

王一帆, 陈德春, 王紫琳, 等. 钙离子诱导组装核桃蛋白水解物的抗氧化性及稳定性研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 430-438.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060041

WANG Yifan, CHEN Dechun, WANG Zilin, et al. Antioxidant Activity and Stability of Calcium Ion-induced Assembled Walnut Protein Hydrolysates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 430-438. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060041

· 营养与保健 ·

钙离子诱导组装核桃蛋白水解物的 抗氧化性及稳定性研究

王一帆¹, 陈德春¹, 王紫琳¹, 蒋海芬¹, 马咏梅², 陶亮^{1,3,4,*}, 田洋^{1,3,4,*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201;

2. 云南农业大学就业与创新创业指导服务中心, 云南昆明 650201;

3. 食药同源资源开发与利用教育部工程研究中心, 云南昆明 650201;

4. 云南省药食同源功能食品工程研究中心, 云南昆明 650201)

摘要: 为研究核桃肽与金属离子螯合物的抗氧化性与稳定性, 以分子量<1 kDa 的核桃肽 (Walnut peptide, WP) 为原料, 采用金属离子配位法, 系统研究了 WP 与不同金属离子形成螯合物后的抗氧化能力。在此基础上, 筛选出抗氧化能力最优的金属螯合物, 完成其抗氧化性和稳定性的综合评价。进一步借助分子对接技术确定核桃肽中抗氧化能力最佳的肽段, 并探究其结合作用机制。研究结果表明, WP (6 mg/mL) 与 Ca²⁺ 配位后, 抗氧化能力与 WP 相比显著提升 ($P<0.05$), 其 DPPH 自由基清除率达 74.00%±0.54%, ABTS⁺ 自由基清除率为 85.27%±0.67%, 均高于其他金属离子与 WP 形成的肽螯合物。此外, 核桃肽-钙螯合物 (Walnut peptide-Ca, WP-Ca) 在不同 pH、温度和胃肠道消化中表现出良好的稳定性。通过分子对接技术筛选出与 DPPH 螯合能力最佳的肽段 NALVAPHY, 该肽段与 DPPH 之间基于静电相互作用和氢键作用力发挥抗氧化作用。本研究不仅为核桃加工副产物的高值化利用提供了一定的理论依据, 也为新型金属螯合肽类抗氧化剂的开发提供了思路, 在功能性食品和营养补充剂领域具有一定的应用前景。

关键词: 核桃肽, 核桃肽-金属离子螯合物, 抗氧化性, 稳定性, 分子对接

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2026)09-0430-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060041



本文网刊:

Antioxidant Activity and Stability of Calcium Ion-induced Assembled Walnut Protein Hydrolysates

WANG Yifan¹, CHEN Dechun¹, WANG Zilin¹, JIANG Haifen¹, MA Yongmei²,

TAO Liang^{1,3,4,*}, TIAN Yang^{1,3,4,*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Agricultural University Employment and Innovation Guidance Service Center, Kunming 650201, China;

3. Engineering Research Center for Development and Utilization of Chinese Food and Drug Resources,

Ministry of Education, Kunming 650201, China;

4. Yunnan Engineering Research Center for Chinese Medicine and Food, Kunming 650201, China)

Abstract: This study investigated the antioxidant activity and stability of walnut peptide-metal chelates using walnut peptides (WP, Mw<1 kDa) as raw material. The antioxidant capacity of WP chelates with different metal ions prepared by

收稿日期: 2025-06-05

基金项目: 云南省万人计划产业技术领军人才项目 (YNWR-CYJS-2020-010); 云南省省市一体化专项 (202302 AN360002); 高层次科技人才及创新团队选拔专项 (202305 AS350025)。

作者简介: 王一帆 (2003-), 女, 大学本科, 研究方向: 食品科学, E-mail: w2684159508@163.com。

* 通信作者: 陶亮 (1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: 875316158@qq.com。

田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: tianyang1208@163.com。

coordination was systematically evaluated, followed by screening of optimal-activity chelates and comprehensive assessment of their antioxidant capacity and stability. Molecular docking was employed to identify the peptide segment exhibiting the strongest antioxidant capacity within walnut peptides and elucidate its specific binding interactions. Results showed that the walnut peptide-calcium chelates (WP-Ca) exhibited significantly enhanced antioxidant activity ($P < 0.05$), achieving $74.00\% \pm 0.54\%$ DPPH and $85.27\% \pm 0.67\%$ ABTS⁺ radical scavenging rates, surpassing other metal-ion chelates. WP-Ca also maintained high stability across various pH, temperatures, and simulated gastrointestinal digestion. Molecular docking identified NALVAPHY as the optimal peptide for DPPH chelation, with its antioxidant activity mediated by electrostatic interactions and hydrogen bonding with DPPH. This study provides theoretical support for valorizing walnut processing by-products and advances the development of novel metal-chelated peptide antioxidants, with particular implications for functional foods and nutraceuticals.

Key words: walnut peptides (WP); walnut peptides-metal ion chelates; antioxidant activity; stability; molecular docking

核桃(*Juglans regia* L.)属于胡桃科胡桃属落叶乔木,主要种植区分布在云南、新疆、四川等省份。云南省的核桃种植面积已达 4300 万亩,核桃干果产量超过 240 万吨,是全球最大的核桃生产地。核桃含有多种蛋白质、维生素、矿物质、多酚和多糖等活性成分,具备较高的营养价值^[1]。在我国居民膳食结构中植物蛋白的主要来源是大豆,且主要依赖进口^[2],而核桃油压榨过程中产生的副产物核桃粕,蛋白质含量 40% 以上,含有人体必需氨基酸^[3],是一种优质的植物蛋白资源,具备较高的开发潜力和应用价值^[4],但目前多作为饲料原料或直接废弃处理,资源利用率不足且附加价值较低^[5]。核桃蛋白中溶解性较差的谷蛋白占 72%^[6],加之种皮中酚类物质引发的蛋白聚集沉淀效应,导致核桃蛋白水溶性较低^[7],限制了核桃蛋白在食品加工中的应用。研究表明,通过酶法或微生物水解技术对核桃蛋白进行适度修饰,可有效提高其溶解性,使其转化生成更易被机体吸收利用的功能性多肽^[8],以减少核桃粕中优质蛋白资源的浪费,提高核桃油副产品的附加值。

多肽可以通过配位作用与金属离子形成稳定螯合物,并通过肽的吸收运输机制,提高生物体对矿物元素的利用效率^[9]。不同的肽可能具有不同的结合模式,金属与肽链之间的分子间作用力能够影响螯合物的稳定性。此外,金属螯合肽还展现出多样的生物学特性,包括调节免疫系统、降低血糖和血脂水平等作用^[10]。宫瑞林等^[11]研究发现小麦蛋白肽与钙离子结合形成肽钙螯合物后,具有更加稳定的环状结构,防止钙在体内与磷酸盐等产生难溶盐类,增加钙的吸收利用。López-garcía 等^[12]研究发现铜螯合肽富含组氨酸,其可防止铜的氧化。冷雨佳等^[13]研究发现大豆肽锌螯合物具有优于无机锌盐的胃肠溶解性和肠道透过率,可能增加锌的生物利用度。目前,以多肽为主要原料或配料开发的功能性食品及保健品中,多肽的活性和稳定性对产品质量至关重要,但基于金属离子配位提高多肽活性及稳定性的研究鲜有报道,因此开展相关研究具有一定意义及必要性,也将在食品工业等领域发挥重要作用。

本研究基于抗氧化指标(DPPH 和 ABTS⁺自由基清除率)测定,从 Zn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Se⁴⁺与核

桃多肽配位制成的金属螯合物中筛选出具有较强抗氧化性的核桃肽金属螯合物。通过热稳定性、酸碱稳定性、胃肠道模拟消化试验对核桃肽及核桃肽-钙螯合物进行抗氧化性和稳定性分析,并使用分子对接模拟技术分析多肽配体与自由基对接的结合模式,进一步验证核桃肽钙金属螯合物的抗氧化能力。本研究旨在提高核桃多肽抗氧化性及稳定性,以实现核桃蛋白肽高值化利用,以期核桃产业发展提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脱脂核桃粕 云南一叶生物科技股份有限公司; DPPH、ABTS 美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶(250 U/mg)、胃蛋白酶(250 U/mg) 北京索莱宝试剂有限公司; 胆酸盐 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氯化钙、氯化铁、硫酸锌、硫酸铜、亚硒酸钠分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司。

VL-7F 低速冷冻离心机 湖南百诺克离心机仪器有限公司; A-AB33PH ZH pH 仪 上海越平科学仪器有限公司; SKSW-KC-100 酶标仪 美国伯腾仪器有限公司; DK-8D 水浴锅 金坛市城西峥嵘实验公司; YP20002 电子分析天平 上海舜宇恒平仪器有限公司; TD-1A-50 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; BPH-9272 恒温振荡培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; TS-211B 摇床培养箱 上海天呈实验仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分子量<1 kDa 的核桃肽的制备 采用碱提酸沉法处理脱脂核桃粕获得核桃分离蛋白^[1],将核桃分离蛋白溶解在超纯水中,用 1 mol/L 氢氧化钠调节混合溶液的 pH 至 9.0,加入 2%(w/w)碱性蛋白酶,在 55 °C 下水解 3 h,加热煮沸 10 min 以灭酶活,离心(4000 r/min, 20 min),收集液体上清液^[2],使用 1 kDa 超滤膜分离上清液,获得分子量<1 kDa 的核桃肽(WP)并冻干保存。

1.2.2 金属螯合物的制备 参照 Zhang 等^[14]的方法,将 WP(终浓度为 6 mg/mL)溶于蒸馏水中,分别与 CaCl₂、FeCl₃、ZnSO₄、CuSO₄、Na₂SeO₃ 以 1:2(WP:金属化合物)的质量比混合后得到金属螯合物(WP-

Ca、WP-Fe、WP-Zn、WP-Cu、WP-Se)。调节溶液 pH 至 6.8, 在 37 °C 条件下水浴反应 30 min。随后在反应液中加入 3 倍体积(即反应液:乙醇=1:3)乙醇将其混合均匀, 静置于 4 °C 条件下使金属配合物沉淀 1 h。以 8000 r/min 离心 15 min 后, 收集沉淀并冻干得到金属离子螯合物。

1.2.3 抗氧化性测定

1.2.3.1 DPPH 自由基清除能力 参照任娇艳等^[15]的方法并稍作修改。取 0.02 mmol/L 的 DPPH 溶液与 1.2 mg/mL 的样品液以体积 1:3 的比例混匀。在室温条件下避光反应 30 min, 于 517 nm 波长处测定其吸光值。按照式(1)计算出测得样品的 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式(1)

式中: A_1 为样品待测液吸光度值, A_2 为乙醇溶液作对照吸光值, A_0 为以纯水代替样液并测空白吸光度值。

1.2.3.2 ABTS⁺自由基清除能力 参照王宇晴等^[16]的方法并稍作修改。称取 ABTS 200.0 mg 和过硫酸钾 34.4 mg, 溶于 50 mL 蒸馏水中, 充分摇匀, 在室温避光条件下反应 24 h, 作为 ABTS 母液。取适量 ABTS 母液, 95% 乙醇稀释使其在 734 nm 波长处吸光值在 0.70±0.02 范围内, 作为 ABTS 测定溶液, 溶液现配现用。取 ABTS 测定液与 1 mg/mL 的样品液以体积 1:3 比例混匀, 室温避光反应 6 min, 于 734 nm 处测定吸光度。按照式(2)计算测得样品的 ABTS⁺自由基清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式(2)

式中: A_1 为样品待测液吸光度值, A_2 为乙醇溶液作对照吸光值, A_0 为以纯水代替样液并测空白吸光度值。

1.2.4 稳定性研究

1.2.4.1 金属螯合物的热稳定性 采用熊含露等^[17]的方法, 稍加修改。将筛选出的金属螯合物分别在 37、50、60、70、80、90、100 °C 条件下处理 30 min 后, 利用 1.2.3.1 和 1.2.3.2 的方法测定不同温度处理后的核桃肽金属螯合物的抗氧化性, 以未处理的核桃肽为对照, 每次处理重复 3 次。

1.2.4.2 金属螯合物的酸碱稳定性 采用吴晗硕等^[18]的方法, 稍加修改。用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将去离子水的 pH 分别调为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0。以 6 mg/mL 金属螯合物溶解在各 pH 溶液室温反应 1 h, 利用 1.2.3.1 和 1.2.3.2 的方法测定抗氧化性。以未处理的核桃肽为对照, 每次处理重复 3 次。

1.2.4.3 金属螯合物的体外模拟消化 参考刘春燕^[19]的方法并稍加修改。将核桃肽与核桃肽金属螯合物以 6 mg/mL 的浓度溶解到胃液中(1 mg/mL 的胃蛋白酶溶液, pH 为 2.0), 37 °C 摇床上避光振荡 2 h。随后将胃模拟消化后的反应液加入肠液(1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液, pH7.4)使酶与样品的质量比为 1:25, 37 °C 摇床避光振荡 2 h。每隔半小时取一次消化液并在 100 °C 热水中灭酶 5 min^[20]。所得样品利用 1.2.3.1 和 1.2.3.2 的方法测定抗氧化性。以未处理的核桃肽为对照, 每次处理重复 3 次。

1.2.5 同步热分析(TG-DSC) 将 5 mg 分子量 < 1 kDa 的核桃肽与核桃肽金属螯合物样品加载到坩埚上, 在流量为 50 mL/min 的氮气吹扫气、20 mL/min 的保护气中进行 25~900 °C 的热重分析, 空坩埚为参比, 升温速率 20 K/min^[21]。

1.2.6 分子对接 多肽(NALVAPHY)结构根据其氨基酸序列利用 AlphaFold3 进行构建(<https://golgi.sandbox.google.com/>)。使用离子操作平台(MOE 2019.01)进行离子对接, 将离子导入 MOE 软件中比利用 Compute 中的 Energy Minimize 模块对其进行几何优化以及能量最小化, 之后定义为对接配体。将 PEP 多肽导入 MOE 中, 利用 Structure Preparation 模块对蛋白进行优化处理, 具体包括去除溶剂离子, 水离子, 无关金属离子, 加氢以及能量最小化等, 最后将处理好的靶点蛋白定义为对接受体。对接前, 选择 Amber14: EHT 的力场和反应场的隐形溶剂化模型。对接配体为 Ca²⁺以及 DPPH 分子。选择 dock 模块进行离子对接。根据诱导-契合原理进行对接, 其中允许受体口袋范围内的侧链可以根据配体的构象移动, 并限制其位置。通过 London DG 函数对所有的离子姿势进行排序, 然后对前 500 个姿势进行立场细化并利用 GBVI/WSA 进行评分。对接后的复合物的可视化均在 Pymol2.1 软件上完成。

1.3 数据处理

所有实验至少进行三次平行重复, 结果以平均值±标准偏差(mean±SD)表示。采用 Origin 2024 软件绘图。方差分析和显著性差异检验由 SPSS 22.0 根据 Duncan 检验采用单因素方差分析(ANOVA)确定, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同核桃肽金属螯合物抗氧化活性

核桃肽各金属螯合物抗氧化性通过 DPPH、ABTS⁺自由基清除率进行对比分析, 结果如图 1 所示。5 种核桃肽金属螯合物的 DPPH 自由基清除能力大小依次为: WP-Ca>WP-Se>WP-Cu>WP-Zn>WP-Fe, ABTS⁺自由基清除能力为: WP-Ca>WP-Se>WP-Cu>WP-Fe>WP-Zn。其中 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率为 74.00%±0.54%, ABTS⁺自由基清除率为 85.27%±0.67%, WP-Ca 的两个自由基清除率在

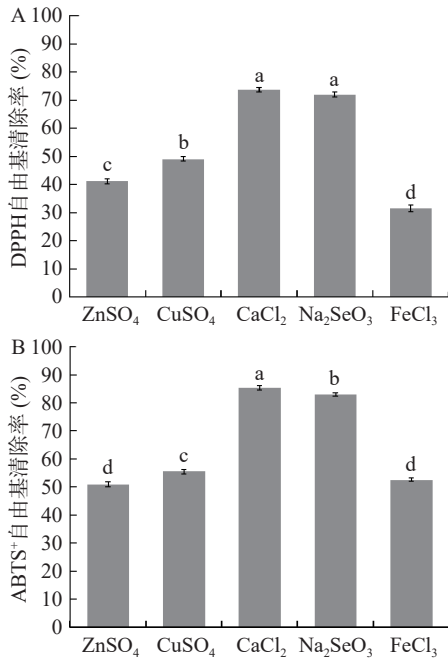


图 1 WP 金属螯合物抗氧化情况

Fig.1 Antioxidant status of metal chelates of walnut peptide
注: (A)不同金属螯合物 DPPH 自由基清除率; (B)不同金属螯合物 ABTS⁺自由基清除率; 不同小写字母表示显著性差异 ($P<0.05$), 图 2~图 5 同。

5 个 WP 金属螯合中均最高, 表现出良好的抗氧化效果, 这是由于 Ca²⁺电荷密度低、配位能力适中, 螯合时更易形成稳定但疏松的网状结构, 保留多肽抗氧化基团(如氨基、羧基)的暴露^[22-23]。Ca²⁺和 Se⁴⁺的 WP 金属螯合物与其余 3 种金属螯合物有显著差异 ($P<0.05$), 但 WP-Se 的 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺自由基清除率分别比 WP-Ca 低 2.16%、2.29%。因此, 选择 WP-Ca 进行后续试验。

2.2 WP 和 WP-Ca 稳定性研究

2.2.1 WP 和 WP-Ca 热稳定性 图 2A 为不同温度对 WP 和 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率的影响。结果显示, WP 和 WP-Ca 均具备一定的 DPPH 自由基清除能力, 但随着温度的升高 DPPH 自由基清除能力均逐渐降低, 这可能是由于温度影响了多肽的空间构象及与金属离子的结合状态。在 37 °C 和 50 °C 条件下, WP 的 DPPH 自由基清除率分别为 76.41%±0.66% 和 74.75%±0.60%, 而 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率分别为 88.68%±0.51% 和 85.88%±0.62%, 在小于 60 °C 的温度的条件下, WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率显著大于 WP 的 DPPH 自由基清除率 ($P<0.05$), 且呈现随温度增高, DPPH 自由基清除率均下降的趋势。在温度大于等于 60 °C 的条件下, 两者的清除活性相近, 但 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除活性始终强于 WP 组, WP 的 DPPH 自由基清除率分别为 73.32%、69.76%、62.07%、51.65%、47.74%, WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率分别为 74.61%、71.35%、64.06%、52.68%、48.65%。值得注意的是, 常规巴氏消毒温度为 62.5 °C 左右^[24], WP-Ca 在巴氏

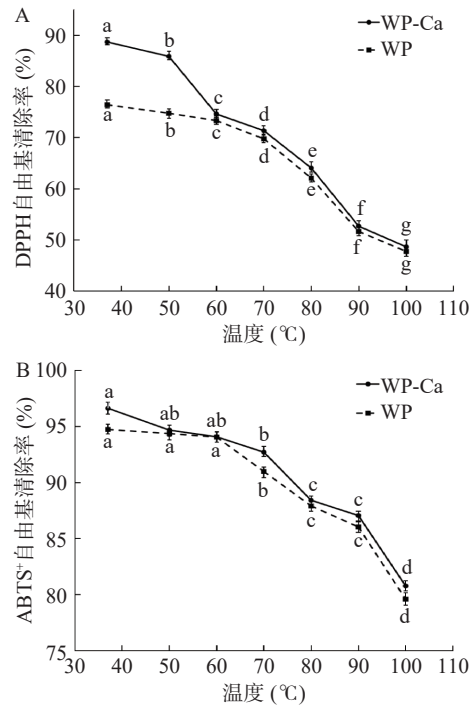


图 2 温度对 WP 与 WP-Ca 螯合物 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of temperature on DPPH and ABTS⁺ free radical clearance of WP and WP-Ca

注: (A)不同温度条件下 DPPH 自由基清除率; (B)不同温度条件下 ABTS⁺自由基清除率。

消毒温度前后活性能力均大于 WP, 为核桃肽相关创新产品工业化生产的热工艺优化提供了数据支持。综上, WP-Ca 的热稳定性高于 WP, 因此 WP-Ca 在低温热加工产品中应用优势明显。

图 2B 为不同温度对 WP 和 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。随着温度的升高, WP 和 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除率活性呈现下降趋势。在 37 °C 和 70 °C 时 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除率与 WP 的 ABTS⁺ 自由基清除率相差较多, 分别相差 1.89%、1.72%。60 °C 时 WP 与 WP-Ca 两者对 ABTS⁺ 自由基的清除率相等, 但 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除能力在 37~100 °C 条件下普遍高于 WP 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力, 表明在此温度范围内 WP-Ca 热稳定性强于 WP, 此结论与 Luo 等^[25] 的研究结论一致。但整体来看, 温度对 WP 和 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除能力的影响大于 ABTS⁺ 自由基清除能力。

2.2.2 WP 和 WP-Ca 酸碱稳定性 WP 与 WP-Ca 在不同 pH 条件下的 DPPH 自由基清除率如图 3A 所示, 在 pH 为 2.0~10.0 的范围内, WP 及 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率均呈先升高后降低的趋势。在 pH 环境变化中, pH 为 4.0 时, WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率达到最大值 85.52%±0.56%; pH 为 6.0 时, WP 的 DPPH 自由基清除率达到最大值 84.98%±0.45%; pH 为 10.0 时, WP 和 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率下降到最小值, 分别为 64.14%±0.55% 和

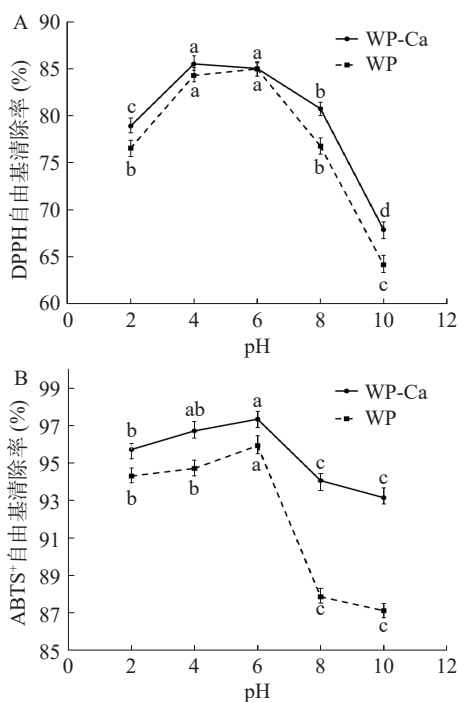


图3 pH对WP及WP-Ca的DPPH、ABTS⁺自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of pH on DPPH and ABTS⁺ free radical clearance of WP and WP-Ca

注: (A)不同 pH 条件下 DPPH 自由基清除率; (B)不同 pH 条件下 ABTS⁺自由基清除率。

67.88%±0.68%, 且 WP 和 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率能力较最大值分别降低 24.52% 和 20.63%, 即 WP-Ca 组的抗氧化能力下降幅度小于 WP 组, pH 环境变化下 WP-Ca 更具稳定性优势。整体观察, WP 与 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除能力对碱性环境更加敏感, 与郑昌亮^[26] 研究鳙鱼抗氧化肽随 pH 变化趋势相似。在酸碱稳定性试验中 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率明显高于 WP, 在过酸或过碱性条件下 WP 和 WP-Ca 的 DPPH 自由基能力下降, 可能由于酸性条件更容易影响多肽的残基基因及空间结构, 使其与自由基结合受到一定的抑制, 从而导致其活性降低, 而碱性环境中, 多肽容易发生外消旋或脱酰胺反应, 从而导致其活性减弱。因此, 在 WP 的加工及贮藏过程中, 应严格控制环境条件, 避免强酸、强碱物质与其接触。

WP 与 WP-Ca 在不同 pH 条件下的 ABTS⁺ 自由基清除率如图 3B 所示, 随 pH 增加, WP 和 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除率呈先升高后降低的趋势。在 pH 为 6.0 时 WP 和 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除率均达到最大值, 分别为 95.92%±0.43%、97.34%±0.21%, WP 和 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除率均在 pH 为 10.0 时达到最小值, 分别为 87.11%±0.32% 和 93.14%±0.41%。结果表明 WP 和 WP-Ca 均具有一定的 ABTS⁺ 自由基清除能力, 在酸碱稳定性试验中 WP-Ca 的 ABTS⁺ 自由基清除力明显高于 WP, 这是由于在螯合反应后多肽的供氢能力得到了显著提

高^[27], 增强了 WP-Ca 的抗氧化能力。综上, WP-Ca 的酸碱稳定性整体优于 WP, 且对于 WP-Ca, 相较于 DPPH 自由基清除能力, ABTS⁺ 自由基清除能力可维持更佳的酸碱稳定性。

2.3 WP 和 WP-Ca 胃肠道模拟消化抗氧化性研究

图 4A、B 展示了 WP 和 WP-Ca 在体外模拟胃消化、肠消化过程中对 DPPH 自由基的清除率。在体外模拟胃消化 30~120 min 中 WP 和 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率总体呈现上升趋势, WP 的 DPPH 自由基清除率在 55.46%~76.78% 之间, WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率在 66.97%~80.69% 之间, 整体优于 WP。在胃模拟消化(30~120 min)期间, WP 与 WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率分别上升了 21.32% 和 13.72%, 这是因为在胃消化过程中, 多肽进一步被酶解成较小的肽段和氨基酸, 这些较小的分子更容易与 DPPH 自由基结合, 从而提高 DPPH 自由基的清除能力^[28]。肠模拟消化 30、60、90、120 min 过程中 WP 的 DPPH 自由基清除率分别为 69.08%、57.48%、42.48%、39.71%, WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率分别为 72.71%、67.48%、65.02%、47.31%, 总体呈现下降的趋势, 可能因为在弱碱性环境 WP、WP-Ca 中肽的抗氧化能力受到抑制^[29], WP-Ca 的 DPPH 自由基清除率明显高于 WP, 因此可知 WP-Ca 比 WP 更稳定, 受到的影响更小。梁秋芳^[30] 进行的玉米多肽及抗氧化研究实验结果与本实验结果相似。

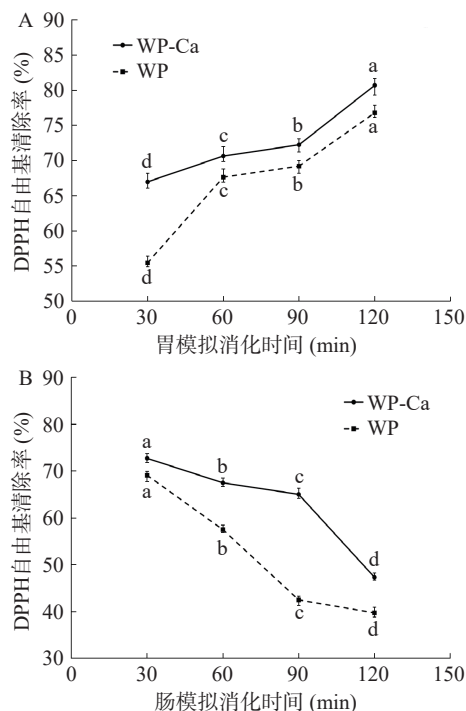


图4 WP 和 WP-Ca 胃肠道模拟消化过程中 DPPH 自由基清除率

Fig.4 DPPH radical scavenging activity of WP and WP-Ca during simulated gastrointestinal digestion

注: (A)胃模拟消化 DPPH 自由基清除率; (B)肠模拟消化 DPPH 自由基清除率。

图 5A、B 展示了 WP 与 WP-Ca 在体外模拟胃消化、肠消化环境下 ABTS⁺自由基清除效率。体外模拟胃消化 30、60、90、120 min 过程中 WP 的 ABTS⁺自由基清除率依次为 50.23%、50.87%、60.60%、76.13%，WP-Ca 的 ABTS⁺自由基清除率分别为 55.93%、64.03%、70.03%、77.62%，在体外模拟胃消化过程中 WP 和 WP-Ca 的 ABTS⁺自由基清除率总体情况呈现上升趋势。WP 和 WP-Ca 在胃模拟消化(30~120 min)过程中的 ABTS⁺自由基清除率分别上升了 25.90%、21.69%，结果显示 WP-Ca 的 ABTS⁺自由基清除率高于 WP。肠模拟消化 30、60、90、120 min 过程中 WP 的 ABTS⁺自由基清除率分别为 49.06%、48.11%、46.06%、43.65%，WP-Ca 的 ABTS⁺自由基清除率分别为 52.96%、50.75%、46.01%、44.01%，均呈现下降趋势。WP 和 WP-Ca 在肠模拟消化(30~120 min)过程中 ABTS⁺自由基清除率分别下降 5.4%、8.95%。整体来看，经过胃肠道模拟消化后 WP-Ca 比 WP 的 ABTS⁺自由基清除率高。结果同样证明 WP-Ca 抗氧化活性比 WP 高。

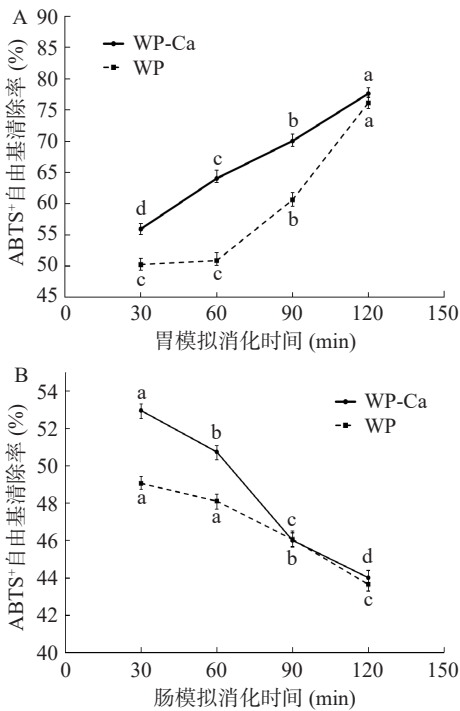


图 5 WP 和 WP-Ca 胃肠道模拟消化过程中 ABTS⁺自由基清除率

Fig.5 ABTS⁺ radical scavenging activity of WP and WP-Ca during simulated gastrointestinal digestion

注: (A)胃模拟消化 ABTS⁺自由基清除率; (B)肠模拟消化 ABTS⁺自由基清除率。

2.4 WP 和 WP-Ca 的 TG-DSC 分析

图 6A 为 WP 的热重曲线, 由图可知, 在加热过程中有 6 个弱吸热峰, WP 分别在 88.3、153.1、193.3、276.4、411.4、796.9 °C 有吸热峰, 同时伴随着 TG-DSC 曲线的下降, 在 25~900 °C 过程中出现了 2 个失重区, WP 在这个阶段质量损失约 74.81%。由此说明 WP 在 88.3 °C 时开始分解, 这可能由不同

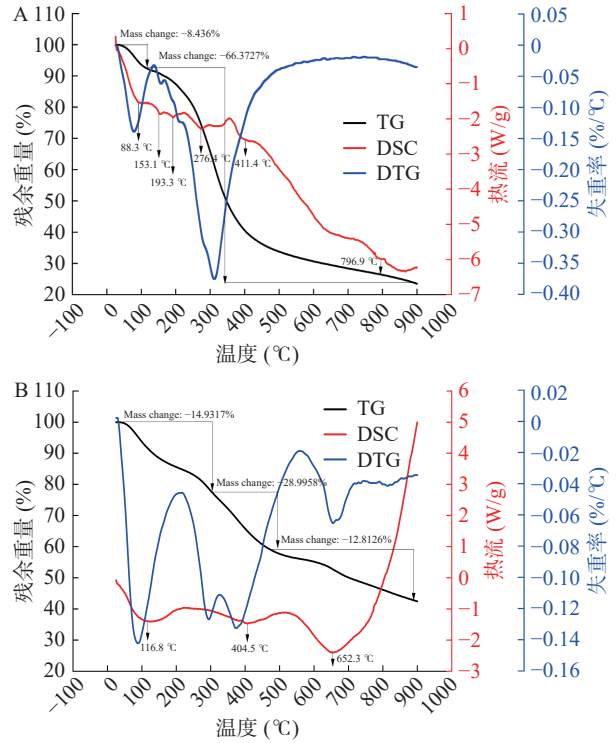


图 6 WP 和 WP-Ca 的热重曲线

Fig.6 Thermogravimetric curve of WP and WP-Ca

注: (A)WP 热重曲线; (B)WP-Ca 热重曲线。

位置上的 C-N 键在高温下断裂引起的^[31]。

图 6B 为 WP-Ca 的热重曲线, 由图可知, 在加热过程中出现 3 个吸热峰, WP-Ca 分别在 116.8、404.5、652.3 °C 有吸热峰。在各类化学键中, 键能的增加导致断裂过程需消耗更多的能量。随着断裂温度的提高, 物质结构愈发稳定, 抗破坏性也更强。此研究表明, WP 与 Ca²⁺之间存在着相互作用, 形成了一种新的化学键使其结构更为稳定, 在 116.8 °C 时才开始分解。这个阶段, WP-Ca 的质量损失大约为 56.74%。随着温度的不断升高, WP 和螯合物上的化学键会在高温下断裂, WP-Ca 的起始分解温度比 WP 高 28.5 °C。这表明 WP-Ca 可能形成了稳定的化学键^[32], 分解螯合物需要更多的能量, 说明螯合物的结构更加稳定。结果表明 WP-Ca 的稳定性比 WP 强。

2.5 WP 分子对接分析

表 1 为核桃肽序列与 DPPH 对接的结果, 由表可知, NALVAPHY 序列与 DPPH 对接的结合能最低, Ma 等^[33] 研究指出肽与 DPPH 的最佳结合构型基于最小的结合能, Wen 等^[34] 研究表明西瓜籽中与 DPPH 结合能最低的活性肽段具有最强的抗氧化性, 而 NALVAPHY 序列与 DPPH 最易结合, 因此与其他肽段相比, 其具有更优的潜在抗氧化能力, 选择 NALVAPHY 序列的对接结果进行分析。将 Ca²⁺、DPPH 与多肽 NALVAPHY 进行分子对接, 结果如表 2 所示。结合能越低, 结合能力越强, 结合能小于 -5.00 kcal/mol 表示良好结合, 小于 -7.00 kcal/

表1 核桃肽序列与DPPH对接结果

Table 1 Docking results of walnut peptide sequence and DPPH

序号	序列	结合能(kcal/mol)
1	VVQGRGLHGA	-8.5
2	VVAIPAGVAH	-8.6
3	VLINAYRI	-8.8
4	VIAFPAGVAH	-9.2
5	TSTGPTSR	-8.7
6	SNAPRLVY	-9.7
7	SERPSYSN	-9.6
8	RQPEGGR	-8.1
9	RQESTLVR	-8.4
10	PSFSNAPRL	-9.4
11	NSFNLPII	-8.9
12	NALVAPHY	-9.8
13	LQLSAERGA	-8.6
14	LPSFSNAPR	-8.6
15	LLRGIENY	-8.8
16	ISTVNSHTL	-8.5
17	IRHNLDTQ	-9
18	HSTLPVLY	-9.6
19	GIGTVPVGR	-8.1
20	GESQLIVM	-7.5
21	GAKSPDQSY	-9.4
22	AVGSDIPLI	-8.8
23	ALNTPRDR	-9.6
24	AIRALPEE	-8.4
25	AERGVLYR	-8

表2 NALVAPHY和Ca²⁺、DPPH结合

Table 2 NALVAPHY binds to Ca²⁺ and DPPH

多肽	配体	结合能(kcal/mol)	结合方式
NALVAPHY	Ca ²⁺	-3.02	静电相互作用
NALVAPHY	DPPH	-6.29	静电相互作用; 氢键
NALVAPHY	Ca ²⁺ -DPPH	-6.62	静电相互作用; 氢键

mol 则表示强结合能力^[35], 对接结果表明, DPPH 与 NALVAPHY, Ca²⁺、DPPH 与 NALVAPHY 三者的结合能分别为-6.29、-6.62 kcal/mol, 并形成静电相互作用与氢键作用, 因此三者存在良好的结合作用且匹配度良好。将对接后离子及分子与蛋白形成的复合物利用 Pymol 2.1 软件进行可视化, 得到离子与蛋白的结合模式, 根据结合模式可以很清晰的看到离子及分子与蛋白口袋的相结合的氨基酸残基。图 7 中 A 为 NALVAPHY 和 Ca²⁺结合模式(单个金属离子与肽结合无法呈现 2D 图), B 为 NALVAPHY 和 DPPH 结合模式, C 为 NALVAPHY 和 Ca²⁺-DPPH 结合模式, Ca²⁺与 NALVAPHY 的 TYR-8 氨基酸形成静电相互作用, 平均距离为 2.80 Å。DPPH 与 NALVAPHY 的 ASN-1, LEU-3, HIS-7 氨基酸形成氢键作用, 与多肽结合较强。此外, 将 Ca²⁺与 NALVAPHY 复合物再与 DPPH 对接, 发现三者之间存在很强亲和力, 结合能为-6.62 kcal/mol, 且 NALVAPHY 的 TYR-8 的羧基与 DPPH 化合物的硝基均能够与 Ca²⁺形成静电相互作用, 而且化合物硝基还可以与 HIS-7, ALA-5 形成氢键。本研究选择 NALVAPHY 序列为代表性多肽组分与 Ca²⁺、DPPH

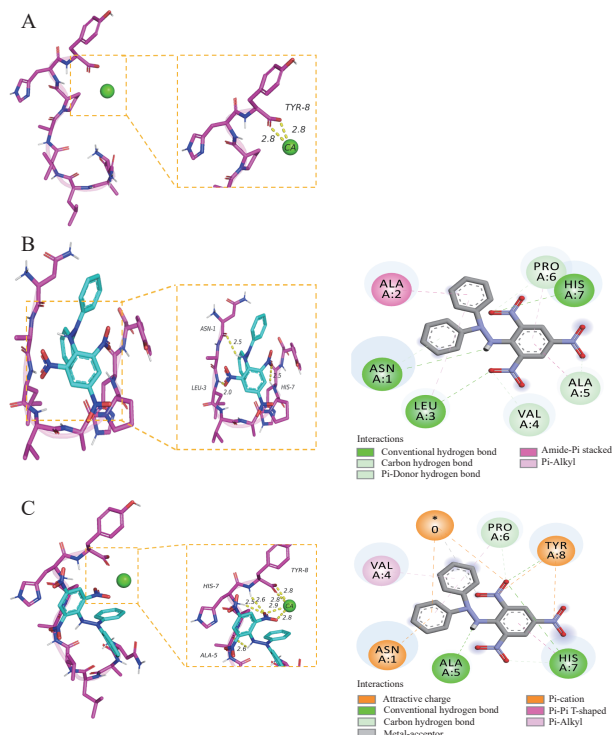


图7 分子对接结果

Fig.7 Molecular docking results

注: (A)NALVAPHY 和 Ca²⁺结合模式; (B)NALVAPHY 和 DPPH 结合模式; (C)NALVAPHY 和 Ca²⁺-DPPH 结合模式; 图 7A 中黄色虚线表示静电作用力, 图 7B、7C 中黄色虚线代表氢键。

进行分子对接, 分析 Ca²⁺螯合多肽后对其抗氧化性及稳定性提升的潜在作用, 在此基础上, 推测其他多肽组分亦可能通过类似的分子间相互作用(氢键、静电相互作用、疏水相互作用等)参与协同作用, 进而形成“多组分协同增强效应”实现其功能强化。

3 结论

本研究以分子量<1 kDa 的核桃肽为原料, 基于抗氧化活性指标, 通过抗氧化试验与分子对接, 热稳定性、酸碱稳定性、胃肠道模拟消化试验及热重分析, 研究 WP-Ca 的抗氧化特性及稳定性。结果表明 Zn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Se⁴⁺中与 WP 配位抗氧化活性较好的金属螯合物为 WP-Ca, 且 WP-Ca 在抗氧化试验与稳定性试验中展现出比 WP 更好的抗氧化能力和稳定性, 分子对接定向锁定了分子量<1 kDa 的核桃肽中抗氧化能力最强的肽序列为 NALVAPHY, 进一步证实, Ca²⁺与 NALVAPHY 螯合后再与 DPPH 对接, 三者亲和力更强, 即进一步表明核桃肽钙金属螯合物的抗氧化能力及稳定性强于核桃肽。本研究为提高核桃多肽功能性提供了理论基础和技术支持, 为实现核桃蛋白的高值化利用提供新的途径, 为推动核桃产业技术创新具有一定理论意义。

参考文献

- [1] 田洋, 汤木果, 周艳, 等. 不同分子质量糖基化核桃肽的制备及功能特性分析[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 205–214. [TIAN Y, TANG M G, ZHOU Y, et al. Preparation and functional properties of glycosylated walnut peptides with different molecular masses[J]. Food Science, 2023, 44(10): 205–214.]
- [2] 谈亚丽, 熊蓉, 黄蓉, 等. 核桃品种及加工方式对其蛋白质制品特性的影响[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(3): 130–135. [TAN Y L, XIONG R, HUANG R, et al. Effect of walnut varieties and processing methods on the properties of their protein products[J]. Cereals and Oils, 2025, 38(3): 130–135.]
- [3] 董阳, 李晓敏, 史玉东, 等. 常见植物蛋白的分类组成和性质研究概述[J]. 农产品加工, 2024(2): 84–92. [DONG Y, LI X M, SHI Y D, et al. Classification, composition and properties of common plant proteins[J]. Farm Products Processing, 2024(2): 84–92.]
- [4] 王姗姗, 左阮靖, 张玉红. 生物活性肽制备方法的研究进展[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 255–262. [WANG S S, ZUO R J, ZHANG Y H. Recent advances in the production of bioactive peptides[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(2): 255–262.]
- [5] 缪福俊, 宁德鲁. 核桃多肽生物活性研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 48–51. [LIAO F J, NING D L. Progress on bioactivity of walnut peptides[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(3): 48–51.]
- [6] MAO X Y, HUA Y F, CHEN G G. Amino acid composition, molecular weight distribution and gel electrophoresis of walnut (*Juglans regia* L.) proteins and protein fractionations[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 2003–2014.
- [7] 李笑笑. 核桃内种皮多酚的提取及核桃油与核桃蛋白粉的稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [LI X X. Study on polyphenol extraction from walnut kernel skin and stability of walnut oil and walnut protein powder[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [8] 孙娜. 微生物发酵核桃粕在食品生产中的应用[J]. 食品工业, 2024, 45(8): 152–156. [SUN N. Application of microbial fermentation of walnut meal in food production[J]. The Food Industry, 2024, 45(8): 152–156.]
- [9] LIU Y, WANG Z, KELIMU A, et al. Novel iron-chelating peptide from egg yolk: Preparation, characterization, and iron transportation[J]. Food Chemistry, 2023, 18: 100692.
- [10] 沈刚. 乌骨鸡金属螯合肽的分离纯化及其金属螯合、抗氧化活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021. [SHEN G. Study on the isolation and purification of metal chelating peptides from black-bone silky fowl and its metal chelating and antioxidant activities [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.]
- [11] 宫瑞林, 刘伯业, 陈复生, 等. 小麦蛋白肽钙螯合物的制备工艺及结构表征[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2023, 44(6): 1–8, 43. [GONG R L, LIU B Y, CHEN F S, et al. Preparation and structural characterization of chelate of wheat protein peptide and calcium[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2023, 44(6): 1–8, 43.]
- [12] LÓPEZ-GARCÍA G, DUBLAN-GARCÍA O, ARIZMENDI-COTERO D, et al. Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins[J]. Molecules, 2022, 27(4): 1343.
- [13] 冷雨佳, 段晓杰, 陈复生. 大豆肽锌螯合物的制备、结构表征及其体外消化分析[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(4): 29–37. [LENG Y J, DUAN X J, CHEN F S. Preparation, structural characterization and *in vitro* digestion analysis of soybean peptide-zinc chelate[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2022, 43(4): 29–37.]
- [14] ZHANG J P, TANG Y X, ZHOU S P. Novel strategy to improve the bioactivity and anti-hydrolysis ability of oat peptides via zinc ion-induced assembling[J]. Food Chemistry, 2023, 416: 135468.
- [15] 任娇艳, 史传超, 常博, 等. 核桃蛋白的分离制备及其酶解物的抗氧化特性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(3): 118–124. [REN J Y, SHI C C, CHANG B, et al. Separation and preparation of walnut protein and antioxidant properties of its enzymatic hydrolysate[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(3): 118–124.]
- [16] 王宇晴, 徐晓涵, 朱明慧, 等. 茶叶渣抗氧化肽的分离纯化、鉴定及其活性测定[J]. 食品科学, 2025, 46(5): 142–150. [WANG Y Q, XU X H, ZHU M H, et al. Isolation, purification, identification and activity of antioxidant peptides from tea residue [J]. Food Science, 2025, 46(5): 142–150.]
- [17] 熊含露, 张露, 李金林, 等. 鲟鱼骨胶原蛋白-钙螯合物的制备及结构表征与稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 168–175. [XIONG H L, ZHANG L, LI J L, et al. Preparation, structure characterization, and stability of catfish bone collagen polypeptide-calcium chelate[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 168–175.]
- [18] 吴晗硕, 任杰, 张新雪, 等. 玉米低聚肽螯合钙的结构表征及其体外稳定性[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(1): 94–98. [WU H S, REN J, ZHANG X X, et al. Structural characterization and *in vitro* stability of corn oligopeptide chelated calcium[J]. Cereals and Oils, 2024, 37(1): 94–98.]
- [19] 刘春燕. 西瓜籽肽与钙螯合物的制备及其功能特性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023. [LIU C Y. Preparation and functional properties of watermelon seed peptide and calcium chelate[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023.]
- [20] 王俊强. 大豆肽钙螯合物的结合机理及其性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [WANG J Q. Study on binding mechanism and properties of calcium-binding soypeptides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]
- [21] 苑贤伟, 石梦园, 颜如玉, 等. 胶束酪蛋白复酶水解肽与钙形成螯合物的制备、表征及螯合机制[J]. 食品科学, 2024, 45(20): 57–64. [YUAN X W, SHI M Y, YAN R Y, et al. Preparation, characterization and formation mechanism of calcium—chelating peptide derived from micellar casein by enzymatic hydrolysis[J]. Food Science, 2024, 45(20): 57–64.]
- [22] 阮国瑞. 核桃楸多肽—钙螯合物的制备及性质研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019. [RUAN G R. Preparation and properties of *Juglans mandshurica* Maxim calcium-chelating peptide[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.]
- [23] 孙小东. 核桃蛋白肽改善骨质疏松活性评价和钙螯合肽的制备与结构表征[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021. [SUN X D. Evaluation of osteoporosis activity improved by walnut protein hydrolysate and preparation and characterization of calcium chelating peptide[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2021.]
- [24] 周文姬, 沈永珍, 周紫光, 等. 融冻与巴氏消毒法对母乳巨细胞病毒感染性的影响[J]. 海南医学, 2023, 34(6): 832–835. [ZHOU W J, SHEN Y Z, ZHOU Z G, et al. Effect of thawing and pasteurization on human cytomegalovirus infection through breast milk [J]. Hainan Medical Journal, 2023, 34(6): 832–835.]
- [25] LUO J, YAO X, SOLADOYE O P, et al. Phosphorylation

- modification of collagen peptides from fish bone enhances their calcium-chelating and antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 155: 112978.
- [26] 郑昌亮. 鳙鱼抗氧化肽及其纳米颗粒的制备和稳定性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023. [ZHENG C L. Preparation and stability of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) antioxidant peptide and its nanoparticles[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.]
- [27] 吴朋谕. 地龙多肽-钙螯合物的制备、性质及其应用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023. [WU P Y. Preparation, properties and application of earthworm peptide calcium chelate[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2023.]
- [28] LIU D D, CHEN M, ZHU J S, et al. A two-stage enzymolysis method and its application in exerting antioxidant activity of walnut protein[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 889434.
- [29] 李如蕊, 陈欣, 茹月蓉, 等. 体外模拟消化过程中核桃花提取物抗氧化活性的变化[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(11): 196-201. [LI R R, CHEN X, RU Y R, et al. Changes of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of walnut flower[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(11): 196-201.]
- [30] 梁秋芳. 玉米多肽制备技术及其抗氧化和抗炎活性的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019. [LIANG QF. The study of corn peptide preparation technology and its antioxidant and anti-inflammatory activities[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.]
- [31] 黄顺丽. 乳清蛋白钙整合肽的制备、分离与表征[D]. 福州: 福州大学, 2016. [HUANG S L. Preparation, purification and characterization of calcium-binding peptide from whey protein[D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2016.]
- [32] 王孟丽, 布冠好, 陈复生, 等. 花生肽-钙螯合物的制备及其结构表征[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(5): 47-54,76. [WANG M L, BU G H, CHEN F S, et al. The preparation and structural characterization of peanut peptide-calcium chelate[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2021, 42(5): 47-54,76.]
- [33] MA Y Y, ZHANG D D, LIU M Q, et al. Identification of antioxidant peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin and their mechanism of action by molecular docking[J]. *Foods*, 2022, 11: 2576.
- [34] WEN C, ZHANG J, ZHANG H, et al. Study on the structure-activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130432.
- [35] ABULAITI A, JIMILIHAN S, MAIMAITIMING N, et al. Quince extract resists atherosclerosis in rats by down-regulating the EGFR/PI3K/Akt/GSK-3 β pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 160: 114330.