

核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的分离纯化及稳定性研究

张丽娜, 孔祥珍, 华欲飞

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:采用 5 种商业蛋白酶水解核桃粕, 评估水解物对二肽基肽酶 4(DPP-IV) 的抑制活性, 优选出碱性蛋白酶作为水解用酶。研究确定了碱性蛋白酶水解核桃粕的最佳水解时间为 5 h, 然后通过超滤和 SP Sephadex C-25 阳离子交换树脂柱层析分离纯化碱性蛋白酶水解物得到核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽, 并对所得 DPP-IV 抑制肽的热稳定性、pH 稳定性和模拟胃肠道消化稳定性进行了测试。结果表明, 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽(0.25 mg/mL) DPP-IV 抑制率(76.19%) 比未分离纯化的水解物的提高了约 3 倍, 其富含碱性氨基酸(含量 34.36%), 尤其是精氨酸含量高达 25.93%。核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽在高温(121 °C)、极端 pH(pH 1.0 和 pH 11.0) 和模拟胃肠道消化条件下, 均显示出良好的稳定性, 因此可用作控制血糖的功能性食品成分。

关键词:核桃粕; 核桃肽; DPP-IV 抑制活性; 核桃蛋白水解物; 纯化; 稳定性

中图分类号: TS229; TQ93

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)11-0062-06

Purification and stability of walnut protein DPP-IV inhibitory peptides

ZHANG Lina, KONG Xiangzhen, HUA Yufei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Five proteases were used to hydrolyze walnut meal, and the DPP-IV inhibitory activities of the enzymatic hydrolysates were evaluated. According to the DPP-IV inhibitory activity, Alcalase was selected as the enzyme for hydrolysis. The optimal hydrolysis time for Alcalase was determined as 5 h. Then the Alcalase-derived hydrolysate was purified by ultrafiltration and SP-Sephadex C-25 cation exchange column chromatography to obtain DPP-IV inhibitory peptides. The thermal stability, pH stability and gastrointestinal digestive stability of the DPP-IV inhibitory peptide were determined. The results showed that the DPP-IV inhibitory activity(76.19%, 0.25 mg/mL) of the obtained peptide increased by about 3 times compared with the hydrolysate. The DPP-IV inhibitory peptide was rich in basic amino acids, accounting for 34.36%, and the content of arginine was as high as 25.93%. The DPP-IV inhibitory peptide showed good stability under high temperature (121 °C), extreme pH (pH 1.0 and pH 11.0) and gastrointestinal digestion conditions, so it could be used as a natural functional ingredient in foods for blood sugar control.

Key words: walnut meal; walnut peptide; DPP-IV inhibitory activity; walnut protein hydrolysate; purification; stability

糖尿病是世界上最普遍和发展最快的慢性代谢

疾病之一, 其中 2 型糖尿病占 90% ~ 95%^[1-2]。二肽基肽酶 4(DPP-IV) 抑制剂是针对 2 型糖尿病的最新治疗方法^[3]。肠促胰岛素包括胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP), 具有维持血糖稳态的作用。DPP-IV 是一种普遍存在的酶, 可以降解肠促胰岛素, 引起血糖控

收稿日期: 2020-01-18; 修回日期: 2020-06-22

作者简介: 张丽娜(1995), 女, 硕士研究生, 研究方向为油脂与植物蛋白 (E-mail) alina0506@126.com。

通信作者: 孔祥珍, 副教授, 博士 (E-mail) xzkong@jiangnan.edu.cn。

制水平的紊乱^[4]。因此,通过抑制 DPP-IV 的活性来防止内源性肠促胰岛素的降解,从而可以更好地实现血糖调节。目前,许多天然的食物蛋白质,例如牛奶、燕麦、大米和鲑鱼等,都是 DPP-IV 抑制肽的良好来源^[5-8]。

核桃粕是核桃油提取过程的副产物,含有丰富的蛋白质,被认为是生产生物活性肽的潜在来源^[9]。为了充分利用核桃的蛋白质资源,创造高附加值产品,将核桃粕在蛋白酶作用下水解,以提供更具市场价值的核桃蛋白水解物,赋予其对人类健康有益的功能特性。据报道,通过蛋白酶水解产生的核桃蛋白水解物具有多种生物活性,包括抗氧化性、ACE 抑制活性、抗高尿酸活性、抗增殖活性和神经保护活性等^[10-13]。但迄今为止,尚未报道核桃蛋白水解物的 DPP-IV 抑制活性。因此,研究核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽具有巨大的潜力。

本文首先研究了由 5 种商业蛋白酶水解的核桃蛋白水解物的 DPP-IV 抑制活性,选择制备 DPP-IV 抑制肽的最适水解酶,通过超滤结合离子交换层析分离纯化高活性 DPP-IV 组分。随后,研究了温度、pH 和模拟胃肠道消化对核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽活性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

核桃粕,晨光生物科技集团股份有限公司;碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶,诺维信(中国)生物技术有限公司;二肽基肽酶 4(DPP-IV)、甘氨酸-脯氨酸-对硝基苯胺(Gly-Pro-PNA),Sigma 公司;SP Sephadex C-25 阳离子交换树脂柱,GE 公司;乙腈,色谱纯;盐酸、冰醋酸、氢氧化钠、氯化钠、乙酸钠、甘氨酸、三羟基氨基甲烷、三氟乙酸,均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

SC-15 智能节能恒温槽, HimacCR-21G 型冷冻离心机, D-2000 Elite 高效液相色谱仪, SCIENTZ-10ND 冷冻干燥机, Enspire 型多功能酶标仪, Agilent 1100 型全自动氨基酸分析仪, 赛普膜分离装置。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白的酶法水解

将核桃粕按料液比 1:10 分散在去离子水中,温育至每种蛋白酶的最适温度,酶添加量为 2%,所有反应均在每种酶的最适 pH 下水解 5 h(最适水解条件见表 1)。水解结束后调节 pH 至中性,100℃加热 10 min 灭酶,然后冰水浴冷却至 4℃,再在 9 000

r/min 下离心 20 min,取上清液冷冻干燥,得核桃蛋白水解物,-20℃保存。

表 1 不同酶的最适水解条件

蛋白酶	pH	温度/℃
碱性蛋白酶	9.0	55
复合蛋白酶	7.5	50
中性蛋白酶	7.0	50
风味蛋白酶	7.5	45
胰蛋白酶	7.0	37

1.2.2 水解度的测定

核桃蛋白的水解度按照 pH-stat 方法测定^[14],记录水解过程中 NaOH 的添加量,按下式计算水解度(D)。

$$D = B \times c_b / (\alpha \times m_p \times h_{tot}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: B 为 NaOH 消耗量, mL; c_b 为 NaOH 的浓度, mol/L; m_p 为核桃蛋白的质量, g; h_{tot} 为核桃蛋白肽键总数, mmol/g(核桃蛋白 $h_{tot} = 7.35$ mmol/g); α 为 α -氨基的解离度。

1.2.3 Tricine-SDS-PAGE 分析

参考 Schagger^[15] 的方法。取适量样品与样品溶解液混合,稀释至蛋白质量浓度为 2 mg/mL,还原电泳需加入 20 μ L 1 mol/L DTT 煮沸 5 min,上样 10 μ L。浓缩胶 4%、分离胶 16%,样品在浓缩胶中电压为 30 V,进入分离胶调整电压为 100 V,直至电泳结束。将所得凝胶固定、染色和脱色,然后用凝胶成像仪扫描拍照。

1.2.4 DPP-IV 抑制率的测定

根据 Zhang 等^[16] 的方法测定。在 96 微孔板中,将 25 μ L 一定质量浓度的样品(溶解在 pH 8.0、100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中)与 25 μ L Gly-Pro-PNA(1.6 mmol/L)混合,在 37℃ 孵育 10 min,加入 50 μ L DPP-IV(8 U/L),于 37℃ 反应 60 min,然后添加 100 μ L 乙酸钠缓冲液(1 mol/L, pH 4.0)中止反应,于 405 nm 处测量吸光度。以 Tris-HCl 缓冲液代替 DPP-IV 溶液作为空白组,以 Tris-HCl 缓冲液代替样品作为对照组测量吸光度。按下式计算 DPP-IV 抑制率(Y)。

$$Y = \frac{1 - A_s - A_b}{A_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_s 、 A_b 和 A_c 分别为样品组、空白组和对照组的吸光度。

1.2.5 DPP-IV 抑制肽的分离纯化

1.2.5.1 超滤

将碱性蛋白酶水解物冻干样品溶于去离子水配制成 50 mg/mL 溶液,依次通过 10 kDa 和 5 kDa 的

超滤膜,收集不同相对分子质量(>10 kDa、 $5\sim 10$ kDa、 <5 kDa)的肽组分,冷冻干燥并保存在 -20°C 下,测定不同组分的 DPP-IV 抑制率。

1.2.5.2 阳离子交换层析

SP Sephadex C-25 阳离子交换树脂柱用 50 mmol/L 乙酸钠缓冲液($\text{pH } 4.0$)平衡,将超滤后冻干的小于 5 kDa 的组分用 10 mmol/L 乙酸缓冲液($\text{pH } 4.0$)配成质量分数 10% 的溶液后上样,首先收集未吸附的组分 A,然后用含 2 mol/L NaCl 的醋酸缓冲液洗脱,收集组分 B,将 A、B 组分分别浓缩,并用截留相对分子质量为 100 Da 的透析袋在去离子水中透析 48 h ,冷冻干燥并保存在 -20°C 下,测定不同组分的 DPP-IV 抑制率及氨基酸组成。氨基酸组成分析参考王俊强等^[17]的方法,采用 OPA FMOC 柱前衍生,通过氨基酸自动分析仪进行测定。

1.2.6 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的稳定性分析

1.2.6.1 热稳定性

将核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽溶于去离子水中配制成 5 mg/mL 的肽溶液,分别在 37 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100°C 和 121°C 加热 30 min 后,冷却到室温,以未加热(25°C)的样品作为对照组,测定其 DPP-IV 抑制率,并表示为相对于对照组的活性。

1.2.6.2 pH 稳定性

用 2 mol/L HCl 或 NaOH 将按 1.2.6.1 配制的 5 mg/mL 肽溶液的 pH 分别调节为 1 、 3 、 5 、 7 、 9 和 11 ,在室温下孵育 30 min 。调节样品溶液 pH 至 7.0 ,测定其 DPP-IV 抑制率,并表示为相对于对照组(未经任何处理)的活性。

1.2.6.3 体外模拟胃肠道消化稳定性

将按 1.2.6.1 配制的 5 mg/mL 肽溶液调节 pH 至 2.0 ,加入 2% 胃蛋白酶,在 37°C 下孵育 120 min ,模拟胃消化。然后将混合物 pH 调节至 6.8 ,加入 2% 胰酶,在 37°C 下孵育 120 min ,模拟肠消化。在体外消化过程中,分别在 0 、 0.5 、 1 、 2 、 2.5 、 3 、 4 h 取样,将取得的样品快速放入沸水浴中 10 min ,测定其 DPP-IV 抑制率。

1.2.7 数据处理

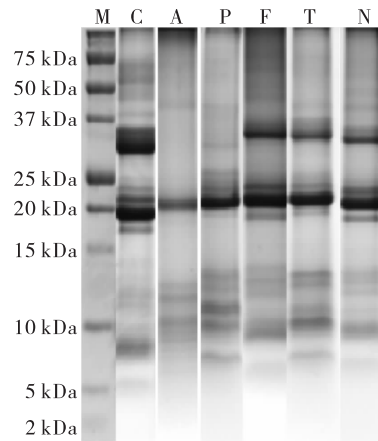
所有实验数据用 SPSS Statistics Base 17.0 和 OriginPro 8.5 分析处理。

2 结果与分析

2.1 核桃蛋白酶法水解条件的确定

2.1.1 蛋白酶的筛选

按照 1.2.1 方法,采用 5 种蛋白酶对核桃蛋白进行水解,对所得核桃蛋白水解物进行 Tricine-SDS-PAGE 分析,结果见图 1。

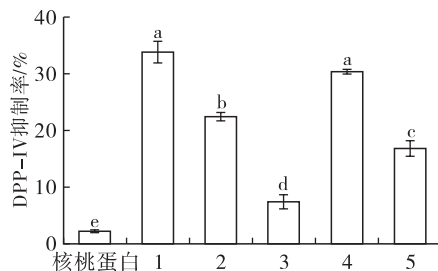


注:M. Marker;C. 核桃蛋白;A、P、F、T、N 分别为碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶水解物。

图 1 不同核桃蛋白水解物的 Tricine-SDS-PAGE 图

由图 1 可看出,核桃蛋白在相对分子质量 $8.0\sim 75.0\text{ kDa}$ 范围内观察到 13 条明显的条带(泳道 C),不同蛋白酶水解过程中,高相对分子质量的条带被水解成低相对分子质量的新条带,核桃蛋白碱性蛋白酶水解物的蛋白条带降解最大,其次是复合蛋白酶水解物,而对于风味蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶水解物,核桃蛋白条带都显示出较小的降解。

图 2 为核桃蛋白及其 5 种蛋白酶水解物(0.5 mg/mL)的 DPP-IV 抑制活性。



注:1、2、3、4、5 分别为核桃蛋白碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶水解物;不同字母表示有显著差异($P < 0.05$)。

图 2 不同蛋白酶水解物(0.5 mg/mL)的 DPP-IV 抑制率

由图 2 可看出,核桃蛋白表现出极低的 DPP-IV 抑制活性,DPP-IV 抑制率小于 5% ,而 5 种蛋白酶水解物的 DPP-IV 抑制活性显著高于核桃蛋白。碱性蛋白酶水解物表现出最高的 DPP-IV 抑制活性,其次是胰蛋白酶水解物,二者无显著差异,但均显著高于复合蛋白酶、风味蛋白酶和中性蛋白酶水解物,与 Zhang 等^[5]报道的胰蛋白酶处理的牛/山羊酪蛋白水解物具有较高的 DPP-IV 抑制活性结果一致。综上,选择碱性蛋白酶水解核桃粕。

2.1.2 水解时间的选择

按照 1.2.1 方法,采用碱性蛋白酶分别水解核桃粕 1 、 2 、 3 、 4 、 5 h ,测定不同水解时间下核桃蛋白水

解度及水解物的 DPP-IV 抑制活性,结果见图 3。

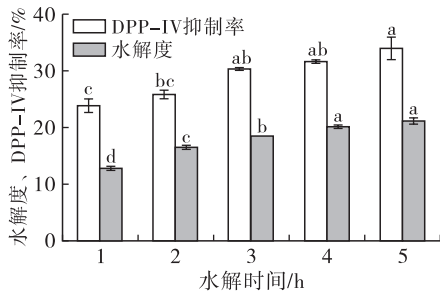


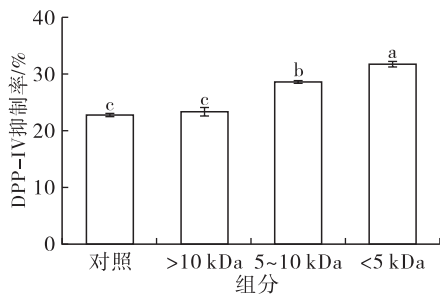
图3 不同水解时间下核桃蛋白水解度及水解物(0.5 mg/mL)的 DPP-IV 抑制率

由图3可看出,随着水解时间的延长,水解度增大,DPP-IV抑制活性不断提高,水解5 h时,核桃蛋白水解物的水解度、DPP-IV抑制率基本保持不变。因此,选择水解5 h的核桃蛋白碱性蛋白酶水解物进行后续研究。

2.2 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的分离纯化

2.2.1 超滤分离组分的 DPP-IV 抑制活性

碱性蛋白酶水解物经超滤分离的3个不同相对分子质量肽组分的 DPP-IV抑制活性如图4所示。



注:对照为碱性蛋白酶水解物。

图4 碱性蛋白酶水解物超滤分离组分(0.25 mg/mL)的 DPP-IV 抑制率

由图4可看出,超滤获得的3个肽组分均表现出 DPP-IV抑制活性,与核桃蛋白碱性蛋白酶水解物相比,5~10 kDa 和小于5 kDa 组分显示出更强的 DPP-IV抑制活性,在0.25 mg/mL的质量浓度下其 DPP-IV抑制率分别为28.65%和31.71%,而大于10 kDa 组分与核桃蛋白碱性蛋白酶水解物没有显著差异。因此,将具有较高 DPP-IV抑制活性的小于5 kDa 组分冻干,用于 SP Sephadex C-25 阳离子交换层析进一步纯化。

2.2.2 阳离子交换层析各组分的 DPP-IV 抑制活性

采用1.2.5.2方法由碱性蛋白酶水解物小于5 kDa 组分进一步分离得到的组分 A 和 B 的 DPP-IV抑制活性测定结果见图5,氨基酸组成及含量见表2。

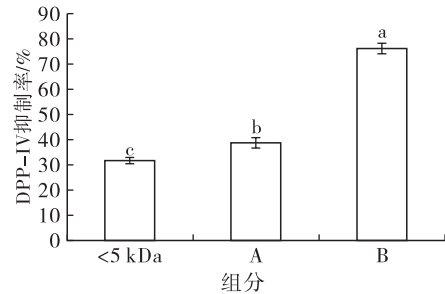


图5 阳离子交换层析各组分(0.25 mg/mL)的 DPP-IV 抑制率

由图5可看出,在0.25 mg/mL的质量浓度下,组分 B 的 DPP-IV抑制率为76.19%,显著高于组分 A (38.94%),比未分离的碱性蛋白酶水解物的高约3倍。

表2 阳离子交换层析各组分的氨基酸组成及含量 %

氨基酸	碱性蛋白酶水解物	组分 A	组分 B
天冬氨酸(Asp)	10.73	13.28	7.36
谷氨酸(Glu)	22.69	27.69	17.36
丝氨酸(Ser)	4.46	5.22	4.05
组氨酸(His)	2.23	1.11	4.31
甘氨酸(Gly)	4.60	4.83	3.95
苏氨酸(Thr)	3.62	4.64	2.08
精氨酸(Arg)	12.78	5.01	25.93
丙氨酸(Ala)	4.97	5.14	3.60
酪氨酸(Tyr)	4.50	2.55	4.07
半胱氨酸(Cys)	0.56	0.48	0.52
缬氨酸(Val)	5.31	5.79	4.27
甲硫氨酸(Met)	1.40	2.15	0.93
苯丙氨酸(Phe)	4.60	3.99	4.83
异亮氨酸(Ile)	4.21	4.20	4.02
亮氨酸(Leu)	7.18	7.85	5.82
赖氨酸(Lys)	2.65	1.35	4.12
脯氨酸(Pro)	3.50	4.73	2.78
疏水氨基酸	31.17	33.85	26.25
酸性氨基酸	33.42	40.97	24.72
碱性氨基酸	17.66	7.47	34.36

由表2可看出,碱性蛋白酶水解物的主要氨基酸是谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸。碱性蛋白酶水解物、组分 A 和组分 B 含有的疏水性氨基酸比例分别为31.17%、33.85%和26.25%,酸性氨基酸比例分别为33.42%、40.97%和24.72%,碱性氨基酸比例分别为17.66%、7.47%和34.36%。与碱性蛋白酶水解物和组分 A 相比,组分 B 含有较高含量的碱性氨基酸,尤其是精氨酸。在阳离子交换过程中,带负电(Asp 和 Glu)的多肽未被吸附,带正电(Arg、His 和 Lys)的多肽吸附后被洗脱^[18],所以组分 A 含有高含量的酸性氨基酸,组分 B 含有大量碱性氨基酸。

综上,选择组分 B 作为最终的核桃蛋白 DPP-IV抑制肽并进行稳定性分析。

2.3 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的稳定性

2.3.1 热稳定性(见图 6)

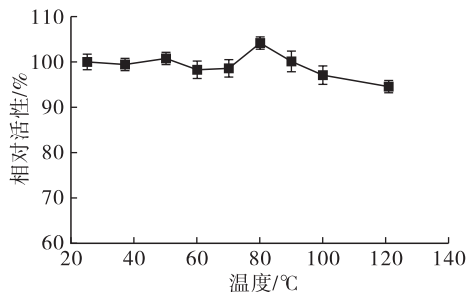


图 6 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的热稳定性

由图 6 可看出,分离纯化得到的 DPP-IV 抑制肽经过不同温度处理后,仍保持较高的 DPP-IV 抑制活性。值得注意的是,在 80 °C 加热 30 min,核桃肽的 DPP-IV 抑制活性提高了约 4%,121 °C 处理 30 min, DPP-IV 抑制活性损失了约 5%,结果表明核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽具有较好的热稳定性,可以应用到热处理食品中。

2.3.2 pH 稳定性(见图 7)

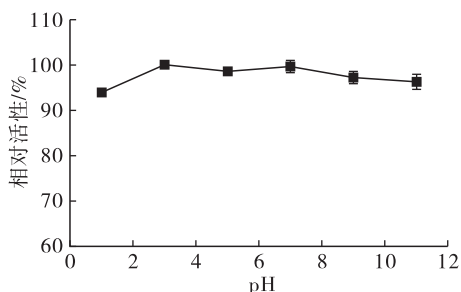


图 7 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的 pH 稳定性

由图 7 可看出,在强酸(pH 1.0)和强碱(pH 11.0)条件下,核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的 DPP-IV 抑制活性略有损失,这可能是由于抑制肽在酸性或碱性过强的条件下降解成非活性片段^[19]。核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的活性在 pH 3.0~9.0 范围内十分稳定,表明核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽可以应用到宽 pH 范围的食物体系中,并保留其生物活性。

2.3.3 体外模拟胃肠道消化稳定性(见图 8)

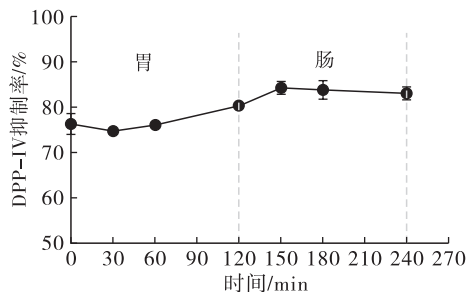


图 8 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的体外模拟胃肠消化稳定性

为了使生物活性肽在体内发挥其活性,要满足的要求之一是能抵抗胃肠道消化和降解的能力,通

过肠道能够被完整吸收。体外模拟胃肠道消化可用于研究生物活性肽在体内的生物利用度。由图 8 可看出,在胃环境中消化 30 min,核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的 DPP-IV 抑制率由 76.19% 降低至 73.29%,但随着消化的继续进行, DPP-IV 抑制活性有所提高,在十二指肠环境中, DPP-IV 抑制活性继续提高并趋于稳定。我们推测在胃肠道消化后,可能产生了一些新的活性肽,这些肽具有较高的 DPP-IV 抑制活性,因此 DPP-IV 抑制率有所增加。有研究报道,相对分子质量较小的短链肽通常对胃肠道酶具有抵抗力,对胃肠道消化实验显示出非常稳定的活性^[20]。本研究结果表明,在模拟胃肠道消化过程中,核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的活性结构并没有被胃肠道蛋白酶破坏,其活性得到很好的保留。

3 结论

采用蛋白酶水解核桃粕中的蛋白质,经分离纯化得到 DPP-IV 抑制肽,研究了 DPP-IV 抑制肽的稳定性。结果表明,碱性蛋白酶水解物经过超滤和阳离子交换层析分离后得到的核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽,在 0.25 mg/mL 的质量浓度下, DPP-IV 抑制率为 76.19%,其 DPP-IV 抑制活性在宽温度和 pH 范围内保持稳定,且在模拟胃肠道系统中,消化后的 DPP-IV 抑制活性有所提高。本文研究结果为食源 DPP-IV 抑制活性肽作为人体降血糖功能膳食的开发利用提供了基础。本课题组后续将进一步研究 DPP-IV 抑制肽结构与活性的关系,并评估其抑制模式和体内功效。

参考文献:

- [1] CHATTERJEE S, KHUNTI K, DAVIES M J. Type 2 diabetes[J]. Lancet, 2017, 389: 2239-2251.
- [2] XU F R, YAO Y J, XU X Y, et al. Identification and quantification of DPP-IV-inhibitory peptides from hydrolyzed-rapeseed-protein-derived napin with analysis of the interactions between key residues and protein domains[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67: 3679-3690.
- [3] BOWER A M, REAL HERNANDEZ L M, BERHOW M A, et al. Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62: 6147-6158.
- [4] CASANOVA-MARTI A, BRAVO F I, SERRANO J, et al. Antihyperglycemic effect of a chicken feet hydrolysate via the incretin system: DPP-IV-inhibitory activity and GLP-1 release stimulation[J]. Food Funct, 2019(10): 4062-4070.
- [5] ZHANG Y, CHEN R, ZUO F L, et al. Comparison of

- dipeptidyl peptidase IV – inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses[J]. *Int Dairy J*, 2016, 53:37–44.
- [6] WANG F, YU G Y, ZHANG Y Y, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), and highland barley (*Hordeum vulgare trifurcatum* (L.) Trofim) proteins[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63:9543–9549.
- [7] HATANAKA T, INOUE Y, ARIMA J, et al. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran[J]. *Food Chem*, 2012, 134:797–802.
- [8] ZHANG Y, CHEN R, CHEN X L, et al. Dipeptidyl peptidase IV – inhibitory peptides derived from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) proteins[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 831–839.
- [9] 珠娜,李勇. 核桃肽生物活性的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(12):58–62.
- [10] SHENG J Y, YANG X Y, CHEN J T, et al. Antioxidative effects and mechanism study of bioactive peptides from defatted walnut (*Juglans regia* L.) meal hydrolysate[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 3305–3312.
- [11] LIU M, DU M, ZHANG Y C, et al. Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from walnut protein[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61:4097–4100.
- [12] YANG X, SUN J, TAO J M, et al. The allergenic potential of walnuts treated with high pressure and heat in a mouse model of allergy[J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2017, 39: 165–170.
- [13] LIU M C, YANG S J, YANG J P, et al. Neuroprotective and memory – enhancing effects of antioxidant peptide from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. *Nat Prod Commun*, 2019, 14(7):1–13.
- [14] ADLER – NISSEN J. *Enzymic hydrolysis of food proteins* [M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 110–125.
- [15] SCHAGGER H. Tricine – SDS – PAGE[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 16–22.
- [16] ZHANG Y, CHEN R, MA H, et al. Dipeptidyl peptidase IV – inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin – treated goat milk casein hydrolysates by 2D – TLC and LC – MS/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63:8819–8828.
- [17] 王俊强,孔祥珍,华欲飞. 大豆肽钙螯合物的制备、稳定性及表征[J]. *中国油脂*, 2019, 44(10):46–50.
- [18] SONG W G, KONG X Z, HUA Y F, et al. Antioxidant and antibacterial activity and in vitro digestion stability of cottonseed protein hydrolysates [J]. *LWT – Food Sci Technol*, 2020, 118:108724.
- [19] FU Y, YOUNG J F, DALSGAARD T K, et al. Separation of angiotensin I – converting enzyme inhibitory peptides from bovine connective tissue and their stability towards temperature, pH and digestive enzymes [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2015, 50:1234–1243.
- [20] MAHMOODANI F, GHASSEM M, BABJI A, et al. ACE inhibitory activity of pangasius catfish (*Pangasius sutchi*) skin and bone gelatin hydrolysate [J]. *J Food Sci Tech*, 2014, 51:1847–1856.

(上接第39页)

L^* 、 a^* 、 b^* 值均降低,仁碱化粉 a^* 值大于粉碱化粉;加压碱化可以大大提高碱化效率,在120℃下,施加0.1 MPa压力时,仁碱化粉与粉碱化粉的 ΔE 分别比未施加压力时提高了253%与73%;碱液质量浓度越高,碱化粉的 a^*/b^* 值越高,红色色调增加,高浓度的碱液有助于碱化粉增强红色色调。

参考文献:

- [1] 杨珊. 可可粉的质量标准研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2013.
- [2] 余诗庆,杜传来. 我国可可粉的应用和生产现状、问题分析与对策[J]. *安徽科技学院学报*, 2005, 19(4):24–30.
- [3] GUTIÉRREZ T J. State of the art chocolate manufacture: a review[J]. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, 2017, 16(15):1313–1344.
- [4] WELLS M A. Industrial chocolate manufacture and use [J]. *Trends Food Sci Technol*, 1999, 10(8):278.
- [5] BONVEHÍ J S, COLL F V. Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalinized cocoa powder[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(13):3743–3750.
- [6] RODRÍGUEZ P, PÉREZ E, GUZMÁN R. Effect of the types and concentrations of alkali on the color of cocoa liquor[J]. *J Sci Food Agric*, 2009, 89(7):1186–1194.
- [7] BECKETT S T. *Industrial chocolate manufacture and use* [M]. New York: Springer US, 1994.
- [8] 佚名. 可可粉的特性与应用[J]. *中国食品工业*, 1997(12):14,16.
- [9] 冯芸. 可可仁/粉碱化工艺的研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2008.
- [10] BODART M, DE PENARANDA R, DENEYER A, et al. Photometry and colorimetry characterisation of materials in day lighting evaluation tools[J]. *Building Environ*, 2008, 43(12):2046–2058.
- [11] MOSER A. Alkalinizing cocoa and chocolate[J]. *Manufacturing Confectioner*, 2015, 7:31–38.
- [12] PABLO R, ELEVINA P, ROMEL G. Effect of the types and concentrations of alkali on the color of cocoa liquor [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 89(7):1186–1194.