

核桃抗氧化肽的酶法制备、鉴定及其对脂氧合酶的抑制机理

洪佳伟¹, 肖柳柳¹, 王爱琳¹, 李闯¹, 朱西平¹,
顾千辉², 谢婷婷², 薛正莲^{*1}

(1. 安徽工程大学 生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 三只松鼠股份有限公司, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 作者以核桃粕为原料制备抗氧化肽, 用胰酶酶解核桃蛋白质, 以超氧阴离子自由基清除率为主要指标优化酶解条件, 分离纯化酶解产物。通过 LC-MS/MS 技术鉴定多肽序列, 通过最低对接结合能、蛋白质稳定指数等参数筛选抗氧化肽。结果表明, 最优酶解条件下, 酶解液的超氧阴离子自由基清除率为 26.57%。酶解液经 Smartdex G-50 分离纯化得到 4 个组分, 在相同质量浓度下, D-4 组分超氧阴离子自由基清除率最高。对 D-4 组分进行序列鉴定, 经计算机虚拟筛选推测 R.AGIQFPVG.R 为 D-4 组分抗氧化活性的主要贡献物。该肽段和脂氧合酶最低对接结合能为 -21 933.85 J/mol, 蛋白质预测结果为稳定蛋白质。对接结果表明, R.AGIQFPVG.R 和脂氧合酶非活性位点 Glu186 结合, 说明该肽段主要起非竞争性抑制作用, 该研究为天然抗氧化剂的筛选提供参考。

关键词: 核桃; 抗氧化肽; 分离纯化; 分子对接; 生物信息学; 酶解

中图分类号: TS 201.1 文章编号: 1673-1689(2024)06-0112-07 DOI: 10.12441/spyswjs.20230524001

Enzymatic Preparation and Identification of Walnut Antioxidant Peptides and Their Inhibitory Mechanism on Lipoxygenase

HONG Jiawei¹, XIAO Liuliu¹, WANG Ailin¹, LI Chuang¹, ZHU Xiping¹,
GU Qianhui², XIE Tingting², XUE Zhenglian^{*1}

(1. School of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China; 2. Three Squirrels Co., Ltd., Wuhu 241000, China)

Abstract: To enhance the utilization of walnut meal, walnut protein was enzymatically hydrolyzed by trypsin and the purified hydrolysates were separated to analyze the antioxidant peptides. The preparation conditions were optimized by using superoxide anion free-radical scavenging as the main indicator. The purified components were sequenced by LC-MS/MS and the peptides were screened by docking binding energy and protein stability index. Under optimum hydrolysis conditions, the superoxide anion free-radical scavenging rate of hydrolysate was 26.57%. Altogether four hydrolysate fractions were separated by Smartdex G-50, among which, the hydrolysate, namely D-4

收稿日期: 2023-05-24 修回日期: 2023-11-25

基金项目: 安徽省重点研发计划项目(202104a06020003)。

* 通信作者: 薛正莲(1967—), 女, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事酶工程研究。E-mail: xuezl@ahpu.edu.cn

displayed the highest scavenging rate at the same concentration. The sequence of D-4 component was identified and R.AGIQFPVG.R was presumed to be the main bearer of antioxidant activity, as determined by virtual computer screening. Through molecular docking with lipoxygenase, it was found that R.AGIQFPVG.R was able to form hydrogen bonds with inactive center of lipoxygenase with a binding energy of -21 933.85 J/mol. The docking results showed that R.AGIQFPVG.R bound to the lipoxygenase inactive site *via* Glu186, indicating that the peptide acted mainly as a non-competitive inhibitor. This study conducted an enzymatic hydrolysis of walnut meal to prepare antioxidant peptides to provide a reference research for the screening of natural antioxidants.

Keywords: walnut, antioxidant peptides, isolation and purification, molecular docking, bioinformatics, enzymolysis

核桃仁富含不饱和脂肪酸,在生产、储藏等过程中易发生不可逆氧化反应导致酸败,进而影响风味、缩短货架期^[1]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是氧化应激的主要诱因,在核桃内 ROS 过量累积会对生物大分子如油脂、蛋白质等造成氧化损伤,引发脂质过氧化^[2]。抗氧化剂可以有效抑制脂质过氧化反应,但长期使用化学合成抗氧化剂如 TBHQ、BHA 等会带来一系列副作用,包括细胞毒性、遗传毒性、致癌作用^[3]。因此,如何寻找优良天然抗氧化剂成为研究热点。

生物质源抗氧化肽因环境友好、制备高效及较强的自由基清除能力,在天然抗氧化剂领域备受关注^[4-5]。核桃粕为核桃粗加工过程中产生的副产物,蛋白质含量高、氨基酸种类丰富,可作为优质的生物活性肽源^[6]。多肽在蛋白质结构中并不具备活性,需先经处理从蛋白质母体释放后才可表现出各种生物活性^[7]。研究发现,从核桃蛋白质中获得的活性肽具有抗氧化^[8]、降血压^[9]和改善记忆等活性^[10-12]。通过酶解获得生物活性肽是最为常见的方法,而不同酶解工艺与分离纯化方式所得活性肽存在差异。以脱脂核桃粕为例,Chen 等用中性蛋白酶酶解核桃粕,经超滤、凝胶层析分离出 3 种 ACE 抑制肽^[13]。Feng 等使用碱性蛋白酶对核桃粕进行酶解,经超滤、凝胶层析分离出酪氨酸酶抑制肽^[14]。何宛诗等通过 LC-MS/MS 技术从酶解产物中鉴定出 10 条多肽,采用分子对接技术将多肽和 ABTS 自由基结合,筛选出相对最强抗氧化肽,由体内试验证明计算机辅助筛选的准确性^[15]。

为丰富核桃源抗氧化肽种类、提升核桃粕利用率,作者利用胰酶优化了核桃粕蛋白质的水解条件。分离纯化最优酶解条件下获得的酶解液,确定

抗氧化活性最好的 D-4 组分。随后利用 LC-MS/MS 鉴定该组分中主要肽段的氨基酸序列,基于生物信息学分析进一步筛选出可能的抗氧化肽。最后,依据抗氧化肽和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)的相互作用解释潜在的抗氧化机制,为核桃活性肽的制备与筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

借助 PEAKS Studio 软件对 LC-MS/MS 所得原始数据解析,于 Uniprot 数据库中匹配核桃蛋白质信息,筛选可信度较高的序列。利用 Chemdraw 20.0 软件构建肽段最稳定的空间构象。通过 AutoDockTools-1.5.6 将肽段和脂氧合酶活性中心对接,结合 PyMOL 软件将分子对接结果可视化。

1.2 材料与设备

去皮核桃仁:河北鼎辉食品有限公司;焦性没食子酸、还原型谷胱甘肽、硫酸铜、氢氧化钠、三氯乙酸、溴化钾、石油醚:上海生工生物工程股份有限公司;胰酶(4×10^3 U/g):广西东恒华道有限公司。上述化学试剂均为分析纯。

TU-1800 紫外-可见分光光度计、电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪:美国赛默飞公司;AKTA prime plus 快速低压液相色谱系统:美国通用电气公司;LC-20A 高效液相色谱仪:日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 核桃蛋白质的制备 核桃仁粉碎后按 1 g:5 mL 用石油醚浸泡,静置过夜。抽滤后在通风橱内挥干残留溶剂,得到脱脂核桃粕^[16]。参考高盼等的方法^[17]制备核桃蛋白质,核桃粕与水按 1 g:15 mL 混合,调节 pH 至 9.0,在 60 °C 以 220 r/min 搅拌 2 h 收集滤

液,对滤渣重复上述操作,合并滤液。用盐酸溶液调节 pH 至 4.5,4 000 r/min 离心弃上清液,收集沉淀冻干。此方法下每 100 g 核桃粕可制得核桃蛋白质粉约 58 g。根据 GB/T 6432—2018《饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法》测定蛋白质质量分数。

1.3.2 核桃蛋白质酶解工艺优化 酶解前核桃蛋白质于 95 °C 水浴 10 min,使包裹在蛋白质内部的疏水基团暴露出来,便于酶解。前期研究发现,胰酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶中,胰酶对核桃蛋白质水解程度最高,故选择胰酶作为最优水解酶。胰酶最适 pH 为 6~8,为使胰酶处于最适 pH 同时避免酸、碱条件对核桃蛋白质的影响,调节溶液 pH 至中性。水解完成后 100 °C 水浴 15 min 灭活。设核桃蛋白质质量浓度为 2 g/dL,对酶添加量、酶解时间、酶解温度进行单因素及正交试验,以多肽得率和超氧阴离子自由基清除率为指标优化酶解工艺。

1.3.3 多肽得率的测定 各取 5 mL 酶解液和 10 g/dL 三氯乙酸溶液混匀,静置 10 min,在 4 000 r/min 下离心 15 min。取 6 mL 上清液和 4 mL 双缩脲试剂混匀。静置 30 min 后在 536 nm 处测定吸光度,代入标准曲线得可溶性多肽质量浓度。以还原型谷胱甘肽质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得到曲线方程 $y=0.246x-0.0214$, $R^2=0.9947$ 。测定酶解液吸光度,通过标准曲线获得对应的可溶性多肽质量浓度,计算多肽得率。

1.3.4 超氧阴离子自由基清除率的测定 以超氧阴离子自由基清除率作为抗氧化指标^[8],采用邻苯三酚自氧化法测定超氧阴离子自由基清除率^[9]。取 50 μ L 样液于比色皿中,加入 2 950 μ L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 和 50 μ L 邻苯三酚溶液,混匀后在 325 nm 处测吸光度,每 30 s 记录吸光度,共反应 4 min。用 Tris-HCl 缓冲液作为阴性对照,1 mg/mL 还原型谷胱甘肽作为阳性对照,超氧阴离子自由基清除率按下式计算:

$$D = \frac{(A_2 - A_1)}{(A_4 - A_3)} \times 100\%$$

式中: D 为超氧阴离子自由基清除率,%; A_1 为首次记录的样品溶液吸光度; A_2 为末次记录的样品溶液吸光度; A_3 为首次记录的空白溶液吸光度; A_4 为末次记录的空白溶液吸光度。

1.3.5 还原力的测定 将 1 mL 酶解液、2 mL 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.6)、2 mL 的 1 g/dL

铁氰化钾溶液混匀,50 °C 水浴 20 min。加入 2 mL 的 10 g/dL 三氯乙酸溶液,2 000 r/min 离心 10 min。将 2 mL 上清液与 2 mL 去离子水、0.5 mL 0.1 g/dL 三氯化铁溶液混匀,静置 10 min 后在 700 nm 处测吸光度^[9]。以样品吸光度和阳性对照吸光度的比值判断还原力的强弱,以 1 mg/mL 还原型谷胱甘肽作为阳性对照。

1.3.6 葡聚糖凝胶过滤层析 配制质量浓度为 20 mg/mL 的酶解液冻干粉水溶液,过 0.22 μ m 水相滤膜。采用 Smartdex G-50 凝胶过滤层析柱 (16 mm \times 50 cm) 与 AKTA prime plus 系统联用进行分离纯化,设置上样量 2 mL,检测波长 280 nm。用去离子水以 0.8 mL/min 洗脱,每 5 mL 收集 1 管,将同一峰的收集液合并冻干,于 -20 °C 下储藏备用。

1.3.7 多肽序列测定 将凝胶过滤层析收集的溶液冷冻干燥后溶解于 ddH₂O,于适量样品中加入 DTT 溶液,使其终浓度为 10 mmol/L,于 56 °C 水浴还原 1 h。加入 IAA 溶液使其终浓度为 50 mmol/L,避光反应 40 min 进行烷基化预处理。使用自填脱盐柱脱盐,于 45 °C 真空离心浓缩仪中挥干溶剂后进行 LC-MS/MS 分析,所得质谱数据结合 PEAKS Studio 进行数据库检索获得多肽序列。

1.3.8 分子对接分析 小分子配体的构建:用 Chemdraw 20.0 软件对筛选的抗氧化肽进行建模,采用 MM2 分子力场方法优化其构型 (化学能最小构型)。

从 Uniprot 中下载脂氧合酶 (PDB ID:4G32) 的三维结构,以其自带的配体文件为标准设置对接位点盒子,在 AutoDockTools-1.5.6 中去除携带的配体,同时对小分子肽和蛋白质受体去水、加氢,从而优化结构。对接中心坐标为 $x=19.183$ 、 $y=13.426$ 、 $z=23.840$,盒子大小为 70 \AA \times 70 \AA \times 70 \AA 。对配体和受体进行半柔性对接,筛选对接结合能最低构象,于 PyMOL 中分析相互作用力。

1.3.9 数据分析 所有试验均重复 3 次,通过 SPSS 软件分析显著性。采用 Origin 绘图。

2 结果与分析

2.1 核桃产品的蛋白质质量分数

核桃仁经过脱脂、碱溶酸沉、冷冻干燥等工艺,可有效去除核桃粕中的非蛋白质杂质,有利于获得抗氧化肽。由凯氏定氮法测得核桃仁的蛋白质质量

分数为 14.84%、脱脂核桃粉的蛋白质质量分数为 40.80%、核桃蛋白粉的蛋白质质量分数为 63.07%。由上述方法所得核桃蛋白粉中蛋白质的质量分数较高,因此用于后续试验。

2.2 核桃蛋白质的酶解工艺优化结果

2.2.1 单因素试验结果 探究酶添加量的影响时,设定酶解时间 2 h、酶解温度 50 ℃。结果见图 1,酶解液抗氧化能力及多肽得率随着酶添加量增加而增加。当酶添加量超过 7 g/dL,酶的加入对酶解液的影响减弱,故以 7 g/dL 作为最优酶添加量。温度的升高对酶解液还原力的影响较小,随着温度的上升,酶解液多肽得率及超氧阴离子自由基清除率总体呈现先增加后减小的趋势,且在 40 ℃时达到最高,故以 40 ℃作为最佳酶解温度。酶解液抗氧化活性在酶解初期即获得释放,在 10~15 min 内,酶解液各项指标均显著上升,超过 15 min 后酶解液各项指标总体呈现下降趋势,故选择 15 min 作为最优酶解时间。

2.2.2 正交试验结果 结合单因素试验结果,进行三因素三水平的正交试验,以酶解温度(A)、酶解时间(B)、酶添加量(C)为影响因素,以超氧阴离子自由基清除率为评价指标,试验设计见表 1。

由表 2 可知,各因素对酶解产物抗氧化活性的影响强弱由高到低依次为:酶解时间>酶添加量>酶解温度,所得最优组合为 A₁B₃C₂,即酶解温度 35 ℃、酶解时间 20 min、酶添加量 7 g/dL。结合方差分析(见表 3)可知,酶解时间对酶解产物的抗氧化活性具有显著影响 ($P<0.05$)。验证试验中测定 A₁B₃C₂、A₁B₃C₃ 酶解液超氧阴离子自由基清除率分别为 26.57%、24.22%,故选择 A₁B₃C₂ 为最优酶解条件。

2.3 酶解液的分离纯化及组分抗氧化活性结果

如图 2 所示,酶解液经 Smartdex G-50 分离纯化后得到 4 个组分。研究表明核桃多肽对超氧阴离子自由基的清除效果显著^[20]。4 个组分的质量浓度为 2 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率分别为 14.11%、18.67%、19.39%、29.61%,D-4 组分超氧阴离子自由基清除力最强,故对 D-4 组分进行结构鉴定。

2.4 D-4 组分抗氧化肽的结构鉴定

通过 PEAKS Studio 软件解析 LC-MS/MS 所得数据,在 Uniprot 数据库中搜索核桃蛋白质信息进行匹配。 $-10\lg P$ 表示相应谱图鉴定的可信度, $-10\lg P>15$ 即为高可信度。选择高可信度肽段在 Peptide Ranker 中预测活性,选取评分>0.70 的肽

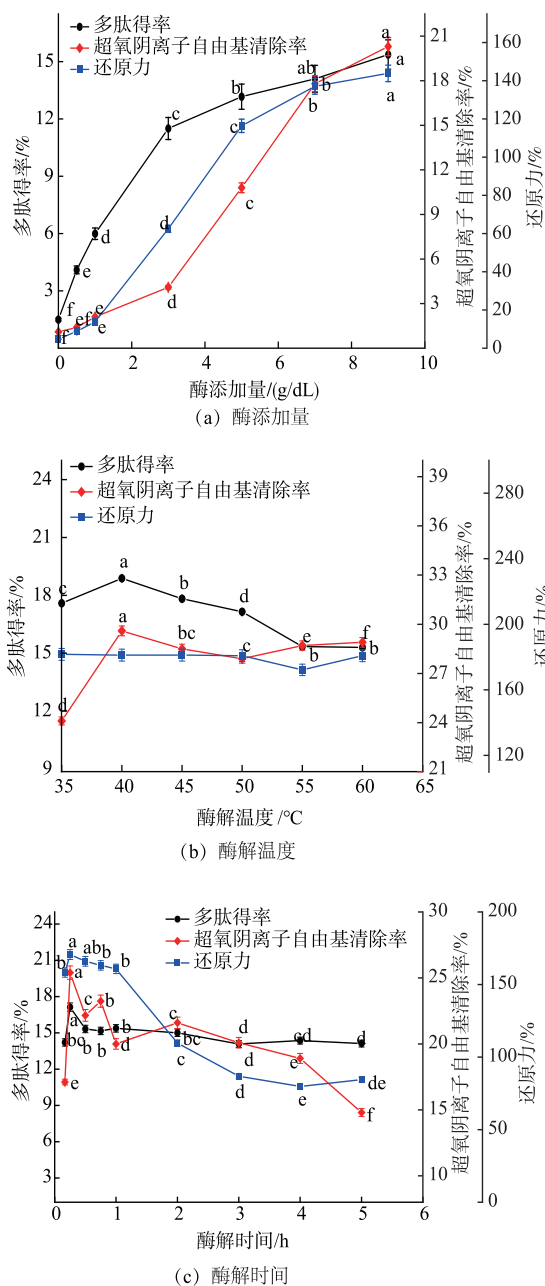


图 1 各因素对核桃蛋白质酶解液的影响

Fig. 1 Effects of various factors on walnut protein hydrolysates

表 1 核桃蛋白质水解的正交试验设计

Table 1 Orthogonal experimental design for walnut protein hydrolysis

水平	酶解温度/℃	酶解时间/min	酶添加量/(g/dL)
1	35	10	6
2	40	15	7
3	45	20	8

表 2 核桃蛋白质水解的正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results for walnut proteolysis

试验号	酶解温度/°C	酶解时间/min	酶添加量/(g/dL)	误差列	超氧阴离子自由基清除率/%
1	35	10	6		9.23
2	35	15	7		15.33
3	35	20	8		24.75
4	40	10	7		10.84
5	40	15	8		13.92
6	40	20	6		17.78
7	45	10	8		11.35
8	45	15	6		13.42
9	45	20	7		8.23
均值 1	16.74	10.34	13.31	15.97	
均值 2	14.13	14.06	16.96	14.66	
均值 3	16.26	22.73	16.86	16.50	
极差	2.61	12.39	3.65	1.83	

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	F 值	显著性
A	11.590	2.166	
B	242.486	45.316	*
C	26.031	4.865	
误差	5.350		

注:* 表示差异显著($P<0.05$)。

表 4 D-4 组分抗氧化肽的结构鉴定

Table 4 Structural identification of D-4 component antioxidant polypeptides

多肽序列	GRAVY	-10lg P	相对分子量	净电荷	评分	蛋白质稳定指数
G.KFFVGGNW.K	0.09	33.91	953.47	+2	0.80	-10.01
K.AVGKVLPELNGKLTGMAFR.V	0.28	29.42	2 000.12	+3	0.79	0.53
R.AGIQFPVG.R	0.93	25.99	787.42	+2	0.72	26.25

2.5 抗氧化机制分析

ROS 引起的脂质过氧化是食品及化妆品基质中脂质降解的主要原因之一^[23]。核桃本身油脂质量分数很高,主要由亚油酸、亚麻酸、油酸等 7 种脂肪酸组成,其中亚油酸质量占脂肪酸总质量的 64.3%~66.5%^[24]。核桃贮藏期间,由于脂氧合酶的作用导致核桃仁内 9-氢过氧化物和 13-氢过氧化物积累,继续氧化产生醛、酮类物质,导致酸败^[25]。抗氧化肽可通过供氢或供电子作用直接清除 ROS^[26],小分子肽可以和转运金属、LOX、血红蛋白等催化剂结合抑制食品中的脂质氧化。对接结合能是衡量分子

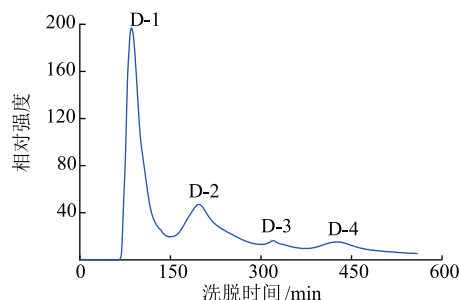


图 2 凝胶过滤层析图谱

Fig. 2 Gel filtration chromatogram of walnut protein hydrolysates

段。一般认为评分 >0.70 的肽段具有很高的潜在生物活性。GRAVY 为亲水性总平均值,正值越大表明疏水性越强,以 $GRAVY>0$ 为指标进行筛选。抗氧化肽特征为相对分子质量低且序列中含有疏水、芳香和带正电的氨基酸,在 ExPasy 中对筛选出的肽段进行稳定性预测,并从中选取稳定蛋白质,蛋白质稳定指数 <40 时认为是稳定蛋白质。通过上述参数最终筛选出 3 条潜在抗氧化肽,如表 4 所示。肽段 R.AGIQFPVG.R 具有高疏水性且带两个正电荷,肽段中存在大量疏水性氨基酸,有助于肽与脂质自由基相互作用,提升抗氧化能力^[21],同时带正电的肽段与带负电的自由基离子更易结合。由于相对分子质量较大的肽段和自由基结合时会受到空间位阻的影响,导致抗氧化活性下降,故相对分子质量较小的肽段往往显示出更好的抗氧化活性^[22]。

间能否自发结合的指标,对接结合能 <0 说明多肽可自发与受体结合^[27]。从上述 3 条肽段中筛选最低对接结合能 <0 的肽段,结果显示,序列 G.KFFVGGNW.K、R.AGIQFPVGR 与 LOX 最低结合能分别为 $-11 845.96$ 、 $-21 933.85$ J/mol,最低对接结合能越小表明两者组成的复合体越稳定,该结果说明,与 G.KFFVGGNW.K 相比,R.AGIQFPVG.R 与 LOX 的亲性更高,意味着 R.AGIQFPVG.R 抗氧化活性更强。

用 PyMOL 工具观察 R.AGIQFPVG.R 与 LOX 在三维的具体结合情况(见图 3)。结果显示 R.AGIQFPVG.R 和 LOX 的 Glu168 形成了 3 个稳定

氢键,从而与 LOX 紧密结合。对 LOX 有高抑制活性的物质需要与 LOX 活性中心的位点有反应且具备一定亲脂性。LOX 的铁活性位点与 5 个氨基酸残基侧链和 1 个水分子或者氢氧配合键紧密结合^[28]。谷氨酸结合位点未出现在已报道的 LOX 活性位点中,推测 R.AGIQFPVG.R 主要是通过非竞争性作用抑制 LOX 活性。作者认为 R.AGIQFPVG.R 更具抗氧化活性的原因还包括其 C 端存在较多的疏水性氨基酸,这些疏水性氨基酸有助于肽段获得强抗氧化活性,提高肽链的自由基清除能力^[29]。经数据库检索,未在已有文献中发现该肽段信息,推断 R.AGIQFPVG.R 为核桃源新型抗氧化肽。

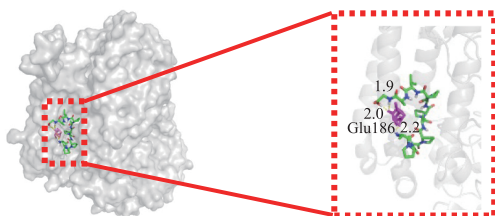


图 3 R.AGIQFPVG.R 和 LOX 之间的三维对接
Fig. 3 Graphical three-dimensional docking between R.AGIQFPVG.R and LOX

综合上述分析,通过计算机虚拟筛选出的 3 条多肽中最稳定且最有可能具有抗氧化活性的肽段为 R.AGIQFPVG.R。一方面,因为其低相对分子质量及高疏水性符合抗氧化肽特征;另一方面,对于抗氧化肽来说,其 C 端氨基酸对抗氧化活性影响较大,随着抗氧化肽 C 端的疏水性氨基酸占比提升,其超氧阴离子自由基清除能力、还原力等一般均会增强,从而总体上赋予肽段更强的抗氧化活性^[30]。

3 结语

作者以核桃粕蛋白质为原料,利用胰酶优化了抗氧化肽的酶法制备工艺,借助葡聚糖凝胶过滤层析分离纯化最优酶解条件下获得的酶解液,获得 4 个组分,以超氧阴离子自由基清除率为指标筛选出最具抗氧化潜力的 D-4 组分。通过 LC-MS/MS 技术鉴定该组分中主要肽段的氨基酸序列,基于生物信息学分析进一步筛选出 3 条可能的抗氧化肽。分析抗氧化肽和脂氧合酶的相互作用,挖掘潜在的抗氧化机制,为核桃活性肽的制备与筛选提供理论依据。后续将采用 Smartdex G-25 葡聚糖凝胶层析及高效液相色谱获得相应多肽,进一步探究其对脂氧合酶活性的影响及自由基清除能力。

参考文献:

- [1] XIE M Z, DONG X Y, YU Y, et al. A novel method for detection of lipid oxidation in edible oil[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 123: 109068.
- [2] YANG Z, MIN Z J, YU B. Reactive oxygen species and immune regulation[J]. *International Reviews of Immunology*, 2020, 39(6): 292-298.
- [3] KHEZERLOU A, AKHLAGHI A P, ALIZADEH A M, et al. Alarming impact of the excessive use of tert-butylhydroquinone in food products: a narrative review[J]. *Toxicology Reports*, 2022, 9: 1066-1075.
- [4] ZHANG S H, LUO L, SUN X Y, et al. Bioactive peptides: a promising alternative to chemical preservatives for food preservation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(42): 12369-12384.
- [5] 徐晨晨, 祝宝华, 杨志艳, 等. 新型加工技术在抗氧化肽制备中的应用研究[J]. *食品与机械*, 2023, 39(2): 9-16.
XU C C, ZHU B H, YANG Z Y, et al. Application of novel processing technology in the preparation of antioxidant peptides[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(2): 9-16. (in Chinese)
- [6] LI X Y, GUO M L, CHI J T, et al. Bioactive peptides from walnut residue protein[J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1285.
- [7] JI D W, UDENIGWE C C, AGYEI D. Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: an in silico assessment[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2019, 8(3): 306-314.
- [8] 王宸轩, 吴丹, 张素榕, 等. 核桃粕固态发酵酱油的制备及抗氧化性分析[J]. *食品与机械*, 2023, 39(5): 182-185.
WANG C X, WU D, ZHANG S R, et al. Preparation of solid-fermented soy sauce in walnut dregs and analysis of antioxidant properties[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(5): 182-185. (in Chinese)
- [9] JAHANBANI R, GHAFFARI M, VAHDATI K, et al. Kinetics study of protein hydrolysis and inhibition of angiotensin converting enzyme by peptides hydrolysate extracted from walnut[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2018, 24(1): 77-85.
- [10] CHEN H P, ZHAO M M, LIN L Z, et al. Identification of antioxidative peptides from defatted walnut meal hydrolysate with potential for improving learning and memory[J]. *Food Research International*, 2015, 78: 216-223.
- [11] XU D F, WANG W Q, LIAO J M, et al. Walnut protein hydrolysates, rich with peptide fragments of WSREEQEREE and

- ADIYTEEAGR ameliorate UV-induced photoaging through inhibition of the NF- κ B/MMP-1 signaling pathway in female rats[J]. **Food & Function**, 2020, 11(12):10601-10616.
- [12] 杨雅梦, 胥健萍, 刘婉月, 等. 植物多肽分离技术及功能研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(6):194-200.
YANG Y M, XU J P, LIU W Y, et al. Research progress of plant polypeptide separation technology and function[J]. **Food Science and Technology**, 2021, 46(6):194-200. (in Chinese)
- [13] CHEN Y H, LI J, DONG N G, et al. Separation and identification of ACE inhibitory peptides from defatted walnut meal[J]. **European Food Research and Technology**, 2020, 246(10):2029-2038.
- [14] FENG Y X, WANG Z C, CHEN J X, et al. Separation, identification, and molecular docking of tyrosinase inhibitory peptides from the hydrolysates of defatted walnut (*Juglans regia* L.) meal[J]. **Food Chemistry**, 2021, 353:129471.
- [15] 何宛诗, 郑钦生, 陈小艳, 等. 雨生红球藻新型抗氧化肽的制备纯化、鉴定筛选及其对秀丽线虫抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(22):116-125.
HE W S, ZHENG Q S, CHEN X Y, et al. Preparation, purification and identification of a novel antioxidant peptide from *Haematococcus pluvialis* and its effect on the antioxidant capacity of *Caenorhabditis elegans* [J]. **Food Science**, 2023, 44(22):116-125. (in Chinese)
- [16] 杜玉琼, 薛舒心, 辛蕊, 等. 焙烤工艺对核桃仁品质的影响[J]. 中国油脂, 2021, 46(1):17-23.
DU Y Q, XUE S X, XIN R, et al. Effect of baking process on the quality of walnut kernel[J]. **China Oils and Fats**, 2021, 46(1):17-23. (in Chinese)
- [17] 高盼, 张慧慧, 王澍, 等. 酶法辅助制备核桃蛋白的工艺优化及超滤回收核桃蛋白[J]. 中国油脂, 2022, 47(10):11-17.
GAO P, ZHANG H H, WANG S, et al. Optimization of enzymatic-assisted preparation of walnut protein and ultrafiltration recovery of walnut protein[J]. **China Oils and Fats**, 2022, 47(10):11-17. (in Chinese)
- [18] 杜昕, 李诚, 肖岚, 等. 牦牛血抗氧化肽制备方法对比及分离纯化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(8):861-867.
DU X, LI C, XIAO L, et al. Preparation comparison of yak blood antioxidant peptides and its purification[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2018, 37(8):861-867. (in Chinese)
- [19] 张靖, 苏琳, 陈晓雨, 等. 羊骨抗氧化肽酶解法制备和响应面工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(3):18-27.
ZHANG J, SU L, CHEN X Y, et al. Optimization of enzymatic preparation of antioxidant peptides from sheep bone by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(3):18-27. (in Chinese)
- [20] 李丽, 阮金兰, 钱伟亮, 等. 多指标评价核桃蛋白及多肽的抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3):1-4.
LI L, RUAN J L, QIAN W L, et al. Studies on the antioxidant activity of walnut protein and polypeptide by multi-index[J]. **Food Research and Development**, 2017, 38(3):1-4. (in Chinese)
- [21] RAJAPAKSE N, MENDIS E, BYUN H G, et al. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems[J]. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2005, 16(9):562-569.
- [22] SHEN S W, CHAHAL B, MAJUMDER K, et al. Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010, 58(13):7664-7672.
- [23] PARADISO V M, FLAMMINI F, PITTIA P, et al. Radical scavenging activity of olive oil phenolic antioxidants in oil or water phase during the oxidation of O/W emulsions; an oxidomics approach[J]. **Antioxidants**, 2020, 9(10):996.
- [24] HAYES D, ANGOVE M J, TUCCI J, et al. Walnuts (*Juglans regia*) chemical composition and research in human health[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2016, 56(8):1231-1241.
- [25] 周晔, 裴东. 核桃油品质及贮藏稳定性的影响因素探讨[J]. 中国油脂, 2016, 41(1):60-63.
ZHOU Y, PEI D. Influence factors of quality and storage stability of walnut oil[J]. **China Oils and Fats**, 2016, 41(1):60-63. (in Chinese)
- [26] 刘辉, 童星. 大豆水解蛋白中抗氧化肽的研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(1):191-195.
LIU H, TONG X. Research progress of antioxidant peptides in hydrolyzed soybean protein[J]. **China Condiment**, 2021, 46(1):191-195. (in Chinese)
- [27] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. **PLoS One**, 2013, 8(12):e83922.
- [28] 马小龙. 蚂蚱麦抗麦长管蚜基因的初定位及兰麦抗蚜相关基因 *TiLOX* 的功能解析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2020.
- [29] LI Y W, LI B. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models; key sequence positions and their amino acid properties[J]. **Journal of Theoretical Biology**, 2013, 318:29-43.
- [30] MEJRI L, VÁSQUEZ-VILLANUEVA R, HASSOUNA M, et al. Identification of peptides with antioxidant and antihypertensive capacities by RP-HPLC-Q-TOF-MS in dry fermented camel sausages inoculated with different starter cultures and ripening times [J]. **Food Research International**, 2017, 100(1):708-716.

(责任编辑:史润东东)