

## 体外模拟消化对核桃主成分代谢及抗氧化特性的影响

李夏<sup>1,2</sup>, 陈杭君<sup>1,2</sup>, 夏魏<sup>1</sup>, 郑永华<sup>2</sup>, 金鹏<sup>2</sup>, 牛犇<sup>1</sup>,  
房祥军<sup>1</sup>, 吴伟杰<sup>1,3\*</sup>, 郜海燕<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江省农业科学院食品科学研究所 农业农村部果品采后处理重点实验室  
浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室 中国轻工业果蔬保鲜与加工重点实验室 杭州 310002

<sup>2</sup>南京农业大学食品科技学院 南京 210095

<sup>3</sup>省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 杭州 310021)

**摘要** 为明确核桃主要营养成分(蛋白质和油脂)的消化代谢情况及其抗氧化特性,以“新新 2”核桃为研究对象,利用模拟胃肠道消化模型分析蛋白质和油脂两类主成分的代谢过程。采用气相色谱-质谱法(GC-MS)和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定消化过程中 5 个阶段的代谢变化。结果表明:随着胃肠道消化时间的推移,蛋白质的消化产物中游离氨基酸总量从 3.50  $\mu\text{g/g}$  增至 61.85  $\mu\text{g/g}$ ,呈持续增加特征( $P<0.05$ ),如精氨酸的含量从 0.24  $\mu\text{g/g}$  增加至 25.50  $\mu\text{g/g}$ ,赖氨酸的含量从 0.12  $\mu\text{g/g}$  增加至 6.03  $\mu\text{g/g}$ 。油脂的消化产物中游离脂肪酸含量从 1.08 mg/g 增到 413.20 mg/g,呈持续上升趋势( $P<0.05$ ),这表明消化过程中在酶的作用下生成新的脂肪酸,如顺式-11-二十碳烯酸和反式-10-十九碳烯酸。探究 5 个不同配比组(蛋白:油脂的质量比分别为 1:0,7:3,1:1,3:7,0:1)消化后的抗氧化特性,结果显示,抗氧化能力均随物质浓度的提高而增强。研究发现蛋白:油脂的质量比为 1:0 时,抗氧化能力最强,其质量浓度在 50 mg/mL 时,DPPH 和 ABTS<sup>+</sup>清除率分别为 80.65%和 81.02%, $\text{Fe}^{3+}$ 还原力吸光度值为 1.55,说明核桃蛋白的抗氧化能力优于油脂。这是因为蛋白质的两级消化产物均具有抗氧化性。本研究结果为明确核桃主成分的消化代谢机制提供数据支持,为开发具有高抗氧化功能的核桃产品提供参考。

**关键词** 核桃; 成分分析; 体外消化; 抗氧化; 代谢

文章编号 1009-7848(2023)06-0029-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.06.004

核桃(*Juglans regia* L.)和扁桃、腰果、榛子三者合称为“四大干果”<sup>[1]</sup>。核桃富含人体所需的脂肪酸、蛋白质、多酚类、糖类、黄酮类及多种微量元素与膳食纤维等<sup>[2-3]</sup>。核桃中油脂质量分数为 52%~70%,且油脂以不饱和脂肪酸为主,约占 82%~85%,蛋白占比 24%左右,富含多种必需氨基酸<sup>[4]</sup>。核桃是人体优质的营养物质来源,具有健脑益智,延缓细胞衰老以及增强免疫力的功效,并对心血管疾病也有一定的辅助功效<sup>[5-6]</sup>。目前对核桃营养价值的开发和功能活性的研究还不够深入,对核桃的消化代谢及活性研究较少,导致其产品创新研发受阻<sup>[7]</sup>。在核桃产品的生产加工中,还存在未能充分利用的营养成分,造成营养浪费的现象。如

何全面开发利用核桃的营养价值也成为产业营养健康发展的聚焦点<sup>[8]</sup>。

体外消化系统是在体外条件下模拟体内消化吸收情况,以达到还原人体胃肠道生理过程的目的<sup>[9]</sup>。它可以完全或部分替代活体试验,具有成本较低、耗时短、可重复性强等优点<sup>[10]</sup>。在研究膳食消化时,最常用的是多酶系多腔室静态模型,其主要优势之一是固定模拟消化食物的条件,并尽量保证消化模型的统一<sup>[11]</sup>。此方法可用于分析消化产物和评估食物基质中微量元素的释放,以此来评估食物消化至终点或某时间点时的情况<sup>[12]</sup>。

食物消化过程中的 pH 值及各种消化酶类对食物的抗氧化特性有一定影响,营养成分提取物的功能活性与消化后的实际利用情况存在差异。韩海涛等<sup>[13]</sup>发现在相同质量浓度下,核桃蛋白中的清蛋白对 DPPH 自由基清除能力最高,其次为醇溶蛋白,均高于二丁基羟基甲苯(Butylated Hydroxyl Toluene)。这与其氨基酸组成、分子质量和

收稿日期: 2023-04-09

基金项目: 农业农村部“农业科研杰出人才”项目

第一作者: 李夏,女,硕士生

通信作者: 吴伟杰 E-mail: wuweijie87@163.com

郜海燕 E-mail: spsghy@163.com

结构有关,因此能有效抗衰老和防御多种心脑血管疾病<sup>[14]</sup>。核桃多肽也具有一定抗氧化能力,并具有一定的量效关系<sup>[15]</sup>。弘子姗等<sup>[16]</sup>用酶解法提取核桃多肽,当多肽质量浓度 0.5 g/mL 时,其 DPPH 清除率 87%,ABTS<sup>+</sup>清除率 84%,羟基自由基清除率 82%,铁离子还原能力达 45%,说明核桃多肽具有一定的抗氧化能力<sup>[17]</sup>。

由于核桃油中含有较多的多不饱和脂肪酸,因此易发生氧化变质<sup>[18]</sup>,使核桃油产品货架期缩短。核桃油的抗氧化能力还可用来评价油脂的品质特性<sup>[19]</sup>。彭星星等<sup>[20]</sup>研究表明,核桃油含有多种生物活性物质,如黄酮、生育酚、甾醇等,具有较强的抗氧化能力,然而,核桃油中的天然活性物质会随时间呈现急剧减少的变化特征,对自由基的清除能力逐渐降低,抗氧化能力也降低。

本文以“新新 2”核桃为研究对象,提取油脂和蛋白质两类主成分进行相关研究。采用 GC-MS 和 HPLC-MS/MS 分析核桃消化过程中油脂和蛋白质含量的变化,体外消化特性及消化产物的抗氧化活性,旨在为研发核桃油内源性天然抗氧化剂,核桃产品的开发提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

核桃品种为“新新 2”核桃 (*Juglans regia* ‘Xinxin 2’)(原产地新疆),购于洽洽食品股份有限公司。胰脂肪酶、胰酶、胰蛋白酶、猪胆盐,阿拉丁生化科技有限公司;三氯乙酸、过硫酸钾、铁氯化钾、三氯化铁、硫酸铜、酒石酸钾,分析纯,阿拉丁生化科技有限公司;福林酚,分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;游离脂肪酸含量试剂盒,科铭生物技术有限公司;氨基酸含量测定试剂盒,仑昌硕生物有限公司;DPPH 自由基清除试剂盒,南京建成科技有限公司;甲醇、正己烷、异丙醇,色谱纯,CNW Technologies GmbH;乙腈,色谱纯,德国默克集团;D35-氘代硬脂酸,纯度为 98%,德国默克集团;三甲基硅烷基重氮甲烷,在正己烷中含量为 2mol/L,上海麦克林生化科技有限公司。

### 1.2 设备与仪器

LR56495 台式离心机,赛默飞世尔科技公司;THZ-C-1 恒温冷冻振荡器,海门其林贝尔仪器制

造有限公司;DK-8D 电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司;LC20AD-API 3200MD TRAP HPLC-MS/MS,日本岛津公司;7890B 气相色谱,安捷伦科技有限公司;ReadMax1900 酶标仪,上海闪普生物科技;UV-9000 紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 核桃油脂和蛋白的提取 参考闫圣坤等<sup>[21]</sup>的方法,采用冷榨法提取核桃油脂,设置温度 170 °C 榨取核桃油。参考刘猛等<sup>[22]</sup>的方法,采用酸沉碱提法分离纯化核桃蛋白质,将核桃粕与蒸馏水按质量比 1:25 混合,用氢氧化钠调节 pH 值为 9,碱提;用盐酸调节 pH 值为 5,酸沉。

1.3.2 模拟体外消化试验方法 试验分组:设置蛋白质组即 Pr 组(样品只含核桃蛋白)、7:3 组(样品中核桃蛋白质与油脂质量比 7:3)、1:1 组(样品中核桃蛋白质与油脂质量比 1:1)、3:7 组(样品中核桃蛋白质与油脂质量比 3:7)、油脂组即 Oil 组(样品只含有核桃油)。

模拟胃消化阶段:称取 3.10 g 氯化钠、1.10 g 氯化钾、0.30 g 二水氯化钙、0.60 g 碳酸氢钠溶解在 1 L 蒸馏水中,配成胃电解质溶液。配制 1 mol/L 乙酸钠溶液并调节 pH=5。所有溶液预热至 37 °C。取 17 样品、255 mL 胃电解质、59.50 mg 胃蛋白酶、0.51 mL 乙酸钠溶液于锥形瓶中,用 1 mol/L 盐酸调节 pH 值至 2~3,37 °C,80 r/min 摇床温育 2 h。分别于 20,40,120,140,160,180 min 和 240 min 处取样,90 °C 水浴灭酶 30 min,10 000 r/min,4 °C 离心 15 min,取上清液,冷冻干燥,待测。

模拟肠消化阶段:称取 5.40 g 氯化钠、0.65 g 氯化钾、0.33 g 二水氯化钙溶解在 1 L 蒸馏水中,配成肠电解质溶液,7%胰酶-PBS 溶液,4%胆盐-PBS 溶液。量取 50 mL 肠电解质、50 mL 胰酶-PBS 溶液、100 mL 胆盐-PBS 溶液、59.50 mg 胰脂肪酶、0.013 g 胰蛋白酶,加入剩余胃消化液中,用 0.10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 7,37 °C,80 r/min 摇床温育 2 h。分别于 20,40,120,140,160,180 min 和 240 min 取样,90 °C 水浴灭酶 30 min,10 000 r/min,4 °C 离心 15 min,取上清,冷冻干燥<sup>[23]</sup>,待测。

1.3.3 多肽含量的测定 参考高英等<sup>[24]</sup>方法,配制碱性铜 A 试剂和酒石酸钾 B 试剂,3.42 mg/mL

牛血清白蛋白对照品溶液,分别取样品溶液加水稀释 30 倍待测。

根据对照品溶液含量及吸收值,计算可得标准曲线方程:

$$y = 0.3515x + 0.2773$$

其中相关系数  $R^2=0.9909$ 。

1.3.4 游离氨基酸含量的测定 按照试剂盒说明,在 570 nm 处测定吸光度  $A$ :

$$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$$

由此计算可得标准曲线方程:

$$y = 0.3963x + 0.006$$

式中: $x$ ——标准品浓度,  $\mu\text{mol/mL}$ ;  $y$ —— $\Delta A$ 。

游离氨基酸含量计算公式:

$$\text{游离氨基酸}(\mu\text{mol/mL}) = 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \times D \quad (1)$$

式中, $D$ ——稀释倍数,未稀释为 1。

1.3.5 游离氨基酸种类的测定 样品预处理:称取 0.1 g 样品加入 2 mL 盐酸,充氮气保护,密封 110 °C 消化 24 h。取 100  $\mu\text{L}$  消化液,浓缩至 20  $\mu\text{L}$ ,加 980  $\mu\text{L}$  超纯水。

衍生化过程:取混标、待测样本 50  $\mu\text{L}$ ,加 50  $\mu\text{L}$  蛋白沉淀剂,混匀后 13 200 r/min 冷冻离心 4 min。取 8  $\mu\text{L}$  上清液,加 42  $\mu\text{L}$  标记缓冲液混匀瞬间。再加 20  $\mu\text{L}$  衍生液混匀、瞬间后置 55 °C 恒温衍生 15 min。衍生后样本置冰箱,冷却后混匀瞬间,取 50  $\mu\text{L}$  于 HPLC-MS/MS 检测。

液相条件:色谱柱:MSLab45+AA-C18(150 mm $\times$ 4.60 mm,5  $\mu\text{m}$ );柱温:50 °C,流速:1 mL/min;流动相:A 为有机相:乙腈(A+B 调节剂);B 为水相:超纯水(A+B 调节剂);进样量:3  $\mu\text{L}$ 。梯度见表 1 所示。

表 1 液相梯度洗脱设置

Table 1 Liquid phase gradient meter

保持时间/min	0.01	6.00	6.10	10.00	10.10	12.50	12.60	15.00
A/%	12	17	24	27	97	97	12	12
B/%	88	83	76	73	3	3	88	88

质谱条件:离子源:+ESI 电喷雾离子源;IS:+5500 V (喷雾电压);GS1:0.38 MPa (雾化气);GS2:0.41 MPa (辅助气);扫描方式:多反应监测;CAD:Medium (碰撞气);TEM:500 °C (雾化温度);CUR:0.14 MPa (气帘气);CXP:2.0 eV (碰撞室射出电压);EP:10 eV (射入电压)。

1.3.6 游离脂肪酸含量的测定 按照试剂盒说明书测定吸光值,记为  $A$ 。经计算得标准曲线:

$$y = 0.0075x + 0.0055$$

(相关系数  $R^2=0.994$ 。)

由此可得游离脂肪酸含量计算公式:

$$\text{游离脂肪酸}(\text{nmol/g}) = (A - 0.0055) \div 0.0075 \times V_1 \div (V_1 \div V_2 \times M) = 160 \times (A - 0.0055) \div M \quad (2)$$

式中, $V_1$ ——加入样本体积,1 mL; $V_2$ ——提取液体积,1.2 mL; $A$ ——吸光度; $M$ ——样品质量,g。

1.3.7 游离脂肪酸种类的测定 样本预处理:取 1 mL 样品加入 500  $\mu\text{L}$  提取液 (异丙醇:正己烷体积比 2:3,含内标 0.20 mg/L),加入钢珠涡旋混匀

30 s,用研磨仪处理 4 min(40 Hz),超声 5 min(冰水浴),重复 3 次。然后,将样本于 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清。剩余样本中加入 500  $\mu\text{L}$  上述提取液,重复涡旋、研磨冰浴和离心步骤。取上清,混合涡旋 10 s。将上述两种提取液的上清液混合,取 800  $\mu\text{L}$  于 2 mL 试管中,氮气吹干。加入 500  $\mu\text{L}$  甲醇-三甲基硅烷基重氮甲烷溶液 (二者体积比 1:2),室温静置 30 min 后氮气吹干。加入 160  $\mu\text{L}$  正己烷复溶,12 000 r/min 离心 1 min,取上清进行 GC-MS 检测。

参数设置:进样量:1  $\mu\text{L}$ ;分流模式:Split Mode(5:1);隔垫吹扫流速:3 mL/min;载气:氦气;色谱柱:DB-FastFAME (90 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ );柱压:0.32 MPa;柱箱升温程序:1 min 升至 50 °C,15 min 升至 200 °C(50 °C/min),1 min 升至 210 °C(2 °C/min),15 min 升至 230 °C(10 °C/min);前进样口温度:240 °C;传输线温度:240 °C;离子源温度:230 °C;四级杆温度:150 °C;电离电压:-70 eV;质量范围  $m/z$ :33~400;扫描模式:Scan/SIM;溶



剂延迟:7 min。

定量结果:计算公式:

$$C_{(\text{con})}=(CS \times V_1 \times V_2)/(M \times V_3) \quad (3)$$

式中, $C_{(\text{con})}$ ——样本中游离脂肪酸的含量, $\mu\text{g/g}$ ; $CS$ ——复溶液游离脂肪酸的质量浓度, $\text{ng/mL}$ ; $V_1$ ——复溶体积, $\text{mL}$ ; $V_2$ ——加入提取液的体积, $\mu\text{L}$ ; $V_3$ ——取出提取液的体积, $\mu\text{L}$ ; $M$ ——称重质量, $\text{mg}$ 。

1.3.8 DPPH 自由基清除能力的测定 取消化终产物,设置 10,20,30,40,50 mg/mL 5 个质量浓度梯度,按照试剂盒说明操作。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=[1-(A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}})/A_{\text{空白}}] \times 100 \quad (4)$$

式中, $A_{\text{测定}}$ ——测定管的吸光度; $A_{\text{对照}}$ ——对照管的吸光度; $A_{\text{空白}}$ ——空白管的吸光度。

1.3.9 清除 ABTS<sup>+</sup>能力的测定 取消化终产物,设置 10,20,30,40,50 mg/mL 5 个质量浓度梯度,参考邵洋洋等<sup>[25]</sup>方法,在波长 734 nm 处测定吸光度。计算公式:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%)=(1-A_1/A_0) \times 100 \quad (5)$$

式中, $A_0$ ——蒸馏水+ABTS 工作液的吸光度; $A_1$ ——样品+ABTS 工作液的吸光度。

1.3.10 三价铁离子还原能力的测定 取消化终产物,设置 10,20,30,40,50 mg/mL 5 个质量浓度梯度,参考曲文娟等<sup>[26]</sup>方法,在 700 nm 处测定反应液的吸光值。

## 1.4 数据处理

采用 Excel 2021 进行数据汇总处理,采用 GraphPad Prism 8.0 进行方差分析并绘制统计图。试验均设置 3 次重复,数据分析结果以平均值 $\pm$ 标准差表示,用不同符号或字母表示具有显著差异( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 体外消化过程中核桃游离脂肪酸含量的变化

脂肪的消化主要集中在小肠的上部,它被各种酶和胆汁酸盐水解成甘油和脂肪酸<sup>[27]</sup>。核桃油在体外消化过程中游离脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) 的变化如图 1 所示。随着消化的进行,FFA 含量呈持续上升趋势,从 13.61 nmol/g 增到 20.94

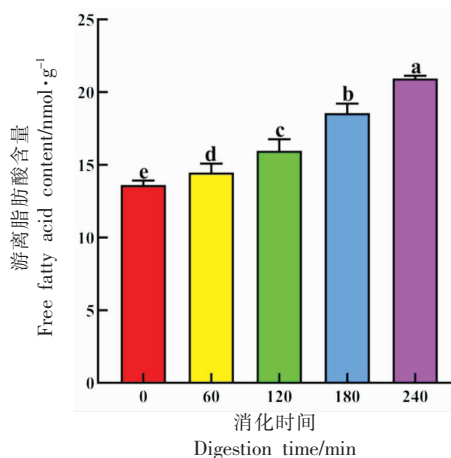


图 1 核桃主成分在体外消化过程中游离脂肪酸 (FFA) 含量的变化

Fig.1 Changes of free fatty acid (FFA) content in walnut during digestion *in vitro*

nmol/g。120~180 min 为肠消化阶段,肠道中有胰脂肪酶,主要负责脂质的消化,游离脂肪酸在此期间增加明显,与脂肪相比,游离脂肪酸更易被人体吸收利用,是人体必需的营养物质,有助于促进人体生长发育。核桃油主要在肠消化阶段被分解为游离脂肪酸并被人体吸收代谢。因仅测定游离脂肪酸的总含量无法明确核桃油消化产物的具体情况,故对 5 个时间点的消化产物组分进行 GC-MS 检测。

### 2.2 体外消化过程中核桃游离脂肪酸组分分析

采用 GC-MS 定量检出 49 种游离脂肪酸,在体外消化试验所取样品中共检出 22 种游离脂肪酸有含量变化,具体种类及含量见表 2 所示。亚油酸含量在消化过程中始终维持最高,在 180~240 min 期间含量显著增加 ( $P<0.05$ ),亚油酸是  $\omega$ -6 型脂肪酸,有助于预防心脑血管疾病和降血脂等;游离脂肪酸总量呈上升趋势,从 1 080  $\mu\text{g/g}$  增到 413 199.89  $\mu\text{g/g}$ ,与上述指标检测结果保持一致,且在 120~180 min 期间,游离脂肪酸总量显著提高 ( $P<0.05$ ),从 27 451.01  $\mu\text{g/g}$  增至 283 616.18  $\mu\text{g/g}$ 。其中有 8 种脂肪酸是 0 min 时未检出,而后续消化分解产生的。顺式-11-二十碳烯酸和反式-10-十九碳烯酸的变化最显著 ( $P<0.05$ ),此类脂肪酸在人体中可起到滋润皮肤、润肠通便等作用。游离脂肪酸增量在 0~120 min 时相对平缓,在 120~

表 2 不同消化时间点 22 种游离脂肪酸 (FFA) 含量特征

Table 2 Content characteristics of 22 kinds of free fatty acids (FFA) at different digestion time points

游离脂肪酸种类	不同时间点 FFA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$				
	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min
辛酸	0	$1.44 \pm 0.03^b$	$3.43 \pm 0.06^a$	0	0
癸酸	$0.09 \pm 0.02^a$	$0.02 \pm 0.01^a$	$0.14 \pm 0.03^b$	0	0
十一烷酸	$1.86 \pm 0.07^a$	$0.07 \pm 0.02^b$	$0.07 \pm 0.01^b$	0	0
十二烷酸	$0.32 \pm 0.10^b$	$0.26 \pm 0.12^c$	$0.55 \pm 0.05^a$	0	0
肉豆蔻酸	$1.92 \pm 0.16^c$	$6.50 \pm 0.21^d$	$18.65 \pm 1.09^c$	$100.72 \pm 8.08^b$	$129.67 \pm 9.5^a$
十五烷酸	$0.38 \pm 0.11^d$	$3.22 \pm 0.77^c$	$9.37 \pm 0.83^b$	$8.91 \pm 0.85^b$	$23.03 \pm 1.19^a$
棕榈酸	$132.70 \pm 9.08^e$	$1\ 149.95 \pm 12.02^d$	$2\ 610.18 \pm 15.13^c$	$5\ 609.48 \pm 18.00^b$	$9\ 829.63 \pm 15.93^a$
棕榈烯酸	$0.45 \pm 0.15^d$	$11.24 \pm 0.20^c$	$38.99 \pm 0.37^b$	$275.96 \pm 5.10^a$	$355.72 \pm 5.37^a$
十七烷酸	$1.04 \pm 0.18^d$	$9.52 \pm 0.23^c$	$29.47 \pm 2.70^b$	$29.09 \pm 4.71^b$	$60.87 \pm 16.28^a$
硬脂酸	$46.54 \pm 7.32^c$	$488.17 \pm 10.24^d$	$1\ 369.08 \pm 15.64^c$	$2\ 603.30 \pm 18.23^b$	$4\ 423.52 \pm 20.06^a$
油酸	$82.34 \pm 9.42^c$	$3\ 269.05 \pm 20.40^d$	$4\ 269.97 \pm 26.13^c$	$49\ 956.14 \pm 33.97^b$	$75\ 995.45 \pm 30.26^a$
亚油酸	$607.61 \pm 13.35^c$	$8\ 927.61 \pm 22.78^d$	$7\ 973.45 \pm 22.48^c$	$166\ 177.72 \pm 87.40^b$	$236\ 033.41 \pm 92.21^a$
反式-10-十九碳烯酸	0	$6.88 \pm 0.65^c$	$18.45 \pm 1.87^b$	$224.88 \pm 8.73^a$	$221.07 \pm 8.65^a$
$\alpha$ -亚麻酸	$196.09 \pm 11.72^c$	$5\ 167.07 \pm 18.80^d$	$10\ 823.76 \pm 22.23^c$	$58\ 070.41 \pm 28.95^b$	$85\ 042.99 \pm 28.42^a$
二十烷酸	$1.27 \pm 0.44^d$	$17.72 \pm 0.15^c$	$52.73 \pm 1.82^b$	$130.81 \pm 3.00^a$	$197.57 \pm 3.87^a$
顺式-11-二十碳烯酸	0	$36.25 \pm 1.86^d$	$145.45 \pm 5.17^c$	$284.19 \pm 7.26^b$	$557.86 \pm 9.42^a$
顺式-11,14-二十碳二烯酸	0	$6.58 \pm 0.64^c$	$23.70 \pm 1.67^b$	0	$59.78 \pm 4.30^a$
二十一烷酸	0	$1.72 \pm 0.07^b$	$5.91 \pm 0.27^a$	0	$6.26 \pm 0.31^a$
花生四烯酸	0	0	$8.89 \pm 0.79^b$	0	$149.31 \pm 17.44^a$
顺式-11,14,17-二十碳三烯酸	0	$1.70 \pm 0.15^c$	$5.97 \pm 0.26^b$	0	$53.17 \pm 7.25^a$
二十二烷酸	0	$5.94 \pm 0.54^c$	$18.67 \pm 2.68^b$	0	$60.56 \pm 11.06^a$
木蜡酸	$4.18 \pm 0.50^a$	$2.76 \pm 0.41^b$	0	0	0
DHA	$1.62 \pm 0.04^c$	$4.60 \pm 0.12^c$	$24.10 \pm 2.88^b$	$144.58 \pm 15.32^a$	0
游离脂肪酸总量	$1\ 078.00 \pm 20.03^c$	$19\ 118.27 \pm 26.20^d$	$27\ 451.01 \pm 31.85^c$	$283\ 616.18 \pm 35.76^b$	$413\ 199.89 \pm 40.39^a$

注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

240 min 时增长趋势明显。对不同时间点消化产物的 FFA 组分进行聚类分析发现,如图 2 所示,消化 180 min 时的产物组分与消化 240 min 时的产物组分相近,与前 3 个时间段差异较大。0 min 即未消化和消化 60 min 时与后续产物组分存在差异,其中消化 120 min 时的产物组分与其它 4 个时间点差异明显。综上结果,初步判断油脂的主要消化部位在肠道,是因为在肠消化阶段游离脂肪酸含量明显增加,与姚轶俊<sup>[28]</sup>的研究结果相近,肠道的胰脂肪酶是消化脂肪的主要酶类,大部分油

脂在肠消化阶段才被分解为游离脂肪酸。

### 2.3 体外消化过程中核桃多肽及游离氨基酸含量的变化

人体内的消化酶主要由胃蛋白酶和胰蛋白酶构成,它们与胃酸共同作用即可水解蛋白质<sup>[29]</sup>。在体外消化模拟过程中,多肽含量呈现先增后减趋势,如图 3a 所示。在消化 120 min 时达到最大值 0.37 mg/mL,整体变化较平缓,从消化初始到消化终点,多肽含量从 0.34 mg/mL 增到 0.36 mg/mL。如图 3b 所示,核桃蛋白质随着消化的进行,逐渐分

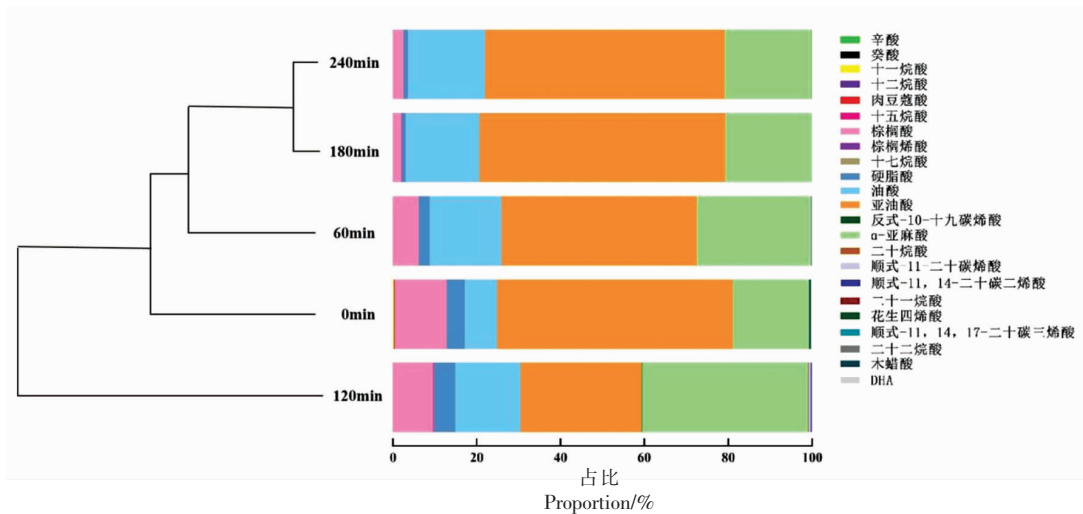


图2 消化产物中 FFA 聚类分析图

Fig.2 Cluster analysis of FFA in digestive products

解为氨基酸,使游离氨基酸 (Free Amino Acid, AA) 总量从 0 min 时的  $0.59 \mu\text{mol/mL}$  升至 240 min 时的  $17.75 \mu\text{mol/mL}$ , 在 120 min 后进入肠消化阶段,氨基酸增量明显升高。推测 0~120 min 为胃消化阶段,蛋白被分解为多肽,导致多肽含量增加;120~240 min 为肠消化阶段,部分多肽逐渐被

分解为氨基酸,整体多肽含量减少,而游离氨基酸总量明显增加,说明蛋白质经胃和肠道的消化分解依次产生多肽和蛋白质两级产物,短肽和游离氨基酸更有利于人体吸收利用,且功能活性优于直接吸收蛋白质。

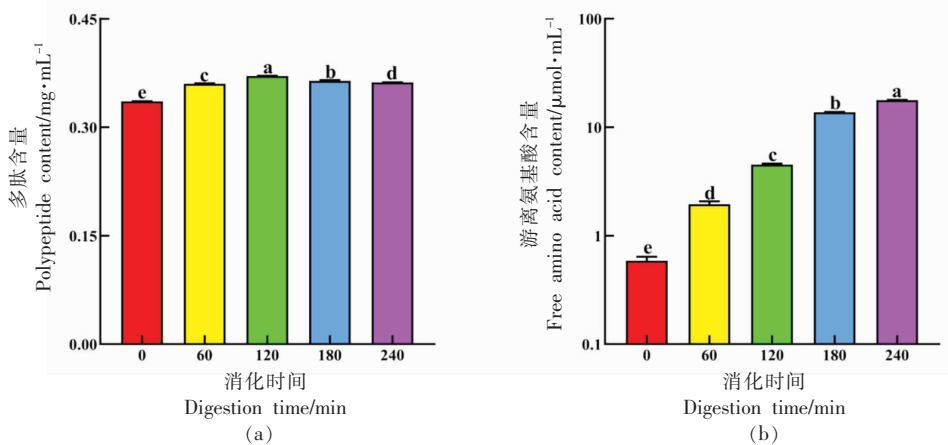


图3 核桃蛋白质在体外消化过程中多肽及游离氨基酸含量的变化

Fig.3 The changes of polypeptide and free amino acid contents in walnut protein during digestion *in vitro*

## 2.4 体外消化过程中核桃多肽及游离氨基酸组分分析

采用 HPLC-MS/MS 分析具有代表性的 20 种游离氨基酸含量。0 min 时样品即核桃蛋白,随消化进行,不同时间点游离氨基酸含量的变化情况见表 3 所示。可以看出,0 min 时核桃蛋白中含量最高的是色氨酸  $0.71 \mu\text{g/g}$ ,当消化 240 min 时,含

量最高的是精氨酸  $25.50 \mu\text{g/g}$ 。消化过程中精氨酸和赖氨酸的含量增加明显,精氨酸有助于软化血管,具有抗动脉粥样硬化的作用,赖氨酸有助于提高人体免疫力,促进生长发育。半胱氨酸与冠心病等心脑血管疾病有关<sup>[30]</sup>,而研究发现核桃蛋白质中不含有半胱氨酸,且随消化进行不会产生半胱氨酸,因此核桃蛋白质可作为维持人体健康的优

表 3 不同消化时间点 20 种游离氨基酸(AA)具体含量

Table 3 Specific contents of 20 kinds of free amino acids(AA) at different digestion time points

游离氨基酸种类	不同时间点 AA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$				
	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min
甘氨酸	$0.12 \pm 0.01^c$	$0.19 \pm 0.02^b$	$0.22 \pm 0.03^b$	$0.40 \pm 0.06^a$	$0.49 \pm 0.05^a$
丙氨酸	$0.32 \pm 0.06^c$	$0.54 \pm 0.08^b$	$0.73 \pm 0.11^b$	$1.10 \pm 0.11^a$	$1.41 \pm 0.12^a$
丝氨酸	$0.07 \pm 0.02^d$	$0.09 \pm 0.02^d$	$0.18 \pm 0.18^c$	$0.57 \pm 0.26^b$	$0.75 \pm 0.74^a$
脯氨酸	$0.14 \pm 0.03^c$	$0.22 \pm 0.06^b$	$0.24 \pm 0.08^b$	$0.30 \pm 0.11^a$	$0.35 \pm 0.15^a$
缬氨酸	$0.22 \pm 0.04^c$	$0.29 \pm 0.01^c$	$0.54 \pm 0.09^b$	$1.24 \pm 0.10^a$	$1.58 \pm 0.13^a$
苏氨酸	$0.10 \pm 0.01^d$	$0.10 \pm 0.02^d$	$0.29 \pm 0.04^c$	$0.61 \pm 0.05^b$	$0.72 \pm 0.11^a$
半胱氨酸	0	0	0	0	0
异亮氨酸	$0.13 \pm 0.04^d$	$0.15 \pm 0.04^d$	$0.46 \pm 0.07^c$	$1.08 \pm 0.14^b$	$1.48 \pm 0.23^a$
天门冬酰胺	$0.07 \pm 0.01^c$	$0.12 \pm 0.09^d$	$0.21 \pm 0.16^c$	$0.48 \pm 0.32^b$	$0.63 \pm 0.33^a$
天门冬氨酸	$0.08 \pm 0.02^c$	$0.54 \pm 0.06^a$	$0.52 \pm 0.14^b$	$0.50 \pm 0.23^a$	$0.51 \pm 0.27^a$
谷氨酰胺	$0.08 \pm 0.01^d$	$0.04 \pm 0.01^d$	$0.37 \pm 0.07^c$	$1.65 \pm 0.33^b$	$2.89 \pm 0.36^a$
谷氨酸	$0.35 \pm 0.16^d$	$0.53 \pm 0.32^c$	$0.69 \pm 0.30^c$	$1.09 \pm 0.98^b$	$1.36 \pm 0.43^a$
甲硫氨酸	$0.06 \pm 0.05^d$	$0.06 \pm 0.03^d$	$0.10 \pm 0.02^c$	$0.51 \pm 0.74^b$	$0.98 \pm 0.39^a$
组氨酸	$0.09 \pm 0.13^d$	$0.20 \pm 0.11^c$	$0.80 \pm 0.15^b$	$1.70 \pm 0.34^a$	$1.87 \pm 0.87^a$
苯丙氨酸	$0.24 \pm 0.12^c$	$0.66 \pm 0.14^d$	$1.13 \pm 0.12^c$	$3.98 \pm 0.85^b$	$5.13 \pm 1.79^a$
精氨酸	$0.24 \pm 0.07^d$	$0.47 \pm 0.86^d$	$8.36 \pm 1.05^c$	$19.78 \pm 2.11^b$	$25.50 \pm 4.03^a$
色氨酸	$0.71 \pm 0.05^c$	$1.78 \pm 0.32^b$	$1.92 \pm 0.68^b$	$2.13 \pm 0.33^a$	$2.46 \pm 0.24^a$
赖氨酸	$0.12 \pm 0.01^d$	$0.12 \pm 0.00^d$	$1.47 \pm 0.09^c$	$4.68 \pm 0.45^b$	$6.03 \pm 1.91^a$
酪氨酸	$0.08 \pm 0.02^c$	$0.12 \pm 0.03^d$	$0.92 \pm 0.06^c$	$2.57 \pm 0.99^b$	$3.71 \pm 1.07^a$
亮氨酸	$0.28 \pm 0.04^d$	$0.48 \pm 0.01^d$	$1.66 \pm 0.26^c$	$3.11 \pm 0.88^b$	$4.00 \pm 0.16^a$
游离氨基酸总量	$3.50 \pm 0.85^e$	$6.69 \pm 1.37^d$	$20.79 \pm 2.98^c$	$47.46 \pm 6.20^b$	$61.85 \pm 7.16^a$

注:小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

质营养源;游离氨基酸总量从  $3.50 \mu\text{g/g}$  增至  $61.85 \mu\text{g/g}$ ,在 120~180 min 有明显上升,从  $20.79 \mu\text{g/g}$  增至  $47.46 \mu\text{g/g}$ ,与上述指标检测结果保持一致。对不同时间点消化产物的 AA 组分进行聚类分析发现,如图 4 和图 5 所示,消化 60 min 时的产物组分与消化 0 min 即未消化时的产物组分相近,消化 180 min 时的产物组分与消化 240 min 时的产物组分相近,而消化前 60 min 与消化 120 min 后产物组分有明显差异。蛋白质的消化产物主要以氨基酸和肽段的形式被生物体吸收<sup>[31]</sup>。小肠中所含有的消化酶种类成分复杂,能进一步水解胃消化产生的氨基酸和肽<sup>[31]</sup>。综上结果,初步判断蛋白质的主要消化部位在肠道。

## 2.5 核桃主成分消化产物抗氧化能力

随着消化产物浓度的增加,5 个试验组都保持上升趋势。如图 6 所示,Pr 组的整体 DPPH 清除能

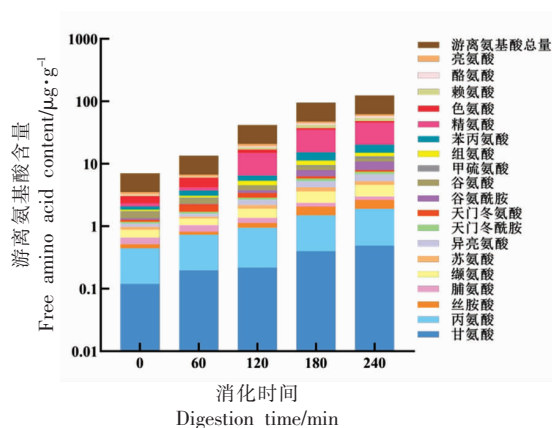


图 4 消化产物中 AA 聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of AA in digestive products

力较高,在消化终产物浓度为  $50 \text{ mg/mL}$  时有最高清除率为  $80.65\%$ ;Oil 组相对清除能力最弱,在消化终产物浓度为  $50 \text{ mg/mL}$  时其最高清除率仅  $40.61\%$ ;不同比例复配组中 7:3 比例组清除效果

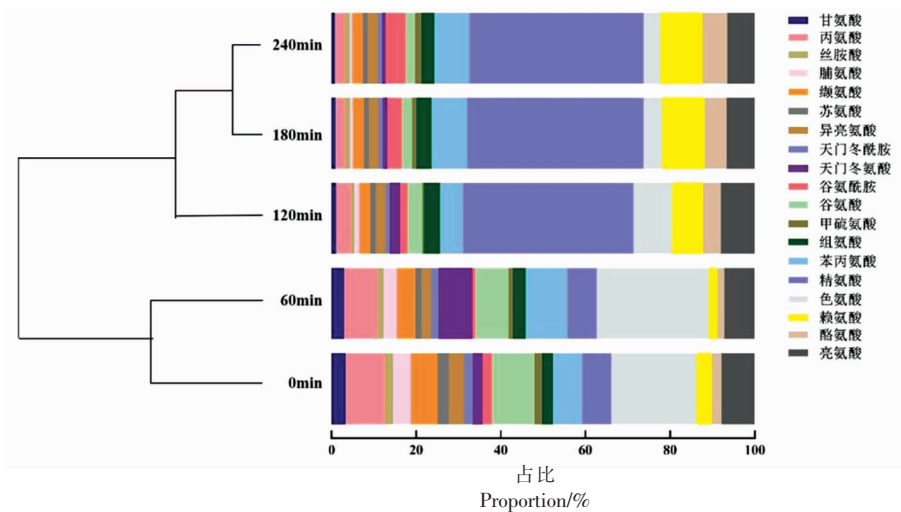


图5 消化产物中 AA 聚类分析图

Fig.5 Cluster analysis of AA in digestive products

较好,最高清除率为 75.88%,3:7 比例组清除效果较差,最高清除率仅 53.70%。初步推断核桃蛋白质的 DPPH 清除能力比油的 DPPH 清除能力好。如图 7 所示,除 Oil 组,其它 4 组在消化终产物浓度为 50 mg/mL 时的清除率趋于一致;Pr 组的整体 ABTS<sup>+</sup>清除能力较高,在 50 mg/mL 时有最高清除率 81.02%;Oil 组清除能力最弱,在 50 mg/mL 时其最高清除率为 60.14%;不同比例复配组中 7:3 比例组清除效果较好,最高清除率为 79.05%,1:1 比例组清除效果较差,最高清除率仅 74.61%。初步推断核桃蛋白质的 ABTS<sup>+</sup>清除能力比油的 ABTS<sup>+</sup>清除能力强。如图 8 所示,7:3 和 3:7 复配

比例组的还原能力在消化终产物浓度为 50 mg/mL 时趋于一致,1:1 组和 Oil 组在质量浓度为 30 mg/mL 时吸光度值很接近;Pr 组的整体铁离子还原能力较高,在消化终产物质量浓度为 50 mg/mL 时测定其在 700 nm 处的吸光度,最高值为 1.55;Oil 组清除能力最弱,在消化终产物质量浓度为 50 mg/mL 时其吸光度值为 0.88;不同比例复配组中 7:3 比例组清除效果较好,最高吸光度值为 1.46,1:1 比例组清除效果较差,最高吸光度值仅 1.20。初步推断核桃蛋白质的铁离子还原能力比油的铁离子还原能力强。

核桃蛋白包括醇溶蛋白、清蛋白、球蛋白、谷

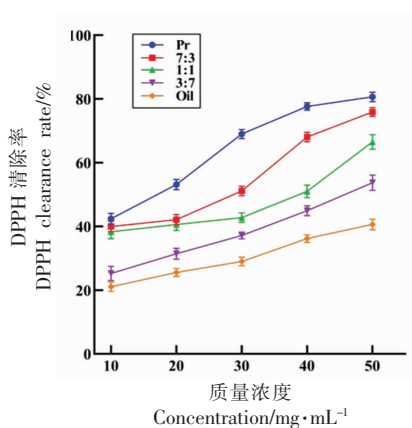


图6 核桃蛋白质和油脂在体外消化过程中 DPPH 清除率的变化

Fig.6 Changes of DPPH clearance of walnut protein and oil during digestion *in vitro*

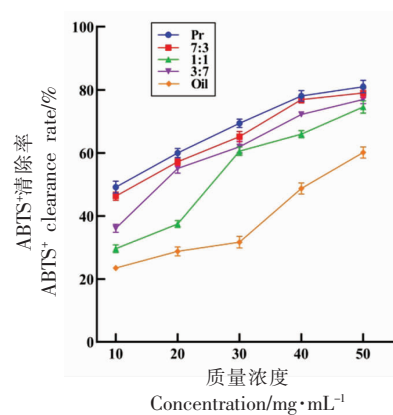


图7 核桃蛋白质和油脂在体外消化过程中 ABTS<sup>+</sup>清除率的变化

Fig.7 Changes of ABTS<sup>+</sup> clearance of walnut protein and oil during digestion *in vitro*



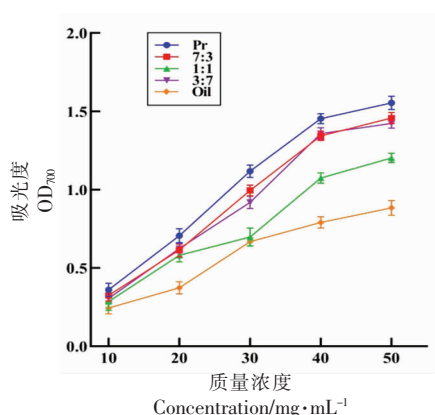


图 8 核桃蛋白质和油脂在体外消化过程中铁离子还原力的变化

Fig.8 Changes of iron reducing power of walnut protein and oil during digestion *in vitro*

蛋白-1 和谷蛋白-2,这 5 种蛋白质均具有一定的抗氧化性<sup>[15]</sup>。核桃蛋白具有较高的抗氧化活性与小分子多肽含量有关<sup>[33]</sup>,同时与其氨基酸组成、分子质量和结构有关<sup>[15]</sup>。核桃油的抗氧化能力主要与酚类物质相关,酚类物质通过获得羟基自由基、过氧自由基和烷氧自由基,起到抗氧化作用<sup>[1]</sup>。结合上述 HPLC-MS/MS 和 GC-MS 分析结果可知,由于核桃蛋白质在消化阶段会产生多肽和氨基酸两种次级代谢物,均具有良好的抗氧化性,推断其抗氧化性与多肽含量和氨基酸组成有关,多肽分子质量越小,氨基酸含量越高,抗氧化性越强。核桃油经消化分解主要产生代谢产物为脂肪酸,推断其抗氧化性与脂肪酸含量相关<sup>[19]</sup>。随着消化的进行,产生的短链脂肪酸含量越高,酚类物质相对含量越少,越容易被氧化,因此其抗氧化性弱于蛋白质。有研究发现核桃粉中含油量越高,其货架期越短<sup>[34]</sup>,复合核桃油的抗氧化能力也明显优于纯核桃油<sup>[35]</sup>。添加外源性抗氧化剂,与提高核桃油抗氧化性之间起到协调增效作用,而核桃油本身也含一定的抗氧化活性物质,有助于结合内源的抗氧化成分,优化核桃油抗氧化剂的配方,以此达到有效延长易氧化核桃产品货架期的目的<sup>[36]</sup>。可以考虑通过添加核桃内源性氨基酸,如精氨酸和赖氨酸等,在不降低核桃产品营养价值的前提下,延长其货架期。

### 3 结论

利用体外模拟消化试验明确核桃主要成分蛋白和油脂的代谢变化特征,并对两种物质的抗氧化性进行探究。结果表明:0~120 min 为胃消化阶段,产物中多肽含量、游离氨基酸含量和游离脂肪酸含量显著增加( $P<0.05$ ),多肽从 0.34 mg/mL 增到 0.37 mg/mL,游离氨基酸从 3.50  $\mu\text{g/g}$  增到 20.79  $\mu\text{g/g}$ ,游离脂肪酸从 1 080  $\mu\text{g/g}$  增到 27 451.01  $\mu\text{g/g}$ ;120~180 min 为肠消化阶段,多肽含量逐渐降低,游离氨基酸和游离脂肪酸含量显著提高( $P<0.05$ ),多肽从 0.37 mg/mL 降到 0.36 mg/mL,游离氨基酸从 20.79  $\mu\text{g/g}$  增到 61.85  $\mu\text{g/g}$ ,游离脂肪酸从 27 451.01  $\mu\text{g/g}$  增到 413 199.89  $\mu\text{g/g}$ 。通过体外消化终产物抗氧化能力分析,发现核桃蛋白质的抗氧化能力比油脂的抗氧化能力强,在同时存在蛋白质和油脂的情况下,没有表现出显著的协同作用。以上结论表明核桃油和蛋白质的主要消化部位在肠道,核桃蛋白的抗氧化性高于核桃油,二者混合不利于抗氧化性的提高,在等比混合时甚至导致抗氧化性更差。本研究结果为核桃油内源性天然抗氧化剂的研发,以及开发高抗氧化性核桃功能产品提供研究思路。

### 参 考 文 献

- [1] JAN R, ARA T, MIR J I. Quality profiling and estimation of total phenols, flavonoids, flavonols and antioxidative potential of walnut kernel (*Juglans regia*) from Kashmir valley[J]. Journal of Nuts, 2022, 13(3): 211-225.
- [2] HAN Y, ZHENG Y, LI S, et al. Effects of drying process with different temperature on the nutritional qualities of walnut (*Juglans regia* L.)[J]. Food Science and Technology Research, 2019, 25(2): 167-177.
- [3] PYCIA K, KAPUSTA I, JAWORSKA G, et al. Antioxidant properties, profile of polyphenolic compounds and tocopherol content in various walnut (*Juglans regia* L.) varieties[J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(7): 607-616.
- [4] ASHRAF S, ARFEEN A, AMJAD S, et al. Effect of walnut (*Juglans Regia*) consumption on hyperlipidemic adults[J]. Food Science and Technology, 2020,

- 41(2): 432-438.
- [5] NI Z J, ZHANG Y G, CHEN S X, et al. Exploration of walnut components and their association with health effects [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(19): 5113-5129.
- [6] CHEN C, VENKITASAMY C, ZHANG W, et al. Effect of step-down temperature drying on energy consumption and product quality of walnuts[J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 285(11): 110105.
- [7] KHIR R, PAN Z. Walnuts integrated processing technologies for food and agricultural by-products[M]. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, 2019: 91.
- [8] ASTWOOD J D, LEACH J N, FUCHS R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(10): 1269-1273.
- [9] CALVO-LERMA J, FORNÈS-FERRER V, HEREDIA A, et al. *In vitro* digestion models to assess lipolysis: the impact of the simulated conditions of gastric and intestinal pH, bile salts and digestive fluids[J]. *Food Research International*, 2019, 125(11): 108511.
- [10] HE X, WANG B, ZHAO B, et al. Ultrasonic assisted extraction of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein and effect of heat treatment on its *in vitro* digestion characteristics[J]. *Foods*, 2022, 11(5): 771.
- [11] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. *Nature protocols*, 2019, 14(4): 991-1014.
- [12] HUR S J, LIM B O, DECKER E A, et al. *In vitro* human digestion models for food applications[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(1): 1-12.
- [13] 韩海涛, 宴正明, 张润光, 等. 核桃蛋白组分的营养价值、功能特性及抗氧化性研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(4): 29-34.
- HAN H T, YAN Z M, ZHANG R G, et al. Study on nutritional value, functional properties and antioxidant activity of protein components of walnut[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(4): 29-34.
- [14] YANG X Y, ZHONG D Y, WANG G L, et al. Effect of walnut meal peptides on hyperlipidemia and hepatic lipid metabolism in rats fed a high-fat diet[J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1410.
- [15] 李艳伏, 徐怀德, 陈金海, 等. 木瓜蛋白酶解核桃粕蛋白产物抗氧化活性研究[J]. *中国食品学报*, 2008, 8(5): 8-14.
- LI Y F, XU H D, CHEN J H, et al. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysis of walnut meal protein products by papain[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2008, 8(5): 8-14.
- [16] 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.
- HONG Z S, XIE J, ZHANG B J, et al. Preparation and antioxidant activity of walnut meal polypeptides[J]. *Scientia Tropica Agricultura*, 2021, 41(12): 45-52.
- [17] CHEN N, YANG H M, SUN Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. *Peptides*, 2012, 38(2): 344-349.
- [18] 龚娣, 陈程莉, 常馨月, 等. 核桃油氧化及抗氧化调控研究进展[J]. *中国油脂*, 2021, 46(5): 58-62.
- GONG D, CHEN C L, CHANG X Y, et al. Research progress on oxidation and antioxidant regulation of walnut oil[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(5): 58-62.
- [19] ARRANZ S, PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(4): 25-31.
- [20] 彭星星, 乔茜华, 张红云, 等. 核桃油贮藏过程抗氧化能力的研究[J]. *粮油食品科技*, 2017, 25(5): 27-31.
- PENG X X, QIAO Q H, ZHANG H Y, et al. Study on antioxidant capacity of walnut oil during storage[J]. *Grain, Oil and Food Science and Technology*, 2017, 25(5): 27-31.
- [21] 闫圣坤, 杨嘉鹏, 王庆惠, 等. 低温冷榨核桃油工艺及主要压榨参数优化[J]. *农业工程*, 2020, 10(1): 48-52.
- YAN S K, YANG J P, WANG Q H, et al. Process and main press parameters optimization of low temperature cold pressing walnut oil[J]. *Journal of Agricultural Engineering*, 2020, 10(1): 48-52.
- [22] 刘猛, 李祥, 樊凤娇. 影响核桃粕蛋白溶出率的提

- 取条件[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 91-95.
- LIU M, LI X, FAN F J. Extraction conditions affecting protein dissolution rate of walnut meal[J]. Journal of Food Industry, 2021, 42(12): 91-95.
- [23] 邵宇辰, 穆宏磊, 陈杭君, 等. 肠道条件和粒径对加工山核桃体外消化的影响[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(8): 1734-1742.
- SHAO Y C, MU H L, CHEN H J, et al. Effects of intestinal conditions and particle size on *in vitro* digestion of processed carya carya[J]. Acta Agriculturae Zhejiensis, 2022, 34(8): 1734-1742.
- [24] 高英, 俞玉忠. 福林酚法测定脑蛋白水解物溶液中的多肽含量[J]. 海峡药学, 2004(6): 57-58.
- GAO Y, YU Y Z. Determination of polypeptide content in brain protein hydrolysate by folin phenol method[J]. Straits Pharmacy, 2004(6): 57-58.
- [25] 邵洋洋, 邵海燕, 刘瑞玲, 等. 双孢菇柄酵素发酵条件优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 244-251.
- SHAO Y Y, GAO H Y, LIU R L, et al. Optimization of fermentation conditions and analysis of antioxidant activity of pestozyme bisporus[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 244-251.
- [26] 曲文娟, 凡威, 朱亚楠, 等. 变温滚筒催化红外-热风干燥核桃营养品质研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 205-215.
- QU W J, FAN W, ZHU Y N, et al. Study on nutritional quality of walnuts catalyzed by variable temperature roller infrared and hot air[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 205-215.
- [27] ROY D, YE A, MOUGHAN P J, et al. Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species—A review[J]. Frontiers in Nutrition, 2020, 7(10): 7759.
- [28] 姚轶俊. 荞麦多酚消化吸收及其对脂质代谢调控机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- YAO Y J. Study on the effect of polyphenols on lipid metabolism in buckwheat[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [29] SOUSA R, PORTMANN R, DUBOIS S, et al. Protein digestion of different protein sources using the infogest static digestion model[J]. Food Research International, 2020, 130(10): 89-96.
- [30] EL-KHAIRY L, UELAND P M, REFSUM H, et al. Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project[J]. Circulation, 2001, 103(21): 2544-2549.
- [31] NGUYEN H T H, GATHERCOLE J L, DAY L, et al. Differences in peptide generation following *in vitro* gastrointestinal digestion of yogurt and milk from cow, sheep and goat [J]. Food Chemistry, 2020, 317(7): 126419.
- [32] GUO H, HAO Y, RICHEL A, et al. Antihypertensive effect of quinoa protein under simulated gastrointestinal digestion and peptide characterization[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(15): 5569-5576.
- [33] 任娇艳, 史传超, 常博, 等. 核桃蛋白的分离制备及其酶解物的抗氧化特性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(3): 118-124.
- REN J Y, SHI C C, CHANG B, et al. Isolation and preparation of walnut protein and antioxidant properties of its hydrolysates[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(3): 118-124.
- [34] 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): 191-171.
- HOU Y Q, LIU C J, NIE R Z, et al. Research progress on composition, preparation and properties of walnut protein[J]. China Journal of Grain and Oils, 2020, 35(12): 191-171.
- [35] 李清清, 余旭亚, 耿树香, 等. 复合核桃油的体外抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 31-36.
- LI Q Q, YU X Y, GENG S X, et al. Antioxidant activity of compound walnut oil *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(24): 31-36.
- [36] 李大鹏, 王文倩, 王晗琦, 等. 货架期与 0℃下核桃营养成分与品质稳定性比较[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 231-238.
- LI D P, WANG W Q, WANG H Q, et al. Comparison of nutritional functional components and quality stability of walnut at 0℃ and shelf life[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 231-238.

## Effects of Simulated Digestion *in Vitro* on the Principal Component Metabolism and Antioxidant Properties of Walnut

Li Xia<sup>1,2</sup>, Chen Hangjun<sup>1,2</sup>, Xia Wei<sup>1</sup>, Zheng Yonghua<sup>2</sup>, Jin Peng<sup>2</sup>, Niu Ben<sup>1</sup>,

Fang Xiangjun<sup>1</sup>, Wu Weijie<sup>1,3\*</sup>, Gao Haiyan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Post-Harvest Processing of Fruit Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fruit and Vegetable Preservation and Processing Technology of Zhejiang Province, Key Laboratory of Fruit and Vegetable Preservation and Processing of Light Industry of China, Food Science Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310002

<sup>2</sup>College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Agricultural Product Quality and Safety Hazard Factors and Risk Control, Hangzhou 310021)

**Abstract** In order to clarify the changes of digestion and metabolism of main nutrients (protein and oil) in walnut and their antioxidant properties, this study took *Juglans regia* ‘Xinxin 2’ as the research object, and analyzed the metabolic processes of the two main components of protein and oil by using a simulated gastrointestinal digestive model. The metabolic changes at five different stages during digestion were determined by GC-MS and HPLC-MS/MS. The results showed that the total amount of free amino acids in protein digestion products increased from 3.50  $\mu\text{g/g}$  to 61.85  $\mu\text{g/g}$  with the passage of gastrointestinal digestion time ( $P < 0.05$ ). For example, the content of arginine increased from 0.24  $\mu\text{g/g}$  to 25.50  $\mu\text{g/g}$ , and the content of lysine increased from 0.12  $\mu\text{g/g}$  to 6.03  $\mu\text{g/g}$ . The content of free fatty acids increased from 1.08 mg/g to 413.20 mg/g ( $P < 0.05$ ), indicating that new fatty acids such as cis-11-eicosanoenoic acid and trans-10-19-enoenoic acid were produced under the action of enzymes during digestion. To explore the antioxidant properties of 5 different matching groups (the mass ratio of protein to oil was 1:0, 7:3, 1:1, 3:7, 0:1) after digestion. The results showed that the antioxidant capacity increased with the increase of substance concentration. It was found that the antioxidant capacity was strongest when the protein-oil mass ratio was 1:0, and when the concentration was 50 mg/mL, the DPPH and ABTS<sup>+</sup> clearance rates were 80.65% and 81.02%, respectively. The absorbance value of Fe<sup>3+</sup> reducing power was 1.55, indicating that the antioxidant capacity of walnut protein was better than that of oil, because the two digestive products of protein had antioxidant properties. This study provides data support for clarifying the digestion and metabolism mechanism of walnut principal components, and provides reference for the development of walnut products with high antioxidant function.

**Keywords** walnut; component analysis; *in vitro* digestion; antioxidant; metabolism