

徐倩, 陈洲, 王青华, 等. 核桃球蛋白的分离纯化、鉴定及抗氧化性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 105–113. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010234

XU Qian, CHEN Zhou, WANG Qinghua, et al. Isolation, Purification, Identification and Oxidation Analysis of Walnut Globulin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 105–113. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010234

· 研究与探讨 ·

核桃球蛋白的分离纯化、鉴定及 抗氧化性分析

徐倩, 陈洲, 王青华, 韩盼盼, 李思霆, 马爱进, 贾英民*, 展远蓉
(北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048)

摘要:为揭示核桃球蛋白主要组成及体外抗氧化活性,以脱脂核桃粕为原料,对其中的球蛋白进行分离纯化并通过 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)阳离子自由基清除能力对其抗氧化能力进行评价,即经进一步脱脂后,根据 Osborne 分级法提取得到核桃球蛋白粗提物,再通过 HiTrapTM CaptoTM Q 阴离子交换柱和 SephacrylTM S 100HR 凝胶过滤柱两步分离纯化,得到主要蛋白组分。结果表明,制备的球蛋白蛋白含量为 51.53%,占核桃总蛋白的 15.3%,等电点为 3.8。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示,纯化得到主要蛋白组分分子量为 10.1 kDa。经高效液相色谱-质谱联用分析表明,该主要蛋白组分在活性状态下由一种 7S 球蛋白 vicilin Car i 2.0101 和 2S 清蛋白组成。研究发现,球蛋白粗提物和纯化蛋白组分均对 ABTS⁺ 自由基有较好的清除能力,其 IC₅₀ 值分别为 0.302 和 0.075 mg/mL,表明纯化蛋白组分的清除能力提高了 4 倍以上。研究结果可为核桃球蛋白开发利用提供理论基础。

关键词:核桃,球蛋白,提取,分离纯化,鉴定,抗氧化活性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2022)18-0105-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010234

本文网刊:



Isolation, Purification, Identification and Oxidation Analysis of Walnut Globulin

XU Qian, CHEN Zhou, WANG Qinghua, HAN Panpan, LI Siting, MA Aijin, JIA Yingmin*, ZHAN Yuanrong
(School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: In order to reveal the main composition of walnut globulin and its antioxidant activity *in vitro*, defatted walnut meal was used as raw material to separate and purify the globulin. And 2,2'-azido-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) cationic radical scavenging ability was used to evaluate its antioxidant capacity, after further defatting, the crude walnut globulin extract was extracted according to the Osborne fractionation method, and then the main protein components were separated and purified by HiTrapTM CaptoTM Q anion exchange column and SephacrylTM S 100HR gel filtration column. The results showed that the prepared globulin protein content was 51.53%, accounting for 15.3% of the walnut protein, and the isoelectric point was 3.8. The results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the molecular weight of the purified main protein component was 10.1 kDa. The major protein component in the active state consists of a 7S globulin vicilin Car i 2.0101 and 2S albumin. It was found that both crude globulin extract and purified protein component had good scavenging ability against ABTS⁺, with IC₅₀ values of 0.302 and 0.075 mg/mL, respectively, indicating that the scavenging ability of purified protein component was increased by more than 4 times. The research results could provide a theoretical basis for the development and utilization of walnut globulin.

收稿日期: 2022-01-25

基金项目: 河北养元智汇饮品股份有限公司核桃产品高值化技术研发创新团队(215A7102D)。

作者简介: 徐倩(1999-),女,硕士研究生,研究方向:酶与蛋白质,E-mail: 837657782@qq.com。

* 通信作者: 贾英民(1961-),男,博士,教授,研究方向:酶与蛋白质,E-mail: jiaymtd@163.com。

Key words: walnut; globulin; extract; isolation and purification; identification; antioxidant activity

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科胡桃属植物,是世界四大坚果之一^[1]。我国核桃栽培历史悠久,种植面积及总产量已远超美国^[2],截至 2018 年底,我国核桃种植面积为 816.57 万 m²,核桃年产量 383 万 t^[3]。核桃仁营养价值很高,其蛋白质含量达 15%~20%^[4],核桃经压榨制油后会产生大量的饼粕,其蛋白质含量更是可达 50%,是一种优质的蛋白质资源^[5]。然而,目前核桃粕大多只被用作动物饲料、植物肥料,甚至直接丢弃,其附加值利用率较低^[6]。因此,如何研究开发核桃粕蛋白的应用价值对实现核桃粕的综合利用、提高其附加值具有重要意义。

国内外对核桃蛋白的研究集中在蛋白的提取、理化性质及其活性多肽方面的研究^[7-10]。根据溶解性的不同,核桃蛋白可分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白,其中,清蛋白和球蛋白的溶解性最佳,其中清蛋白的溶解度 61.23%^[11]、球蛋白的溶解度可达近 25%^[12],目前相关研究也最多。清蛋白约占核桃总蛋白 6.81%^[13],它也是核桃蛋白研究热点的最主要对象,包括清蛋白的提取、酶解制备多肽的工艺条件以及清蛋白和酶解肽生物活性的探究等^[14-15]。相比之下,球蛋白的含量更高,约占 17.57%^[16],但针对球蛋白的科学研究却较少。现有研究中,关于球蛋白的报道主要集中在蛋白提取、功能特性和过敏性测定等方面^[17-18],韩海涛等^[19]利用 Osborne 法制备冷榨核桃球蛋白,并对其功能性质进行研究。Blankes-tijn 等^[20]纯化得到核桃 11S 球蛋白 Jug r4,并对其进行 SDS-PAGE 印迹分析,以鉴定其是否为核桃过敏原蛋白;Downs 等^[21]鉴定和表征了来自核桃 7S 种子储存球蛋白原蛋白 N 末端区域的一系列肽,表明成熟的 7S 球蛋白和新表征的 7S 球蛋白 N 端肽是两种不同类型的过敏原。而对球蛋白的组成信息、生物活性的探究等方面的研究却很少,这一定程度上限制了它的开发与应用。

本研究即以榨油后核桃粕为对象,提取其中球蛋白组分,通过纯化获得球蛋白主要组分,进一步探究球蛋白及其纯组分的功能活性,以期对脱脂核桃粕的深度开发以及核桃蛋白的研究提供基础数据和参考,具有积极的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃粕(北方香玲核桃) 由河北养元智汇饮品股份有限公司提供;乙腈(质谱级)、二硫苏糖醇、碘乙酰胺(分析纯) Fisher Chemical 公司;测序级胰蛋白酶(酶活力 14742 U/mg) Promega 公司;HiTrapTM CaptoTM Q、SephacrylTM S-100 High Resolution 柱料 美国 GE 公司;丙烯酰胺(纯度≥99.9%)、甲叉双丙烯酰胺(纯度≥98%) 北京拜尔迪生物技术有限公司;ABTS(纯度≥98%) 北京博奥拓达科技有限

公司。

Ultimate 3000 毛细管高效液相色谱仪、Q ExactiveTM Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometer 电喷雾-组合型离子阱、Orbitrap 质谱仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Allegra X-30R 型高速冷冻离心机 美国贝克曼公司;Alpha 2-4 LD Plus 型冷冻干燥机 德国 Christ 公司;INFINITE Spark 10M 型多功能酶标仪 瑞士 TECAN 公司;Cary 60 型紫外可见分光光度计 Agilent 公司;BS-100A 型自动部分收集器、BT-100 型恒流泵、TH-500 梯度混合器 上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 核桃粕经粉碎后过 80 目筛,在 4 ℃ 条件下,用正己烷($m_{\text{脱脂核桃粕}}:V_{\text{溶剂}}=5:1$)处理 1 h 后抽滤得到滤饼,滤饼用正己烷再次处理,直至滤液呈无色为止,收集滤饼,于通风橱中挥干剩余溶剂,在 4 ℃ 贮存^[22]。

1.2.2 核桃球蛋白提取 球蛋白根据改进的 Osborne 法^[23]制备:将脱脂粉与蒸馏水按 1:10(w/v)的比例混合,然后在恒温水浴摇床中保温振荡,离心弃上清液。对沉淀进行两次上述操作,收集沉淀加入一定体积 1 mol/L NaCl 溶液,充分混匀,在 37 ℃ 保温振荡提取 1 h 后,4 ℃、8000 r/min 离心 30 min 取上清液,再重复提取 2 次。收集上清液于 4 ℃ 条件下用滤纸滤去不溶物后用蒸馏水透析,冷冻干燥获得球蛋白粗提物。蛋白含量依据 GB 5009.5-2016^[24]测定,氮换算为蛋白质的系数为 6.25^[18]。球蛋白提取率,公式(1):

$$\text{蛋白质提取率(\%)} = \frac{\text{提取液蛋白含量} \times \text{提取液体积}}{\text{脱脂粉的蛋白含量} \times \text{脱脂粉的取样量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3 球蛋白等电点测定 参照李婷等^[25]的方法进行改进,取 4 mL 核桃球蛋白提取液 6 份,初步调节 pH 分别为 3、4、5、6、7、8,静置后 10000 r/min 离心 5 min,在 280 nm 下测定上清液吸光度。根据上述结果,参考晔艳等^[26]的方法,再在吸光度最低时的 pH 附近均衡选择 5 个点,间隔为 0.2,重新准备 5 份蛋白提取液,按此条件分别调节每管的 pH。静置后 10000 r/min 离心 5 min,测定上清液中蛋白质含量,蛋白含量测定采用 BCA 试剂盒法,蛋白含量最低点对应的 pH 即为球蛋白的等电点。

1.2.4 球蛋白纯化

1.2.4.1 HiTrapTM CaptoTM Q 离子交换层析 采用 HiTrapTM CaptoTM Q 作为固定相,纯化的色谱条件为:先用平衡缓冲液(25 mmol/L pH8.5 的 Tris-HCl 溶液)平衡离子交换柱后,步骤 1.2.2 提取得到球蛋

白粗提物用平衡缓冲液溶解,经 4 ℃、8000 r/min 离心 5 min 后取上清液,上清液过 0.45 μm 滤膜后上柱,再用初始浓度 0 mol/L、最高浓度 2 mol/L 氯化钠的 25 mmol/L pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液进行线性梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,1 mL/管分管收集。收集后测定每管溶液的 $A_{280\text{ nm}}$ 值,绘制洗脱曲线,分别将各峰收集后用 SDS-PAGE 电泳分析,然后分别于 4 ℃ 截留分子质量为 3500 Da 的透析袋中透析 72 h。透析完毕后收集蛋白溶液,于 4 ℃ 条件下保存备用,以待进一步纯化。

1.2.4.2 Sephacryl™ S 100HR 凝胶过滤层析 用含有 0.3 mol/L NaCl 的 PBS(50 mmol/L, pH7.4)平衡 Sephacryl™ S 100HR 柱(1.6 cm×120 cm),上一步离子交换层析纯化得到峰 1 蛋白样品经过 3 kDa 滤膜超滤浓缩后过 0.45 μm 滤膜后上柱,再用相同的缓冲液进行洗脱,流速为 1 mL/3 min,采用自动部份收集器收集洗脱液测定 $A_{280\text{ nm}}$ 值,绘制洗脱曲线。分别将各峰收集后用 SDS-PAGE 电泳分析,收集得到各峰的蛋白溶液分别于 4 ℃ 截留分子质量为 3500 Da 的透析袋中透析 72 h 后收集蛋白溶液,−80 ℃ 冷冻过夜后真空冷冻干燥,收集冻干粉于−20 ℃ 条件下保存备用。

1.2.5 蛋白表征

1.2.5.1 SDS-PAGE 分析 制备 12.5% 分离胶、4.5% 浓缩胶,电极缓冲液为 0.025 mol/L Tris-HCl、0.1% SDS、0.192 mol/L 甘氨酸的缓冲溶液。样品在浓缩胶中电压为 80 V,进入分离胶之后将其增至 110 V。电泳完毕后染色 30 min,最后脱色至背景透明^[27]。(Maker: 鸡蛋清溶菌酶 14.4 kDa、人生长素 22.0 kDa、牛碳酸酐 31.0 kDa、兔肌动蛋白 43.0 kDa、牛血清白蛋白 66.2 kDa、兔磷酸化酶 97.4 kDa,标准蛋白的标准曲线为 $y=-1.1608x+2.0666$, $R^2=0.9807$)。

制备 15.5% 分离胶、10% 夹层胶、4% 浓缩胶,阳极缓冲液为 pH8.9、2 mol/L Tris-HCl 溶液、阴极缓冲液为 0.1 mol/L Tris-HCl、0.1% SDS、0.239 mol/L 甘氨酸的缓冲溶液。样品在浓缩及夹层胶中电压为 30 V,进入分离胶之后将其增至 110 V。电泳完毕后考马斯亮蓝染色 30 min,最后脱色至背景透明(Maker: 3.3、5.8、7.8、14.4、20.1 kDa,标准蛋白的标准曲线为 $y=-1.8612x+2.4$, $R^2=0.9574$)。

1.2.5.2 Native-PAGE 分析 1.2.4.2 步骤中得到峰 1 蛋白用水溶解,然后与缓冲溶液按体积比为 1:2 混合,缓冲溶液中含有 30% 甘油、12.5% Tris-HCl (0.5 mol/L, pH6.8)和 2% 质量浓度为 0.5% 溴酚兰,充分混合后参照文献 [28] 方法进行 Native-PAGE 检测。

1.2.6 蛋白分析与鉴定

1.2.6.1 胰蛋白酶酶解 将 Native-PAGE 上的目的条带切成 1 mm³ 的胶粒,分别装入 1.5 mL 塑料离心

管中,加入含有 50% 乙腈-50% 50 mmol/L NH_4HCO_3 的脱色液进行脱色,静置 10~30 min 后除去脱色液,重复此操作至胶粒无色。每管各加入 100 μL 纯乙腈溶液,放置 30 min,待胶粒呈白色索至团状,弃去乙腈,室温放置干燥。然后每管各加入 100 μL 10 mmol/L 的 DTT,于 56 ℃ 水浴条件下还原 1 h 后,除去 DTT,之后再按照 100 μL/管的比例加入 55 mmol/L 的 IAA,室温避光反应 1 h,除去溶剂。之后再加脱色液(50% 乙腈-50% 50 mmol/L NH_4HCO_3)洗一遍,除去溶剂后,加入 100 μL 纯乙腈,放置 30 min,待胶粒呈白色索至团状,弃去乙腈,室温放置干燥。用 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液配制得到浓度为 0.22113 U/μL 的酶液,按照 7~10 μL/管的量加入酶液,于 4 ℃ 条件下孵育 40 min 后取出,每管补加 5~10 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液,密封于 37 ℃ 水浴条件下反应 16 h。然后每管加 100 μL 提取液(5% 甲酸-50% 乙腈-45% 水,于 37 ℃ 条件下水浴 1 h 后,超声 5 min,离心 5 min,将提取液移入另一新离心管中,重复提取一次,将提取液合并,真空离心干燥。酶切后的肽段使用自填脱盐柱脱盐,于 45 ℃ 真空离心浓缩仪中挥干溶剂备用以待下一步质谱检测^[29]。

1.2.6.2 LC-MS/MS 检测 将上述处理好的样品在流动相 A(0.1% 甲酸,2% 乙腈/水)中溶解后使用自填脱盐柱脱盐,在线 LC-MS/MS 分析。LC-MS/MS 过程参数设置为:

毛细管液相色谱分离条件:流动相 A 为含有体积分数 0.1% 甲酸,2% 乙腈的超纯水,流动相 B 为含有体积分数 0.1% 甲酸,19.9% 超纯水的乙腈溶液,预柱为 packed with Acclaim PepMap RPLC C₁₈ (100 Å, 5 μm, 300 μm×5 mm),流速为 600 nL/min。经过反复多次的试验,最终采用线性梯度洗脱程序为:开始 0 min,4% B;0~2 min,4%~8% B;2~45 min,8%~28%;45~55 min,28%~40% B;55~56 min,45%~95% B;56~66 min,95% B。

质谱条件:一级质谱参数:Resolution: 70000; AGCtarget: 3e6; MaximumIT: 40ms; Scanrange: 300 to 1800 m/z; 二级质谱参数:Resolution: 17500; AGCtarget: 1e5; MaximumIT: 60ms; TopN: 20; NCE/steppedNCE: 27^[30]。

质谱原始文件使用 Maxquant(1.6.2.10)分别检索目标蛋白数据库,检索参数如下:固定修饰:脲基(C);可变修饰:氧化(M),乙酰基(Protein N-term);酶:胰蛋白酶;肽段/碎片离子质量数:单同位素;显著性阈值:0.01。

1.2.7 核桃球蛋白抗氧化能力测定 ABTS 法参考汪小玉等^[31]的方法:先制备 ABTS 工作液,测定时将球蛋白和纯化得到蛋白主要组分加水制成质量浓度为 400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 μg/mL 的待溶液,吸取待测溶液各 20 μL,置于 96 孔板中,

每孔加入工作液 200 μL , 混匀, 静置 10 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度。以维生素 C 为阳性对照, 按下式计算 ABTS⁺ 自由基清除率, 利用 SPSS 软件分别计算 $\text{IC}_{50}(\text{样品})$ 、 $\text{IC}_{50}(\text{维生素 C})$, 并计算其抗坏血酸当量, 用 AEAC 表示, ABTS⁺ 自由基清除率按式(2)进行计算, 样品的抗坏血酸当量按式(3)进行计算:

$$\text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A 为样品溶液+ABTS 的吸光度; A_1 为水+ABTS 的吸光度; A_0 为样品溶液+水的吸光度。

$$\text{AEAC} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{维生素 C})}{\text{IC}_{50}(\text{样品})} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: $\text{IC}_{50}(\text{维生素 C})$ 为维生素 C 对 ABTS 阳离子自由基的半数抑制浓度, $\text{IC}_{50}(\text{样品})$ 为样品对 ABTS 阳离子自由基的半数抑制浓度。

1.3 数据处理

本实验所有数据均重复三次, 结果用 $\pm$ 标准差表示, 数据利用 Excel 2019、Origin 来绘制图形, SPSS 软件进行方差及显著性分析。

2 结果与分析

2.1 核桃球蛋白的提取制备

本研究以冷榨脱油后的核桃粕为原料, 经二次脱脂处理后核桃粕的蛋白含量从 39.90% 提高至 47.10%(表 1)。韩海涛等^[19]研究表明冷榨的“清香”核桃饼中蛋白含量为 48.64%, 脱脂后蛋白含量提高至 60.05%, 略高于本研究的结果, 可能是因为原料存在差异和提取工艺的不同。

表 1 不同物质的蛋白含量

Table 1 Protein contents of different substances

样品	蛋白含量(%)
核桃粕	39.90 $\pm$ 1.20
脱脂核桃粕	47.10 $\pm$ 0.60
球蛋白粗提物	51.53 $\pm$ 1.17

脱脂核桃粕进一步提取获得了球蛋白粗提物, 其蛋白含量可达 51.53%, 占核桃总蛋白的 15.3%, 此结果与毛晓英等^[32]研究新疆和田核桃的结果基本一致。而王晓飞等^[18]制备得到蛋白含量为 80.71% 的球蛋白, 高于本研究的结果, 一方面可能是提取液种类不同; 另一方面可能是考虑到硫酸铵盐析纯化蛋白时, 蛋白溶液中引入硫酸铵不利于后续处理^[33], 所以本研究在制备球蛋白时没有进行硫酸铵盐析这一操作步骤所致。

2.2 核桃球蛋白等电点测定结果

如图 1 所示, pH 为 4 时, 上清液吸光度最小, 因此, 初步确定核桃球蛋白等电点在 4 左右。继续研究 pH4 左右的核桃球蛋白等电点(图 2), 发现该蛋白在 pH3.8 时上清液中的蛋白含量最少, 而随着 pH 低于或者高于 3.8 时蛋白含量又呈现明显的上

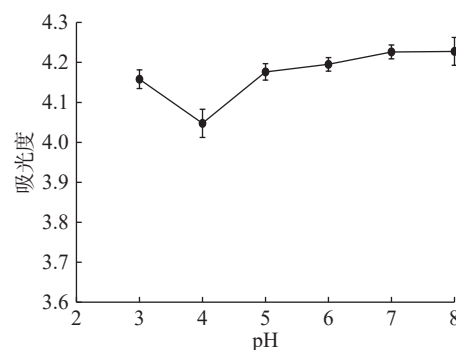


图 1 不同 pH 下离心后上清液蛋白吸光度

Fig.1 Protein absorbance of supernatant after centrifugation at different pH

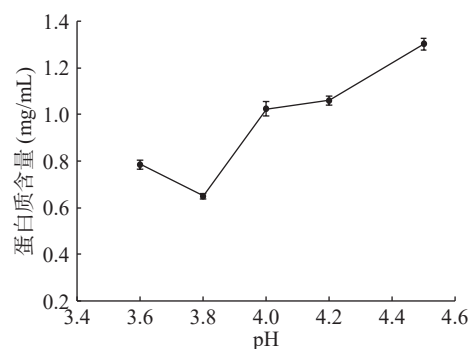


图 2 不同 pH 下离心后上清液蛋白含量

Fig.2 Protein content of supernatant after centrifugation at different pH

升, 这表明其等电点为 pH3.8。核桃球蛋白的等电点与其他植物来源的球蛋白的等电点值相近, 如花生粕^[25]、米糠^[34]、谷子^[35]中球蛋白的等电点分别为 4.6、4.0 和 3.6, 他们也与大多数食品蛋白质一样属于典型的酸性蛋白质^[36], 而对于核桃蛋白等电点的解析也是为后续该蛋白的纯化提供了基础数据。

2.3 核桃球蛋白纯化结果

球蛋白粗提物先经离子交换层析色谱纯化, 获得两部分蛋白分离物(图 3), 采 SDS-PAGE 分析各部分的蛋白条带分布情况(图 4), 其中峰 1 的分离效果更好, 继续进行后续纯化。采用凝胶过滤层析进一步分离峰 1 中的蛋白, 共得到 2 个峰(图 5)。其中,

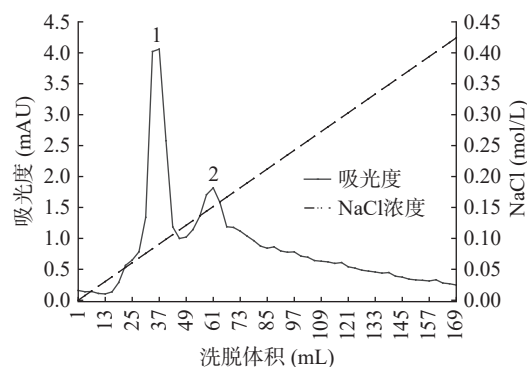


图 3 脱脂核桃粕球蛋白离子交换层析

Fig.3 Ion exchange chromatography of globulin from degreased walnut meal

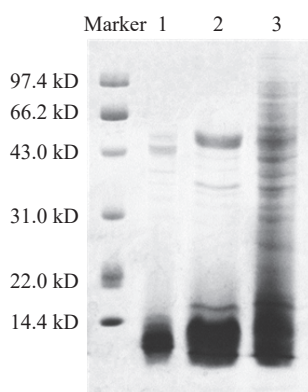


图 4 脱脂核桃粕球蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE electropherogram of defatted walnut meal globulin

注: 泳道 1: 球蛋白原样; 泳道 2: 纯化后的峰 1 的样品; 泳道 3: 纯化后峰 2 的样品。

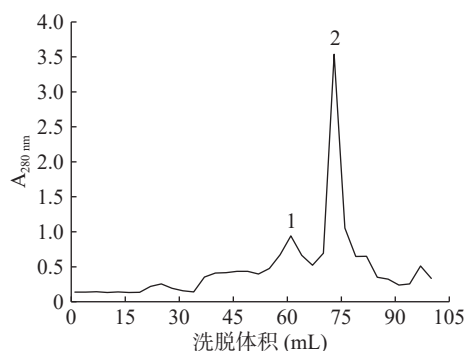


图 5 脱脂核桃粕球蛋白凝胶过滤层析

Fig.5 Gel filtration chromatography of degreased walnut meal globulin

首先收集到的蛋白经 SDS-PAGE 分析后证实为球蛋白中 10.1 kDa 大小的主要蛋白(图 6), 其纯度可达电泳级纯。再经 Native-PAGE 电泳分析该组分, 它由两个活性蛋白条带组成, 后续分别对两个蛋白条带进行蛋白鉴定。

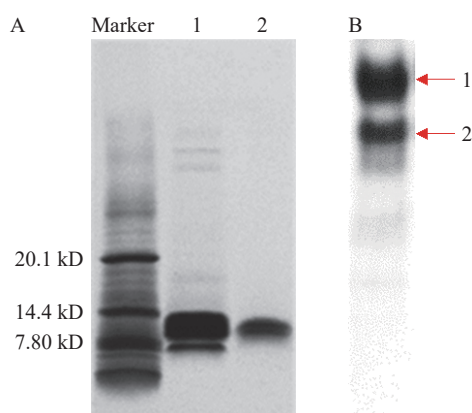


图 6 球蛋白 SDS-PAGE 电泳(A)和纯化得到主要蛋白 Native-PAGE(B)电泳分析

Fig.6 Globulin SDS-PAGE electrophoresis (A) and purification of the main protein Native-PAGE (B) electrophoresis analysis

注: A:泳道 1: 球蛋白原样; 泳道 2: 纯化后的峰 1 的样品。

脱脂核桃粕球蛋白粗提物由多种蛋白组成, 其

中含有 2 个主要条带(图 6), 其分子量分别为 7.8 和 10.1 kDa(图 6)。而 Mao 等^[37] 研究发现新疆核桃的球蛋白显示出九个条带, 其中两个主要条带的分子量为 20.1 和 35.0 kDa, 这可能是由于核桃品种不同而造成的差异。

2.4 蛋白的质谱鉴定结果

2.4.1 条带 1 蛋白的鉴定结果 LC-MS/MS 检测结果显示, Native-PAGE 电泳图上的条带 1 蛋白经液相色谱分离后, 在质谱中检测到的肽段数量与丰度较高(图 7), 共检测到 145 条肽段, 其中的 98 条肽段均在其对应的蛋白质组中是唯一的。质谱采集结果经软件 MaxQuant(1.6.2.10)数据库检索, 得到鉴定蛋白的比对结果, 仅列出得分较高的前 5 个蛋白比对结果(表 2)。综合蛋白的得分和含量结果表明该蛋白为 vicilin Car i 2.0101, 属于 7S 种子储存蛋白家族, 是一种 7S 球蛋白。这也与 Regina 等^[38] 报道的结果一致, 其发现 7S 球蛋白通常由大量多肽组成, 其分子质量范围在 10~70 kDa, 不存在二硫键。

2.4.2 条带 2 蛋白的鉴定结果 LC-MS/MS 检测结果显示, Native-PAGE 电泳图上条带 2 蛋白经液相色谱分离后, 在质谱中检测到的肽段数量与丰度较高(图 8), 共检测到 177 条肽段, 其中的 127 条均在其对应的蛋白质组中是唯一的。质谱采集结果经过软件 MaxQuant(1.6.2.10)数据库检索, 得到鉴定蛋白的对比结果, 仅列出得分较高的前 5 个蛋白对比结果(表 3)。综合蛋白的得分和含量结果表明该蛋白为 2S 清蛋白。这也与 Downs 等^[21] 报道的结果一致, 他们表明 2S 清蛋白是一类结构紧凑, 半胱氨酸残基结构保守的低分子量蛋白, 其分子质量范围在 10~15 kDa 之间。另有, Spiric 等^[39] 从山核桃中提纯得到由 5 和 12 kDa 的主要条带及 16 kDa 蛋白条带共同组成的天然的 2S 清蛋白, 与本研究得到的结果有所不同。本文通过 Osborne 法制得核桃球蛋白, 在对其进行纯化后得到 2S 清蛋白, 这与郭彦飞^[40] 报道结果不同, 他们证明苦荞中属于 2S 清蛋白家族的 16 kDa 过敏原仅存于苦荞种子清蛋白中, 推测这可能是由于采用此方法提取核桃清蛋白和球蛋白时, 两种蛋白很难绝对分开, 导致出现交叉的现象。

2.5 核桃球蛋白抗氧化效果

ABTS⁺被广泛应用于测定抗氧化剂的总抗氧化能力(图 9, 表 4)。核桃球蛋白、球蛋白纯化得到主要蛋白组分蛋白以及维生素 C 对 ABTS⁺自由基的清除能力均与其质量浓度呈正相关, 其强弱依次为维生素 C>纯化得到主要蛋白组分>核桃球蛋白, 同浓度下球蛋白纯化得到蛋白组分对 ABTS⁺自由基的清除率显著高于核桃球蛋白。核桃球蛋白和球蛋白纯化得到主要蛋白组分的 IC₅₀ 值分别为 0.302、0.075 mg/mL, 两者之间存在显著性差异, 后者 IC₅₀ 值仅为前者的 1/4。同时球蛋白纯化得到主要蛋白组分的抗氧化能力弱于对照品维生素 C, 但与之相比也是具有较好的

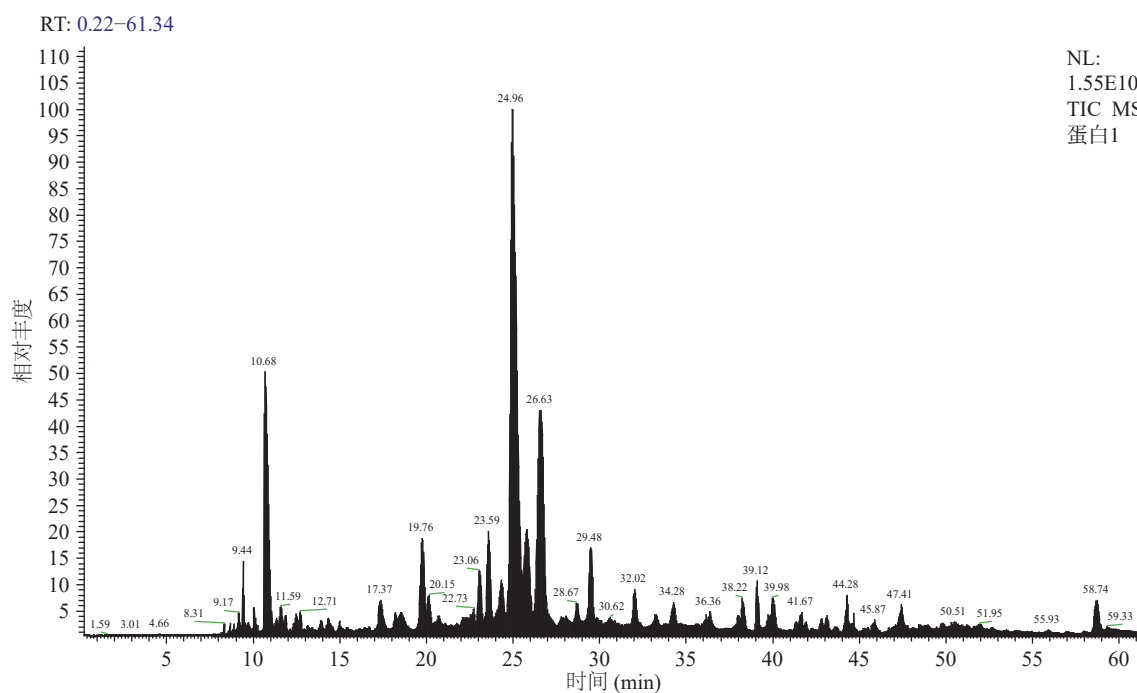


图7 条带1蛋白的LC-MS/MS总离子流图

Fig.7 LC-MS/MS total ion chromatogram of band 1 protein

表2 条带1蛋白的鉴定结果

Table 2 Identification results of band 1 protein

登录号	蛋白	特征性肽段	序列覆盖率 (%)	分子量(kDa)	序列长度	匹配得分	含量
A0A2I4DYF1	vicilin Car i 2.0101	37	24.6	94.4	789	323.31	11418000000
P93198	2S albumin	9	54	16.373	139	323.31	6640100000
A0A2I4F3R2	barwin-like	1	6.8	20.455	192	323.31	116920000
A0A2I4F6R4	11S globulin-like	4	9.2	58.293	511	126.31	52859000
A0A2I4EG83	11S globulin seed storage protein 2-like	6	14.6	54.307	481	111.28	42719000

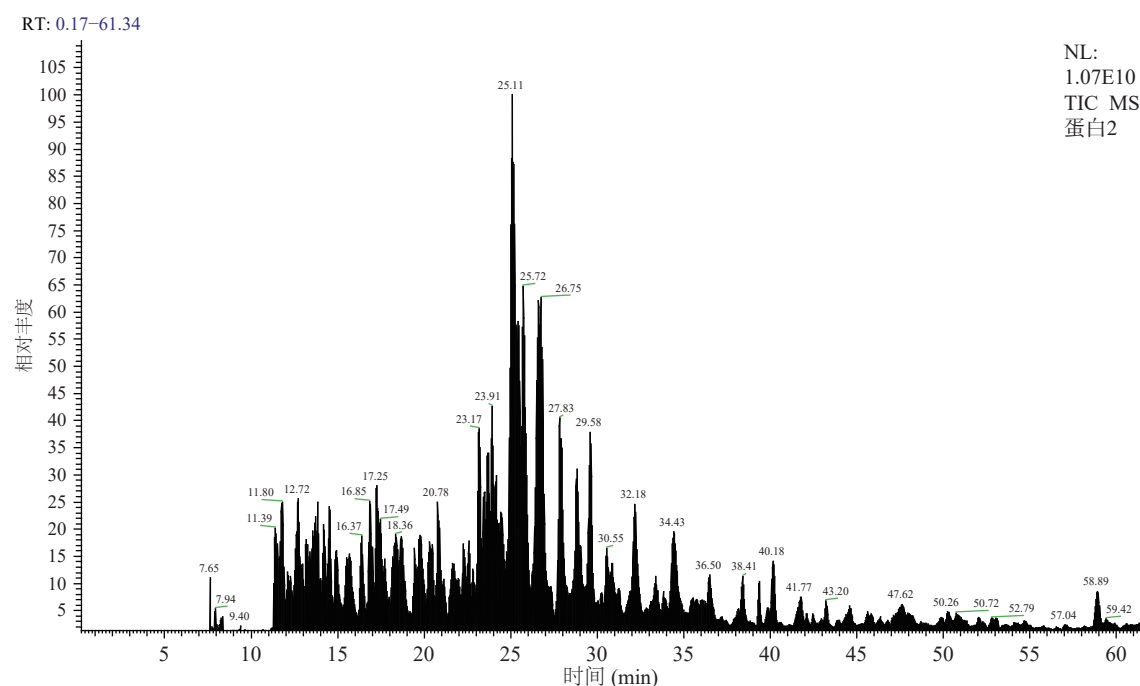


图8 条带2蛋白的LC-MS/MS总离子流图

Fig.8 LC-MS/MS total ion chromatogram of Band 2 protein

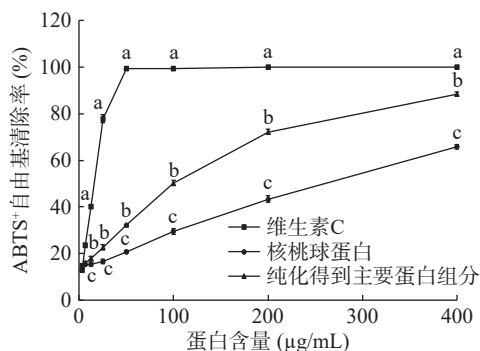
清除 $ABTS^+$ 自由基的能力。本试验的结果表明, 球蛋白及从球蛋白中纯化得到主要蛋白组分均具有较

高的总抗氧化能力, 可以利用这一性质, 将其添加到肉汤、火腿等食品中, 提高产品的货架期^[41]。

表 3 条带 2 蛋白的鉴定结果

Table 3 Identification results of the band 2 protein

登录号	蛋白	特征性肽段	序列覆盖率 (%)	分子量(kDa)	序列长度	匹配得分	含量
P93198	2S albumin	8	54	16.373	139	323.31	16864000000
A0A2I4DYF1	vicilin Car i 2.0101	27	25	94.4	789	323.31	8514700000
A0A2I4F6R4	11S globulin-like	5	11	58.293	511	323.31	545190000
Q2TPW5	11S globulin seed storage protein Jug r 4	7	15.6	58.144	507	323.31	443470000
A0A2I4GEH1	legumin B-like	15	30.8	55.855	490	273.45	2420900000

图 9 不同质量浓度蛋白对 ABTS⁺自由基的清除率Fig.9 Scavenging rate of ABTS⁺ free radicals by protein at different mass concentrations表 4 不同蛋白对 ABTS⁺自由基的 IC₅₀、AEACTable 4 IC₅₀, AEAC of different proteins to ABTS⁺ free radicals

组别	IC ₅₀ (µg/mL)	AEAC(g/100 g)
核桃球蛋白	302.425±16.244 ^a	3.987±0.126 ^b
纯化得到主要蛋白组分	74.950±2.134 ^b	16.066±0.123 ^a
抗坏血酸组	12.040±0.275 ^c	

注: 同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 结论

本文以改进的 Osborne 法制备脱脂核桃粕球蛋白粗提物, 球蛋白粗提物蛋白含量达 51.53%, 占核桃总蛋白的 15.3%, 其等电点为 3.8; 经离子交换层析和凝胶过滤层析两步纯化获得大小为 10.1 kDa 的球蛋白; 该蛋白在活性状态下呈现出两条条带, 经 HPLC-MS 分析表明条带 1 为 vicilin Car i 2.0101, 是一种 7S 球蛋白, 条带 2 为 2S 清蛋白。研究发现, 核桃球蛋白粗提物和纯化的球蛋白均具有良好的抗氧化能力, 而纯化后球蛋白的抗氧化效果是粗提蛋白的 4 倍, 其 IC₅₀ 值可低至 0.075 mg/mL。通过以上研究, 可为深入了解与开发核桃球蛋白组分与功能提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] 刘瑞, 谢辰阳, 吴水霞, 等. 核桃青皮不同极性酚类物质组成分析[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(6): 88-93. [LIU R, XIE C Y, WU S X, et al. Composition analysis of different polar phenols in walnut green peel[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(6): 88-93.]
- [2] 柳青, 陈晓琪, 马长路, 等. 响应面法优化低糖核桃营养派制作工艺研究[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(5): 81-90. [LIU Q,

CHEN X Q, MA C L, et al. Optimization of processing technology of low-sugar walnut nutritional pie by response surface methodology[J]. Preservation and Processing, 2021, 21(5): 81-90.]

[3] 荣瑞芬, 齐琳, 苏晨, 等. 核桃多糖研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(3): 11-21. [RONG R F, QI L, SU C, et al. Research progress of walnut polysaccharide[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(3): 11-21.]

[4] 王文倩, 王晗琦, 陈文, 等. 不同干燥方法对核桃品质及不饱和脂肪酸稳定性的影响[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(1): 59-64. [WANG W Q, WANG H Q, CHEN W, et al. Effects of different drying methods on walnut quality and stability of unsaturated fatty acids[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 33(1): 59-64.]

[5] 单春兰, 耿树香, 缪福俊, 等. 核桃蛋白多肽对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国油脂, 2021, 46(4): 33-37. [SHAN C L, GENG S X, MIAO F J, et al. Protective effect of walnut protein polypeptide on lipopolysaccharide induced acute liver injury in mice[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(4): 33-37.]

[6] 李明娟, 张雅媛, 游向荣, 等. 低温喷雾干燥技术制备核桃粕蛋白粉的工艺条件优化[J]. 食品工业, 2021, 42(1): 156-161. [LI M J, ZHANG Y Y, YOU X R, et al. Optimization of process conditions for preparation of walnut meal protein powder by low-temperature spray drying[J]. Food Industry, 2021, 42(1): 156-161.]

[7] 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): 191-197. [HUO Y Q, LIU C J, NIE R Z, et al. Research progress in the composition, preparation and properties of walnut protein[J]. Journal of the China Cereals and Oils Society, 2020, 35(12): 191-197.]

[8] 周迎春, 姜太玲, 李月仙, 等. 蛋白质酶水解物的功能特性及其生物活性的研究进展[J]. 农产品加工, 2018(3): 42-46. [ZHOU Y C, JIANG T L, LI Y X, et al. Research progress on functional properties and biological activities of protease hydrolysates[J]. Agricultural Products Processing, 2018(3): 42-46.]

[9] 缪福俊, 宁德鲁. 核桃多肽生物活性研究进展[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 48-51. [MIAO F J, NING D L. Walnut polypeptide biological activity research progress[J]. Journal of China Oil and Fats, 2021, 46(3): 48-51.]

[10] 李京京, 刘春雷, 闵伟红, 等. 利用 Shotgun 蛋白组学策略分析长白山核桃楸(Juglans mandshurica Maxim)蛋白[J]. 现代食品科技, 2015, 31(9): 256-262. [LI J J, LIU C L, MIN W H, et al. Shotgun proteomics strategy for protein analysis of Juglans mandshurica Maxim[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(9): 256-262.]

[11] 金子纯. 核桃粕蛋白质组分的理化性质、抗氧化性质及

- ACE 抑制率的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017. [JIN Z C. Study on physicochemical properties, antioxidant properties and ACE inhibition rate of walnut meal protein components[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017.]
- [12] LV S Y, AHMED T, HU H, et al. Effects of ultrasonic-assisted extraction on the physicochemical properties of different walnut proteins[J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4260–4260.
- [13] 李俊南, 习学良, 熊新武, 等. 核桃的营养保健功能及功能成分研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(5): 60–64. [LI J N, XI X L, XIONG X W, et al. Research progress on nutritional and health functions and functional components of walnut[J]. *Food and Nutrition in China*, 2018, 24(5): 60–64.]
- [14] 邱娟. 核桃清蛋白抗氧化肽对力竭运动小鼠抗疲劳和抗氧化能力的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(5): 2222–2229. [QIU J. Effects of walnut albumin antioxidant peptide on fatigue resistance and antioxidant capacity of exhausted exercise mice[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(5): 2222–2229.]
- [15] 刘威, 闵伟红, 刘春雷, 等. 核桃清蛋白抗氧化肽的制备及其活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(17): 40–44. [LIU W, MIN W H, LIU C L, et al. Preparation and activity of walnut albumin antioxidant peptide[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(17): 40–44.]
- [16] 姚奎章, 齐兵, 路敏, 等. 核桃乳酶解工艺及稳定性研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 259–264. [YAO K Z, QI B, LU M, et al. Study on enzymatic hydrolysis technology and stability of walnut milk[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(8): 259–264.]
- [17] 邓欣伦, 赵强忠. 核桃蛋白及其组分构象和功能特性的研究[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(1): 48–53, 61. [DENG X L, ZHAO Q Z. Conformation of walnut protein and its components and features of research[J]. *Journal of Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 48–53, 61.]
- [18] 王晓飞, 闵伟红, 朱运明, 等. 刘景圣. 长白山核桃球蛋白的提取、分离纯化及其功能性质研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(4): 234–241. [WANG X F, MIN W H, ZHU Y M, et al. Extraction, purification and functional properties of walnut globulin from Chang bai[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(4): 234–241.]
- [19] 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. Studies on nutritional value, functional properties and antioxidant activity of walnut protein components[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(4): 29–34.]
- [20] BLANKESTIJN M A, DEN H J C F, MARTY B W, et al. A subset of walnut allergic adults is sensitized to walnut 11S globulin Jug r 4[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2018; 48.
- [21] DOWNS M L, SEMIC-JUSUFAGIC A, SIMPSON A, et al. Characterization of low molecular weight allergens from English walnut (*Juglans regia* L.)[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(48): 11767–11775.
- [22] 王耀松, 张唯唯, 马天怡, 等. 丙二醛氧化对核桃分离蛋白结构及乳化性的影响[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(16): 3372–3384. [WANG Y S, ZHANG W W, MA T Y, et al. Effects of malondialdehyde oxidation on structure and emulsification of walnut protein isolate[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(16): 3372–3384.]
- [23] 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 enzymatic hydrolysates[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(3): 118–124.]
- [24] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.5-2016 National standard for food safety Determination of protein in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 3.]
- [25] 李婷, 任虹, 王丹丹, 等. 4种花生粕蛋白的理化性质及功能特性研究[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(11): 37–42. [LI T, REN H, WANG D D, et al. Study on physical and chemical properties and functional properties of four peanut meal proteins[J]. *Journal of the China Cereals and Oils Society*, 2016, 31(11): 37–42.]
- [26] 誉艳, 王常青, 陈晓萌, 等. 白芸豆清蛋白提取工艺及分子组成研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(15): 121–123, 129. [Zi Y, Wang C Q, Chen X M, et al. Study on extraction technology and molecular composition of albumin from white kidney bean[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2014, 35(15): 121–123, 129.]
- [27] 李述刚, 陆健康, 王萍, 等. 新疆莎车1号扁桃仁2S-清蛋白的纯化及特性研究[J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 36–41. [LI S G, LU J K, WANG P, et al. Study on purification and characteristics of 2S-albumin from Xin jiang Sha che 1 almond seed[J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 36–41.]
- [28] MICHAEL J T, ASFARUL S H, KHANH H B, et al. X-Ray Crystallography and electron microscopy of cross- and multi-module nonribosomal peptide synthetase proteins reveal a flexible architecture[J]. *Structure*, 2017, 25(5): 783–793.
- [29] 陶醉, 徐丽, 谢岚, 等. 米糠蛋白糖基化与非酶褐变机理的研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(7): 20–25. [TAO Z, XU L, XIE L, et al. Mechanism of glycosylation and non-enzymatic browning of rice bran protein[J]. *China Cereals and Oils Journal*, 2021, 36(7): 20–25.]
- [30] 李莹莹, 张颖颖, 任南, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛排产品中大豆蛋白含量[J]. *食品科学*, 2020, 41(10): 297–303. [LI Y Y, ZHANG Y Y, REN N, et al. Determination of soybean protein content in steak products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2020, 41(10): 297–303.]
- [31] 汪小玉, 李婷, 税丕先, 等. 仙茅总黄酮提取纯化工艺及其抗氧化、抗肿瘤活性[J]. *中成药*, 2022, 44(3): 907–912. [WANG X Y, LI T, SHUI P X, et al. Extraction and purification technology of total flavonoids from cyperaceae and its antioxidant and anti-tumor activities[J]. *Chinese Patent Medicine*, 2022, 44(3): 907–912.]
- [32] 毛晓英, 朱新荣, 万银松, 等. 核桃蛋白的组成分析及分离提取工艺的优化[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(3): 195–205. [MAO X Y, ZHU X R, WAN Y S, et al. Composition analysis of walnut protein and optimization of separation and extraction process[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2019, 19(3): 195–205.]
- [33] 姜国庆, 闫秋丽, 李东, 等. 螺旋藻中藻蓝蛋白提取、纯化及

- 稳态化研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2332–2338. [JIANG G Q, YAN Q L, LI D, et al. Spirulina algae in blue protein extraction, purification and steady state research progress[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2021, 12(6): 2332–2338.]
- [34] 张敏, 周梅, 王长远. 米糠 4 种蛋白质的提取与功能性质[J]. *食品科学*, 2013, 34(1): 18–21. [ZHANG M, ZHOU M, WANG C Y. Extraction and functional properties of four proteins from rice bran[J]. *Food Science*, 2013, 34(1): 18–21.]
- [35] 刘敬科, 张玉宗, 刘莹莹, 等. 谷子蛋白组分分析研究[J]. *食品与机械*, 2014, 30(6): 39–42. [LIU J K, ZHANG Y Z, LIU Y Y, et al. Millet protein component analysis[J]. *Journal of Food and Machinery*, 2014, 30(6): 39–42.]
- [36] 朱科学, 周音卉, 周惠明. 小麦胚芽球蛋白的提取及功能性质研究[J]. *中国粮油学报*, 2008(5): 19–23. [ZHU K X, ZHOU Y H, ZHOU H M. Extraction and functional properties of wheat germ globulin[J]. *Journal of Chinese Cereals and Oils*, 2008(5): 19–23.]
- [37] MAO X Y, HUA Y F, CHEN G G. Amino acid composition, molecular weight distribution and gel electrophoresis of walnut (*Juglans regia* L.) proteins and protein fractionations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(2): 2003–2014.
- [38] FREITAS R L, FERREIRA R B, TEIXEIRA A R. Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins[J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2000, 51(5): 341–352.
- [39] SPIRIC J, KOPPELMAN S J, KNULST A, et al. *In vitro* digestion and characterisation of 2S albumin and digestion-resistant peptides in pecan[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(6): 1566–1578.
- [40] 郭彦飞. 苦荞 16 kDa 主要过敏原的原核表达纯化、免疫活性分析及转化拟南芥研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2011. [GUO Y F. Prokaryotic expression and purification, immune activity analysis and transformation of Tartary buckwheat 16 kDa major allergens in *arabidopsis thaliana* [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2011.]
- [41] 郭帅, 李艳. 脱脂椰麸谷蛋白-1 抗氧化性的研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(15): 18–22. [GUO S, LI Y. Study on antioxidant activity of fat-free coco-bran gluten-1[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(15): 18–22.]