

薄壳山核桃仁的蛋白质组成及其内源性蛋白酶活性

周倩倩¹, 余旺¹, 沐万孟², 陈业明¹

(1. 江南大学 油脂与植物蛋白工程研究中心, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了对薄壳山核桃仁中的主要蛋白质, 特别是相对丰度较低的功能活性蛋白进行系统研究, 以新鲜的薄壳山核桃仁为原料, 利用电泳、液相串联质谱和氨基酸分析等方法, 考察了薄壳山核桃仁的主要蛋白质和功能活性蛋白(抗氧化酶、内源性蛋白酶), 并对内源性蛋白酶的最适 pH 和温度进行了研究。结果显示: 薄壳山核桃仁的主要蛋白质包括 11S 球蛋白(58%)、7S 球蛋白(17%)和 9 kDa 蛋白(15%), 还含有 0.239% 超氧化物歧化酶、0.190% 过氧化氢酶和 0.282% 内源性蛋白酶; 只检测到 1 种蛋白酶抑制剂, 并且其相对丰度极低; 内源性蛋白酶在 pH 3.5~5.5 和 40~60℃ 时可发挥水解活性, 并在 pH 4.5 和 50℃ 时活性最强; 在氨基酸组成方面, 薄壳山核桃仁蛋白的赖氨酸含量低(3.74%), 但谷氨酸+谷氨酰胺含量(19.51%)和精氨酸含量(14.12%)高。说明国产薄壳山核桃适宜鲜食, 对促进人体健康有益。

关键词: 薄壳山核桃仁; 蛋白质; 抗氧化酶; 内源性蛋白酶

中图分类号: TS222+.1; TS255.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)12-0051-07

Protein components and activity of endogenous proteases in pecan kernels

ZHOU Qianqian¹, YU Wang¹, MU Wanmeng², CHEN Yeming¹

(1. Research Center of Lipid & Vegetable Protein, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In order to systematically examine the major proteins in pecan kernels, especially the bioactive proteins with low relative abundance, the major proteins and bioactive proteins (antioxidant enzymes, endogenous proteases) in fresh pecan kernels were investigated by tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, liquid chromatography tandem mass spectrometry and amino acid analysis. The optimum pH and temperature of the endogenous proteases were also studied. The results showed that the major proteins in pecan kernels included 11S globulins (58%), 7S globulins (17%) and 9 kDa proteins (15%), as well as 0.239% superoxide dismutases, 0.190% catalases and 0.282% endogenous proteases. Only one protease inhibitor was detected, and its relative abundance was extremely low. These endogenous proteases showed hydrolytic activity at pH 3.5-5.5 and 40-60℃, and optimal at pH 4.5 and 50℃. As for the amino acid composition, the proteins in pecan kernels contained a low content of lysine (3.74%), but a high content of glutamic acid + glutamine (19.51%) and arginine (14.12%). It is suggested that domestic pecans are suitable for fresh consumption, which is beneficial for promoting human health.

Key words: pecan kernel; protein; antioxidant enzymes; endogenous proteases

收稿日期: 2021-08-30; 修回日期: 2022-05-27

基金项目: 江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ-句容[2020]01)

作者简介: 周倩倩(1999), 女, 在读硕士, 研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail) qqzhou312@163.com。

通信作者: 陈业明, 副教授(E-mail) chenyming19821213@163.com。

薄壳山核桃也称碧根果, 原产于北美^[1]。由于薄壳山核桃的良好口感和营养价值^[2], 从2008年开

始,我国大量进口薄壳山核桃^[3]。2008年以来国内薄壳山核桃的种植规模逐步增加^[3],目前年产量已达到千吨级。薄壳山核桃仁的营养成分主要为脂质和蛋白质。植物蛋白除了主要蛋白——贮藏蛋白外,还含有一些功能活性蛋白,可为人体提供氨基酸营养,还可发挥其生理功能。目前研究较多的功能活性蛋白包括抗氧化酶类和蛋白酶类,鲜食可以完好地保持功能活性蛋白的生理活性^[4]。抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等,由于自身的抗氧化性,对于代谢紊乱、心血管疾病、炎症、癌症和大脑功能衰退等具有功能活性作用^[5]。蛋白酶主要包括内肽酶和外肽酶,摄入这些蛋白酶可缓解人体因消化能力不足引起的胃肠道不适,一些蛋白酶对于癌症、免疫调节问题和伤口愈合也具有功能活性作用^[6-8]。

对于薄壳山核桃蛋白,目前研究主要集中在利用电泳和免疫印迹法考察致敏蛋白^[9-10],而对于薄壳山核桃中的主要蛋白质,特别是相对丰度较低的功能活性蛋白还缺乏系统研究。因此,本文以新鲜薄壳山核桃仁为原料,通过还原和非还原电泳首先考察薄壳山核桃仁中主要蛋白质的二硫键连接情况,再通过液相串联质谱(LC-MS/MS)考察主要蛋白质的种类及相对丰度较低的功能活性蛋白,接着分析蛋白质的氨基酸组成,最后分析内源性蛋白酶的水解活性条件。通过本研究,一方面系统梳理薄壳山核桃仁中主要蛋白质的基本性质(分子质量、二硫键和氨基酸组成),另一方面挖掘其中的功能活性蛋白,以期为提高国产薄壳山核桃的市场竞争力提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

新鲜的薄壳山核桃仁(蛋白质含量为9.7%),由江苏农垦生态建设有限公司提供。硫酸钾、硫酸铜、硼酸、盐酸、氢氧化钠、硫酸、甘油、甲醇、乙酸、乙酸铵、三氯乙酸(TCA)、考马斯亮蓝G-250、十二烷基硫酸钠(SDS)、无水乙醇、甲基红、溴甲酚绿、磺基水杨酸,国药集团化学试剂有限公司;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、过硫酸铵,上海麦克林生化科技有限公司;三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine),北京百灵威科技有限公司;甲叉丙烯酰胺、丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、尿素,上海Sigma-Aldrich有限公司;标准蛋白Marker(2~250 kDa),上海伯乐生命医学产品有限公司;氮气,无锡市圣马气体有限公司。

1.1.2 仪器与设备

九阳L18-Y928S破壁机,九阳股份有限公司;AR224CN电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司;XMTA数显调节烘箱,上海跃进医疗器械厂;SH220石墨消解仪,济南海能仪器有限公司;HH-S数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂;TDZ5-WS台式低速离心机、M16高速微量离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;DYY-8C型电泳仪电源,北京市六一仪器厂;K9840自动凯氏定氮仪,海能未来技术集团股份有限公司;FE20实验室pH计,梅特勒-托利多公司;90型磁力搅拌器,上海沪西分析仪器厂有限公司;Himac-CR21G II高速冷冻离心机、L-8900氨基酸分析仪,日立高科技公司;TS-200定轨摇床,其林贝尔仪器制造有限公司;Q Exactive质谱仪,赛默飞世尔科技。

1.2 实验方法

1.2.1 薄壳山核桃仁浆液的制备

称取30g薄壳山核桃仁,按质量比1:3加入去离子水于4℃浸泡8~12h;用去离子水清洗2次,加入去离子水至总质量达到180g,用破壁机9档打浆2min,经纱布过滤得到浆1和渣;向渣中加入120g去离子水,再次用破壁机7档打浆1min,过滤得到浆2;将浆1和浆2混合得到薄壳山核桃仁浆液。利用凯氏定氮法(GB 5009.5—2016)测得浆液中的蛋白质含量为8.3 mg/mL,浆液中的蛋白质约占薄壳山核桃仁中总蛋白质的85%。

1.2.2 三(羟甲基)甲基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE)分析

样品制备:利用去离子水将浆液中的蛋白质含量稀释至2 mg/mL,得到稀释液;取0.5 mL稀释液,加入0.5 mL蛋白质溶解液(pH 6.8、0.25 mol/L Tris-HCl缓冲液,1% SDS)并混合均匀,加入30 μL DTT,煮沸5 min,冷却至室温,得到还原电泳样品;对于非还原电泳样品,取0.5 mL稀释液与0.5 mL蛋白质溶解液混合,不加DTT,也不煮沸处理。然后,离心(12 000 r/min, 10 min),取清液,加10 μL溴酚蓝指示剂,混合均匀,用于Tricine-SDS-PAGE分析。

Tricine-SDS-PAGE分析:参考Chen等^[11]的方法进行,4%浓缩胶,16%分离胶,阳极缓冲液为0.2 mol/L Tris-HCl(pH 8.9),阴极缓冲液为0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.25),并含有0.1% SDS和0.1 mol/L Tricine,进样量10 μL,样品在浓缩胶段的电压设定为30 V,进入分离胶后电压调为100 V,

并保持至结束。整个电泳过程中电泳槽置于室温环境下。电泳结束后,凝胶经固定、染色、脱色后使用 Image Lab 3.0 软件分析蛋白条带的表观分子质量和强度。

1.2.3 薄壳山核桃仁蛋白质的 LC-MS/MS 鉴定

参考 Chen 等^[11]的方法进行 LC-MS/MS 鉴定。

(1) 脱脂和酶解。将适量薄壳山核桃浆液在裂解缓冲液(4% SDS、1 mmol/L DTT、150 mmol/L Tris-HCl, pH 8)中剪切后,高速离心(16 000 g、10 min)去除脂质,得到透明液相。利用反复超滤的方式(超滤膜的截留分子质量 10 kDa;洗脱液为 8 mol/L 尿素、150 mmol/L Tris-HCl, pH 8)除去透明液相中的 SDS、DTT 和其他小分子物质。再利用 0.05 mol/L 碘乙酰胺(8 mol/L 尿素溶液)将蛋白质中的巯基烷基化。然后利用超滤(洗脱液为 8 mol/L 尿素,3 次)洗去碘乙酰胺,再利用超滤(洗脱液为 25 mmol/L 碳酸氢铵,3 次)洗去尿素。加入胰蛋白酶(酶与蛋白质质量比为 1:80),在 37 °C 孵育 16~18 h。

(2) 液相色谱分离。以 0.1% 甲酸水溶液为 A 液,0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈为 84%)为 B 液。液相色谱柱为 RP-C18(0.15 mm × 150 mm),以 95% 的 A 液平衡色谱柱。样品由自动进样器上样到 Zorbax 300SB-C18 peptide traps,再经过液相色谱柱分离。液相梯度:0~50 min, B 液 4%~50%;50~54 min, B 液 50%~100%;54~60 min, B 液保持在 100%。

(3) 质谱鉴定。样品酶解产物经上述液相色谱分离后,使用 Q Exactive 质谱仪进行分析,分析时间为 60 min,检测方式为正离子模式,收集方式为每次全扫描后采集 10 个碎片图谱。

(4) 数据分析。质谱测试原始文件使用 MaxQuant 1.5.5.1 软件在数据库进行检索,对蛋白质进行定性。利用蛋白质的质谱 LFQ(label-free quantification)强度按归一化法计算各个蛋白质的相对丰度(代表该蛋白质的相对含量),对蛋白质进行定量。

1.2.4 氨基酸组成分析

参考 Chen 等^[12]的方法测定样品氨基酸组成。取 2.41 mL 样品于水解管中,加入 10 mL 6 mol/L HCl 溶液,充氮气 3 min,拧紧水解管盖。放入 120 °C 的烘箱中水解 22~24 h,期间摇匀数次,待水解完全后取出、冷却、混匀后开管,定容到 50 mL,过滤去除不溶性杂质,取 2 mL 溶液于试管,置于 95 °C 烘箱蒸干,最后用 2 mL 0.02 mol/L HCl 溶解,经 0.22 μm 水系滤膜过滤后进行分析。

利用氨基酸分析仪分析。流动相 A 为乙酸钠三乙胺-四氢呋喃缓冲液(pH 7.2),流动相 B 为乙酸钠-甲醇-乙腈缓冲液(pH 7.2),色谱柱为 Agilent Hypersil ODS 柱(250 mm × 4.0 mm × 5 μm),流速 10 mL/min,柱温 40 °C,检测波长 338 nm(脯氨酸检测波长 262 nm)。采用外标法定量。

1.2.5 pH 和温度对内源性蛋白酶活性的影响

从 1.2.1 制备的浆液中取出 6 份(每份 20 mL),1 份不做任何处理(空白对照, pH 6.8),将其余 5 份的 pH 分别调至 3.5、4.0、4.5、5.0 和 5.5,在 50 °C 水浴中孵育 6 h,然后进行氮溶指数(TCA-NSI)测定,用以表征内源性蛋白酶的协同活性^[13]。

从 1.2.1 制备的浆液中取出 6 份(每份 20 mL),1 份不做任何处理(空白对照, pH 6.8),将其余 5 份的 pH 都调至 4.5,在 40、50、60、70 °C 和 80 °C 水浴中孵育 6 h,然后进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。

1.2.6 氮溶指数的测定

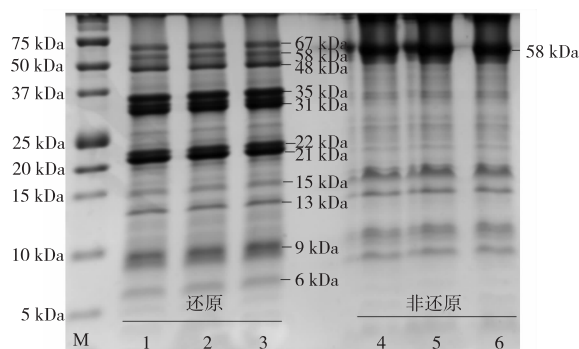
在样品中加入 TCA 固体,使其质量分数达到 15%,搅拌使 TCA 完全溶解,静置 1 h,离心(15 000 g, 20 min),过滤,取上清液,待测。采用凯氏定氮法分别测定上清液和样品中的氮含量。按下式计算氮溶指数(I_{NS})。

$$I_{NS} = N/N_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: N 为上清液的氮含量; N_0 为样品的氮含量。

2 结果与讨论

2.1 薄壳山核桃仁中蛋白质的 Tricine-SDS-PAGE 表征(见图 1)



注: M. 标准蛋白 Marker;泳道 1~3. 浆液中蛋白质还原电泳的 3 次平行;泳道 4~6. 浆液中蛋白质非还原电泳的 3 次平行;图谱为分离胶的全部区域,不包括浓缩胶区域

图 1 薄壳山核桃仁浆液中蛋白质的还原和非还原 Tricine-SDS-PAGE 图谱

相比于 SDS - PAGE, Tricine - SDS - PAGE 可以表征样品中更大分子质量范围的蛋白质组成,尤其是 10 kDa 以下的小分子质量蛋白^[14]。由图 1 可知:在还原条件下,薄壳山核桃仁中蛋白质包括 48 ~ 67 kDa、31 ~ 35 kDa、21 ~ 22 kDa、15 kPa、13 kPa、9 kDa 和 6 kDa;在非还原条件下,蛋白质条带主要集中在 58 kDa 附近及其上部区域。根据分子质量及 Tricine - SDS - PAGE 图谱分析可知,还原条件下的 31 ~ 35 kDa 和 21 ~ 22 kDa 蛋白通过二硫键连接形成非还原条件下的 58 kDa 蛋白^[15]。

2.2 薄壳山核桃仁主要蛋白质和微量活性蛋白的 LC - MS/MS 表征

利用 LC - MS/MS 鉴定了薄壳山核桃仁的蛋白质组成,并利用质谱 LFQ 强度分析了各种蛋白质的相对丰度。共鉴定出 374 种蛋白质,本文仅列出主要蛋白质成分和一些已知功能活性的微量活性蛋白。

2.2.1 主要蛋白质成分(见表 1)

由表 1 可知,薄壳山核桃仁的主要蛋白质包括 7S 球蛋白和 11S 球蛋白。共检测出 5 种 7S 球蛋白,理论分子质量分别约为 94、57、59、81 kDa 和 70 kDa,其中:57、59 kDa 和 70 kDa 的 3 种蛋白质对应于图 1 中的 58 kDa 和 67 kDa 条带,而 94 kDa 和

81 kDa 没有对应条带。NCBI 数据库中的蛋白质序列信息有很多是来源于基因预测^[16],特别是对于薄壳山核桃这类深入研究较少的植物。因此,有些蛋白质在成熟种子中的实际分子质量与理论分子质量大相径庭。如:Zhang 等^[9]研究证实,理论分子质量为 94 kDa 的 7S 球蛋白在电泳胶上的实际分子质量为 48 kDa(主要由翻译和翻译后修饰引起),对应于图 1 中的 48 kDa 条带。对于理论分子质量为 81 kDa 的蛋白,还未见研究,可能与 94 kDa 蛋白类似。因此,通过对比电泳和质谱结果,可得如下结论:图 1 中的 67、58 kDa 和 48 kDa 条带为薄壳山核桃仁的 7S 球蛋白。

对于 11S 球蛋白,共检测出 9 种,理论分子质量在 53 ~ 59 kDa 范围内。一般而言,植物种子中 11S 球蛋白的亚基都是碱性肽链和酸性肽链通过二硫键连接而成^[15]。因此,通过对比电泳和质谱结果,可得如下结论:质谱检测出的 11S 球蛋白对应于图 1 中非还原条件下的 58 kDa 条带,图 1 中还原条件下的 31 ~ 35 kDa 条带是 11S 球蛋白的酸性肽链,而 21 ~ 22 kDa 条带是 11S 球蛋白的碱性肽链^[15]。

通过分析图 1 中还原条件下的条带强度可得,薄壳山核桃仁中的主要蛋白质为 11S 球蛋白(58%)、7S 球蛋白(17%)和 9 kDa 蛋白(15%)。

表 1 薄壳山核桃仁的主要蛋白质组成

序号	蛋白质	理论分子质量/kDa	氨基酸残基数	覆盖率/%	相对丰度/%
1	7S vicilin	94.209	784	68.9	25.994
2	Vicilin Jug r 6.0101	57.399	502	21.7	5.635
3	Vicilin - like seedstorage protein	59.444	523	19.5	3.350
4	Vicilin - like seed storage protein	81.095	681	7.8	0.184
5	Vicilin Jug r 2.0101	69.989	593	34.4	0.091
6	11S legumin protein	57.943	505	64.6	16.331
7	Legumin B - like	55.855	490	46.9	12.895
8	11S globulin 2 - like	53.440	470	38.7	7.860
9	Legumin A - like	58.293	511	35.2	6.069
10	Legumin B - like	55.826	487	27.9	2.914
11	11S globulin 2 - like	54.307	481	16.2	1.471
12	11S globulin Jug r 4	58.144	507	48.7	1.125
13	11S globulin (allergen Jug n 4)	58.055	510	40.0	0.038
14	11S globulin (Allergen Car i 4)	58.016	505	64.0	0.002

注:表中序号 1 ~ 5 为 7S 球蛋白,6 ~ 14 为 11S 球蛋白

2.2.2 抗氧化酶(见表 2)

由表 2 可知,薄壳山核桃仁中的主要抗氧化酶为超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,各有 3 种,相对丰

度分别为 0.239% 和 0.190%。国产薄壳山核桃由于可以保持新鲜度,可通过鲜食摄入抗氧化酶。而进口薄壳山核桃由于需要长时间的运输等,新鲜度

大打折扣,不适宜鲜食,一般需要加工成盐焗或烘烤坚果等进行食用,从而导致其中的抗氧化酶变性失活,降低了营养功能价值。

表2 薄壳山核桃仁中的抗氧化酶

序号	蛋白质	理论分子质量/kDa	氨基酸残基数	覆盖率/%	相对丰度/%
1	Superoxide dismutase	24.934	223	17.0	0.113
2	Superoxide dismutase [Cu - Zn]	8.235	79	16.5	0.100
3	Superoxide dismutase [Cu - Zn]	21.503	210	13.3	0.026
4	Catalase	57.072	492	25.6	0.176
5	Catalase	56.920	492	14.4	0.009
6	Catalase	56.962	492	25.4	0.005

注:表中序号1~3为超氧化物歧化酶,4~6为过氧化氢酶

2.2.3 内源性蛋白酶(见表3)

由表3可知,薄壳山核桃仁中共检测出15种内源性蛋白酶(8种内肽酶和7种外肽酶),具体为5种天冬氨酸内肽酶、1种半胱氨酸内肽酶、1种金属内肽酶、1种丝氨酸内肽酶、2种羧肽酶和5种氨肽酶(包括1种三肽基肽酶)。主要蛋白酶为天冬氨酸内肽酶(相对丰度0.082%)、氨肽酶(相对丰度

0.075%)、羧肽酶(相对丰度0.060%)和半胱氨酸内肽酶(相对丰度0.045%)。总内源性蛋白酶的相对丰度为0.282%。另外,薄壳山核桃仁中的蛋白酶抑制剂极少,只检测出1种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,其相对丰度只有0.006%,可作为薄壳山核桃可鲜食的重要科学理论依据。

表3 薄壳山核桃仁中的内源性蛋白酶组成

序号	蛋白质	理论分子质量/kDa	氨基酸残基数	覆盖率/%	相对丰度/%
1	Aspartic proteinase - like	56.120	514	10.7	0.040
2	Aspartyl protease AED3 - like	46.968	438	11.4	0.026
3	Aspartic proteinase - like	55.696	514	6.0	0.013
4	Aspartic protease	58.806	542	1.8	0.002
5	Aspartic protease	53.140	498	4.8	0.001
6	Vacuolar processing enzyme	54.822	494	10.7	0.045
7	Zinc metalloprotease	54.511	505	6.7	0.011
8	Probable serine protease EDA2	55.026	489	8.6	0.009
9	Probable glutamate carboxypeptidase 2	77.967	705	9.2	0.048
10	Carboxypeptidase	56.157	503	6.0	0.012
11	Tripeptidyl - peptidase II	149.830	1358	7.1	0.029
12	Aminopeptidase	98.585	873	7.1	0.017
13	Probable aspartyl aminopeptidase	60.243	556	5.2	0.016
14	Leucine aminopeptidase 1 - like	60.366	578	5.7	0.011
15	Puromycin - sensitive aminopeptidase	100.190	886	1.2	0.002

注:表中序号1~5为天冬氨酸内肽酶,6为半胱氨酸内肽酶,7为金属内肽酶,8为丝氨酸内肽酶,9、10为羧肽酶(外肽酶),11~15为氨肽酶(外肽酶)

2.3 薄壳山核桃仁蛋白质的氨基酸组成(见表4)

由于在人体代谢过程中,苯丙氨酸和蛋氨酸可分别转化成酪氨酸和半胱氨酸,因此食物中的酪氨酸和半胱氨酸可一定程度减少人体对于苯丙氨酸和蛋氨酸的需求^[17-18]。由表4可知:薄壳山核桃仁蛋白的必需氨基酸相对含量为31.12%;赖氨酸是薄壳山核桃仁蛋白的第一限制性氨基酸,苏氨酸含量

略微低于联合国粮食及农业组织(FAO)的标准。对于非必需氨基酸,谷氨酸+谷氨酰胺、精氨酸和天冬氨酸+天冬酰胺相对含量较高,分别为19.51%、14.12%和9.74%。虽然薄壳山核桃仁蛋白中赖氨酸含量较低,但其是一种良好的谷氨酸+谷氨酰胺和精氨酸的来源。

表4 薄壳山核桃仁蛋白质的氨基酸组成 %

氨基酸	相对含量	FAO 标准
亮氨酸 [#]	7.46	6.6
缬氨酸 [#]	5.58	3.5
苯丙氨酸 [#] + 酪氨酸	8.74	6.3
异亮氨酸 [#]	4.75	2.8
赖氨酸 [#]	3.74	5.8
苏氨酸 [#]	3.06	3.4
蛋氨酸 [#] + 半胱氨酸	2.40	2.5
谷氨酸 + 谷氨酰胺	19.51	
精氨酸	14.12	
天冬氨酸 + 天冬酰胺	9.74	
甘氨酸	5.22	
丙氨酸	4.86	
丝氨酸	4.23	
脯氨酸	3.87	
组氨酸	2.73	
必需氨基酸	31.12	

注:#表示必需氨基酸;苯丙氨酸相对含量为5.46%;酪氨酸相对含量为3.28%;蛋氨酸相对含量为1.07%;半胱氨酸相对含量为1.33%

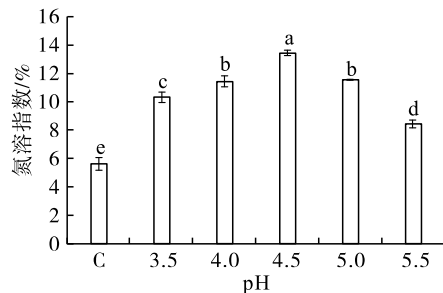
2.4 薄壳山核桃仁的内源性蛋白酶活性

通常人体胃液的pH在1~3,当食物进入胃后,可使胃中的pH上升至1.7~4.7。当胃中的食糜进入小肠后,被胰腺分泌释放进入小肠的碳酸氢钠逐步中和^[19]。因此,经口摄入的食物源蛋白酶需在酸性和中性pH范围内发挥水解活性才能帮助食物消化。基于此,本文考察了pH和温度对于内源性蛋白酶活性的影响。通过前期研究发现,薄壳山核桃仁内源性蛋白酶的活性在pH4~5时较强,而在pH4以下和pH5以上活性逐步减弱,这与大多数植物种子中内源性蛋白酶相符^[20]。因此,本文在pH3.5~5.5和40~80℃条件下进行系统研究。

按照1.2.5的方法考察pH和温度对薄壳山核桃仁内源性蛋白酶活性的影响,结果分别见图2和图3。由图2可知,在pH4.5时氮溶指数最大,为13.46%,pH5(11.59%)和pH4(11.46%)时次之,而pH3.5时氮溶指数为10.33%,pH5.5时氮溶指数为8.46%。空白对照氮溶指数为5.66%。可见,在pH4.5、50℃条件下,内源性蛋白酶的活性比空白对照提高了7.8个百分点。

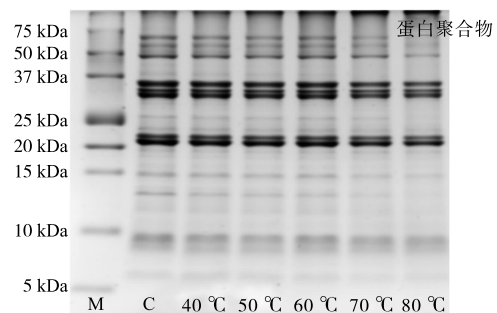
由图3可知:在40~60℃范围内,50℃时48~67 kDa、31~35 kDa和21~22 kDa等蛋白条带的强度降低最大,其次是40℃(接近于人体温度);在70~80℃时,上述的蛋白条带强度降低明显,但是在分离胶的顶部形成了大量的蛋白聚合物。综合上述结果可知,薄壳山核桃仁中的内源性蛋白酶在pH

4.5和50℃时活性最大,这与核桃、芝麻和大豆中内源性蛋白酶的结果相符^[4,13,21]。由上述结果可知,通过鲜食薄壳山核桃可以摄入膳食蛋白酶,这些蛋白酶在胃中和食糜进入小肠的碳酸氢钠中和阶段可发挥助消化作用。对于这些蛋白酶是否可发挥其他生理活性作用,还需后续进一步研究。



注:C为空白对照;不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)

图2 50℃条件下pH对薄壳山核桃仁内源性蛋白酶活性的影响



注:M为标准蛋白Marker;C为空白对照

图3 pH4.5时不同温度下薄壳山核桃仁内源性蛋白酶的Tricine-SDS-PAGE图谱

3 结论

薄壳山核桃仁蛋白主要包括11S球蛋白、7S球蛋白和9 kDa蛋白,分别占总蛋白的58%、17%和15%。另外,还含有超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和内源性蛋白酶等微量活性蛋白,相对丰度分别为0.239%、0.190%和0.282%。LC-MS/MS仅检测出1种蛋白酶抑制剂(半胱氨酸蛋白酶抑制剂),且相对丰度极低,可作为薄壳山核桃可鲜食的重要科学依据。内源性蛋白酶在pH3.5~5.5、40~60℃时具有水解活性,并在pH4.5和50℃时活性最大。与进口薄壳山核桃不同,国产薄壳山核桃由于可保持新鲜度,从而适宜鲜食。鲜食可摄入薄壳山核桃仁中的抗氧化酶和内源性蛋白酶,对于促进人体健康有益。另外,与大多数植物蛋白类似,薄壳山核桃仁蛋白的赖氨酸含量达不到FAO标准。不过,薄壳山核桃仁蛋白是一种良好的谷氨酸+谷氨酰胺和精氨酸来源。基于上述研究,对于国产薄壳山核桃,我

们建议国内相关从业人员在推广鲜食薄壳山核桃(活性蛋白保留较好)方面做出努力,开辟国内市场新赛道,促进国产薄壳山核桃产业的健康发展。

参考文献:

- [1] GONG Y, PEGG R B. Separation of ellagitannin - rich phenolics from US pecans and Chinese hickory nuts using fused - core HPLC columns and their characterization [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65:5810 - 5820.
- [2] ATANASOV A G, SABHARANJAK S M, ZENGİN G, et al. Pecan nuts; a review of reported bioactivities and health effects [J]. Trends Food Sci Technol, 2018, 71: 246 - 257.
- [3] ZHANG R, PENG F R, LI Y R. Pecan production in China [J]. Sci Hortic, 2015, 197:719 - 727.
- [4] CHEN Y M, PEI H M, DAI Q Y, et al. Raw walnut kernel; a natural source for dietary proteases and bioactive proteins [J/OL]. Food Chem, 2022, 369:130961[2021 - 08 - 15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130961>.
- [5] ROMA O S. Therapeutic value of oral supplementation with melon superoxide dismutase and wheat gliadin combination [J]. Nutrition, 2015, 31:430 - 436.
- [6] GONZALEZ - RABADE N, BADILLO - CORONA J A, ARANDA - BARRADAS J S, et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro; a review [J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(6):983 - 996.
- [7] MELLO V J, GOMES M T R, LEMOS F O, et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis* [J]. Phytomedicine, 2008, 15:237 - 244.
- [8] SALAS C E, GOMES M T R, HERNANDEZ M, et al. Plant cysteine proteinases; evaluation of the pharmacological activity [J]. Phytochemistry, 2008, 69:2263 - 2269.
- [9] ZHANG Y Z, LEE B R, DU W X, et al. Identification and characterization of a new pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] allergen, Car i 2 [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(20):4146 - 4151.
- [10] VENKATACHALAM M, TEUBER S S, PETERSON W R, et al. Antigenic stability of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] proteins; effects of thermal treatments and in vitro digestion [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54:1449 - 1458.
- [11] CHEN Y M, ZHANG H S, ZHANG C M, et al. Characterization of endogenous endopeptidases and exopeptidases and application for the limited hydrolysis of peanut proteins [J/OL]. Food Chem, 2020, 345:128764 [2021 - 08 - 15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128764>.
- [12] CHEN Y M, CAO Y Y, ZHAO L P, et al. Macronutrients and micronutrients of soybean oil bodies extracted at different pH [J]. J Food Sci, 2014, 79(7):1285 - 1291.
- [13] CHEN Y M, ZHU J M, ZHANG C M, et al. Sesame water - soluble proteins fraction contains endopeptidases and exopeptidases with high activity; a natural source for plant proteases [J/OL]. Food Chem, 2021, 353:129519 [2021 - 08 - 15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129519>.
- [14] SCHAGGER H. Tricine - SDS - PAGE [J]. Nat Protoc, 2006, 1:16 - 22.
- [15] JUNG R, SCOTT M P, NAM Y W, et al. The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins [J]. Plant Cell, 1998, 10(3):343 - 357.
- [16] NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41:8 - 20.
- [17] BROSANAN J T, BROSANAN M E. The sulfur - containing amino acids; an overview [J]. J Nutr, 2006, 136(6): 1636 - 1640.
- [18] PENCHARZ P B, HSU J W, BALL R O. Aromatic amino acid requirements in healthy human subjects [J]. J Nutr, 2007, 137(6): 1576 - 1578.
- [19] KOZIOLEK M, GRIMM M, BECKER D, et al. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the Intellicap system [J]. J Pharm Sci, 2015, 104(9):2855 - 2863.
- [20] TAN - WILSON A L, WILSON K A. Mobilization of seed protein reserves [J]. Physiol Plant, 2012, 145:140 - 153.
- [21] CHEN Y M, LI H N, SHEN Y, et al. Endopeptidases, exopeptidases, and glutamate decarboxylase in soybean water extract and their in vitro activity [J/OL]. Food Chem, 2021, 360:130026 [2021 - 08 - 15]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130026>.