

松仁蛋白的研究进展

徐冰心^{1,2}, 王婷婷^{1,3}, 赵梓辰⁴, 张惠玲^{1*}, 刘敦华¹ (1. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏回族自治区银川市市场监督管理局, 宁夏银川 750001; 3. 宁夏民族职业技术学院, 宁夏吴忠 751100; 4. 哥本哈根大学食品科学系, 丹麦哥本哈根 1958)

摘要 红松种子仁是优质的植物资源,其所含的蛋白质更是非常优质的蛋白质来源,近年来得到国内外学者的广泛关注和研究。综述了松仁蛋白的提取方法、理化性质和生理活性以及主要成分的生理功能,以期对松仁蛋白进一步的开发利用提供参考。

关键词 松仁蛋白;抗氧化性;多肽

中图分类号 TS201.2⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)33-0081-02

Research Progress of Pine Kernel Protein

XU Bing-xin^{1,2}, WANG Ting-ting^{1,3}, ZHAO Zi-chen⁴, ZHANG Hui-ling^{1*} et al (1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Ningxia Hui Autonomous Region Yinchuan Market Supervision and Administration, Yinchuan, Ningxia 750001; 3. Ningxia National Career Technical College, Wuzhong, Ningxia 751100; 4. Department of Food Science, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark 1958)

Abstract Pinus Koraiensis seed (PKS) is a kind of high-quality plant resources, and its protein is a very good source of protein. In recent years, it has been widely concerned and studied by scholars at home and abroad. Review the physiological function of pine nut protein extraction method, physicochemical properties and biological activity as well as the main component, in order to provide reference for the development and utilization of pine nut protein deep.

Key words Pine kernel protein; Antioxidant activities; Polypeptide

松仁为松属(*Pinus L.*)多种植物成熟种子的皮去掉之后所得的种子仁的统称,而红松子又称为新罗松子、海松子。红松种子仁中含有多种功能性蛋白成分,且具有分散性好、脂肪含量低及易于吸收的优点。我国红松资源丰富,对植物资源开发功能性食品具有重大的效益及意义,符合科学的食疗理论。植物蛋白中的一些生物活性因子广泛具有抗肿瘤、降血压、免疫调节等功能性,可以为生物保健品及生物制药提供广泛的原料,所以在功能性食品的开发以及药品的开发过程中可利用植物蛋白的功能性。松子被称为“长寿果”,对于中老年人来说,是一种理想的保健食品,也是爱美女性们美容润肤的理想食物^[1]。

松仁中的蛋白质含量较高,在13%~20%,具有18种氨基酸且配比合理,谷氨酸含量最高,精氨酸、天冬氨酸含量也较高^[2]。谷氨酸在人体内会增进 γ -氨基丁酸的合成,促使降低血氮,增进细胞呼吸,用来治疗神经疾病,例如小儿智力不全、脑血管障碍、精神分裂病等引起的记忆语言障碍^[3]。红松松仁中的苯丙氨酸、异亮氨酸的含量高于国际标准^[4-5]。

1 松仁蛋白的提取方法

红松种子仁中的蛋白质主要有4种,分别是水提蛋白、碱提蛋白、盐提蛋白、醇提蛋白。水溶性松仁蛋白所占比例较大,所以有关水溶性松仁蛋白的报道较多。

提取松仁蛋白需先将红松子去皮去红衣后进行脱脂,然后采用索式提取法或石油醚浸提法除去脂肪。

1.1 水溶性松仁蛋白的提取

1.1.1 碱提酸沉法。王振宇等^[6]采用碱提酸沉法提取,其最佳提取工艺条件为pH 9.0,料液比1:25(g:mL),提取时间60 min,提取温度40℃,该条件下的提取率可达61.03%。

1.1.2 酶法提取。酶法提取松仁蛋白的工艺^[7]:选用碱性蛋白酶提取松仁蛋白,pH 8.4,提取温度54.16℃,提取时间3.07 h,料液比1:25(g:mL),加酶量1.53%,在最优条件下提取率88.06%。可以看出,使用酶法提取达到了很好的效果,而且酶法较为温和,可以为工业化生产提供技术参考。

1.1.3 超声波辅助提取。运用超声波辅助提取松仁蛋白时可以使提取率明显提高,在试验过程中可以得出超声波提取时间和固液比例对提取率的影响较为显著^[8-9]。

1.1.4 几种提取方法的比较。碱提酸沉法与酶法和超声波法提取蛋白相比成本较低,而且节省能源,此外,此法不会引起蛋白质变性和有害物质的生成,且不会污染环境^[6]。酶法提取的提取条件较为温和且在过程中很少产生有毒物质^[7]。超声波辅助提取大大缩短了提取时间,提高了松仁蛋白质的提取率,而且还具有时间短、成本低的特点,在工业化的生产中应用前景广阔。吴晓红等^[10]利用响应面法优化了水溶性松仁蛋白的提取工艺,使提取率达83.6%。

1.2 松仁盐溶蛋白的提取 吴晓红等^[11]研究了松仁盐溶蛋白的最佳提取工艺:提取温度37℃、pH 8.0、料液比为1:30(g:mL)、盐溶液浓度0.12 mol/L、提取时间为120 min,此条件下松仁蛋白质的提取率可达87.235%。

在松仁深加工中使用打浆和酶解综合处理,比直接打浆提取松仁蛋白提取率显著提高^[12]。

2 松仁蛋白的理化性质

2.1 溶解性和乳化性 利用碱提酸沉法提取红松仁分离蛋白,当pH 10,提取温度60℃,蛋白质量分数10%,乳化性最佳。当加热时间为0.5 h时,溶解度最大,为3.3 g/L。红松仁蛋白质的乳化性和溶解性具有一定的相关性,改善红松仁蛋白溶解性有助于其乳化性能的提高,可以广泛用于烘焙、肉制品和色拉调味品等食品工业^[13]。

2.2 等电点 李莉^[14]和蒋丽萍等^[15]均测得松仁蛋白在pH为4.6时蛋白质沉淀量最大,可以推断松仁蛋白的等电点约

作者简介 徐冰心(1991—),女,浙江温岭人,硕士研究生,研究方向:食品加工与安全。*通讯作者,教授,硕士生导师,从事生物工程等研究。

收稿日期 2017-09-13

为4.6。

2.3 变性温度 松仁蛋白在加热过程中随着温度的升高,松仁蛋白与参比物之间会出现热量差,实际峰顶温度则是输给松仁蛋白样品的热量差等于样品吸收热量的速率时所对应的温度。通过分析得出样品的变性温度是73.08℃^[14]。

2.4 质构特性 李宏菊等^[16]测得松仁蛋白的坚硬度为23.833,稠度为653.704,黏度为14.077,黏附指数为33.758。

2.5 磷酸化及琥珀酰化改性 将松仁蛋白进行磷酸化及琥珀酰化改性,磷酸化改性试剂为三聚磷酸钠(STP),使得红松仁分离蛋白的溶解度和乳化度明显提高;红松仁蛋白经磷酸化改性后其质构特性的变化如下:坚硬度、黏性、黏附指数均有略微下降,而稠度有所提高;而经琥珀酰化改性后坚硬度、黏性、稠度、黏附指数等均有不同程度的提高^[17]。

3 松仁蛋白的生理活性

红松松仁各种蛋白能显著降低试验小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的水平,高血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)则显著升高。红松松仁蛋白不仅能降低高血脂症小鼠血清总胆固醇和甘油三酯含量,而且能降低高血脂症小鼠肝脏总胆固醇和甘油三酯含量,从而更加证明了松仁蛋白的降脂功能。由此证明红松松仁各种蛋白均能积极调节血脂和脂质代谢,防止体内脂肪的堆积^[18]。

4 松仁多肽

4.1 松仁多肽的制备 选用中性蛋白酶、Alcalase蛋白酶和胰蛋白酶进行试验,用水解度作为指标,结果表明:选用Alcalase碱性蛋白酶时,水解度最高,为30.06%^[19]。利用葡聚糖凝胶层析分离多肽,运用生化分析仪得出松仁多肽谷氨酸、精氨酸质量分数较高。

将蛋白酶酶解和固定化技术结合起来制备松仁多肽^[20],采用壳聚糖为载体,双功能试剂戊二醛作为交联剂,将Alcalase 2.4 L蛋白酶固定化,得到最佳固定化条件为壳糖浓度2.5%、戊二醛浓度0.4%、载体交联时间4 h、给酶量915 U/g载体、pH 9.4、固定化时间8 h,此条件下固定化酶活力回收率为54.35%。

4.2 松仁多肽的生理活性

4.2.1 抗氧化活性。 选用胃蛋白酶酶解松仁蛋白^[21],测得胃蛋白酶酶解松仁蛋白的最佳酶解条件,检测酶解液具有很好的清除羟基自由基的能力,并且有一定的还原能力。

制备松仁抗氧化肽的最佳蛋白酶为Alcalase 2.4 L碱性蛋白酶,松仁抗氧化肽的还原能力可以达到V_c的84.3%,对羟基自由基(OH·)、超氧阴离子自由基(O²⁻·)和ABTS⁺·均有很强的清除作用^[22]。

4.2.2 免疫活性。 松仁多肽能显著增加小鼠免疫器官的重量^[14],也可以促进小鼠的单核巨噬细胞吞噬、体液免疫、细胞免疫功能,表明松仁多肽具有免疫调节作用。

5 松仁蛋白饮品的开发

红松种子仁作为一种味美而优质的植物资源,可以将其开发成各种食品。从现有的报道中可见,开发松仁蛋白饮品

成为优选^[23-24]。

吴琼英等^[25]研究了松仁饮料的工艺条件及最佳配方。把松仁在20℃水中浸泡12 h后研磨制浆,添加海藻酸钠、羧甲基纤维素钠等稳定剂并进行了10~15 min、110℃条件的杀菌,制成了具有浓郁的松仁香气、风味独特、爽滑顺口、成本低、营养丰富的蛋白饮料。张立钢等^[26]用松仁、鲜牛乳和蔗糖为主要原料研制出松仁牛乳复合蛋白饮料。饶国华等^[27]研究了酸性红枣松仁复合蛋白饮料的稳定性。研究表明,pH、电解质磷酸盐的种类和用量以及均质条件均直接影响酸性红枣松仁复合蛋白饮料的稳定性。夏光辉等^[28]选用松仁为主要原料研制具有保健功能的蛋白饮料,因为松仁中含有松仁油,因此饮料的稳定性不佳,通过添加0.15%黄原胶、0.2%羧甲基纤维素和0.2%的蔗糖脂肪酸酯显著提高了松仁蛋白饮料的稳定性。

6 展望

目前植物蛋白的研究开发,尤其是在生物蛋白的分离提纯、其生物活性的研究和机理的研究仅停留在科研阶段,对于真正的工业生产、批量生产和应用于人体的试验还远远不够,产学研一体化的发展还处在滞后且不够深入的状态,所以植物蛋白活性的探究和产业化发展任重道远。

近年来,食物源生物活性肽成为研究热点,这为解决粗放生产中的副产物提供了可能,蛋白质经过消化道酶的水解后产生的多肽比原有的蛋白质吸收率更高,小蛋白肽的吸收率要比游离氨基酸的吸收率更高,且食用后也不会引起过敏反应,一些研究者根据这一思路还制作出了许多具有功能性的多肽,比如降压肽、抗氧化肽、免疫调节肽等^[29-30]。松仁蛋白经合适的酶解,得到松仁蛋白多肽。研究证明,松仁蛋白多肽具有调节免疫系统的能力,还具有降血脂的功效。松仁蛋白多肽是很好的生物活性肽,其更多的生理活性需要更多的研究。面对现今社会“三高”人群激增,松仁既能丰富日常食品的种类,同时还起到一定的保健作用。松仁蛋白的研究报道较少,还有待深入,其将成为一种很好的功能性原料,得到广大研究者的研究与开发,同时在功能性食品领域,松仁蛋白也将得到更多消费者的推崇与认可。

参考文献

- [1] 陈永霞. 红松籽营养价值分析[J]. 现代农业科技, 2010(3): 361-362.
- [2] 李晶, 贾君. 超临界CO₂从松子仁中萃取亚麻酸油的工艺研究[J]. 食品科技, 2004(6): 20-22.
- [3] 冯彦博, 白凤翎. 松仁的营养价值及其深加工[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(4): 86-87.
- [4] REIGHARD G L. Ginkgo, Pine Nuts, Beeches, and Oaks [C]//FUL-BRIGHT D W. A Guide to Nut Tree Culture in North America. [s. l.]: Northern Nut Growers Association, 2003.
- [5] 荣会, 余元祥, 李庆才, 等. 松籽油脂肪酯化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 30-34.
- [6] 王振宇, 杨丽娜, 李宏菊. 碱提酸沉法提取红松仁分离蛋白的工艺研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(6): 71-74.
- [7] 吴晓红, 郑月明, 付兆龙, 等. 酶法提取红松种子蛋白工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9): 145-146.
- [8] 杨立宾, 王振宇, 李相阳. 超声波辅助提取松仁蛋白的工艺研究[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(2): 60-62.
- [9] 苏晓雨, 王振宇, 李颖. 超声辅助提取松仁蛋白工艺的响应面法优化[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 45-49.

酸分子量和图 2 可知,由分子量 553.70 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 R;由分子量 517.70 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 A₁;由分子量 515.67 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 A、灵芝酸 B、灵芝酸 delta、灵芝酸 gamma、灵芝酸 epsilon;由分子量 513.70 构建的离子选择图谱可知泰山赤灵芝中含有一定量的灵芝酸 C₁、灵芝酸 zeta、灵芝酸 beta。

2.2 灵芝酸 A 含量的测定 由标准品的浓度和其相应峰面积得到标准曲线方程为 $y = 48\ 233x + 218\ 717$ ($R^2 = 0.998\ 9$),说明峰面积与灵芝酸 A 标准品线性关系良好(图 3)。将样品测定灵芝酸 A 的峰面积(图 4)带入标准曲线,得样品中灵芝酸 A 的含量为 115.4 $\mu\text{g/g}$ 。并做加标回收试验得出,加标回收率在 97.16% ~ 102.44%。

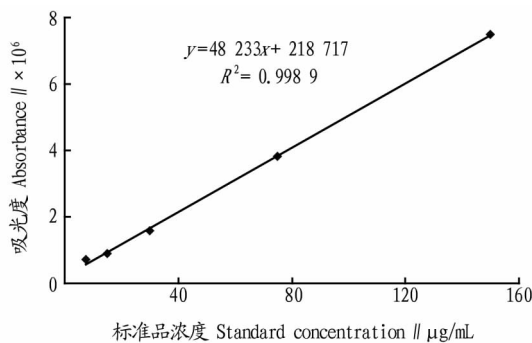


图 3 灵芝酸 A 标准品的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *Ganoderma lucidum* acid A standard

3 结论

利用反相高效液相色谱和电喷雾质谱联用技术,通过研究已知的灵芝酸化合物的相对分子质量及结构特征,鉴定泰山赤灵芝中生物碱提取物中的灵芝酸类化合物,并通过灵芝酸 A 标准品的标准曲线测定其中灵芝酸 A 的含量。结果发现,标准曲线的相关系数为 0.998 9,峰面积与灵芝酸 A 标准品线性关系良好,加标回收率在 97.16% ~ 102.44%,样品中

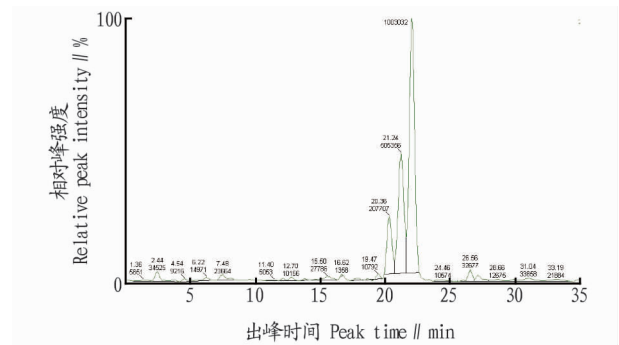


图 4 样品中灵芝酸 A 的峰面积

Fig. 4 Peak area of *Ganoderma lucidum* acid sample

灵芝酸 A 的含量为 115.4 $\mu\text{g/g}$ 。表明该方法用于泰山赤灵芝中灵芝酸 A 的测定准确、可靠。相对于其他分析技术,液质联用技术是一种快速灵敏的分析技术,准确性和回收率更高^[11-12]。下一步将利用其优势,进一步分析泰山赤灵芝的活性成分,研究并发现其他活性成分。

参考文献

- [1] 金善姬. 谈灵芝的药用价值[J]. 中国社区医师, 2007(21): 35.
- [2] 张冬梅. 灵芝的药用价值及开发利用[J]. 中国林副特产, 1998(3): 43.
- [3] 王维源. 灵芝的药用价值[J]. 今日科技, 1998(10): 4-5.
- [4] 陈若芸, 于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展[J]. 药学报, 1990, 25(12): 940-953.
- [5] 北京医学院药理教研组. 灵芝的药理研究: I. 灵芝子实体制剂的药理作用[J]. 北京医学院学报, 1974(4): 246-254.
- [6] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 477-486.
- [7] 王勇, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 白山草乌中二萜生物碱的电喷雾串联质谱分析[J]. 质谱学报, 2002, 23(3): 160-163.
- [8] KOCH D E, ISAZA R, CARPENTER J W, et al. Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from primate plasma with LC/MS detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34(3): 577-584.
- [9] 周燕, 王明奎, 廖循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J]. 分析化学, 2004, 32(2): 174-178.
- [10] 刘罡一, 汪国权, 张慧, 等. 中草药及制剂中吴茱萸内酯的 LC-MS/MS 测定方法[J]. 中成药, 2003, 25(2): 144-146.
- [11] 孙金旭. 灵芝中灵芝酸的测定研究[J]. 食品研究与开发, 2015(8): 13-15.
- [12] 翁小刚. 酶免疫测定法定量检测灵芝中的灵芝酸 A[J]. 国外医学(中医中药分册), 2003, 25(1): 47-48.

(上接第 82 页)

- [10] 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.
- [11] 吴晓红, 王振宇, 郑月明, 等. 松仁中盐溶蛋白的提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 259-261.
- [12] 饶国华, 陈锦屏, 张京芳, 等. 松仁深加工中提高蛋白质提取率工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(11): 46-47.
- [13] 王振宇, 李宏菊, 夏祥慧, 等. 红松仁分离蛋白乳化性和溶解性分析[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(5): 77-79.
- [14] 李莉. 松仁多肽的制备及其免疫活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [15] 蒋丽萍, 高吉喆. 松子仁蛋白提取工艺的研究[J]. 中国科技信息, 2005, 2(23): 98.
- [16] 李宏菊, 王振宇, 赵鑫, 等. 响应面法对磷酸化改性红松仁分离蛋白溶解性工艺参数的优化[J]. 食品研究与开发, 2010, 30(9): 28-33.
- [17] 李宏菊. 红松仁蛋白磷酸化及琥珀酰化改性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [18] 杨丽娜. 红松仁分离蛋白的制备及降血脂功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [19] 赵玉红, 李莉, 张立钢. 松仁蛋白多肽的制备及组分分析[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(9): 86-88.
- [20] 李颖. 固定化蛋白酶的制备及松仁多肽加工工艺研究[D]. 哈尔滨: 东

北林业大学, 2009.

- [21] 徐冰心, 刘敏, 林秀芳, 等. 胃蛋白酶水解松仁蛋白的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2672-2674.
- [22] 慕蕾, 王振宇. 红松仁抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业, 2010(7): 78-82.
- [23] 李基洪, 黄来发. 饮料和冷饮配方 1800 例[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 210-211.
- [24] 苏晓雨, 王振宇. 植物来源生物活性蛋白研究进展[J]. 食品工业科技, 2008, 29(12): 293-296.
- [25] 吴琼英, 马海乐, 田呈瑞. 松仁饮料的加工技术[J]. 食品工业, 2001(2): 28-29.
- [26] 张立钢, 鄂志强. 松仁牛乳饮料的研制及体系稳定性研究[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(4): 29-31.
- [27] 饶国华, 陈锦屏, 赵谋明. 酸性红枣松仁复合蛋白饮料稳定性研究: 乳白稳定剂对稳定性的影响[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(1): 175-178.
- [28] 夏光辉, 徐晶, 孟祥红. 松仁蛋白饮料的制备及试验分析[J]. 通化师范学院学报, 2008, 29(12): 37-38.
- [29] 吴建平. 日本生理活性肽的市场动态[J]. 食品工业, 1998(3): 8-9.
- [30] 杨国玲, 文永均, 胡晓愚, 等. 胸腺相关肽及其自旋标记类似物的抗氧化活性研究[J]. 生物化学与生物物理学报(英文), 1995(6): 680-684.