

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.03.012

王薇, 李亚娟, 蒋悦, 等. 核桃蛋白的酶解及脱色工艺优化[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(3): 105-112.

WANG W, LI Y J, JIANG Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and decolorization process of walnut protein[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(3): 105-112.

# 核桃蛋白的酶解及脱色工艺优化

王薇<sup>1</sup>, 李亚娟<sup>2</sup>, 蒋悦<sup>3</sup>, 沈明娟<sup>3</sup>

(1. 赣南卫生健康职业学院, 江西 赣州 341000;

2. 雪山中心学校, 云南 临沧 675906;

3. 西南林业大学 生命科学学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 为高值化利用油脂加工工业的副产物——核桃饼粕, 采用碱溶酸沉法从冷榨核桃饼中提取核桃蛋白(walnut protein, WP), 以水解度为指标, 用单因素和正交实验优化胰蛋白酶的最优酶解工艺; 以脱色率和蛋白回收率为指标, 确定核桃蛋白酶解液的最佳脱色工艺条件。结果表明, 所提取核桃蛋白样品的纯度较高, 可用于下一步的酶解和脱色实验。胰蛋白酶酶解核桃蛋白的最优条件为: pH7.5、底物浓度3% (W/V)、温度55 °C、加酶量6 250 U/g 蛋白质、酶解时间5 h。在此条件下核桃蛋白的水解度可达21.08%。活性炭对核桃蛋白酶解液的最优脱色工艺为: pH为4.5、活性炭用量为1.2% (W/V)、温度为45 °C、脱色时间为90 min。在此条件下脱色率为78.05%, 蛋白回收率为82.16%, 加权综合评分为80.11分。优化了胰蛋白酶水解核桃蛋白和酶解液脱色的工艺, 可为核桃饼粕的开发利用提供借鉴。

**关键词:** 核桃饼粕; 胰蛋白酶; 水解度; 脱色; 蛋白回收率

中图分类号: TS209 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)03-0105-08

## Optimization of Enzymatic Hydrolysis and Decolorization Process of Walnut Protein

WANG Wei<sup>1</sup>, LI Ya-juan<sup>2</sup>, JIANG Yue<sup>3</sup>, SHEN Ming-juan<sup>3</sup>

(1. Gannan Healthcare Vocational College, Ganzhou, Jiangxi 341000, China;

2. Xueshan Central School, Lincang, Yunnan 675906, China;

3. College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

**Abstract:** This paper aimed at the high-value utilization of walnut cake, a by-product of oil processing industry. The walnut protein (WP) was extracted by alkali extraction-acid precipitation method from cold-pressed walnut cake, then trypsin hydrolysis process was optimized by single factor experiment and orthogonal design, with degree of hydrolysis (DH) as the indicator. Subsequently, the decolorization process of WP hydrolysate was optimized with protein recovery rate and decolorization rate as the indicators. The results showed that the extracted walnut protein was of high purity and could be used for further enzymatic hydrolysis and decolorization tests. After optimization, the DH of WP could be increased to 21.08% under the following conditions: the substrate concentration of 3%, the hydrolysis temperature of 55 °C, the enzyme addition of 6 250 U/g protein, and the enzymatic hydrolysis time of 5 h. The optimal process of

收稿日期: 2021-11-21

基金项目: 云南省高层次人才引进计划(81210411)

Supported by: Program of Introducing High-level Talents to Yunna Province (No. 81210411)

作者简介: 王薇, 女, 1987年出生, 本科, 讲师, 研究方向为生物医药及农林资源开发利用。E-mail: 270872438@qq.com.

decolorization of walnut protease hydrolysate was obtained at an activated carbon addition of 1.2% (W/V), a pH of 4.5, a adsorption temperature of 45 °C, and a decolorization time of 90 min. Under these conditions, the decolorization rate of walnut protease hydrolysate was 78.05%, protein recovery rate was 82.16%, and the combined weighted mean score was 80.11. The optimization process of trypsin hydrolysis and decolorization could provide some references for the development and utilization of walnut cake.

**Key words:** walnut cake; trypsin; degree of hydrolysis (DH); decolorization; protein recovery rate

核桃 (*Juglans regia L.*) 富含油脂、蛋白质及维生素等营养成分, 其中蛋白质含量占比 14%~28%, 消化吸收率可达 85%<sup>[1-2]</sup>。核桃仁经榨油后的饼粕是潜在的食品蛋白质来源, 但因所含蛋白质的加工特性不理想, 且色泽较深, 限制了其在食品工业上的高值化应用。

酶法水解蛋白质具有反应条件温和、高效、成本低等优点<sup>[3]</sup>。研究发现核桃蛋白经不同程度酶解后, 其溶解度、持水性、乳化性能、起泡性能等加工特性有所提高<sup>[4-5]</sup>, 此外, 核桃蛋白的抗氧化活性、二肽基肽酶 IV 抑制肽含量等也显著增加<sup>[6-8]</sup>。因此, 可通过蛋白酶的选择和参数的优化, 获得水解度 (degree of hydrolysis, DH) 较高的蛋白酶解产物, 从而达到改善其功能性质的目的。但由于蛋白质经酶解后色泽加深, 限制了其在食品工业等领域的应用。活性炭吸附常用于蛋白酶解液的脱色, 如焦涵等研究了活性炭对卵黄多肽的最优脱色工艺<sup>[9]</sup>, 肖怀秋等优化了活性炭对花生蛋白酶解液的脱色工艺<sup>[10]</sup>, 而目前关于核桃蛋白酶解液脱色方面的研究较少, 活性炭脱色可能会使蛋白被吸附损失, 因此如何控制脱色的工艺条件, 以获得理想的脱色率和蛋白回收率, 是核桃蛋白酶解液脱色的关键。

本文以核桃饼粕中蛋白质为研究对象, 采用单因素和正交实验优化胰蛋白酶水解核桃蛋白的工艺条件, 并以脱色率和蛋白回收率为考察指标, 优化活性炭对核桃蛋白酶解液的脱色工艺, 以期获得优良加工特性的核桃蛋白制品, 本文对于核桃产业加工副产物的进一步开发利用具有一定意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

冷榨核桃饼: 由迪庆香格里拉舒达有机食品有限公司提供。胰蛋白酶 (酶活力 70 000 U/g)、

Folin-酚试剂: 索莱宝生物科技有限公司; 牛血清蛋白: 上海伯奥生物科技有限公司; 氢氧化钠、盐酸、活性炭: 天津市大茂化学试剂厂。以上试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

5804R 型多功能台式高速冷冻离心机: 美国 Eppendorf 公司; FJ200-SH 数显高速分散均质机: 上海标本模型厂; UV-2600 紫外可见分光光度计: 日本岛津公司; F50 型酶标仪: 瑞士 Tecan 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 工艺流程

冷榨核桃饼→粉碎过筛→碱提酸沉→核桃蛋白→酶解工艺的优化→灭酶 (90 °C, 15 min) →离心→上清液→脱色工艺的优化<sup>[11]</sup>

#### 1.3.2 核桃蛋白的制备

采用碱溶酸沉法提取核桃蛋白。核桃饼粕经粉碎过 60 目筛后, 按料液比 1:25 (W/V) 加入蒸馏水, 以 NaOH 溶液调 pH 至 8.7, 于 48 °C 搅拌提取 1 h 后, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液以盐酸溶液调至 pH 5 并在 4 °C 静置过夜, 按上述条件离心取沉淀洗涤至中性, 冻干为核桃蛋白 (walnut protein, WP)<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.3 冷榨核桃饼和核桃蛋白主要理化指标的测定

观察冷榨核桃饼、所提取核桃蛋白样品的色泽和形态, 其粗蛋白、水分、粗脂肪和灰分含量分别按照 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》、GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》、GB 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》和 GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》中方法测定。

#### 1.3.4 核桃蛋白酶解单因素实验

称取 0.25 g 核桃蛋白, 控制底物质量浓度为 3% (W/V), pH 为 7.5, 酶解温度为 55 °C, 加酶量为 5 000 U/g, 分别酶解 1, 2, 3, 4 和 5 h, 经

90 °C, 15 min 灭酶后, 测定相应条件下核桃蛋白酶解液的水解度, 考察酶解时间对核桃蛋白酶解度的影响。

同时, 固定其它酶解参数条件, 分别以底物浓度 (2%、3%、4%、5%和 6%, W/V), 酶解温度 (45、50、55、60 和 65 °C), 加酶量 (2 500、3 750、5 000、6 250 和 7 500 U/g) 为单因素变量, 考察底物浓度、酶解温度、加酶量对核桃蛋白酶解度的影响<sup>[16]</sup>。

### 1.3.5 核桃蛋白酶解正交实验

根据单因素实验所得结果, 以酶解时间、底物浓度、酶解温度、加酶量为影响因素, 每个因素选 3 个水平, 设计  $L_9(3^4)$  正交实验 (如表 1 所示), 以水解度为指标, 确定胰蛋白酶酶解核桃蛋白的最优条件。

表 1 酶解工艺正交实验因素水平表

Table 1 Factor level of enzymolysis orthogonal experiment

水平	因素			
	A 时间/h	B 底物浓度/(%, W/V)	C 温度/°C	D 加酶量/(U/g)
1	3	2	50	5 000
2	4	3	55	6 250
3	5	4	60	7 500

### 1.3.6 水解度的测定

核桃蛋白酶解液的水解度参照公式 (1) 和 (2) 计算。其中酶解液的总氮含量采用凯氏定氮法测定, 氨基氮的含量采用甲醛滴定法测定, 分别称取一定量的两份样品于三角烧瓶, 一份加入中性红指示剂 2~3 滴, 用 0.100 mol/L NaOH 溶液滴定终点, 另一份加入麝香草酚酞 3 滴和中性甲醛 20 mL, 摇匀, 以 0.100 mol/L NaOH 准溶液滴定至淡蓝色<sup>[13]</sup>。

$$DH = \frac{N}{N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: DH 为酶解液的水解度, %; N 为氨基氮含量, %;  $N_0$  为总氮含量, %。

$$N = \frac{0.1 \times (V_2 - V_1) \times 0.014}{W} \times 100\% \quad (2)$$

式中: N 为氨基氮含量, %;  $V_1$  为以中性红为指示剂滴定到终点所消耗的标准 NaOH 溶液体积, mL;  $V_2$  为以麝香草酚酞为指示剂滴定到终点所消耗的标准 NaOH 溶液体积, mL; W 为样品的重

量, g。

### 1.3.7 核桃蛋白酶解液脱色的单因素实验

取核桃蛋白酶解液 50 mL, 调 pH 至 4.5, 分别添加 0.6%、0.8%、1.0%、1.2% 和 1.4% 的活性炭 (W/V), 于 45 °C 水浴 90 min 后, 6 000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定吸光度值和蛋白质含量, 以脱色率和蛋白质回收率为指标, 考察活性炭添加量对脱色效果的影响。

同时, 固定其它脱色参数条件, 分别以 pH (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0)、温度 (35、40、45、50、55 °C)、时间 (30、45、60、75、90 min) 为单因素变量, 考察 pH、温度和时间对脱色效果的影响。

### 1.3.8 核桃蛋白酶解液脱色的正交实验

在单因素实验的基础上, 选取活性炭用量、pH、温度、时间四个因素进行正交实验, 每个因素三个水平, 选择  $L_9(3^4)$  正交表进行实验, 分别以脱色率、蛋白回收率和加权评分为考察指标, 优化核桃蛋白酶解液的脱色工艺, 正交实验因素水平表如表 2 所示。

表 2 脱色工艺正交实验因素水平表

Table 2 Factor level of decolorization orthogonal experiment

水平	因素			
	A 时间/min	B 活性炭用量/%	C pH	D 温度/°C
1	60	1.0	3.5	40
2	75	1.2	4.0	45
3	90	1.4	4.5	50

### 1.3.9 核桃蛋白酶解液的脱色评价方法

取一定体积核桃蛋白酶解液, 添加 1.2% (W/V) 的活性炭, 调节 pH 为 4.5, 并保温 90 min 后, 于 6 000 r/min 离心 15 min, 取上清液分别测定吸光度值和蛋白质含量, 根据公式 (3) 和 (4) 计算脱色率和蛋白质回收率<sup>[14]</sup>。采用公式 (5) 的加权评分法考察酶解液的脱色效果<sup>[10,15]</sup>。

$$X = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: X 为脱色率, %;  $A_0$  为核桃蛋白酶解液在 314.5 nm 处的吸光度; A 为核桃蛋白酶解液在 314.5 nm 处的吸光度。

$$Y = \frac{W_1}{W_2} \times 100\% \quad (4)$$

式中:  $Y$  为蛋白回收率, %;  $W_1$  为脱色后蛋白质的含量, mg/mL;  $W_2$  为脱色前蛋白质含量, mg/mL。

$$Z = 0.5X + 0.5Y \quad (5)$$

式中:  $Z$  为脱色综合评分;  $X$  为脱色率, %;  $Y$  为蛋白回收率, %。

#### 1.4 数据分析

所有实验重复 3 次, 正交实验采用 SPSS 软

件分析, 采用 OriginPro 2019b 64-bit 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷榨核桃饼、核桃蛋白的主要物理化学指标

冷榨核桃饼、核桃蛋白的主要物理化学指标如表 3 所示。相较冷榨核桃饼, 所提取的核桃蛋白色泽较浅, 粒度较小, 粗脂肪、水分和灰分含量低, 粗蛋白含量接近 90%, 说明核桃蛋白样品的纯度较高, 可用于下一步的酶解和脱色实验。

表 3 冷榨核桃饼及核桃蛋白的主要物理化学指标

Table 3 Main physicochemical indicators of cold-pressed walnut meal and WP

指标	色泽	形态	粗蛋白	粗脂肪	水分	灰分
冷榨核桃饼	深褐色	片状	59.61±0.58	10.32±1.16	11.48±0.64	6.72±0.85
核桃蛋白	浅黄色	粉状	89.23±0.77	2.81±0.83	3.89±0.37	1.87±0.51

### 2.2 核桃蛋白酶解单因素水平的确定

#### 2.2.1 加酶量对核桃蛋白水解度的影响

胰蛋白酶添加量对核桃蛋白水解度的影响如图 1 所示, 随着胰蛋白酶添加量的增大 (2 500~6 250 U/g), 核桃蛋白水解度的增幅较大, 而当加酶量继续增加 (>6 250 U/g), 水解度上升的趋势变缓, 因此综合成本等因素, 选择胰蛋白酶添加量为 6 250 U/g 进行下一步实验。

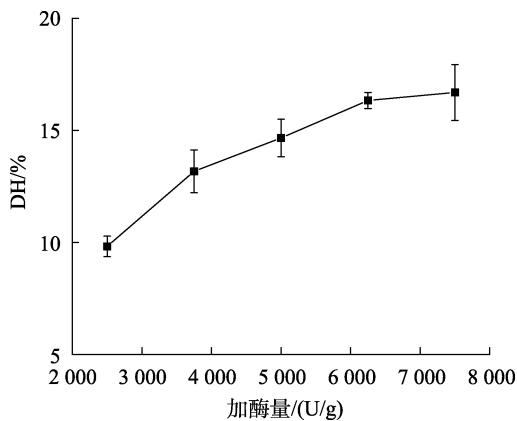


图 1 加酶量对核桃蛋白水解度的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on DH of WP

#### 2.2.2 底物浓度对核桃蛋白水解度的影响

底物浓度对核桃蛋白水解度的影响如图 2 所示, 随着底物浓度的增加 (1%~3%, W/V), 核桃蛋白的水解度大幅度上升, 但当底物浓度达 3% (W/V) 后, 水解度呈下降趋势, 这可能是因为在低底物浓度时, 核桃蛋白分散液的流动性好, 酶与核桃蛋白更易接触反应, 从而使水解度呈上

升趋势<sup>[17]</sup>; 而当底物浓度>3% (W/V), 蛋白分散液的流动性变小, 不利于酶的作用, 水解度也随之下降。因此, 底物浓度宜选取 3% (W/V) 进行正交实验。

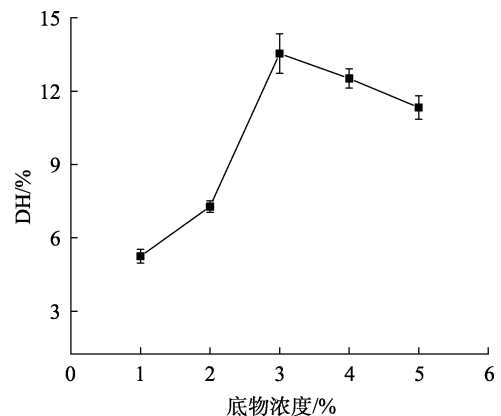


图 2 底物浓度对核桃蛋白水解度的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on DH of WP

#### 2.2.3 酶解温度对核桃蛋白水解度的影响

酶解温度对核桃蛋白水解度的影响如图 3 所示, 随着酶解温度的升高 (45~55 °C), 核桃蛋白的水解速度随之加快, 而当温度升高到一定程度 (>55 °C), 酶在高温的作用下变性甚至失活, 导致核桃蛋白的水解度下降<sup>[18]</sup>。因此, 选取酶解温度为 55 °C 进行下一步优化。

#### 2.2.4 酶解时间对核桃蛋白水解度的影响

酶解时间对核桃蛋白水解度的影响如图 4 所示, 随着酶解时间的增加, 核桃蛋白的水解度一开始呈大幅上升的趋势, 而当酶解时间超过 4 h

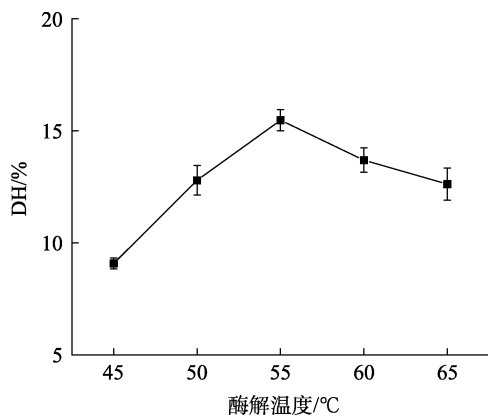


图 3 酶解温度对核桃蛋白水解度的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis temperature on DH of WP

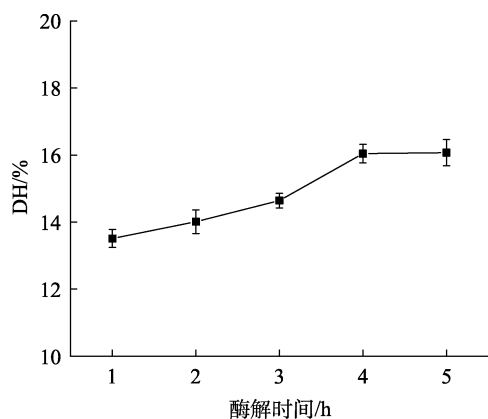


图 4 酶解时间对核桃蛋白水解度的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis time on DH of WP

后, 水解度增幅减缓, 综合考虑生产效率和时间成本, 选择酶解时间 4 h 进行正交实验优化。

### 2.3 正交实验优化核桃蛋白酶解工艺

核桃蛋白酶解的正交实验结果及分析如表 4 所示。由极差  $R$  可知, 影响核桃蛋白酶解的各因素主次顺序为  $B$  (底物浓度)  $> C$  (温度)  $> D$  (加酶量)  $> A$  (时间), 核桃蛋白的最佳酶解工艺为  $A_3B_2C_2D_2$ , 即底物浓度 3%, 加酶量 6 250 U/g, 酶解温度 55 °C, 酶解时间 5 h, 在此条件下核桃蛋白的水解度最大。为避免偶然实验因素造成误差, 对优化的酶解工艺进行验证, 测得水解度为 21.08%, 高于表 4 中的最大水解度 (19.24%), 说明  $L_9(3^4)$  正交实验优化的核桃蛋白酶解工艺准确可靠。

### 2.4 核桃蛋白酶解液脱色单因素水平的确定

#### 2.4.1 活性炭用量对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

活性炭对核桃蛋白酶解液脱色的单因素实验

结果如图 5 所示。随着活性炭用量的增大, 核桃蛋白的脱色率逐渐增大, 回收率逐渐减小。这是由于活性炭的用量增大, 比表面积也随之增加, 可更高效地吸附酶解液中的色素物质, 同时, 活性炭也会吸附酶解液中的蛋白 (肽), 导致蛋白含量的降低<sup>[19-20]</sup>。当活性炭用量为 1.2% (W/V) 时, 脱色率达 68.68%, 蛋白回收率为 81.75%, 可在保留大部分核桃蛋白的前提下达到较好的脱色效果, 因此选择活性炭用量为 1.20% (W/V) 进行正交实验。

表 4 酶解正交实验结果及分析

Table 4 Results and analysis of enzymolysis orthogonal experiment

实验号	A 时间/h	B 底物浓度/%	C 温度/°C	D 加酶量/(U/g)	水解度/%
1	1	1	1	1	9.28
2	1	2	2	2	19.24
3	1	3	3	3	14.78
4	2	1	2	3	12.97
5	2	2	3	1	16.09
6	2	3	1	2	14.90
7	3	1	3	2	13.24
8	3	2	1	3	16.87
9	3	3	2	1	15.63
$k_1$	14.43	11.83	13.68	13.67	
$k_2$	14.65	17.40	15.95	15.79	
$k_3$	15.25	15.10	14.70	14.87	
$R$	0.81	5.57	2.26	2.13	
因素主次	$B > C > D > A$				
优组合	$A_3B_2C_2D_2$				

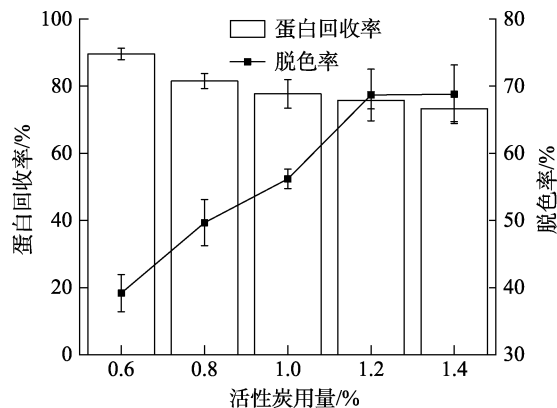


图 5 活性炭用量对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

Fig.5 Effect of activated carbon dosage on decolorization of WP hydrolytes

#### 2.4.2 pH 对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

pH 对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响如图 6

所示。当 pH 值为 2.0~3.0 时, 活性炭对酶解液的脱色率逐渐增大, 蛋白回收率逐渐减小; 而当 pH 值为 3.0~6.0 时, 活性炭对酶解液脱色率逐渐减小, 蛋白回收率逐渐增大。可能是因为酶解液中的色素物质在酸性条件下与活性炭有较强的亲和力, 因而更容易被吸附脱色, 同时, pH 的变化也会影响蛋白酶解物的电荷和活性炭的表面化学性质, 导致一些小肽被活性炭吸附损失<sup>[14]</sup>。综合考虑蛋白回收率和脱色率, 选择脱色 pH 值 4.0 进行下一步实验。

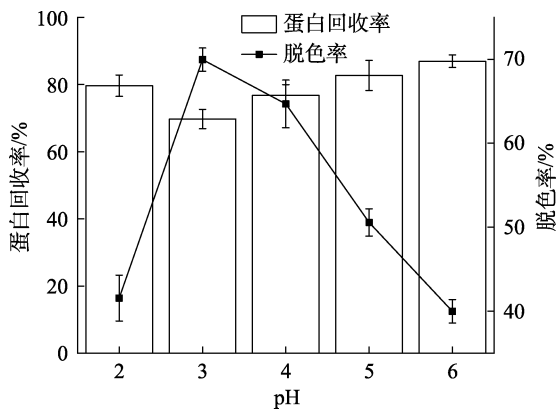


图 6 pH 对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

Fig.6 Effect of pH on decolorization of WP hydrolytes

#### 2.4.3 温度对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

温度对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响如图 7 所示。随着温度的升高, 酶解液的脱色率呈先上升后下降的趋势, 而蛋白回收率则呈下降的趋势。这是由于温度升高可使酶解液的粘度降低, 有利于色素物质的扩散, 从而与活性炭充分接触, 增强脱色的效果。但温度继续升高 (>50 °C) 不利于物理吸附, 脱色率随之下降<sup>[19]</sup>。综合考虑蛋

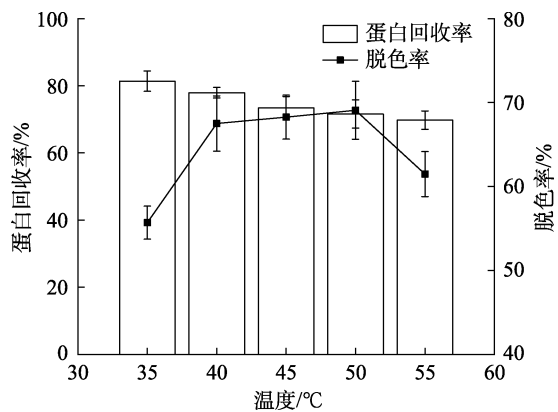


图 7 温度对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

Fig.7 Effect of incubating temperature on decolorization of WP hydrolytes

白回收率和脱色率, 选择脱色温度 45 °C 进行优化实验。

#### 2.4.4 时间对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

时间对酶解液脱色效果的影响如图 8 所示。随着脱色时间的延长, 脱色率逐渐增大, 蛋白回收率则逐渐减小。当脱色时间为 75 min 时, 脱色效果较好, 且蛋白回收率也相对较高。因此选择脱色时间为 75 min 进行下一步实验。

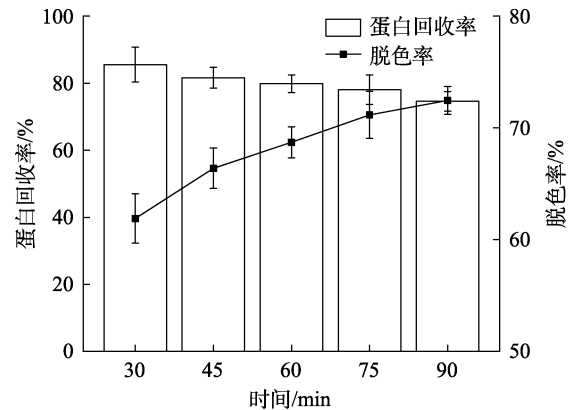


图 8 时间对核桃蛋白酶解液脱色效果的影响

Fig.8 Effect of incubating time on decolorization of WP hydrolytes

## 2.5 正交实验优化核桃蛋白酶解液的脱色工艺

核桃蛋白酶解液脱色正交实验的结果和直观分析如表 5 所示。影响核桃蛋白酶解液脱色率各因素主次顺序为 C(pH) > B(活性炭用量) > A(时间) > D(温度), 最高脱色率的工艺为  $A_3B_2C_1D_3$ , 即 pH 为 3.0, 活性炭用量为 1.2% (W/V), 温度为 50 °C, 脱色时间为 90 min。影响核桃蛋白酶解液中蛋白回收率的各因素主次顺序为 C(pH) > B(活性炭用量) > D(温度) > A(时间), 最高蛋白回收率的工艺为  $A_1B_2C_3D_1$ , 即 pH 为 5.0, 活性炭用量为 1.2% (W/V), 温度为 40 °C, 脱色时间为 60 min。对加权综合评分影响的主次顺序为 B(活性炭用量) > C(pH) > A(时间) > D(温度), 最佳综合评分组合为  $A_3B_2C_2D_2$ , 即 pH 为 4.5, 活性炭用量为 1.2% (W/V), 温度为 45 °C, 脱色时间为 90 min。为避免偶然因素造成误差, 对加权综合评分的最佳实验条件进行验证, 测得脱色率为 78.05%, 蛋白回收率为 82.16%, 加权综合评分为 80.11, 说明  $L_9(3^4)$  正交实验优化的核桃蛋白酶解液最佳脱色工艺准确可靠。

表5 核桃蛋白酶解液脱色正交实验结果及分析  
 Table 5 Results and analysis of decoloring orthogonal experiment of WP hydrolytes

实验号	A 时间/ min	B 活性 炭用 量/%	C pH	D 温度/ ℃	脱色 率/%	蛋白 回收 率/%	加权 综合 评分/分
1	1	1	1	1	69.47	79.79	74.63
2	1	2	2	2	70.88	87.73	79.31
3	1	3	3	3	59.08	87.27	73.18
4	2	1	2	3	66.04	83.43	74.74
5	2	2	3	1	61.04	89.65	75.35
6	2	3	1	2	75.37	78.06	76.72
7	3	1	3	2	56.02	86.85	71.44
8	3	2	1	3	78.30	80.16	79.23
9	3	3	2	1	69.32	85.23	77.28
<hr/>							
脱色率/ %	$k_1$	66.48	63.84	74.38	66.61		
	$k_2$	67.48	70.07	68.75	67.42		
	$k_3$	67.88	67.92	58.71	67.81		
	$R$	1.40	6.23	15.67	1.20		
<hr/>							
蛋白回 收率/%	$k_1$	84.93	83.36	79.34	84.89		
	$k_2$	83.71	85.85	85.46	84.21		
	$k_3$	84.08	83.52	87.92	83.62		
	$R$	1.22	2.49	8.59	1.27		
<hr/>							
加权综 合评分/ 分	$k_1$	75.71	73.60	76.86	75.75		
	$k_2$	75.60	77.96	77.11	75.82		
	$k_3$	75.98	75.73	73.32	75.72		
	$R$	0.38	4.36	3.79	0.11		

### 3 结论

本文以水解度为考察指标,通过单因素和正交实验确定胰蛋白酶酶解核桃蛋白的最佳工艺为底物浓度 3% (W/V),温度 55 °C,加酶量为 6 250 U/g,酶解时间 5.0 h,在此条件下核桃蛋白的水解度为 21.08%。以脱色率和蛋白回收率的加权综合评分为考察指标,确定了活性炭对核桃蛋白酶解液脱色的最佳工艺条件为 pH 为 4.5,活性炭用量 1.2% (W/V),温度 45 °C,脱色时间为 90 min,在此条件下脱色率为 78.05%,蛋白回收率为 82.16%,加权综合评分为 80.11 分。研究可为核桃饼粕中蛋白质的高值化利用提供一定参考。

### 参考文献:

[1] MAO X, HUA Y. Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.)[J]. International journal of molecular sciences, 2012, 13(2): 1561-1581.  
 [2] 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 Y, LIU C, NIE R, et al. Research progress on the composition, preparation and properties of walnut protein[J]. Journal of the Chinese cereals and oils association, 2020, 35(12): 191-197.  
 [3] LI X, GUO M, CHI J, et al. Bioactive peptides from walnut residue protein[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1285.  
 [4] 刘猛, 史婷. 不同水解度对核桃分离蛋白酶解物功能特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 25-29.  
 LIU M, SHI T. Effects of different degree of hydrolysis on functional characteristics of enzymatic hydrolysate of walnut protein[J]. Food research and development, 2020, 41(19): 25-29.  
 [5] 张余, 刘洋, 陈志宏, 等. 双指标评价核桃蛋白酶法增溶改性[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(12): 27-33.  
 ZHANG C, LIU Y, CHEN Z, et al. Enzymatic solubilization modification of walnut protein evaluated with double indices[J]. Journal of the Chinese cereals and oils association, 2019, 34(12): 27-33.  
 [6] MOGHADAM M, SALAMI M, MOHAMMADIAN M, et al. Physicochemical and bio-functional properties of walnut proteins as affected by trypsin-mediated hydrolysis[J]. Food bioscience, 2020, 36, 100611.  
 [7] SUN Q, MA Z F, ZHANG H, et al. Structural characteristics and functional properties of walnut glutelin as hydrolyzed: effect of enzymatic modification[J]. International journal of food properties, 2019, 22(1): 265-279.  
 [8] KONG X, ZHANG L, SONG W, et al. Separation, identification and molecular binding mechanism of dipeptidyl peptidase iv inhibitory peptides derived from walnut (*Juglans Regia* L.) protein[J]. Food chemistry, 2021, 347(2): 129062.  
 [9] 焦涵, 陈杰, 顾璐萍, 等. 卵黄多肽的工业化制备及脱色工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 139-145.  
 JIAO H, CHEN J, GU L, et al. Industrial production and decolorization of egg yolk polypeptides[J]. Food and fermentation industries, 2021, 47(11): 139-145.  
 [10] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. 冷榨花生蛋白酶解液活性炭脱色工艺的响应面优化研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(10): 34-38.  
 XIAO H, LI Y, LIN Q, et al. Optimization of bleaching of cold-pressed peanut protein hydrolysate with activated carbon by response surface methodology[J]. China oils and fats, 2014, 39(10): 34-38.  
 [11] GOLLY M K, MA H, DUAN Y, et al. Effect of multi-frequency countercurrent ultrasound treatment on extraction optimization, functional and structural properties of protein isolates from walnut (*Juglans Regia* L.) meal[J]. Journal of food biochemistry, 2020, 44(6): e13210.  
 [12] QIN Z, GUO X, LIN Y, et al. Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical and functional properties of walnut (*Juglans Regia* L.) protein isolate[J]. Journal of the science of food & agriculture, 2013, 93(5): 1105-1111.  
 [13] GOLLY M K, MA H, DUAN Y, et al. Enzymolysis of walnut (*Juglans Regia* L.) meal protein: ultrasonication-assisted alkaline

- pretreatment impact on kinetics and thermodynamics[J]. *Journal of food biochemistry*, 2019, 43(8): e12948.
- [14] XIAO C, LIN Z, SU G, et al. Effect of solution ph and activated carbon dosage on the decolorization ability, nitrogen components and antioxidant activity of peanut meal hydrolysate[J]. *International journal of food science & technology*, 2015, 49(12): 2571-2577.
- [15] 刘振锋, 戴圣佳, 黄小鸣, 等. 活性炭对鱿鱼皮酶解液脱色效果的研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(16): 261-265.  
LIU Z, DAI S, HUANG X, et al. Effect of activated carbon on decolorization of squid skin protein hydrolysate[J]. *Science and technology of food industry*, 2015, 36(16): 261-265.
- [16] 马雅鸽, 张希, 杨婧娟, 等. 核桃饼粕蛋白提取、多肽制备条件优化及其酶解液的抗氧化性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 151-157.  
MA Y, ZHANG X, YANG J, et al. Study on protein extraction, polypeptide preparation and antioxidant activity of walnut pulp hydrolysate[J]. *Science and technology of food industry*, 2020, 41(11): 151-157.
- [17] 李佳. 芝麻油加工副产物提取蛋白质及制备蛋白肽的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.  
LI J. The research on extracting protein and preparing protein[D]. Taian: Shandong agricultural university, 2016.
- [18] 郭刚军, 邹建云, 胡小静, 等. 液压榨澳洲坚果粕酶解制备多肽工艺优化[J]. *食品科学*, 2016, 37(17): 173-178.  
GUO G, ZOU J, HU X, et al. Optimizing the preparation of crude peptides from hydraulic macadamia nut meal by enzymatic hydrolysis[J]. *Food science*, 2016, 37(17): 173-178.
- [19] 赵谋明, 马梅, 苏国万, 等. 玉米蛋白粉的预处理方法的比较及其酶解液的脱色工艺研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(10): 131-138+130.  
ZHAO M, MA M, SU G, et al. Comparison of pretreatment methods for corn gluten meal and the study of decolorization process of corn enzymatic hydrolysate[J]. *Modern food science and technology*, 2019, 35(10): 131-138+130.
- [20] YAN L, SHI T, LI Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and activated carbon adsorption for producing high fischer ratio peptides from soy protein[J]. *International journal of peptide research and therapeutics*, 2021, 27(2): 1363-1372. 