DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260208001
引用格式: 刘康乾, 谢强, 付超, 等. 梯次酶解法制备核桃抗氧化肽工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 111–121.
Liu Kangqian, Xie Qiang, Fu Chao, et al. Optimization of preparation process of *Juglans regia* L. antioxidant peptide by echelon enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 111–121. (in Chinese with English abstract).

梯次酶解法制备核桃抗氧化肽工艺优化

刘康乾, 谢　强, 付　超, 贾志宏, 徐　想, 王　萍*

(塔里木大学食品科学与工程学院, 新疆生产建设兵团南疆特色农产品深加工重点实验室, 阿拉尔　843300)

摘　要: 目的　优化梯次酶解法制备核桃抗氧化肽的工艺条件。**方法**　以脱脂核桃粉为原料, 依次采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和酸性蛋白酶梯次酶解方式制备核桃抗氧化肽, 以抗氧化活性和水解度为指标, 通过单因素结合正交试验及响应面优化酶解工艺。**结果**　中性蛋白酶的最佳工艺为酶解温度 51 ℃, pH 为 6.87, 底物浓度 5%, 酶添加量 28000 U, 酶解时间 3 h, 酸性蛋白酶酶解的最佳工艺为酶解温度 50.0 ℃, pH 为 5, 底物浓度 5.0%, 酶添加量 30000 U, 酶解时间 3 h, 水解度为 43.74%, 2,2'-联氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS]阳离子自由基清除率 92.14%, 1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)清除率为 87.55%。**结论**　本研究优化了蛋白梯次酶解工艺, 可作为核桃抗氧化肽制备的一种可行策略。

关键词: 脱脂核桃粕粉; 核桃酶解工艺; 响应面分析; 正交试验
中图分类号: TS255.6　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)13–0111–11

Optimization of preparation process of *Juglans regia* L. antioxidant peptide by echelon enzymatic hydrolysis

LIU Kang-Qian, XIE Qiang, FU Chao, JIA Zhi-Hong, XU Xiang, WANG Ping*

(*College of Food Science and Engineering*, *Tarim University*, *Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Deep Processing on Featured Agricultural Products in South Xinjiang*, *Aral* 843300, *China*)

ABSTRACT: Objective　To optimize the process conditions for the preparation of *Juglans regia* L. antioxidant peptides by echelon enzymatic hydrolysis. **Methods**　*Juglans regia* L. antioxidant peptides were prepared from defatted *Juglans regia* L. powder by alkaline protease, neutral protease and acid protease in a consecutive manner. The enzymatic hydrolysis process was optimized by single factor combined with orthogonal experiment and response surface method with antioxidant activity and hydrolysis degree as indexes. **Results**　The optimum process of neutral protease was enzymatic hydrolysis temperature 51 ℃, pH 6.87, substrate concentration 5%, enzyme addition 28000 U, enzymatic hydrolysis time 3 h. The optimum process of acid protease was enzymatic hydrolysis temperature 50.0 ℃, pH 5, substrate concentration 5.0%, enzyme addition 30000 U, enzymatic hydrolysis time 3 h. The degree of hydrolysis was

收稿日期: 2026-02-08
基金项目: 2024 年新疆生产建设兵团青年科学项目(2024DB033); 新疆自治区重大科技专项(2022A004)
第一作者: 刘康乾(2002—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为园艺产品贮运与加工。E-mail: 1273088039@qq.com
***通信作者:** 王萍(1985—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为园艺产品贮运与加工。E-mail: wpaing513@163.com

43.74%, the cation radical scavenging rate of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) was 92.14%, and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging rate was 87.55%. **Conclusion** This study optimizes the protein echelon enzymatic hydrolysis process, which can be used as a feasible strategy for the preparation of *Juglans regia* L. antioxidant peptides.

KEY WORDS: defatted *Juglans regia* L. meal powder; *Juglans regia* L. enzymatic hydrolysis process; response surface analysis; orthogonal experiment

0 引 言

核桃(*Juglans regia* L.)又称胡桃、羌桃，属胡桃科胡桃属，与扁桃、腰果、榛子并称世界"四大坚果"[1]。核桃本身富含不饱和脂肪酸、优质蛋白质、8 种必需氨基酸、矿物质及多酚类化合物等多种生物活性成分[2−3]，具备显著的健康促进功效，在坚果消费领域备受青睐。然而，坚果蛋白虽含量丰富，其分子构象却较为紧密，导致功能特性低下且生物活性受到抑制[4]，从而限制了其在食品工业中的直接应用。

为改善这一状况，酶解法因操作简单、反应条件温和、安全性高、产品性能优良等特点，被广泛用于制备生物活性肽[5]。将蛋白质水解成活性肽可有效改善其功能特性和生物活性[6]，目前已有多种有益生物活性肽从食品蛋白质酶解产物中被成功提取和确认[7]。核桃粕作为核桃榨油后的主要副产物，蛋白质含量丰富，具有较高的利用价值，是制备生物活性肽的优质原料[8]。

基于核桃粕的上述优势，核桃肽已成为食品领域最具发展潜力的功能因子之一[9]，具有抗氧化[10]、改善认知能力[11]、降血压[12]、增强免疫力[13]、抗疲劳[14]等诸多生物活性，在特殊健康食品开发中展现出广阔的应用前景。目前，以核桃蛋白为原料制备肽的方法主要包括酶解法[15]、发酵法[16]和化学法[17]等，其中酶解法最为常用。在酶解过程中，蛋白酶的种类、反应温度、反应时间、pH、底物浓度等因素均会影响产物的生成与活性。酶解释放肽类化合物后，产品功能特性得到显著改善，例如更易被人体消化、溶解性增强[18−19]；同时，采用酶解法制备的核桃肽类产品安全无害，无有害物质产生[20−21]。

目前，核桃蛋白肽的制备多采用碱溶酸沉法提取蛋白，随后通过单一酶解或复合酶解工艺获得。然而，该生产过程产生大量酸碱废液，对环境造成压力。因此，本研究模拟目前新疆企业采用非碱溶酸沉的生产制备肽条件，对核桃粕采用超临界萃取二次去残留油脂的方法，继而依次利用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和酸性蛋白酶进行梯次酶解工艺优化，以蛋白质水解度及产物抗氧化活性为评价指标，通过单因素试验、响应面分析及正交试验，旨在提高酶解效率和蛋白质利用率，为工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料与试剂

核桃粕粉(喀什光华现代农业有限公司)。

酸性蛋白酶(5×10^4 U/g)、中性蛋白酶(5×10^4 U/g)、碱性蛋白酶(2×10^5 U/g)、邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)、磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、2,2'-联氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS]、1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、丝氨酸标准品(纯度≥98%)(北京索莱宝科技有限公司)；氢氧化钠、盐酸、正己烷、四硼酸钠、乙酸锌、亚铁氰化钾、酒石酸钾钠、过硫酸钾、硫酸、硫酸钾、硫酸铜(分析纯，天津市致远化学试剂有限公司)；冰乙酸、无水乙醇(分析纯，天津市鑫铂特化工有限公司)。

1.1.2 仪 器

TGL-20bR 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)；10 L×2 二氧化碳连续萃取等变压分离设备(江苏高科制药设备有限公司)；HH-6A 数显恒温磁力搅拌水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司)；HH-2 数显恒温水浴锅(常州越新仪器制造有限责任公司)；SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)；PHS-3C 型精密 pH 计(上海仪电科学仪器有限公司)；723 型分光光度计(上海光谱仪器有限公司)；LE203E/02 电子天平[精度 0.001 g，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]；T18 digital ULTRA-TURRAX 高速分散机(德国 VMA-Getzmann 公司)；Lab-1C-80 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白酶解物的制备

去脂核桃粕：将核桃粕粉经过二氧化碳连续萃取等变压分离设备去除残留油脂，设定萃取压力 23.2 MPa、分离温度 45.5 ℃、二氧化碳循环泵电机频率 12.33 Hz，萃取时间 45 min，即得到脱脂核桃粕粉。

5 g 脱脂核桃粕粉置于烧杯中，加入去离子水制成底物浓度为 5%的蛋白液。根据蛋白酶的最适条件，调节溶液温度和 pH，加入碱性蛋白酶，恒温水浴搅拌反应 4 h，反

应过程中维持pH恒定(pH变化范围±0.1), 水解4 h后95 ℃下加热 15 min 灭酶, 冷却后用盐酸调节 pH 至中性, 以8000 r/min 离心 15 min, 取上层清液进行冷冻干燥, 干燥物即为核桃蛋白酶解物, –20 ℃下保存备用。中性蛋白酶及酸性蛋白酶分别以离心之后所得碱性酶解物及梯次中性蛋白酶解物, 控制其最佳反应条件来制备酶解物。

1.2.2　核桃粕粉及脱脂核桃粕粉的基本成分的测定

参照 GB 5009.5—2025《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法测定蛋白质含量, 参照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》中索氏抽提法, 测定粗脂肪含量, 参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中直接干燥法测定水分含量, 参照GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》中称重法测定灰分含量, 参照GB 5009.7—2016《食品安全国家标准 食品中还原糖的测定》中直接滴定法测量还原糖含量及总糖含量。

1.2.3　核桃酶解顺序的确定

将脱脂核桃粕粉溶于去离子水中以制备成底物浓度为5%的蛋白液, 在 pH 调节过程, 分别加入碱性蛋白酶、中性蛋白酶及酸性蛋白酶, 在酶解结束后, 离心(8000 r/min, 15 min), 取上清液测其水解度, 测定 ABTS 阳离子自由基清除率及 DPPH 自由基清除率, 通过对所得结果分析来确定梯次酶解最佳工艺。

1.2.4　碱性蛋白酶最佳酶解条件

参照韦雅虹[22]得出的最佳酶解工艺为底物浓度 5.2%, 酶添加量 40000 U, 酶解温度 48.5 ℃, 酶解时间 4 h, 酶解pH 为 10.8。

1.2.5　中性蛋白酶最佳反应条件确定

(1)中性蛋白酶单因素实验

以水解度和DPPH自由基清除率及ABTS阳离子自由基清除率为评价指标, 设定底物浓度(3%、4%、5%、6%、7%)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)、酶解温度(35、40、45、50、55 ℃)、酶解 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)和酶添加量(10000、20000、30000、40000、50000 U)为变量因素, 确定最佳的酶解因素水平。

(2)中性蛋白酶响应面试验设计

基于单因素试验数据, 将水解度作为响应值(*Y*), 自变量包括 pH (*A*)、酶解温度(*B*)、酶添加量(*C*)、酶解时间(*D*) 4 个因素。通过采用 Box-Behnken 中心组合原理进行了 4 因素 3 水平的响应面试验设计, 以优化中性酶酶解工艺。因素水平设计见表 1。

1.2.6　酸性蛋白酶最佳反应条件确定

(1)酸性蛋白酶单因素实验

以水解度和DPPH自由基清除率及ABTS阳离子自由基清除率为评价指标, 设定底物浓度(3%、4%、5%、6%、7%)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)、酶解温度(45.0、47.5、50.0、52.5、55.0 ℃)、酶解 pH (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0)和酶添加量(10000、20000、30000、40000、50000 U)为变量因素, 确定最佳的酶解因素水平。

(2)酸性蛋白酶正交试验

酸性蛋白酶阶段预实验中响应面模型拟合不佳, 说明交互作用不显著或体系近线性, 因此改用 4 因素 3 水平正交试验, 以主效应分析确定最优条件。基于单因素实验数据, 筛选了 4 个关键因素, 分别为酶解温度(*E*)、酶解 pH (*F*)、底物浓度(*G*)和酶添加量(*H*), 以水解度为指标。设计 4 因素 3 水平的正交试验, 选用$L_9(3^4)$正交表进行正交试验设计, 如表 2 所示。

1.2.7　DPPH 自由基清除率测定

参照冷帅辰[23]的实验方法, 向试管中加入 1 mL 蛋白酶解液和 1 mL 浓度为 60 μmol/L 的 DPPH 醇溶液, 在避光条件下混合均匀反应 30 min, 在 517 nm 波长下测吸光度值。清除率计算公式如(1)所示:

$$\text{DPPH 自由基清除率/\%}=\frac{A_0-(A_1-A_2)}{A_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 为用去离子水代替蛋白酶解液为空白样加入DPPH 吸光度值; A_1 为蛋白酶解液加入 DPPH 的吸光度值; A_2 为蛋白酶解液不加 DPPH 的吸光度值。

表 1　Box-Behnken 设计因素和水平

Table 1　Design factors and levels of Box-Behnken

水平	因素			
	A: pH	*B*: 酶解温度/℃	*C*: 酶添加量/U	*D*: 酶解时间/h
–1	6.0	45	20000	2
0	6.5	50	30000	3
1	7.0	55	40000	4

表 2　正交试验因素水平表

Table 2　Factor level table of orthogonal test

编号	因素			
	E: 酶解温度/℃	*F*: pH	*G*: 底物浓度/%	*H*: 酶添加量/U
1	50.0	4.0	4	10000
2	52.5	4.5	5	20000
3	55.0	5.0	6	30000

1.2.8 ABTS 阳离子自由基清除率测定

参照 Kong 等[24]实验方法, 将 7.00 mmol/L 的 ABTS 水溶液和 2.49 mmol/L 的过硫酸钾水溶液等体积混合后, 在避光条件下静置 12~16 h 后制成 ABTS 储备液, 在 4 ℃条件下保存。用 5 mmol/L 的 PBS 将溶液稀释, 使其在 734 nm 波长下的吸光度值为 0.700±0.002, 制备出 ABTS 工作液。取样品 100 μL, 再加入 1900 μL 的 ABTS 工作液于 10 mL 离心管, 准确反应 6 min, 在 734 nm 波长下测量吸光度值。清除率的计算公式如(2)所示:

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除率\%}=\frac{A_3-(A_4-A_5)}{A_3}\times 100\% \quad (2)$$

式中: A_3 为去离子水代替蛋白酶解液为空白样加入 ABTS 吸光度值; A_4 为蛋白酶解液加入 ABTS 的吸光度值; A_5 为蛋白酶解液不加 ABTS 的吸光度值。

1.2.9 酶解物水解度的测定

采用 OPA 法[25]测定水解度。

丝氨酸标准液的制备: 将 50 mg 丝氨酸标准品用纯水溶解置于 500 mL 容量瓶中, 并定容。

标准曲线的绘制: 分别取丝氨酸标准溶液 0、100、200、300、400 μL 于玻璃试管中, 再用去离子水将标准液补至 400 μL, 加入 3 mL OPA 试剂, 混合均匀反应 2 min, 在 340 nm 波长下, 测定吸光度值。以丝氨酸浓度作为横坐标(X, mg/mL), 以吸光度值作为纵坐标(Y), 绘制出标准曲线, 拟合得标准曲线方程 Y=0.6025X+0.1736 (r^2=0.9997)。

样品水解度的测定: 将 3 mL OPA 试剂与 400 μL 酶解液混合均匀, 准确反应 2 min 后, 在 340 nm 波长下测定吸光度, 根据标准曲线方程计算水解度。

1.3 数据处理

所有样品重复测定 3 次, 结果表述为平均值±标准偏差, 利用 Design Expert 13 设计软件进行实验设计, 使用 SPSS 27.0 软件进行数据分析, 使用 Origin 2025 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 核桃粕粉及脱脂核桃粕粉的基本成分的测定结果

由表 3 可知, 脱脂处理后, 核桃粕蛋白含量由 58.65%升至 77.91%, 脂肪含量由 30.57%降至 1.89%(脱脂率 93.8%)。脱脂核桃粕高蛋白、低脂肪, 符合梯次酶解制备活性肽的原料要求。

2.2 最佳酶解条件的确定

2.2.1 中性蛋白酶最佳酶解条件

(1)中性蛋白酶底物浓度对水解度及抗氧化性的影响

从图 1 可知, 水解度随着底物浓度的增加而提升, 底物浓度超过 5%后, 水解度增加变小并趋于平稳。由此推断, 当底物浓度为 5%时水解反应已趋于完全, 继续增加底物浓度对水解度的提高无明显促进作用。底物浓度对 ABTS 阳离子自由基清除率影响较小, 无明显差异; 底物浓度为 5%时, DPPH 自由基清除率达最大值 85.3%。因此当底物浓度为 5%时, 水解度及抗氧化性均达到最优值, 该浓度被确定为最佳反应水平。

(2)中性蛋白酶酶解 pH 对水解度及抗氧化性的影响

中性蛋白酶最适 pH 范围为 5.5~7.5, pH 影响蛋白酶活力, 进而影响核桃蛋白水解度。由图 2 可知, 随酶解 pH 升高, 核桃蛋白水解度在 pH 为 6.5 时达最大值 19.95%。当 pH 在 5.5~6.0 时, DPPH 自由基清除率上升, pH 超过 6.0 则逐步下降。pH 对 ABTS 阳离子自由基清除率影响较小, pH 为 6.0 时达最大值 99.57%。由此可见, 中性蛋白酶在 pH 为 6.0 时活性最强; 不合适的 pH 会改变蛋白酶空间结构, 导致酶活性下降[26], 综上所得 pH 为 6.5 作为最佳水平。

(3)中性蛋白酶酶解温度对水解度及抗氧化性的影响

温度是酶的催化活性的主要影响因素。从图 3 可以看出, 当酶解温度达到 40 ℃时, DPPH 自由基清除率达到最大值为 71.59%; 当酶解温度升至 45 ℃后, ABTS 阳离子自由基清除率达到峰值为 99.54%, 温度对 DPPH 自由基清除率和 ABTS 阳离子自由基清除率影响不大。温度达到 50 ℃之后水解度下降。这可能是因为随着温度的升高, 酶的构象和活性中心发生了改变, 导致酶的活性降低, 从而使得酶与底物的反应效率下降[27]。因此, 酶解温度为 50 ℃为最佳水平。

(4)中性蛋白酶酶添加量对水解度及抗氧化性的影响

由图 4 可知, 酶添加量超过 30000 U, 水解度小幅降低, 依据酶反应动力学, 底物与酶的结合达到饱和状态, 反应完全, 导致反应不再继续, 因此酶解液的水解度不再增加。酶添加量对 DPPH 自由基清除率的影响比较明显, 酶添加量在 10000 U 和 20000 U 时有较高的 DPPH 自由基清除能力, 酶添加量为 30000 U 时水解度显示出下降趋势, 这表明在一定范围内, 增加酶的用量可以提高反应速率, 但酶添加量过多时, 蛋白酶之间可能会产生竞争性抑制, 从而降低反应速率[28]。综上所述, 酶添加量为 30000 U 作为单因素最佳水平。

表 3 核桃粕粉和脱脂核桃粕粉的基本成分

Table 3 Basic components of *Juglans regia* L. meal powder and defatted *Juglans regia* L. meal powder

蛋白种类	蛋白质含量/%	水分/%	粗脂肪/%	灰分/%	总糖/%	还原糖/%
核桃粕粉	58.65±1.05	3.12±0.51	30.57±1.05	2.90±0.12	4.08±0.26	0.27±0.07
脱脂核桃粕粉	77.91±1.67	6.78±0.78	1.89±0.32	1.30±0.05	10.12±0.45	0.35±0.12

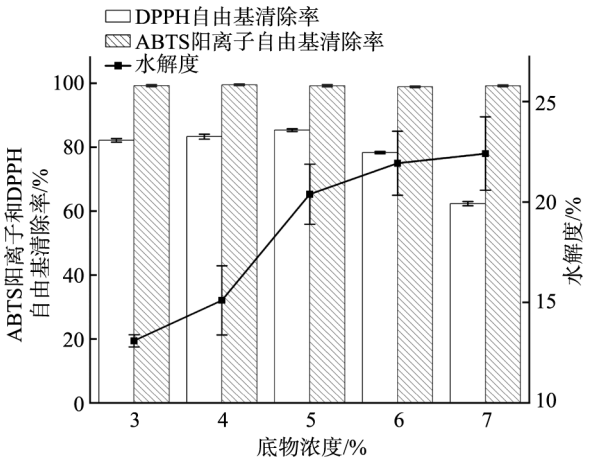


图 1　中性蛋白酶酶解的底物浓度对水解度及抗氧化性的影响

Fig.1　Effects of substrate concentration on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of neutral protease hydrolysis

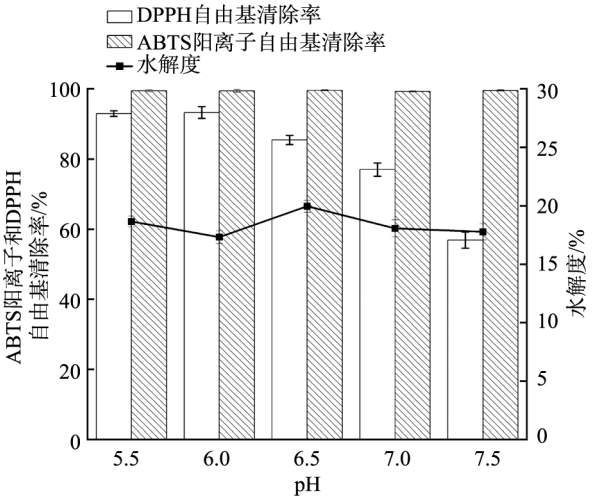


图 2　中性蛋白酶酶解的 pH 对水解度及抗氧化性的影响

Fig.2　Effects of pH on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of neutral protease hydrolysis

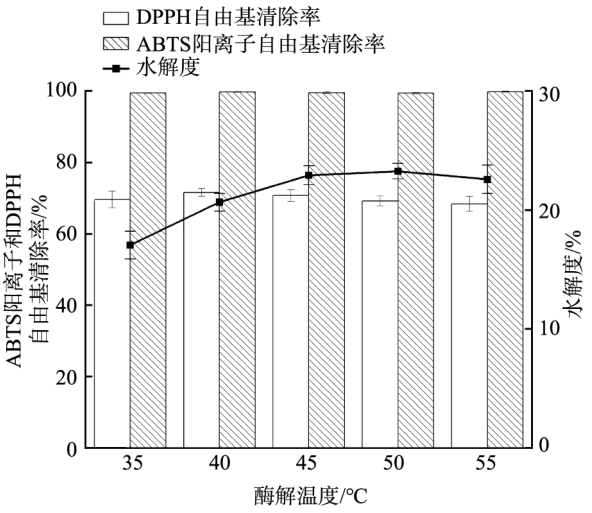


图 3　中性蛋白酶酶解温度对水解度及抗氧化性的影响

Fig.3　Effects of enzymolysis temperature on degree of hydrolysis and antioxidant activity of neutral protease hydrolysis

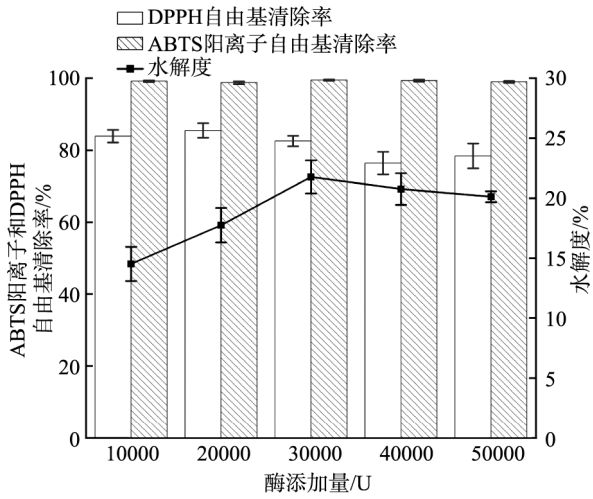


图 4　中性蛋白酶酶解的酶添加量对水解度及抗氧化性的影响

Fig.4　Effects of enzyme addition on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of neutral protease hydrolysis

(5)中性蛋白酶酶解时间对水解度及抗氧化性的影响

从图 5 可知, 随着酶解时间延长, DPPH 自由基清除率整体呈上升趋势, DPPH 自由基清除率和 ABTS 阳离子自由基清除率在 4 h 达到最高。在酶解的 1~3 h 时, 水解度的变化较大, 主要原因是酶解开始时酶的活力很高, 产物抑制较小, 3 h 以后水解度略微下降后上升, 继续延长时间并不能明显增加水解度。可能是在酶解后期, 溶液中底物减少, 蛋白质分子可结合位点减少, 产物增多对反应产生抑制作用[29]。考虑到时间成本, 选择酶解时间为 3 h 作为最优解。

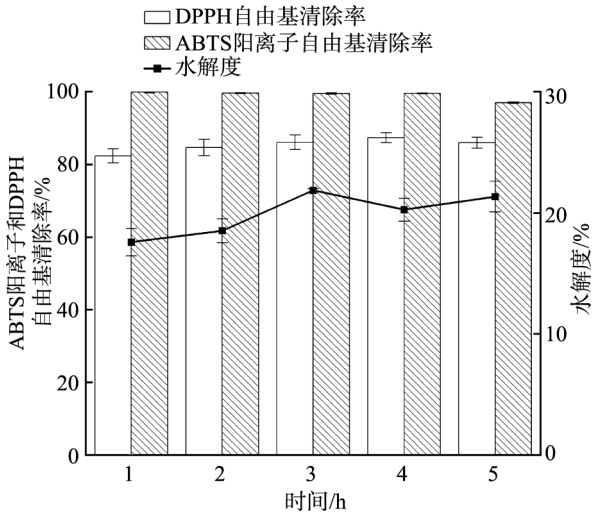


图 5　中性蛋白酶的酶解时间对水解度及抗氧化性的影响

Fig.5　Effects of hydrolysis time on degree of hydrolysis and antioxidant activity of neutral protease hydrolysis

(6)响应面对中性蛋白酶酶解最佳条件的优化试验

通过单因素实验结果, 利用 Design Expert 13 设计软件, 基于 Box-Behnken 实验设计原理, 以 pH、酶解温度、酶添加量和酶解时间 4 个因素作为自变量, 以水解度作为响应值, 对这些因素及水平进行实验设计。响应面试验设计及结果见表 4。

表 4 响应面试验设计及结果

Table 4 Design and results of response surface test

试验号	*A*: pH	*B*: 酶解温度/℃	*C*: 酶添加量/U	*D*: 酶解时间/h	*Y*: 水解度/%
1	–1	–1	0	0	22.77±1.31
2	1	–1	0	0	20.65±1.11
3	–1	1	0	0	18.58±1.18
4	1	1	0	0	23.02±1.50
5	0	0	–1	–1	19.57±1.08
6	0	0	1	–1	16.19±0.80
7	0	0	–1	1	18.41±0.76
8	0	0	1	1	21.03±1.11
9	–1	0	0	–1	13.21±0.50
10	1	0	0	–1	21.01±1.26
11	–1	0	0	1	19.69±1.19
12	1	0	0	1	19.79±1.01
13	0	–1	–1	0	21.17±0.89
14	0	1	–1	0	19.57±1.09
15	0	–1	1	0	20.24±1.01
16	0	1	1	0	19.57±0.35
17	–1	0	–1	0	22.07±0.71
18	1	0	–1	0	22.16±0.94
19	–1	0	1	0	19.61±0.72
20	1	0	1	0	20.12±0.74
21	0	–1	0	–1	18.92±0.72
22	0	1	0	–1	15.83±0.72
23	0	–1	0	1	19.24±0.49
24	0	1	0	1	20.15±0.68
25	0	0	0	0	22.04±0.83
26	0	0	0	0	23.31±0.78
27	0	0	0	0	23.71±0.78
28	0	0	0	0	23.39±0.68
29	0	0	0	0	23.19±0.74

(7)回归模型建立与方差分析

利用多元二次回归方程拟合各影响因素与响应值之间的函数关系，运用软件 Design Expert 13 对多因素综合问题进行分析解决，并基于表 4 中的数据建立了酶解工艺参数的回归模型。

水解度与各因素之间的二次多元回归方程式如下：Y=23.1300+0.9017A–0.5225B–0.5158C+1.1300D+1.6400AB+0.1050AC–1.9300AD+0.2325BC+1.0000BD+1.5000CD–0.9194A^2–1.2900B^2–1.2900C^2–3.3700D^2。

对此二次多项回归模型进行方差分析，结果如表 5 所示，模型 P<0.0001，F=10.8400，且失拟项 P=0.1517>0.05 为不显著，说明模型高度显著，模型结果与实验结果拟合度较高。回归系数 R^2=0.9155，表明理论值与实际值呈现出一定的相关性，模型调整系数 R_{adj}^2=0.8311，模型变异的可能性小，进一步说明该模型具有优良拟合程度，整个试验结果可靠。F 可以用来评价各因素对响应值的显著性，D>A>B>C，说明各因素对核桃蛋白酶解物的水解度影响顺序为酶解时间>pH>酶解温度>酶添加量。

(8)响应面各因素交互作用分析

如图 6 所示，pH (A)、酶解温度(B)、酶添加量(C)、酶解时间(D)各因素间的交互作用对水解度的影响。根据响应曲面的陡峭度和等高线图的密度可知，在 4 个因素中 A 与 B、A 与 D 及 C 与 D 之间的交互作用对水解度的影响极显著。这与方差分析结果相吻合。

表 5　回归模型的方差分析
Table 5　Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	149.3100	14	10.6600	10.8400	<0.0001	**
A	9.7600	1	9.7600	9.9200	0.0071	**
B	3.2800	1	3.2800	3.3300	0.0895	
C	3.1900	1	3.1900	3.2500	0.0932	
D	15.3700	1	15.3700	15.6200	0.0014	**
AB	10.7600	1	10.7600	10.9300	0.0052	**
AC	0.0441	1	0.0441	0.0448	0.8354	
AD	14.8200	1	14.8200	15.0600	0.0017	**
BC	0.2162	1	0.2162	0.2198	0.6464	
BD	4.0000	1	4.0000	4.0700	0.0634	
CD	9.0000	1	9.0000	9.1500	0.0091	**
A^2	5.4800	1	5.4800	5.5700	0.0333	*
B^2	10.8100	1	10.8100	10.9800	0.0051	**
C^2	10.8100	1	10.8100	10.9800	0.0051	**
D^2	73.8600	1	73.8600	75.0600	<0.0001	**
残差	13.7800	14	0.9840			
失拟项	12.1500	10	1.2100	2.9800	0.1517	
纯误差	1.6300	4	0.4070			
总误差	163.0800	28	R^2	0.9155	R_{adj}^2	0.8311

注: *表示差异显著(P<0.05); **表示差异极显著(P<0.01)。

(9)中性蛋白酶最优条件验证

通过软件分析, 得出中性蛋白酶的理论最优酶解工艺为: 酶解时间 3 h, 酶解温度 51 ℃, 酶解 pH 为 6.87, 底物浓度 5%, 酶添加量 28000 U, 理论水解度 23.42%。在此条件下进行 3 次平行试验, 获得核桃粕蛋白酶解液的平均水解度为 22.89%±0.36%, 与预测值误差较小, 表明该模型具有可靠性。

2.2.2　酸性蛋白酶最佳酶解条件

(1)酸性蛋白酶底物浓度对水解度及抗氧化性的影响

如图 7 所示, 随着底物浓度的持续增加, 水解度总体上呈现上升趋势。但当底物浓度达到 5%时, 水解度先升至 11.7%的峰值后略有回落。这表明核桃蛋白在 5%底物浓度下水解趋于稳定, 继续增加底物浓度对水解度提升效果有限。底物浓度对 DPPH 自由基清除效率影响甚微, 在 5%浓度时达到 96.88%的最大值。相比之下, 底物浓度对 ABTS 阳离子自由基清除效率具有明显影响, 在 6%浓度时达到 96.78%的峰值。证实 5%底物浓度能同时实现最佳水解度和抗氧化活性。

(2)酸性蛋白酶酶解 pH 对水解度及抗氧化性的影响

酸性蛋白酶的最佳 pH 范围在 3.0~5.0 之间, 因为该参数对酶活性及后续核桃蛋白水解效率具有明显影响。图 8 所示, 核桃蛋白的水解度先随 pH 升高先增加, 随后略有下降, 最终出现回升。DPPH 自由基清除能力呈现与 pH 升高同步上升趋势, 在 pH 为 4.5 时达到峰值, 随后开始下降。ABTS 阳离子自由基清除率在 pH 为 4.5 时达到最大值 98.19%。酸性蛋白酶在 pH 为 4.5 时活性达到峰值, 而次优 pH 条件会导致酶活性降低。因此, 选择 pH 为 4.5 进行正交试验。

(3)酸性蛋白酶酶解温度对水解度及抗氧化性的影响

从图 9 可以看出, 当酶解温度达到 52.5 ℃时, DPPH 自由基清除率达到最大值为 97.62%; 当酶解温度升至 55.0 ℃后, ABTS 阳离子自由基清除率达到峰值为 94.06%, 温度对 DPPH 自由基清除率和 ABTS 阳离子自由基清除率影响不大。温度达到 47.5 ℃之后水解度略微下降再上升。这可能是因为随着温度的升高, 酶的构象和活性中心发生了改变, 导致酶的活性降低, 从而使得酶与底物的反应效率下降。因此, 选择酶解温度为 52.5 ℃进行正交试验。

(4)酸性蛋白酶酶添加量对水解度及抗氧化性的影响

由图 10 可知, 酶添加量超过 20000 U, 水解度先降低后升高。酶添加量对 DPPH 自由基清除率的影响比较明显, 酶添加量在 20000 U 时有较高的 DPPH 自由基清除能力, 自由基清除率为 95.67%, 酶添加量为 30000 U 时水解度显示出下降趋势, 因为酶量较大时, 蛋白质的相对浓度较小, 酶被饱和, 部分酶分子将不能与蛋白质分子结合, 酶量过大, 在实际生产中会加大成本[30]。综上所述, 酶添加量 20000 U 进行下一步正交试验。

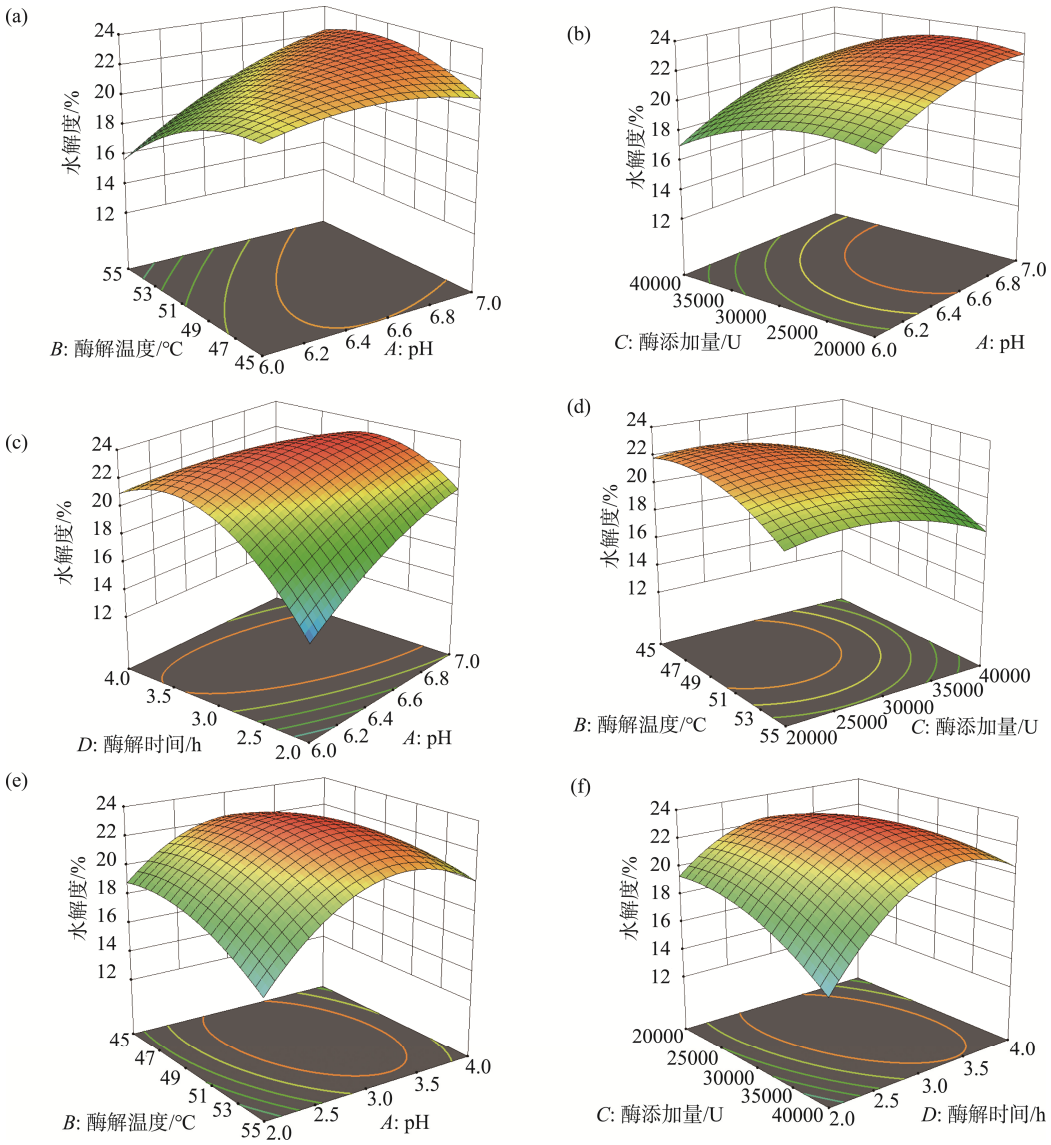


图 6 过程变量的响应曲面图

Fig.6 Response surface of process variables

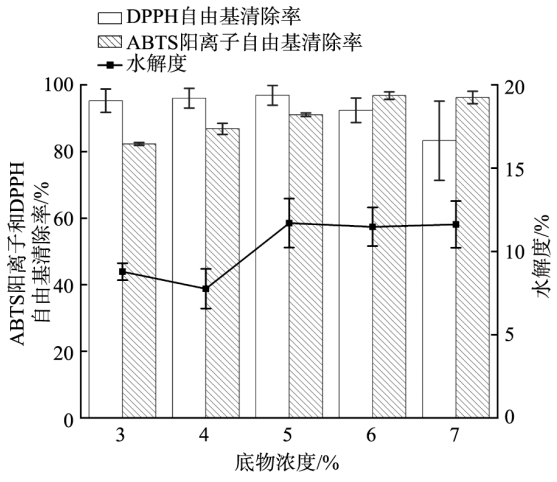


图 7 酸性蛋白酶酶解的底物浓度对水解度及抗氧化性的影响

Fig.7 Effects of substrate concentration on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of acid protease hydrolysis

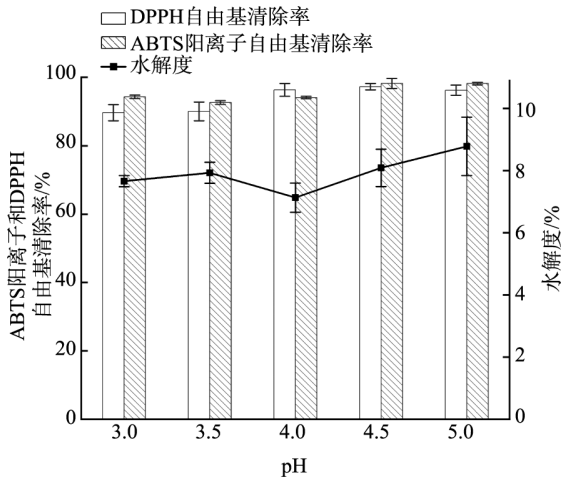


图 8 酸性蛋白酶酶解 pH 对水解度及抗氧化性的影响

Fig.8 Effects of pH on degree of hydrolysis and antioxidant activity of acid protease hydrolysis

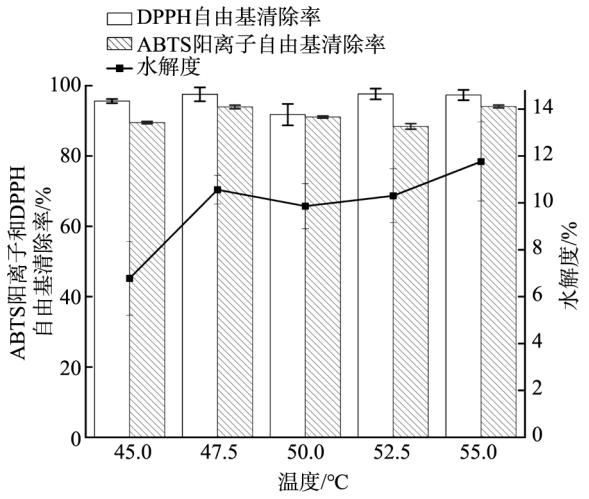


图 9　酸性蛋白酶酶解的温度对水解度及抗氧化性的影响

Fig.9　Effects of enzymolysis temperature on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of acid protease hydrolysis

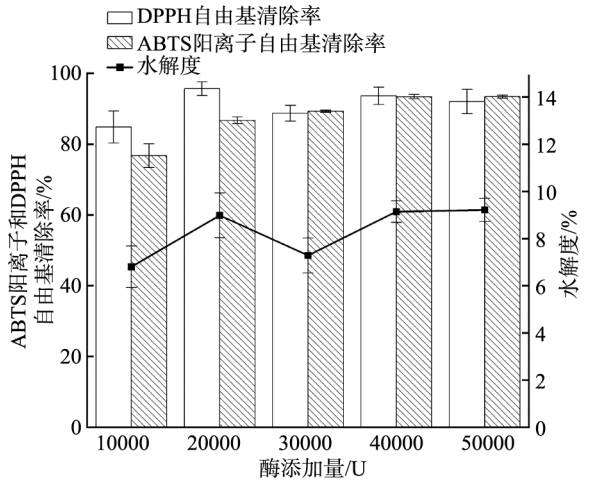


图 10　酸性蛋白酶酶解的酶添加量对水解度及抗氧化性的影响

Fig.10　Effects of enzyme addition on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of acid protease hydrolysis

(5)酸性蛋白酶酶解时间对水解度及抗氧化性的影响

从图 11 可知, 随着酶解时间延长, DPPH 自由基清除率在 2 h 达到最高, 之后下降后升高, ABTS 阳离子自由基清除率在 1 h 达到最高, 之后在 2 h 骤然下降后波动变化。在酶解的 1~3 h 时, 水解度的变化较大, 主要原因是酶解开始时酶的活力很高, 产物抑制较小, 3 h 以后水解度略微上升, 继续延长时间并不能明显增加水解度。可能是因为在酶解后期, 溶液中底物减少, 蛋白质分子可结合位点减少, 产物增多对反应产生抑制作用。为节约时间成本, 选择酶解时间为 3 h 作为最优水平。

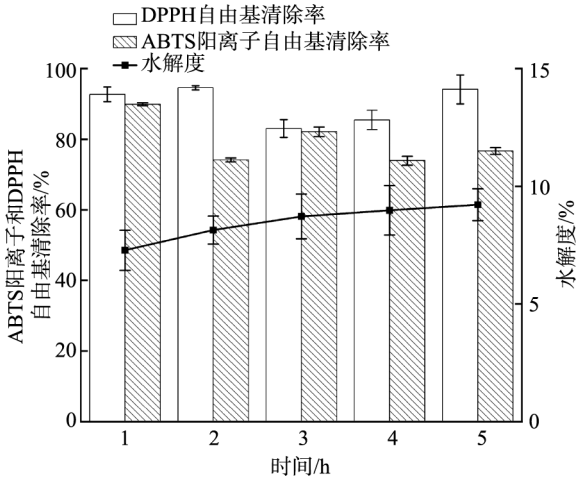


图 11　酸性蛋白酶酶解时间对水解度及抗氧化性的影响

Fig.11　Effects of hydrolysis time on degree of hydrolysis and antioxidant activity of acid protease hydrolysis

(6)正交试验对酸性蛋白酶酶解最佳条件的优化试验

各因素对核桃蛋白水解度正交试验设计及结果如表6所示。由极差分析可知, 各个因素的先后顺序为酶添加量>酶解温度>底物浓度>pH, 最优提取工艺为 $E_1F_3G_2H_3$。所以酸性蛋白酶酶解的最佳工艺为在 50.0 ℃的温度下酶解, pH 为 5, 底物浓度为 5.0%, 酶添加量为 30000 U, 酶解持续时间为 3 h。

表 6　各因素对核桃蛋白水解度正交试验设计及结果

Table 6　Orthogonal test design and results of various factors on the degree of hydrolysis of *Juglans regia* L. protein

编号	*E*: 酶解温度/℃	*F*: pH	*G*: 底物浓度/%	*H*: 酶添加量/U	水解度/%
1	1	1	1	1	9.78
2	1	2	3	2	14.48
3	1	3	2	3	22.23
4	2	1	3	3	16.61
5	2	2	2	1	8.85
6	2	3	1	2	8.61
7	3	1	2	2	10.92
8	3	2	1	3	14.71
9	3	3	3	1	7.99
K_1	46.49	37.31	33.10	26.62	
K_2	34.07	38.04	41.99	34.01	

表 6(续)

编号	*E*: 酶解温度/℃	*F*: pH	*G*: 底物浓度/%	*H*: 酶添加量/U	水解度/%
K_3	33.61	38.83	39.08	53.55	
k_1	15.50	12.44	11.03	8.87	
k_2	11.36	12.68	14.00	11.34	
k_3	11.20	12.94	13.03	17.85	
极差 *R*	4.30	0.50	2.97	8.98	
影响因素主次			*H>E>G>F*		
最优组合			$E_1F_3G_2H_3$		

(7)酸性蛋白酶最优条件验证

根据得到的最优酶解条件进一步做验证试验, 上述条件下进行 3 次平行试验, 得到核桃蛋白酶解液的平均水解度为 21.76%±2.94%, 说明所选最优工艺合理。

2.3 梯次酶解工艺酶解产物抗氧化活性及水解度

在进行完整梯次酶解工艺之后酶解产物的水解度为 43.74%±0.95%, ABTS 阳离子自由基清除率 92.14%±0.09%, DPPH 清除率为 87.55%±0.15%。

3 结论与讨论

核桃肽是核桃榨油后的副产物的高值产品, 本研究以梯次酶解法来对核桃蛋白进行酶解, 来制备核桃肽。以核桃粕为原材料, 碱性蛋白酶、中性蛋白酶及酸性蛋白酶来制备核桃抗氧化肽。通过以水解度和 DPPH 自由基清除率及 ABTS 阳离子自由基清除率为指标, 用单因素试验来确定影响核桃蛋白酶解的主要影响因素和水平, 利用响应面分析法和正交试验法来确定核桃梯次酶解的最佳工艺。最终试验结果为: 碱性蛋白酶的最佳工艺为在 48.5 ℃下进行酶解, pH 为 10.8, 底物浓度为 5.2%, 酶添加量为 40000 U, 酶解持续时间为 4 h[22]; 中性蛋白酶的最佳工艺为在 51 ℃的温度下酶解, pH 为 6.87, 底物浓度为 5%, 酶添加量为 28000 U, 酶解持续时间为 3 h; 酸性蛋白酶酶解的最佳工艺为在 50.0 ℃的温度下酶解, pH 为 5.0, 底物浓度为 5%, 酶添加量为 30000 U, 酶解持续时间为 3 h。在进行完整酶解工艺之后酶解产物的水解度为 43.74%±0.95%, ABTS 阳离子自由基清除率 92.14%±0.09%, DPPH 清除率为 87.55%±0.15%。

本研究只关注碱性酶解后滤渣再次利用酶解工艺优化, 并未深入探讨不同工艺对肽的影响研究。核桃蛋白梯次酶解比只经过碱性蛋白酶单酶水解, 工艺复杂度及产物更多。目前常用碱溶酸沉后酶解制备肽, 工艺可控且水解效率高。通过碱溶酸沉法可去除油脂和非蛋白质杂质, 提高蛋白溶解性[31]; 去除干扰物质后, 酶特异性作用最大化, 提升水解度和抗氧化活性[32], 但该方法成本高、步骤烦琐(需碱溶、酸沉、离心、洗涤、冻干等), 还可能使部分蛋白质功能性丧失或构象改变。复合酶解作为制备核桃抗氧化肽的重要方式, 相比于单酶解, 可提高肽得率和肽的活性[33], 但因受酶解条件限制, 是否适合工业化生产还有待进一步验证。目前工业多采用核桃粕再脱脂后酶解, 无需碱溶酸沉制备蛋白, 使生产流程简化、节约试剂且降低环境压力, 且较好保留核桃饼粕中的少量油脂和纤维等基质。梯次酶解可通过逐步释放细胞壁中的蛋白质, 结合不同 pH 下蛋白质结构松弛状态, 产生更广泛肽段分布, 且避免烦琐提取步骤[34], 能够更加充分利用蛋白资源, 为生产提供依据。但后续仍需进一步验证不同工艺及梯次酶解顺序对核桃肽功能性质的影响。

参考文献

[1] 门德盈, 代佳和, 汤木果, 等. 核桃肽制备及生物活性的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(23): 367–376.
Men Deying, Dai Jiahe, Tang Muguo, et al. Research progress on preparation and biological activity of walnut peptide [J]. Food Science, 2022, 43(23): 367–376.

[2] Fan Luhao, Mao Xiaoying, Wu Qingzhi. Purification, identification and molecular docking of novel antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates [J]. Molecules, 2022, 27(23): 8423.

[3] 袁雨汛, 王亚敏, 余靖, 等. 响应面法优化反胶束前萃取核桃蛋白工艺[J]. 食品工业, 2025, 46(6): 75–80.
Yuan Yuxun, Wang Yamin, Yu Jing, et al. Optimization of reverse micelle pre-extraction process of walnut protein by response surface method [J]. The Food Industry, 2025, 46(6): 75–80.

[4] 刘闯, 马建爽, 柏映国, 等. 豆粕酶解工艺中常用酶制剂的酶学性质研究进展[J]. 生物技术进展, 2025, 15(4): 573–586.
Liu Chuang, Ma Jianshuang, Bai Yingguo, et al. Research progress on enzymatic properties of commonly used enzymes in enzymatic hydrolysis of soybean meal [J]. Current Biotechnology, 2025, 15(4): 573–586.

[5] 马建伟. 羊肚菌蛋白抗氧化肽的制备及抗运动疲劳活性研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(9): 163–169.
Ma Jianwei. Study on the preparation of antioxidant peptides from morchella protein and its anti-exercise fatigue activity [J]. China Brewing, 2023, 42(9): 163–169.

[6] 豁银强, 刘传菊, 聂荣祖, 等. 核桃蛋白的组成、制备及特性研究进展[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(12): 191–197.
Huo Yinqiang, Liu Chuanju, Nie Rongzu, et al. Research progress on composition, preparation and characteristics of walnut protein [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(12): 191–197.

[7] Abdel-Hamid M, Otte J, Gobba D C, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins [J]. International Dairy Journal, 2017, 66: 91–98.

[8] 张缓. 核桃粕水解蛋白的制备及其特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2018: 1–12.
Zhang Huan. Study on preparation and characteristics of walnut meal hydrolyzed protein [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2018: 1–12.

[9] Clare D A, Swaisgood H E. Bioactive milk peptides: a prospectus [J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(6): 1187–1195.

[10] Hu Yuxi, Ni Ce, Wang Yingying, et al. Research progress on the preparation and function of antioxidant peptides from walnuts [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(19): 14853.

[11] 丁航, 徐德峰, 李彩虹. 核桃蛋白水解肽改善大鼠酒精性认知下降的作用机制[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(19): 6290–6298.
Ding Hang, Xu Defeng, Li Caihong. The mechanism of walnut protein hydrolysate peptide in improving alcoholic cognitive decline in rats [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(19): 6290–6298.

[12] Meng Meng, She Ziyi, Feng Yinyin, et al. Optimization of extraction process and activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from walnut meal [J]. Foods, 2024, 13(7): 1067.

[13] Mao Ruixue, Wu Lan, Zhu Na, et al. Immunomodulatory effects of walnut (*Juglans regia* L.) oligopeptides on innate and adaptive immune responses in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2020(73): 104068.

[14] 廖彦超, 刘妍, 张钧橙, 等. 糖基化改性对核桃肽结构及功能特性的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(2): 219–229.
Liao Yanchao, Liu Yan, Zhang Juncheng, et al. Effects of glycosylation modification on the structure and functional properties of walnut peptides [J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(2): 219–229.

[15] 郝云涛, 珠娜, 李勇. 核桃肽制备工艺的研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 253–257.
Hao Yuntao, Zhu Na, Li Yong. Research progress on preparation technology of walnut peptide [J]. The Food Industry, 2020, 41(5): 253–257.

[16] 刘莹莹, 庞晓宇, 郭聪聪, 等. 发酵核桃粕中有助于维持血糖健康水平肽的分析及降血糖机制[J]. 食品科学, 2025, 46(6): 38–46.
Liu Yingying, Pang Xiaoyu, Guo Congcong, et al. Analysis of peptides in fermented walnut meal that help to maintain blood glucose health level and its hypoglycemic mechanism [J]. Food Science, 2025, 46(6): 38–46.

[17] Hou Yongqing, Wu Zhenlong, Dai Zhaolai, et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: industrial production, bioactive peptides, and functional significance [J]. Bioactive Peptides from Food, 2022, 8: 209–232.

[18] 刘东伟, 袁玮琼, 柳梅, 等. 核桃粕蛋白抑菌肽的制备工艺及纯化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 185–191.
Liu Dongwei, Yuan Weiqiong, Liu Mei, et al. Preparation and purification of walnut meal protein antibacterial peptide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 185–191.

[19] 邸红艳, 马海乐, 王洋, 等. 超声辅助提取核桃粕蛋白的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 164–172.
Di Hongyan, Ma Haile, Wang Yang, et al. Study on ultrasonic-assisted extraction of walnut meal protein [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 164–172.

[20] 缪福俊, 宁德鲁. 核桃多肽生物活性研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 48–51.
Miao Fujun, Ning Delu. Research progress on biological activity of walnut peptides [J]. China Oils and Fats, 2021, 46(3): 48–51.

[21] 李敏, 岳晓华, 薛慧清, 等. 响应面法优化黄芪蛋白水解工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5758–5765.
Li Min, Yue Xiaohua, Xue Huiqing, et al. Optimization of astragalus protein hydrolysis process by response surface method and its antioxidant activity [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(14): 5758–5765.

[22] 韦雅虹. 酶解法制备核桃肽及其相关产品开发[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2024: 9–24.
Wei Yahong. Enzymatic preparation of walnut peptide and its related product development [D]. Ala'er : University of Tarim, 2024: 9–24.

[23] 冷帅辰. 长白山松仁抗氧化肽的制备、分离纯化及鉴定[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015: 8–34.
Leng Shuaichen. Preparation, purification and identification of antioxidant peptides from Changbai Mountain pine nuts [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015: 8–34.

[24] Kong Baohua, Xiong Youling. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(16): 6059–6068.

[25] 程赞, 赵晓燕, 张晓伟, 等. 核桃分离蛋白酶解产物结构与功能的变化[J]. 中国油脂, 2022, 47(6): 85–91.
Cheng Zan, Zhao Xiaoyan, Zhang Xiaowei, et al. Changes in structure and function of enzymatic hydrolysates of walnut protein isolate [J]. China Oils and Fats, 2022, 47(6): 85–91.

[26] 高云龙, 徐梦豪, 赵祥忠. 响应面优化冰岛刺参内脏团抗氧化肽制备工艺及其组成分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 235–243.
Gao Yunlong, Xu Menghao, Zhao Xiangzhong. Optimization of preparation process and composition analysis of antioxidant peptides from viscera of *Apostichopus japonicus* by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 235–243.

[27] 田裕心, 彭亚博, 姚昱锟, 等. 响应面优化鲍鱼内脏抗氧化肽制备工艺及其活性[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 110–115.
Tian Yuxin, Peng Yabo, Yao Yukun, et al. Response surface optimization of abalone viscera antioxidant peptide preparation process and its activity [J]. The Food Industry, 2019, 40(4): 110–115.

[28] 陈琪, 何静, 吉日木图. 骆驼胎盘抗氧化肽的制备及其稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 234–242.
Chen Qi, He Jing, Ji Rimutu. Study on preparation and stability of antioxidant peptide from camel placenta [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(12): 234–242.

[29] 杨晓月. 核桃粕降血脂肽的制备及其降血脂作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2021: 9–23.
Yang Xiaoyue. Study on preparation of hypolipidemic peptide from walnut meal and its hypolipidemic effect [D]. Xi'an: Shanxi Normal University, 2021: 9–23.

[30] 卢忠魁, 张璐璐, 张雷. 油莎豆粕小分子肽的制备、鉴定及功能分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(22): 305–312.
Lu Zhongkui, Zhang Lulu, Zhang Lei. Preparation, identification and functional analysis of small molecular peptides from *Cyperus esculentus* meal [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(22): 305–312.

[31] 祝素莹, 朱瑜, 张银志, 等. 复合蛋白酶水解核桃粕制备血管紧张素转化酶抑制肽工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(17): 56–63.
Zhu Suying, Zhu Yu, Zhang Yinzhi, et al. Process optimization of preparation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from walnut meal by compound protease hydrolysis [J]. Food Research and Development, 2020, 41(17): 56–63.

[32] 林燕, 陈计峦, 胡小松, 等. 酶解核桃蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 204–207, 212.
Lin Yan, Chen Jiluan, Hu Xiaosong, et al. Study on the preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of walnut protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(4): 204–207, 212.

[33] 李遇豪, 李道明, 田智辉, 等. 核桃饼(粕)的组成与加工应用研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(5): 131–140.
Li Yuhao, Li Daoming, Tian Zhihui, et al. Research progress on composition and processing application of walnut cake (meal) [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2024, 45(5): 131–140.

[34] 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, 36(12): 94–99.
Kang Weili, Tang Junhu, Jing Siqun. Optimization of process conditions for enzymatic hydrolysis of walnut protein to prepare antioxidant peptides [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(12): 94–99.

(责任编辑: 安香玉　曹岱琳)