

核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析

Enzymatic hydrolysis preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut dregs

倪 策¹ 曹天红¹ 陈 敏^{1,2} 喻 勋¹ 吴 昊¹ 文 李¹

NI Ce¹ CAO Tianhong¹ CHEN Min^{1,2} YU Xun¹ WU Hao¹ WEN Li¹

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

摘要:目的:深度利用核桃粕蛋白。方法:采用分级分离法从核桃粕中提取蛋白质后,分别用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶 5 种蛋白酶对其进行水解,并比较分析胰蛋白酶酶解物(trypsin hydrolysate, TH)、木瓜蛋白酶酶解物(papain hydrolysate, PH)、中性蛋白酶酶解物(dispace hydrolysate, DH)、碱性蛋白酶酶解物(alcalse hydrolysate, AH)和风味蛋白酶酶解物(flavourzyme hydrolysate, FPH)的抗氧化活性;以 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率和羟自由基清除率为检测指标分析不同浓度 AH 的体外抗氧化性;采用 LC-MS/MS 技术鉴定 AH 中所有肽的序列,并利用 PeptideRanker、BIOPEP-UWM 数据库和分子对接工具 AutoDock1.5.6 筛选潜在的核桃抗氧化活性肽;将上述两条肽分别与 Keap1 蛋白进行计算机模拟分子对接,并利用斑马鱼胚胎氧化损伤模型,对人工合成的两条抗氧化活性肽的抗氧化活性进行分析。结果:5 种酶解物中抗氧化活性较好的 AH 对 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基的最佳清除率分别为 $(71.56 \pm 0.75)\%$ 、 $(60.63 \pm 0.45)\%$ 、 $(98.63 \pm 0.06)\%$ 。LC-MS/MS 鉴定并通过计算机分析预测得到两条活性最优的肽,即:ALWPF 和 PLRWPF;两条抗氧化活性肽均能与 Keap1 蛋白的活性部位结合,其

结合能分别为 -9.2 、 -9.6 kJ/mol。ALWPF 和 PLRWPF 肽处理斑马鱼胚胎的安全质量浓度范围分别为 $0 \sim 50$ 、 $0 \sim 30$ $\mu\text{g/mL}$ 。结论:从核桃粕中鉴定出两条抗氧化肽,其对斑马鱼胚胎具有保护作用。

关键词:核桃蛋白;酶解工艺;抗氧化活性;LC-MS/MS;生物信息学分析;斑马鱼胚胎模型

Abstract: **Objective:** This study focused on the identification and activity analysis of antioxidant active peptides in walnut dregs protein hydrolysates. **Methods:** Protein was extracted from walnut meal by fractionation method, and five kinds of proteolytic enzymes, including trypsin, papain, neutral protease, alkaline protease and flavor protease, were used to hydrolyze the proteins. The antioxidant activity of trypsin hydrolysate (TH), papain hydrolysate (PH), dispace hydrolysate (DH), alcalse hydrolysate (AH) and flavourzyme hydrolysate (FPH) were evaluated and compared. The in vitro antioxidant activity of different concentrations of AH was determined by the detection indexes of DPPH free radical scavenging rate, ABTS free radical scavenging rate and hydroxyl free radical scavenging rate. The sequences of all peptides in AH were identified by LC-MS/MS technology, and the potential antioxidant active peptides of walnut were screened by PeptideRanker, BIOPEP-UWM database and molecular docking tool AutoDock1.5.6, and the two antioxidant active peptides were obtained. The above two peptides were simulated with Keap1 protein, and the antioxidant activity of the two antioxidant peptides was analyzed by using the zebrafish embryo oxidative damage model. **Results:** The optimal scavenging rates of AH with better antioxidant activity among the five enzymatic hydrolysates were $(71.56 \pm 0.75)\%$, $(60.63 \pm 0.45)\%$ and $(98.63 \pm 0.06)\%$, respectively. LC-MS/MS was

基金项目:湖南省科技创新计划资助(编号:2023RC3137);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:S202310536041)

作者简介:倪策,男,长沙理工大学在读本科生。

通信作者:文李(1971—),女,长沙理工大学教授,博士生导师,博士。E-mail: wl@csust.edu.cn

收稿日期:2023-11-02 **改回日期:**2024-03-08

identified by computer analysis to obtain two active ALWPF and PLRWPF peptides, both of which could bind to the active sites of Keap1 protein, with binding energies of -9.2 and -9.6 kJ/mol, respectively. The safe concentrations of zebrafish embryos treated with ALWPF and PLRWPF peptides ranged from $0 \sim 50$ $\mu\text{g/mL}$ and $0 \sim 30$ $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion:** Two antioxidant peptides were obtained from walnut meal, and the antioxidant effects of them were verified by zebrafish embryo model. The results of this study can provide a basis for the in-depth utilization of walnut protein.

Keywords: walnut protein; enzymatic hydrolysis process; antioxidant activity; LC-MS/MS; bioinformatics analysis; zebrafish embryo model

核桃是中国主要经济树种之一,广泛分布于中国的辽宁、湖南、四川和云南等 21 个省份及直辖市,其种植面积和年产量均为世界第一。核桃主要用于榨油,榨油后的核桃粕营养价值丰富,但目前对榨油之后的核桃粕利用不充分,造成了大量的资源浪费^[1]。近年来,随着生物活性肽制备技术的进步,对核桃粕中潜在生物活性肽开发逐渐受到重视。前期研究表明,酶解植物源蛋白可以获得生物活性肽^[2-4],这些肽类物质在抗氧化、抗疲劳、调节血压、提高免疫力等方面表现出显著功效^[5-6]。

目前,植物源蛋白的提取方法主要有碱提酸沉法和分级分离法,前者主要提取种子中的谷蛋白,后者可提取全部蛋白^[7]。制备生物活性肽的方法主要有酶解法、发酵法和化学合成法,其中酶解法为利用天然蛋白质制备生物活性肽最常用的方法,具有操作简单、环境污染小、原料价格低廉等优点^[8]。前人研究大多采用碱提酸沉法制备核桃蛋白,进行酶解并获得抗氧化活性肽^[9]。

生物在正常有氧代谢过程中会产生许多自由基,人体中过量的自由基会堆积在细胞内,引起氧化应激,从而破坏机体原有的氧化还原平衡,引起衰老与疾病^[10]。食源性抗氧化肽作为天然抗氧化剂的潜在来源,既可以提供营养物质,又可以通过调节活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)失活、螯合过渡金属以阻止自由基形成等方式发挥抗氧化作用^[11]。Keap1-Nrf2-ARE 是研究机体内抗氧化通路的重要路径^[12]。与体外抗氧化活性研究相比,动物试验更能真实模拟体内环境。斑马鱼体型小、繁殖力高、成本低、与哺乳动物生理相似、体内胚胎发育快,尤其是其透明度允许特定的细胞、组织和器官的可视化,故胚胎和幼体均有利于成像研究,近年来被作为一种新型试验动物模型来研究体内氧化应激和抗氧化水平^[13]。

研究拟以核桃粕为原料,采用酶解法制备核桃蛋白酶解物,并探究核桃蛋白酶解物抗氧化活性;鉴定并预测

抗氧化活性肽,合成抗氧化活性较强的肽段,并通过斑马鱼体内试验探究其抗氧化活性,旨在为核桃肽的广泛应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

核桃粕:甘肃成县九源农林产品开发有限公司;

AB 品系斑马鱼:中国科学院武汉水生所;

六水合氯化铁、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS):98%,阿拉丁试剂(上海)有限公司;

碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶:北京索莱宝科技有限公司;

L-抗坏血酸、溴甲酚绿:分析纯,西陇化工股份有限公司;

1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH): $>97\%$,上海麦克林生化科技股份有限公司;

谷胱甘肽(GSH): $\geq 98\%$,北京酷来搏科技有限公司;

甲酸: $\geq 96\%$,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

乙腈:优级纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;

其他化学试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

台式高速冷冻离心机:TGL-16 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-B8 型,常州金坛良友仪器有限公司;

恒温磁力搅拌器:HJ-3 型,江苏金怡仪器科技有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-5200 型,上海元析仪器有限公司;

pH 计:PHS-25 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

真空冷冻干燥机:LJG-25C 型,四环福瑞科仪科技发展有限公司(北京)有限公司;

超微弱发光测量仪:BPCL 型,广州微光科技有限公司;

DLAB 微量冷冻离心机:Fresco 17 型,赛默飞世尔科技公司;

真空离心浓缩仪:CV100-DNA 型,北京吉艾姆科技有限公司;

纳升液相系统:Easy-nLC1200 型,赛默飞世尔科技公司;

高分辨质谱仪:Q Exactive 型,赛默飞世尔科技公司;

除盐柱:C₁₈ Zip-Tip 型,安捷伦科技有限公司;

倒置生物显微镜:XD-101 型,南京江南永新光学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 核桃粕脱脂预处理 称取一定量核桃粕粉按料液比 1:3 (g/mL)加入正己烷,常温下搅拌 2 h 后静置,待出现明显分层后倾倒入上层清液。重复上述步骤一次,将下层沉淀置于通风橱中风干溶剂,得到脱脂核桃粕粉。

1.2.2 核桃全蛋白的提取 称取脱脂核桃粉,按料液比 1:10 (g/mL)加入去离子水,常温下搅拌 2 h,3 600 r/min 离心 30 min,上清液为清蛋白。向剩余沉淀中按料液比 1:10 (g/mL)加入 5% NaCl 溶液,常温搅拌 2 h,3 600 r/min 离心 30 min,上清液为球蛋白。向剩余沉淀中按料液比 1:10 (g/mL)加入 70% 乙醇,常温搅拌 2 h,3 600 r/min 离心 30 min,上清液置于 60 °C 水浴中搅拌至乙醇完全挥发,得到醇溶蛋白。最后向剩余沉淀中按料液比 1:20 (g/mL)加 0.1 mol/L NaOH 溶液,常温搅拌 2 h,3 600 r/min 离心 30 min,上清液为谷蛋白。上述蛋白液除醇溶蛋白外,调到相应等电点,即清蛋白 pH 4.1,球蛋白 pH 4.3,谷蛋白 pH 4.5,3 600 r/min 离心 30 min,收集沉淀。将上述蛋白沉淀混合后冻干,控制参数为冷阱温度 -74.7 °C,腔室真空 2 Pa,得到核桃全蛋白,研磨均匀后于 -80 °C 保存。

1.2.3 酶解工艺 称取一定量核桃蛋白,按料液比 1:20 (g/mL)加入去离子水,水化 2 h,每个样本设置 3 个平行试样。按表 1 所示的温度、pH 值和酶量对蛋白质进行酶解 3 h。在酶解过程中加入 0.2 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 使酶解液的 pH 始终维持在设定的范围内,记录所添加的 NaOH 体积。酶解结束后,立即置于 95 °C 水浴中灭酶处理 10 min,待酶解液冷却至室温后调节 pH 至中性,10 000 r/min 离心 20 min,上清液冻干后置于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.4 水解度测定 采用 pH-state 法,按式(1)计算水解度。

$$D_H = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

表 1 不同蛋白酶的反应条件

Table 1 Reaction conditions of different proteases

酶种类	酶解温度/°C	pH	加酶量/(U · g ⁻¹)
碱性蛋白酶	50	10.0	6 000
胰蛋白酶	37	7.0	6 000
风味蛋白酶	50	6.5	6 000
木瓜蛋白酶	65	6.5	6 000
中性蛋白酶	50	7.0	6 000

D_H ——水解度,%;

B ——消耗 NaOH 的体积,mL;

α —— α -NH₂的解离度, $\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}}$,pKa 值为 7;

N_b ——NaOH 的摩尔浓度,mol/L;

M_p ——蛋白质的质量,g;

h_{tot} ——水解度常数,7.35 mmol/g。

1.2.5 抗氧化活性测定

(1) ABTS 自由基清除能力:称取 ABTS 固体 200 mg,K₂S₂O₈ 34.4 mg 加水溶解后定容到 50 mL,暗处避光反应 24 h,作为 ABTS 母液。将母液与 95% 乙醇按一定比例混合,使其在 734 nm 处的吸光度维持在 0.70 ± 0.02,作为 ABTS 测定溶液(现配现用)。分别称取不同酶解产物配制成 0.25 mg/mL 的待测液。在离心管中加入 0.4 mL 酶解物待测液和 3.6 mL ABTS 测定液作为样品组;用去离子水替代酶解物待测液作为空白组。充分混合均匀后,暗处避光反应 5 min。用空白组调零,测定 734 nm 吸光度。按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

$$P = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

P ——ABTS 自由基清除率,%;

A_b ——ABTS⁺溶液与样品溶剂混合液的吸光度;

A_s ——待测溶液与 ABTS⁺溶液混合液的吸光度。

(2) DPPH 自由基清除能力:分别称取不同酶解产物配制成 2 mg/mL 的待测液。在离心管中加入 1 mL 酶解物待测液与 3 mL 50 μg/mL DPPH 溶液(无水乙醇为溶剂),作为样品组;将 DPPH 溶液换成无水乙醇作为对照组;将待测液换成去离子水作为空白组;充分混合均匀后,立即置于暗处避光反应 30 min。在波长 517 nm 处,测定其吸光度。按式(3)计算 DPPH 自由基清除率。

$$P = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

P ——DPPH 自由基清除率,%;

A_s ——待测溶液与 DPPH 溶液混合液的吸光度;

A_c ——待测溶液与无水乙醇溶液混合液的吸光度;

A_b ——DPPH 溶液与样品溶剂混合液的吸光度。

(3) 羟自由基清除能力:利用紫外超微弱发光测量仪进行测定。称取不同酶解产物配制成 1 mg/mL 的待测液,在测量前,先用 pH 7.5 的硼砂—硼酸缓冲溶液润洗测量管,依次加入多肽待测液 50 μL、1.5 mmol/L 邻菲罗啉 50 μL、1.25 mmol/L CuSO₄ 50 μL、0.25 mmol/L 抗坏血酸 20 μL 和 pH 7.5 的硼砂—硼酸缓冲溶液 780 μL,轻弹测量管,加入 30% H₂O₂ 50 μL 后立即放入反应池中,盖好盖子,测定发光强度。设置测定程序为反应时间

50 min, 每 0.1 s 测定一次发光强度, 待出现明显峰值后停止测量, 记录峰值。以去离子水代替多肽待测液, 测定其发光强度, 并记录峰值, 作为空白; 按式(4)计算羧基清除率。

$$P = \frac{S_{\text{空白}} - S_{\text{样品}}}{S_{\text{空白}}} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

P ——羧基清除率, %;

$S_{\text{空白}}$ ——空白组荧光吸光峰值;

$S_{\text{样品}}$ ——样品荧光吸光峰值。

(4) 总还原能力: 在 Wang 等^[14]的基础上优化。称取不同酶解产物配制成 0.5 mg/mL 的待测液。取 1 mL 待测液, 加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH 6.6) 和 2.5 mL 1.0% $K_3[Fe(CN)_6]$, 混合均匀后置于 50 °C 水浴 25 min, 立即加入 0.5 mL 10% 三氯乙酸溶液停止反应, 10 000 r/min 离心 5 min; 取 2.5 mL 上清液, 分别加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL $FeCl_3$, 室温反应 10 min。用去离子水调零, 于 700 nm 下测定溶液的吸光度。以吸光度大小表示总还原能力的大小。

以上试验均以 GSH 作为阳性对照, 设定 3 次平行试验。

1.2.6 LC-MS/MS 测序分析

(1) 多肽除盐: 取碱性蛋白酶解产物溶于清洗液 (含 0.1% FA 和 2% ACN) 之后转移至超滤离心管 (0.5 mL, 10 kD) 中, 用冷冻离心机 4 °C, 12 000 × g , 离心 10 min; 将超滤后的溶液使用 C_{18} 除盐柱进行脱盐处理, 再用洗脱液 (含 0.1% FA 和 60% ACN) 洗脱样品, 洗脱溶液转至新 EP 管, 将洗脱后的多肽样品进行离心浓缩干燥。

(2) LC-MS/MS 分析: 除盐后多肽样品经离心干燥, 重新溶解于 100 μ L Nano-LC 流动相 A (0.1% 甲酸/水) 中装瓶上样, 进行在线 LC/MS 分析。2 μ L 溶解后的样品上样至 Nano Viper C_{18} 预柱 (3 μ m, 10 nm), 20 μ L 体积冲洗脱盐。高效液相分析采用 Easy nLC 1200 型纳升液相系统, 样品在预柱上脱盐保留后再经分析柱分离, 分析柱规格为 C_{18} 反相色谱柱 (Acclaim PepMap RSLC, 75 μ m × 25 cm C_{18} , 2 μ m, 10 nm), 60 min 内流动相 B (80% 乙腈, 0.1% 甲酸) 由 5% 升高至 38%。采用 ThermoFisher Q Exactive 质谱系统结合纳升喷雾 Nano Flex 离子源分析氨基酸序列。喷雾电压为 1.9 kV, 离子传输管加热温度为 275 °C。质谱扫描方式为信息依赖的采集工作模式下 (data dependent analysis, DDA), 一级质谱扫描分辨率为 70 000, 扫描范围 100 ~ 1 500 (m/z), 最大注入时间 100 ms。每次 DDA 循环下最多采集 20 个电荷量为 $1^+ \sim 3^+$ 的二级图谱, 二级质谱离子最大注入时间为 50 ms。碰撞室能量设定为 28 eV, 适用于所有前体离子; 动态排

除时间设置为 6 s。

1.2.7 抗氧化活性肽的筛选及模拟分子对接 参照 Wang 等^[15]的方法, 将多肽序列提交至 PeptideRanker 数据库 (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 进行生物活性肽预测。预测根据多肽的氨基酸组成、排列顺序、所带电荷和其他性质判定其具有生物活性的可能性 (介于 0 与 1 之间), 越接近 1, 表明其具有生物活性的概率越大。手动将参数阈值设置为 0.5, 并将所有高于 0.5 的多肽序列保存到 Excel 表格中。将上述预测的生物活性肽序列提交到 BIOPEP-UWM 数据库 (https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php) 中进行抗氧化活性的预测。通过对比所提交肽段与数据库中肽段的同源性, 筛选出可能具有抗氧化活性的肽段以及抗氧化活性的氨基酸位点。分子对接被广泛应用于研究蛋白质和肽类的相互作用和结合亲和力^[16]。在软件 AutoDock 1.5.6 上对 Keap1 蛋白质分子进行去水加氢, Keap1 蛋白为受体与核桃肽对接; 应用内置 vina 程序对接 9 次, 并输出对接完成的小分子“pbdqt”格式。在 PyMol 2.3.0 中画出核桃肽与 Keap1 蛋白结合能最高的接触图、细节图; 应用 Discovery Studio 4.5 展示结合部位的键参数; 应用 LigPlot+ v 2.2.8 将 3D 模型转换为 2D 平面展示图。

1.2.8 斑马鱼养殖及抗氧化模型构建 在 14 h/10 h 的光/暗循环、水温为 (28.0 ± 0.5) °C 的条件下饲养斑马鱼, 每天 3 次 (8:00、12:00、17:00) 喂食脱壳丰年虾卵。按雌雄比 1:2 将斑马鱼成鱼分开放入隔上隔板的繁育缸中, 第 2 天抽取隔板, 通过光照刺激雌鱼产卵, 收取胚胎。为构建 H_2O_2 诱导斑马鱼胚胎模型, 设置试验组和对照组分别用 60 μ g/L 海盐溶液配制的 1.2, 3.4, 5 mmol/L 的 H_2O_2 溶液和 60 μ g/L 海盐溶液处理; 均于 28.5 °C 培养箱中培养; 每组设置 6 个平行。每 24 h 记录胚胎存活数量并换液, 连续观察 96 h; 计算 96 h 时的半致死浓度。

1.2.9 核桃酶解物体内抗氧化活性测定 参照邹娅雪等^[17]的方法略加修改。设置对照组为 60 μ g/L 海盐溶液, 试验组分别用 60 μ g/L 海盐溶液配制的 0.2, 2.0, 10.0, 20.0, 200.0 mg/mL 的酶解物处理; 于 28.5 °C 培养箱中培养; 每组设置 6 个平行。每 24 h 记录胚胎存活数量并换液, 连续观察 96 h。设置试验组、 H_2O_2 损伤组和对照组分别用 60 μ g/L 海盐溶液配制的 1 mL 40 mg/mL 酶解物和 4 mmol/L H_2O_2 (共 2 mL) 混合处理、浓度为 2 mmol/L H_2O_2 溶液处理和 60 μ g/L 海盐溶液处理; 于 28.5 °C 培养箱中培养; 每组设置 6 个平行。每 24 h 记录胚胎存活数量并换液, 连续观察 96 h。

1.2.10 核桃肽体内毒性测定 对核桃肽的安全性进行测试。设置对照组和试验组分别用 60 μ g/L 海盐溶液配制的 10, 30, 50, 70, 90 μ g/mL 的核桃肽溶液和 60 μ g/L

海盐溶液处理;每组设置 3 个平行。24 h 后记录胚胎存活数量。

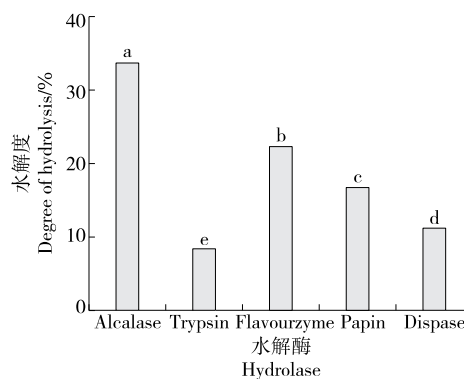
1.2.11 核桃肽对 H_2O_2 诱导损伤的斑马鱼胚胎的保护作用 参照 Ko 等^[13]的方法略改。设置试验组、 H_2O_2 损伤组 and 对照组,在采用核桃肽保护处理斑马鱼胚胎 24 h 后,分别加入 60 $\mu\text{g/L}$ 海盐溶液配制的 10 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 核桃肽、半致死浓度的 H_2O_2 和 60 $\mu\text{g/L}$ 海盐溶液;均于 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养;每组设置 6 个平行。每 24 h 记录胚胎存活数量并换液,连续观察 96 h。

1.2.12 统计分析 运用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,设置最小显著水平为 0.05 进行分析及差异显著性检验。对不同处理数据进行 Duncan 多重比较,数据以平均值土标准差表示。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶的水解度分析

研究表明,相对分子质量小于 3 000 的肽段具有更强的抗氧化活性,水解程度越高,获得小分子肽的可能性越大^[18]。如图 1 所示,碱性蛋白酶的水解度为 $(33.74 \pm 0.21)\%$,胰蛋白酶的水解度为 $(8.47 \pm 0.34)\%$,风味蛋白酶的水解度为 $(22.40 \pm 0.36)\%$,木瓜蛋白酶的水解度为 $(16.86 \pm 0.36)\%$,中性蛋白酶的水解度为 $(11.25 \pm$



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

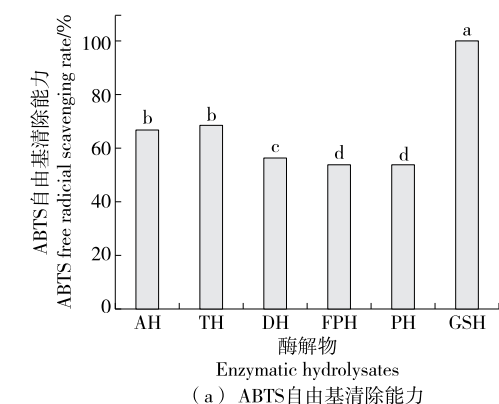
图 1 5 种酶水解度的测定

Figure 1 Determination of hydrolysis degree of five kinds of enzymes ($n=3$)

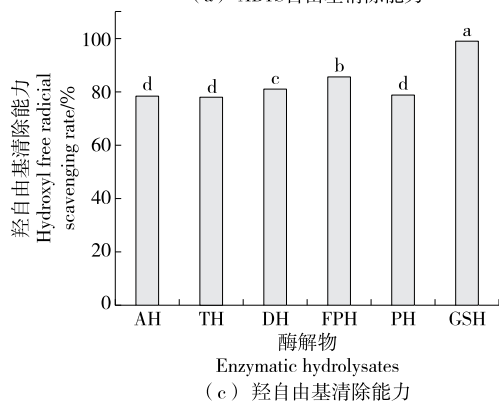
0.30) %。碱性蛋白酶的酶切位点比其他 4 种酶多,能够使得更多的肽键发生断裂,因而水解度更高。

2.2 5 种酶解产物的抗氧化活性分析

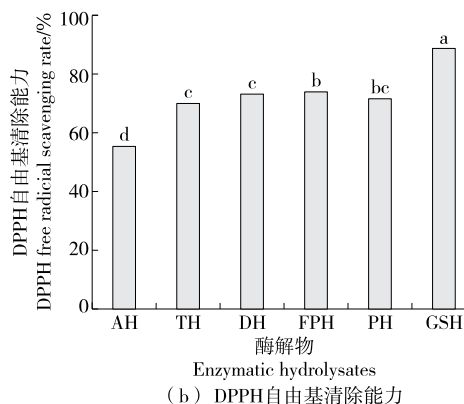
2.2.1 ABTS 自由基清除能力 如图 2(a) 所示,TH、AH、DH、FPH 和 PH 的 ABTS 自由基清除率为 54.11%~68.59%,其中 AH 与 TH 清除效果显著高于其余 3 种酶解物,分别为 $(67.06 \pm 0.36)\%$ 与 $(68.59 \pm$



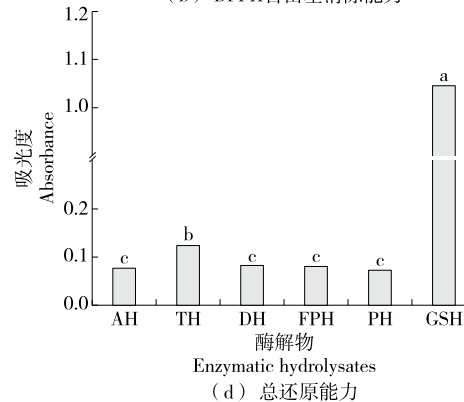
(a) ABTS 自由基清除能力



(c) 羟自由基清除能力



(b) DPPH 自由基清除能力



(d) 总还原能力

字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 5 种酶解产物的抗氧化能力测试

Figure 2 Antioxidant capacity test of five enzymatic hydrolysates ($n=9$)

1.05)%。Gu 等^[19]通过胰蛋白酶水解核桃蛋白得到多肽,当多肽质量浓度为 0.5 mg/mL 时,其 ABTS 自由基清除率为 $(69.21 \pm 7.66)\%$;而试验中,蛋白酶水解物质量浓度仅为 0.25 mg/mL,其 ABTS 自由基清除率已接近 Gu 等^[19]报道的数据。

2.2.2 DPPH 自由基清除能力 如图 2(b)所示,酶解物对 DPPH 自由基的清除率为 $55.32\% \sim 73.82\%$,由高到低依次为 FPH、TH、PH、NPH 和 AH。阳性对照 GSH 的清除率为 $(88.71 \pm 0.29)\%$ 。李丽等^[20]研究结果表明,核桃肽的 DPPH 自由基清除率在一定浓度下随着浓度的增加而升高,且质量浓度为 5 mg/mL 时,其清除率达 75%。试验中,5 种蛋白酶产物的质量浓度为 2 mg/mL,均具备较高的 DPPH 自由基清除率。

2.2.3 羟自由基清除能力 如图 2(c)所示,5 种蛋白酶的酶解物均具有很高的羟自由基清除能力,且在试验范围内无显著变化。其中,FPH 的羟自由基清除能力最佳,为 $(85.54 \pm 1.48)\%$ 。阳性对照 GSH 的清除率为 $(99.12 \pm 1.39)\%$ 。罗燕等^[21]利用碱性蛋白酶水解核桃蛋白得到多肽,当酶解物质量浓度为 1 mg/mL 时,羟自由基清除率为 21.44%;而试验中,相同质量浓度酶解物,具有更高的羟自由基清除能力,可能为分级分离提取的核桃全蛋白较碱提酸沉蛋白种类更多,因而其酶解产物可产生更多的抗氧化活性肽。

2.2.4 总还原能力 如图 2(d)所示,5 种蛋白酶的酶解产物都表现出很低的还原能力。其中还原力最高的是 TH,吸光度为 0.124 ± 0.014 ,而阳性对照 GSH 的吸光度为 1.046 ± 0.003 ,远高于酶解物。根据贾靖霖等^[22]的研究结果,核桃多肽的总还原能力与其质量浓度存在相关性,低浓度的多肽会表现出较低的还原能力;当多肽质量浓度达到 120 mg/mL 时,其还原能力与 V_C 接近。试验中,使用的蛋白酶解物质量浓度仅为 0.5 mg/mL,但均表现出一定程度的总还原能力。

5 种酶解产物均具有较强的抗氧化活性。核桃全蛋白通过酶促水解释放出具有抗氧化活性的肽段,但由于不同蛋白酶的酶切位点不同,所得肽段的相对分子质量、氨基酸序列不同,导致其抗氧化活性存在差异。

综上所述,相比其他 4 种酶解物,AH 的体外抗氧化活性较高^[23]。因此,继续对 AH 进行深入的体外和体内抗氧化活性分析。

2.3 AH 体外抗氧化测定

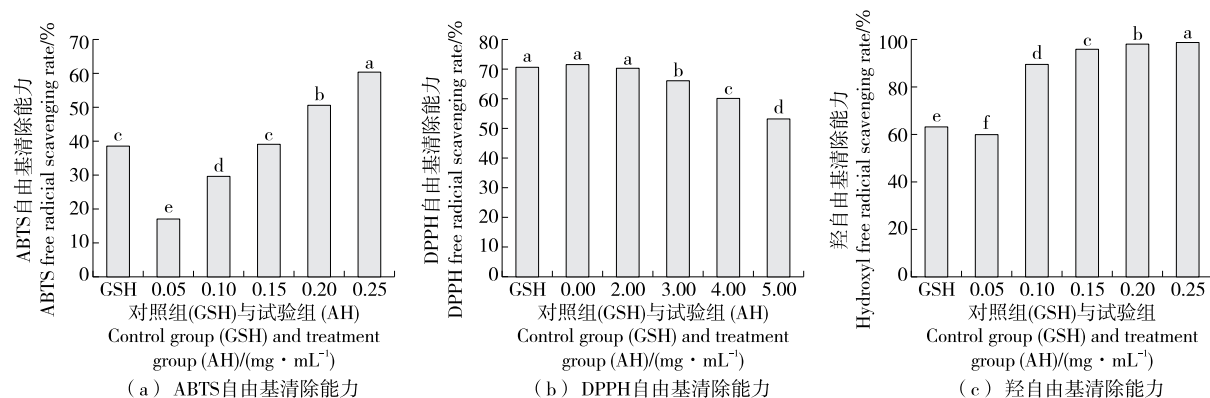
使用 3 种常用的体外抗氧化模型来进行抗氧化测定,结果(图 3)表明,5.00 mg/mL AH 的羟自由基清除率为 $(98.63 \pm 0.06)\%$;0.25 mg/mL AH 的 ABTS 自由基清除率为 $(60.63 \pm 0.45)\%$;0.50 mg/mL AH 的 DPPH 自由基清除率为 $(71.56 \pm 0.75)\%$,均高于 GSH。贺舒雯等^[24]发现,虾壳肽 DPPH 自由基和羟自由基的清除率分别为 $(46.35 \pm 1.32)\%$, $(75.22 \pm 2.18)\%$,与之相比 AH 清除能力更高。由此可见,AH 具有良好的体外自由基清除能力。

2.4 H_2O_2 诱导斑马鱼氧化应激损伤模型建立

H_2O_2 引起的氧化应激会造成体内氧化系统与抗氧化系统作用失衡,使体内产生过多高活性分子,从而造成组织损伤^[25]。由图 4 可知,与对照组的斑马鱼胚胎存活率相比,在 48 h 之内各浓度处理下的斑马鱼胚胎存活率相近;浓度 >2 mmol/L H_2O_2 处理后的斑马鱼胚胎存活率在 48 h 后显著降低。经过直线内插法^[26]得出 H_2O_2 处理斑马鱼胚胎的半致死浓度约为 2 mmol/L。

2.5 AH 毒性测试及其保护作用分析

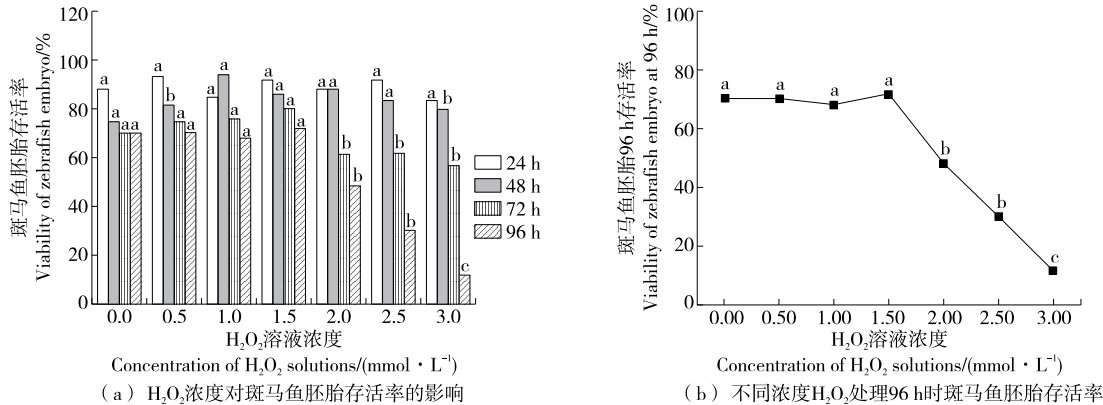
酶解提取物对于动物细胞的毒性测试是有必要的。AH 处理斑马鱼胚胎的安全质量浓度范围为 2 ~ 200 mg/mL;其中质量浓度为 2,20 mg/mL 的 AH 可显著提高胚胎存活率(图 5);20 mg/mL AH 对 H_2O_2 损伤处理后的斑马鱼胚胎具有保护作用,存活率可恢复至与空白组相当的水平(图 6)。



字母不同表示显著性差异 ($P < 0.05$)

图 3 不同质量浓度 AH 的抗氧化活性

Figure 3 Antioxidant activity of different concentrations of AH ($n = 3$)



字母不同表示显著性差异 ($P<0.05$)

图 4 斑马鱼胚胎损伤模型的建立

Figure 4 Establishment of a zebrafish embryo injury model ($n=4$)

2.6 抗氧化活性肽的序列鉴定及生物信息学预测

利用LC-MS/MS及生物信息学技术对AH进行肽

组学分析,共获得 1 391 条肽序。通过 PeptideRanker 和 BIOPEP-UWM 数据库搜寻并对生物活性肽和抗氧化活性肽进行筛选,共获得 217 条潜在抗氧化活性肽,占所鉴定肽数目的 15.60%,其中 70.07%抗氧化活性肽长度小于 10 个氨基酸。试验所预测的部分抗氧化活性肽序列见表 2,相应的 MS/MS 图谱见图 7。

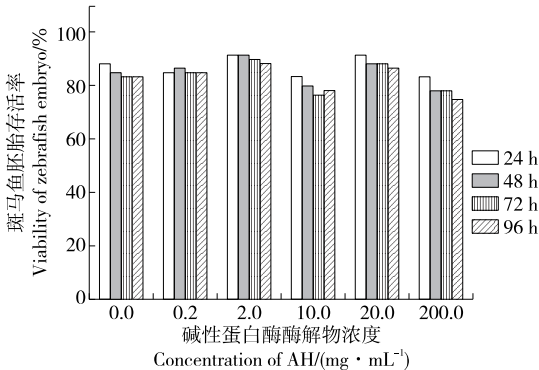
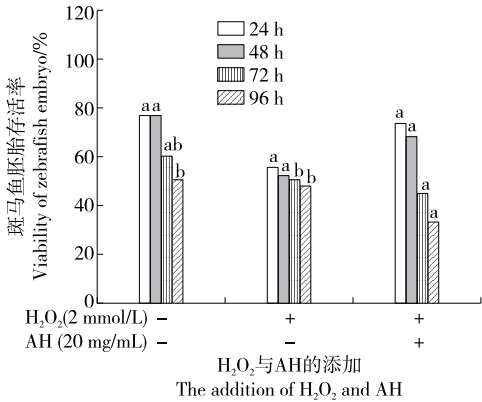


图 5 AH 浓度对斑马鱼胚胎存活率的影响

Figure 5 The effects of AH concentration on the survival rate of zebrafish embryos ($n=6$)



—:未添加该组分;+:添加该组分;字母不同表示显著性差异 ($P<0.05$)

图 6 AH 保护组对斑马鱼胚胎存活率的影响

Figure 6 The effects of different concentrations of AH protection groups on the survival rate of zebrafish embryos ($n=6$)

表 2 部分潜在抗氧化活性肽序列信息

Table 2 Part of sequence information of potential antioxidant peptides

多肽氨基 酸序列	肽长度 (氨基酸数目)	抗氧化肽 序列核心	PeptideRanker 值
ALWPF	5	LW	0.984 394
PLRWPF	6	RW	0.983 070
PRLWPF	6	LW	0.982 904
RLWPF	5	LW	0.982 700
PKFDPWPVFF	10	PW	0.981 808
FYAPW	5	PW	0.978 333

抗氧化活性肽长度在 2~10 个氨基酸,而且真正起作用的往往是 2~3 个核心氨基酸。由表 2 可知,通过肽组学和生物信息学预测分析,证明 AH 中存在抗氧化活性肽,从而解释了上述试验中 AH 具有抗氧化活性。分子对接是研究分子间相互作用,并预测其结合模式和亲合力的一种理论模拟方法^[16],对表 2 中得分最高的两条肽(ALWPF 和 PLRWPF)与 Keap1 蛋白分子作分子模拟对接分析。发现 ALWPF 与 PLRWPF 两条肽均可与受体 Keap1 蛋白分子结合,主要结合力为氢键和疏水相互作用,结合能分别为-9.2,-9.6 kJ/mol(图 8)。图 8(a)中,ALWPF 肽与 Keap1 的 Thr560, Gly367, Val512, Val324, Val608 形成氢键,键长分别为 0.291,0.313,0.299,0.280,0.291 nm;与 Ala466, Cys513, Val369, Val467, Val561, Cys368, Val420,

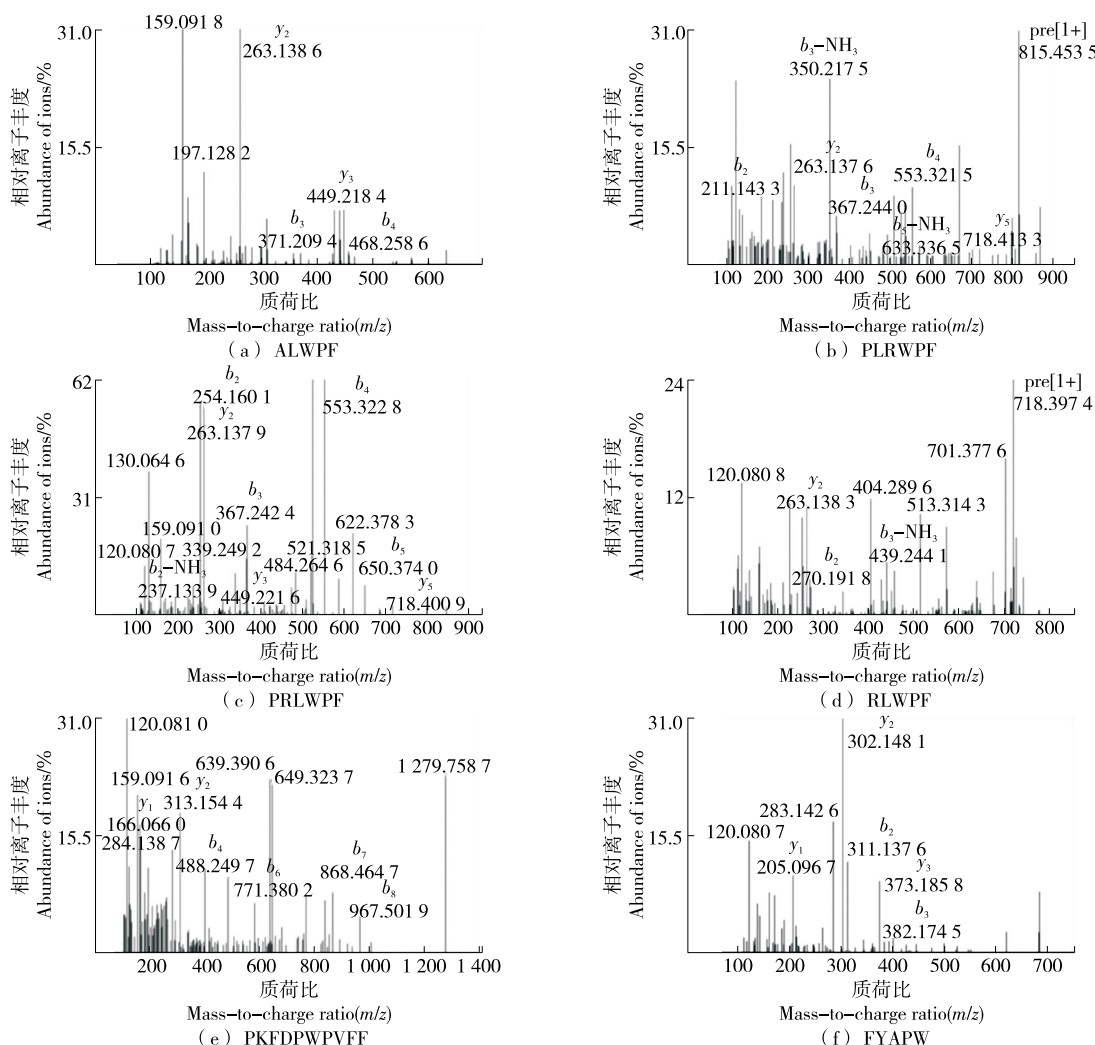
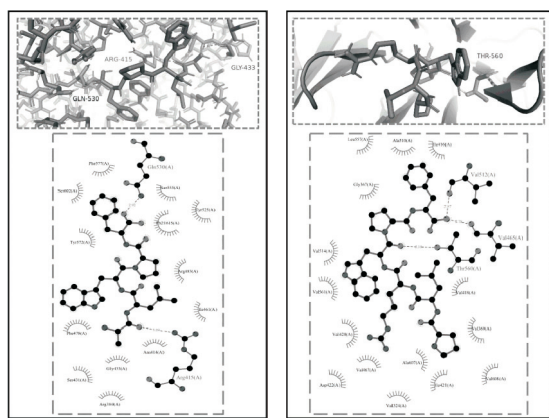


图 7 肽序的 MS/MS 鉴定图谱

Figure 7 MS/MS identification map of peptide sequence



(a) ALWPF肽与Keap1受体 (b) PLRWPF肽与Keap1受体

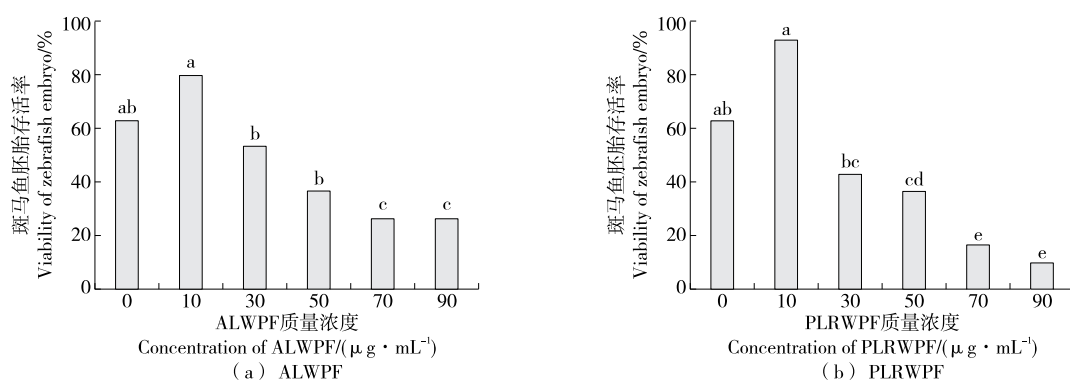
图 8 ALWPF 肽及 PLRWPF 肽与 Keap1 受体的氨基酸作用位点与相互作用图

Figure 8 Amino acid binding sites and interaction graphs of peptides ALWPF and PLRWPF with Keap1 receptor

Ile559, Ala607, Val418, Gly417, Ala366, Ile416 等氨基酸残基形成疏水作用力。图 8(b) 表明, PLRWPF 肽与 Keap1 蛋白质的 Val514, Val561, Gly367, Val418, Ile416 形成氢键, 键长分别为 0.297, 0.313, 0.287, 0.299, 0.326 nm; 与 Val604, Gly364, Ala366, Val463, Arg415, Val512, Leu365, Gly464, Val606, Val465, Cys513, Ile559, Val467, Gly417, Ala466, Val420, Thr560, Ala607, Cys368, Val608 等氨基酸残基形成疏水作用力。

2.7 核桃肽毒性测试

与对照组相比, 质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的核桃肽 ALWPF 和 PLRWPF 处理下斑马鱼胚胎存活率均显著升高。随着核桃肽质量浓度的增加, 斑马鱼胚胎存活率均下降; 其中, 核桃肽 ALWPF 的安全质量浓度为 0 ~ 30 $\mu\text{g/mL}$, PLRWPF 的安全质量浓度为 0 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ (图 9)。



字母不同表示显著性差异($P < 0.05$)

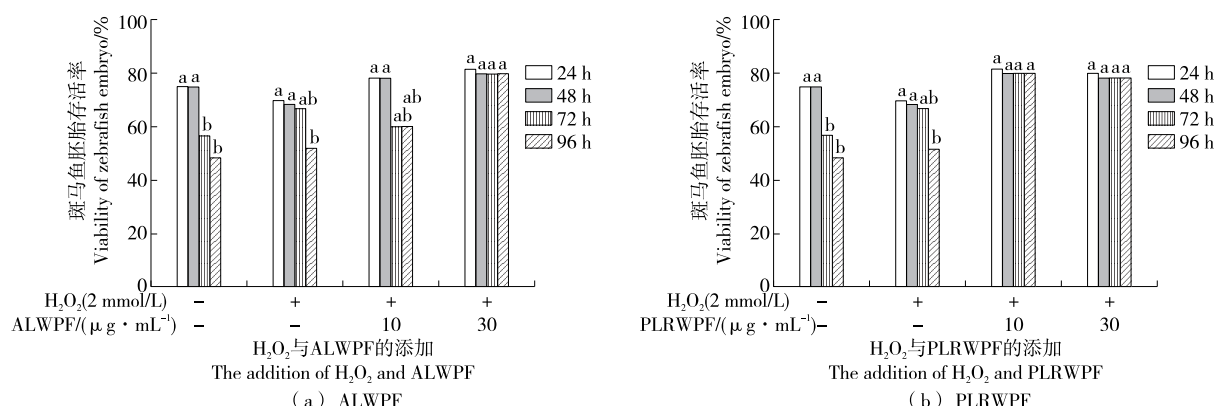
图9 ALWPF、PLRWPF 浓度对斑马鱼胚胎存活率的影响

Figure 9 Effects of different concentrations of ALWPF and PLRWPF on zebrafish embryo survival rate ($n = 6$)

2.8 核桃肽(ALWPF、PLRWPF)对 H_2O_2 损伤处理斑马鱼胚胎的保护作用

研究^[27]表明,从植物中提取的活性肽对氧化应激损伤处理的斑马鱼胚胎具有一定的保护作用。试验中,与空白组和损伤组相比,高质量浓度(30 μg/mL)ALWPF、

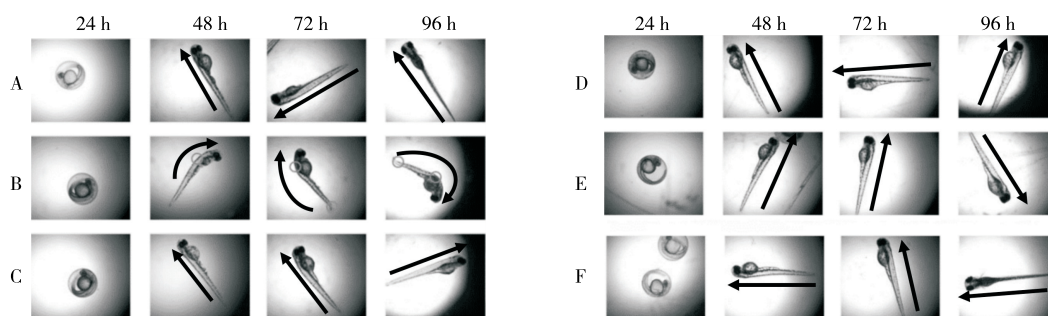
PLRWPF 保护组和低质量浓度(10 μg/mL)PLRWPF 保护组的斑马鱼胚胎存活率显著提高(图10);48 h后低质量浓度ALWPF 保护组斑马鱼胚胎存活率与损伤组相近,且此时损伤组出现大量脊柱侧弯的畸变,而对照组与保护组中存活的斑马鱼胚胎无畸变现象(图11)。结果表



—:未添加该组分;+:添加该组分;字母不同表示显著性差异($P < 0.05$)

图10 不同浓度ALWPF和PLRWPF预保护后对斑马鱼胚胎存活率的影响

Figure 10 Effects of different concentrations of ALWPF and PLRWPF pre-protection on zebrafish embryo survival rate ($n = 6$)



A~F 分别表示对照组、 H_2O_2 损伤组、低浓度ALWPF 保护组、低浓度PLRWPF 保护组、高浓度ALWPF 保护组、高浓度PLRWPF 保护组;箭头表示斑马鱼幼体脊柱生长趋势; H_2O_2 损伤组中的灰色圆圈处存在脊柱侧弯现象

图11 不同浓度ALWPF、PLRWPF 处理斑马鱼胚胎的显微照片

Figure 11 Micrographs of zebrafish embryos treated with different concentrations of ALWPF and PLRWPF

明, 高质量浓度 ALWPF、PLRWPF 和低质量浓度 PLRWPF 对 H_2O_2 损伤后的斑马鱼胚胎具有较强的保护作用。

3 结论

研究以脱脂核桃粕为原料, 通过分级分离提取得到核桃全蛋白。通过测定碱性蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶及木瓜蛋白酶酶解产物的抗氧化活性, 发现核桃粕蛋白的酶解产物均具有较高的抗氧化活性。其中, 碱性蛋白酶解物具有较好的抗氧化活性。

试验过程中通过探究不同浓度碱性蛋白酶解物的体外抗氧化水平, 发现各浓度碱性蛋白酶解物对于 DPPH 自由基、ABTS 自由基及羟自由基均有很强的清除效果; 利用 LC-MS/MS 对碱性蛋白酶解物进行肽序鉴定, 并进一步对抗氧化活性预测, 发现短肽具有更高的潜在抗氧化活性。研究共筛选出 217 条潜在的抗氧化活性肽, 占比 15.60%, 证明碱性蛋白酶酶解策略具有制备核桃抗氧化肽潜力。其中预测活性最好的肽段为 ALWPF 和 PLRWPF。利用计算机模拟将两条肽 ALWPF、PLRWPF 与 Keap1 蛋白分子进行分子对接, 其均能与 Keap1 的活性部位进行结合, 结合能分别为 -9.2 、 -9.6 kJ/mol, 表明分子结合较稳定。

通过斑马鱼胚胎氧化应激损伤模型的保护试验分析, 发现核桃肽 (ALWPF 和 PLRWPF) 均对斑马鱼胚胎具有保护作用, 且随着核桃肽质量浓度的升高, 其保护能力增强。质量浓度为 20 mg/mL 的碱性蛋白酶解物对于 H_2O_2 损伤的斑马鱼胚胎具有较好的保护作用, 可使半致死浓度 H_2O_2 损伤的胚胎存活率恢复至正常水平。

核桃肽在抗氧化方面具有极大的潜能, 但其体内的作用机制尚未可知。后续可以通过蛋白质印迹法对 ALWPF、PLRWPF 保护的斑马鱼体内的 Keap1 和 Nrf2 蛋白含量及其下游相关蛋白进行检测, 探究其对 Keap1-Nrf2 通路调控的分子机制。

参考文献

- [1] 李明娟, 张雅媛, 游向荣, 等. 不同干燥技术对核桃粕蛋白粉品质特性及微观结构的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 92-98.
- LI M J, ZHANG Y Y, YOU X R, et al. Effect of different drying technologies on the quality characteristics and microstructure of walnut meal protein powder[J]. Food Science, 2021, 42(5): 92-98.
- [2] QU T M, HE S W, NI C, et al. In vitro anti-inflammatory activity of three peptides derived from the byproduct of rice processing[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2022, 77(2): 172-180.
- [3] WEN L, HUANG L, LI Y W, et al. New peptides with immunomodulatory activity identified from rice proteins through peptidomic and in silico analysis [J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130357.

- [4] 文李, ISAAC N, 刘步青, 等. 食源性免疫活性肽的筛选策略及作用机制研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 7-11, 37.
- WEN L, ISSAC N, LIU B Q, et al. Progresses of the screening strategies and the effect mechanism researches of food-derived immunopeptides[J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 7-11, 37.
- [5] LIU C L, GUO Y, ZHAO F R, et al. Potential mechanisms mediating the protective effects of a peptide from walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.) against hydrogen peroxide induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. Food & Function, 2019, 10(6): 3491-3501.
- [6] MAO R X, WU L, ZHU N, 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.
- [7] MOGHADAM M, SALAMI M, MOHAMMADIAN M, et al. Walnut protein-curcumin complexes: Fabrication, structural characterization, antioxidant properties, and in vitro anticancer activity[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(2): 876-885.
- [8] ABD EL-SALAM M H, EL-SHIBINY S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(6): 1119-1132.
- [9] JIA Q, YUAN J F, LIU H P, et al. Purification and identification of dual-enzyme hydrolysates obtained from defatted walnut and its antioxidant effects on galactose-induced aging mice[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 15: 1034-1043.
- [10] WANG J Y, LU S L, LI R T, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from Chinese dry-cured mutton ham[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 1246-1255.
- [11] YU Z P, CAO Y X, KAN R T, et al. Identification of egg protein-derived peptides as xanthine oxidase inhibitors: Virtual hydrolysis, molecular docking, and in vitro activity evaluation [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1591-1597.
- [12] TU W J, WANG H, LI S, et al. The anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases[J]. Aging and Disease, 2019, 10(3): 637-651.
- [13] KO J Y, KIM E A, LEE J H, et al. Protective effect of aquacultured flounder fish-derived peptide against oxidative stress in zebrafish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 320-323.
- [14] WANG Y Y, WANG C Y, WANG S T, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128765.
- [15] WANG J, XIE Y J, LUAN Y Y, et al. Identification and dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity verification of peptides from mouse lymphocytes[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1515-1526.
- [16] 张迎阳, 董亚云, 邹平, 等. 橄榄仁抗氧化肽的分离鉴定及分

- 子对接[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(5): 189-198.
- ZHANG Y Y, DONG Y Y, ZOU P, et al. Isolation, identification and molecular docking of antioxidant peptides from olive kernel [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(5): 189-198.
- [17] 邹娅雪, 付晓婷, 段德麟, 等. 利用斑马鱼模型研究琼胶寡糖抗氧化机制[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 286-291, 298.
- ZOU Y X, FU X T, DUAN D L, et al. Antioxidant activities of agaro-oligosaccharides in AAPH-induced zebrafish model [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(4): 286-291, 298.
- [18] 沈金鹏, 王珂雯, 黄潘钊, 等. 珍珠贝水解肽的制备、氨基酸组成及抗炎活性[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 132-139, 206.
- SHEN J P, WANG K W, HUANG P D, et al. Preparation, amino acid composition and anti-inflammatory activity of hydrolyzed peptides from *Pinctada martensii* [J]. Food & Machinery, 2023, 39(2): 132-139, 206.
- [19] GU M, CHEN H P, ZHAO M M, et al. Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans Sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(1): 213-220.
- [20] 李丽, 阮金兰, 钱伟亮, 等. 多指标评价核桃蛋白及多肽的抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 1-4.
- LI L, RUAN J L, QIAN W L, et al. Studies on the antioxidant activity of walnut protein and polypeptide by multi-index [J]. Food Research and Development, 2017, 38(3): 1-4.
- [21] 罗燕, 和兴萍, 李雪, 等. 三种蛋白酶酶解核桃饼粕的抗氧化活性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(5): 170-174.
- LUO Y, HE X P, LI X, et al. Study on antioxidant activity of three kinds of protease for enzymatic hydrolysis of walnut cake [J]. China Brewing, 2017, 36(5): 170-174.
- [22] 贾靖霖, 陆健康, 汪莉莉, 等. 核桃多肽体外抗氧化活性研究 [J]. 中国酿造, 2014, 33(5): 109-112.
- JIA J L, LU J K, WANG L L, et al. Study on antioxidant activity of walnut polypeptide in vitro [J]. China Brewing, 2014, 33(5): 109-112.
- [23] WANG J Y, LIU J L, JOHN A T, et al. Structure identification of walnut peptides and evaluation of cellular antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2022, 388: 132943.
- [24] 贺舒雯, 朱豪杰, 韩鹏薇, 等. 虾壳活性肽对斑马鱼氧化应激损伤的保护作用 [J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 140-147.
- HE S W, ZHU H J, HAN P W, et al. Protective effects of *Procambarus clarkii* shell bioactive peptides on oxidative stress injury of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 140-147.
- [25] 郭勇, 秦汉雄, 魏贞, 等. 长白山核桃源五肽对过氧化氢诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用及机理 [J]. 食品科学, 2019, 40(13): 143-149.
- GUO Y, QIN H Y, WEI Z, et al. Cytoprotective effect and underlying mechanism of pentapeptide derived from manchurian walnut (*Juglans mandshurica* Maxim) meal protein on PC12 cells against H_2O_2 -induced damage [J]. Food Science, 2019, 40(13): 143-149.
- [26] ZHU X L, XIAO X J, WANG S, et al. Rosendaal linear interpolation method appraising of time in therapeutic range in patients with 12-week follow-up interval after mechanical heart valve replacement [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 925571.
- [27] LI Y, WANG R X, LI Y Q, et al. Protective effects of tree peony seed protein hydrolysate on Cd-induced oxidative damage, inflammation and apoptosis in zebrafish embryos [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 126: 292-302.
- (上接第 50 页)
- [22] 张亮. 不同加工工艺的菜籽油品质及其生物学评价 [D]. 无锡: 江南大学, 2016: 19-30.
- ZHANG L. Quality and biological evaluation of rapeseed oil with different processing methods [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016: 19-30.
- [23] 卢梦瑶. 油基对脂质伴随物细胞抗氧化的影响研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2020: 42-44.
- LU M Y. Study on the effect of oil bases on cellular antioxidant activities of lipid concomitants [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020: 42-44.
- [24] 程晨, 黄凤洪, 黄庆德, 等. 脂质伴随物对多不饱和脂肪酸乳液稳定性的影响研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(5): 816-824.
- CHENG C, HUANG F H, HUANG Q D, et al. Review of lipid concomitants effects on stability of polyunsaturated fatty acid emulsion [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(5): 816-824.
- [25] HEURTAULT B, SAULNIER P, PECH B, et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles [J]. Biomaterials, 2003, 24(23): 4 283-4 300.
- [26] RICAURTE L, DE JESÚS PEREA-FLORES M, MARTINEZ A, et al. Production of high-oleic palm oil nanoemulsions by high-shear homogenization (microfluidization) [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 35: 75-85.
- [27] AKHTAR M, MURRAY B S, AFEISUME E I, et al. Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 34(1): 62-67.
- [28] ADITYA N P, ADITYA S, YANG H, et al. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 7-13.
- [29] LIU F, TANG C-H. Phytosterol colloidal particles as Pickering stabilizers for emulsions [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(22): 5 133-5 141.
- [30] MOREIRA J B, GOULARTE P G, DE MORAIS M G, et al. Preparation of beta-carotene nanoemulsion and evaluation of stability at a long storage period [J]. Food Science and Technology, 2019, 39(3): 599-604.