

核桃蛋白的分离制备及其酶解物的抗氧化特性

任娇艳^{1,2}, 史传超¹, 常博¹, 袁尔东¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641) (2. 中新国际联合研究院, 广东广州 510000)

摘要: 根据蛋白在水溶液、盐溶液、醇溶液及碱性溶液中的溶解性不同, 从核桃粕中分离得到四类不同性质的蛋白组分: 清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白, 其中球蛋白和谷蛋白含量较高, 分别为 16.90% 和 71.40%。以脱脂脱酚粕、谷蛋白和球蛋白为原料, 分别制备蛋白酶解液, 以 DPPH 自由基清除率和蛋白质回收率为指标, 对蛋白酶解工艺条件进行优化, 探讨蛋白酶解液的分子量分布与抗氧化活性的关系。结果表明: 在碱性蛋白酶、pH 8 及酶解 9 h 的条件下, 蛋白酶解液有较高的 DPPH 清除率和蛋白回收率; 脱脂脱酚核桃粕酶解液 DPPH 清除率 83.29% 高于谷蛋白酶解液 79.25% 和球蛋白酶解液 72.27%, 蛋白回收率分别为 69.83%、66.42% 和 73.71%。脱脂脱酚粕、谷蛋白和球蛋白酶解液以小分子肽居多, 其中相对分子量 ≤ 1000 的肽段分别占总量的 42.73%、63.91% 和 55.10%, 推测其抗氧化活性可能与小分子肽含量有关。

关键词: 核桃蛋白; 酶解; 蛋白回收率; 抗氧化性; 分子量分布

文章编号: 1673-9078(2019)03-118-124

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.019

Separation and Preparation of Walnut Protein and Antioxidant Properties of Its Enzymatic Hydrolysate

REN Jiao-yan^{1,2}, SHI Chuan-chao¹, CHANG Bo¹, YUAN Er-dong¹

(1. School of Food Science and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. Sino-Singapore International Joint Research Institute, Guangzhou 510000, China)

Abstract: According to the solubility of protein in an aqueous solution, salt solution, alcoholic solution and alkaline solution, four types of different protein components were separated from walnut meal: albumin, globulin, gliadin and glutenin. Among which, the contents of globulin and glutenin were higher (16.90% and 71.40%, respectively). The defatted and dephenolated walnut meal, glutenin and globulin were used as raw materials to prepare the proteolytic solution, and the DPPH free radical scavenging rate and protein recovery rate were used as indices to optimize the proteolytic conditions and investigate the relationship between molecular weight distribution and antioxidant activity. The results showed that the enzymatic hydrolysate had higher DPPH scavenging rate and protein recovery rate under the conditions: alkaline protease, pH 8, and enzymolysis time 9 h. The DPPH scavenging rate for the enzymatic hydrolysate of the defatted and dephenolated walnut meal was higher (83.29%) than those of glutenin hydrolysate (79.25%), and globulin hydrolysate (72.27%), with their protein recovery rates being 69.83%, 66.42% and 73.71% respectively. The peptides in these protein hydrolysates were mostly small molecular peptides, and among which, those with molecular weights not more than 1000 accounted for 42.73% (hydrolysate of defatted walnut meal), 63.91% (hydrolysate of glutenin) and 55.10% (hydrolysate of globulin), respectively. It is speculated that their antioxidant activities may be related to the contents of small peptides.

Key words: walnut protein; enzymatic hydrolysis; protein recovery; antioxidant properties; molecular weight distribution

核桃 (*Juglans regia* L.) 又名胡桃、羌桃、万岁子

收稿日期: 2018-06-08

基金项目: “广东特支计划”科技青年拔尖人才项目 (2014TQ01N645); 国家自然科学基金项目 (31671804); 中央高校基本科研业务费项目 (2017ZD079); 广州市产学研协同创新重大专项 (201604020047); 广东省科技计划项目 (2015B020230001)

作者简介: 任娇艳 (1980-), 女, 教授, 研究方向: 食品生物化学、食品营养与健康

通讯作者: 袁尔东 (1975-), 女, 副教授, 研究方向: 食品生物化学、食品营养与健康

等属胡桃科核桃属植物^[1]。我国是核桃生产大国, 核桃产量居世界首位。目前我国的核桃主要用于榨油以及炒制休闲食品, 榨油后的副产物核桃粕, 大多作为饲料廉价出售或直接丢弃, 没有得到很好的利用。分析显示, 核桃粕的蛋白含量高达 40%^[2], 包括 18 种氨基酸, 其中 8 种必需氨基酸, 并以精氨酸、谷氨酸含量相对较高^[3], 是一种优质植物蛋白资源。因此, 对核桃粕蛋白资源进行深加工和高值化利用, 提高其附加值, 具有重要的现实意义。

植物籽粒蛋白按溶解性一般可分为四类: 溶于水

的白蛋白、溶于盐的球蛋白、溶于醇的醇溶蛋白和溶于碱的谷蛋白。研究表明,核桃中这四类蛋白的疏基含量、三级结构、表面疏水性指数和乳化性等理化性质各不相同^[4],决定其不同的生物活性。近年来,多肽在生物体内的生理功能受到越来越多的重视,筛选具有强抗氧化活性的天然多肽已成为生物学、医学和食品科学研究的新趋势^[5,6]。研究显示,核桃蛋白酶解制备的核桃多肽具有抗氧化、抗病毒、免疫调节、抑制肿瘤细胞增殖、改善高血压等作用^[7-9]。

目前关于酶解核桃粕蛋白的研究,多针对其抗氧化活性^[10-12],而特别针对四类核桃蛋白的提取与制备的研究并不多见。本文根据蛋白的不同溶解特性制备四类核桃蛋白,并进行酶解,对比其抗氧化活性差异,初步探索分子量分布与抗氧化活性的关系,为核桃蛋白的精深加工、抗氧化肽等健康功能因子的研究与生产提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

核桃粕,购于辽宁长白仙子生物科技有限公司;碱性蛋白酶(Alcalase, 200 U/mg)、中性蛋白酶(Neutrase, 200 U/mg)、木瓜蛋白酶(Papain, 600 U/mg)、胰酶(Pancreatin, 600 U/mg)、风味蛋白酶(Flavourzyme, 30 U/mg)购于广州华琪生物科技有限公司。

二苯代苦味酰肼自由基(DPPH·)购于Sigma公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠等化学试剂均为分析纯,购于国药化学集团;试剂配制均采用去离子水。

1.2 仪器

精密pH计,上海仪电科学仪器有限公司;UV-752紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;水浴恒温振荡器,常州澳华仪器有限公司;冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;岛津LC-20A液相处理系统,岛津(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 技术路线

榨油核桃粕→粉碎,过60目筛→脱脂脱酚处理→四类核桃蛋白提取→不同种类蛋白酶的优化(以DPPH·清除率和蛋白回收率为指标)→酶解条件(时间,pH)的优化(以DPPH·清

除率和蛋白回收率为指标)→探索核桃肽分子量分布规律与抗氧化活性的关系

脱脂脱酚处理与四类蛋白提取流程见图1。

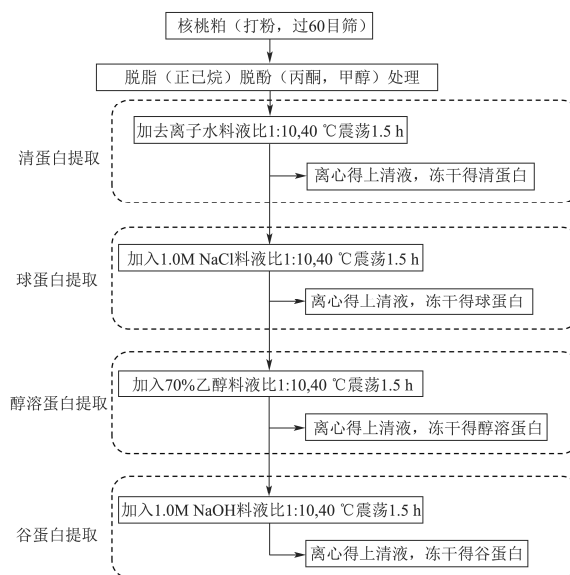


图1 四类核桃蛋白的分离制备流程

Fig.1 Separation and preparation of four kinds of walnut proteins

1.3.2 核桃脱脂脱酚粕的制备^[13,14]

核桃粕粉按料液比1:5加正己烷,4℃下搅拌1h,抽滤,取滤饼粕。重复以上步骤至正己烷无色,挥发溶剂得干燥脱脂核桃粕。按料液比1:10加75%(V/V)丙酮溶液,4℃下搅拌1h,抽滤,取滤饼粕,重复2次。按料液比1:10加甲醇,4℃搅拌1h,抽滤,得滤饼粕,重复2次,挥发溶剂得干燥脱脂脱酚核桃粕。

1.3.3 四种核桃蛋白的制备^[15,16]

取脱脂脱酚核桃粕按料液比1:10加去离子水,40℃保温振荡1.5h后5000 r/min离心25 min,取上清得到核桃清蛋白溶液。剩余沉淀1按1:10料液比加1.0 M NaCl溶液,40℃保温振荡1.5h后5000 r/min离心25 min,取上清得到核桃球蛋白溶液。剩余沉淀2按料液比1:10加入70%乙醇,40℃振荡1.5h后5000 r/min离心25 min,取上清得到核桃醇溶蛋白溶液。剩余沉淀3按料液比1:10加0.1 M NaOH溶液,40℃振荡1.5h后5000 r/min离心25 min,取上清酸沉收集沉淀后回调至pH 7.0,得核桃谷蛋白溶液。分离所得蛋白溶液分别冻干保存待用。

1.3.4 蛋白酶解条件的优化

1.3.4.1 蛋白酶种类的筛选

取一定质量原料蛋白按照1:10料液比加入去离子水,分别加入木瓜蛋白酶(Papain)、胰蛋白酶(Trypsin)、碱性蛋白酶(Alcalase)、中性蛋白酶(Neutrase)或风味蛋白酶(Flavourzyme),蛋白酶加

酶量为蛋白含量的 1%, 55 °C 下酶解 5 h。酶解过程中滴加 0.1 M NaOH 溶液以维持溶液 pH 7.0。酶解完毕, 100 °C 灭酶 10 min^[17]。取酶解液 4 °C 下 8500 r/min 离心 25 min, 取上清液。凯氏定氮法测定酶解液中蛋白含量, 比较核桃蛋白酶解液的蛋白回收率和 DPPH·清除率。

1.3.4.2 蛋白酶酶解时间的优化

取一定质量原料蛋白按 1:10 料液比加入去离子水, 加入 1% 底物蛋白量的蛋白酶, 55 °C 下分别酶解 3 h、6 h、9 h。酶解过程中滴加 0.1 M NaOH 溶液以维持溶液 pH 7.0, 酶解完毕 100 °C 灭酶 10 min。凯氏定氮法测定酶解液中蛋白含量, 比较核桃蛋白酶解液蛋白的回收率和 DPPH·清除率。

1.3.4.3 不同酶解 pH 值的优化

取一定质量原料蛋白按 1:10 料液比加入去离子水, 根据优选出的蛋白酶以及酶解时间, 加入 1% 底物蛋白量的蛋白酶, 55 °C 下进行酶解。酶解过程中, 每隔 0.5 h 用 0.1 M HCl 调节一次体系 pH 为 7.0、8.0 或 9.0。酶解完毕 100 °C 灭酶 10 min。凯氏定氮法确定酶解液中蛋白含量, 比较核桃蛋白酶解液蛋白回收率和 DPPH·清除率。

1.3.5 酶解液分子量分布的测定

参考卢韵君^[18]的方法并略作修改。以细胞色素 C (相对分子量 12384 u), 抑肽酶 (相对分子量 6511 u), 杆菌肽 (相对分子量 1450 u), Gly-Gly-Tyr-Arg (相对分子量 451 u), Gly-Gly-Gly (相对分子量 189 u) 为标准品, 高效液相色谱法检测不同分子的保留时间, 作分子量与保留时间的标准曲线。通过比较样品不同组分的保留时间计算样品的分子量分布。高效液相色谱条件: 样品过 0.22 μm 微孔滤膜, 色谱柱 TSK-GEL G2000 SWxl 7.8 mm×300 mm, 进样量 20 μL, 温度 35 °C, 检测波长 214 nm, 流速 0.5 mL/min, 流动相为乙腈:水:TFA=40:60:0.05。

1.3.6 检测指标

1.3.6.1 蛋白回收率

蛋白原料分别在不同试验条件下进行酶解反应, 用凯氏定氮法测定酶解液蛋白含量, 按如下公式计算蛋白回收率^[19]。

$$\text{蛋白回收率} / \% = \frac{\text{酶解液总蛋白含量}}{\text{原料总蛋白含量}} \times 100$$

1.3.6.2 DPPH·清除率检测^[20,21]

取 0.02 mmol/L 的 DPPH·溶液 2 mL 于试管中, 加入 2 mL 样品待测液 (将酶解液统一稀释至蛋白含量为 0.25%), 混匀, 室温避光反应 20 min, 于 517 nm 处测定吸光值 (A_i)。以 2 mL 乙醇加入 2 mL 蒸馏水

调零, 以 2 mL DPPH·溶液加 2 mL 蒸馏水在测定波长下的吸光值 (A_c) 为参比, 以 2 mL 样品待测液和 2 mL 乙醇混合后吸光值为空白 (A_j)。按下式计算待测样品的 DPPH·清除率。

$$\text{DPPH·清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right) \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 四类核桃蛋白的提取制备

表 1 不同核桃分离蛋白的蛋白含量

Table 1 Protein content of different walnut proteins

样品	蛋白含量/%
脱脂核桃粕	56.96±0.16
脱脂脱酚粕	60.82±1.05
醇溶蛋白	90.73±0.88
球蛋白	93.82±0.56
谷蛋白	89.33±1.75
清蛋白	93.25±0.71

如表 1 所示, 以榨油后核桃粕为原料经过脱脂处理, 蛋白含量由 41.0% 上升至 56.96%, 说明工业机械榨油脱脂并不充分, 核桃粕中还残留一定量的油脂, 需要首先去除。其次, 在核桃蛋白酶解及抗氧化活性研究中, 种皮内存留的多酚黄酮类物质的强抗氧化性会对抗氧化肽活性测定产生影响, 因此对脱脂核桃粕进行了脱酚处理。脱脂脱酚后核桃粕蛋白含量达 60.82%, 其余部分可能为碳水化合物和水分等。根据不同理化性质制备的四类核桃蛋白的蛋白质含量较高, 达到 90% 左右, 相对较纯。

表 2 核桃蛋白中四种蛋白组分含量

Table 2 Four kinds of protein contents in walnut protein

蛋白质种类	含量/%
谷蛋白	71.40
球蛋白	16.90
醇溶蛋白	4.50
清蛋白	7.20

如表 2 所示核桃蛋白中, 谷蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及清蛋白的含量分别占 71.40%、16.90%、4.50% 和 7.20%。其中谷蛋白含量最高达到 70% 以上, 这与 Sze-Tao 等研究的美国核桃结果基本一致^[22]。清蛋白和醇溶蛋白含量较少, 工业制备意义不大, 故最终选择脱脂脱酚核桃粕 (Walnut meal)、碱性谷蛋白 (Glutenin)、盐溶性球蛋白 (Globulin) 进行后续酶解实验。

2.2 蛋白酶种类的筛选

对脱脂脱酚核桃粕、核桃谷蛋白和核桃球蛋白分别用木瓜蛋白酶(P)、胰蛋白酶(T)、碱性蛋白酶(A)、中性蛋白酶(N)、风味蛋白酶(F)进行酶解,比较酶解液的蛋白回收率和 DPPH·清除率,结果见图 2。

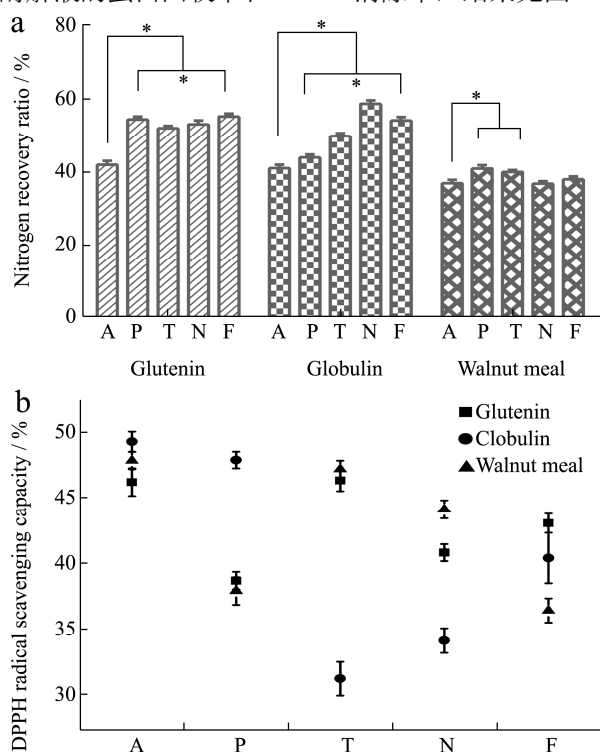


图2 不同核桃蛋白酶解液的蛋白回收率(a)与 DPPH·清除率(b)比较

Fig.2 Protein recovery rate (a) and DPPH· clearance rate (b) of different enzymatic hydrolyzate of walnut protein

蛋白回收率表明酶解液中回收的蛋白质占参与酶解的蛋白质的百分比,在蛋白质加工中是很重要的指标。由图 2a 可知,核桃谷蛋白在风味蛋白酶酶解条件下蛋白回收率最高,达 55.28%,在碱性蛋白酶酶解条件下蛋白回收率最低为 42.05%,但是碱性蛋白酶酶解液的 DPPH·清除率最好,达到 49.18%;木瓜蛋白酶酶解条件下蛋白回收率较高达 54.46%,但 DPPH·清除率最低,为 38.66%。核桃球蛋白在中性蛋白酶酶解条件下蛋白回收率最高,达到 58.79%,碱性蛋白酶条件下蛋白回收率最低;胰蛋白酶酶解条件下 DPPH·清除率最低,碱性蛋白酶酶解条件下 DPPH·清除率较高,达 49.28%。脱脂脱酚核桃粕在木瓜蛋白酶酶解条件下蛋白回收率最高,达 41.04%;在中性蛋白酶酶解条件下蛋白回收率最低;在碱性蛋白酶酶解条件下 DPPH·清除率最高,达到 48.83%;在风味蛋白酶酶解条件下 DPPH·清除率最低。

比较三种蛋白酶解液的蛋白回收率发现,无论在

何种蛋白酶的酶解条件下脱脂脱酚粕的蛋白回收率均低于谷蛋白和球蛋白,这可能是由于脱脂脱酚粕蛋白种类复杂多样,比谷蛋白和球蛋白具有更好的热稳定性、更高的二硫键含量和更致密的空间结构,导致其酶解效率低于纯度较高的谷蛋白和球蛋白^[4]。比较谷蛋白和球蛋白酶解液发现,除中性蛋白酶酶解液之外谷蛋白酶酶解液的蛋白回收率均高于球蛋白,这可能是由于碱溶性的谷蛋白较盐溶性的球蛋白更容易在酶解环境中被破坏高级结构而提高酶解效率。

从 DPPH·清除率指标上看,三种蛋白原料都在碱性蛋白酶酶解条件下取得最大 DPPH·清除率。其原因可能是,酶解产物的抗氧化性与其疏水性相关,疏水性越大,抗氧化能力越强^[23,24],而碱性蛋白酶酶切位点多在疏水性氨基酸。但是相对其他品种蛋白酶,碱性蛋白酶的蛋白回收率相对较低,可能是碱性蛋白酶在 pH 7 条件下并不能发挥其最佳酶解效率。可以通过优化酶解条件提升蛋白回收率,同时保持较高的 DPPH·清除活性。因此,综合考虑选择碱性蛋白酶作为最佳用酶。

2.3 最佳酶解时间的确定

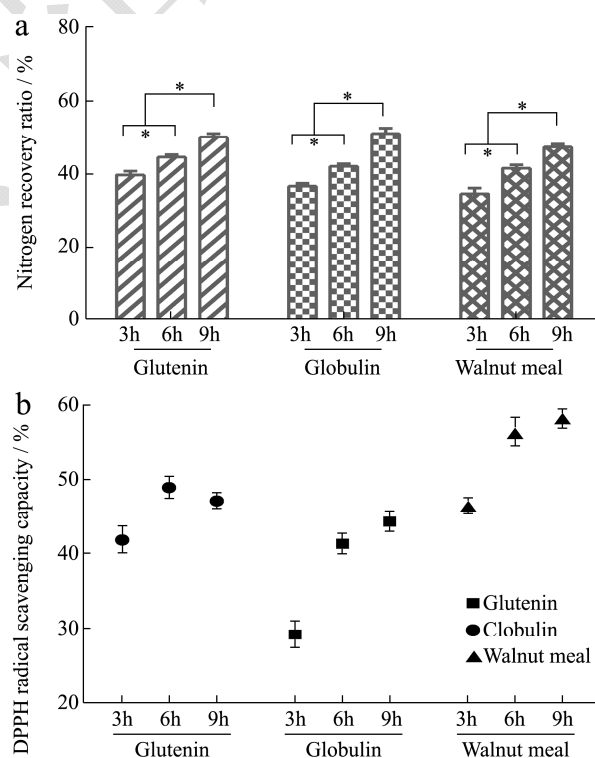


图3 不同酶解时间蛋白回收率(a)和 DPPH·(b)清除率比较

Fig.3 Protein recovery rate (a) and DPPH· clearance rate (b) after different time of enzymatic hydrolysis

图 3 为碱性蛋白酶酶解三种核桃蛋白,在不同酶解时间下酶解液的蛋白回收率和 DPPH·清除率。由图 3a 可以看出,三种酶解液都在 9 h 达到最大蛋白回收

率。核桃球蛋白和脱脂脱酚核桃粕酶解 9 h 后, DPPH·清除率分别为达到 58.13%和 44.28%。核桃谷蛋白在酶解 6 h 后取得最大 DPPH·清除率为 48.89%, 但 6 h 和 9 h 时的 DPPH·清除率无显著性差异。脱脂脱酚粕 DPPH·清除率比球蛋白和谷蛋白高, 可能是由于脱脂脱酚粕除酚不彻底, 残留多酚发挥一定的抗氧化作用。而谷蛋白在 3 h、6 h 和 9 h 均高于球蛋白, 原因可能与其氨基酸组成不同有关。综合考虑, 选择 9 h 作为最佳酶解时间进行后续实验。

2.4 酶解最佳 pH 值的确定

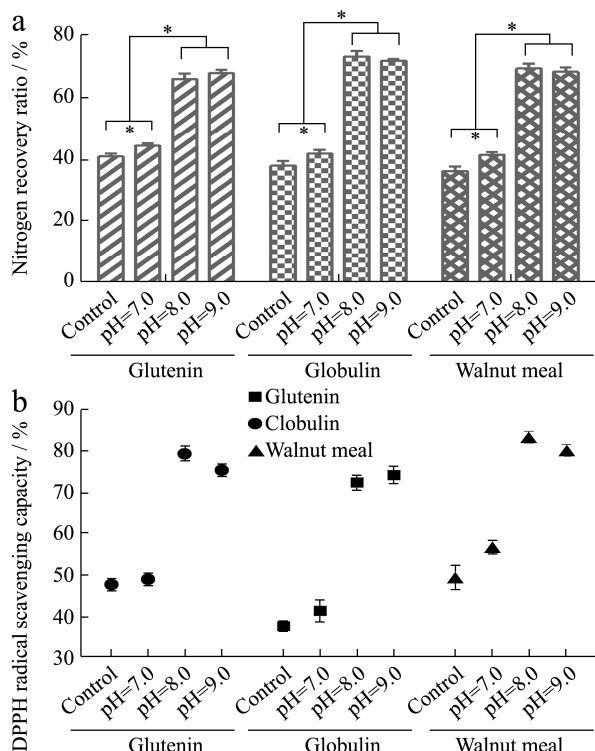


图4 不同酶解 pH 时蛋白回收率 (a) 和 DPPH·清除率 (b) 比较

Fig.4 Protein recovery rate (a) and DPPH· clearance rate (b) in different enzymatic pH

图 4 为不同 pH 值条件下三种核桃蛋白的碱性蛋白酶解液的蛋白回收率和 DPPH·清除率。如图 4a 所示, 随着 pH 升高, 三种酶解液蛋白质回收率有显著升高, 这是因为碱性蛋白酶在碱性环境中发挥较高的催化活性。由图 4b 可知, 脱脂脱酚核桃粕和核桃谷蛋白在 pH 8 条件下酶解液的 DPPH·清除率最高, 分别为 83.29%和 79.25%; 核桃球蛋白在 pH 8 和 pH 9 酶解液的 DPPH·清除率, 无显著性差异。在 pH 9 时三种酶解液 DPPH·清除率变化不大, 甚至略有下降。这可能是因为, 酶解过程中具有抗氧化活性的氨基酸残基不断暴露出来, 显示出了一定的抗氧化活性; 而水解到一定程度, 具有抗氧化活性的肽被进一步水解, 破坏了维持其抗氧化活性的结构上的完整特征, 从而

使得抗氧化能力开始逐渐减弱^[25]。谷蛋白酶解液的 DPPH·清除率高于球蛋白酶解液, 其原因可能氨基酸组成及一级结构有关。综上, 选择碱性蛋白酶在 pH 8 条件下酶解 9 h, 对脱脂脱酚核桃粕、核桃谷蛋白和核桃球蛋白分别进行酶解。

2.5 酶解液的分子量分布

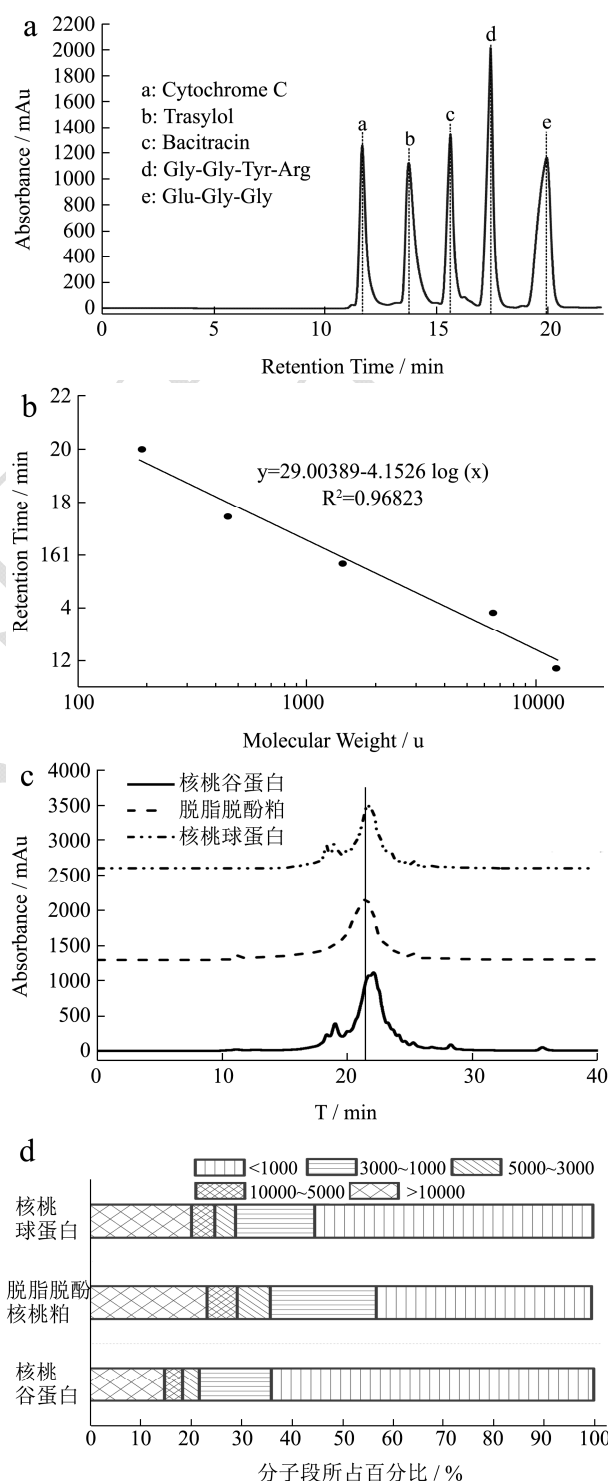


图5 酶解液的分子量分布

Fig.5 Molecular weight distribution of enzymatic hydrolyzate

分子量分布检测,是基于凝胶色谱中不同分子量的多肽分子保留时间不同,分子量较大的优先通过凝胶色谱。通过比较蛋白酶解液的分子量分布,分析分子量分布与抗氧化的关系。以细胞色素 C (a)、抑肽酶(b)、杆菌肽(c)、Gly-Gly-Tyr-Arg (d)、Gly-Gly-Gly (e)为标准品,其分子量分布如图 5a 所示。根据 5 种标准品的出峰位置计算得到分子量标准曲线 $y=29.0039-2.1526\log x$ ($R^2=0.9682$),如图 5b 所示。将最优酶解工艺条件下所得脱脂脱酚核桃粕、核桃谷蛋白、核桃球蛋白酶解产物进行分子量分布分析(图 5c),根据标准曲线计算各分子段(MW<1 ku, 1000~3000, 3000~5000, 5000~10000 及>10000)百分比(图 5d)。

三种蛋白酶解液以小分子肽居多,分布相对集中。脱脂脱酚核桃粕、核桃谷蛋白和核桃球蛋白酶解液相对分子量在 1000 以下的肽段分别占 42.73%、63.91% 和 55.10%,而三种酶解液的 DPPH·清除率分别为 83.29%、79.25%和 72.72%。推测脱脂脱酚粕 DPPH·清除率比球蛋白和谷蛋白高,可能与除酚不彻底,残留多酚黄酮类物质发挥一定的抗氧化作用有关。对比谷蛋白与球蛋白酶解液分子量分布与抗氧化的相关性发现,抗氧化活性可能与分子量小于 1000 的多肽含量有关,其含量越高抗氧化活性越好,这与张瑞^[26]等人对花生肽抗氧化活性研究结果一致。

3 结论

本研究从核桃粕中分离得到清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白等四类蛋白,对其中含量较高的谷蛋白、球蛋白以及脱脂脱酚核桃粕分别进行酶解工艺研究,分析酶解液的抗氧化活性及分子量分布特征。结果显示,脱脂脱酚核桃粕、核桃谷蛋白和核桃球蛋白经碱性蛋白酶在 pH 8 条件下分别酶解 9 h,所得酶解液的 DPPH·清除率最高;酶解液以相对分子量小于 1000 的小分子肽为主,推测其抗氧化活性可能与其小分子多肽含量有关。

参考文献

- [1] 孔令明,李芳,宗玉霞,等.酶解条件对核桃多肽抗氧化活性的影响[J].食品研究与开发,2013,34(14):106-109
- [2] KONG Ling-ming, LI Fang, ZONG Yu-xia, et al. Effect of enzymatic hydrolysis conditions on anti-oxidative activity of walnut polypeptide [J]. Food Research and Development, 2013, 34(14): 106-109
- [3] 陈金海,徐怀德,李艳伏,等.碱性蛋白酶酶解核桃粕蛋白产物抗氧化特性研究[J].西北农业学报,2010,11:88-92
- [4] CHEN Jin-hai, XU Huai-de, LI Yan-fu, et al. Study on antioxidative activities of alcalase hydrolysate of walnut proteins [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2010, 11: 88-92
- [5] 李建杰,荣瑞芬.复合酶解制备核桃多肽工艺条件的优化[J].中国油脂,2011,36(1):22-26
- [6] LI Jian-jie, RONG Rui-fen. Optimization of the preparation conditions of walnut peptides by compound enzymatic hydrolysis [J]. China Oils and Fats, 2011, 36(1): 22-26
- [7] 邓欣伦,赵强忠.核桃蛋白及其组分构象和功能特性的研究[J].现代食品科技,2017,33(1):48-53
- [8] DENG Xin-lun, ZHAO Qiang-zhong. Study on conformation and functional properties of walnut protein and its components [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(1): 48-53
- [9] Nakajima Y, Nakashima T, Inaba K, et al. Effects of nitric oxide on the redox status of liver microsomes-electron spin resonance monitoring using nitroxide probes [J]. Hepatology Research, 2002, 24(1): 72-79
- [10] Vezin H, Lamour E, Routier S, et al. Free radical production by hydroxy-salen manganese complexes studied by ESR and XANES [J]. Inorg. Biochem., 2002, 92(3): 177-182
- [11] 李艳伏,徐怀德,陈金海,等.木瓜蛋白酶酶解核桃粕蛋白产物抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2008,8(5):8-14
- [12] LI Yan-fu, XU Huai-de, CHEN Jin-hai, et al. Studies on antioxidative activity of walnut residue protein hydrolysate by papain [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(5): 8-14
- [13] Liu M-C, Yang S-J, Hong D, et al. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates [J]. Chem. Cent. J., 2016, 10(1): 39
- [14] Liao W, Lai T, Chen L, et al. Synthesis and characterization of a walnut peptides-zinc complex and its antiproliferative activity against human breast carcinoma cells through the induction of apoptosis [J]. Agric. Food. Chem., 2016, 64(7): 1509-1519
- [15] 陈永浩,王克建,郝艳宾,等.酶解方式对核桃蛋白肽及其抗氧化活性的影响[J].食品与机械,2011,5:63-67
- [16] CHEN Yong-hao, WANG Ke-jian, HAO Yan-bin, et al. Effects of different protease hydrolysis patterns on walnut protein peptide and its antioxidant activity [J]. Food & Machinery, 2011, 5: 63-67
- [17] 侯雅坤,王晟,黄昆,等.核桃蛋白酶解工艺优化与酶解液抗氧化活性分析[J].食品与发酵工业,2012,38(4): 99-103

- HOU Ya-kun, WANG Sheng, HUANG Kun, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of walnut protein and analysis of antioxidant activity of enzymatic hydrolysate [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(4): 99-103
- [12] 康玮丽,唐军虎,敬思群.酶解核桃蛋白制备抗氧化肽工艺条件优化[J].食品与发酵工业,2010,12: 94-99
- KANG Wei-li, TANG Jun-hu, JIN Si-qun. Optimization of the preparation of antioxidative peptide from walnut protein with enzymolysis technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 12: 94-99
- [13] 蒋将,朱波,刘元法,等.脱酚和碱处理对豌豆分离蛋白基本性质的影响[J].食品科学,2013,34(23):1-5
- JIANG Jiang, ZHU Bo, LIU Yuan-fa, et al. Functional properties of pea protein isolate subjected to phenol removal and alkali treatment [J]. Food Science, 2013, 34(23): 1-5
- [14] 毛晓英,华欲飞.不同提取工艺制备的核桃蛋白的组成与结构特征[J].江苏大学学报:自然科学版,2011,32(6): 631-635
- MAO Xiao-ying, HUA Yu-fei. Composition and structure characteristics of walnut proteins extracted by different techniques [J]. Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition), 2011, 32(6): 631-635
- [15] Mao X, Hua Y. Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.) [J]. Int. J. Mol. Sci., 2012, 13(2): 1561-1581
- [16] Fang Y, Catron B, Zhang Y, et al. Distribution and in vitro availability of selenium in selenium-containing storage protein from selenium-enriched rice utilizing optimized extraction [J]. Agric. Food. Chem., 2010, 58(17): 9731-9738
- [17] Wang X, Chen H, Li S, et al. Physico-chemical properties, antioxidant activities and antihypertensive effects of walnut protein and its hydrolysate [J]. Sci. Food Agric., 2016, 96(7): 2579-2587
- [18] 任娇艳,卢韵君,廖文镇,等.凝胶色谱测定核桃肽分子量方法比较[J].现代食品科技,2015,31(5):267-271
- REN Jiao-yan, LU Yun-jun, LIAO Wen-zhen, et al. Molecular comparison of gel-permeation chromatography methods to determine the weight of walnut peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 267-271
- [19] 任娇艳,张榕,杨继国,等.柴鱼蛋白肽的酶法制备、分离纯化及结构鉴定[J].现代食品科技,2015,31(9):155-161
- REN Jiao-yan, ZHANG Rong, YANG Ji-guo, et al. Enzymatic preparation, separation, and structural identification of bonito protein hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 9: 155-161
- [20] Luo W, Zhao M, Yang B, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities [J]. Food Chem., 2009, 114(2): 499-504
- [21] Zheng X-q, Liu X-l, Wang X-j, et al. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 73(4): 763-770
- [22] Sze-Tao K W C, Sathe S K. Walnuts (*Juglans regia* L.): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility [J]. Sci. Food Agric., 2000, 80(9): 1393-1401
- [23] Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein [J]. Agric. Food. Chem., 1998, 46(1): 49-53
- [24] Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. J. Agric. Food Chem., 1996, 44(9): 2619-2623
- [25] 陈山,杨晓泉,郭祀远,等.大豆肽超滤分离纯化过程的研究[J].食品与发酵工业,2003,29(1):49-52
- CHEN Shan, YANG Xiao-quan, GUO Si-yuan, et al. Study on UF process for the separation and purification of soy peptide [J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(1): 49-52
- [26] 张瑞,范远景,陈伟,等.花生活性肽的分子量分布及抗氧化活性研究[J].安徽农业科学,2012,40(21):11041-11043
- ZHANG Rui, FAN Yuan-jing, CHEN Wei, et al. Study on the molecular weight composition and antioxidant activity of peanut bioactive peptides [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(21): 11041-11043