-mail: 181065008@qq.com
***通信作者:** 王方(1982—), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品加工工艺。E-mail: 68819327664@qq.com

enzymatic hydrolysis was as follows: Alkaline protease at 2000 U/g, pH of 9.0 for alkaline protease, and flavor protease at 1000 U/g. Compared with ascorbic acid, the half-maximal inhibitory concentration for DPPH radical scavenging was (0.25±0.01) mg/mL, the half-maximal inhibitory concentration for hydroxyl radical scavenging was (0.96±0.01) mg/mL, and the half-maximal inhibitory concentration for superoxide anion radicals scavenging was (0.25±0.01) mg/mL, indicating that walnut meal enzymatic peptides had certain *in vitro* antioxidant activity. The mouse experiments revealed that walnut meal enzymatic peptides had no negative effects on mice and could effectively prolong their swimming time, maintain the levels of glycogen and antioxidant enzymes in the body, and reduce the accumulation of serum metabolic waste and peroxides, demonstrating a certain anti-fatigue effect. **Conclusion** The two-step enzymatic hydrolysis method is successfully used to prepare walnut meal enzymatic peptides with *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-fatigue activities, which have great application potential in the development of health foods or functional food ingredients with antioxidant and anti-fatigue functions.

KEY WORDS: walnut meal; complex enzymatic hydrolysis; polypeptide; antioxidant activity; anti-fatigue activity

0 引 言

疲劳已成为现代社会普遍存在的健康挑战，其与多种慢性疾病的发展和生活质量的下降密切相关。如何解决疲劳状态下能量代谢失衡导致的负面影响，已成为现代营养健康领域的研究热点。食源性生物活性肽具有良好的生物相容性、低毒性及多种生理调节功能，与咖啡因、退黑素等[1]具有一定副作用的物质相比更符合现代人对健康的追求。目前，已有诸多学者对食源性生物活性肽进行探索，发现其具有多种功能活性，例如：杨策等[2]从火麻脱脂蛋白中分离出了一种具有降血糖活性的多肽；江含秀等[3]从不同苦荞蛋白中进行分离得到高抗氧化性的多肽。

核桃作为重要的油料作物，其榨油后产生大量副产物—核桃粕，核桃粕通常含有高达 40%~50%的优质蛋白质，但目前其利用价值普遍较低，多被用作饲料或废弃，不仅造成宝贵的植物蛋白资源浪费，也带来一定的环境压力[4]。酶解技术因其反应条件温和、特异性强、产物可控且安全性高等优点，可以高效释放出核桃粕蛋白中潜在生物活性肽[5]——核桃粕酶解多肽(walnut meal enzymatic hydrolysate peptides, WMEP)。目前有部分学者对 WMEP 进行相应研究，但研究大多在体外抗氧化[6]及油脂提取[7]方面进行探索。鉴于此，本研究将酶解技术、体外抗氧化与体内抗疲劳相结合，建立动物运动性疲劳模型，综合评价 WMEP 的抗疲劳效果，并通过分析血清中的氧化应激指标以期揭示其潜在的生物学机制，发掘出天然、安全的抗氧化抗疲劳新资源，满足健康市场需求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃粕(新疆和田果之初食品股份有限公司)；碱性蛋白酶(酶活≥16 U/g)、风味蛋白酶(100000 U/g)(上海麦克林生化科技股份有限公司)；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、乳清肽、过硫酸钾、水杨酸、乙醇、硫酸亚铁、过氧化氢、抗坏血酸(ascorbic acid, VC)(分析纯，国药集团化学试剂有限公司)。

血乳酸(lactic acid, LA)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肝糖原、肌糖原、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究院)。

实验动物：SPF 级雄性昆明小鼠，5~6 周龄，体质量(20±2) g：湖南斯莱克景达实验动物有限公司[动物许可证号：SCXK(湘)2019-0004]。

1.2 仪器与设备

BSA224S 实验室电子分析天平[精度 0.0001 g，赛多利斯莱珀思(上海)贸易有限公司]；CTK80 台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)；H04-1 磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司)；FD-1D-80 真空冷冻干燥机冻干机[博医康(北京)仪器有限公司]；SN-RE-201D 旋转蒸发仪(上海尚仪仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 核桃粕酶解多肽的制备

核桃粕的脱脂：将核桃粕与正己烷以 1:10 (g:mL)的比例置于 40 ℃磁力搅拌器上，以 50 r/min 搅拌脱脂 2 h，重复进行 3 次，得到脱脂核桃粕。

核桃粕蛋白(walnut meal protein, WMP)的制备：将脱脂核桃粕粉与去离子水以 1:15 (g:mL)的比例进行混合，调节溶液 pH 为 11.0，用磁力搅拌器加热至 45 ℃, 80 r/min 搅拌 90 min，后以 8000 r/min 离心 20 min 后收集上清，调上

清 pH 为 4.5。静置半小时后, 以 3000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 沉淀物加去离子水调节 pH 为 7.0 后使用真空冷冻干燥机冻干 24 h, 得到 WMP 粉末。

WMEP 的制备: 用去离子水将 WMP 配制为 5%的溶液, 而后调溶液 pH 为 9.0, 温度稳定在 55 ℃后加入 2000 U/g WMP 的碱性蛋白酶, 酶解 3 h 过程中持续搅拌, 而后沸水浴 10 min 灭酶, 冷却至室温后将 pH 调至 7.0, 温度稳定在 50 ℃, 加入 1000 U/g WMP 的风味蛋白酶, 酶解 2 h, 而后沸水浴 10 min 灭酶。静置室温后以 5000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 进行 30 min 的 3%用量活性炭吸附后用 3 kDa 超滤膜进行超滤, 经旋转蒸发仪浓缩后的液体进行冷冻干燥, 得到 WMEP 粉末[8]。

1.3.2　核桃粕酶解多肽制备优化

对两步酶解时的温度(45、50、55、60、65 ℃)、酶用量(500、1000、1500、2000、2500、3000 U/g)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)、酶解 pH(碱性蛋白酶: 7、8、9、10、11; 风味蛋白酶: 5、6、7、8、9)、活性炭吸附时间(10、20、30、40、50 min)及超滤膜截留量(1、2、3、4、5 kDa)进行单因素实验优化。酶解时单因素指标为多肽得率、活性炭吸附时单因素指标为脱色率, 超滤膜截留时单因素指标以多肽得率及多肽抗氧化活性综合考量。

并取碱性蛋白酶酶用量(*A*)、碱性蛋白酶 pH (*B*)及风味蛋白酶酶用量(*C*), 多肽得率为因变量(*Y*)进行响应面实验, 表 1 为响应面实验因素水平表。

表 1　Box-Behnken 实验设计因素与水平
Table 1　Levels and factors in Box-Behnken experimental design

因素	水平		
	–1	0	1
A: 碱性蛋白酶用量/(U/g WMP)	1500	2000	2500
B: 碱性蛋白酶 pH	8	9	10
C: 风味蛋白酶用量/(U/g WMP)	500	1000	1500

多肽得率的测定方法: 使用戴梦萍等[9]的方法进行测定。

脱色率的测定方法: 取 5 mL 吸附前后上清液, 在 420 nm 处测定吸光度。脱色率按公式(1)进行计算。

$$脱色率/\%=(1-A_{420\ 处理后}/A_{420\ 处理前})\times 100\% \quad (1)$$

1.3.3　抗氧化活性测定方法

以 VC 为对照组对 WMEP 的自由基清除率及总还原能力等抗氧化活性进行测定, DPPH 自由基清除率的测定与 • OH 自由基清除率的测定按照李宣达[10]的方法进行。

总还原能力的测定: 按照金丹莉等[11]的操作进行铁离子还原抗氧化能力的测定。

1.3.4　小鼠分组方法

60 只雄性昆明小鼠在结束适应性喂养后随机分为 6 组, n=10, 分组详情、灌胃处理肌运动情况见表 2。结束适应性喂养后固定于每早 9:00 灌胃, 持续 28 d, 灌胃期间小鼠自由饮食。第 28 d 灌胃后 3 h, 进行游泳力竭实验, 将小鼠放入装有 30 cm 水的水桶中, 从放进时开始计时, 在小鼠游泳期间用玻璃棒轻轻搅动水面, 刺激小鼠游动, 待小鼠完全沉入水下不再挣扎即为游泳力竭, 结束计时[13]。而后将小鼠注射死亡, 眼眶取血, 仔细分离肝脏、肾脏等器官。

表 2　小鼠分组情况
Table 2　Grouping information of the mice

组名	灌胃情况	是否游泳
对照组 (CK)	0.2 mL 生理盐水	否
阴性对照组 (NC)	0.2 mL 生理盐水	是
阳性对照组 (PC)	0.2 mL 乳清肽[12] 乳清肽剂量: 0.5 mg/g • bw/d	是
WMEP 低剂量组 (WL)	0.2 mL WMEP WMEP 剂量: 0.2 mg/g • bw/d	是
WMEP 中剂量组 (WM)	0.2 mL WMEP WMEP 剂量: 0.5 mg/g • bw/d	是
WMEP 高剂量组 (WH)	0.2 mL WMEP WMEP 剂量: 1.0 mg/g • bw/d	是

1.3.5　小鼠生理生化指标测定方法

体重: 每天固定时间进行测定, 并记录。

肝脏、肾脏指数: 将肝脏、肾脏处理干净, 无血污后称重, 分别与对应小鼠体重相比即为肝脏、肾脏指数。

肝、肌糖原、BUN、LA、SOD、CAT、GSH-Px 及 MDA 的测定按照相关试剂盒的要求进行测定。

1.4　数据处理

所有实验均设置 3 次重复。采用 Origin 2021 进行数据绘图, 并运用 SPSS 26.0 统计软件完成数据与显著性水平分析。

2　结果与分析

2.1　核桃粕酶解多肽单因素实验

核桃粕主要由 40%~50%的蛋白质与 30%~40%的膳食纤维组成, 其中蛋白质主要包括谷蛋白与醇溶蛋白, 其中含有大量的疏水性氨基酸, 膳食纤维主要包括纤维素、半纤维素等, 由其包裹蛋白质, 增强组织稳定性[14]。碱性蛋白酶与风味蛋白酶分别针对不同结构进行靶向酶解, 形成互补效应。碱性蛋白酶主要破坏蛋白质的刚性结构暴露出更多的酶切位点[15], 同时, 碱性条件可以形成纤维-蛋白复合物, 提高酶与底物的接触点; 但碱性蛋白酶水解产物会产生大量—C 端疏水性氨基酸, 存在苦味重、口感差等劣势。风味蛋白酶的加入可以切除这一位点, 显著降低苦味产生[16], 且经过风味蛋白酶的进一步酶解可以生产出更多具有更高生物活性的短肽片段。

图 1(A)为两步酶解中对酶解温度的单因素实验结果, 可以看出随着温度的升高, 两种酶的多肽得率都呈现出先

增后降的趋势，碱性蛋白酶的最适酶解温度为 55 ℃，风味蛋白酶的最适酶解温度为 50 ℃。图 1(B)为两步酶解中对酶添加量的单因素实验结果，随着两种酶添加量的增加，多肽得率出现了先增加后缓慢下降的趋势，但二者峰值不同，对于碱性蛋白酶来说，其最适添加量为 2000 U/g WMP；风味蛋白酶最适添加量为 1000 U/g WMP。图 1(C)为两步酶解中对酶解时间的单因素实验结果，随着酶解时间的增长，碱性蛋白酶的多肽得率出现先剧烈增加再平缓的趋势，风味蛋白酶在 5 h 的酶解过程中一直保持相对平稳。由此，碱性蛋白酶的酶解时间设置为 3 h；风味蛋白酶设置为 2 h。图 1(D)为两步酶解中对酶解 pH 的单因素实验结果，随着 pH 的升高，两种酶的多肽得率均出现先增后降的趋势，其中，碱性蛋白酶的最适 pH 为 9；风味蛋白酶的最适 pH 为 7。

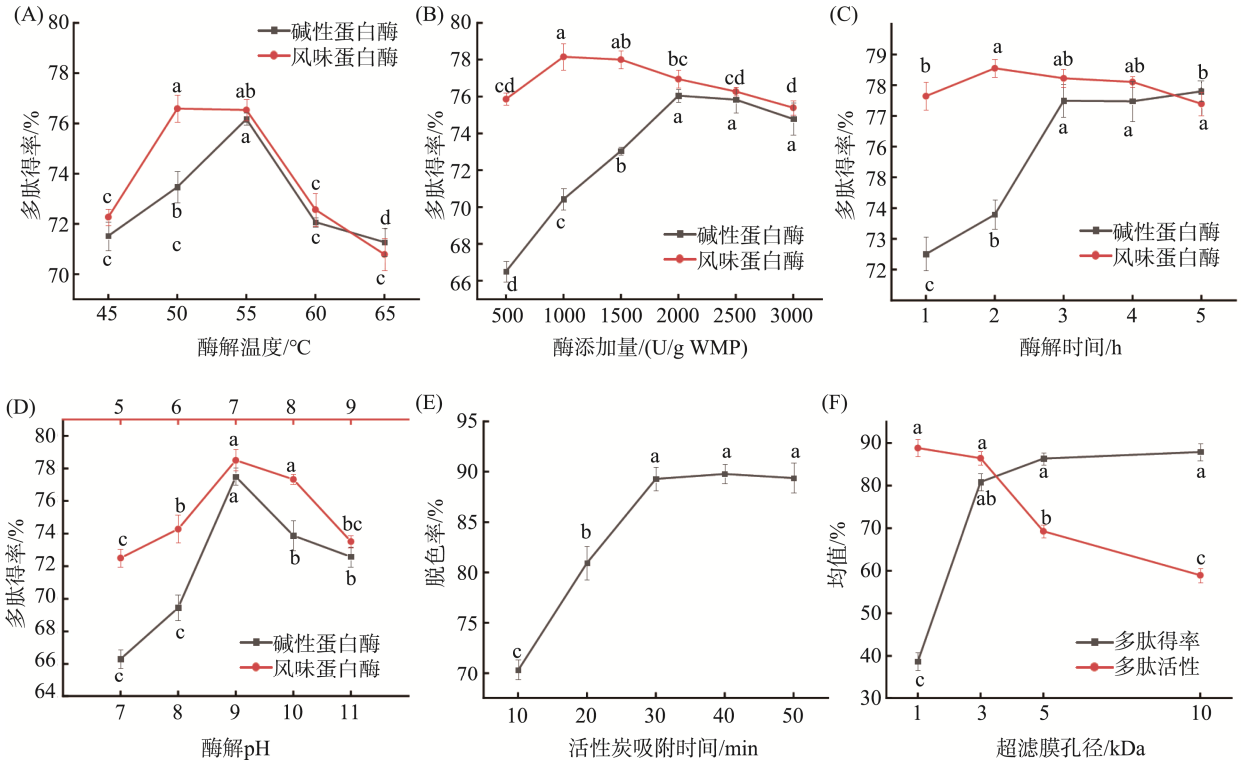
由两步酶解制备出的酶解液中含有多种物质，包括目标活性肽、未完全酶解的大分子、碳水化合物、脂质、氧化物、色素及多酚等。其中，脂质及氧化物会令酶解液存在异味并破坏酶解液的稳定性；包括单宁、类黑精在内的色素与多酚使得酶解液颜色变深，抑制目标活性肽的抗氧化性并产生一定涩味。使用活性碳吸附是最有效去除脂质及色素的方法，并且不会对肽的结构造成影响，经吸附脱色的浅色产品更符合商业需求。图 1(E)为不同活性炭吸附时间下的脱色率，可以清晰看出 10~30 min 脱色率逐渐上升，到达 30 min 脱色饱和，30 min 后延长时间脱色率已无显著变化，故选择固定 30 min 为活性炭脱色时间。

酶解液中的杂质已经过一步去除，但多肽的分子量并不均匀，通过超滤膜截留作用可以把不同分子量区间的多肽相分离，并通过实验判断出抗氧化性更好的多肽分子量区间[17]。图 1(F)为不同规格超滤膜对酶解液截流得到的多肽得率及多肽活性图，从中可以看出：随着超滤膜孔径的增大，得到肽的多肽得率上升但抗氧化活性出现一定下降[18]。结合多肽得率与抗氧化性综合考虑，选取固定 3 kDa 的超滤膜进行后续实验。

2.2 响应面实验结果

表 3 为响应面实验设计及结果表。采用 Design-Expert 13 软件对得到的实验结果进行回归分析，得到的关于多肽得率的回归方程为：Y=79.61+2.38A+2.09B–0.4811C–2.24AB–0.2575AC+0.9847BC–8.60A^2–7.59B^2–7.94C^2。

表 4 为响应面结果的方差分析表。从中可以看出，模型整体显著，失拟项不显著，说明模型良好，可以用来较好地分析和预测响应值。同时，根据显著性进行判断可知 3 个因素均对多肽得率具有显著性影响，其中风味蛋白酶含量的影响低与其余二者，碱性蛋白酶用量与 pH 的交互



注：不同字母表示同一指标具有显著性差异，P<0.05。图 3~7 同。

图 1 单因素实验结果

Fig.1 Results of the single-factor experiment

表 3　Box-Behnken 响应面实验设计及结果

Table 3　Design and results of Box-Behnken experimental

实验号	*A*: 碱性蛋白酶用量/(U/g WMP)	*B*: 碱性蛋白酶 pH	*C*: 风味蛋白酶用量/(U/g WMP)	多肽得率/%
1	1500	8	1000	57.23
2	2500	8	1000	66.01
3	1500	10	1000	65.32
4	2500	10	1000	65.13
5	1500	9	500	60.53
6	2500	9	500	66.26
7	1500	9	1500	60.41
8	2500	9	1500	65.11
9	2000	8	500	63.34
10	2000	10	500	66.12
11	2000	8	1500	60.08
12	2000	10	1500	66.80
13	2000	9	1000	79.34
14	2000	9	1000	79.76
15	2000	9	1000	79.31
16	2000	9	1000	79.99
17	2000	9	1000	79.67

作用显著, 但碱性蛋白酶用量与风味蛋白酶用量并无交互作用, 且所有的二次项均为极显著因素, 说明该模型存在非线性关系, 并存在最佳工艺条件。同时, 预测决定系数(predicted R^2, R_{Pre}^2)与调整后决定系数(adjusted R^2, R_{Adj}^2)差值小于 0.2, 说明模型具有较好的预测能力, 精度在大于 4 时具有优秀的衡量信号(真实效应)与噪声(随机误差)的比, 本模型比值远超于 4, 符合条件。以上均说明本模型温度可靠, 可以用于实际应用。

图 2 为相应曲面及等高线图。在相应曲面图中, 曲面的坡度越陡则说明两因素的交互作用越大; 等高线图中, 形成的曲线越接近椭圆则说明两因素交互作用越大, 越接近圆说明交互作用越弱。从图 2 可以看出 *A* 与 *B* 的交互作用最强, *B* 与 *C* 次之, 结果与方差分析表相吻合。

Design-Expert 13 软件给出的关于以多肽得率为响应值, 碱性蛋白酶酶用量、碱性蛋白酶 pH 及风味蛋白酶酶用量进行的三因素三水平的最优解为: 碱性蛋白酶酶用量 1985.339 U/g, 碱性蛋白酶 pH 为 8.811, 风味蛋白酶酶用量 1196.702 U/g, 理想的 WMEP 得率为 77.372%。进行验证实验时, 将其设置为: 碱性蛋白酶酶用量 2000 U/g, 碱性蛋白酶 pH 为 9.0, 风味蛋白酶酶用量 1000 U/g, 得到的实际 WMEP 得率为 74.958%±1.230%, 与理想值的相对误差为 2.241%, 相差不大, 说明本模型可以用于实际生产中。

2.3　抗氧化活性结果

VC 作为被研究最广泛的抗氧化物质, 其抗氧化机制已十分明确, 主要机制为通过电子或氢原子转移来淬灭自由基[18–19], 采用 VC 作为对照组来评价多肽的抗氧化能力已十分普遍[20]。图 3(A)为不同浓度 WMEP 与 VC 对 DPPH 自由基清除率的影响。随着 WMEP 浓度的升高, DPPH 清除率也在显著上升, 但仍略低于 VC 组, 测定 WMEP 清除 DPPH 自由基能力的半抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})值为(0.25±0.01) mg/mL。

图 3(B)为不同浓度 WMEP 与 VC 对超氧阴离子自由基清除率的影响, 超氧阴离子自由基是一种由线粒体电子传递产生的弱自由基, 同时也被认为是产生活性氧的先决条件, 而活性氧是导致大量疾病的原因之一[21]。WMEP 的超氧阴离子自由基清除率显著低于 VC, 但呈现出一种缓慢上升的趋势。计算得到 WMEP 清除超氧阴离子自由基能力的 IC_{50} 值为 1.95 mg/mL。

表 4　响应面结果方差分析表

Table 4　Analysis of variance table of response surface results

来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	1021.482	9	113.498	488.8191	<0.0001	**
A	45.22005	1	45.22005	194.7561	<0.0001	**
B	34.89884	1	34.89884	150.3042	<0.0001	**
C	1.85185	1	1.85185	7.975647	0.025621	*
AB	20.11523	1	20.11523	86.63333	<0.0001	**
AC	0.265225	1	0.265225	1.142285	0.320635	
BC	3.87893	1	3.87893	16.70598	0.004647	**
A^2	311.3616	1	311.3616	1340.989	<0.0001	**
B^2	242.6611	1	242.6611	1045.106	<0.0001	**
C^2	265.2178	1	265.2178	1142.254	<0.0001	**
残差	1.625316	7	0.232188			
失拟项	1.292325	3	0.430775	5.174612	0.073103	NS
净误差	0.332991	4	0.083248			
总误差	1023.107	16				
		R^2=0.9984	R_{Adj}^2=0.9964	R_{Pre}^2=0.9793		

注: *表示差异显著, P<0.05; **表示差异极显著, P<0.001; NS 表示差异不显著。

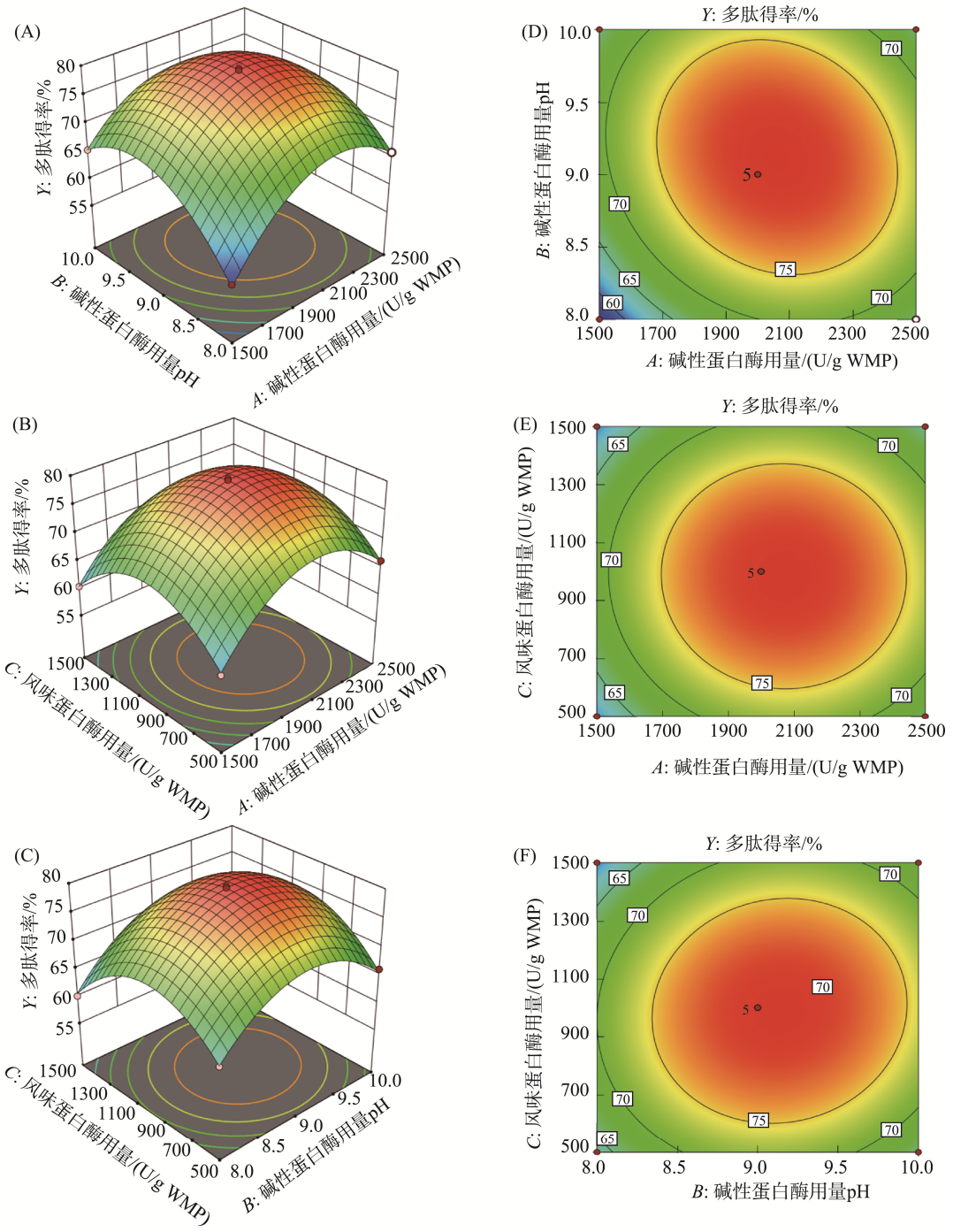


图 2 响应曲面及等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots

图 3(C)为不同质量浓度 WMEP 与 VC 对羟基自由基清除率的影响，羟基自由基会对体内蛋白质、核酸、脂类等生物分子造成损伤，并引发疾病[22]。随着 WMEP 质量浓度的升高，羟基自由基清除率升高趋势显著性增强，在 6 mg/mL 时已接近VC的羟基自由基自由基清除率，表明WMEP具有良好的羟基自由基自由基清除能力。经过计算得到 WMEP 清除羟基自由基自由基的 IC_{50} 值为(0.96±0.01) mg/mL。

总还原能力可以判断出物质的抗氧化潜力，具有较高还原能力的物质可以更容易地将电子转移给其他物质，来保护该物质免受还原损伤[23]。还原力越高的物质保护细胞和组织免受氧化损伤的能力越强。图 3(D)为不同浓度 WMEP 与 VC 总还原力的结果。随着物质质量浓度的升高，二者的还原能力都有一定浮动，对于 WMEP 来说，质量浓度越高，总还原能力有着显著性的上升。虽然在 1~6 mg/mL 的质量浓度范围内，WMEP 的还原能力始终低于 VC，但结果显示，WMEP 仍具有一定的总还原能力。

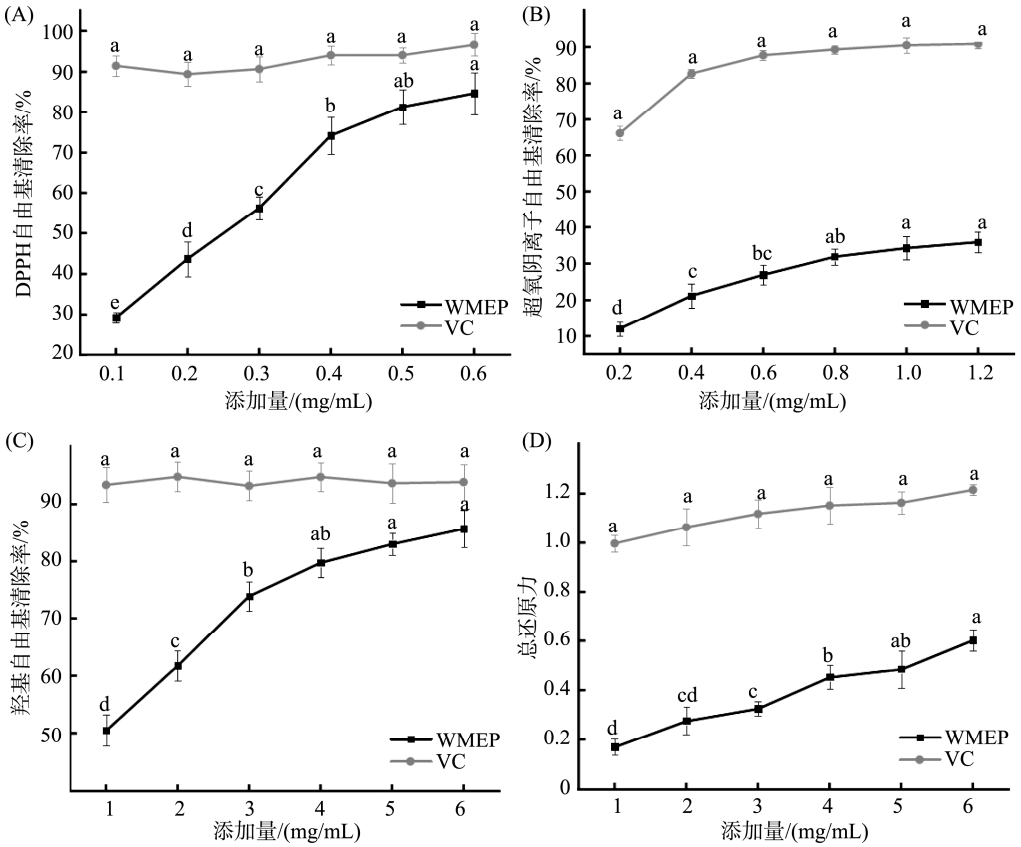


图 3　抗氧化活性测定结果

Fig.3　Determination results of antioxidant activity

2.4　抗疲劳活性结果

评估小鼠基本生理状态最直接的指标就是小鼠体重。小鼠可能因为药物潜在的副作用或实验操作产生一定应激反应，而显著的体重下降往往就是小鼠多度应急或是被药物潜在毒性干扰所导致的[24]。图 4(A)为小鼠 28 d 内的体重变化，可以清晰看出各组小鼠体重均呈平稳增长趋势，且同期组间无显著差异，表明实验条件下小鼠生长正常，未诱发应激反应，WMEP 对体重增长无显著影响。

游泳力竭时间是判断小鼠运动耐力增长的最直观、简单的途径[25]。以 NC 组进行对比可观察出灌胃乳清肽与 WMEP 的作用效果强弱。图 4(B)为各组小鼠的游泳力竭时间，从中可以清晰看出 NC 组最快达到力竭；PC 组力竭时间显著延长(P<0.05)，表明乳清肽可有效提升运动耐力；WL 组与 NC 组无显著差异，WM 组抗疲劳效果与 PC 组相当，WH 力竭时间最长。结果表明 WMEP 可剂量依赖性地延缓运动性疲劳，其效应随剂量增加而增强。

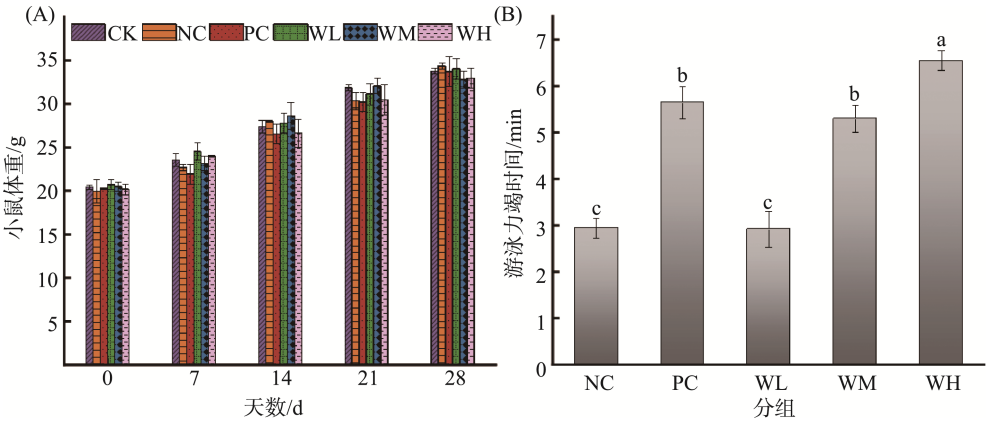


图 4　小鼠体重(A)与游泳力竭时间(B)

Fig.4　Body weight (A) and swimming exhaustion time (B) of mouse

疲劳与高强度的剧烈运动都有可能引起组织损伤、炎症与代谢紊乱，导致器官水肿或萎缩，表现为肝脏、肾脏系数就会相应增大或减少[26]。同时，由于器官具有不同的代谢功能，肝脏主要负责能量代谢、解毒与糖原储存，而肾脏负责排泄代谢废物；疲劳状态下肝脏承担的代谢压力更大，通过器官系数的变化可以间接反映出器官在疲劳应激时的状态。图 5(A)为各组小鼠的肝脏、肾脏指数，从中可以看出各组间肝、肾器官系数无显著差异(P>0.05 *vs* CK 组)，表明 WMEP 干预未引起小鼠器官毒性反应或病理性负荷改变。

糖原是直接反映核心能量储备的指标之一，疲劳往往伴随着显著的糖原消耗。肌糖原不足会直接导致外周疲劳，也是公认的运动疲劳的关键机制[27]；肝糖原不足是中枢系统疲劳的导火索之一，也会影响机体的整体耐力。图 5(B)为各组小鼠的肝、肌糖原含量，其中运动组的肝、肌糖原含量整体上显著低于 CK 组，其中 NC 组降幅最大。而灌胃 WMEP 各组与 PC 组在肝糖原方面无显著差异，表明 WMEP 与乳清肽具同等肝糖原恢复功效。WL 组与 PC 组在肌糖原方面无显著差异，而 WM 与 WH 组显著高于 PC 组，表明 WMEP 中高剂量可增强肌糖原储备，减少运动消耗。

高强度运动后，机体中会存在大量的代谢废物，BUN 与 LA 是其中的代表性物质。BUN 作为蛋白质代谢终产物，其水平反映能量代谢状态：正常情况下能量充足，BUN 维持低水平；高强度运动时因糖类供能不足，触发蛋白质分解供能，导致 BUN 显著升高[28]。因此，BUN 水平直接指示运动性疲劳程度，高水平 BUN 表明蛋白质分解供能占比升高，机体疲劳加重；低水平下糖脂供能主导，疲劳程度较轻。图 6(A)为各组小鼠的 BUN 含量，其中 CK 组小鼠未出现疲劳状态；NC 组小鼠在运动小鼠中的 BUN 水平及疲劳状态最高；WL 与 WM 组小鼠在 BUN 水平上与 PC 组无显著性差异，WH 组小鼠 BUN 水平显著低于 WL、WM 组，说明高浓度的 WMEP 在缓解机体疲劳方面更有优势。

LA 作为糖酵解终产物，其水平反映了糖酵解过程的活跃程度。高浓度 LA 会起到抑制骨骼肌收缩的功能，加速疲劳发生[29]；低浓度的 LA 水平则表明机体以有氧代谢为主，机体无明显疲劳感。图 6(B)为各组小鼠的 LA 含量，从中可以清晰看出 CK 组小鼠未经高强度运动，机体进行正常的有氧代谢，LA 含量最低，疲劳感也最低；NC 组体内发生大量无氧代谢，机体疲劳感为 6 组中最高；与 BUN 相似，灌胃 WMEP 低、中、高剂量组的 LA 含量与 PC 无显著性差异，说明 WMEP 的各剂量组都可以达到与乳清肽同等的抗疲劳作用。

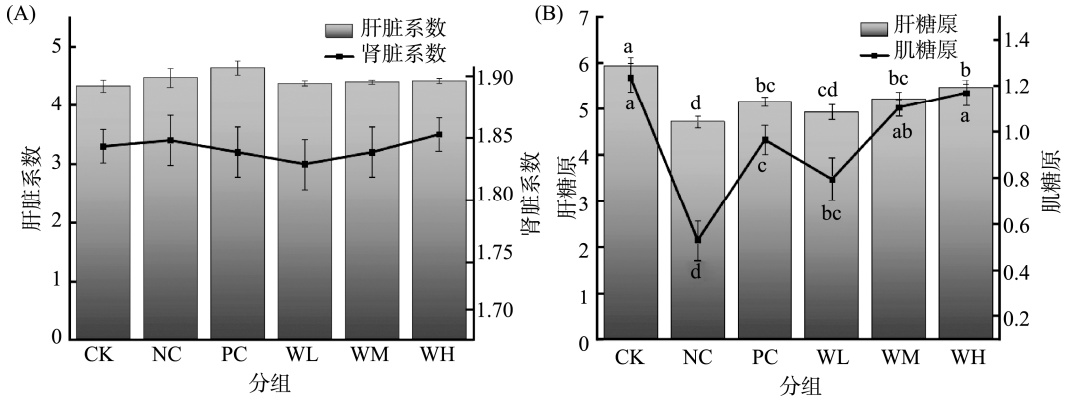


图 5 小鼠肝脏、肾脏指数(A)与肝、肌糖原含量(B)

Fig.5 Liver and kidney indices (A) and hepatic and muscle glycogen content (B) of mouse

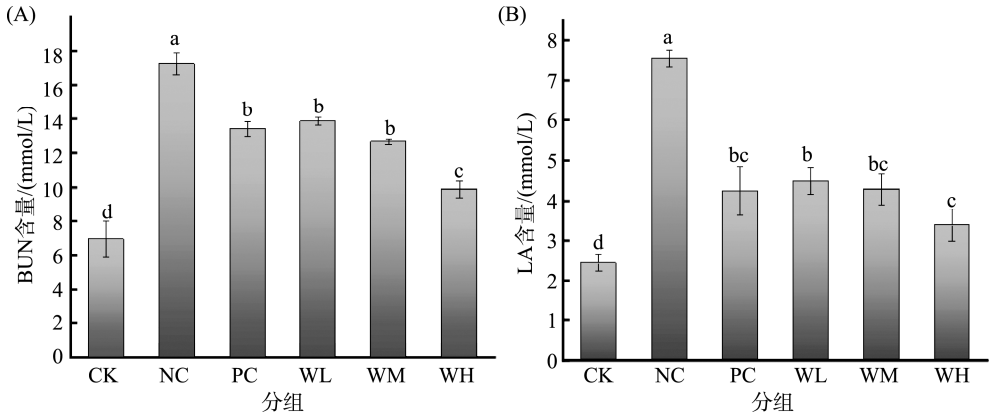


图 6 小鼠血清中 BUN 含量(A)与 LA 含量(B)

Fig.6 BUN content (A) and LA content (B) in mouse serum

抗疲劳研究中, SOD、CAT、GSH-Px 与 MDA 是评估机体氧化应激水平的核心指标[30]。高强度的运动疲劳会导致体内自由基呈现爆发性的增加, 抗氧化酶开始被大量消耗, 其含量与活性都出现下降, 同时, 组织的脂质过氧化程度加重, 过氧化产物大量积累, 造成细胞的损伤, 机体中出现疲劳的恶性循环[31]。由此, 通过 SOD、CAT、GSH-Px 与 MDA 的含量变化可以判断出机体清除自由基能力与组织氧化损伤的程度[32]。图 7 为各组小鼠的抗氧化酶及氧化产物的含量图。运动组小鼠的 SOD、CAT、GSH-Px 含量均低于 CK, 这是由于体内的抗氧化系统发挥各自作用, 而 NC 组小鼠的 SOD、CAT 与 GSH-Px 下降最为严重, 结合脂质过氧化终产物 MDA 含量显著升高进行分析, 推断出 NC 组小鼠氧化应激严重, 机体已无法清除过量自由基; PC 组中 SOD、CAT 与 GSH-Px 较 NC 组均显著性提高; 灌胃 WMEP 组小鼠的低剂量组作用不及 PC, 但较 NC 相比, 疲劳程度有一定缓解, 中、高剂量的 WMEP 可以起到与乳清肽相近的提高抗氧化酶活性、抑制 MDA 积累的作用。说明 WMEP 可以通过增强机体内抗氧化性与抑制脂质过氧化双重途径缓解氧化应激, 起到抗疲劳作用。

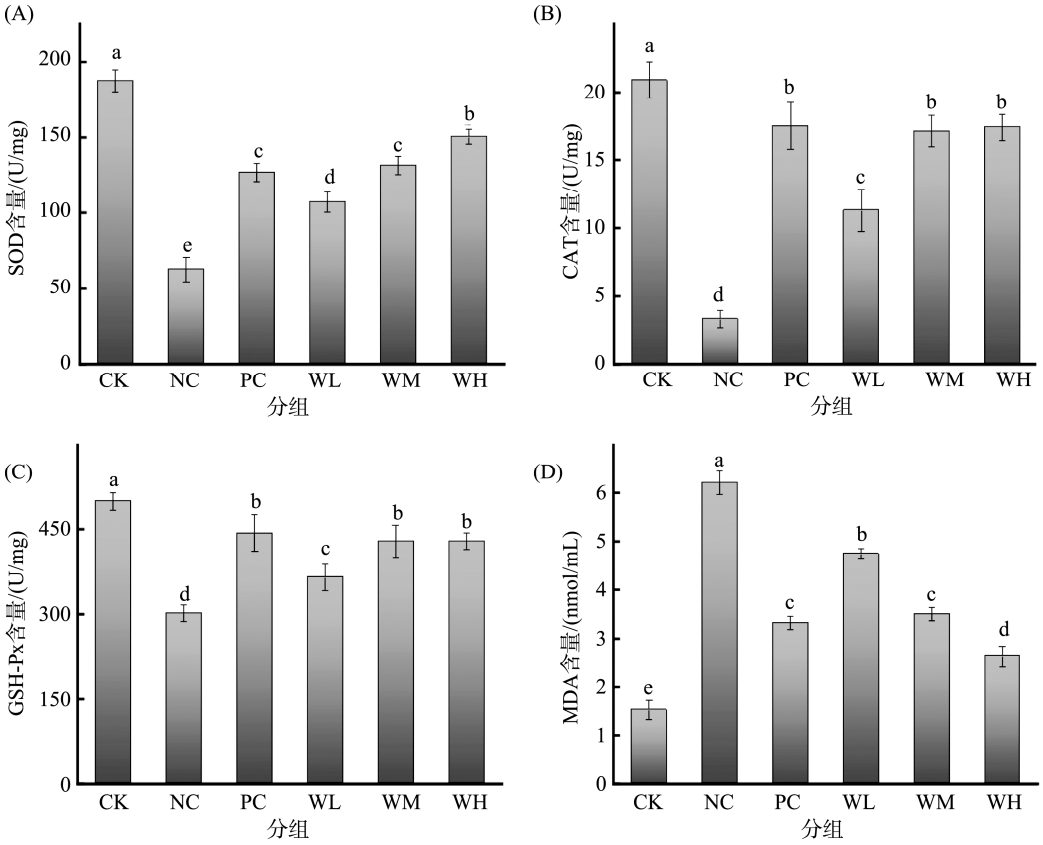


图 7　小鼠血清中 SOD (A)、CAT (B)、GSH-Px (C)与 MDA (D)含量
Fig.7　SOD (A), CAT (B), GSH-Px (C), and MDA (D) content of mouse serum

3　结　论

本研究主要探讨了关于制备 WMEP 的方法, 与 WMEP 在体外抗氧化与体内抗疲劳的活性。通过单因素实验与响应面优化得到制备 WMEP 的两部酶解法最优组合为: 碱性蛋白酶 2000 U/g, 碱性蛋白酶 pH 为 9.0, 风味蛋白酶用量 1000 U/g。体外抗氧化实验证明, 制备出的 WMEP 抗氧化能力不如 VC, 但仍有一定的抗氧化活性, 其清除羟基自由基的 IC_{50} 值为(0.96±0.01) mg/mL; 清除超氧阴离子自由基能力的 IC_{50} 值为 1.95 mg/mL; 清除 DPPH 自由基能力的 IC_{50} 值为(0.25±0.01) mg/mL。并通过动物实验判定 WMEP 具有一定的抗疲劳能力, 中、高剂量 WMEP 整体上对小鼠体重、肝脏及肾脏系数无负面影响, 可显著提升小鼠游泳力竭时间, 维持体内糖原及抗氧化酶含量, 降低代谢废物 BUN、LA 与 MDA 的积累, 可通过提高糖原储备与体内抗氧化性来延缓机体疲劳, 提高运动耐力。

下一步研究将注重于活性肽的分离、鉴定与构效关系研究, 拟通过色谱-质谱法对 WMEP 的活性成分及氨基酸序列进行鉴定, 找到明确具体的活性肽段; 并将通过细胞模型判断出 WMEP 对 Nrf2/ARE 通路及 AMPK/PGC-1α 通路的影响, 对抗疲劳现象进行分子层面的进一步分析。WMEP 具有良好的溶解性、抗氧化活性及抗疲劳功能, 可

以考虑添加到固体饮料中，帮助普通人群恢复体力、缓解疲劳。同时，酶解多肽通常含有丰富的呈味氨基酸和短肽，表现出明显的鲜味和浓厚感，可尝试作为天然、健康的增鲜剂或风味增强剂直接加入酱油、耗油等调味酱中，增加鲜味与营养价值。

参考文献

[1] GOMES JSD, JUAN CD, SOUZA DFF, *et al*. Risk or benefit? Side effects of caffeine supplementation in sport: A systematic review [J]. European Journal of Nutrition, 2022, 61(8): 3823–3834.

[2] 杨策, 李会珍, 张志军, 等. 火麻脱脂蛋白酶解工艺优化及其多肽降血糖活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(4): 66–75.
YANG C, LI HZ, ZHANG ZJ, *et al*. Optimization of the proteolytic hydrolysis process and the hypoglycemic activity of its peptides [J]. Chinese Food Additives, 2020, 36(4): 66–75.

[3] 江含秀, 曾芳, 邬晓霞, 等. 不同品种苦荞蛋白的复合酶解及其多肽抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(9): 43–51.
JIANG HX, ZENG F, WU XX, *et al*. Compound enzymatic hydrolysis of tartary buckwheat protein from different cultivars and its peptide antioxidant activity [J]. Food Research and Development, 2023, 44(9): 43–51.

[4] 胡保住, 郭众仲, 游志斌, 等. 核桃副产物价值及开发利用研究进展[J]. 现代农业科技, 2025(7): 129–133, 139.
HU BZ, GUO ZZ, YOU ZB, *et al*. Research progress on value and development and utilization of walnut by-products [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2025(7): 129–133, 139.

[5] 肖柳柳, 王爱琳, 陶梦雪, 等. 核桃粕抗氧化肽对核桃油贮藏品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(20): 174–180.
XIAO LL, WANG AIL, TAO MX, *et al*. Effect of antioxidant peptide of walnut meal on storage quality of walnut oil [J]. Food and Fermentation Industry, 2025, 51(20): 174–180.

[6] 倪策, 曹天红, 陈敏, 等. 核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 51–61.
NI C, CAO TH, CHEN M, *et al*. Enzymatic preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut meal [J]. Food and Machinery, 2024, 40(5): 51–61.

[7] 王国王, 祁岩龙, 杨忠强, 等. 核桃仁及其粕中油脂提取工艺优化及品质分析[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(2): 86–92.
WANG GW, QI YL, YANG ZQ, *et al*. Optimization of extraction process and quality analysis of oil from walnut kernel and its meal [J]. Grain & Oils, 2020, 38(2): 86–92.

[8] MENG M, SHE Z, FENG Y, *et al*. Optimization of extraction process and activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from walnut meal [J]. Foods, 2024, 13(7): 1067.

[9] 戴梦萍, 段涵怡, 陈晓萌, 等. 风味蛋白酶酶解桑葚制备抗氧化肽的工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(2): 116–120.
DAI MP, DUAN HY, CHEN XM, *et al*. Study on the preparation of antioxidant peptide from mulberry by flavor protease enzymatic hydrolysis [J]. Grain and Oils, 2024, 37(2): 116–120.

[10] 李宣达. 亚临界水制备杏仁抗氧化肽的工艺优化及其抗疲劳活性研究[J]. 食品科技, 2025, 50(2): 217–227.
LI XD. Optimization of preparation process and anti-fatigue activity of almond antioxidant peptide by subcritical water [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 50(2): 217–227.

[11] 金丹莉, 程逸潮, 洪杏德, 等. 橙足海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2024, 49(6): 22–30.
JIN DL, CHENG YC, HONG XD, *et al*. Optimization of preparation process and antioxidant activity of orange foot sea cucumber polypeptide [J]. Chinese Condiment, 2024, 49(6): 22–30.

[12] RUI L, ZHEN L, XIAOCHEN Y, *et al*. The effects of peanut oligopeptides on exercise-induced fatigue in mice and its underlying mechanism [J]. Nutrients, 2023, 15(7): 1743.

[13] YONG C, JIAJUN W, ZIHENG J, *et al*. Anti-fatigue and anti-oxidant effects of curcumin supplementation in exhaustive swimming mice via Nrf2/Keap1 signal pathway [J]. Current Research in Food Science, 2022, 5: 1148–1157.

[14] SHEN H, SHI Y, BAI J, *et al*. Electron beam irradiation treatment driven structure-function relationships of walnut meal proteins and hydrolysates [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 155: 110234.

[15] GÓRECKA A, VASSEV KK. Neutrophil elastase and elafin in inflammatory bowel diseases: Urinary biomarkers reflecting intestinal barrier dysfunction and proteolytic activity [J]. Journal of Clinical Medicine, 2025, 14(7): 2466.

[16] LIU JW, CHEN MW, WANG MX, *et al*. Comparative studies on microbial transglutaminase, complex phosphate and fructooligosaccharide interacts with myofibrillar proteins: Improvement of the quality and flavor of silver carp surimi [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 141696. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.141696

[17] 张子杰, 田益玲, 夏君霞, 等. 核桃多肽结构表征及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2024, 45(9): 1–8.
ZHANG ZJ, TIAN YL, XIA JX, *et al*. Structure characterization and antioxidant activity of walnut polypeptides [J]. Food Science, 2020, 45(9): 1–8.

[18] 李国祥, 安琪. 罗非鱼抗氧化肽的制备及其抗疲劳功效研究进展[J]. 中国调味品, 2024, 49(3): 96–100.
LI GX, AN Q. Preparation of antioxidant peptides from Tilapia and research progress on anti-fatigue effect [J]. Chinese Condiment, 2012, 49(3): 96–100.

[19] NG WJ, WONG FC, ABD-MANAN F, *et al*. Antioxidant peptides and protein hydrolysates from Tilapia: Cellular and *in vivo* evidences for human health benefits [J]. Foods, 2024, 13(18): 2945.

[20] HUANG P, MIAO J, LI J, *et al*. Novel antioxidant peptides from pearl shell meat hydrolysate and their antioxidant activity mechanism [J]. Molecules, 2023, 28(2): 864.

[21] ARLETTE R, FRANCISCO M, NORÁH B, *et al*. Electrophilic modulation of the superoxide anion radical scavenging ability of copper(II) complexes with 4-methyl imidazole [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2021, 125(12): 2394–2401.

[22] HUONG QD, QUANG TD, THANG QL, *et al*. Theoretical study on the influence of OH group position on the free radical scavenging ability of tryptamine derivatives [J]. RSC Advances, 2025, 15(15): 11417–11430.

[23] OU YH, LIU X, HUO J, *et al*. Screening, identification, and mechanism of novel antioxidant peptides in walnut meal under aerobic stress [J]. Food Chemistry, 2025, 470: 142677.

[24] WIGGERMANN N, KEYSERLING MW. Effects of anti-fatigue mats on perceived discomfort and weight-shifting during prolonged standing [J]. Human Factors: The Journal of Human Factors and Ergonomics Society, 2013, 55(4): 764–775.

[25] BIAN X, WANG L, MA Y, *et al*. A flavonoid concentrate from *Moringa oleifera* Lam. leaves extends exhaustive swimming time by improving energy metabolism and antioxidant capacity in mice [J]. Journal of Medicinal Food, 2024, 27(9): 887–894.

[26] CHEN L, XU P, DIAO J, *et al*. Distribution, metabolism and toxic effects of beta-cypermethrin in lizards (*Eremias argus*) following oral administration [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 306: 87–94.

[27] HAO H, SHA A. Study on anti-fatigue effects and mechanisms of polysaccharide from *Paris polyphylla* [J]. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2024, 516(1): 58–65.

[28] BING NC, XIANG XY, ZHOU W, *et al*. Anti-fatigue effects and mechanism of *Syngnathus schlegeli* peptides supplementation on exercise-fatigued mice [J]. Journal of Functional Foods, 2023, 110: 12.

[29] PYEON M, LEE J, MOON M, *et al*. Anti-fatigue effects of low-molecular-weight brewer's yeast extracts on mice [J]. Advances in Traditional Medicine, 2024, 25(2): 1–10.

[30] JEON H, LEE K, KIM TY, *et al*. Effect of HY7602 fermented deer antler on physical fatigue and antioxidant activity in mice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(6): 3318.

[31] ZHOU XH, ZHANG X, HUANG GR, *et al*. Antifatigue effects and antioxidant activity in polysaccharide fractions from Chinese yam bulbils [J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(2): 1218–1229.

[32] XIAO XZ, WALLACE Y, XIAO HL, *et al*. Milk fat globule membrane relieves fatigue via regulation of oxidative stress and gut microbiota in *BALB/c* mice [J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 712.

(责任编辑: 韩晓红　于梦娇)