

白芸豆球蛋白的提取及其氨基酸组成研究

訾 艳, 王常青*, 党彦飞, 陈 源, 黄宜颖, 李雯娟

山西大学生命科学学院, 太原 030006

摘要: 本文研究了白芸豆球蛋白的提取工艺、分子量和氨基酸组成。结果表明, 白芸豆球蛋白最佳提取工艺为 NaCl 浓度 2.5 g/100 mL, 料液比 1: 22 (g/mL), 提取温度 55 °C, 提取时间 5 h, 在此条件下的球蛋白提取率为 31.46%; 用 60% 的硫酸铵, 在 4 °C 下盐析 1 h, 球蛋白的盐析得率为 73.55%; 球蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱中有 6 条蛋白亚基条带, 其相对分子质量分别为 97.52、47.35、33.84、29.62、26.28 和 21.99 ku, 其中有 5 条与白芸豆分离蛋白的亚基条带相吻合; 球蛋白的氨基酸组成种类齐全, 必需氨基酸含量接近 FAO/WHO 推荐模式, 是一种优质植物蛋白质资源。

关键词: 球蛋白; 分离蛋白; 盐析; 分子量; 氨基酸分析

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

Study on the Extraction and Amino Acid Composition of White Kidney Bean Globulin

ZI Yan, WANG Chang-qing*, DANG Yan-fei, CHEN Yuan, HUANG Yi-ying, LI Wen-juan

College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Extraction technology, molecular weight and amino acid composition of white kidney bean globulin were studied. The result showed that: the optimized extraction technology of globulin was as follows: concentration of NaCl 2.5 g/100 mL, solid-liquid ratio 1: 22 (g/mL), extraction temperature 55 °C, extraction time 5 h, and the extraction yield of globulin was 31.46% under the above conditions. The salting-out rate of globulin was 73.55%, when globulin was salted out at 4 °C for one hour by 60% ammonium sulphate saturation. Six protein subunit bands were detected in the SDS-PAGE electrophoretogram of globulin, their relative molecular weights were 97.52, 47.35, 33.84, 29.62, 26.28 and 21.99 ku, respectively. Five bands were consistent with the subunit bands of isolated white kidney bean protein. In conclusion, globulin contained abundant amino acids, and the essential amino acid content was close to the FAO/WHO recommended pattern. It was a kind of high quality plant protein resource.

Key words: globulin; isolated protein; salting-out; molecular weight; amino acid analysis

白芸豆 (white kidney bean), 生物学名菜豆 (*Phaseolus vulgaris* Linn.), 别名四季豆、白腰豆等, 在我国西南地区种植面积较大。白芸豆中蛋白质含量 19.9% ~ 20.0%, 脂肪含量 1.6% ~ 2.1%, 碳水化合物含量 37.6% ~ 48.5%, 并含有丰富的 Ca、Fe、维生素 C、维生素 B₁、维生素 B₂ 等维生素^[1]; 有研究表明, 白芸豆分离蛋白中必需氨基酸含量为 41.34%, 氨基酸评分为 91.25^[2], 由此可见, 白芸豆是一种营养价值较高的豆类食品。但是, 目前未见有关白芸豆中球蛋白的营养价值的研究报道。本课题研究表明, 白芸豆中含有清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白

和谷蛋白, 其中清蛋白含量最高 (此文另发)。白芸豆清蛋白中含有一种天然的 α -淀粉酶抑制剂, 可以用于治疗肥胖症和糖尿病等^[3]。而提取清蛋白后所剩白芸豆残渣中含有大量球蛋白, 为充分利用白芸豆蛋白资源, 本文研究了白芸豆球蛋白的提取工艺, 并对球蛋白的分子量和氨基酸组成进行了比较分析, 旨在为白芸豆蛋白资源的综合利用提供理论依据。

1 材料与仪器

白芸豆 (购于云南银健食品有限公司); 白芸豆分离蛋白 (本实验室采用碱溶酸沉法^[4]制备); 蛋白质电泳 Marker (北京天恩泽基因科技有限公司); 其他试剂 (为国产分析纯)。

DYCZ-23A 型电泳仪(北京市六一仪器厂);数显恒温水浴提取器(国华电器有限公司);UV-2600 型紫外可见分光光度计[尤尼科(上海)仪器有限公司];旋转蒸发仪(上海申升科技有限公司);pH 计(奥立龍);Thermo MR23 冷冻离心机(美国热电公司);日立 835-50 型高速氨基酸分析仪(日本日立公司)。

2 试验方法

2.1 白芸豆球蛋白的提取试验

白芸豆烘干粉碎后过 60 目筛,按 1:10 加入蒸馏水,在 40 ℃ 提取 2 次,每次 2 h,提取后离心,弃去上清液,取沉淀干燥,作为球蛋白提取试验的原料。球蛋白提取单因素试验包括不同料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL)、不同 NaCl 浓度(0.5、1、2、3、4、5 g/100 mL)、不同温度(30、40、50、60、70、80 ℃)和不同时间(1、2、3、4、5、6h)的提取试验。以上不同条件下的球蛋白提取液经 4000 rpm 离心 20 min 取上清液,测定上清液中的蛋白含量,按下式计算球蛋白提取率:球蛋白提取率(%) = 离心上清液中蛋白质含量 × 100 / 白芸豆中总蛋白质含量;其中上清液中蛋白质含量用双缩脲法^[5]测定,白芸豆中总蛋白质含量参照 GB 5009.5-2010 测定。

在以上单因素试验基础上,选取工艺参数,进行球蛋白提取的正交试验。

2.2 白芸豆球蛋白的硫酸铵盐析试验^[6]

取上一步中提取的球蛋白溶液 8 等份,加入硫酸铵,分别达到 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的饱和度,4 ℃ 静置 1 h,离心收集上清液,测定未沉淀蛋白含量,按下式计算球蛋白的盐析得率:盐析得率(%) = (球蛋白溶液中总蛋白质量 - 未沉淀蛋白质量) × 100 / 球蛋白溶液中总蛋白质量。再取 4 等份球蛋白溶液,按球蛋白盐析得率最大的饱和度加入硫酸铵,在 4 ℃ 下研究不同盐析时间(0.5、1、1.5 和 2 h)对球蛋白盐析得率的影响。盐析沉淀物透析 48 h,冷冻干燥后得盐析后的球蛋白。

2.3 白芸豆球蛋白和分离蛋白的分子量测定

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法确定白芸豆球蛋白和分离蛋白的分子量。分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 5%。考马斯亮蓝 R-250 染色。将蛋白质标准品的相对分子质量的对数对其相对迁移率作图得标准

曲线,根据回归方程计算球蛋白和分离蛋白的相对分子质量。

2.4 白芸豆球蛋白的氨基酸组成分析^[7]

取样品 20 mg 加入 6 mol/L HCl 冲入氮气封口,在 110 ℃ 烘箱内水解 22 h,冷却摇匀过滤,双蒸水定容至 50 mL,取 1 mL 冻干后加入 0.02 mol/L HCl 摇匀,14000 rpm 离心 15 min,吸取上清液 0.8 mL 过 0.45 μm 滤膜,用日立 835-50 氨基酸自动分析仪检测。

3 结果与讨论

3.1 白芸豆球蛋白提取单因素试验结果

3.1.1 NaCl 浓度对白芸豆球蛋白提取率的影响

在料液比 1:10,40 ℃ 提取 2 h 的条件下,NaCl 浓度小于 2 g/100 mL 时,白芸豆球蛋白提取率随着 NaCl 浓度增加而显著增大,在 2 g/100 mL 时提取率达到最大值;之后随着 NaCl 浓度增加提取率呈下降趋势(见图 1A)。这可能是因为当蛋白质溶液中有较多中性盐时,会降低蛋白质极性基团与水分子之间的相互作用,使水化膜破坏;同时,蛋白质分子间的疏水性作用增加,导致蛋白质溶解度降低^[8]。因此,正交试验中 NaCl 浓度选 1.5、2 和 2.5 g/100 mL。

3.1.2 料液比对白芸豆球蛋白提取率的影响

以 2 g/100 mL 的 NaCl 溶液,在 40 ℃ 提取 2 h,料液比与球蛋白提取率的关系见图 1B。料液比 1:20 时,白芸豆球蛋白提取率最大,高于和低于 1:20 时,提取率均会下降。料液比降低不利于球蛋白的溶出,但过高的料液比可能增加原料中非蛋白物质的溶出。因此,正交试验中料液比选在 1:18、1:20 和 1:22。

3.1.3 提取温度对白芸豆球蛋白提取率的影响

用 2 g/100 mL 的 NaCl 溶液,料液比 1:10,提取 2 h,得到提取温度与球蛋白提取率的关系(图 1C)。在 60 ℃ 之前,提取率随提取温度的升高而增大,60 ℃ 时达到最大值;60 ℃ 之后,随提取温度的升高,球蛋白提取率迅速下降。有报道称,芸豆淀粉起糊温度在 70 ℃ 左右^[9],因此提取温度高于 70 ℃ 后,淀粉的糊化会阻碍蛋白质的溶出,从而降低了蛋白质的提取率。因此,下一步正交试验中温度选在 55、60 和 65 ℃。

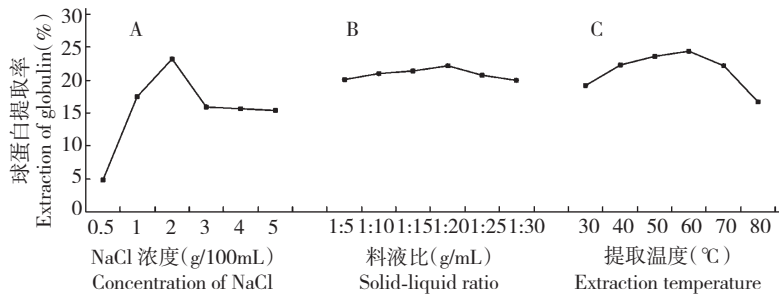


图1 NaCl 浓度(A)、料液比(B)及提取温度(C)对球蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effect of concentration of NaCl (A), solid-liquid ratio (B) and extraction temperature (C) on extraction yield of globulin

3.2 白芸豆球蛋白提取正交试验结果

提取率最高)为基础,设计白芸豆球蛋白提取的 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表1。

以 NaCl 浓度、料液比和提取温度的单因素试验结果及提取时间的预实验结果(提取 5 h 时球蛋白

表1 白芸豆球蛋白提取的正交试验结果

Table 1 Results of orthogonal experiment of extraction of white kidney bean globulin

试验号 No.	(A)NaCl 浓度 Concentration of NaCl(g/100 mL)	(B)料液比 Ratio of solid to liquid(g/mL)	(C)提取温度 Extraction temperature(°C)	(D)提取时间 Extraction time(h)	蛋白提取率 Extraction yield of protein(%)
1	1(1.5)	1(1:18)	1(55)	1(4.5)	25.78
2	1	2(1:20)	2(60)	2(5)	25.25
3	1	3(1:22)	3(65)	3(5.5)	26.42
4	2(2)	1	2	3	26.17
5	2	2	3	1	25.61
6	2	3	1	2	28.16
7	3(2.5)	1	3	2	28.87
8	3	2	1	3	29.12
9	3	3	2	1	30.05
k_1	25.82	26.94	27.69	27.15	
k_2	26.65	26.66	27.16	27.43	
k_3	29.35	28.21	26.97	27.24	
R	3.53	1.55	0.72	0.28	

表2 白芸豆球蛋白提取的正交试验方差分析表

Table 2 Analysis of variance of extraction of white kidney bean globulin

方差来源 Variance source	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
A	2	20.440	10.220	166.72	极显著
B	2	4.094	2.047	33.39	显著
C	2	0.835	0.418	6.81	
D	2	0.123	0.061	1.00	
误差 Error	2	0.123	0.061		

$F_{0.05}(2,2) = 19.0; F_{0.01}(2,2) = 99.0。$

正交试验表明,白芸豆球蛋白的最佳提取工艺

参数组合为 $A_3B_3C_1D_2$,即 NaCl 浓度 2.5 g/100 mL,

料液比 1:22, 提取温度 55 ℃, 提取时间 5 h。在此条件下进行验证试验, 球蛋白提取率的平均值为 31.46%, 高于正交表中其他组合, 证明正交试验可靠。影响白芸豆球蛋白提取率的因素为 $A > B > C > D$, 即 NaCl 浓度对球蛋白提取率的影响最大, 料液比次之, 提取时间的影响最小。方差分析也表明, NaCl 浓度对白芸豆球蛋白提取率的影响极显著 ($P < 0.01$), 料液比影响显著 ($P < 0.05$), 而提取温度和时间的影响不显著。

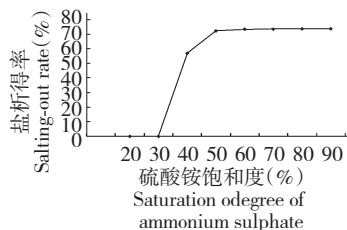


图2 白芸豆球蛋白硫酸铵盐析浓度曲线

Fig. 2 Ammonium sulphate salting-out curve of white kidney bean globulin

3.3 白芸豆球蛋白的硫酸铵盐析

由图2可知, 随着硫酸铵饱和度增加, 球蛋白盐析得率不断增加, 当硫酸铵饱和度为 60% 时, 盐析得率最大, 再增大硫酸铵的饱和度, 盐析得率基本不变。在盐析时间试验中发现, 在 4 ℃ 时, 用 60% 的硫酸铵盐析球蛋白 0.5、1、1.5 和 2 h 的盐析得率变化很小。最终选择球蛋白盐析的条件为: 在 4 ℃ 下, 用 60% 的硫酸铵盐析 1 h, 在此条件下, 球蛋白盐析得率的平均值为 73.55%。

3.4 白芸豆球蛋白和分离蛋白分子量的电泳分析

由白芸豆球蛋白和分离蛋白的电泳图谱可知, 球蛋白共分离出 6 条蛋白亚基条带, 分离蛋白共分离出 8 条蛋白亚基条带 (这与张丙云^[2]等人的研究结果一致)。将球蛋白和分离蛋白各亚基的相对迁移率带入蛋白质 Marker 标准曲线中, 计算出球蛋白各亚基相对分子质量 ($\bar{x} \pm s$) 由大到小分别为 97.52 ± 0.72 、 47.35 ± 0.49 、 33.84 ± 0.38 、 29.62 ± 0.31 、 26.28 ± 0.28 和 21.99 ± 0.19 ku, 分离蛋白各

亚基相对分子质量分别为 79.95 ± 0.81 、 60.11 ± 0.52 、 55.47 ± 0.47 、 47.30 ± 0.41 、 33.89 ± 0.38 、 29.68 ± 0.33 、 26.24 ± 0.21 和 21.97 ± 0.16 ku。可见, 白芸豆分离蛋白和球蛋白共有 5 条蛋白亚基条带相吻合, 说明白芸豆分离蛋白中的主要成分是球蛋白。

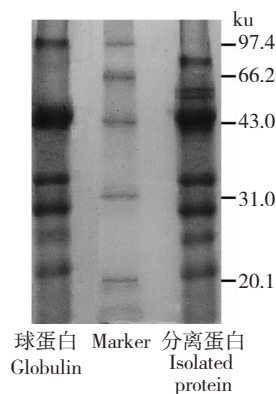


图3 白芸豆球蛋白和分离蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoretogram of white kidney bean globulin and isolated protein

3.5 白芸豆球蛋白的氨基酸组成分析

由表3可知, 白芸豆球蛋白中含有 18 种氨基酸 (色氨酸因样品处理采用酸水解未检出), 氨基酸总量达 76.56%, 其中谷氨酸和天冬氨酸含量最高, 分别为 11.51% 和 9.59%, 而蛋氨酸含量最低, 为 1.33%。球蛋白中人体必需的 8 种氨基酸总量为 30.91%, 与总氨基酸的比值 (EAA/TAA) 为 40.37%, 这与 FAO/WHO 提出的 EAA/TAA 为 40% 左右的参考蛋白模式相近, 说明球蛋白属于优质蛋白。从表4比较分析可知, 白芸豆分离蛋白的第一、第二限制性氨基酸分别为异亮氨酸和苏氨酸, 而球蛋白分别为苏氨酸和异亮氨酸。球蛋白的 AAS 为 83.50, 与标准模式接近。与其他植物蛋白不同的是, 赖氨酸不是白芸豆球蛋白的第一限制性氨基酸。此外, 球蛋白中苯丙氨酸 + 酪氨酸含量远高于 FAO/WHO 模式推荐值。可见白芸豆球蛋白必需氨基酸比例均衡, 营养价值较高。

表3 白芸豆球蛋白氨基酸组成与含量 (g/100 g)

Table 3 Amino acid composition and content of white kidney bean globulin (g/100 g)

氨基酸 Amino acid	含量 Content	氨基酸 Amino acid	含量 Content	氨基酸 Amino acid	含量 Content
天冬氨酸 (Asp)	9.59	丙氨酸 (Ala)	3.62	酪氨酸 (Tyr)	2.47

苏氨酸(Thr)	3.34	胱氨酸(Cys)	2.46	苯丙氨酸(Phe)	5.75
丝氨酸(Ser)	4.67	缬氨酸(Val)	4.92	赖氨酸(Lys)	5.20
谷氨酸(Gln)	11.51	蛋氨酸(Met)	1.33	组氨酸(His)	2.13
脯氨酸(Pro)	2.46	异亮氨酸(Ile)	3.71	精氨酸(Arg)	3.80
甘氨酸(Gly)	2.96	亮氨酸(Leu)	6.66	色氨酸(Trp)	-

表4 白芸豆球蛋白的必需氨基酸组成及氨基酸评分(g/100 g)

Table 4 Essential amino acid composition and amino acid score of white kidney bean globulin (g/100 g)

必需氨基酸 Essential amino acid	FAO/WHO 模式 FAO/WHO pattern	分离蛋白 Isolated protein	球蛋白 Globulin	球蛋白的氨基酸评分 AAS of globulin
赖氨酸 Lys	5.50	6.52	5.20	94.55
蛋氨酸 + 胱氨酸 Met + Cys	3.50	3.98	3.79	108.29
色氨酸 Trp	1.00	1.26	-	-
苏氨酸 Thr	4.00	3.79	3.34	83.50
异亮氨酸 Ile	4.00	3.65	3.71	92.75
亮氨酸 Leu	7.00	6.88	6.66	95.14
苯丙氨酸 + 酪氨酸 Phe + Tyr	6.00	9.80	8.22	137.00
缬氨酸 Val	5.00	5.46	4.92	98.40
合计 Total	36.00	41.34	35.84	

4 结论

白芸豆球蛋白最佳提取条件为 NaCl 浓度 2.5 g/100 mL, 料液比 1:22 (g/mL), 温度 55 °C, 时间 5h, 此时球蛋白提取率为 31.46%。用 60% 的硫酸铵, 在 4 °C 下盐析 1 h, 球蛋白的盐析得率为 73.55%。白芸豆球蛋白电泳分离出的 6 个蛋白亚基条带中, 有 5 条与分离蛋白的电泳条带相同, 分离蛋白中只有 79.95、60.11 和 55.47 ku 这 3 个亚基在球蛋白中没有。白芸豆球蛋白的氨基酸组成种类齐全, 必需氨基酸含量接近 FAO/WHO 推荐模式, 是较好的植物蛋白质资源。

参考文献

- Zhao R(赵蓉), Li DW(李多伟), Shen XD(沈晓东), *et al.* Study on α -amylase inhibitor from white kidney beans. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2008, 30:1355-1357.
- Zhang BY(张丙云), Yuan YL(袁亚兰), Gao YJ(高瑜璟), *et al.* Study on nutritional assessment and functional properties of kidney bean protein. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2010, 31:347-350.
- Zhao R(赵蓉). Purification and nature research on lose weight medicine α -amylase inhibitor from white kidney beans. Xi'an: Northwest University(西北大学), MSc. 2010.
- Ren HW(任海伟), Li ZZ(李志忠), Wang MG(王鸣刚), *et al.* Effect of ultrafiltration on antioxidant activity of kidney bean protein hydrolysates. *Food Sci*(食品科学), 2009, 30: 212-216.
- Wang YH(王永华). *Food Analysis*(食品分析). Beijing: China Light Industry Press, 2011. 124-125.
- Lin R(蔺瑞), Zhang ML(张美莉), Zhang JC(张家超). Purification and antioxidant activity of globulins from naked oat seeds. *Food Sci*(食品科学), 2011, 32:31-34.
- Wang YL(王艳玲), Zhang M(张敏). Extraction process and analysis amino acid composition of defatted rice bran albumin and globulin. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2013, 34:226-231.
- Mo CW(莫重文). *Protein Chemistry and Technology*(蛋白质化学与工艺学). Beijing: Chemical Industry Press, 2007. 81-82.
- Du SK(杜双奎), Wang H(王华), Nie LJ(聂丽洁). Study on physical and chemical properties of kidney bean starch. *J Chin Cereals Oils Assoc*(中国粮油学报), 2012, 27:31-35.