谢晓妍, 张芸溪, 王颖, 等. 菌-酶协同法制备白芸豆抗氧化肽工艺优化及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 207−220. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120200
XIE Xiaoyan, ZHANG Yunxi, WANG Ying, et al. Process Optimization of Antioxidant Peptides Preparation from White Kidney Beans via Bacteria-Enzyme Synergy and Analysisof Their Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 207−220. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120200

·工艺技术·

菌-酶协同法制备白芸豆抗氧化肽工艺优化及其抗氧化活性分析

谢晓妍[1], 张芸溪[1], 王　颖[1,2,3,*], 刘　童[1], 李思楠[4], 庞惟俏[1], 佐兆杭[1], 张　璐[4,*], 管　骁[5], 赵自力[6], 李　冰[6]

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;
2.国家杂粮工程技术中心, 黑龙江大庆 163319;
3.厦门海洋职业技术学院, 福建厦门 361100;
4.中国食品发酵工业研究院有限公司, 功能主食创制与慢病营养干预北京市重点实验室, 北京 100015;
5.上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093;
6.安徽省农业科学院皖北研究院, 安徽阜阳 236600)

摘　要: 为建立一种高效筛选白芸豆多肽（White kidney bean polypeptides，WKBPs）的方法并分析其体外抗氧化活性，本实验以白芸豆蛋白为原料，采用中性蛋白酶和枯草芽孢杆菌协同法制备 WKBPs，通过单因素和响应面试验确定最佳工艺参数，并测定其氨基酸组成和相对分子质量分布，利用超滤技术对制备的白芸豆粗肽进行分级分离，测定不同组分的抗氧化活性，对活性最好的组分进行液相色谱-质谱联用（LC-MS/MS）检测，并利用虚拟筛选、分子对接技术及分子动力学模拟探究肽段的潜在抗氧化活性。结果显示：菌-酶协同法制备 WKBPs 最佳工艺参数为发酵温度 37.0 ℃、发酵时间 48.0 h、接种量 5.0%，此条件下的 DPPH 自由基清除率为 76.12%±0.36%，多肽得率为 17.59%±0.16%；WKBPs 中疏水性氨基酸、碱性氨基酸和酸性氨基酸含量均较高，分别为 21.932%、11.331% 和 20.583%；相对分子质量分布主要集中在 3 kDa 以下，超滤结果表明 Mw<3 kDa 的组分具有较好的抗氧化活性（DPPH 自由基清除率、$ABTS^{+}$自由基清除率和羟自由基清除率），其半抑制浓度（IC_{50}）值分别为 0.307、0.310 和 0.361 mg/mL；总抗氧化能力（FRAP）在 1 mg/mL 的浓度下可以达到 0.66±0.0018 mmol Fe^{2+}/g；通过虚拟筛选从 LC-MS/MS 鉴定的 6364 条肽序列中得到 3 条抗氧化多肽（FGWGP、FGHPEW 和 FGPYF），分子对接结果表明：肽段能够通过氢键及疏水相互作用等与 Keap1 结合形成稳定的复合物，调控 Keap1-Nrf2 通路发挥抗氧化作用；分子动力学模拟表明，FGWGP、FGHPEW 和 FGPYF 可以与 Keap1 紧密结合形成稳定的构象。本实验为白芸豆蛋白的深度开发和白芸豆抗氧化肽产品的研发提供技术参考及理论基础。

关键词: 白芸豆多肽, 菌-酶协同, 超滤, 抗氧化活性, 分子对接
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0207−14
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120200
本文网刊:

Process Optimization of Antioxidant Peptides Preparation from White Kidney Beans via Bacteria-Enzyme Synergy and Analysis of Their Antioxidant Activity

XIE Xiaoyan[1], ZHANG Yunxi[1], WANG Ying[1,2,3,*], LIU Tong[1], LI Sinan[4], PANG Weiqiao[1], ZUO Zhaohang[1], ZHANG Lu[4,*], GUAN Xiao[5], ZHAO Zili[6], LI Bing[6]

收稿日期: 2024−12−17
基金项目: 国家重点研发计划项目“杂粮产业链一体化示范”（2020YFD1001400）; 江淮杂粮产业工程技术研发创新基地项目。
作者简介: 谢晓妍（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程, E-mail: xxy10750220@163.com。
*** 通信作者:** 王颖（1979−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程及食品质量安全, E-mail: wychen156@163.com。
张璐（1987−）, 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 功能食品开发与精准营养及功效评价, E-mail: zhanglu8078@126.com。

（1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China；
2.National Coarse Cereals Engineering Center, Daqing 163319, China；
3.Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China；
4.China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co., Ltd., Beijing Key Laboratory of the Innovative Development of Functional Staple and the Nutritional Intervention for Chronic Disease, Beijing 100015, China；
5.School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China；
6.Anhui Academy of Agricultural Sciences Wanbei Research Institute, Fuyang 236600, China）

Abstract: In this study, white kidney bean protein was utilized as a primary material to produce antioxidant peptides through a combined approach involving *Bacillus subtilis* fermentation and neutral protease treatment. The optimal processing conditions for peptide production were determined using single-factor experiments and response surface methodology, and the amino acid composition and the molecular weight distribution of the peptides were analyzed. Ultrafiltration was employed to isolate specific peptide fractions, and their antioxidant properties were assessed. The most promising antioxidant peptides were identified through liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Further investigation into the peptide's potential antioxidative properties was conducted through virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulation. Results indicated that the ideal conditions for peptide formation were a fermentation temperature of 37.0 ℃, a fermentation period of 48.0 h, and an inoculum level of 5.0%. Under these conditions, the DPPH radical scavenging ability reached 76.12%±0.36%, and the peptide yield was 17.59%±0.16%. In WKBPs, the content of hydrophobic, basic, and acidic amino acids was relatively high, at 21.932%, 11.331%, and 20.583% respectively. The molecular weight distribution was predominantly below 3 kDa, and ultrafiltration showed that peptides with molecular weights under 3 kDa exhibited substantial antioxidant activity, as indicated by their DPPH, $ABTS^{+}$, and hydroxyl radical scavenging rates, with IC_{50} values of 0.307, 0.310, and 0.361 mg/mL, respectively. The total antioxidant capacity was measured at 0.66±0.0018 mmol Fe^{2+}/g at a concentration of 1 mg/mL. Among the 6364 peptide sequences analyzed, three active pentapeptides (FGWGP, FGHPEW and FGPYF) were identified, each forming a stable complex with Keap1 protein through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Molecular dynamics simulations indicated that these peptides could bind tightly to Keap1, forming stable conformations. This study provides both a technical guide and a theoretical foundation for further exploration and development of white kidney bean proteins and antioxidant peptide-based products.

Key words: white kidney bean polypeptide; bacteria-enzyme synergy; ultrafiltration; antioxidant activity; molecular docking

氧化应激是机体内一种氧化还原失衡的状态[1]，由于机体受到环境等各方面的影响，会产生过量的自由基催生氧化应激反应，造成细胞凋亡[2] 和 DNA 损伤[3]，进而引发一系列疾病，如糖尿病、心血管疾病和癌症等[4−5]。传统合成的抗氧化剂虽效果显著，但潜在的毒副作用和生物利用度问题限制了其应用[6]，因此，寻找天然有效的抗氧化剂显得尤为重要。抗氧化肽作为一种新型的抗氧化剂，因其显著的抗氧化活性、安全性和易于吸收等特点，受到了广泛的关注和研究[7]。白芸豆（*Phaseolus vulgaris* L.）是一种富含优质植物蛋白的豆类资源，芸豆蛋白富含人体所需的所有必需氨基酸，其总必需氨基酸含量优于大豆，是一种制备生物活性肽的优质植物原料[8−9]。

近年来，酶解法和微生物发酵法被广泛用于生物活性肽的制备，但单一的酶解易产生苦味且酶解位点单一限制了活性肽的功能活性[10]，而微生物发酵法存在发酵周期长、产物复杂且不易控制等问题[11]。通过菌-酶协同法将酶解与发酵相结合，可以实现优势互补，首先利用酶解法高效切割蛋白质的特定肽键，将大分子蛋白分解为中等大小的肽段，然后通过微生物发酵进一步分解这些肽段，可以产生更多具备活性的小分子肽[12]。臧凤[13] 利用酶解得到蛋清酶解物后继续通过乳酸菌发酵协同制备蛋清肽得到了更高活性的抗氧化肽，经菌-酶协同发酵制得的蛋清酶解肽 FRAP 值是未发酵的 4.65 倍；马慧等[14] 利用枯草芽孢杆菌和碱性蛋白酶协同固态发酵制备核桃谷蛋白抑菌肽，多肽含量达到 26.35±1.29 mg/g；Fan 等[15] 通过添加淀粉酶和脂肪酶辅助枯草芽孢杆菌、鼠李糖乳杆菌、保加利亚乳杆菌等菌株发酵制备藜麦多肽，结果表明酶-菌协同法制备的藜麦肽比单一酶解法制备的多肽具有更强的 ACE 抑制活性。以上研究结果表明，菌-酶协同法可以显著提高多肽的产量和活性。

随着生物信息学的飞速发展，计算机模拟技术在抗氧化肽的筛选中展现出了巨大的潜力[16]，徐斐然等[17] 利用计算机分析技术和分子模拟技术从宁夏肉牛血红蛋白中高效筛选出两条新型抗氧化肽 VFYPW 和 DGWHS。Yu 等[18] 采用体外和计算机

相结合的方法从豆粕中鉴定出一种新的抗氧化肽（KFGW），研究显示 KFGW 可通过氢键和范德华相互作用占据 Keap1 上的 Nrf2 结合位点来有效激活 Keap1-Nrf2-HO-1 通路。以上研究结果表明，分子对接技术已成为用于筛选抗氧化肽的重要工具，并且在分子水平上揭示了抗氧化肽与靶标间的作用机制。

目前，虽然有大量研究报道了芸豆多肽在降血压、抗肿瘤等方面的生物活性及其作用机理，但有关采用菌-酶协同法制备白芸豆多肽及其抗氧化活性和分子构效研究甚少。因此，本实验以白芸豆为原料，通过菌-酶协同法制备 WKBPs，并优化其工艺参数，以期获得高活性、高得率的 WKBPs。同时，通过氨基酸组成分析、相对分子质量分布、超滤组分分离及其抗氧化活性测定等手段，对 WKBPs 的理化性质和抗氧化活性进行评价。此外，利用 LC-MS/MS 质谱鉴定肽序列结合虚拟筛选和分子对接技术评估肽段的潜在抗氧化活性，以期为白芸豆健康产品的开发提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

白芸豆　林家粮铺，产自黑龙江省；枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）　中国工业微生物菌种保藏中心；LB 肉汤培养基、琼脂　海博生物技术有限公司；中性蛋白酶（50 U/mg）　北京 Solarbio 生物科技有限公司；三氯乙酸、V_C　上海麦克林生化科技有限公司；2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸（ABTS）、2,4,6-三吡啶基三嗪（TPTZ）、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、Gly-Gly-Gly（189 Da）、Gly-Gly-Tyr-Arg（451 Da）、杆菌肽（1423 Da）、胰岛素（5778 Da）、细胞色素 C（12384 Da）　美国 Sigma 公司；双缩脲试剂（AB 液）、硫酸亚铁（$FeSO_4$）、水杨酸　上海源叶生物科技有限公司。

CHRIST 真空冷冻干燥机　德国 Christ 公司；YXQ-100G 高温高压灭菌锅　上海博迅医疗生物仪器有限公司；DL-CL-2ND 超净工作台　哈东联电子技术有限公司；DNP-9052 恒温培养箱　上海精宏实验设备公司；HZQ-A 恒温摇床　常州市科迈实验仪器有限公司；U-2910 紫外可见分光光度计　日本 Hitachi 公司；GL21M 高速冷冻离心机　湖南湘仪有限公司；LA8080 超高速全自动氨基酸分析仪　广州市君翔仪器仪表有限公司；Cf72-8YW 酶联免疫检测仪　珀金埃尔默仪器有限公司；Waters1525 高效液相色谱仪　美国 Waters 公司；Q Exactive Plius 质谱仪　美国赛默飞世尔有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　白芸豆蛋白的制备　参照周雅情等[19]的方法并稍作修改，白芸豆洗净 60 ℃ 烘干后粉碎，过 80 目筛，用石油醚按液料比 10 mL/g 脱脂后得到脱脂白芸豆粉，将脱脂白芸豆粉用蒸馏水以液料比 10 mL/g 的比例混合，调节 pH 至 8.5 后，50 ℃ 搅拌 1 h，离心（4000 r/min，10 min），取上清液调节 pH 至 4.4，4 ℃ 搅拌 2 h 后离心（4000 r/min，10 min）收集沉淀，冷冻干燥后得白芸豆蛋白粉（纯度为 89%，−80 ℃ 保存）。

1.2.2　菌种活化及种子液制备　将保藏的枯草芽孢杆菌菌液 1 mL 转接到 LB 液体培养基中恒温培养（37 ℃，24 h），后划线接入 LB 固体培养基中恒温培养（37 ℃，24 h），使其充分活化。挑取一环单菌落移至 LB 液体培养基中恒温培养（37 ℃，24 h），得到扩大培养的枯草芽孢杆菌菌悬液，用平板计数法计数调整含活菌数为 1.0×10^7 CFU/mL 用于以下实验。

1.2.3　白芸豆多肽制备　准确称取白芸豆蛋白 5.0 g 加入 100.0 mL 去离子水溶解，添加 3000 U/g 中性蛋白酶于 53 ℃、pH 为 7 条件下酶解 2 h，121 ℃ 灭菌灭酶 15 min 进行后续发酵。加入 5% 枯草芽孢杆菌种子液，37 ℃ 下发酵 48 h，发酵完毕后离心（4000 r/min，15 min）收集上清液冷冻干燥，得到白芸豆多肽粗提物。

1.2.4　单因素实验　通过枯草芽孢杆菌发酵白芸豆蛋白酶解液制备 WKBPs，以多肽得率和 DPPH 自由基清除率为指标，分别固定发酵温度、发酵时间、接种量为 37 ℃、48 h、5%，考察发酵温度（23、30、37、44、51 ℃），发酵时间（12、24、36、48、60 h），接种量（1%、3%、5%、7%、9%）对制备 WKBPs 的影响。

1.2.5　响应面试验　根据 Box-Behnken 设计原理，结合单因素实验结果，选择发酵温度（A）、发酵时间（B）和接种量（C）3 个因素设计三因素三水平试验，以综合值（Y）为响应值，应用 Design-Expert 13.0.5 进行优化试验，各因素水平见表 1。

表 1　发酵酶解液制备 WKBPs 响应面试验因素水平
Table 1　Response surface test factors and levels of WKBPs prepared from fermented enzymatic solution

水平	因素		
	A 发酵温度（℃）	B 发酵时间（h）	C 接种量（%）
−1	30	36	3
0	37	48	5
1	44	60	7

1.2.6　验证实验　在优化条件下重复 3 次实验，测定多肽得率和 DPPH 自由基清除率，以验证优化实验条件的准确性与稳定性。

1.2.7　多肽得率的测定　参考刘潇[20]的方法，取 2 mL WKBPs 粗提液加入 2 mL 10% 三氯乙酸（TCA）反应 10 min 后离心（4000 r/min，10 min），上清液稀释 10 倍后取 1 mL 稀释液与 4 mL 双缩脲试剂混合均匀，室温反应 30 min，测定 540 nm 处 OD 值，以 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽为标准品绘制标准曲线，得到回归方程为：y=0.0626x+0.0526，R^2=0.999。对照标准曲线计算样品溶液中的多肽含量，按公式（1）计算 WKBPs 的得率。

$$得率(\%)=\frac{C\times V}{m}\times 100 \quad 式（1）$$

式中：C—溶液中多肽浓度(mg/mL)；V—溶液总体积(mL)；m—白芸豆蛋白质质量(mg)。

1.2.8 DPPH 自由基清除率测定 参考 Sun 等[21]方法，将 WKBPs 粗提液与 0.1 mmol/L DPPH-乙醇溶液按 1∶1 混合后暗反应(25 ℃, 30 min)，在 517 nm 处测定 OD 值，根据公式(2)计算。

$$P(\%)=\left(1-\frac{A_i-A_j}{A_k}\right)\times 100 \quad 式（2）$$

式中：P—自由基清除率；A_i—样品与 DPPH 溶液混合液的吸光度；A_j—样品与无水乙醇溶液混合液的吸光度；A_k—DPPH 溶液与无水乙醇溶液混合液的吸光度。

1.2.9 综合值计算 将多肽得率和 DPPH 自由基清除率数据分别标准化为 0~1 间的归一值。二者权重均为 50%，归一值 OD 计算如公式(3)，综合值(Y)计算如公式(4)[22]。

$$OD=\frac{D_i-D_{min}}{D_{max}-D_{min}} \quad 式（3）$$

式中：D_i—当前实验值；D_{min}—同组实验中最小值；D_{max}—同组实验中最大值。

$$Y=OD_1\times 50\%+OD_2\times 50\% \quad 式（4）$$

式中：OD_1—多肽得率归一值；OD_2—DPPH 自由基清除率归一值。

1.2.10 氨基酸测定 根据 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》，选用茚三酮法测定 WKBPs 的游离氨基酸含量，以 L-亮氨酸为标准品，绘制标准曲线。

1.2.11 相对分子质量分布 参考李思楠等[23]方法稍作修改。使用高效液相凝胶渗透色谱法(GPC)分析 WKBPs 的分子质量分布，色谱柱为 TSKgel-G2000SWXL(300 nm×7.8 nm)，流速为 0.3 mL/min，柱温为 25 ℃，检测波长为 220 nm，流动相为 20% 乙腈＋80% 去离子水＋0.1% 三氟乙酸，采用 Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Tyr-Arg、杆菌肽、胰岛素和细胞色素 C 为校正标准品，用 GPC 软件对色谱数据进行处理，计算 WKBPs 的相对分子质量和分布情况。

1.2.12 超滤 用不同超滤膜(3 kDa、5 kDa)的超滤管对前期制备的 WKBPs 粗肽进行分级分离，按分子量大小分为 WKBPs1(Mw>5 kDa)、WKBPs2(3 kDa<Mw<5 kDa)、WKBPs3(Mw<3 kDa)三个组分，将三个组分收集浓缩并冷冻干燥，蒸馏水复溶配制成 1 mg/mL，通过测定体外抗氧化活性筛选最佳组分。

1.2.13 抗氧化活性测定

1.2.13.1 DPPH 自由基清除率 按 1.2.8 中方法对 1 mg/mL WKBPs1、WKBPs2、WKBPs3 样品进行测定。

1.2.13.2 $ABTS^+$自由基清除率 参考沙玉欢等[24]方法，取 1.4 mL 稀释后的 ABTS 工作液分别与 0.1 mL 1 mg/mL WKBPs1、WKBPs2、WKBPs3 溶液混匀，避光反应(25 ℃, 6 min)，测定 734 nm 处 OD 值，计算如公式(2)。

1.2.13.3 羟自由基清除率 参考夏吉安等[25]方法，将 1 mg/mL WKBPs1、WKBPs2、WKBPs3 溶液分别与 $FeSO_4\cdot 7H_2O$ 溶液(6 mmol/L)和 H_2O_2 溶液(6 mmol/L)按 1∶1∶1 的体积比混匀后反应(37 ℃, 10 min)，接着向反应体系中加入 1 mL 水杨酸溶液(6 mmol/L)，并充分混合，继续孵育(37 ℃, 30 min)，测定 510 nm 处 OD 值，计算如公式(2)。

1.2.13.4 FRAP 抗氧化能力 参考卢跃红等[26]方法。取 0.1 mL 1 mg/mL WKBPs1、WKBPs2、WKBPs3 溶液和 0.5 mL FRAP 试剂混合均匀后，37 ℃ 反应 10 min，测定 595 nm 处 OD 值，铁离子还原能力以 Fe_SO_4 当量表示。Fe_SO_4 标准曲线回归方程为：$y=0.219x-0.0008$，$R^2=0.9995$。

1.2.14 白芸豆抗氧化肽的筛选及分子对接预测作用机制

1.2.14.1 LC-MS/MS 质谱分析 运用串联 EASY-nanoLC 1200 的 Orbitrap Q-Exactive Plus 质谱仪对 WKBPs3 序列进行精确鉴定。使用 Acclaim PepMap C18(75 μm×25 cm)色谱柱，上样量为 1 μL 进行梯度分离，色谱柱流速设置为 300 nL/min，柱温为 40 ℃，电喷雾电压 2 kV，检测波长 220 nm。流动相：A 为 0.1% 甲酸；B 为 80% 乙腈+0.1% 甲酸。梯度洗脱：B 相在 47 min 以非线性梯度升至 35%，在 1 min 内上升到 100%，并维持 12 min。一级质谱：扫描范围(m/z)处于 200~2000，分辨率达 70000，AG_C target 为 3e6，最大注入时间为 50 ms；二级质谱：分辨率为 17500，AG_C target 为 1e5，最大注入时间为 45 ms，碰撞能量分别为 28%、35%、48%，动态排除时间 30 s。通过 PEAKS Studio version 10.6(Bioinformatics Solutions Inc, Waterloo, Canada)对质谱数据进行分析。

1.2.14.2 抗氧化肽的虚拟筛选 将 LC-MS/MS 鉴定得到的肽段通过在线工具 PeptideRanker(http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/)进行潜在生物活性预测评分，评分越高代表所预测肽可能具有的生物活性越强，并采用在线工具 ToxinPred(http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/)预测肽段毒性。采用 AnOxPePred 数据库(https://services.healthtech.dtu.dk/services/AnOxPePred-1.0/)预测肽段的自由基清除能力。

1.2.14.3 分子对接 从 RCSB 数据库(www.rcsb.org)中获取 Keap1 蛋白的天然晶体结构(PDB ID：2FLU)，采用 AutoDocktools 进行加氢、计算电荷等预处理，使用 Chemdraw 软件绘制多肽 3D 结构，并进行能量

优化，利用 PyRx（https://pyrx.sourceforge.io）软件计算对接能，选择配体在蛋白质结合口袋中结合能最低的对接模型作为最佳模型，采用 AutoDock Vina1.1.2 进行对接，使用 Vina 评分作为预测肽与 Keap1 结合的亲和力（以 kcal/mol 计算），采用 Pymol2.1 软件对肽段和 Keap1 的结合作用可视化。

1.2.14.4 分子动力学模拟　使用 Gromacs 2022 对复合物进行 100 ns MD 模拟。蛋白质采用 CHARMM 36 力场参数，配体拓扑结构由 GAFF2 力场参数构建。采用周期性边界条件，将蛋白质-配体复合物放置在立方盒中。采用 TIP3P 水模型将水分子填充到盒子中，形成周期边界为 1.2 nm 的水盒。使用粒子网格 Ewald（PME）和 Verlet 算法分别处理静电相互作用。随后进行 100000 步的等温等容系综平衡和等温等压系综平衡，耦合常数为 0.1 ps，持续时间为 100 ps 模拟。范德华和库仑相互作用均使用 1.0 nm 的截止值计算。最后，系统在恒定温度（310 K）和恒压（1 bar）下利用 Gromacs 2022 进行分子动力学模拟。

1.3　数据处理

采用 Origin 2022 软件进行制图及 Design-Expert 13.0.5.0 软件和 Box-Behnken 试验方法设计响应面优化分析。利用 IBM SPSS statistics 21.0 软件进行 ANOVA 显著性分析。每个样品均做 3 个平行，结果以平均值±标准误差表示。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

DPPH 是一种稳定的氮中心自由基，抗氧化肽通过活性基团（如酚羟基、巯基）的供氢/供电子作用，可以直接中和自由基，终止自由基链式反应[27]。此外，DPPH 自由基清除率具有高度的稳定性和灵敏度，更易于量化和标准化[28]，因此成为评价抗氧化活性的核心指标。由图 1（A）可以看出，随发酵温度的升高，多肽得率呈现先增加后下降的趋势。当发酵温度为 37 ℃ 时，多肽得率和 DPPH 自由基清除率最高，达到 17.73%±0.27% 和 76.58%±0.41%。随后，随着温度的升高，多肽得率显著下降（P<0.05）。这可能是由于在发酵过程中，适度温度有利于枯草芽孢杆菌的生长繁殖，增加蛋白酶的分泌，但是高温会影响菌体的生长[29]，因此，选择发酵温度为 37 ℃ 进行后续实验。

由图 1（B）可以看出，多肽得率和 DPPH 自由基清除率随发酵时间的增加先显著升高（P<0.05），在 48 h 达到峰值 17.09%±0.24% 和 75.09%±0.39%，之后显著下降（P<0.05）。可能由于酶解液中含有大量肽段，发酵加快了多肽的生成，继续发酵可能会导致多肽被进一步水解成游离氨基酸，从而使多肽得率下降，并导致其抗氧化能力的降低[30]。因此，选择发酵时间为 48 h 进行后续实验。

由图 1（C）可以看出，当接种量在 5%（v/v）时多肽得率和 DPPH 自由基清除率达到最大值 16.17%±0.20% 和 75.32%±0.31%。此后，随着接种量的增加，抗氧化活性显著降低（P<0.05），可能是微生物增多消耗了酶解液中的多肽，从而造成多肽得率的降低[31]。因此，选择接种量为 5% 进行后续实验。

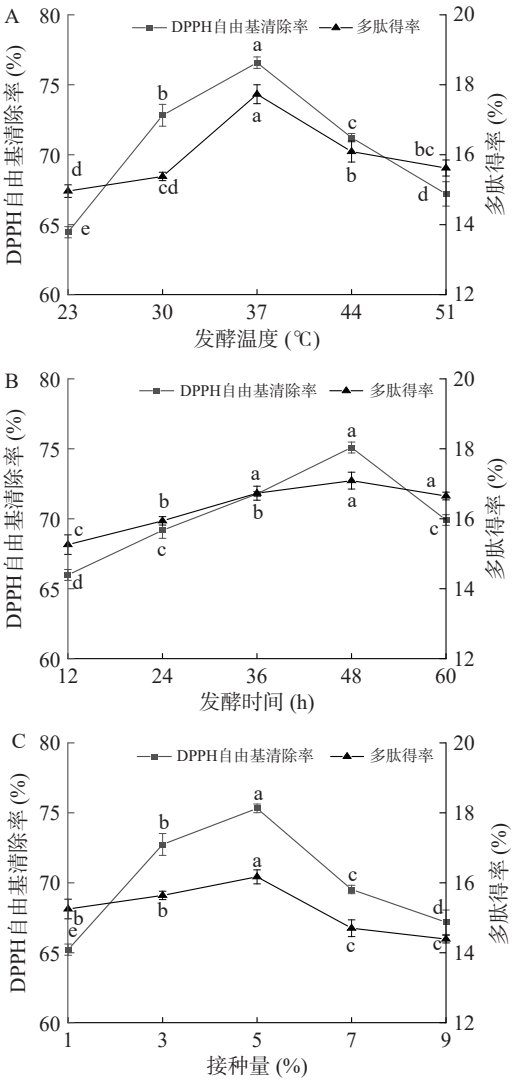


图 1　发酵因素对 WKBPs 提取的影响

Fig.1　Effect of fermentation factors on the produceion of white kidney bean peptides

注：图中不同字母表示组间差异显著（P<0.05），图 4、图 5 同。

2.2　发酵酶解液制备 WKBPs 响应面优化试验结果

2.2.1 响应面优化试验方案及结果　用 Design Expert 13.0.5.0 软件对表 2 的试验数据进行回归与方差分析后，得到菌酶分步发酵制备 WKBPs 的综合值（Y）对 A、B、C 各因素变量的二次多元回归方程为：$Y=97.48-2.45A-2.49B-2.20C-14.38AB+1.45AC-3.54BC-40.73A^2-38.02B^2-23.06C^2$。

从表 3 可知，对于综合值来说，模型 F 值为 686.74（P<0.0001），说明该模型极显著。失拟项 P=0.3739>0.05 不显著，说明模型比较稳定，拟合度良好。其中，R^2=0.9989，说明试验值和拟合值相关性较好，模型校正系数 R^2adj=0.9974，说明该模型能够解释 99.74% 试验数据响应值的变化。除 AC 外均达

表 2 响应面试验方案与结果

Table 2 Response surface experimental design and test results

试验号	A	B	C	Y综合值(%)
1	0	−1	−1	36.64
2	1	1	0	0.00
3	0	0	0	97.57
4	1	−1	0	34.39
5	−1	−1	0	8.68
6	1	0	1	28.98
7	0	1	−1	39.38
8	0	0	0	96.77
9	0	0	0	98.35
10	−1	0	1	32.81
11	−1	0	−1	41.28
12	−1	1	0	31.81
13	0	0	0	99.44
14	0	−1	1	40.47
15	1	0	−1	31.65
16	0	1	1	29.06
17	0	0	0	95.25

表 3 回归与方差结果分析

Table 3 Analysis of regression and variance results

变异来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	18008.82	9	2000.98	686.74	<0.0001	极显著
A-发酵温度	47.82	1	47.82	16.41	0.0049	**
B-发酵时间	49.65	1	49.65	17.04	0.0044	**
C-接种量	38.85	1	38.85	13.33	0.0082	**
AB	827.14	1	827.14	283.88	<0.0001	***
AC	8.41	1	8.41	2.89	0.1331	
BC	50.06	1	50.06	17.18	0.0043	**
A^2	6985.58	1	6985.58	2397.48	<0.0001	***
B^2	6087.76	1	6087.76	2089.34	<0.0001	***
C^2	2239.83	1	2239.83	768.72	<0.0001	***
残差	20.40	7	2.91			
失拟项	10.31	3	3.44	1.36	0.3739	不显著
纯误差	10.08	4	2.52			
总离差	18029.22	16				

注：***差异极显著，$P<0.001$；**差异极显著，$P<0.01$；*差异显著，$P<0.05$。

到极显著水平($P<0.01$)，说明三个因素对 WKBPs 的综合值均具有显著影响，因此，该二次回归方程可以客观预测发酵酶解液后综合值随各因素变化的规律。

2.2.2 响应面交互作用分析 菌-酶协同法制备 WKBPs 各个因素之间交互作用对综合值的影响如图 2 所示，B 与 A、C 两两交互作用的响应面坡度变化较陡，等高线为椭圆形，说明对综合值均有显著影响，而 B 对应的响应面曲线及等高线变化相对陡峭，可以推知发酵时间对综合值的影响较大。

2.2.3 最优条件的确定及验证 采用 Design-Expert 13.0.5 对试验优化分析，得到 WKBPs 最佳制备工艺为：发酵温度 36.81 ℃、发酵时间 47.69 h、接种量 4.91%，此时综合值预测值为 97.59%，DPPH 自由基清除率为 75.68%，多肽得率为 17.46%。从实际操作性及节约资源方面，将菌酶分步发酵条件调整为发酵

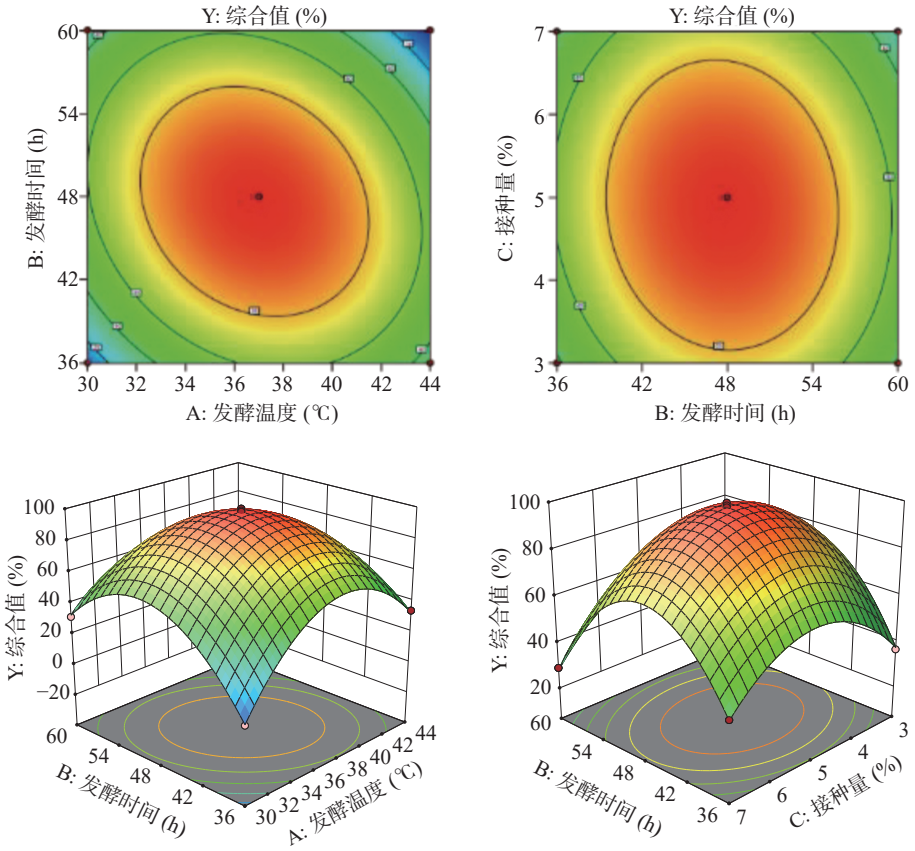


图 2 发酵酶解液制备 WKBPs 综合值响应面曲线图

Fig.2 Response surface curve of synthetic value of WKBPs prepared from fermented enzymatic solution

温度 37 ℃、发酵时间 48 h、接种量 5%。在此条件下经过验证试验，DPPH 自由基清除率为 76.12%±0.36%，多肽得率为 17.59%±0.16%。

2.3　氨基酸组成成分分析

氨基酸是生物活性肽的基本组成单位，氨基酸组成及含量在抗氧化活性中发挥着重要作用[32]。根据表 4 可知，WKBPs 共检测出 17 种氨基酸（由于采用酸水解法检测，因此未检测出色氨酸），其中必需氨基酸有 7 种，含量为 21.959%，其组成较为接近人体必需氨基酸模型。从氨基酸分布来看，碱性氨基酸总含量为 11.331%，有助于肽在体内的运输和吸收[33]；疏水性氨基酸含量高达 21.932%，研究表明，疏水性氨基酸可使活性肽具有更高的抗氧化活性[34]，原因可能是疏水侧链可促进抗氧化肽的富集，从而更高效地清除自由基[35]；此外，WKBPs 中还含有一定量的 His 和 Tyr 等具有特殊功能的氨基酸，它们可能通过各自的生物活性，共同参与到抗氧化过程中。综上表明，高含量疏水性氨基酸的存在使得 WKBPs 具有较高的抗氧化活性。

表 4　氨基酸组成成分分析（g/100 g）
Table 4　Analysis of amino acid composition (g/100 g)

氨基酸种类	含量(%)
天冬氨酸(Asp)	7.920±0.025
苏氨酸(Thr)[e]	2.583±0.009
丝氨酸(Ser)	3.428±0.087
谷氨酸(Glu)	12.663±0.010
甘氨酸(Gly)[h]	2.673±0.012
丙氨酸(Ala)[h]	2.316±0.008
缬氨酸(Val)[eh]	3.026±0.066
半胱氨酸(Cys)	0.170±0.003
蛋氨酸(Met)[eh]	0.987±0.013
异亮氨酸(Ile)[eh]	2.419±0.022
亮氨酸(Leu)[eh]	4.023±0.146
酪氨酸(Tyr)	2.300±0.010
苯丙氨酸(Phe)[eh]	3.558±0.075
组氨酸(His)	2.089±0.015
赖氨酸(Lys)[e]	5.363±0.005
精氨酸(Arg)	3.879±0.018
脯氨酸(Pro)[h]	2.930±0.052
必需氨基酸	21.959±0.123
疏水性氨基酸	21.932±0.096

注：[e]为必需氨基酸；[h]为疏水性氨基酸。

2.4　相对分子质量分布

研究表明，小分子肽更容易被吸收到达靶位点，有效地发挥抗氧化活性[36]。WKBPs 分子量分布谱图如图 3 所示，吸光度（AU）峰值集中在 6.40~15.02 min 内，主峰在约 10~11 min 处，表明 WKBPs 活性肽段主要集中在这一峰，分子量分布呈现出相对的均匀性，且纯度较高。此外，12.5~15 min 出现的小峰和波动进一步提示存在游离氨基酸。各组分详细信息见表 5，根据 GPC 数据分析软件计算可知 Mw>5 kDa 的肽段含量为 7.50%、3 kDa<Mw<5 kDa 的肽段含量为 7.50%、Mw<3 kDa 的肽段含量高达 85.00%，表明 WKBPs 分子量主要集中在 3 kDa 以下，产物处于 2~10 肽间的活性低聚肽含量较高。现有研究表明，分子量小于 3 kDa 的低聚肽具有较好的抗氧化活性，活性基团更容易暴露于分子外部，易与结合位点相互作用[37]。李思涵等[38] 的研究也表明分子量小于 3 kDa 的纳豆肽组分抗氧化能力最强。因此，推测制备的 WKBPs 具有较好的抗氧化作用。

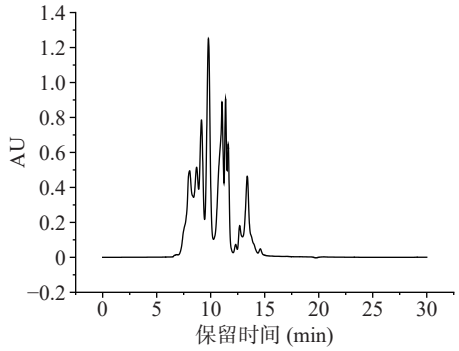


图 3　WKBPs 的相对分子质量分布
Fig.3　Relative molecular weight distribution of WKBPs

表 5　WKBPs 分子质量分布结果
Table 5　Results of molecular mass distribution of WKBPs

分子量(Da)	保留时间(min)	相对含量(%)
>5000	6.40~8.00	7.50
3000~5000	8.01~8.46	7.50
<3000	8.46~15.02	85.00

2.5　超滤组分分离及其抗氧化活性测定

生物活性肽的分子量大小是决定其生物特性的关键因素之一，较小分子量的肽通常具有较高的生物活性[39]。超滤是一种压力驱动的分离技术，可以将水解产物以分子量为基础分离成多种组分[40]。本实验将 WKBPs 经超滤后按分子量大小分为 3 个组分，以 1 mg/mL 浓度进行抗氧化活性测定，结果如图 4 所示，各组分均有抗氧化活性，且分子量的大小与抗氧化活性呈现出相关性，WKBPs3 组分抗氧化能力显著高于其它组分（P<0.05），DPPH 自由基清除率、$ABTS^+$自由基清除率、羟自由基清除率和总抗氧化能力分别为 79.05%±0.43%、91.82%±0.19%、94.30%±0.78%、0.7192±0.0053 mmol Fe^{2+}/g，结果与朱巧楠等[41] 结论相符，他们对油茶饼粕抗氧化肽超滤分离后发现分子量小于 3 kDa 的组分抗氧化活性最强。这可能是由于相对分子量小的肽具有较多的活性基团与自由基发生反应促使其转化为更加稳定的物质，表现出更好的自由基清除能力，并且可以提供更多的电子，相比于大分子量肽其更容易结合活性位点[42]。吴绍珍[43] 也报道了分子量小于 3 kDa 的山核桃肽组分抗氧化能力最高。因此，综合考虑选择 WKBPs3 进行后续实验。

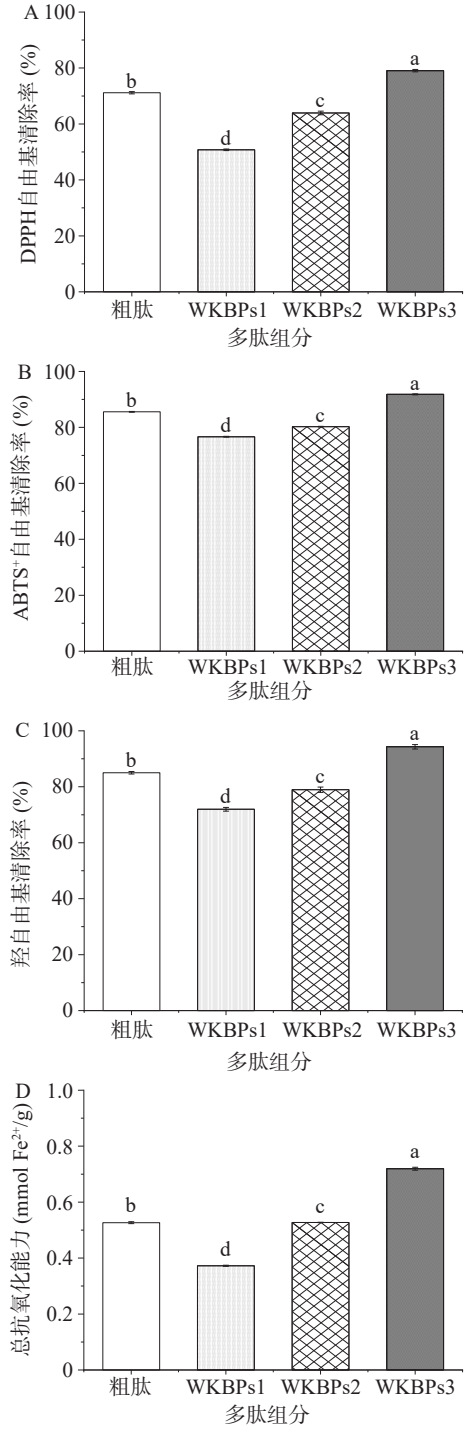


图 4　超滤后各组分抗氧化活性

Fig.4　Antioxidant activity of the fractions after ultrafiltration

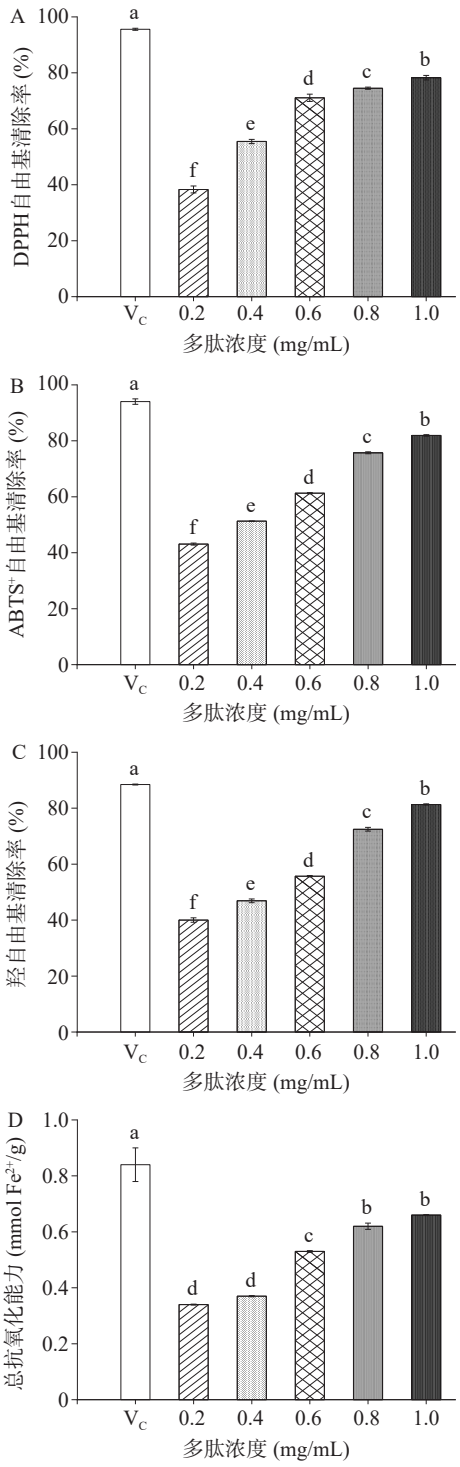


图 5　不同浓度 WKBPs3 抗氧化活性

Fig.5　Antioxidant activity of different concentrations of WKBPs3

2.6　体外抗氧化活性分析

活性氧产生过多或抗氧化防御机制调控不足，会产生大量自由基，这些自由基会催生氧化应激反应[44]。本研究以 0.1 g/mL V_C 为阳性对照，通过测定 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、羟自由基清除率和总抗氧化能力评估 WKBPs3 的抗氧化能力，结果如图 5 所示。从图 5(A~C)可以看出，随着 WKBPs3 浓度的增加，其自由基清除能力呈上升趋势，且逐渐接近 V_C 的清除率，其半抑制浓度(IC_{50})如表 6，DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、羟自由基清除率 IC_{50} 分别为 0.307、0.310 和 0.361 mg/mL，结果表明 WKBPs 具有较好的自由基清除能力，这一结果与杨涵[45] 制备的大豆肽自由基清除能力接近，这可能是由于 WKBPs3 存在较多的活性氨基酸残基，保持高氧化还原电位，为自由基提供有效的电子供体[46]。从图 5(D)可以看出，WKBPs3 在 0.2~1.0 mg/mL 浓度范围内，总抗氧化能力随 WKBPs3 浓度的增加而增加，在 1 mg/mL 的浓度下可以达到 0.66±0.0018 mmol Fe^{2+}/g，略低于

表 6　不同浓度 WKBPs3 的自由基清除率的 IC_{50}

Table 6　IC_{50} of free radical clearance of WKBPs at different concentrations

类别	白芸豆多肽(mg/mL)
DPPH自由基清除率	0.307
$ABTS^{+}$自由基清除率	0.310
羟自由基清除率	0.361

V_C，表现出较好的还原能力，与 Cao 等[47] 对红豆肽总抗氧化能力的研究结果相似，可能是由于分子量较小的肽段其空间位阻较小，更易与金属离子形成配位化合物，使其金属离子螯合能力较强[48]，以上结果说明 WKBPs3 具有较好的抗氧化活性，且呈现出剂量依赖性。

2.7　白芸豆抗氧化肽的筛选及分子对接预测作用机制

2.7.1　LC-MS/MS 质谱分析　经 LC-MS/MS 氨基酸序列检测，从 WKBPs3 组分中共鉴定出 6364 条白芸豆源多肽序列，其一级质谱图如图 6 所示。肽段长度主要分布在 3~18 个氨基酸残基间，肽序列长度位于 3~10 的有 4186 条，占比 65.78%，8 肽占比最多为 10%。其中，肽段中含有大量的亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等疏水性氨基酸及芳香族氨基酸，使其具有良好的抗氧化活性。

2.7.2　虚拟筛选与分子对接　将鉴定出的肽段在 PeptideRanker 网站中进行潜在生物活性预测评分，筛选出得分大于 0.7 的肽段有 677 条，后进一步采用 PyRx 软件对其进行初步筛选，对结合能小于 −10 kcal/mol 肽段进行毒性、自由基清除活性预测，最终得到 10 条肽段，结果如表 7 所示。

Keap1 蛋白是一种 BTB-Kelch 底物衔接蛋白，可调节 Nrf2(一种 bZIP 转录因子)的稳态水平以响应氧化应激[49]，据报道 Keap1-Nrf2 通路是消除体内氧化应激的最可能机制[50]。因此，进一步从分子水平上将鉴定出的肽段与 Keap1 蛋白进行结合，分析其

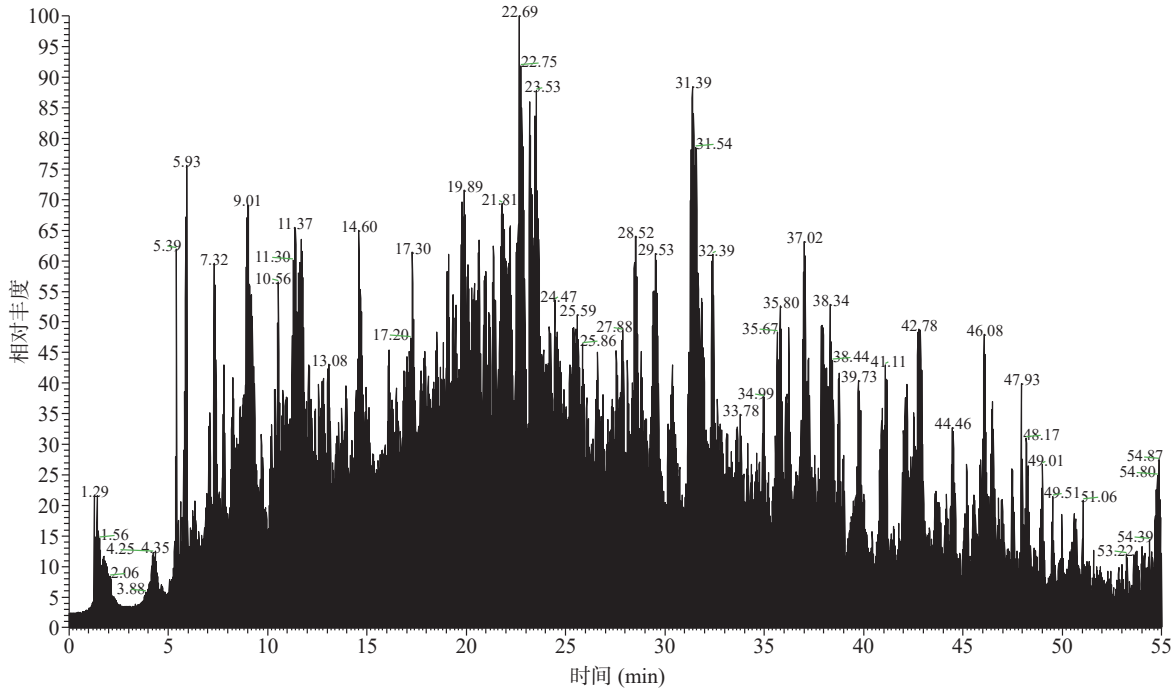


图 6　WKBPs3 的总离子流色谱图

Fig.6　Total ion chromatogram of the WKBPs3

表 7　WKBPs3 鉴定得到的肽序列的虚拟筛选结果

Table 7　Virtual screening results of the peptide sequences identified by WKBPs3

肽段	预测生物活性评分	分子量(Da)	结合能(kcal/mol)	毒性	疏水性氨基酸占比(%)	自由基清除活性评分
FGWGP	0.9874	562.254	−10.9	Non	100	0.5852
FGHPEW	0.8623	771.334	−10.8	Non	67	0.5757
FGPYF	0.9905	629.2849	−10.7	Non	80	0.5810
LGPHW	0.9030	819.4028	−10.6	Non	80	0.5854
FSHPGDF	0.9182	805.3395	−10.3	Non	57	0.5327
FGALGHGL	0.7283	770.4075	−10.2	Non	87	0.5166
FEGNWGPL	0.8890	918.4235	−10.1	Non	75	0.5849
FYPFPHP	0.9506	903.4279	−10.0	Non	71	0.6363
PGPGY	0.8566	489.2223	−10.0	Non	40	0.5700
LGGGWPEM	0.7222	845.374	−10.0	Non	50	0.5892

注：Non表示无毒性。

相互作用力及结合位点等信息。研究表明，结合能越低，与靶标蛋白的相互作用越强[51]，利用 PyMol 软件对 FGWGP、FGHPEW 和 FGPYF 与 Keap1 结合进行可视化处理，3D 和 2D 分子相互作用如图 7 所示，FGWGP 多肽能够与 Keap1 蛋白活性位点氨基酸残基 Tyr334、Ser602、Tyr572 和 Gln530 形成氢键相互作用，与 Phe478 和 Tyr525 形成疏水相互作用，与 Arg415 和 Arg483 提供部分疏水相互作用并同时辅助形成静电相互作用；FGHPEW 多肽能够与氨基酸残基 Arg483、Ser555、Arg380、Arg415 形成氢键相互作用，还能与 Tyr572 和 Tyr334 形成疏水相互作用；FGPYF 能够与活性位点氨基酸 Arg483、Arg415、Asn382、Arg380、Tyr525 和 Tyr572 形成氢键相互作用，与 Arg483 和 Arg415 形成离子键（盐桥），此外，还可以与 Tyr525 和 Tyr572 形成静电相互作用。这些相互作用能够促进抗氧化肽与 Keap1 蛋白之间形成稳定的复合物，并且根据蛋白与多肽的静电表面图也可发现多肽与蛋白契合较好。有研究表明，疏水氨基酸是 Keap1-Nrf2 复合物结合的主要贡献，特别是 Keap1 中 Tyr334、Arg380、Arg415、Arg483、Asn382、Tyr525 和 Tyr572[52]。这与本研究中 FGWGP、FGHPEW 和 FGPYF 三条多肽与 Keap1 的分子对接结果一致。三条多肽均能与 Keap1 蛋白的关键氨基酸残基形成相互作用，尤其是疏水相互作用，从而可能影响 Keap1-Nrf2 复合物的稳定性，进一步调控 Nrf2 信号通路，发挥抗氧化作用。

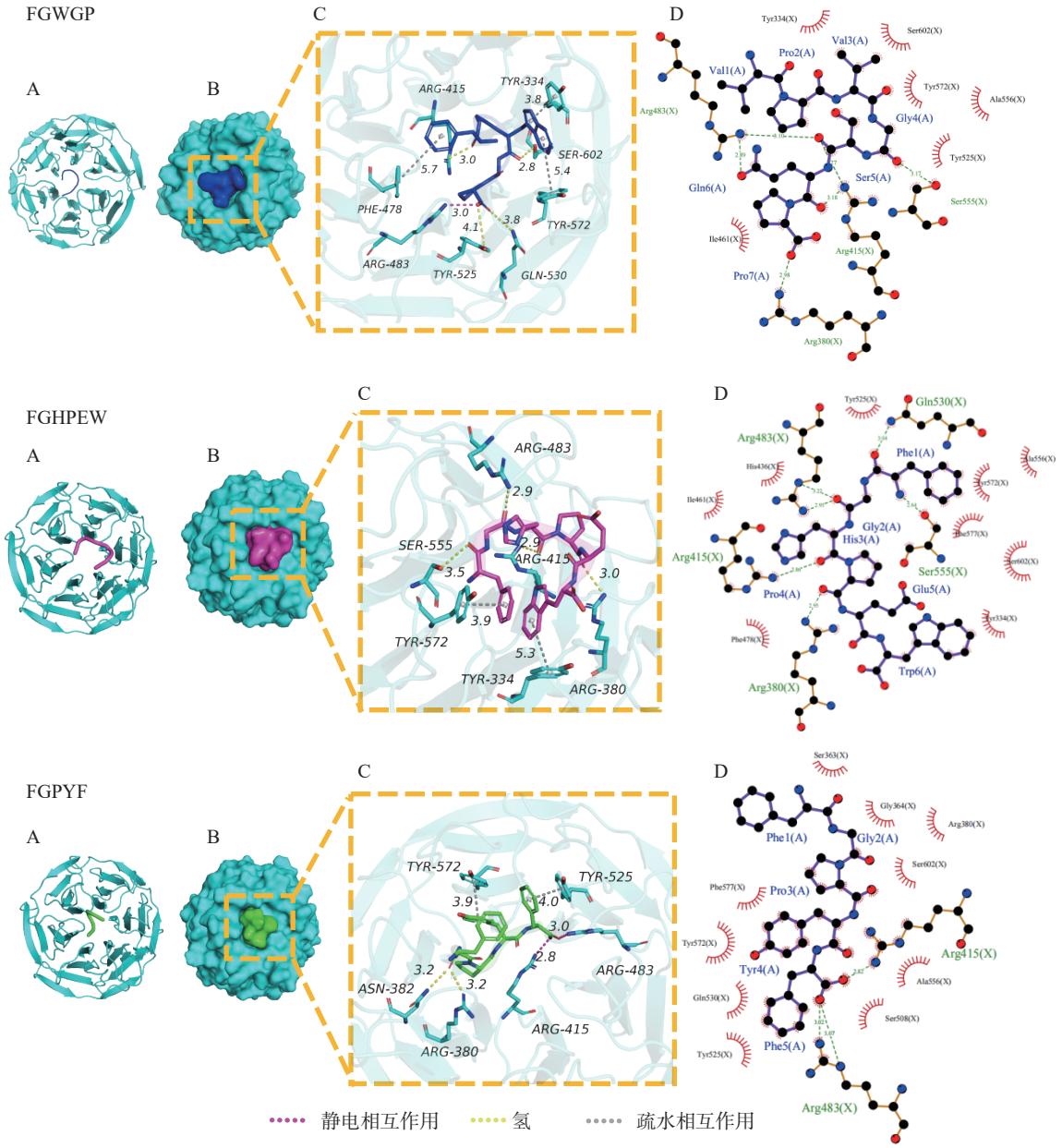


图 7　肽段 FGWGP、FGHPEW、FGPYF 与 Keap1（PDB ID:2FLU）相互作用的分子对接模型

Fig.7　Molecular docking model of peptide segment FGWGP, FGHPEW, FGPYF interacting with Keap1 (PDB ID: 2FLU)

注：（A）复合物的 3D 结构；（B）多肽和 Keap1 的静电表面；（C）复合物的详细结合模式；（D）多肽与 Keap1 活性位点相互作用的 2D 图，2D 蓝色模型和红色扇区模型分别是肽和 Keap1 残基。

2.8　白芸豆抗氧化肽与 Keap1 相互作用的分子动力学模拟分析

本研究通过分析均方根偏差（RMSD）、均方根波动（RMSF）和回转半径（Rg）评估 FGPYF、FGWGP 和 FGHPEW 与 Keap1 结合的稳定性。RMSD 是复合物相对于其初始位置原子坐标的均方根偏差，被视为评估系统稳定性的重要指标，较小的

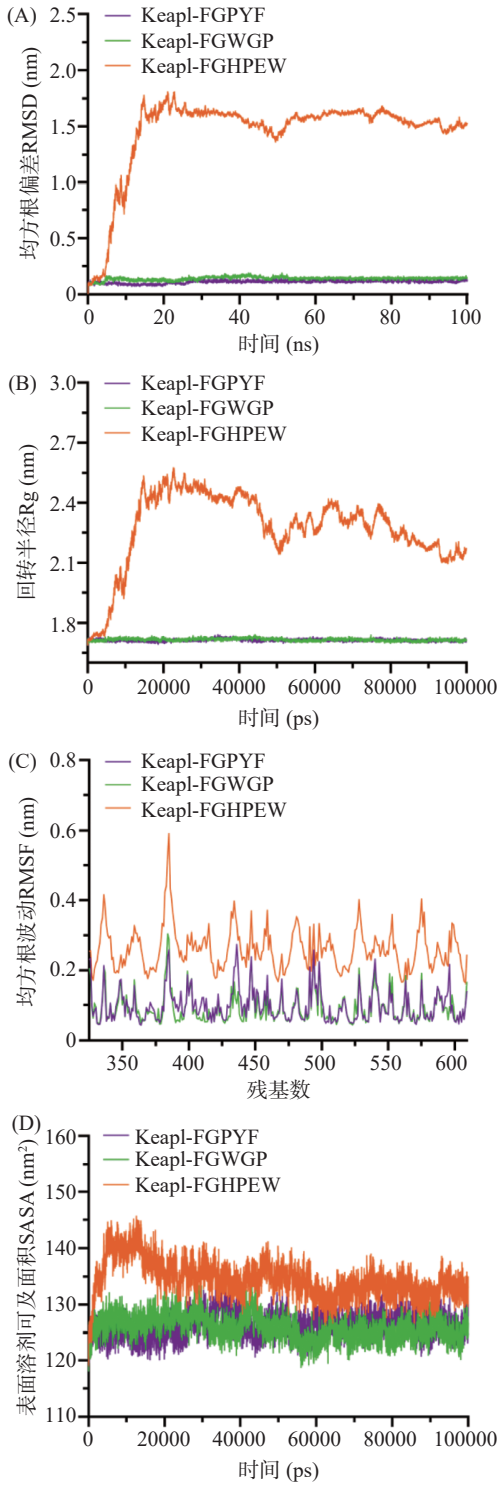


图 8　Keap1 与抗氧化肽 FGWGP、FGHPEW、FGPYF 复合物 RSMD（A）、RMSF（B）、Rg（C）和 SASA（D）曲线

Fig.8　Keap1 and antioxidant peptides FGWGP, FGHPEW, FGPYF complex RMSD (A), RMSF (B), Rg (C), and SASA (D) curves

RMSD 值表示系统更加稳定[53]。如图 8（A）所示，在 100 ns 模拟过程中，FGPYF-Keap1 和 FGWGP-Keap1 复合物的 RMSD 轨迹几乎相似，其 RMSD 值在 0.1~0.16 nm 之间波动，在 0~10 ns 的模拟时间内，其 RMSD 值总体上呈现上升趋势，随后变化趋势保持稳定，RMSD 值稳定在 0.13 nm 左右。在 0~20 ns，FGHPEW-Keap1 复合物的 RMSD 值呈现快速上升趋势，在之后逐渐稳定，其 RMSD 值最终在 1.5 nm 左右波动，模拟结果表明，FGPYF-Keap1 和 FGWGP-Keap1 复合物的 RMSD 值波动较小，结构稳定性更高。各复合物的 RMSD 涨落值均在合理范围内，表明模拟过程中体系中各复合物的结构是平衡的。Rg 用于反映单个氨基酸残基的均方根距离，用于描述蛋白质整体结构的紧密度，Rg 值越小表示复合物结构稳定性更好[54]。如图 8（B）所示，在 100 ns 的模拟过程中，FGPYF-Keap1 和 FGWGP-Keap1 和 FGHPEW-Keap1 复合物的 Rg 值分别稳定在 1.71、1.72、2.16 nm 左右。FGPYF-Keap1 和 FGWGP-Keap1 复合物 Rg 值的总体趋势都是稳定的，而 FGHPEW-Keap1 发生了明显波动，表明 FGPYF-Keap1 和 FGWGP-Keap1 复合物的结构是紧凑且稳定的。RMSF 值表示蛋白质与小分子复合物中单个氨基酸在模拟时间内的波动程度，用于衡量复合物不同区域的柔性，波动越大，意味着残基越灵活，蛋白质结构越不稳定[55]。如图 8（C）所示，FGPYF-Keap1 和 FGWGP-Keap1 复合物的 RMSF 轨迹波动趋势相似，其 RMSF 值均在 0.05~0.25 nm 之间。FGHPEW-Keap1 复合物 RMSF 值则基本在 0.2~0.4 nm 之间，Keap1 残基在 380~394、429~439、490~501 之间波动较大，这可能是因为这些位点上的残基参与了多肽与 Keap1 的相互作用。溶剂可及表面积（SASA）是反映分子或残基与溶剂接触面积的量化指标，SASA 越小表明蛋白小分子结合越紧密[56]。由图 8（D）可知，FGPYF-Keap1、FGWGP-Keap1 和 FGHPEW-Keap1 的 SASA 值均较低，进一步表明了蛋白小分子形成了较为紧密的结合，这与虚拟筛选的结果一致。以上结果表明，FGWGP、FGPYF 和 FGHPEW 均可以与 Keap1 紧密结合为稳定的构象。

3　结论

本研究以白芸豆为原料，通过单因素结合响应面法确定菌-酶协同法制备 WKBPs 最佳工艺条件，得到了高得率及抗氧化活性的 WKBPs。氨基酸组成成分及 GPC 结果显示 WKBPs 分子量主要集中在 3 kDa 以下，且具有潜在的抗氧化活性。超滤后组分 WKBPs3 表现出最好的抗氧化活性，其 DPPH 自由基清除率、$ABTS^{+}$自由基清除率和羟自由基清除率的 IC_{50} 分别为 0.307、0.310 和 0.361 mg/mL，总抗氧化能力在 1 mg/mL 的浓度下可以达到 0.66±0.0018 mmol Fe^{2+}/g。通过 LC-MS/MS 质谱分析及虚拟筛选出 3 条潜在的抗氧化肽，分别为 FGWGP、

FGHPEW 和 FGPYF。分子对接结果表明，3 条肽主要通过氢键、疏水相互作用和静电相互作用等与 Keap1 蛋白活性位点结合形成稳定的复合物，抑制 Keap1 与 Nrf2 的结合，从而调控 Keap1-Nrf2 通路发挥抗氧化作用。通过分子动力学模拟进一步验证 FGWGP、FGHPEW 和 FGPYF 可以与 Keap1 紧密结合形成稳定的构象。综上，FGWGP、FGHPEW 和 FGPYF 可作为新型抗氧化肽被进一步开发和利用，本研究为白芸豆抗氧化肽产品的研发提供技术参考及理论基础，但当前的研究仅局限于 WKBPs 的提取、体外活性表征及抗氧化活性肽序列的筛选，未来可以基于细胞和动物实验进一步验证 3 条多肽在体内的生物学功能，为白芸豆作为功能性食品改善人体健康提供科学依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] SÁNCHEZ M M, ÁVILA-GANDÍA V, PÉREZ-PIÑERO S, et al. Antioxidant effect of a probiotic product on a model of oxidative stress induced by high-intensity and duration physical exercise[J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 323.

[2] 贺东亮. 紫苏多肽分离纯化及其抗肿瘤活性研究[D]. 太原: 中北大学, 2019. [HE Dongliang. Study on purification and anticancer effects of peptides derived from *Perilla frutescens*[D]. Taiyuan: North University of China, 2019.]

[3] MALFATTI M C, ANTONIALI G, CODRICH M, et al. Coping with RNA damage with a focus on APE1, a BER enzyme at the crossroad between DNA damage repair and RNA processing/decay[J]. DNA Repair, 2021, 104: 103133.

[4] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. Clinical Interventions in Aging, 2018, 13: 757−772.

[5] JELINEK M, JURAJDA M, DURIS K. Oxidative stress in the brain: Basic concepts and treatment strategies in stroke[J]. Antioxidants, 2021, 10(12): 1886.

[6] 田丹妮. 灵芝孢子油的提取、氧化稳定性提升与软胶囊车间的工艺设计[D]. 西安: 陕西科技大学, 2020. [TIAN Danni. produceion of *Ganoderma lucidum* spore oil, improvement of oxidation stability and the process design of workshop of *Ganoderma lucidum* spore oil soft capsule[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2020.]

[7] 欧阳小健. 当归多肽的制备及其抗氧化活性机制与构效关系研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021. [OUYANG Xiaojian. The study of preparation, mechanism of antioxidant activity and structure-activity relationship of peptides in *Angelica sinensis* Radix[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021.]

[8] 贾斌. 不同品种芸豆蛋白营养、功能及消化特性的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2023. [JIA Bin. Study on the nutritional, functional, and digestive characteristics of different varieties of kidney bean protein[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2023.]

[9] CHOE U, OSORNO J M, OHM J B, et al. Modification of physicochemical, functional properties, and digestibility of macronutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours by different thermally treated whole seeds[J]. Food Chemistry, 2022, 382: 132570.

[10] XIE Mengxi, MA Yuanyuan, AN Feiyu, et al. Ultrasound-assisted fermentation for antioxidant peptides preparation from okara: Optimization, stability, and functional analyses[J]. Food Chemistry, 2024, 439: 138078.

[11] 李思楠, 王萌, 安宇, 等. 复合菌种发酵制备白芸豆多肽工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(3): 213−221. [LI Sinan, WANG Meng, AN Yu, et al. Process optimization and antioxidant activity analysis of white kidney bean polypeptides prepared by composite strain fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(3): 213−221.]

[12] 吴占春. 酶-菌耦合法制备鳜鱼副产物水解肽及其体外模拟胃肠消化吸收的研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022. [WU Zhanchun. Research of preparation of hydrolytic peptides from mandarin fish by-products by enzyme bacteria coupling method and its simulated gastrointestinal digestion and absorption *in vitro*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022.]

[13] 臧凤. 乳酸菌发酵辅助酶解制备蛋清肽的工艺优化及其抗氧化活性评价[D]. 南昌: 南昌大学, 2023. [ZANG Feng. Optimization and antioxidant activity evaluation of egg white peptides prepared by *Lactobacillus* fermentation-assisted enzymolysis[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.]

[14] 马慧, 梅洁, 袁新超, 等. 菌酶协同固态发酵核桃谷蛋白制备抑菌肽[J]. 食品工业科技, 2024, 45(12): 112−120. [MA Hui, MEI Jie, YUAN Xinchao, et al. Bacteriozyme cooperated with solid-fermented walnut glutenin to prepare bacteriostatic peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(12): 112−120.]

[15] FAN Xing, MA Xuemei, MAIMAITIYIMING R, et al. Study on the preparation process of quinoa anti-hypertensive peptide and its stability[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 9: 1119042.

[16] ZHANG Wenhua, ABUBAKER M A, LI Zekun, et al. Bioactive peptides with antioxidant and ACE inhibitory properties in goat milk protein hydrolysates: Peptidomics and molecular docking study[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 299: 140286.

[17] 徐斐然, 王玉, 王晓静, 等. 基于计算机筛选与分子模拟技术的宁夏肉牛血红蛋白源抗氧化肽的鉴定[J]. 食品科学, 2025, 46(2): 108−117. [XU Feiran, WANG Yu, WANG Xiaojing, et al. Hemoglobin-derived antioxidant peptides from beef cattle in Ningxia: Identification based on computerized screening and molecular docking[J]. Food Science, 2025, 46(2): 108−117.]

[18] YU Yiding, MA Sitong, HAN Yuxi, et al. A novel antioxidant peptide from soybean meal alleviates H_2O_2-induced oxidative damage via the Keap1-Nrf2-HO-1 pathway[J]. Food Research International, 2025, 206: 116084.

[19] 周雅情, 王莹, 王昱沣. 牛排菇多肽的酶解工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(14): 169−174. [ZHOU Yaqing, WANG Ying, WANG Yufeng. Optimization of enzymatic hydrolysis of *Fistulln hepatica* polypeptides[J]. Food Research and Development, 2023, 44(14): 169−174.]

[20] 刘潇. 基于磁场强化与原位监测的核桃多肽固态发酵—蛋白酶解联合制备技术研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018. [LIU Xiao. Study on walnut peptides prepared by integration of solid state fermentation and enzymolysis based on magnetic field strengthening and *in-situ* monitoring[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018.]

［21］ SUN Jin, ZHOU Changyu, CAO Jinxuan, et al. Purification and characterization of novel antioxidative peptides from duck liver protein hydrolysate as well as their cytoprotection against oxidative stress in HepG2 cells[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 848289.
［22］ 葛珍珍, 许明月, 赵玉翔, 等. 杜仲籽粕水解肽的制备及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 218−224. ［GE Zhenzhen, XU Mingyue, ZHAO Yuxiang, et al. Preparation and antioxidant activity analysis of hydrolyzed peptides from *Eucommia ulmoides* seed meal[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 218−224.］
［23］ 李思楠, 王萌, 余钧, 等. 基于体外模拟消化探究白芸豆多肽降糖活性[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(3): 292−297. ［LI Sinan, WANG Meng, YU Jun, et al. The investigation of hypoglycemic activity of white kidney bean polypeptides based on simulated digestion *in vitro* system[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(3): 292−297.］
［24］ 沙玉欢, 毛晓英, 吴庆智, 等. 核桃分心木黄酮物质的组分及其抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 91−98. ［SHA Yuhuan, MAO Xiaoying, WU Qingzhi, et al. Flavonoid composition and antioxidant activity of *Diaphragma juglandis* fructus[J]. Food Science, 2021, 42(12): 91−98.］
［25］ 夏吉安, 黄凯, 李森, 等. 绿豆抗氧化肽的酶法制备及其抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(10): 40−47. ［XIA Ji'an, HUANG Kai, LI Sen, et al. Enzymatic preparation of mung bean antioxidant peptides and antioxidant activity investigation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(10): 40−47.］
［26］ 卢跃红, 王斌, 刘偲, 等. 沙葱多酚提取物抗氧化活性及其对消化酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2024, 24(8): 164−177. ［LU Yuehong, WANG Bin, LIU Cai, et al. Antioxidant activities and inhibitory effects on digestive enzyme of polyphenolic produces from *Allium mongolicum* regel[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(8): 164−177.］
［27］ 庞会娜. 葛根抗氧化肽的提取分离及其对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023. ［PANG Huina. produceion and isolation of antioxidant peptides from *Pueraria lobata* and their protective effects on HepG2 cells from oxidative damage[D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2023.］
［28］ 李青青, 陈晨, 曹艳亭, 等. 红芽芋多糖提取工艺优化及其抗氧化活性的研究[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(5): 1272−1282. ［LI Qingqing, CHEN Chen, CAO Yanting, et al. Optimum produceion process for the polysaccharides from red bud taro(*Colocasia esculenta*(L.)) schott and its antioxidative activity *in vitro*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(5): 1272−1282.］
［29］ 周爽, 张青, 齐晓芬, 等. 枯草芽孢杆菌和中性蛋白酶协同发酵豆粕方法的研究[J]. 食品工业, 2016, 37(9): 163−168. ［ZHOU Shuang, ZHANG Qing, QI Xiaofen, et al. Study on the method of the synergy *Bacillus subtilis* and neutral protease in soybean meal fermentation[J]. The Food Industry, 2016, 37(9): 163−168.］
［30］ 于德涛, 李纪元, 刘烁, 等. 水貂源高产蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2023(9): 4078−4089. ［YU Detao, LI Jiyuan, LIU Shuo, et al. Isolation, identification, and enzymatic characterization of *Bacillus subtilis* from mink[J]. Microbiology China, 2023(9): 4078−4089.］
［31］ 葛风茹. 枯草芽孢杆菌发酵草鱼加工副产物制备寡肽的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023. ［GE Fengru. Study on the preparation of oligopeptides from by-products of grass carp processing by fermentation of *Bacillus subtilis*[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.］
［32］ 柏倩, 毛绍云, 徐倩. 混菌发酵女贞子制备抗氧化肽及其结构的鉴定[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(2): 34−42. ［BAI Qian, MAO Shaoyun, XU Qian. Preparation of antioxidative peptides from *Ligustrum lucidum* by mixed fermentation and identification of their structures[J]. China Food Additives, 2025, 36(2): 34−42.］
［33］ 李晓彤, 胡冠华, 王诗琪, 等. 羊骨生物活性肽体内外降尿酸活性及作用机制[J]. 食品科学, 2025, 46(8): 143−150. ［LI Xiaotong, HU Guanhua, WANG Shiqi, et al. Uric acid-lowering activity *in vitro* and *in vivo* and mechanism of sheep bone bioactive peptides[J]. Food Science, 2025, 46(8): 143−150.］
［34］ SHI Chenshan, LIU Miaomiao, ZHAO Hongfei, et al. A novel insight into screening for antioxidant peptides from hazelnut protein: Based on the properties of amino acid residues[J]. Antioxidants, 2022, 11(1): 127.
［35］ 史晨杉. 榛源抗氧化肽的定向制备及其抑制油脂氧化的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2022. ［SHI Chenshan. Directional preparation of hazelnut protein-derived antioxidant peptides and their inhibition against oil oxidation[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2022.］
［36］ WEN Chaoting, ZHANG Jixian, FENG Yuqin, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H_2O_2-induced oxidative stress[J]. Food Chemistry, 2020, 327: 127059.
［37］ 苏梓盈, 陆旭丽, 代亚萍, 等. 响应面法优化金鲳鱼皮抗氧化肽制备工艺及其组成分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(23): 198−207. ［SU Ziying, LU Xuli, DAI Yaping, et al. Optimization of preparation process of antioxidant peptides from golden pompano (*Trachinotus ovatus*) skin by response surface method and its composition analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(23): 198−207.］
［38］ 李思涵, 倪庆圆, 耿相玉, 等. 纳豆抗氧化肽对 H_2O_2 诱导 HEK293 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(6): 161−169. ［LI Sihan, NI Qingyuan, GENG Xiangyu, et al. Protective effects of natto antioxidant peptide against H_2O_2-induced oxidative stress injury in HEK293 cells[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(6): 161−169.］
［39］ 郭子鑫. 海蜇小分子肽制备及生理活性研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2023. ［GUO Zixin. Preparation and biological activity of low molecular weight peptide from *Rhopilema esculentum* kishinouye[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023.］
［40］ 曹洪震. 鳗鱼蛋白源 DPP-Ⅳ抑制活性肽的制备、分离纯化及性质鉴定[D]. 无锡: 江南大学, 2023. ［CAO Hongzhen. Preparation, purification and characterization of DPP-Ⅳ inhibitory peptide derived from eel protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.］
［41］ 朱巧楠, 王鹏, 杨选, 等. 油茶饼粕抗氧化肽的鉴定及其稳定性[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 332−341. ［ZHU Qiaonan, WANG Peng, YANG Xuan, et al. Identification and stability of antioxidant peptides from *Camellia* seed cake[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 332−341.］
［42］ 付镓榕, 胡小静, 马尚玄, 等. 不同分子量澳洲坚果多肽制备工艺与抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 414−421. ［FU Jiarong, HU Xiaojing, MA Shangxuan, et al. Preparation technology and antioxidant activities of different molecular weight Macadamia nut polypeptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(20): 414−421.］
［43］ 吴绍珍. 山核桃饼粕生物活性肽的制备与活性研究[D]. 杭

州: 浙江农林大学, 2022. [WU Shaozhen. Preparation and activity study of bioactive peptides from pecan cake[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2022.]
[44] HASSAN H A, AHMED H S, HASSAN D F. Free radicals and oxidative stress: Mechanisms and therapeutic targets[J]. Human Antibodies, 2024, 32(4): 151−167.
[45] 杨涵. 大豆抗氧化肽的制备及其应用[D]. 重庆: 重庆大学, 2022. [YANG Han. Preparation and application of soybean antioxidant peptides[D]. Chongqing: Chongqing University, 2022.]
[46] LEE S Y, LEE D Y, HUR S J. Changes in the stability and antioxidant activities of different molecular weight bioactive peptide produces obtained from beef during *in vitro* human digestion by gut microbiota[J]. Food Research International, 2021, 141: 110116.
[47] CAO Mengdi, LI Wenhui, LI He, et al. Antioxidant and ACE inhibitory activities of peptides prepared from adzuki bean by semi-solid enzymatic hydrolysis[J]. Food Bioscience, 2022, 47: 101620.
[48] CHEN Jinyu, YAN Yijun, ZHANG Leilei, et al. Purification of novel antioxidant peptides from myofibrillar protein hydrolysate of chicken breast and their antioxidant potential in chemical and H_2O_2-stressed cell systems[J]. Food & Function, 2021, 12(11): 4897−4908.
[49] LO S, LI Xuchu, HENZL M T, et al. Structure of the Keap1: Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling[J]. The EMBO Journal, 2006, 25(15): 3605−3617.
[50] WANG Xiang, DENG Yejun, ZHANG Yang, et al. Screening and evaluation of novel α-glucosidase inhibitory peptides from *Ginkgo biloba* seed cake based on molecular docking combined with molecular dynamics simulation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(27): 10326−10337.
[51] LIAO Fei, YOUSIF M, HUANG Ruya, et al. Network pharmacology- and molecular docking-based analyses of the antihypertensive mechanism of *Ilex* Kudingcha[J]. Frontiers in Endocrinology, 2023, 14: 1216086.
[52] 于梦怡, 刘世林, 黄志远, 等. 青刺果抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及其分子对接解析[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(2): 109−119. [YU Mengyi, LIU Shilin, HUANG Zhiyuan, et al. Isolation, purification, structure identification and molecular docking analysis of antioxidant peptide from *Prinsepia utilis* Royle[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(2): 109−119.]
[53] MEN Deying, DAI Jiahe, YUAN Yuxue, et al. Exploration of anti-osteoporotic peptides from *Moringa oleifera* leaf proteins by network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics and cellular assay analyses[J]. Journal of Functional Foods, 2024, 116: 106144.
[54] FU Mengqi, GAO Jie, MAO Kemin, et al. Interaction mechanism between surface layer protein and yeast mannan: Insights from multi-spectroscopic and molecular dynamics simulation analyses[J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137352.
[55] MASAND V H, SK M F, KAR P, et al. Identification of food compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking and molecular dynamics simulations[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2021, 217: 104394.
[56] PAN Fei, LI Jiaxing, ZHAO Lei, et al. A molecular docking and molecular dynamics simulation study on the interaction between cyanidin-3-O-glucoside and major proteins in cow's milk[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(1): e13570.