

文章编号:2095-7386(2016)04-0017-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.04.003

## 利用连续提取法定量花生蛋白

周宁菱<sup>1,2,3</sup>,邵建军<sup>1,2</sup>,陈红兵<sup>3</sup>,吴志华<sup>3</sup>,周煌<sup>3,4</sup>

(1. 景德镇市市场和质量技术监督局,江西 景德镇 333000; 2. 景德镇市食品药品检验所,江西 景德镇 333000;  
3. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室,江西 南昌 330047; 4. 吉安职业技术学院,江西 吉安 343000)

**摘 要:** 为了建立一个数学模型,用于计算花生基质中蛋白含量,实验将花生脱脂粉进行五步连续提取,利用 Bradford 法和 SDS-PAGE,分别定量出每次花生提取液中可提取的蛋白、花生过敏原蛋白 Ara h 3/4 和 Ara h 6,用于分析提取量与提取次数的关系。结果显示,每次蛋白提取量可用等比数列  $a_n = a_1 q^{n-1}$  表示,根据等比数列求和公式可计算出可提取的总蛋白量。因此,利用五步连续提取法获得的数学模型可作为一种计算花生基质中蛋白含量的方法。

**关键词:** 花生蛋白; 定量; 提取; Ara h 3/4; Ara h 6

**中图分类号:** TS 201.2

**文献标识码:** A

## Quantification of peanut protein by sequential extraction

ZHOU Ning-ling<sup>1,2,3</sup>, SHAO Jian-Jun<sup>1,2</sup>, CHEN Hong-bing<sup>3</sup>, WU Zhi-hua<sup>3</sup>, ZHOU Huang<sup>3,4</sup>

(1. Jingdezhen Market and Quality Supervision Administration, Jingdezhen 333000, China;  
2. Jingdezhen Institute for Food and Drug Control, Jingdezhen 333000, China;  
3. State Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
4. Ji'an Vocational and Technical College, Ji'an 343000, China)

**Abstract:** In order to establish a mathematical model for calculating the matrix peanut protein, a five-step sequential extraction method on defatted peanut flour (DPF) was put forward in the study. After each extraction, the extracted protein, peanut allergen Ara h 3/4 and Ara h 6 were quantified by Bradford and SDS-PAGE with the aim of analyzing the relationship between the extracted protein content and extraction times. The results showed that a geometric sequence  $a_n = a_1 q^{n-1}$  was obtained. Using the mathematical summation formula, the protein content in peanut matrix could be calculated. So, the using of five-step sequential extraction method could provide a means to quantify certain protein in peanut matrix.

**Key words:** peanut protein; quantification; extraction; Ara h 3/4; Ara h 6

## 1 引言

花生中含 25%—36% 蛋白<sup>[1]</sup>, 含量高且营养价值丰富, 受到广泛重视和利用。花生蛋白的组分、含量、结构和性质是进行生物研究和精深加工的重要

基础。通常, 花生粗蛋白可采用凯氏定氮法, 花生提取液中总蛋白量可采用 Bradford 法<sup>[2]</sup> 和 BCA 法<sup>[3]</sup> 等方法, 单种蛋白可配合灰度分析法计算, 另外花生提取液中过敏原含量可采用 ELISA 法<sup>[4]</sup>。在上述定量方法中, 凯氏定氮法主要用于测定固体基质中蛋白量, 但耗时, 灵敏度不高; Bradford 法和 ELISA

收稿日期: 2016-03-29.

修回日期: 2016-10-10.

作者简介: 周宁菱(1989-), 女, 实验员, 硕士, E-mail: zhouningling@sina.cn.

法均具有快速、易操作、高灵敏度、干扰少等特点,受到实验室广泛的运用,但两者只能检测提取液中蛋白量,不能反映花生基质中总蛋白或者单种蛋白含量的完整信息。而在花生蛋白研究中,定量基质中的蛋白是非常重要的。遗憾的是,目前,尚未见检测花生基质中单种蛋白的定量检测方法的相关报道。

在蛋白提取过程中,提取次数、温度、速率、时间、提取剂等因素均会影响提取效果<sup>[5]</sup>,导致提取出的蛋白含量或种类存在差异。在以往的研究中,大部分是通过优化提取条件,增加提取量,但未见对提取次数与蛋白提取量关系进行研究的相关报道。因此,本研究以花生单种蛋白 Ara h 3/4<sup>[6]</sup>和 Ara h 6<sup>[7]</sup>为例,采用五次连续提取蛋白实验,探究经多次提取后花生蛋白含量和种类的变化规律,以期建立一个数学模型,用于计算出花生基质中蛋白的含量。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

22 个品种花生

### 2.2 仪器与设备

高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);RH basic 2 S25 型磁力搅拌器(德国 IKA LABORTECHNIK);TS-3 型脱色摇床(海门市麒麟医用仪器厂);FDV 型超细粉碎机(北京兴时利和科技发展有限公司);迷你蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);GS-800 扫描仪(北京宇艾奇科技有限公司);BR 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);MVS-1 型漩涡混合器(北京北德有限公司);PB-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 花生蛋白的提取<sup>[8]</sup>

##### (1)花生脱脂

花生仁(赣花 7 号),去种皮,用低温粉碎机粉碎,用丙酮按 1:5(W/V)低温搅拌,脱脂 2 h,低温离心 30 min,弃上清,取沉淀重复脱脂 2 次,最终将沉淀自然风干得花生脱脂粉, -20 ℃ 下冻存备用。

##### (2)花生蛋白的连续提取方法

花生脱脂粉 2.00 g 用浸提液(50 mM Tris-HCl 缓冲液,(pH8.0),1:5(W/V))低温浸提 2 h,低温离心 30 min,所得上清液即为第一次提取液。剩下沉淀同提取步骤一继续提取,连续提取四次,记录每次提取液体积。所得提取蛋白液分别冻存于 -20 ℃ 下以备用。

#### 2.3.2 花生蛋白含量的测定

花生粗蛋白含量采用凯氏定氮法测定,测得的含氮量乘以蛋白质转化系数即为粗蛋白含量,此处蛋白质转化系数定为 5.46<sup>[9]</sup>。

花生蛋白提取液浓度采用 Bio-Rad 公司的商业化定量试剂盒测定,原理为 Bradford 蛋白测定法。所有蛋白含量测定均重复三次。

#### 2.3.3 SDS-PAGE

5 次蛋白提取液进行 SDS-PAGE<sup>[10]</sup>实验,根据蛋白电泳凝胶的图像,对提取液进行定性和定量分析。其中 Ara h 3/4 和 Ara h 6 的相对含量借助 quantity one 软件计算。

#### 2.3.4 不同品种花生的蛋白提取

选取 21 个花生品种(泉花 726,沙坡,忻县大花生,ICGV87281,8405-3,大伦花生 1,桂花 22,白马红,桂花 26,西农花,桂花 H771,升平,7501-11,闽花 6 号,秧道红,猛豆,昌花 1 号,邦机红,鲁花,0475,桂花 30)进行上述的脱脂、连续提取、蛋白含量的测定及 SDS-PAGE 实验。

## 3 结果与分析

### 3.1 花生总蛋白的数量分析

通过凯氏定氮法测得 2 g 桂花 26 花生脱脂粉中含粗蛋白  $1\,050.1 \pm 13.1$  mg。花生脱脂粉经五次连续提取后,提取液浓度采用 Bradford 蛋白定量法测定,其测得的蛋白量( $\pm$ 标准差 SD)分别是  $700.93 \pm 46.95$  mg、 $198.09 \pm 23.46$  mg、 $67.99 \pm 16.28$  mg、 $24.35 \pm 9.00$  mg、 $9.96 \pm 1.18$  mg。五次提取液中可提取的蛋白量合计  $1\,001.3$  mg,略低于花生粗蛋白量。其中,第一次提取液中含有的蛋白量约占 66.8%的粗蛋白,而第三次提取的蛋白量只占粗蛋白量的 6.5%。因此,在以前的蛋白提取率研究中,经第二次提取后剩余的残渣中含有的蛋白量极少,一般都会被丢弃。

实验结果如图 1 所示,花生蛋白经连续提取后,其提取率分别为 66.8%、56.7%、45.0%、29.3% 和 17.0%,呈现良好的负线性关系( $y = -12.694x + 81.054, R^2 = 0.994\,3$ ,其中  $x$  代表提取次数, $y$  代表蛋白提取率)。由此可见,在理论上,经多次提取,花生蛋白是可以被完全提取的。同时,由图 1 可知,蛋白提取量与提取次数的关系可用指数关系式  $y = 1\,792.5e^{-1.060\,3x}$  ( $R^2 = 0.996\,0$ ,其中  $x$  代表提取次数, $y$  代表蛋白提取量)表示。随着提取次数的增加,蛋白的提取量显著降低。多次重复实验结果显

示,这种规律可用指数方程的公式  $y = Ae^{kx}$  ( $A$  和  $k$  为常数)表示。当提取次数  $x$  从 1 次逐渐增加到 5 次时,蛋白提取量分别为  $Ae^k$ ,  $Ae^{2k}$ ,  $Ae^{3k}$ ,  $Ae^{4k}$ ,  $Ae^{5k}$ , 这种数据变化趋势可用数学中的等比数列通式  $a_n = a_1 q^{n-1}$  表示,  $a_1 = Ae^k$ ,  $q = e^k$ , 当  $x$  趋于无穷大时即提取无数次,可用等比数列求和公式  $S_n = a_1 / (1 - q)$  计算出花生基质中可提取的蛋白量为 945.1 mg, 约占粗蛋白量的 90.0%, 基于花生基质中含有无法提取的结构蛋白或者不溶性蛋白,此计算数据是合理的。

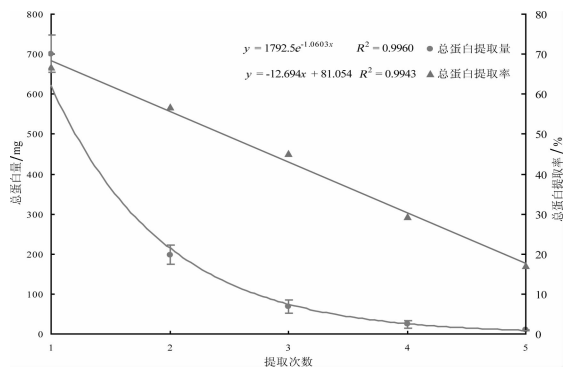


图 1 蛋白提取量与提取率在连续提取中的变化

### 3.2 花生蛋白 Ara h 3/4 和 Ara h 6 的含量分析

五次连续提取液经测定浓度后,进行 SDS-PAGE 实验,如图 2 所示。从图 2 可知,每次提取液的蛋白谱图的模式相似,即蛋白组分种类并没有显著差异。而利用 quantity one 软件分析,可知过敏原 Ara h 3/4 和 Ara h 6 占每次提取液中的含量比存在一定的差异。在 1—5 次提取液中,Ara h 3/4 的含量百分比分别为  $27.76 \pm 1.7\%$ ,  $31.95 \pm 1.85\%$ ,  $38.30 \pm 4.19\%$ ,  $38.83 \pm 5.74\%$ ,  $45.80 \pm 7.52\%$ ,随着提取次数的增加,Ara h 3/4 的含量比逐渐增加,呈现良好的正相关性  $y = 4.295x + 23.65$  ( $R^2 = 0.9599$ );而 Ara h 6 的含量百分比分别为  $6.90 \pm 0.68\%$ ,  $6.26 \pm 0.89\%$ ,  $6.92 \pm 0.99\%$ ,  $6.60 \pm 0.53\%$ ,  $6.79 \pm 0.95\%$ ,五次含量比的偏差在 0.28,变化并不显著。由此可见,提取次数不同,每次提取液中蛋白组分的含量比存在一定的差异。

由图 3 可看出 Ara h 3/4 的提取量与提取次数呈现指数相关性,方程为  $y = 450.7 e^{-0.9407x}$ ,  $R^2 = 0.9955$ 。由于总蛋白与过敏原蛋白 Ara h 3/4、Ara h 6 的提取过程是在同一条件下,因此,利用数学模型计算花生基质中蛋白量的方法也适用于 Ara h 3/4 和 Ara h 6。因此,通过指数方程  $y = Ae^{kx}$  与求和公

式  $S_n = a_1 / (1 - q)$ ,可计算出花生基质中 Ara h 3/4 的含量约为 286.0 mg,约占粗蛋白的 27.2%。同时,Ara h 6 的提取量与提取次数也呈现相似的指数相关性,方程为  $y = 119.12 e^{-1.0582x}$  ( $R^2 = 0.9939$ ),利用数学模型计算出花生基质中 Ara h 6 的含量约为 63.0 mg,约占粗蛋白量的 6.0%。

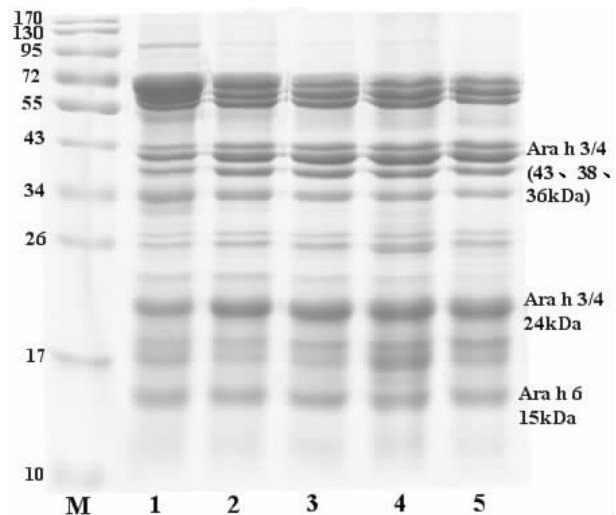


图 2 五次连续提取液的 SDS-PAGE 电泳图 (从左到右:泳道 1 为蛋白 marker,泳道 2—6 分别为第 1 次—第 5 次提取液)

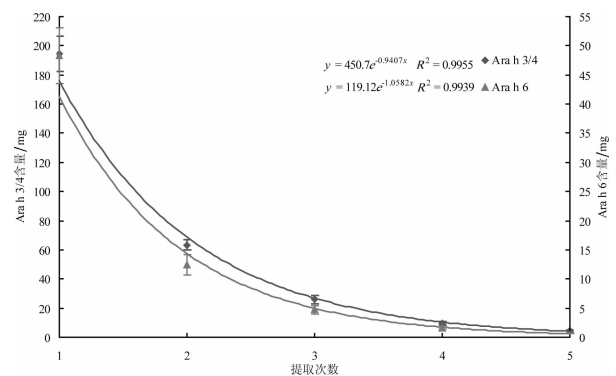


图 3 Ara h 3/4 和 Ara h 6 在连续提取中提取量的变化

### 3.3 不同花生品种的蛋白含量分析

为了验证蛋白提取量与提取次数之间的指数相关性的真实性,除了利用重复实验验证外,还探索了不同品种花生经脱脂、连续提取后,蛋白提取量与提取次数的关系。

由表 1 可知,随机选取的 21 份花生品种均存在此类规律,即蛋白提取量与提取次数的关系均可用指数方程式表示,相关性的变化幅度为 0.92—0.99。方程式计算的蛋白量与粗蛋白量的比值变化幅度为 89%—130%,对于大部分花生品种,该比值

集中于 100%—110%。由此可见,蛋白提取量与提取次数的指数相关性是普遍存在于不同花生品种之间的,这进一步验证了利用数学模型计算花生基质中蛋白量的可行性。

同时,在所选取的 22 份花生品种中,利用此数学模型计算出的粗蛋白理论值有的高于实际测定值,有的低于实际测定值。造成此结果的影响因素可能包括:第一,本实验是利用数学模型中拟合的指数方程  $y = Ae^{kx}$  计算蛋白量,这要求方程式具有较高的相关系数  $R^2$ ,而受花生品种、实验条件、实验操作和工作量等影响,使得一部分花生品种对应的方程式  $R^2$  并不高,影响计算结果;第二,实验中采用的

提取方法较为温和(提取温度 4 ℃,搅拌速度低),而无法在 5 次提取中获得花生基质中的全部蛋白;第三,Bradford 定量法所致,该方法原理是利用考马斯亮蓝 G-250 所含的疏水基团与蛋白质的疏水基团之间的亲和结合作用,而不同品种花生蛋白提取液中蛋白种类和性质不同,蛋白疏水性会有所差异。同时,曾有报道,Bradford 定量法可能会低估大多数种类的蛋白含量<sup>[11]</sup>;第五,凯氏定氮法所致,该方法测定的是有机氮含量,测得的花生粗蛋白量可能杂含一些含氮的非蛋白物质(硝酸盐、亚硝酸盐、核苷酸、核酸和多糖等),甚至一些难溶或不溶蛋白,而本实验中计算出的蛋白量为可溶性蛋白量。

表 1 不同花生品种的蛋白提取量与提取次数的关系

| 品种        | 拟合方程式                      | 相关性 $R^2$ | 凯氏定氮测定/mg | 5 次提取总量/mg | 计算总量 $S_n$ /mg | $S_n$ 与凯氏定氮测定量比值/% |
|-----------|----------------------------|-----------|-----------|------------|----------------|--------------------|
| 泉花 726    | $y = 1\,176.8e^{-0.8995x}$ | 0.992 3   | 903.31    | 797.31     | 806.93         | 89.33              |
| 沙坡        | $y = 753.04e^{-0.7122x}$   | 0.996 9   | 796.68    | 715.77     | 725.14         | 91.02              |
| 忻县大花生     | $y = 883.08e^{-0.7963x}$   | 0.992 0   | 796.39    | 726.35     | 725.43         | 91.09              |
| ICGV87281 | $y = 675.5e^{-0.6273x}$    | 0.966 9   | 845.46    | 731.24     | 774.17         | 91.57              |
| 8405-3    | $y = 1\,166.5e^{-0.8297x}$ | 0.919 4   | 867.80    | 862.07     | 804.51         | 92.71              |
| 大伦花生 1    | $y = 541.04e^{-0.5363x}$   | 0.975 0   | 793.60    | 698.66     | 762.38         | 96.07              |
| 桂花 22     | $y = 1\,011.2e^{-0.7686x}$ | 0.996 1   | 891.45    | 864.76     | 874.18         | 98.06              |
| 白马红       | $y = 1\,350.6e^{-1.1527x}$ | 0.995 4   | 633.02    | 654.68     | 623.36         | 98.48              |
| 桂花 26     | $y = 2\,125.9e^{-1.1606x}$ | 0.989 9   | 972.49    | 999.03     | 969.91         | 99.74              |
| 西农花       | $y = 924.18e^{-0.7002x}$   | 0.985 2   | 908.20    | 867.88     | 911.28         | 100.34             |
| 桂花 H771   | $y = 1\,410.2e^{-1.0358x}$ | 0.988 4   | 751.71    | 751.73     | 775.96         | 103.23             |
| 升平        | $y = 1\,655.7e^{-1.0217x}$ | 0.996 3   | 860.34    | 929.27     | 931.26         | 108.24             |
| 7501-11   | $y = 1\,296e^{-0.8712x}$   | 0.991 6   | 850.45    | 941.60     | 932.52         | 109.65             |
| 闽花 6 号    | $y = 1\,443.7e^{-0.9152x}$ | 0.977 2   | 865.51    | 946.85     | 964.22         | 111.40             |
| 秧道红       | $y = 1\,065.5e^{-0.7695x}$ | 0.968 4   | 808.44    | 854.91     | 919.58         | 113.75             |
| 猛豆        | $y = 1\,261.1e^{-0.7913x}$ | 0.944 1   | 902.50    | 1\,011.05  | 1\,045.46      | 115.84             |
| 昌花 1 号    | $y = 1\,298.9e^{-0.8754x}$ | 0.989 4   | 794.59    | 955.12     | 927.90         | 116.78             |
| 邦机红       | $y = 1\,404.7e^{-0.9416x}$ | 0.950 5   | 747.34    | 827.30     | 898.10         | 120.17             |
| 鲁花        | $y = 2\,024.2e^{-1.0483x}$ | 0.989 1   | 892.13    | 1\,036.85  | 1\,092.51      | 122.46             |
| 0475      | $y = 1\,681e^{-0.8756x}$   | 0.995 8   | 961.22    | 1\,166.28  | 1\,200.44      | 124.89             |
| 桂花 30     | $y = 1\,272.7e^{-0.6952x}$ | 0.954 8   | 974.61    | 1\,206.18  | 1\,267.49      | 130.05             |

4 结 论

本实验采用 5 次连续提取和 Bradford 蛋白定量法探索蛋白提取量与提取次数的关系,结果发现可以用指数方程式  $y = Ae^{kx}$  表示此关系,结合指数极限

求和公式  $S_n = a_1/(1 - q)$  建立了一个可以计算花生基质中蛋白含量的数学模型。在研究中,分别用粗蛋白、两个单种蛋白和 22 个花生品种进行验证,增加数学模型的可信度。

植物基质中单种蛋白含量的测定在蛋白研究中

起着至关重要的作用,在今后的实验中,还可对除花生以外的植物进行探究,以期获得相应的数学模型计算植物基质中蛋白含量。

#### 参考文献:

- [1] 刘大川. 植物蛋白工艺学[J]. 北京: 中国商业出版社, 1993.
- [2] Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976,72:248-254.
- [3] 李海玲,彭书明,李凇,等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2008,29(4):277-282.
- [4] 邵景东,孙秀兰,张银志,等. 酶联免疫吸附分析法检测花生过敏原的研究[J]. 分析科学学报,2011,27(1):89-92.
- [5] 杨伟强,李鹏,袁涛,等. 从花生蛋白粉中提取花生分离蛋白的条件优化[J]. 中国油脂, 2009,34(1):34-37.
- [6] Marsh Justin, Rigby Neil, Wellner Klaus, et al. Purification and characterisation of a panel of peanut allergens suitable for use in allergy diagnosis[J]. Molecular Nutrition Food Research, 2008,52:S272-S285.
- [7] Jin Tengchuan, Guo Feng, Wei Chen Yu, et al. Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut[J]. Molecular Immunology, 2009,46(8-9):1796-1804.
- [8] Luo Chunping, Hu Chunqiu, Gao Jinyan, et al. A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation[J]. Food Chemistry, 2013,136(3-4):1141-1147.
- [9] Misra J B. Variation in Nitrogen-to-Protein Conversion Factor for Peanut[J]. Peanut science, 2001,28(2):48-51.
- [10] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4[J]. Nature, 1970,227:680-685.
- [11] Hildebrandt S, Steinhart H, Paschke A. Comparison of different extraction solutions for the analysis of allergens in hen's egg[J]. Food Chemistry, 2007,108(4):1088 - 1093.
- (上接第 16 页)
- [21] 邓传波,夏延斌,罗凤莲,等. 乙醇-超声波处理提取食品级辣椒碱的工艺研究[J]. 食品科技, 2012, 04: 265-268.
- [22] 严伟,李淑芬,田松江. 超声波协助提取技术[J]. 化工进展, 2002, 21(9): 649.
- [23] USMAN M G, RAFII M Y, ISMAIL M R, et al. Capsaicin and dihydrocapsaicin determination in chili pepper genotypes using ultra-fast liquid chromatography[J]. Molecules, 2014, 19(5): 6474-6488.
- [24] 杨代明,马东兴,李忠海,等. 辣椒制品糊辣度的表示与测定[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 31-36.
- [25] KOSTYRA E, BARYŁKO-PIKIELNA N, DBROWSKA U. Relationship of pungency and leading flavour attributes in model food matrices - temporal aspects[J]. Food Quality and Preference, 2010, 21(2): 197-206.