

贯筋藤酶解核桃分离蛋白及其体内抗疲劳作用

黄 思, 张 霞, 牟泓羽, 吴 宽, 马志星, 凌 云, 赵存朝

Enzymatic Cleavage of Walnut Isolate Proteins by *Dregea sinensis* Hemsl. Protease and Its Anti-fatigue Effect *In Vivo*

HUANG Si, ZHANG Xia, MU Hongyu, WU Kuan, MA Zhixing, LING Yun, and ZHAO Cunzhao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090103>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

逐级盐析结合双水相法纯化贯筋藤凝乳酶

Purification of Milk-clotting Enzyme from *Dregea sinensis* Hemsl. by Stepwise Salting-out and Aqueous Two-Phase Extraction

食品工业科技. 2020, 41(1): 44-49 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.01.008>

雪樱子石榴复合饮料研制及其抗运动性疲劳作用

Preparation of *Amaranthus caudatus* L. and *Punica granatum* Composite Beverage and Its Resisting Exercise Fatigue Effect

食品工业科技. 2021, 42(12): 203-208 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-020090125>

远志多糖对力竭运动小鼠体内抗疲劳和体外抗氧化作用研究

Effects of Anti-fatigue *in Vivo* and Anti-oxidant *in Vitro* of Polysaccharides from *Polygala tenuifolia* Willd. on Exhaustive Exercise Mice

食品工业科技. 2021, 42(6): 332-336 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050292>

有氧运动联合补充D-核糖对小鼠抗疲劳和抗氧化的作用

Effects of Aerobic Exercise Combined with D-Ribose Supplementation on Anti-fatigue and Anti-oxidation in Mice

食品工业科技. 2022, 43(2): 368-375 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050117>

桑葚花色苷对小鼠的抗疲劳作用

Anti-fatigue Effects of Mulberry Anthocyanins in Mice

食品工业科技. 2023, 44(16): 377-385 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090071>

发酵法制备芸豆渣可溶性膳食纤维及其抗运动性疲劳作用研究

Study on Preparation of Modified Soluble Dietary Fiber of Kidney Bean by Fermentation and Its Effect on Anti-exercise Fatigue

食品工业科技. 2022, 43(13): 367-372 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100237>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

黄思, 张霞, 牟泓羽, 等. 贯筋藤酶解核桃分离蛋白及其体内抗疲劳作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 305–313. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090103

HUANG Si, ZHANG Xia, MU Hongyu, et al. Enzymatic Cleavage of Walnut Isolate Proteins by *Dregea sinensis* Hemsl. Protease and Its Anti-fatigue Effect *In Vivo* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(22): 305–313. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090103

· 营养与保健 ·

贯筋藤酶解核桃分离蛋白及其体内 抗疲劳作用

黄思¹, 张霞¹, 牟泓羽¹, 吴宽¹, 马志星¹, 凌云¹, 赵存朝^{1,2,3,4,*}

(1. 云南农业大学, 云南昆明 650201;

2. 昆明生物制造研究院有限公司, 云南昆明 650201;

3. 云南省高原特色农业产业研究院, 云南昆明 650201;

4. 云南省特色资源食品生物制造工程研究中心, 云南昆明 650201)

摘要: 为了研究核桃蛋白酶解物的抗疲劳作用, 为其功能性产品的开发和利用提供科学依据。本文以超临界萃取的核桃粕为原料, 提取核桃分离蛋白 (WPI), 使用贯筋藤蛋白酶酶解 WPI, 以水解度为指标, 研究最佳酶解条件制备核桃肽, 并研究不同分子量的核桃蛋白酶解物对小鼠运动性疲劳的缓解作用。将小鼠随机分为五组, 每日经口灌胃受试样品, 干预周期为一个月, 最后进行负重及力竭游泳实验, 测定血清尿素氮 (BUN)、乳酸 (LA)、肝糖原 (HG)、肌糖原 (MG)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 含量。SDS-PAGE 凝胶电泳表明贯筋藤蛋白酶对 WPI 有明显的降解作用; 单因素实验结合响应面实验表明, 当料液比为 9:100、pH9.6、酶添加质量 9.4%、酶解时间 180 min、酶解温度 63 °C 时, 水解度最高达 30.1%; HE 染色显示, 使用贯筋藤蛋白酶提取的酶解物对小鼠无任何毒副作用; 与其他组相比, 分子量小于 3000 Da 的核桃蛋白酶解物干预小鼠的 LA 和 BUN 含量有所降低, HG 和 MG 含量提高, 延长负重游泳时间较为显著 ($P<0.05$), 核桃蛋白酶解物干预的各组小鼠血清中 SOD 酶、GSH-Px 酶活性显著提高 ($P<0.05$)。表明核桃蛋白酶解物可以缓解小鼠运动性疲劳, 而小分子量的核桃蛋白酶解物效果更显著, 这可能是通过调节体内抗氧化活性实现的。

关键词: 核桃蛋白, 贯筋藤蛋白酶, SDS-PAGE, 运动性疲劳, 负重游泳

中图分类号: R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)22-0305-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090103

本文网刊:



Enzymatic Cleavage of Walnut Isolate Proteins by *Dregea sinensis* Hemsl. Protease and Its Anti-fatigue Effect *In Vivo*

HUANG Si¹, ZHANG Xia¹, MU Hongyu¹, WU Kuan¹, MA Zhixing¹, LING Yun¹, ZHAO Cunzhao^{1,2,3,4,*}

(1. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Kunming Biomanufacturing Research Institute Co., Ltd., Kunming 650201, China;

3. Yunnan Highland Characteristic Agricultural Industry Research Institute, Kunming 650201, China;

4. Yunnan Specialty Resource Food Bio-Manufacturing Engineering Research Center, Kunming 650201, China)

Abstract: To study the anti-fatigue effect of walnut proteolytic enzymes and to provide scientific basis for the development and utilization of its functional products. Walnut isolated protein (WPI) was extracted from supercritically extracted walnut

收稿日期: 2023-09-11

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2023Y1010); 云南省省市一体化专项 (202302AN360002); 高层次科技人才及创新团队选拔专项 (202305AS350025); 云南省凤庆县核桃产业科技特派团 (202204BI090012)。

作者简介: 黄思 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品研究与开发, E-mail: 1656856139@qq.com。

* 通信作者: 赵存朝 (1990-), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 食品科学, E-mail: zcc272744372@163.com。

meal, and the WPI was enzymatically digested by *Dregea sinensis* Hemsl. protease. The hydrolysis degree (DH) was used as an index to study the optimal conditions for the preparation of walnut peptides, and the effects of different molecular weights of walnut proteins on the alleviation of exercise fatigue in mice were also investigated. The mice were randomly divided into five groups, and the test samples were orally gavaged daily for one month. Finally, weight-bearing and exhaustion swimming experiments were performed to determine the serum urea nitrogen (BUN), lactic acid (LA), hepatic glycogen (HG), myo-glycogen (MG), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) contents. SDS-PAGE gel electrophoresis showed that the WPI was significantly degraded by *Dregea sinensis* Hemsl. Protease. The one-way combined response surface experiment showed that the DH was up to 30.1% when the material-liquid ratio was 9:100, pH9.6, enzyme addition quality 9.4%, enzyme digestion time 180 min, and enzyme digestion temperature 63 °C. HE staining showed that the enzyme extracted by the use of *Dregea sinensis* Hemsl. Protease did not have any toxicity side effects on mice. Compared with other groups, the enzymatic digests with molecular weight less than 3000 Da showed a decrease in LA and BUN content, an increase in HG and MG content, and a more significant prolongation of weight-bearing swimming time ($P<0.05$), and a significant increase in the activities of SOD enzyme and GSH-Px enzyme in serum of mice in each group in the sample ($P<0.05$). It indicated that walnut proteolytic digests could alleviate exercise fatigue in mice, and the effect of small molecular weight walnut proteolytic digests was more significant, which might be realized by regulating antioxidant activity *in vivo*.

Key words: walnut proteins; *Dregea sinensis* Hemsl. protease; SDS-PAGE; exercise fatigue; weight-bearing swimming

核桃是我国极其重要的木本油料树种,而云南省核桃种植面积极广,核桃产量、产值在中国位列第一,核桃大部分用于榨油,由此产生的大量核桃粕无法得到很好的利用,常被丢弃,利用率极低^[1-2]。超临界萃取的核桃粕中蛋白质含量高达 48%,脂肪含量为 9.16%,灰分占 5.33%,水分含量为 5.35。而蛋白质是合成体内大多数免疫物质的原料的来源,适当的进食核桃蛋白能为机体补充优质蛋白,提高机体免疫力^[3]。李汉阳等^[4]、袁晋芳^[5]研究发现,使用 Alcalase 和胰蛋白酶的复配蛋白酶酶解核桃蛋白得到的蛋白肽抗氧化能力极好,且分子量与抗氧化能力呈反比关系,此外,核桃蛋白肽还具有抗肿瘤^[6]、益智健脑^[7-8]、免疫调节^[9]等多种生物活性。

贯筋藤多生长在山地灌木丛中,是萝藦科植物,多分布于云南、贵州等地,当地居民用贯筋藤制作乳扇,将其称为“奶浆藤”。研究表明从贯筋藤中提取的蛋白酶,该酶降解 κ -CN 位点为 90~91 之间的丙氨酸-谷氨酰胺(Ala90-Gln91),最适 pH 为 8.6~8.8,并且可耐受 85 °C 高温,是一种耐高温、耐酸碱且凝乳活力好的半胱氨酸蛋白酶^[10-12]。制作乳饼时,使用贯筋藤蛋白酶进行凝乳,制成的乳饼口感极好,并且具有贯筋藤这种植物特有的芳香^[13-14],将贯筋藤凝乳酶加入水牛奶中制作奶酪,质量好、风味佳^[15]。在预实验阶段,我们将贯筋藤蛋白酶用于酶解核桃分离蛋白,发现其可酶解核桃蛋白的 35000 Da 和 60000 Da 分子段,初探酶解物的抗氧化性得出,该酶解物的抗氧化能力良好。接着,在核桃蛋白酶解物混合物的功能初探阶段,我们发现其抗疲劳功效显著,于是将其进行超滤,以探究不同分子量酶解物的抗疲劳效果。本研究首次将贯筋藤蛋白酶用于酶解植物蛋白,得到核桃蛋白酶解物后超滤分离,并研究各分子量核桃蛋白肽的抗疲劳、抗氧化活性,除减少了核桃粕的浪费之外,还对植物蛋白资源奠定理论基础具有实际

意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

超临界萃取核桃粕 实验室提供;贯筋藤 山上采摘(昆明);透析袋(3500 Da) 上海源叶生物技术有限公司;柠檬酸、氢氧化钠、硫酸铵 成都金山化学试剂有限公司;氯化钠 天津市恒兴化学试剂制造有限公司;中性甲醛 天津市优谱化学试剂有限公司;其它试剂均为国产分析纯;实验小鼠 雄性 KM 小鼠(SCXK 豫 2020-0005);糖原、血清尿素氮(BUN)、乳酸脱氢酶(LD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒 南京建成生物工程研究所有限公司。

SK8210HP 恒温超声波仪 上海科导超声仪器有限公司;PHS-3C 酸度计 上海赫尔普国际贸易有限公司;WT2002 电子天平 杭州万特衡器有限公司;TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器场;88-1 磁力搅拌器、HH-8 恒温水浴锅 常州智博瑞仪器制造有限公司;HF-5L 喷雾干燥机 上海贺帆仪器有限公司;LGJ-12 真空冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白的制备 参照代锡鑫等^[16]的方法并略作修改。取适量洁净且无虫害的核桃粕按料液比 1:10 的比例混于水中,置于胶体磨中研磨 3 min,待泡沫消失后再调节 pH,用 1 mol/L 的 NaOH 将核桃粕悬浊液 pH 调至 9.5,将恒温超声波仪的温度调节在 55 °C,然后将调好 pH 的悬浊液超声 1 h,超声结束后冷却至室温,后将其放入 4 °C、4500 r/min 的离心机离心 15 min,随后除去油层,滤出上清液,使用 1 mol/L 的 HCl 将上清液 pH 调至 4.5,静置 1 h 后 4500 r/min 离心 15 min,获得核桃分离蛋白沉淀,加入蒸馏水水洗沉淀 3~5 次,调回 pH 至中性,喷雾干

燥设置进风温度 180 ℃,蠕动泵数值 70 Hz 提取核桃蛋白备用。

1.2.2 贯筋藤蛋白酶的提取 参照赵琼等^[17]的方法略作修改。将贯筋藤茎秆晒干,人工分成 15~20 cm 的小段,用流水除去表面异物,敲碎后在 60 ℃ 水中浸泡后 120 目四层纱布反复过滤至无肉眼所见杂质,过滤后的滤液 4000 r/min 离心 20 min。进行凝乳实验,保留凝乳时间小于 0.5 h、凝乳状态好的滤液,并将滤液真空浓缩(55 ℃, -0.08 MPa)至 20%。浓缩液采用等电点分离,缓缓加入硫酸铵粉末老化,4000 r/min 离心 20 min 弃去上清液,沉淀加少量超纯水溶解作为盐析蛋白质样品,样品加入透析袋(MW3500)中透析除去硫酸铵等杂质,塑料烧杯收集透析后溶液放入-80 ℃ 冰箱迅速冷冻,然后放入真空冷冻干燥机(真空度 1 Pa,冷阱温度-60 ℃,样品温度-40~-20 ℃)中冷冻干燥,制得贯筋藤蛋白酶干粉,-20 ℃ 下低温保藏。

参照 Arima^[18]法,取 50 mL 新鲜山羊乳,加热至 85 ℃ 后同温度下水浴,加入为羊奶体积 35%(17.5 mL)的贯筋藤溶液,充分混合后继续水浴。准确记录从加入贯筋藤溶液到羊乳凝固的时间。凝乳酶活力定义为:40 min 凝固 1 mL 山羊乳的酶量(贯筋藤溶液用量)为 1 单位(Soxhelt Unit, Su)。

$$SU = 2400 \times 50 \times D / (t \times 17.5)$$

式中,t 为凝乳时间(s),D 为贯筋藤溶液或粗酶液的稀释倍数。

1.2.3 核桃蛋白酶解物的制备 参照田洋等^[19]和姜荣庆^[20]的方法并略作修改。将核桃蛋白与水按照一定料液比混合,60 ℃ 超声 10 min,迅速调节 pH 至碱性,加酶,在特定温度水浴锅中酶解 2~5 h,沸水灭酶 10 min,降至常温,使用 4 ℃ 离心机进行离心(4500 r/min, 15 min),取出上清液,冷冻干燥备用。

1.2.4 单因素实验 根据前期预实验,以水解度为指标,固定酶浓度为 10%、酶解时间 3 h、酶解 pH9、酶解温度 60 ℃,考察料液比(3:100、6:100、9:100、12:100、15:100)对水解度的影响;固定酶解时间 180 min、料液比 9:100、酶解 pH9、酶解温度 60 ℃,考察酶添加量(6%、8%、10%、12%、14%)对水解度的影响;固定酶浓度为 10%、料液比 9:100、酶解 pH9、酶解温度 60 ℃,考察酶解时间(120、150、180、210、240 min)对水解度的影响;固定酶浓度为 10%、酶解时间 3 h、料液比 9:100、酶解温度 60 ℃,考察酶解 pH(7、8、9、10、11)对水解度的影响;固定酶浓度为 10%、酶解时间 3 h、酶解 pH9、料液比 9:100,考察酶解温度(45、50、55、60、65 ℃)对水解度的影响。

1.2.5 响应面优化试验 在单因素实验的基础上,结合响应面优化试验数据,将核桃蛋白酶解物的水解度作为响应值,如表 1 所示,选取水解度较为显著的酶

添加质量(%)、酶解 pH 和酶解温度(℃),确定核桃蛋白的最佳酶解条件。

表 1 响应面试验因素水平设计

Table 1 Level design of response surface test factors

水平	酶浓度(%)	酶解pH	酶解温度(℃)
-1	8	7	50
0	10	8	55
1	12	9	60

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 参照沈敏江^[21]的方法并略作改动。采用浓度为 12% 分离胶,浓度为 5% 浓缩胶。精确称取 4.5 mg 核桃蛋白及核桃蛋白酶解物样品,加入上样缓冲液,混匀后置于金属浴中加热 3 min,在 5000 r/min 的条件下离心 10 min。吸取 15 μL 核桃蛋白及核桃蛋白酶解物进行上样,浓缩胶的电压设置为 80 V,待样品跑完浓缩胶后将电压增加至 130 V 直至结束。再进行染色、脱色、拍照。

1.2.7 核桃蛋白酶解物的超滤 使用超滤技术将核桃蛋白酶解物分成不同分子量的三部分,分别为 ≤3000 Da、3000~5000 Da、≥5000 Da。超滤完成后使用冷冻干燥技术将其冻干,置于-20 ℃ 条件下保藏。

1.2.8 不同分子量核桃肽的体外抗氧化实验 参考赵才东等^[22]的方法测定其对 DPPH、ABTS⁺自由基清除率。将 DPPH 粉末加入甲醇中制得 0.26 mmol/L DPPH 溶液。取 100 μL DPPH 溶液与 20 μL 样品加入 96 孔板中,室温避光条件中反应 30 min,在波长 517 nm 处用全自动酶标仪测定其吸光度,平行测定 3 次。ABTS⁺自由基清除能力的测定将 5 mL 7.4 mmol/L ABTS 储备液与 88 μL 2.6 mmol/L K₂S₂O₈ 溶液混匀,暗处静置 12~16 h,配成 ABTS 工作液。ABTS 工作液用 80% 乙醇稀释,使混合溶液在 734 nm 波长处的吸光值为 0.7。将 200 μL ABTS 工作液与 20 μL 样品加入 96 孔板中,常温避光混合 6 min,在波长 734 nm 处测定吸光度,平行测定 3 次。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100$$

式中,A₀—不加样品,加入 DPPH 时的吸光度;A_i—加入样品和 DPPH 的吸光度;A_j—加入样品,不加 DPPH 的吸光度。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i - A_j}{A_0} \times 100$$

式中,A₀—不加样品,加入 ABTS 时的吸光度;A_i—加入样品和 ABTS 的吸光度;A_j—加入样品,不加 ABTS 的吸光度。

1.2.9 动物分组与游泳实验 选择 5 周龄、18~22 g 的雄性 KM 小鼠 90 只,饲养于 SPF 级洁净动物实验室,饲养期间不限制小鼠的饮食和饮水,一周适应期后进行筛选,选出适合实验条件的 80 只小鼠进行

实验。将 KM 小鼠随机分为 5 组: 分别为空白对照组(Control)、阳性对照西洋参组(PC)、<3000 Da 核桃蛋白酶解物(WPPL)、3000~5000 Da 核桃蛋白酶解物(WPPM)、>5000 Da 核桃蛋白酶解物组(WPPH), 每组 16 只小鼠, 其中随机取 8 只标为 Y, 剩下 8 只标记为 N, 小鼠每天灌胃 200 mg/kg 的核桃蛋白酶解物及西洋参, 对照组每天灌胃相应剂量的生理盐水, 其余组都使用生理盐水溶解样品, 实验周期为 31 d, 每天对小鼠进行称重并做好记录。一个月后标记为 N 的小鼠进行负重游泳实验, Y 进行力竭游泳实验^[23-24]。

1.2.10 疲劳相关生化指标的测定及苏木精-伊红(HE)染色 在实验的最后 1 d, 先灌胃受试物, 等待 30 min 后, 每组标记为 N 的 8 只小鼠放于事先准备好的游泳箱中运动 30 min, 结束后休息 45 min 取血、右腿肌肉和肝脏。从血液中分离出血清, 用于 BUN、LD、GSH-Px、SOD、MDA 测定, 肝脏用于 HG 的测定, 右腿肌肉用于 MG 的测定。在每组的 N 中分别取 3 只小鼠进行病理性考察, 取右腿肌肉, 进行 HE 染色评价小鼠肌肉病理变化。

1.3 数据处理

应用 OriginPro 2021 处理所得数据并做图, 多组数据相比较采用 t 检验, 所有数据均以“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 单因素实验分析结果

如图 1 所示, 随着核桃粕与水比值的增加, 水解度呈先升后降的趋势, 核桃粕与水的比值是 9:100

时, 水解度为 21.9%, 此时水解度达到最高值。在 pH 位于 7~11 的区间里, 水解度依然呈现先增后减的趋势, 当酶解 pH 为 9 时, 水解度最高达 27.2%。而对于酶添加量, 本方法提取的贯筋藤蛋白酶活力为 216.16 SU/mg, 核桃蛋白酶解物的水解度一直增加, 在酶添加质量低于 10% 时, 水解度提升幅度较大, 此后继续增加酶用量, 水解度继续增加, 但是增幅较小并趋于平缓, 因此酶添加量选择 10%。由单因素趋势分析结果也可看出, 在反应前期核桃蛋白的水解度随着酶解时间的延长有较快的提升, 根据酶反应动力学可以得知, 在水解初期, 由于蛋白质中存在着大量的酶切位点, 因此反应较为剧烈^[25]; 随着反应时间的延长, 酶切位点逐渐被断开, 此时水解速度就会变得越来越缓慢, 最终酶切作用位点被完全打开后, 蛋白的水解度将不会再升高, 因此酶解时间选择 180 min。当反应温度为 60 °C 时, 蛋白组的水解度达到最高。综合各因素对核桃蛋白水解度的影响, 选择酶解条件为: 酶添加质量 10%, 料液比 9:100, 反应时间 180 min, 酶解 pH 为 9, 酶解温度 60 °C。

2.2 响应面优化结果

采用 Design-Expert 10.0.7 软件对酶解工艺进行响应面优化, 试验结果如表 2 所示, 得到水解度的多元二次回归方程为: 水解度 $Y_1=28.40+1.00A+2.63B+2.38C-2.00AB-1.00AC+0.25BC-4.58A^2-2.32B^2-0.32C^2$ 。由表 3 可知, 此模型极显著 ($P<0.001$), 失拟项均不显著 ($P>0.05$), 说明此模型拟合程度好, 可靠性高。模型的决定系数 R^2 为 0.9956, 说明水解度有 99.56% 来源于所选变量, 因此, 此模

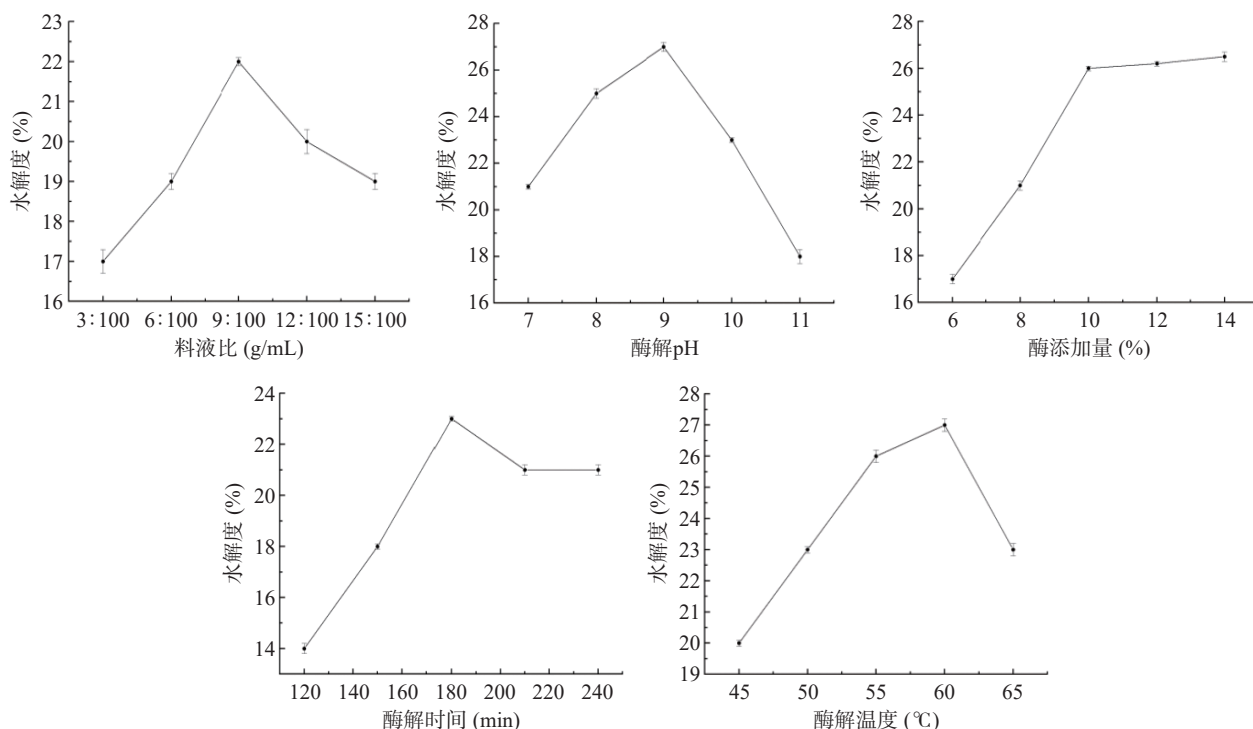


图 1 贯筋藤酶解核桃蛋白的单因素趋势分析

Fig.1 Single factor trend analysis of the enzymatic degradation of walnut protein by *Dregea sinensis* Hemsli. protease

型的回归方程可用于分析和预测水解度。由表 3 亦可知,对于水解度模型,A(酶添加量)、B(酶解 pH)、C(酶解温度)、A²、B² 对水解度有极显著影响($P<0.01$);AB 有显著影响($P<0.05$),AC、BC、C² 无显著影响。

表 2 核桃分离蛋白酶解工艺优化响应面试验设计及结果
Table 2 Experimental design and results of optimal response surface for walnut separation proteolytic hydrolysis process

实验号	A酶添加量	B酶解pH	C酶解温度	水解度(%)
1	-1	-1	0	16.12±0.12
2	1	-1	0	22.21±0.15
3	-1	1	0	24.97±0.12
4	1	1	0	23.22±0.16
5	-1	0	-1	18.32±0.12
6	1	0	-1	22.31±0.11
7	-1	0	1	26.95±0.09
8	1	0	1	27.18±0.43
9	0	-1	-1	22.24±0.26
10	0	1	-1	27.48±0.14
11	0	-1	1	24.11±0.22
12	0	1	1	30.46±0.14
13	0	0	0	28.21±0.11
14	0	0	0	29.16±0.23
15	0	0	0	28.36±0.18
16	0	0	0	28.42±0.24
17	0	0	0	29.42±0.22

根据软件分析,将酶解液的水解度设置为 maximize 最大值,得到水解度最高的酶解条件为:酶解温度 63.06 ℃,酶添加质量 9.41%,酶解 pH9.59,水解度的预测值为 30.4%。为了实验便捷,确定最佳酶解条件为酶解温度 63 ℃,酶添加质量 9.4%,酶解 pH9.6,在此条件下进行多次验证试验,水解度平均为 30.1%,与预测值较为接近。

表 3 水解度回归模型分析
Table 3 Analysis of regression model of hydrolysis degree

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	246.55	9	27.39	16.75	0.0006	**
A	8	1	8	4.89	0.0027	**
B	55.12	1	55.12	33.70	0.0007	**
C	45.12	1	45.12	27.59	0.0012	**
AB	16	1	16	9.78	0.0167	*
AC	4	1	4	2.45	0.1618	
BC	0.25	1	0.25	0.15	0.7075	
A ²	88.13	1	88.13	53.88	0.0002	**
B ²	22.76	1	22.76	13.91	0.0074	**
C ²	0.44	1	0.44	0.27	0.6182	
总残差	11.45	7	1.64			
失拟项	10.25	3	3.42	11.39	0.1199	
净误差	1.2	4	0.3			
总和	258	16				

注:“*”表示对结果影响显著($P<0.05$);“**”表示对结果影响极显著($P<0.01$)。

2.3 SDS-PAGE

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是一种根据分子量去分离蛋白质的技术,结果如图 2 所示。核

桃分离蛋白的电泳条带主要分布在 10~70 kDa,使用贯筋藤蛋白酶酶解核桃蛋白后,35 kDa、60 kDa 的蛋白条带明显被降解为小分子在下层堆积,说明贯筋藤蛋白酶对核桃蛋白具有良好的酶解作用。

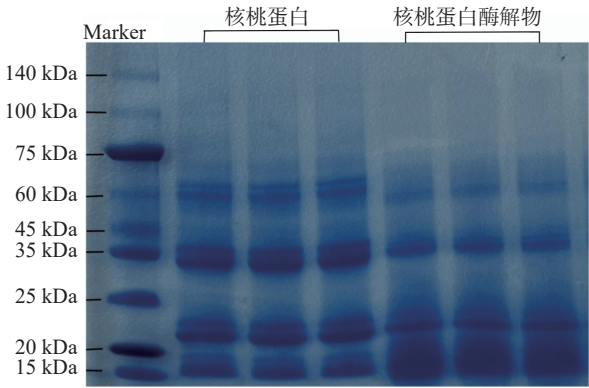


图 2 核桃蛋白与酶解物的 SDS-PAGE 图
Fig.2 SDS-PAGE gel electrophoresis of walnut proteins and enzyme digests

2.4 体外抗氧化结果

将维生素 C 作为阳性组,由图 3 可知,在 0.25~4.00 mg/mL 浓度范围内,各组的 DPPH、ABTS⁺自由基清除能力都较为良好,且具有剂量依赖性。其中,WPPs-1(<3000 Da)相比于较大分子量核桃酶解物的 DPPH、ABTS⁺自由基清除活性皆为最强,最接近阳性对照组。采用碱性蛋白酶水解核桃蛋白,获得分子质量小于 3000 Da 的核桃蛋白肽具有一定的抗氧化能力,核桃蛋白肽对 DPPH 自由基的清除率在

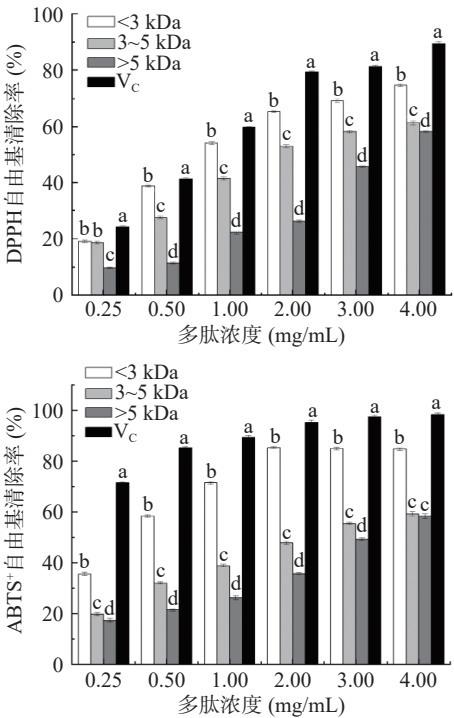


图 3 各分子量核桃蛋白酶解物的体外抗氧化能力
Fig.3 In vitro antioxidant activity of each molecular weight peptides

注:不同小写字母表示数据差异显著, $P<0.05$;图 5~图 7 同。

20 mg/mL 时达到最大, 为 66%^[26]。而采用贯筋藤蛋白酶酶解核桃蛋白得到的小于 3000 Da 的酶解物在 1 mg/mL 时就已经达到了 63%。可见, 使用贯筋藤蛋白酶酶解产生的小分子酶解物具备较好的抗氧化活性, 可为后续的相关研究提供理论基础。

2.5 核桃蛋白肽对小鼠负重游泳时间的影响

小鼠的负重游泳时间可以反映其是否疲劳及疲劳的程度^[27]。由表 4 可以看出, 与空白对照组相比, 阳性对照组(PC)小鼠的负重游泳时间相比于空白对照组显著延长($P<0.05$), 分子量小于 3 kDa 的 WPPL 组的小鼠负重游泳时间为 10.79 ± 2.52 min, 相对于空白对照组的负重游泳时间显著延长($P<0.05$), 约为空白对照组的 2.24 倍。而 WPPM 与 WPPH 组小鼠的负重游泳时间与空白组无显著性差异, 说明小分子量的核桃蛋白酶解物可能具备更好的抗疲劳效果。

表 4 核桃蛋白肽对小鼠负重游泳时间的影响

Table 4 Effects of walnut protein peptides on weight-bearing swimming time in mice

组别	负重游泳时间(min)
Control	4.81 ± 2.59^c
PC	15.41 ± 4.96^a
WPPL	10.79 ± 2.52^b
WPPM	8.46 ± 1.38^{bc}
WPPH	8.75 ± 1.58^{bc}

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异($P<0.05$)。

2.6 核桃蛋白酶解物对小鼠体重、脏器指数及肝脏 HE 染色的影响

由表 5 可知, 各组小鼠的体重都有 10~12 g 左右的增加, 各组小鼠的体重增长幅度均没有显著性差异。脏器指数反应了一定的小鼠的健康状况, 如表 6 所示, WPPL 组、WPPM 组和 WPPH 组的小鼠心脏、肝脏、肾脏、脾脏与阳性组及空白对照组都无

表 5 核桃蛋白酶解物对小鼠体重的影响

Table 5 Effects of peach protein digests on the body weight of mice

分组	初始体重(g)	最终体重(g)
Control	20.21 ± 0.94	32.29 ± 1.17
PC	20.41 ± 0.98	31.54 ± 0.91
WPPL	20.43 ± 0.94	30.34 ± 1.22
WPPM	20.31 ± 0.85	30.50 ± 1.18
WPPH	20.36 ± 0.51	30.10 ± 0.62

表 6 核桃蛋白酶解物对小鼠脏器指数的影响

Table 6 Effects of walnut protease hydrolysate on organ indexes in mice

组别	心脏系数 (mg/g)	肝脏系数 (mg/g)	肾脏系数 (mg/g)	脾脏系数 (mg/g)
Control	44.97 ± 1.26	11.1 ± 0.65	20.83 ± 2.06	7.59 ± 1.35
PC	46.05 ± 2.56	10.68 ± 1.12	21.65 ± 1.63	7.97 ± 1.07
WPPL	44.20 ± 2.71	10.96 ± 1.05	21.99 ± 1.94	8.26 ± 1.07
WPPM	41.01 ± 3.04	10.62 ± 1.67	18.88 ± 2.01	6.74 ± 1.17
WPPH	44.18 ± 1.09	9.72 ± 0.99	18.63 ± 0.75	6.49 ± 1.05

显著性差异, 说明核桃蛋白酶解物对小鼠的各脏器无任何毒副作用。

如图 4 所示, 小鼠后腿肌肉组织可见横切面与纵切面相间分布的肌细胞, 纵切面中的肌细胞是细长呈圆柱状的细胞, 肌质内含有许多沿细胞长轴平行排列的肌原纤维, 细胞核位于细胞周边近肌膜处, 呈椭圆形; 横切面显示数个边界清楚的肌纤维束, 肌束内的肌纤维排列紧密, 多数呈角状外观, 可见典型的明暗相间排列的横纹, 未见明显异常。说明阳性组的西洋参和核桃蛋白酶解物对小鼠都无任何毒副作用。

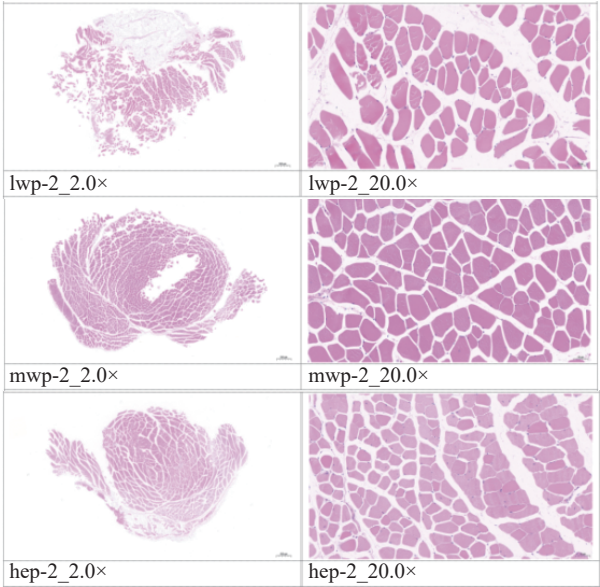


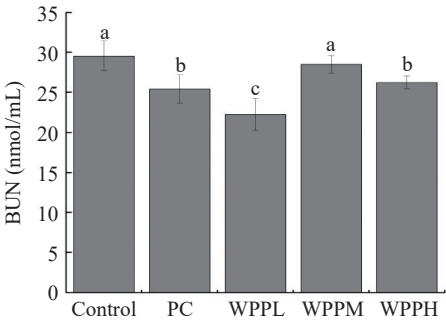
图 4 小鼠后腿肌肉的 HE 染色

Fig.4 HE staining of mouse hind leg muscles

注: 2.0×表示放大倍数为 2; 20.0×表示放大倍数为 20; lwp、mwp 和 hwp 分别表示低、中、高剂量的核桃蛋白酶解物。

2.7 核桃蛋白肽对小鼠血清 BUN、LD 的影响

由图 5 可以看出, 与 Control 组相比, PC 组和 WPPL、WPPM、WPPH 组小鼠的血清 BUN 含量均降低, 说明小鼠在长时间负重游泳前, 补充西洋参与核桃蛋白肽, 小鼠肌肉蛋白质的分解代谢出现显著降低的状况, 其中, WPPL 组的 BUN 降低最为显著($P<0.05$), 可能是由于 WPPL 中含有大量的功能性短肽及壳寡糖, 而糖代谢的调节正需要两者的参与, 导致肌肉中蛋白质消耗量减少, 从而减少尿素的产生, 达到抗疲劳的效果^[28]。与 Control 组相比, PC 组小鼠的血清乳酸含量显著($P<0.05$)降低, WPPL 组小



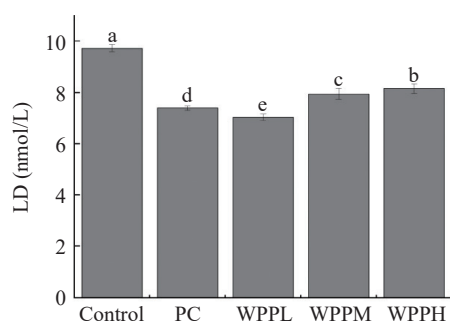


图 5 核桃蛋白肽对小鼠 BUN、LD 含量的影响

Fig.5 Effects of walnut protein peptide on BUN and LD content in mice

鼠的血清 LD 含量降低了 26.04%、WPPM 组降低 17.71%, WPPH 降低 12.50%, 说明核桃蛋白肽对小鼠运动性疲劳有较好的缓解作用, 其中 WPPL 的缓解作用最好。说明使用贯筋藤蛋白酶酶解的核桃蛋白酶解物可能增加小鼠糖原的储备, 使实验鼠体内的有氧代谢能力得到提升, 减少肌肉中乳酸的形成, 从而缓解疲劳。

2.8 核桃蛋白肽对小鼠 HG 和 MG 含量的影响

从图 6 可以看出, 与对照组相比, 阳性组及核桃蛋白酶解物组小鼠的肝糖原均有一定的提高, 说明西洋参与核桃蛋白酶解物都能促进小鼠运动后肝糖原的恢复, 其中 WPPM 的肝糖原有显著提升 ($P<0.05$) 且效果优于西洋参。机体运动的主要贮能物质为糖原, 包括肌糖原和肝糖原, 而机体运动能力减弱的主要原因也是因为肝/肌糖原的过量消耗^[29], 当小鼠食用核桃蛋白肽后, 体内的 MG 含量显著增加 ($P<0.05$), 猜测是由于核桃蛋白肽调节了糖的代谢, 其中, WPPL 组 MG 含量提高尤为显著 ($P<0.05$), 可能

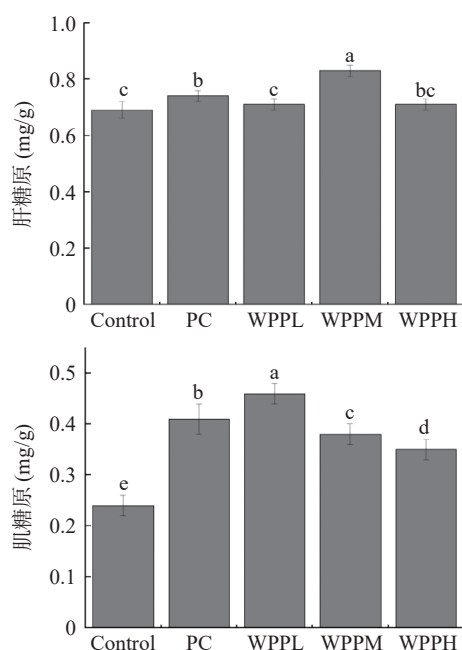


图 6 核桃蛋白肽对小鼠 HG 和 MG 含量的影响

Fig.6 Effects of walnut protein peptide on HG and MG content in mice

是与 WPPL 共价结合的壳寡糖分解代谢, 使机体血糖含量得到补充, 从而提高了小鼠的运动耐力。

2.9 核桃蛋白肽对小鼠 SOD、GSH-Px、MDA 的影响

本研究通过测定各组实验小鼠的血清 SOD、GSH-Px、MDA 含量来评价核桃蛋白肽对小鼠抗氧化能力的影响。如图 7 所示, 与空白对照组相比, WPPL、WPPM、WPPH 组小鼠血清中 SOD 及 GSH-Px 活力均明显升高 ($P<0.05$), 其中 WPPL 效果最为显著 ($P<0.05$), 可能是由于核桃蛋白酶解物在小鼠体内加快了自由基清除的代偿性反应, MDA 各组间无显著性差异。由此说明, 分子量小于 3000 Da 的核桃蛋白酶解物能显著提高小鼠的抗氧化能力。

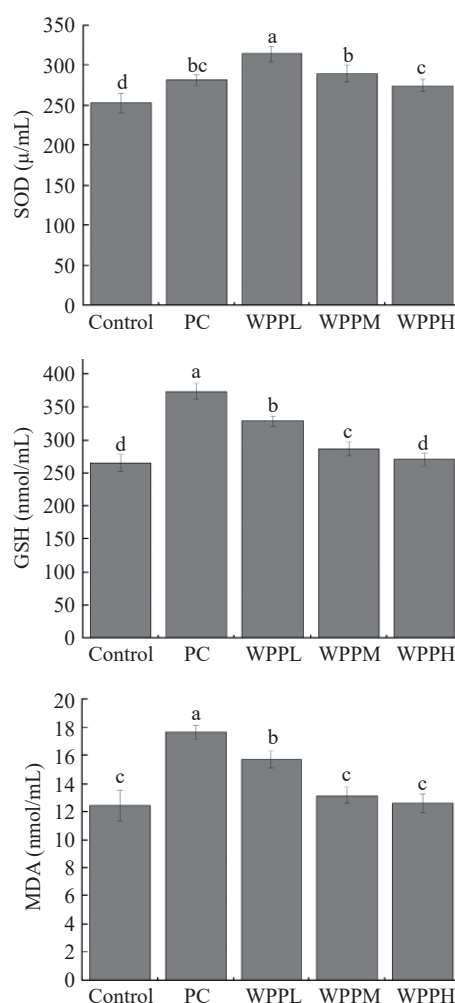


图 7 核桃蛋白肽对小鼠 SOD、GSH-Px 和 MDA 含量的影响

Fig.7 Effects of walnut protein peptide on SOD, GSH-Px and MDA content in mice

3 结论

本文使用贯筋藤蛋白酶水解核桃蛋白, 单因素实验结合响应面试验表明, 当料液比为 9:100、pH9.6、酶添加质量 9.4%、酶解时间 180 min、酶解温度 63 ℃ 时, 水解度最高达 30.1%; HE 染色显示, 使用贯筋藤蛋白酶提取的酶解物对小鼠无任何毒副

作用。

本文还研究了核桃蛋白酶解物的抗疲劳及抗氧化效应,发现 WPPL、WPPM、WPPH 均能使实验小鼠的力竭游泳时间得到不同程度的延长,实验小鼠负重游泳后 MG 和 HG 的消耗以及 LD 的沉积呈现降低的趋势,小鼠体内蛋白质的分解代谢得到一定的改善,有效地清除了实验小鼠体内的血清 BUN,具有显著的抗疲劳效果。其中,WPPL 组力竭游泳时间最长约为 10.79 ± 2.52 min,小鼠体内血液生化指标 SOD、GSH-Px 的结果显示抗氧化活性最强的是小分子的核桃蛋白酶解物。

此外,灌胃核桃蛋白酶解物后,各组小鼠的脏器指数并无显著性差异,HE 染色无明显异常,说明核桃蛋白肽并未对小鼠产生任何毒副作用。目前,在国内外的市场上关于核桃蛋白肽的研究与开发利用较少,因此核桃蛋白肽作为一种天然的抗疲劳功能性食品,其用于食品添加剂或功能性肽粉的研发,有着巨大的发展空间。后续可研究其降脂活性,而本文也可为该核桃蛋白肽的抗疲劳机制研究奠定一定的基础。

© The Author(s) 2024. 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] 高盼,李恒彬,陈哲,等.核桃分离蛋白的制备工艺优化及功能特性[J].中国油脂,2022,47(8):34-39. [GAO Pan, LI Hengbin, CHEN Zhe, et al. Optimization of preparation process and functional properties of walnut isolate protein[J]. China Oils & Fats, 2022, 47(8): 34-39.]
- [2] JI Chenyang, LUO Yangchao. Plant protein-based high internal phase Pickering emulsions: Functional properties and potential food applications[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2023, 12.
- [3] LEI Yuqing, GAO Sihai, XIANG Xiaole, et al. Physicochemical, structural and adhesion properties of walnut protein isolate-xanthan gum composite adhesives using walnut protein modified by ethanol[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 644-653.
- [4] 李汉洋,李建杰,王帅,等.核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究[J].食品工业科技,2018,39(13):1-7,13. [LI Hanyang, LI Jianjie, WANG Shuai, et al. Antioxidant activity of walnut polypeptide and its molecular weight and amino acid composition characterization[J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 39(13): 1-7,13.]
- [5] 袁晋芳.核桃蛋白抗氧化肽制备及其抗氧化性研究[D].天津:天津科技大学,2018. [YUAN Jinfang. Preparation of walnut protein antioxidant peptide and its antioxidant properties[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.]
- [6] 李冬生.核桃蛋白肽功能活性研究[D].昆明:昆明理工大学,2015. [LID S. Research on the functional activity of walnut protein peptide[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2015.]
- [7] 李文治.核桃蛋白酶解产物改善记忆功效及其压片性能研究[D].广州:华南理工大学,2017. [LI Wenzhi. Study on the memory improvement efficacy of walnut proteolytic cleavage products and their compression tableting properties[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.]
- [8] 赵凡睿.核桃抗氧化肽改善学习和记忆功能障碍的分子机制研究[D].长春:吉林农业大学,2021. [ZHAO Fanrui. Research on the molecular mechanism of walnut antioxidant peptide to improve learning and memory dysfunction[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.]
- [9] 崔玲玉.长白山核桃蛋白肽的制备及功能活性研究[D].长春:吉林农业大学,2016. [CUI Lingyu. Preparation and functional activity of protein peptides from Changbai Mountain walnut[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.]
- [10] WANG H, WANG Y, HUANG A. Influence of *Dregea sinensis* Hems. protease on the quality of mozzarella cheese from buffalo milk[J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2017: 5393-546.
- [11] ZHANG Y L, WANG H Y, TAO L, et al. Milk-clotting mechanism of *Dregea sinensis* Hems. protease[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(12).
- [12] 赵琼,李素梅,陈昌航,等.贯筋藤蛋白酶水解槟榔江水牛酪蛋白制备抗菌肽[J].食品工业,2020,41(5):151-155. [ZHAO Qiong, LI Sumei, CHEN Changhang, et al. Preparation of antimicrobial peptides by hydrolysis of casein from Penang River buffalo by protease from Penang vine[J]. Food Industry, 2020, 41(5): 151-155.]
- [13] 赵琼,朱志伟,赵存朝,等.功能型水牛奶乳饼制作工艺的研究[J].中国奶牛,2018(12):38-43. [ZHAO Qiong, ZHU Zhiwei, ZHAO Cunzhao, et al. Research on the production process of functional buffalo milk latkes[J]. China Dairy Cattle, 2018(12): 38-43.]
- [14] 陶亮,潘新杰,林竟,等.牛奶乳饼加工工艺优化及其营养成分分析[J].食品科学,2017,38(6):221-228. [TAO Liang, PAN Xinjie, LIN Jing, et al. Optimization of milk quiche processing and its nutrient composition analysis[J]. Food Science, 2017, 38(6): 221-228.]
- [15] 赵存朝,王雪峰,黄梦,等.贯筋藤酶解山羊乳酪蛋白糖巨肽的工艺研究[J].中国乳品工业,2018,46(9):23-27. [ZHAO Cunzhao, WANG Xuefeng, HUANG Meng, et al. Process study of enzymatic hydrolysis of goat milk casein glycoconjugate megapeptide by Guanzheng vine[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(9): 23-27.]
- [16] 代锡鑫,徐莹,毕爽,等.核桃粕蛋白提取纯化工艺优化及其功能性质分析[J].食品工业科技,2023,44(2):241-252. [DAI Yixin, XU Ying, BI Shuang, et al. Optimization of walnut meal protein extraction and purification process and analysis of its functional properties[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(2): 241-252.]
- [17] 赵琼,王庭伊,黄艾祥.逐级盐析结合双水相法纯化贯筋藤凝乳酶[J].食品工业科技,2020,41(1):44-49. [ZHAO Qiong, WANG Tingyi, HUANG Aixiang. Purification of lactase from Guanzheng vine by step-by-step salting out combined with bi-aqueous phase method[J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(1): 44-49.]
- [18] 刘振民,刘辉,骆承庠.酒药中凝乳酶菌株筛选及产酶条件研究[J].食品与发酵工业,2000,26(5):8-11. [LIU Zhenmin, LIU Hui, LUO Chengxiang. Screening of lactase strains and enzyme production conditions in liquor[J]. Food and Fermentation Industry, 2000, 26(5): 8-11.]

- [19] 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 Yang, TANG Muguo, ZHOU Yan, et al. Preparation and functional characterization of glycosylated walnut peptides with different molecular masses[J]. *Food Science*, 2023, 44(10): 205–214.]
- [20] 姜荣庆. 复合酶提取山核桃油及副产物综合利用的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011. [JIANG Rongqing. Complex enzyme extraction of hickory oil and comprehensive utilization of by-products[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011.]
- [21] 沈敏江. 核桃蛋白粉的制备及其溶解性研究[D]. 北京: 中国农业科学, 2014. [SHEN Minjiang. Preparation of walnut protein powder and its solubility study[D]. Beijing: China Agricultural Science, 2014.]
- [22] 赵才冬, 漆姚姚, 雷楚文, 等. 甲鱼蛋蛋白水解物的体外消化及对抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(10): 126–133. [ZHAO Caidong, QIU Yaoyao, LEI Chuwen, et al. *In vitro* digestion of turtle egg protein hydrolysate and its effect on antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2022, 22(10): 126–133.]
- [23] 荣耀, 白鑫明, 迟明, 等. 高原谷物青稞对小鼠降糖、耐缺氧、抗疲劳功能活性的影响[J/OL]. *中国食品学报*: 1–11 [2023-07-11]. [RONG Yao, BAI Xinming, CHI Ming, et al. Effects of highland grain barley on functional activities of hypoglycemia, hypoxia tolerance and anti-fatigue in mice[J/OL]. *Chinese Journal of Food*: 1–11 [2023-07-11].]
- [24] 冯瑞方, 邹潇潇, 王凯, 等. 牛骨胶原蛋白肽的表征及其对 Balb/c 小鼠的抗疲劳作用[J]. *中国农业大学学报*, 2023, 28(3): 74–82. [FENG Ruifang, ZOU Xiaoxiao, WANG Kai, et al. Characterization of bovine bone collagen peptides and their anti-fatigue effects in Balb/c mice[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(3): 74–82.]
- [25] 黄苏. 大豆蛋白酶解聚集的原因及其抑制途径的初探[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [HUANG S. A preliminary study on the causes of soybean proteolytic aggregation and its inhibition pathway[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [26] 刘昭明, 黄翠姬, 孟陆丽, 等. 核桃蛋白肽的抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(1): 58–61. [LIU Zhaoming, HUANG Cuiji, MENG Luli, et al. Antioxidant activity of walnut protein peptides[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2009, 35(1): 58–61.]
- [27] SHUAI Xixiang, LI Ya, ZHANG Ming, et al. Anti-fatigue effect of enzymatic protein hydrolysate from Macadamia[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 769(2).
- [28] ZHAO C Y, GONG Y R, ZHENG L, et al. The degree of hydrolysis and peptide profile affect the anti-fatigue activities of whey protein hydrolysates in promoting energy metabolism in exercise mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(6): 3010–3021.
- [29] FEI L, WEI L. Comparative study on anti-fatigue and immunomodulatory functions of hemp seed protein[J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2020, 127: 290.