



Lin, Xiufang; Xiaohong Wu; Zhao, Zichen; Xu, Bingxin; Gao, Xiaotang; Liu, Min

*Published in:*

*Publication date:*  
2014

*Document license:*  
[Ikke-specificeret](#)

*Citation for published version (APA):*  
Lin, X., Xiaohong Wu, Zhao, Z., Xu, B., Gao, X., & Liu, M. (2014). . . , 39(11), 29-31.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/318817869>



**Article** · January 2014

---

CITATIONS

0

READS

9

**1 author:**



**Zichen Zhao**

University of Copenhagen

**4** PUBLICATIONS **0** CITATIONS

SEE PROFILE

**Some of the authors of this publication are also working on these related projects:**



photo-oxidation mechanism of protein [View project](#)

油料蛋白

# 松仁蛋白酶解液体外抗氧化活性分析

林秀芳<sup>1</sup>, 吴晓红<sup>2</sup>, 赵梓辰<sup>1</sup>, 徐冰心<sup>1</sup>, 高小棠<sup>1</sup>, 刘敏<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学 林学院, 哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学 交通学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 采用两种胃肠消化酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶)对松仁蛋白进行酶解实验,研究其胃蛋白酶酶解液、胰蛋白酶酶解液和胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解酶解液的体外抗氧化活性。结果表明:胃蛋白酶酶解30 min的酶解液具有最强体外抗氧化活性, $\cdot\text{OH}$ 清除率为67.43%, $\text{O}_2^-$ 清除率为55.66%;胰蛋白酶酶解60 min的酶解液具有最强清除 $\cdot\text{OH}$ 能力, $\cdot\text{OH}$ 清除率为68.79%;胰蛋白酶酶解120 min的酶解液具有最强清除 $\text{O}_2^-$ 能力, $\text{O}_2^-$ 清除率为39.20%;胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解松仁蛋白酶解液在酶解240 min时,具有最强的体外抗氧化活性,此时 $\cdot\text{OH}$ 清除率为79.11%, $\text{O}_2^-$ 清除率为68.99%。

**关键词:** 松仁蛋白; 酶解液; 胃蛋白酶; 胰蛋白酶; 抗氧化活性

中图分类号: TS222; TQ936

文献标志码: A

文章编号: 1003-7969(2014)11-0029-03

## In vitro antioxidant activity of pine kernel protein hydrolysate

LIN Xiufang<sup>1</sup>, WU Xiaohong<sup>2</sup>, ZHAO Zichen<sup>1</sup>,  
XU Bingxin<sup>1</sup>, GAO Xiaotang<sup>1</sup>, LIU Min<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. College of Traffic, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Enzymatic hydrolysis experiment of pine kernel protein was conducted by two kinds of gastrointestinal digestive enzymes ( pepsin and trypsin ), and in vitro antioxidant activities of enzymatic hydrolysates of pine kernel protein obtained by hydrolysis of pepsin, trypsin and pepsin - trypsin were studied. The results showed that after enzymatic hydrolysis for 30 min, the pepsin enzymatic hydrolysate of pine kernel protein had the strongest in vitro antioxidant activity, and the scavenging rates on  $\cdot\text{OH}$  radical and  $\text{O}_2^-$  radical were 67.43% and 55.66% respectively; the trypsin enzymatic hydrolysate of pine kernel protein had the strongest scavenging capacity on  $\cdot\text{OH}$  radical after enzymatic hydrolysis for 60 min, and the scavenging rate on  $\cdot\text{OH}$  radical was 68.79%, while it had the strongest scavenging capacity on  $\text{O}_2^-$  radical after enzymatic hydrolysis for 120 min, and the scavenging rate on  $\text{O}_2^-$  radical was 39.20%; pepsin - trypsin step - by - step enzymatic hydrolysate of pine kernel protein had the strongest in vitro antioxidant activity after enzymatic hydrolysis for 240 min, and the scavenging rates on  $\cdot\text{OH}$  radical and  $\text{O}_2^-$  radical were 79.11% and 68.99% respectively.

**Key words:** pine kernel protein; enzymatic hydrolysate; pepsin; trypsin; antioxidant activity

红松(*Pinus koraiensis* Sieb et Zucc)属于松科松

属植物,是我国重要的可食用林产品松仁的重要来源,天然红松林主要分布在黑龙江,其次为吉林、辽宁两省<sup>[1]</sup>。松仁中蛋白质含量为13%~20%,而且氨基酸组成齐全,是一种优质的植物蛋白<sup>[2]</sup>。植物蛋白是人类食用蛋白的重要来源,通过生物酶法水解植物蛋白生成的多肽及氨基酸等物质,具有更高的营养价值和功能特性,更容易被人体所吸收和消化,能够更充分地达到利用植物蛋白资源的目的。

收稿日期: 2014-02-22; 修回日期: 2014-08-06

基金项目: 中央高校基本科研业务经费专项(DL11BA13); 黑龙江省博士后研究项目(LBH-Z11269); 东北林业大学大学生创业训练项目(201310225080)

作者简介: 林秀芳(1991),女,在读硕士,研究方向为功能食品(E-mail) 609640265@qq.com。

通信作者: 吴晓红,副教授,博士后(E-mail) wxhd1923@126.com。

的<sup>[3]</sup>。松仁蛋白多肽能够提高小鼠免疫功能<sup>[4]</sup>,碱性蛋白酶酶解得到的松仁多肽具有体外抗氧化活性<sup>[5]</sup>。

本实验采用水提酸沉法制备松仁分离蛋白,选取胃肠内两大主要蛋白消化酶胃蛋白酶和胰蛋白酶,进行松仁蛋白酶解实验,测定松仁蛋白酶解液清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )和超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )的清除率,研究其体外抗氧化性,为开发利用松仁蛋白资源提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料、试剂

红松籽 购于黑龙江省伊春市。

胃蛋白酶(效价比 1:3 000),胰蛋白酶(效价比 1:250);过氧化氢、石油醚、邻苯三酚、水杨酸、硫酸亚铁、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器、设备

SF-100 型粉碎机,AB204-S 电子天平,PHS-2C 型精密酸度计,LOC-1M 真空冷冻干燥机,LXJ-II 型离心分离机,HHS 电热恒温水浴锅。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 松仁分离蛋白的制备

将红松籽去杂、脱壳、去红衣,破碎,用石油醚(沸程 30~60℃)进行脱脂处理,得到松仁脱脂粉,4℃下保存备用。

按照参考文献[6]设计松仁分离蛋白制备工艺:取一定量的松仁脱脂粉,以蒸馏水为提取液,在料液比 1:35、提取温度 37℃条件下提取 100 min,10 000 r/min 离心 15 min 后取上清液调节 pH 至酸性 4℃下沉淀 60 min,4 000 r/min 离心 15 min,取沉淀于 4℃下透析 24 h,冷冻干燥,得到松仁分离蛋白。

#### 1.2.2 松仁蛋白酶解液的制备

胃蛋白酶酶解液的制备:将一定量的松仁分离蛋白分散于 pH 1.5 的 HCl 溶液中,形成 10 g/L 的溶液,置于 37℃恒温水浴锅中保温 5 min,然后以  $m(\text{酶}):m(\text{底物})$  为 1:50 加入胃蛋白酶,分别在不同的酶解时间(0、5、10、30、60、120 min)取样,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.0 终止反应,以 4℃、10 000 r/min 离心 15 min,取上清液用水定容至 100 mL,备用。

胰蛋白酶酶解液的制备:将一定量的松仁分离蛋白分散于 pH 7.5 的 NaOH 溶液中,形成 10 g/L 的溶液,置于 37℃恒温水浴锅中保温 5 min,然后以  $m(\text{酶}):m(\text{底物})$  为 1:50 加入胰蛋白酶,分别在不

同的酶解时间(0、5、10、30、60、120 min)取样,95℃水浴保温 10 min 终止反应,后冷却至室温,再以 4℃、10 000 r/min 离心 15 min,取上清液用水定容至 100 mL,备用。

胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解酶解液的制备:将一定量的松仁分离蛋白分散于 pH 1.5 的 HCl 溶液中,形成 10 g/L 的溶液,置于 37℃恒温水浴锅中保温 5 min,然后以  $m(\text{酶}):m(\text{底物})$  为 1:50 加入胃蛋白酶,37℃恒温条件下搅拌酶解 120 min;缓慢加入 1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  溶液调节 pH 至 7.5,以  $m(\text{酶}):m(\text{底物})$  为 1:50 加入胰蛋白酶,37℃恒温条件下搅拌酶解 120 min<sup>[7]</sup>。分别在酶解过程的 30、60、90、120、150、180、210、240 min 取样,100℃、10 min 终止反应,调节 pH 至 4.5,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液用水定容至 100 mL,备用。

#### 1.2.3 松仁蛋白酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力测定<sup>[8]</sup>

反应体系中含有 1 mL 8.8 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、1 mL 9 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 、1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液,待测样品溶液 1 mL。最后加  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动反应,37℃反应 0.5 h。以蒸馏水为空白对照,在 510 nm 处测定各溶液的吸光度。考虑样品本身的吸光度,以 1 mL 9 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 、1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、不同溶液的样品溶液 1 mL 和 1 mL 蒸馏水作为样品的本底吸光度。按照下式计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} = 1 - (A_x - A_{x0}) / A_0 \times 100\%$$

式中: $A_0$  为空白对照液的吸光度; $A_x$  为加入样品溶液后的吸光度; $A_{x0}$  为不加  $\text{H}_2\text{O}_2$  样品溶液的吸光度。

#### 1.2.4 松仁蛋白酶解液清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力测定

采用邻苯三酚自氧化法测定<sup>[8]</sup>。取 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2) 4.5 mL,置于 25℃水浴中保温 20 min,分别加入 1 mL 样品溶液和 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液,混匀后于 25℃水浴中反应 5 min,加入 1 mL 8 mmol/L HCl 溶液终止反应,于 299 nm 波长下测定吸光度;空白对照组以相同体积蒸馏水代替样品。每个试样做 3 个平行样,取平均值,按照下式计算  $\text{O}_2^{\cdot-}$  清除率。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{ 清除率} = (A_0 - A_x) / A_0 \times 100\%$$

式中: $A_0$  为空白对照液的吸光度; $A_x$  为样品溶液的吸光度。

## 2 结果与讨论

2.1 松仁蛋白胃蛋白酶酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力分析(见图 1)

由图1可以看出,松仁蛋白胃蛋白酶酶解液具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力。随着酶解时间的延长, $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 清除率不断增大,在酶解30 min时达到最大值,清除率分别为67.43%、55.66%。之后随着酶解时间的延长, $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 清除率增加不显著。

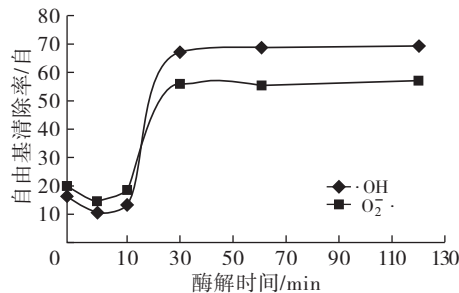


图1 松仁蛋白胃蛋白酶酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力

2.2 松仁蛋白胰蛋白酶酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力分析(见图2)

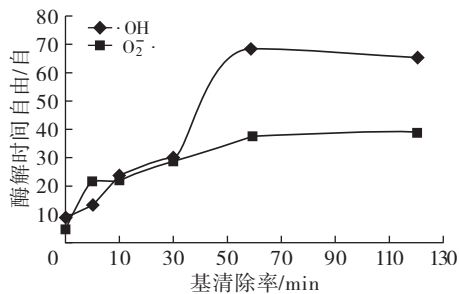


图2 松仁蛋白胰蛋白酶酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力

由图2可以看出,松仁蛋白胰蛋白酶酶解液具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力。随着酶解时间的延长,松仁蛋白胰蛋白酶酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 能力不断增大,在酶解60 min时达到最大值, $\cdot\text{OH}$ 清除率为68.79%,之后随着酶解时间的延长, $\cdot\text{OH}$ 清除率变化不显著。 $\text{O}_2^-$ 清除率随着酶解时间的延长逐渐增大,处于缓慢上升的趋势,60 min后变化不大,酶解实验终止即120 min时 $\text{O}_2^-$ 清除率为39.20%。

2.3 松仁蛋白胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力分析(见图3)

由图3可以看出,胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解在不同酶解时间的酶解液具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力。随着酶解时间的延长,松仁蛋白胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和

$\text{O}_2^-$ 能力逐渐增强,在酶解240 min时, $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 清除率分别为79.11%和68.99%。实验结果表明,双酶酶解得到的酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 能力最强,胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解松仁蛋白可以作为制备松仁抗氧化肽的适宜工艺。

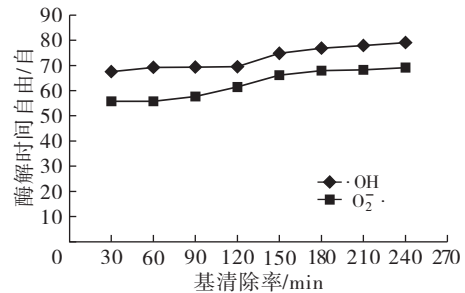


图3 松仁蛋白胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 的能力

### 3 结论

通过研究发现,松仁蛋白胃蛋白酶酶解液、胰蛋白酶酶解液、胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解酶解液具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 能力,具有一定的体外抗氧化活性。实验结果表明,胃蛋白酶-胰蛋白酶分步酶解松仁蛋白酶酶解液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 能力最强。

#### 参考文献:

- [1] 赵振卿, 王建华. 红松种子产业的开发前景及措施[J]. 农村实用科技信息, 2010(4): 34.
- [2] 吴晓红, 王振宇, 郑洪亮, 等. 红松仁蛋白氨基酸组成分析及营养评价[J]. 食品工业科技, 2011(1): 267-270.
- [3] 邓乾春, 陈春艳, 潘雪梅, 等. 白果活性蛋白的酶法水解及抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(11): 155-159.
- [4] 张立刚, 赵玉红, 李莉. 松仁蛋白多肽对小鼠免疫功能的影响[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8): 94-99.
- [5] 慕蕾, 王振宇. 松仁多肽的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(10): 111-113.
- [6] 吴晓红, 华美玲, 石媛, 等. 响应面法优化脱脂松仁水溶性蛋白提取工艺[J]. 中国油脂, 2010, 35(8): 34-37.
- [7] 王金梅, 张占琴, 王学军, 等. 菜籽蛋白的制备及其体外模拟消化[J]. 中国油脂, 2008, 33(9): 10-15.
- [8] 王兴, 黄忠明, 王莉, 等. 苦荞蛋白模拟消化产物抗氧化活性及组成研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(6): 10-15.