响应面试验优化亚临界水提取核桃粕蛋白工艺及其氨基酸分析

汪正兴[1,2]，韩　强[1]，郜海燕[1,*]，陈杭君[1]，房祥军[1]，穆宏磊[1]
（1.浙江省农业科学院食品科学研究所，农业部果品产后处理重点实验室，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，浙江 杭州　310021；2.安徽农业大学茶与食品科技学院，安徽 合肥　230036）

摘　要：本研究以新疆核桃粕为实验原料，利用亚临界水辅助提取核桃粕蛋白，分别以提取时间、料液比、提取温度、pH值为单因素研究对蛋白提取率的影响。通过单因素试验确定合适的因素水平，以响应面优化分析得到核桃粕蛋白提取的最佳条件。结果表明：核桃粕的最佳提取工艺为pH 9.0、料液比1∶25（g/mL）、提取温度133 ℃，此条件下的蛋白提取率可达到75.01%。氨基酸的结果分析表明：氨基酸种类齐全，谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸3 种含量最高，共占氨基酸总量的59.7%，必需氨基酸占20.03%。亚临界水提取蛋白的提取率较高，操作方便，适用于核桃粕蛋白提取。

关键词：核桃粕；亚临界水；蛋白提取；响应面；氨基酸分析

Optimization of Subcritical Water Extraction of Walnut Meal Protein by Response Surface Methodology and Amino Acid Analysis

WANG Zhengxing[1,2], HAN Qiang[1], GAO Haiyan[1,*], CHEN Hangjun[1], FANG Xiangjun[1], MU Honglei[1]
(1. Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Fruits and Vegetables, China National Light Industry, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Postharvest and Processing Technology Research of Zhejiang Province, Key Laboratory of Post-Harvest Handing of Fruits, Ministry of Agriculture, Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou　310021, China; 2. College of Tea and Food Science Technology, Anhui Agricultural University, Hefei　230036, China)

Abstract: The subcritical water extraction of walnut meal protein was optimized by response surface methodology. The variables optimized were extraction time, solid-to-solvent ratio, extraction temperature and pH. The response was the extraction yield of protein. One-factor-at-a-time method was used to determine the appropriate levels of independent variables for further optimization by response surface methodology. The results showed that the optimal conditions were as follows: pH, 9.0; solid-to-solvent ratio, 1:25 (g/mL); and temperature, 133 ℃. Under these conditions, the extraction yield was up to 75.01%. The results of amino acid analysis indicated that the walnut protein contained almost all kinds of amino acids with glutamic acid, arginine, and aspartate being the predominant amino acids, accounting for 59.7% of the total amino acids. Essential amino acids accounted for 20.03%. Sub critical water extraction could be considered as convenient and efficient method for the extraction of walnut protein.

Key words: walnut meal; subcritical water; protein extraction; response surface methodology; amino acid analysis
DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720027
中图分类号：TS201.1　　文献标志码：A　　文章编号：1002-6630（2017）20-0191-06
引文格式：
汪正兴, 韩强, 郜海燕, 等. 响应面试验优化亚临界水提取核桃粕蛋白工艺及其氨基酸分析[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 191-196. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720027.　http://www.spkx.net.cn
WANG Zhengxing, HAN Qiang, GAO Haiyan, et al. Optimization of subcritical water extraction of walnut meal protein by response surface methodology and amino acid analysis[J]. Food Science, 2017, 38(20): 191-196. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720027.　http://www.spkx.net.cn
收稿日期：2016-12-27
基金项目：浙江省科技厅援疆项目（2015C26006）；国家自然科学基金面上项目（31571907）；浙江省公益技术研究农业项目（2015C32032）

作者简介：汪正兴（1990—），男，硕士研究生，主要从事食品物流保鲜与质量控制研究。E-mail：18858114583@163.com
*通信作者：郜海燕（1958—），女，研究员，博士，主要从事食品物流保鲜与质量控制研究。 E-mail：spsghy@163.com

核桃（*Juglans regia* L.）又称胡桃，羌桃，为胡桃科植物。与扁桃、腰果、榛子并称为世界著名的“四大干果”[1]。我国是核桃生产和消费大国，占世界核桃出口总量的45.6%，主产区主要分布在新疆、四川、云南以及西北等地区，其中，新疆由于优越的自然条件，其生产的核桃皮薄、仁多、颗粒大而被人熟知，近年来，由于国家政策的支持，新疆地区种植核桃面积逐渐增大，核桃产量稳步提升，受到国内外消费者的青睐[2]。我国的核桃产品主要集中于生产粮油，炒制以及作为辅料等，相比于发达国家，我国的核桃加工规模小、产品种类少、起步较晚，远远落后于发达国家的核桃产品加工业。现阶段，对于核桃的加工利用主要用于核桃油压榨，得到可食用的核桃油产品，除此之外还有核桃营养粉和乳饮料及一些休闲食品[3]。

核桃油是核桃的主要成分，且是一种高级食用油，在加工的过程会产生附加产物核桃粕，其蛋白含量高达30%左右[4]，核桃粕含有丰富的蛋白质、淀粉、油脂、维生素和矿物质且含有18 种氨基酸，满足人体需要的8 种氨基酸，其中精氨酸和谷氨酸含量十分丰富[5-6]。但在实际的生产中核桃粕作为饲料或直接遗弃，原料未能充分利用，多种营养物质也随之流失造成浪费。同时，因其高蛋白含量，直接遗弃对环境也带来了较大的负面影响，易造成土壤和水资源的富营养化污染。因此，对核桃粕进行精深加工和有效利用具有十分重要的意义。

目前，核桃粕蛋白提取的方法主要有碱溶酸沉法、膜分离法和离子交换法、物理辅助法[7]。碱溶酸沉法工艺简单，但酸碱消耗过大，成本过高[8]。膜分离法耗能低、操作简单、无污染，但超滤膜易污染，会影响蛋白性能的改变[9]。离子交换法的优点在于得到的蛋白纯度较高，但生产周期长。物理辅助法有超声波法、微波法以及亚临界水萃取法等。

亚临界水萃取法是将水作为提取剂，通过改变压力，使水的温度达到100～374 ℃范围，此时水仍然是液态[10-11]。与常温水相比有更强的分解能力和溶解有机物的特性，类似于有机溶剂[12-13]。亚临界萃取技术是新兴发展起来的一项变革性技术，亚临界水相比于其他的辅助方法，其提取时间短、提取效率高、对环境友好等特点[14]。同时亚临界水提取在核桃粕蛋白提取上鲜有报道，本研究采用亚临界水提取蛋白，通过工艺条件优化，为核桃粕蛋白提取提供新型方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新疆核桃粕（油压冷榨后得到）、牛血清蛋白 南京建成生物工程研究所有限公司；氢氧化钠、盐酸 南通凯瑞化工有限公司；试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Cintra 20紫外-可见分光光度计 澳大利亚GBC公司；KQ5200 DE型数控超声波清洗器 昆山市超声波仪器有限公司；LABCONCO低温冷冻干燥机 上海泽权仪器设备有限公司；CEM MARS6高通量密闭微波消解系统 美国培安科技公司。

1.3 方法

1.3.1 核桃蛋白提取工艺

参考王丰俊等[15]的方法：选取色泽较好没有霉烂的大核桃饼粕适量，用中药粉碎机进行粉碎处理至细末状后过80 目筛，按照比例加入到先前配好的氢氧化钠溶液中，摇匀，放入到微波消解仪中处理30 min，消解完成后静置30 min，充分冷却。将冷却后的样品离心后取上清液，按照考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白。

1.3.2 核桃蛋白提取率计算

本实验中以蛋白提取率为指标[16]，按以下公式计算：

$$Y/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

式中：Y为提取率/%；m_1为提取液蛋白质量/g；m_2为核桃粕蛋白质量/g。

1.3.3 单因素试验设计

在提取时间30 min、料液比1∶20（g/mL）、pH 9的条件下，考察提取温度（110、120、130、140、150、160 ℃）对蛋白提取率的影响。

在提取时间30 min、pH 9、提取温度130 ℃的条件下，考察料液比（1∶10、1∶15、1∶20、1∶25、1∶30（g/mL））对核桃粕蛋白提取率的影响。

在提取时间30 min、料液比1∶20（g/mL）、提取温度130 ℃的条件下，考察pH值（8、8.5、9、9.5、10.5）对核桃粕蛋白提取率的影响。

在料液比1∶20（g/mL）、提取温度130 ℃、pH 9的条件下，考察提取时间（10、20、30、40、50、60 min）对核桃粕蛋白提取率的影响。

1.3.4 响应面优化试验设计

根据单因素试验结果，固定提取时间30 min不变，以提取温度、pH值、料液比为试验因素，并以－1、0、1 为自变量的低、中、高水平，以核桃粕的蛋白提取率为响应值，设计三因素三水平试验，因素与水平设计见表1。

表 1 响应面分析因素及水平

Table 1 Coded levels of independent variables used for response surface methodology

因素	水平		
	－1	0	1
*A*料液比（g/mL）	1∶15	1∶20	1∶25
B pH	8.5	9	9.5
*C*提取温度/℃	120	130	140

1.3.5 游离氨基酸的组成分析

参考GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定方法》[17]，使用氨基酸自动分析仪分析氨基酸组成[18]。

1.4 数据统计

每个实验重复3 次，取平均值。响应面数据采用Design-Expert软件进行统计分析[19]。其中$P<0.01$表示差异极显著，$P<0.05$表示差异显著，$P>0.05$表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 可溶性蛋白测定标准曲线

采用考马斯亮蓝方法[20]，以蛋白质量浓度（μg/mL）为横坐标，吸光度A为纵坐标，绘制标准曲线得到线性方程：A=0.006 1X+0.007 8，标准曲线的相关系数R^2为0.999 1，说明牛血清蛋白在0～100 μg/mL范围内呈现良好的线性关系。

2.2 微波消解提取核桃粕蛋白单因素试验

2.2.1 提取时间对核桃粕蛋白提取的影响

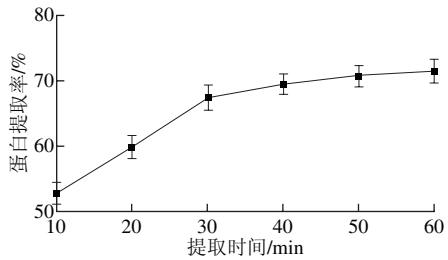


图 1 提取时间对蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on the extraction efficiency of protein

由图1可知，随着提取时间的延长，核桃粕的蛋白提取率逐渐增加，这与王琳等[21]的研究结果相似，提取时间20～30 min，蛋白的提取率显著提高，随着时间的延长，蛋白提取率趋于平衡，开始时蛋白没有完全溶解，提取率较低，当蛋白溶出量达到一定量后只有很少一部分溶解，从节约时间和提取率角度考虑，提取时间控制在30 min较好，因此选30 min为提取蛋白的最佳时间。

2.2.2 pH值对核桃粕蛋白提取率的影响

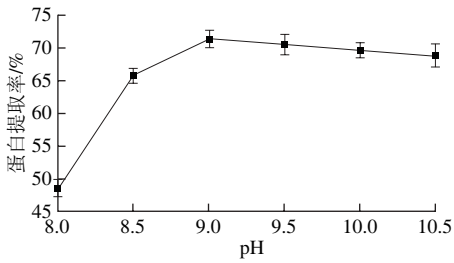


图 2 pH值对蛋白提取率的影响

Fig. 2 Effect of pH on the extraction efficiency of protein

由图2可知，核桃粕蛋白提取率随着pH值的升高，蛋白提取率逐渐增大，当pH值在低范围内，蛋白的提取效率较低，与范方宇[22]和Yuan Yingjin[23]等研究结果一致。实验中发现，随着pH值的升高，蛋白质的颜色会越来越深，当pH值达到9时，蛋白的提取率逐渐下降，可能因为蛋白的基本结构中含有氨基和羧基2 种官能团，不同的pH值环境会影响其存在方式，进而改变溶出效果[24]。因此选择pH值为8.5、9.0、9.5这3 个水平进行响应面试验。

2.2.3 料液比对核桃粕蛋白提取率的影响

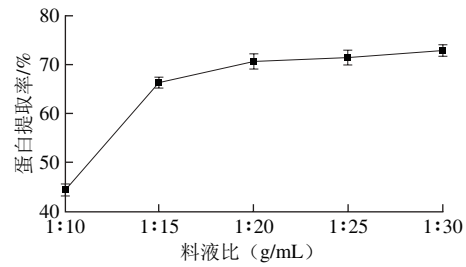


图 3 料液比对蛋白提取率的影响

Fig. 3 Effect of solid-to-solvent ratio on the extraction efficiency of protein

由图3可知，随着溶剂用量的增大，核桃粕的蛋白提取率逐渐增大，与Venkatachalam等[25]研究结果一致，当料液比达到1∶20（g/mL）时，蛋白提取率增大逐渐缓慢，这是由于蛋白的溶解度达到饱和状态，继续增加溶剂不再溶解[26]，选取料液比1∶15、1∶20、1∶25（g/mL）3 个水平进行响应面试验。

2.2.4 提取温度对核桃粕蛋白提取率的影响

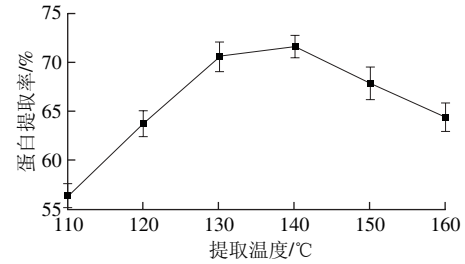


图 4 提取温度对蛋白提取率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the extraction efficiency of protein

由图4可知，随着提取温度的升高，核桃粕蛋白提取率随着温度的增大而减小，与Wiboonsirikul[27]和Sereewatthanawut[28]等研究结果一致。提取温度在140 ℃时，蛋白提取率出现最大值。当温度高于140 ℃以后，蛋白的提取率开始逐渐下降。温度较高时，水发生了解离现象，转化为H^+和OH^-离子，Sereewatthanawut等[28]利用色谱分析也证明了水的解离现象，与此同时，在高温的条件下蛋白质会发生降解，转化为多肽和氨基酸等一些小分子物质[28]。所以130 ℃为提取蛋白的较优条件，选取120、130、140 ℃作为响应面试验的3 个水平。

2.3 响应面优化试验结果

2.3.1 响应面优化试验结果与分析

综合单因素试验结果，选取提取温度、料液比、pH值3 个因素，在单因素试验基础上采用三因素三水平利用Design-Expert 8.0软件按照Box-Behnken原理进行响应面设计，根据试验设计确定的试验方案对核桃粕蛋白提取进行优化，试验方案及结果见表2。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design with experimental results

试验号	*A*料液比（g/mL）	*B* pH	*C*提取温度/℃	蛋白提取率/%
1	1∶15	8.5	130	63.56
2	1∶25	9.5	130	69.85
3	1∶20	9.5	120	64.89
4	1∶20	9.0	130	73.56
5	1∶25	9.0	140	73.98
6	1∶20	9.5	140	69.75
7	1∶20	9.0	130	75.13
8	1∶25	8.5	130	69.45
9	1∶15	9.0	120	63.78
10	1∶20	9.0	130	74.12
11	1∶20	9.0	130	75.97
12	1∶20	8.5	120	62.45
13	1∶15	9.5	130	66.45
14	1∶20	8.5	140	67.45
15	1∶25	9.0	120	69.57
16	1∶15	9.0	140	71.56
17	1∶20	9.0	130	76.15

2.3.2 回归方程方差分析

根据相应的试验表进行分析，得到料液比、pH值、料液比的二次多项回归方程：Y=76.16＋2.19A＋1.00B＋2.76C－0.62AB－0.84AC－0.035BC－2.62A^2－6.21B^2－3.81C^2。

表 3 回归方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	*F*值	*P*值
*A*料液比	1	38.28	38.28	125.77	＜0.000 1**
B pH值	1	8.06	8.06	26.48	0.001 3*
*C*提取温度	1	60.78	60.78	199.67	＜0.000 1**
AB	1	1.55	1.55	5.09	0.058 0
AC	1	2.84	2.84	9.33	0.018 0*
BC	1	0.004 9	0.004 9	0.016	0.902 0
A^2	1	28.96	28.96	95.14	＜0.000 1**
B^2	1	162.38	162.38	553.47	＜0.000 1**
C^2	1	61.28	61.28	201.33	＜0.000 1**
模型	9	389.13	43.24	142.05	＜0.000 1**
失拟项	3	1.09	0.36	1.39	0.367 7
残差	7	2.13	0.3		
纯误差	4	1.04	0.26		
总和	16	391.26			

注：*. P＜0.05，影响显著；**. P＜0.01，影响极显著。

由表3可知，回归模型极显著，R^2=0.981 2＞0.9，说明模型的相关度很好。模型的失拟项不显著，表明模型选择合适，方程的一次项对蛋白提取率的影响均显著。

2.3.3 响应面交互分析与结果优化

为了进一步研究相关变量之间的作用以及确定最优点，通过Design-Expert软件绘制响应面图来进行可视化分析，图5～7分别显示3 组以蛋白提取率为响应值的趋势图。趋势图中等高线直观地反映两变量交互作用的显著程度，椭圆表示两因素交互作用显著，而圆形与之相反[25]。响应面的坡度平缓表示两因素的交互作用不显著，坡度较陡表示两因素交互作用显著。

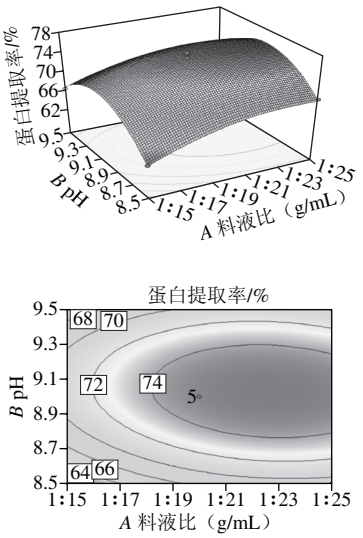
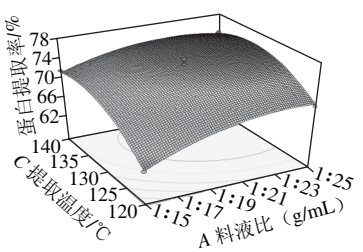


图 5 料液比和pH值对蛋白提取率影响的响应面及等高线图

Fig. 5 Three-dimensional response and contour plots showing the interactive effects of solid-to-solvent ratio and pH on the extraction efficiency of protein

由图5可见，等高线成椭圆形，响应面坡度较陡，说明料液比与pH值之间的交互作用明显；料液比相同，随着pH值的增大，蛋白提取率增大，pH值进一步增加，蛋白提取率反而下降，这是由于蛋白质以离子状态的形式溶解出来，继续提高pH值会破坏蛋白质的二级结构，造成蛋白提取率降低[29]。实验中发现，pH值的变化会引起蛋白质溶液颜色的改变，pH值越大其颜色也会越来越深。在pH值一定的条件下，随着溶剂用量的不断增加，其蛋白提取率先逐渐增加后增加缓慢，这是由于蛋白质具有一定的溶解度，当蛋白质达到饱和时，其不再溶解。



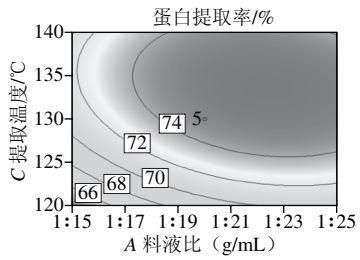


图 6　料液比和提取温度对蛋白提取率影响的响应面及等高线图

Fig. 6　Three-dimensional response and contour plots showing the interactive effects of solid-to-solvent ratio and temperature on the extraction efficiency of protein

由图6可知，料液比和提取温度对蛋白提取率的响应面图，等高线成椭圆形，响应面坡度较陡，说明料液比与提取温度之间的交互作用明显。料液比一定时，随着提取温度的升高，蛋白提取率先增大后减小，这是由于温度升高，部分蛋白质的空间结构可能遭到破坏，溶解度降低。当提取温度一定时，随着溶剂用量的增大蛋白提取率先逐渐增大后增加缓慢。

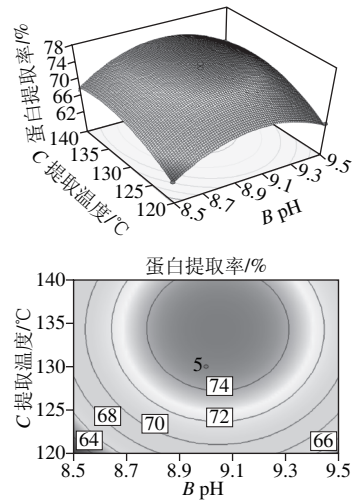


图 7　pH值和提取温度对蛋白提取率影响的响应面及等高线图

Fig. 7　Three-dimensional response and contour plots showing the interactive effects of pH and temperature on the extraction efficiency of protein

由图7可见，等高线成椭圆形，响应面坡度较为平缓，说明pH值与提取温度之间的交互作用不明显。pH值一定时，随着提取温度的升高，蛋白提取率先增加后减少。当提取温度一定时，pH值增大，蛋白提取率呈现相同的趋势变化。

综上所述，蛋白提取率与料液比、pH值、提取温度有着很强的显著性，经过软件分析得到最佳工艺条件为料液比1∶25、pH 9.02、提取温度132.5 ℃，预测的最大提取率为75.43%。

2.4　验证实验结果

为了检验模型预测的准确性，采用响应面优化的工艺条件进行核桃粕蛋白提取实验，考虑实际操作的便利，将工艺条件修正为提取温度133 ℃、pH 9、料液比1∶25（g/mL），实验重复3 次，所得的核桃粕蛋白提取率分别为74.89% 、75.23%、74.91%，平均值为75.01%，与预测值75.43%较为接近，说明模型可以很好地预测蛋白提取情况。

2.5　核桃蛋白氨基酸成分分析结果

表 4　核桃蛋白氨基酸组成

Table 4　Amino acid composition of walnut protein

氨基酸名称	氨基酸质量分数/%	氨基酸名称	氨基酸质量分数/%
天冬氨酸（Asp）	5.86	蛋氨酸（Met）	0.14
苏氨酸（Thr）	1.00	异亮氨酸（Ile）	1.10
丝氨酸（Ser）	1.52	亮氨酸（Leu）	2.04
谷氨酸（Glu）	9.56	酪氨酸（Tyr）	0.65
脯氨酸（Pro）	1.04	苯丙氨酸（Phe）	1.30
甘氨酸（Gly）	1.41	组氨酸（His）	0.95
丙氨酸（Ala）	1.22	赖氨酸（Lys）	0.88
缬氨酸（Val）	1.27	精氨酸（Arg）	7.62
半胱氨酸（Cys）	1.03		

如表4所示，检测到核桃蛋白中共17 种氨基酸，种类较为齐全，未检测到色氨酸，可能是因为在碱性条件下水解。核桃蛋白包含人体必需氨基酸7 种（色氨酸除外），其占总量的20.03%，蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、酪氨酸、半胱氨酸含量较少，但是精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸含量较高，分别占氨基酸总量的19.7%、15.2%、24.8%，这与张庆祝等[5]报道的结果相似。高含量的谷氨酸是表征核桃蛋白的一个重要特性，它可以促进机体生物代谢，提高大脑思维活跃水平，可以用于治疗神经衰弱和记忆力减退[30]。

3　结　论

在单因素试验的基础上，通过三因素三水平响应面试验对核桃粕中蛋白提取工艺进行优化。结果表明，响应面法优化后的最佳亚临界水提取工艺为提取温度133 ℃、料液比1∶25（g/mL）、碱溶pH 9.0，核桃粕蛋白的提取率为75.43%。响应面法优化方法得到各因素对蛋白提取率的影响顺序由大到小为提取温度＞液料比＞pH值。利用响应面分析方法对亚临界水提取核桃粕蛋白提取工艺条件进行优化，可以获得最佳的工艺参数，同时，氨基酸的组成分析结果表明，核桃蛋白的氨基酸种类较为齐全，含量合理，必需氨基酸含量较高，同时精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸含量丰富，因此核桃粕中提取的蛋白质可以作为优质的蛋白资源，为进一步的实验研究提供依据。

参考文献：

[1] 黄黎慧, 黄群, 孙术国. 核桃的营养保健功能与开发利用[J]. 粮食利技与经济, 2009, 3(4): 48-50. DOI:10.16465/j.gste.2009.04.006.

[2] 盛来运. 中国统计年鉴: 13-17主要林产品产量[M]. 北京: 中国统计出版社, 2010: 489.

[3] 李艳伏. 核桃粕多肽提取分离及功能特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008: 12-23.

[4] 王志平, 杨栓平, 李文德, 等. 核桃油及维生素E复合核桃油对动物功能行为影响的研究[J]. 山西医药杂志, 2000, 29(4): 325-326. DOI:10.3969/j.issn.0253-9926.2000.04.025.

[5] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003(5): 21-23. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2009.09.068.

[6] REVAI M. Quality characteristics of California walnuts[J]. Cereal Foods World, 1992, 37(5): 365-366.

[7] 杨瑾. 山核桃饼粕蛋白质提取纯化工艺及其功能特性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012:10-16.

[8] 张凯, 吴卫国. 大米蛋白提取工艺研究进展[J]. 粮食加工, 2010, 35(3): 38-40. DOI:10.3969/j.issn.1007-6395.2010.03.011.

[9] 雷淑芳, 晁芳芳, 张雪苍. 大豆分离蛋白的生产工艺及其在食品工业中的应用[J]. 粮食加工, 2004, 29(4): 53-56. DOI:10.3969/j.issn.1007-6395.2004.04.014.

[10] SMITH R M. Extractions with superheated water[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 975(1): 31-46. DOI:110.1016/S0021-9673(02)01225-6.

[11] 张海晖, 武妍, 段玉清, 等. 亚临界水萃取米糠蛋白工艺与功能特性研究[J]. 农业机械学报, 2011, 42 (11): 139-143. DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2011.11.026

[12] LI B, YANG Y, GAN Y X, et al. Online coupling of subcritical water extraction with high-performance liquid hromatography via solid-phase trapping[J]. Chromatography A, 2000, 873: 175-184. DOI:10.1016/S0021-9673(99)01322-9.

[13] MCGOWIN A E, ADOM K K, OBUBUAFO A K. Sreening of compost for PAHs and pesticides using static subcritical water extraction[J]. Chemosphere, 2001, 45(6/7): 857-864. DOI:10.1016/S0045-6535(01)00043-1.

[14] 刘淑兰, 张永忠, 姚琪, 等. 亚临界水法提取大豆酱渣饼中总异黄酮的研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(11): 64-67.

[15] 王丰俊, 杨朝晖, 马磊, 等. 响应面法优化核桃蛋白提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(3): 33-37. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201418008.

[16] 毛晓英. 核桃蛋白质的结构表征及其制品的改性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 30-31.

[17] 卫生部, 国家标准化管理委员会. 酱油卫生标准分析法: GB/T 5009.39—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 320-323.

[18] 李超, 杨文鸽, 徐大龙, 等. 电子束辐照对泥蚶肉营养成分影响[J]. 核农学报, 2011, 25(5): 959-964.

[19] JEFFWU C F, MICHAEL H. 试验设计与分析及参数优化[M]. 张润楚, 郑海涛, 兰燕, 等, 译. 北京: 中国统计出版社, 2003: 130-141.

[20] 李加兴, 房惠芳, 陈选, 等. 牡丹籽粕蛋自提取工艺优化及其等电点分析[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 147-149. DOI:10.3969/j.issn.1003-5788.2014.03.037.

[21] 王琳, 李芳, 王文杰, 等. 核桃蛋白提取工艺优化及SDS-PAGE分析[J]. 食品工业, 2016(10): 50-54.

[22] 范方宇, 王艳萍, 马艳娟, 等. 核桃蛋白提取工艺研究[J]. 农产品加工(学刊), 2010(5): 13-15. DOI:10.3969/jissn.1671-9646(X).2010.05.003.

[23] YUAN Y J, VELEV O D, CHEN K, et al. Effect of pH and Ca^{2+} induced associations of soybean proteins[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4953-4958. DOI:10.1021/jf025582d.

[24] 刘双凤, 王华生. 山核桃饼粕蛋白提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2015(4): 187-190. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2015.04.048.

[25] VENKATACHALAM M, SATHE S K. Chemical composition of selected edible nut seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(13): 4705-4714. DOI:10.1021/jf0606959.

[26] 赵见军, 张润光, 马玉娟, 等. 核桃粕中蛋白提取工艺的优化[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 40-46. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201418008.

[27] WIBOONSIRIKUL J, KIMURA Y, KADOTA M, et al. Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(21): 8759-8765. DOI:10.1021/jf072041l.

[28] SEREEWATTHANAWUT L, PRAPINTIP S, WATCHIRARUJI K, et al. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(3): 555-561. DOI:10.1016/j.biortech.2006.12.030.

[29] 陈珊珊, 丁俏羽, 李佳, 等. 响应面法优化虾壳可溶性钙提取工艺[J]. 中国食品学报, 2014, 14(6): 81-89. DOI:10.16429/j.1009-7848.2014.06.009.

[30] 吴启南, 王立新, 吴德康, 等. 合子草中氨基酸及无机元素成分分析[J]. 时珍国药研究, 1996, 7(4): 204-205.