

# 云南 3 个主栽品种核桃多肽的制备 及体外抗氧化活性的研究

谢晋祥<sup>1</sup>, 耿树香<sup>2</sup>, 宁德鲁<sup>2</sup>, 庄永亮<sup>1</sup>, 王 玺<sup>2</sup>

(1. 昆明理工大学 食品科学与工程学院, 昆明 650500; 2. 云南省林业和草原科学院,  
云南省木本油料工程技术研究中心, 昆明 650500)

**摘要:**为提高云南核桃饼粕附加值,选取云南 3 个主栽品种深纹核桃(漾泡、三台和细香),采用碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶对 3 个品种的脱脂核桃粕粉进行水解制备核桃多肽,对核桃多肽进行模拟胃肠消化,研究核桃多肽及其体外消化产物的抗氧化活性,并对核桃多肽的基本成分、分子质量分布和氨基酸组成进行分析。结果表明:碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的抗氧化能力显著高于木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶水解制备的,而碱性蛋白酶水解制备的 3 个不同品种核桃多肽的抗氧化活性无显著差异,其中漾泡、三台和细香核桃多肽的 DPPH 自由基清除率分别为 71.34%、71.26% 和 71.82%, ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率分别为 82.41%、81.23% 和 82.86%;在经过模拟胃肠消化后,碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的 DPPH 自由基清除率和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率均有所上升,且其中分子质量小于 1 000 Da 的小分子多肽组分含量增高;碱性蛋白酶水解制备的漾泡、三台和细香核桃多肽的蛋白质含量均高于 50%,必需氨基酸含量分别为 122.58、122.84 mg/g 和 139.19 mg/g,且与抗氧化活性相关的疏水性氨基酸含量较高。综上,云南 3 种深纹核桃漾泡、三台和细香均适用于碱性蛋白酶水解核桃蛋白进行抗氧化相关功能食品的研发。

**关键词:**云南核桃;主栽品种;核桃饼粕;核桃多肽;抗氧化活性

中图分类号:TS229;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)02-0051-07

## Preparation and *in vitro* antioxidant activity of polypeptides from three main walnut cultivars in Yunnan

XIE Jinxiang<sup>1</sup>, GENG Shuxiang<sup>2</sup>, NING Delu<sup>2</sup>, ZHUANG Yongliang<sup>1</sup>, WANG Xi<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology,  
Kunming 650500, China; 2. Woody Oil, Engineering Technology Research Center of Yunnan Province,  
Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming 650500, China)

**Abstract:** In order to improve the added value of walnut cake and meal in Yunnan, three main *Juglans sigillata* D. cultivars (Yangpao walnut, Santai walnut and Xixiang walnut) in Yunnan were selected, and alkaline protease, papain and bromelain were used to hydrolyze the defatted walnut meal powder of the three cultivars to prepare walnut polypeptides. Simulated gastrointestinal digestion of the walnut polypeptides was carried out, and the antioxidant activity of the walnut polypeptides and their *in vitro* digestion products were studied. The basic components, molecular weight distribution and amino acid

composition of the walnut polypeptides were analyzed. The results showed that the antioxidant activity of walnut polypeptides prepared by alkaline protease hydrolysis was significantly higher than that prepared by papain and bromelain, while there was no significant difference in the antioxidant activity of three cultivars of walnut polypeptides prepared by alkaline protease

收稿日期:2023-09-11;修回日期:2024-10-03

基金项目:科技人才与平台计划专家工作站项目(202305AF150025);云南省重大科技专项计划项目(202202AE090007)

作者简介:谢晋祥(1999),男,硕士研究生,研究方向为植物蛋白工程(E-mail)spxiejinxiang@163.com。

通信作者:耿树香,研究员(E-mail)1016430670@qq.com。

hydrolysis. The DPPH free radical scavenging rates of Yangpao walnut, Santai walnut and Xixiang walnut polypeptides prepared by alkaline protease hydrolysis were 71.34%, 71.26% and 71.82%, respectively and the ABTS<sup>+</sup> radical scavenging rates were 82.41%, 81.23% and 82.86%, respectively. After simulated gastrointestinal digestion, the DPPH free radical scavenging rates and ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging rates of three cultivars of walnut polypeptides prepared by alkaline protease hydrolysis increased, and the content of small molecular polypeptides components with molecular weight less than 1 000 Da increased. The protein contents of Yangpao walnut, Santai walnut and Xixiang walnut polypeptides prepared by alkaline protease hydrolysis were higher than 50%, the essential amino acid contents were 122.58, 122.84 mg/g and 139.19 mg/g, respectively, the content of hydrophobic amino acids related to antioxidant activity were higher. In summary, the three cultivars of *Juglans sigillata* D. Yangpao, Santai and Xixiang in Yunnan are suitable for the research and development of antioxidant-related functional foods by alkaline protease hydrolysis of walnut protein.

**Key words:** Yunnan walnut; main cultivar; walnut cake and meal; walnut polypeptides; antioxidant activity

核桃饼粕是核桃油加工后的副产品,通常用作动物饲料或肥料,未对其中的蛋白质等营养物质进行充分利用,造成了严重的资源浪费。核桃蛋白中含有 18 种氨基酸,并富含人体所需的 8 种必需氨基酸,是生产生物活性肽的优质原料<sup>[1]</sup>。目前多肽的制备方法主要分为直接分离提取法、酶解法、化学合成法和发酵法<sup>[2]</sup>。酶解法是一种常用的制备活性肽的方法,其原理为利用酶催化蛋白质中的肽键水解,将有活性的肽段从蛋白质内部释放出来。该方法条件温和、操作简单、酶解过程易控制,能较好地保留活性肽的生物活性以及营养价值<sup>[3]</sup>。目前关于核桃蛋白和核桃多肽的制备以及生物活性研究已有大量报道,但研究的核桃品种大多来自新疆、山西、吉林等地,且关于漾濞大泡核桃的研究较多,而关于云南主栽核桃品种分析较少。

云南 3 个主栽深纹核桃(漾泡、三台、细香)的栽培面积达 200 多万  $\text{hm}^2$ ,分别占云南省核桃种植面积的 70% 和全国核桃种植面积的 20%,具有较好的区域代表性。本文选择漾泡、三台和细香 3 种云南主栽核桃品种,采用酶解法水解脱脂核桃粕粉制备核桃多肽,通过对核桃多肽及其模拟胃肠消化产物 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力的比较,筛选出适用于云南核桃生产抗氧化肽的蛋白酶,并对核桃多肽的成分进行分析,以期为云南核桃抗氧化肽产品的研发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

漾泡核桃仁,2022 年 10 月购于大理漾濞;三台

核桃仁,2022 年 10 月购于楚雄大姚;细香核桃仁,2022 年 11 月购于保山昌宁;木瓜蛋白酶(10 万 U/g)、菠萝蛋白酶(10 万 U/g)、碱性蛋白酶(20 万 U/g),郑州百思特健康科技有限公司;胃蛋白酶(USP 级,1:30 000)、胰蛋白酶(USP 级,1:250)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海源叶生物科技有限公司;氢氧化钠、盐酸、过硫酸钾、石油醚(沸程 60~90℃),天津市风船化学试剂科技有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

HB2000 型核桃仁去皮机,山东省诸城市华邦机械有限公司;6YY-280 型液压全自动榨油机,沂水阳东机械有限公司;CSJ-200 高效粗碎机,江阴市鹭燕机械制造有限公司;THZ-82 型水浴恒温振荡器、TD-4 低速离心机,常州澳华仪器有限公司;LGJ-50FD 真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;U-5100UV/VIS 紫外可见分光光度计、L-8900 氨基酸自动分析仪,日本日立公司;Kjeltec 8400 全自动凯氏定氮仪,福斯分析仪器(苏州)有限公司;Waters 2695 高效液相色谱仪;伍丰 LC-100 高效液相色谱仪。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 脱脂核桃粕粉的制备

将核桃仁在 40℃ 温水中浸泡 20 min,然后取出放入核桃仁去皮机中去除核桃仁内种皮,将得到的去皮核桃仁 40℃ 烘干,使用液压全自动榨油机将去皮核桃仁在 40 MPa 下持续压榨 2 h,重复 2 次,将压榨后的核桃饼粉碎过 0.425 mm(40 目)筛,得到 3

种核桃饼细粉。取一定量核桃饼细粉按质量比1:5加入石油醚,室温振荡提取1 h,抽滤,收集残渣,重复提取2次,将残渣置于40℃烘箱挥发干溶剂,得到脱脂核桃粕粉。

### 1.2.2 核桃多肽的制备

准确称取10 g脱脂核桃粕粉,加入200 mL超纯水,以3 mol/L HCl以及1 mol/L NaOH调节pH至所用蛋白酶的最适pH,随后按照酶与底物质量比1:30加入蛋白酶,在蛋白酶的最适温度下恒温水浴振荡4 h,沸水浴灭酶活15 min,3 500 r/min离心20 min后取上清,冷冻干燥得到核桃多肽,将其粉碎后于-20℃储藏备用。不同蛋白酶的最适pH和最适温度:碱性蛋白酶最适温度50℃,最适pH 9.5;木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶最适温度55℃,最适pH 7.0。

### 1.2.3 核桃多肽水解度的测定

根据文献[4]的方法,使用全自动凯氏定氮仪测定核桃蛋白酶解液中蛋白质含量,使用茚三酮比色法测定游离氨基(-NH<sub>2</sub>)含量。根据式(1)计算核桃多肽的水解度(D)。

$$D = \frac{B}{N \times h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:B为核桃蛋白酶解液中-NH<sub>2</sub>的含量,mmol/L;N为核桃蛋白酶解液中蛋白质含量,mg/mL;h<sub>tot</sub>为核桃蛋白中肽键的物质的量,mmol/g。

### 1.2.4 核桃多肽的体外模拟消化

根据文献[4]的方法,按照质量比1:20分别向核桃多肽粉和脱脂核桃粕粉中加入超纯水,溶解混匀,以3 mol/L HCl调节pH至2.5,按照酶与底物质量比1:35加入胃蛋白酶,37℃下恒温水浴振荡1 h,使用1 mol/L NaOH调节pH至7.5,按照酶与底物质量比1:25加入胰蛋白酶,37℃下恒温水浴振荡2 h,沸水浴灭酶活15 min,3 500 r/min离心15 min取上清,冷冻干燥后-20℃储藏备用。

### 1.2.5 核桃多肽及其体外消化产物抗氧化活性的测定

#### 1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力

参照田文慧等<sup>[5]</sup>的方法,并略作修改,测定DPPH自由基清除率。向样品加入蒸馏水制备5 mg/mL的样品溶液,取样品溶液0.4 mL,加入2 mL 0.1 mmol/L的DPPH-甲醇溶液,充分混匀,室温下避光反应30 min后于517 nm处测定吸光值(A<sub>1</sub>)。以0.4 mL蒸馏水代替样品溶液为空白对照组,测定吸光值(A<sub>2</sub>)。DPPH自由基清除率(Y)按式(2)计算。

$$Y = (1 - A_1/A_2) \times 100\% \quad (2)$$

#### 1.2.5.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力

参照田文慧等<sup>[5]</sup>的方法,并略作修改,测定ABTS<sup>+</sup>自由基清除率。向样品加入蒸馏水制备1 mg/mL的样品溶液,取样品溶液0.5 mL,加入4 mL ABTS<sup>+</sup>自由基工作液,充分混匀,30℃水浴6 min后于734 nm处测定吸光值(A<sub>1</sub>)。以0.5 mL蒸馏水代替样品溶液为空白对照组,测定吸光值(A<sub>2</sub>)。ABTS<sup>+</sup>自由基清除率(X)按式(3)计算。

$$X = (1 - A_1/A_2) \times 100\% \quad (3)$$

#### 1.2.6 核桃多肽基本成分的测定

水分参照GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中直接干燥法测定;灰分参照GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》测定;采用全自动凯氏定氮仪测定样品中总蛋白质含量,其中核桃蛋白质转换系数为5.3。

参考文献[6]采用苯酚-硫酸法测定样品中总糖含量。以葡萄糖质量浓度(x)为横坐标,吸光值(y)为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线,得到的回归方程为 $y = 0.0094x + 0.0092$ ,R<sup>2</sup>为0.9996,由标准曲线回归方程计算样品的总糖含量。

#### 1.2.7 核桃多肽分子质量分布的测定

采用Waters 2695高效液相色谱仪测定核桃多肽的分子质量分布。液相色谱条件:TSKGEL G 2000 SW<sub>XL</sub>色谱柱(300 mm × 7.8 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水-三氟乙酸(体积比40:60:0.1)溶液,等度洗脱,流速0.5 mL/min。以细胞色素C(12 384 Da)、抑肽酶(6 512 Da)、杆菌肽(1 422 Da)、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(451 Da)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(189 Da)作为标准品,由保留时间确定分子质量分布。

#### 1.2.8 核桃多肽氨基酸组成的测定

使用伍丰LC-100高效液相色谱仪,采用柱前衍生-高效液相色谱法测定核桃多肽的氨基酸组成。液相色谱条件:氨基酸专业柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相A为0.05 mol/L乙酸钠水溶液(pH 6.50 ± 0.05),流动相B为甲醇-乙腈-水(体积比20:60:20);梯度洗脱程序为0 min 95% A, 39 min 52% A, 40 min 40% A, 45 min 45% A, 46 min 95% A, 60 min 95% A;进样量10 μL;流速1.0 mL/min;柱温35℃;紫外检测波长254 nm。

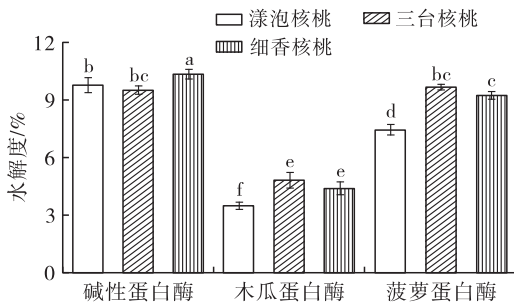
#### 1.2.9 数据处理

所有实验数据均用IBM SPSS Statistics 19软件进行差异性分析,使用Origin 2021软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 核桃多肽的水解度

不同蛋白酶水解下核桃多肽的水解度见图 1。



注:不同字母表示具有显著差异( $p < 0.05$ )。下同

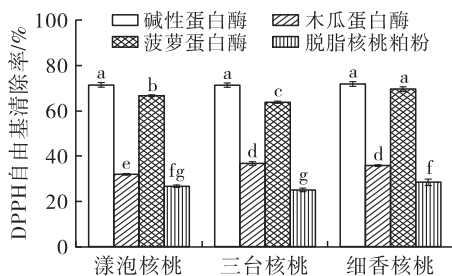
Note: Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

The same below

图 1 不同蛋白酶水解下核桃多肽的水解度

Fig. 1 Degree of hydrolysis of walnut polypeptides under different protease hydrolysis

由图 1 可知,碱性蛋白酶水解 3 种脱脂核桃粕粉制备的核桃多肽水解度普遍较高,木瓜蛋白酶水解制备的核桃多肽水解度普遍较低,其中碱性蛋白酶细香核桃多肽水解度显著高于其余样品的。对于三台核桃多肽,碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽与菠萝蛋白酶



酶水解制备的核桃多肽的水解度之间无显著差异。

### 2.2 核桃多肽的抗氧化活性

分别对 3 种脱脂核桃粕粉及经 3 种蛋白酶水解制备的核桃多肽进行 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力测定,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,3 种脱脂核桃粕粉以及核桃多肽的抗氧化活性具有一定的相似性,3 种脱脂核桃粕粉 DPPH 自由基清除能力均显著低于核桃多肽的,碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的 DPPH 自由基清除率和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率高于菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶水解制备的,且碱性蛋白酶水解制备的 3 种核桃多肽的 DPPH 自由基清除率和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率均无显著差异。碱性蛋白酶水解制备的漾泡、三台和细香核桃多肽的 DPPH 自由基清除率分别为 71.34%、71.26% 和 71.82%,ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率分别为 82.41%、81.23% 和 82.86%。一般来说,碱性蛋白酶制备的生物活性肽在产量以及生物活性上高于其他蛋白酶,这是因为在碱性环境中,核桃蛋白溶解性更好,较多的蛋白质与蛋白酶反应产生更多的生物活性肽,可能导致其具有更高的抗氧化活性。

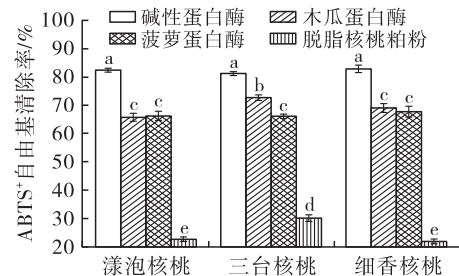


图 2 脱脂核桃粕粉及不同核桃多肽的 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率

Fig. 2 DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging rates of defatted walnut meal and different walnut polypeptides

相较于其他研究结果,弘子姗等<sup>[7]</sup>使用 7 种蛋白酶水解漾泡核桃粕,得出碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的抗氧化能力最佳,在 0.5 g/mL 质量浓度下,其 DPPH 自由基清除率为(87.21 ± 2.07)%,ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率为(84.20 ± 1.31)%,推测其相同浓度下的抗氧化能力低于本研究中碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的,同时本研究中核桃多肽的 DPPH 自由基清除能力高于侯雅坤<sup>[8]</sup>使用河北核桃制备的碱性蛋白酶水解物(IC<sub>50</sub> 为 13.62 mg/mL)的;但相比于贾靖霖<sup>[9]</sup>使用新疆温 185-核桃制备的核桃多肽,其在 0.6 mg/mL 质量浓度下 DPPH 自由基清除率高于 60%,以及阮晓慧<sup>[10]</sup>使用陕西香玲核桃制备的核桃多肽,其在 0.1 mg/mL 质量浓度下 DPPH 自由基清除率为 85.18%,本研究中 3 种核

桃多肽的 DPPH 自由基清除能力略低。

### 2.3 核桃多肽体外消化产物的抗氧化活性

食物中的活性物质在进入生物体中,经过胃肠消化后,被进一步分解,其生物活性也会发生变化<sup>[11]</sup>,测定核桃多肽胃肠模拟消化后消化产物的抗氧化活性,可表明核桃多肽在体内消化过程中抗氧化活性的保持情况。脱脂核桃粕粉和核桃多肽体外消化产物的 DPPH 自由基清除率及 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率如图 3 所示。

由图 3 可以看出:脱脂核桃粕粉消化产物的抗氧化能力显著弱于核桃多肽消化产物的;碱性蛋白酶水解制备的漾泡、三台和细香核桃多肽消化产物的 DPPH 自由基清除率分别为 77.54%、74.15% 和 78.02%,高于木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶水解制备的

核桃多肽消化产物的;木瓜蛋白酶水解制备的细香核桃多肽消化产物的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率为 88.05%, 高于碱性蛋白酶水解制备的细香核桃多肽消化产物的(86.58%), 但二者无显著差异。

对比图 2、图 3 可知, 经过模拟胃肠消化后, 碱性蛋白酶水解制备的漾泡、三台和细香核桃多肽的抗氧化活性得到了提升, 其中 DPPH 自由基清除率增幅分别为 6.20、2.90 个百分点和 6.20 百分点, ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率增幅分别为 4.17、6.82 百分点和 3.88 百分点。与本研究类似, 芦鑫等<sup>[12]</sup> 对芝麻

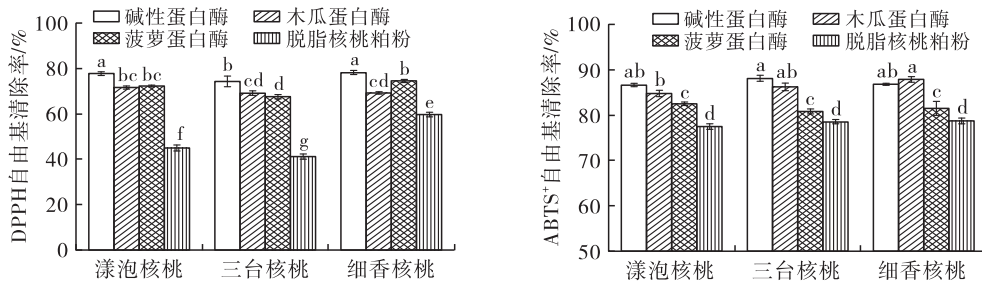


图 3 脱脂核桃粕粉及不同核桃多肽体外消化产物的 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率

Fig. 3 DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging rates of defatted walnut meal and different walnut polypeptides *in vitro* digestion products

综上所述, 碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的抗氧化活性优于菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶的, 且具有良好的消化稳定性, 但不同品种核桃之间的抗氧化能力差异并不显著, 说明碱性蛋白酶普遍适用于云南主栽核桃品种抗氧化产品的研发。在接下来的实验中, 选择碱性蛋白酶生产的核桃多肽进行进一步研究。

#### 2.4 核桃多肽的基本成分分析

对碱性蛋白酶水解制备的 3 种核桃多肽的基本成分进行测定, 结果如表 1 所示。

由表 1 可以看出, 3 种核桃多肽的蛋白质含量均高于 50%, 其抗氧化活性可能主要是由于核桃蛋

白进行体外模拟消化后, 其 DPPH 自由基清除率和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率均有所上升, 而陈艳等<sup>[13]</sup> 制备的榛子多肽与张森<sup>[14]</sup> 制备的玉米多肽在模拟胃肠消化后抗氧化能力均有所降低, 这可能是由于蛋白质进一步水解, 破坏了具有抗氧化活性的多肽结构, 以及可能产生了更多的亲水性氨基酸侧链, 导致抗氧化活性减弱。而本研究中自由基清除能力的增加可能是由于高分子质量核桃多肽进一步水解<sup>[15]</sup>, 而小分子质量核桃多肽稳定性更好以及较高含量的疏水性氨基酸使其产生了更强的抗氧化活性。

白在蛋白酶的作用下变成了小分子活性肽<sup>[15-16]</sup>。3 种核桃多肽中总糖含量为 15.91% ~ 17.77%, 灰分含量为 8.67% ~ 8.92%, 水分含量为 4.93% ~ 5.86%。

表 1 核桃多肽的基本成分

Table 1 Basic composition of walnut polypeptides %

核桃多肽	蛋白质	总糖	灰分	水分
漾泡	54.66 ± 1.06	15.91 ± 0.25	8.84 ± 0.06	5.86 ± 0.42
三台	54.08 ± 0.82	17.77 ± 0.44	8.67 ± 0.02	5.14 ± 0.08
细香	58.17 ± 1.72	16.16 ± 0.38	8.92 ± 0.26	4.93 ± 0.18

#### 2.5 核桃多肽及其体外消化产物的分子质量分布

对碱性蛋白酶水解制备的 3 种核桃多肽及其消化产物进行分子质量分布测定, 结果如表 2 所示。

表 2 核桃多肽及其体外消化产物的分子质量分布

Table 2 Molecular weight distribution of walnut polypeptides and their *in vitro* digestion products

分子质量范围/Da	核桃多肽/%			消化产物/%		
	漾泡	三台	细香	漾泡	三台	细香
>3 000	0.54	0.59	0.48	0.22	0.15	0.21
(2 000, 3 000]	1.13	1.21	1.11	0.61	0.64	0.65
[1 000, 2 000]	5.22	5.18	4.92	4.25	4.49	4.45
<1 000	93.10	93.04	93.49	94.93	94.72	94.69

由表 2 可以看出, 3 种核桃多肽及其体外消化产物的分子质量分布具有一定的相似性, 其中分子质量大于 3 000 Da 的多肽含量低于 1%, 说明在碱性蛋白酶的作用下, 脱脂核桃粕粉中的大分子蛋白

质大部分被降解为小分子多肽。与未消化的核桃多肽相比, 消化产物中大于或等于 1 000 Da 的组分进一步减少, 可能是由于模拟胃肠消化过程中胃蛋白酶、胰蛋白酶进一步水解核桃蛋白所致。3 种核桃



多肽及其消化产物中小于 1 000 Da 的多肽占比最高且均高于 90%。大量研究表明,多肽的分子质量是影响其抗氧化能力的一个重要因素<sup>[17]</sup>。通常认为,抗氧化能力强的多肽主要由 2~9 个氨基酸组成<sup>[18]</sup>,模拟胃肠消化后,小分子多肽含量的增加进一步提高了核桃多肽的抗氧化活性<sup>[16]</sup>,这与 2.3 中核桃多肽消化产物抗氧化活性得到提高相符合。

### 2.6 核桃多肽的氨基酸组成

对碱性蛋白酶水解制备的 3 种核桃多肽进行氨基酸组成及含量测定,结果如表 3 所示。

表 3 核桃多肽的氨基酸组成及含量

Table 3 Amino acid composition and content of

氨基酸	walnut polypeptides			mg/g
	漾泡核桃多肽	三台核桃多肽	细香核桃多肽	
天冬氨酸	42.45	40.89	40.33	
谷氨酸	110.37	107.46	108.06	
丝氨酸	32.33	31.78	35.42	
甘氨酸	28.09	26.90	31.21	
组氨酸	12.56	12.58	13.84	
精氨酸	81.27	78.40	88.56	
苏氨酸*	18.19	18.03	20.43	
丙氨酸 <sup>△</sup>	22.34	22.18	24.30	
脯氨酸 <sup>△</sup>	20.27	20.21	23.03	
酪氨酸	17.16	17.10	19.01	
缬氨酸* <sup>△</sup>	17.71	17.99	20.29	
甲硫氨酸* <sup>△</sup>	0.69	0.57	1.35	
胱氨酸	1.11	1.11	1.19	
异亮氨酸* <sup>△</sup>	15.56	15.87	18.01	
亮氨酸* <sup>△</sup>	34.94	34.74	39.42	
苯丙氨酸* <sup>△</sup>	22.55	22.47	25.35	
赖氨酸*	12.94	13.17	14.34	
半胱氨酸	1.58	1.61	1.55	
必需氨基酸	122.58	122.84	139.19	
疏水性氨基酸	134.06	134.03	151.75	
总量	492.11	483.06	525.69	

注: \* 表示必需氨基酸; <sup>△</sup> 表示疏水性氨基酸

Note: \*. Essential amino acid; <sup>△</sup>. Hydrophobic amino acid

由表 3 可以看出,3 种核桃多肽中,细香核桃多肽的氨基酸总量最高,达到了 525.69 mg/g,三台核桃多肽的氨基酸总量最低,为 483.06 mg/g。3 种核桃多肽中氨基酸含量最高的均为谷氨酸、精氨酸。漾泡、三台和细香核桃多肽的必需氨基酸含量分别为 122.58、122.84、139.19 mg/g,分别占氨基酸总量的 24.90%、25.43% 和 26.48%。据报道,疏水性氨基酸的含量与多肽的抗氧化活性呈正相关<sup>[19]</sup>,漾泡、三台、细香核桃多肽的疏水性氨基酸含量占比分别为 27.24%、27.75% 和 28.87%,略低于张丽娜<sup>[20]</sup>采用河北核桃制备的抗氧化肽(33.13%),但高于杨

君丽<sup>[21]</sup>制备的大豆球蛋白抗氧化肽(21.86%),有作为抗氧化肽的潜力。

### 3 结论

本研究采用碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶对漾泡、三台、细香 3 个云南主栽品种的脱脂核桃粕粉进行水解,比较不同蛋白酶水解以及不同品种核桃制备的核桃多肽的抗氧化活性差异,并对核桃多肽的基本成分、分子质量分布和氨基酸组成进行分析。结果表明:碱性蛋白酶水解制备的核桃多肽的抗氧化能力显著高于木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶水解制备的,经碱性蛋白酶水解后,3 个品种核桃多肽的抗氧化活性无显著差异;经过模拟胃肠消化后,核桃多肽的 DPPH 自由基清除率和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率均有所上升,且分子质量小于 1 000 Da 的小分子多肽含量增高;碱性蛋白酶水解制备的漾泡、三台、细香核桃多肽中蛋白质含量均高于 50%,其必需氨基酸含量分别为 122.58、122.84 mg/g 和 139.19 mg/g,且与抗氧化活性相关的疏水性氨基酸含量较高。综上,在生产核桃多肽产品时碱性蛋白酶更适用于 3 种云南核桃,云南脱脂核桃粕粉有作为抗氧化肽资源的开发潜力。

### 参考文献:

- [1] BURBANO J J, CORREA M J. Composition and physicochemical characterization of walnut flour, a by-product of oil extraction [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2021, 76(2): 233-239.
- [2] 李晓杰,李富强,朱丽萍,等. 生物活性肽的制备与鉴定进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(1): 23-28.
- [3] 王秀明. 核桃和米糠活性肽的制备与活性研究[D]. 天津: 天津大学, 2016.
- [4] 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.
- [5] 田文慧,李若凡,江坤,等. 云南野生大红菇 (*Russula vinosa*) 红色素的制取、抗氧化性研究及其成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 100-108.
- [6] 汤慧民,周丽菊. 超声波辅助纤维素酶提取核桃壳多糖及其抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(2): 101-105.
- [7] 弘子姗,解静,张宝娟,等. 核桃粕多肽的制备及其抗氧化活性研究[J]. 热带农业科学, 2021, 41(12): 45-52.
- [8] 侯雅坤. 核桃活性肽体外抗氧化活性及 ACE 抑制活性的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
- [9] 贾靖霖. 温 185-核桃蛋白酶解物的制备及其活性研究[D]. 新疆阿拉尔: 塔里木大学, 2015.

(下转第 94 页)

- [4] 谷瑞丽, 宁亚萍, 刘璐, 等. 河南省市售食用植物油中氯丙醇酯污染状况分析[J]. 中国油脂, 2024, 49(1): 84-89.
- [5] KAMIKATA K, VICENTE E, ARISSETO - BRAGOTTO A P, et al. Occurrence of 3 - MCPD, 2 - MCPD and glycidyl esters in extra virgin olive oils, olive oils and oil blends and correlation with identity and quality parameters[J]. Food Control, 2019, 95: 135 - 141.
- [6] MONIEN B H, ABRAHAM K. Levels of 2, 3 - dihydroxypropyl mercapturic acid (DHPMA) in human urine do not reflect the exposure to 3 - chloro - 1, 2 - propanediol (3 - MCPD) or glycidol [J/OL]. Environ Res, 2022, 211: 112977 [2023 - 09 - 04]. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112977>.
- [7] 2 - and 3 - MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils and fats by acid transesterification and GC/MS: Cd 29a - 13 [S]. Champaign, IL: AOCS Press, 2017.
- [8] 出口食品中 3 - 氯丙醇酯及缩水甘油酯的测定 气相色谱 - 质谱法: SN/T 5220—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [9] Amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of 3 - monochloropropanediol (3 - MCPD), 3 - MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in certain foods: Commission Regulation (EU) 2020/1322 [S]. Brussels: European Commission, 2020.
- [10] 食品安全国家标准 食品中氯丙醇及其脂肪酸酯含量的测定: GB 5009.191—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [11] CHENG W W, LIU G Q, WANG L Q, et al. Glycidyl fatty acid esters in refined edible oils: A review on formation, occurrence, analysis, and elimination methods [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2017, 16(2): 263 - 281.
- [12] 陈啟荣, 邵鹏, 王帅, 等. 植物油中 3 - 氯 - 1, 2 - 丙二醇单酯/双酯的分离及检测[J]. 分析实验室, 2022, 41(10): 1160 - 1164.
- [13] 张方圆, 王李平, 朱大林, 等. 同位素内标 - 气相色谱 - 质谱法测定食用植物油中缩水甘油酯[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 132 - 136.
- [14] 袁蕊. 植物油中氯丙醇酯及缩水甘油酯酸水解 - GC - MS 测定法的方法改进研究[J]. 职业与健康, 2020, 36(15): 2048 - 2053.
- [15] HRNČIRÍK K. Processing contaminants in edible oils [M]. Champaign, IL: AOCS Press, 2022: 65 - 108.
- [16] 张杰, 栗星, 刘丹, 等. 食用植物油中氯丙醇酯及缩水甘油酯的国家标准检测方法的改进[J]. 理化检验: 化学分册, 2023, 59(6): 671 - 677.
- [17] 刘国琴, 尹诗琴, 汪学德. 气相色谱 - 质谱联用法测定食用油脂中的缩水甘油酯[J]. 现代食品科技, 2016, 32(5): 289 - 294.
- [18] 普雷斯特 H F, 王 M, 科南 J T. 利用不同电子电离能量的电子电离: CN104241075A[P]. 2014 - 12 - 24.
- [19] CUSTODIO - MENDOZA J A, SENDÓN R, DE QUIRÓS A R, et al. Development of a QuEChERS method for simultaneous analysis of 3 - Monochloropropane - 1, 2 - diol monoesters and glycidyl esters in edible oils and margarine by LC - APCI - MS/MS[J/OL]. Anal Chim Acta, 2023, 1239: 340712 [2023 - 09 - 04]. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340712>.
- [20] 郝宇, 马艺茨, 于力涛, 等. 气相色谱 - 串联质谱法测定婴幼儿配方乳粉中的 3 - 氯丙醇酯和缩水甘油酯及其风险评估[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 337 - 344.
- [21] 张家枫, 刘玉兰, 孙国昊, 等. 不同食用油的甘油酯组成、3 - MCPD 酯和 GE<sub>s</sub> 含量研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 38 - 43.

(上接第 56 页)

- [10] 阮晓慧. 核桃粕分离蛋白的酶解产物功能特性研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [11] 曹振海, 乐彩虹, 陶宁萍, 等. 体外模拟消化对暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白肽结构特征及抗氧化活性的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 61 - 69.
- [12] 芦鑫, 胡东彬, 贾聪, 等. 体外模拟消化芝麻蛋白产生多肽的抗氧化性分析[J]. 中国油脂, 2020, 45(5): 63 - 66, 81.
- [13] 陈艳, 吕春茂, 韩金晶, 等. 榛子粕抗氧化肽制备条件的优化及体外模拟消化的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2017, 48(6): 688 - 696.
- [14] 张森. 玉米蛋白及其水解物模拟体外消化产物抗氧化活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [15] EGGER L, MÉNARD O. Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion[J]. Curr Opin Food Sci, 2017, 14: 116 - 121.
- [16] GHASSEM M, ARIHARA K, MOHAMMADI S, et al. Identification of two novel antioxidant peptides from edible bird's nest (*Aerodramus fuciphagus*) protein hydrolysates [J]. Food Funct, 2017, 8(5): 2046 - 2052.
- [17] WANG B, LI B. Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein - derived peptides by using Caco - 2 cell model [J]. Food Chem, 2017, 218: 1 - 8.
- [18] 张丰文, 董超, 周丽亚, 等. 抗氧化多肽来源、提取及检测的研究进展[J]. 生物技术, 2021, 31(1): 96 - 103, 64.
- [19] POWNALL T L, UDENIGWE C C, ALUKO R E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(8): 4712 - 4718.
- [20] 张丽娜. 核桃蛋白水解物的抗氧化性及其二肽基肽酶 IV 抑制活性研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2020.
- [21] 杨君丽. 大豆抗氧化肽的制备与表征[D]. 郑州: 河南工业大学, 2010.