

马铃薯蛋白的分离及氨基酸组成分析

曾凡逵, 刘 刚*

(中国科学院兰州化学物理研究所, 环境材料与生态化学研究发展中心, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 为了从马铃薯淀粉加工分离汁水中回收具有天然活性的蛋白, 以Amberlite XAD7HP树脂作为吸附剂对扩大床吸附进行研究, 并分析回收蛋白的氨基酸组成。结果表明: XAD7HP可以实现Patatin蛋白和蛋白酶抑制剂的分离, 分离到的马铃薯蛋白酶抑制剂的胰蛋白酶抑制活力为410 mg/g。回收的马铃薯蛋白酶抑制剂Ser、Leu、Glu的含量分别为13.2、9.14、8.14 g/100 g, 且必需氨基酸占总氨基酸的40.80%, 疏水氨基酸Ile、Leu、Val、Phe和Tyr的含量也比较高。

关键词: 马铃薯; 天然蛋白; 蛋白酶抑制剂; 氨基酸组成

Isolation and Amino Acid Analysis of Potato Protein

ZENG Fan-kui, LIU Gang*

(Research and Development Center for Eco-material and Eco-chemistry, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Bioactive proteins were recovered from a liquid byproduct containing roughly 1.5% protein, with approximately 50% being protease inhibitors by expanded bed adsorption using macroporous resin Amberlite XAD7HP. The recovered proteins were analyzed for amino acid composition. The results indicated that XAD7HP allowed the separation between protease inhibitors and patatin. The protease inhibitors exhibited an activity of 410 mg/g against trypsin and contained Ser, Leu and Glu at 3.2, 9.14 and 8.14 g/100 g, respectively, with the ratio of essential to total amino acids being 40.80%. Similarly, hydrophobic amino acids, Ile, Leu, Val, Phe and Tyr, were present in relatively higher quantities in these protease inhibitors.

Key words: potato; native protein; protease inhibitor; amino acid composition

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 09-0053-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201409012

马铃薯块茎中可溶性蛋白分成三大类: Patatin蛋白、蛋白酶抑制剂和其他蛋白^[1]。马铃薯蛋白酶抑制剂(potato protein inhibitor, PPI)可分为五大类^[2-7], 这些蛋白分子质量较小(5~25 kD)。在Elkana品种马铃薯中, PPI约占总可溶性蛋白的一半^[8]。

PPI有很多潜在的应用价值: Hu等^[9]报道了PPI可提高血浆中胆囊收缩素的含量, 胆囊收缩素能延缓胃的排空, 控制人体血糖浓度, 通过饱腹感来减少食物的摄入以达到减肥效果。Wang等^[10]通过老鼠实验验证了PPI具有抗血栓活性, Blanco-Aparicio等^[11]报道了PPI可干扰肿瘤细胞增殖而具有抗肿瘤作用。Huang等^[12]报道了PPI还可预防太阳光紫外线对人体皮肤的伤害, 因此可用于研制新型护肤品。

马铃薯淀粉加工分离汁水(potato fruit water, PFW)是从马铃薯淀粉加工生产线上的水力旋流器(或者叫旋

流站)分离出来的汁水, PFW约含有1.5%蛋白, 传统酸热絮凝法回收的马铃薯蛋白存在的主要问题是蛋白已发生不可逆变性, 回收的蛋白不可溶, 起泡性、乳化性和酶活性全部丧失^[8], 导致其在食品和制药行业的应用受到限制。近年来, 回收具有天然活性的食品级(药品级)可溶性马铃薯蛋白是马铃薯加工研究的热点^[8,13-14]。齐斌等^[15]采用盐溶碱提酸沉法制备了马铃薯分离蛋白, 并通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对蛋白亚基的分子质量进行了分析, 验证了马铃薯蛋白含有多个不同蛋白组分; 崔竹梅等^[16]采用透析与等电点沉淀相结合的工艺方法提取分离马铃薯块茎蛋白, 并对其理化性质和功能性质进行了检测。

扩大床吸附(expanded bed adsorption, EBA)是1992年由剑桥大学Chase等^[17]教授发展起来的, 是一种经

收稿日期: 2013-03-19

基金项目: 国家现代农业(马铃薯)产业技术体系建设专项(nycytx-15); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301532)

作者简介: 曾凡逵(1980—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为马铃薯加工。E-mail: zengfk@licp.cas.cn

*通信作者: 刘刚(1962—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为马铃薯加工。E-mail: gangliu@licp.cas.cn

过精心设计的、稳定的、返混很少的离子交换层析技术,把澄清、浓缩和纯化集成于一个单元操作中,减少了操作步骤,提高了产品收率,减少了纯化费用和资本投入,被誉为近几十年来出现的第一个新的单元操作^[18]。Giuseppin等^[19]对EBA回收具有天然活性的马铃薯蛋白进行了研究,回收的产品主要是Patatin蛋白。自1999年以来,Strætkvern^[20-22]、Løkra^[23-24]等发表了一系列扩张床吸附回收天然马铃薯蛋白的报道,他们的研究目的主要是回收Patatin蛋白用于食品加工领域。

填料对EBA回收马铃薯蛋白具有非常重要的影响,Amberlite XAD7HP既可以从水溶液体系中吸附非极性物质,也可以从非极性溶剂体系中吸附极性物质。未见Amberlite XAD7HP树脂从马铃薯淀粉加工分离汁水中回收蛋白的相关报道。本研究拟采用Amberlite XAD7HP树脂作为吸附剂通过EBA技术从马铃薯淀粉加工分离汁水中回收具有天然活性的蛋白,并对回收蛋白的氨基酸组成进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马铃薯淀粉加工分离汁水由甘肃薯界集团提供,使用前用稀盐酸调pH 5.0; Amberlite XAD7HP树脂、猪胰蛋白酶、*N*α-苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

层析柱(16 mm×400 mm) 上海锦华层析设备厂; Vivaflow 200超滤膜包(膜面积为200 cm², 蛋白分子截留量为10 kD) 德国赛多利斯公司; YZ-2512型蠕动泵 天利(中国)流体技术有限公司; DYCZ-24DN型迷你双垂直电泳仪(配置DY-6C型电泳仪电源) 北京六一仪器厂; SKD-100型凯氏定氮仪 上海沛欧分析仪器有限公司; FD-1A-50冷冻干燥机 上海比朗公司; V30型Karl Fischer水分测定仪 Mettler-Toledo公司; A3000-IC高精密度多功能自动氨基酸分析仪 德国安米诺希思公司。

1.3 方法

1.3.1 EBA色谱

扩张床吸附色谱的操作参考Strætkvern等^[20]报道的方法,但以Amberlite XAD7HP树脂为吸附剂。装置简图如图1所示,树脂用量为40 mL,使用前先用乙醇和去离子水清洗。将树脂装入层析柱,用5倍柱体积20 mmol/L的柠檬酸缓冲液(pH 5.0)平衡层析柱(自下而上),将1 L调好pH值的马铃薯淀粉加工分离汁水泵入到层析柱(自下而上),再用500 mL平衡液清洗柱子(自下而上),用500 mL 50 mmol/L的NaOH溶液将吸附在

XAD7HP树脂上的蛋白洗脱下来(自上而下),洗脱液用稀盐酸调成pH 7.0。

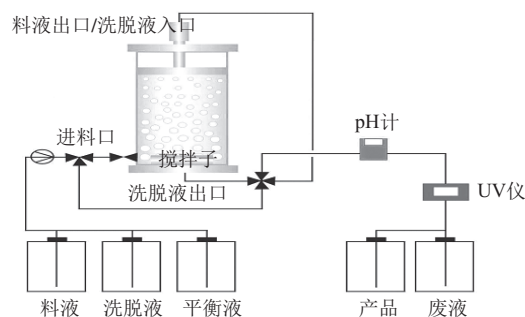


图1 EBA实验装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of the EBA

1.3.2 超滤浓缩

将超滤膜包和蠕动泵用L/STM 16#硅胶管连接起来进行超滤浓缩,浓缩比为5(从500 mL浓缩到100 mL)。浓缩到终体积以后再用20倍体积的蒸馏水进行等体积透析,最后将100 mL残留液冻干。

1.3.3 SDS-PAGE分析

采用5%浓缩胶和12%分离胶,将蛋白溶液与2×上样缓冲液混合后95 °C加热5 min后上样,浓缩胶电压为80 V,分离胶电压为120 V,采用考马斯亮蓝进行染色。

1.3.4 胰蛋白酶抑制活力

胰蛋白酶抑制剂活力根据Pouvreau等^[23]报道的方法进行测定,以*N*α-苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐为底物,在添加或不添加蛋白酶抑制剂的情况下测定猪胰蛋白酶水解底物的活力,计算蛋白酶抑制剂的抑制活力,实验结果取3次重复实验的平均值。

1.3.5 蛋白质含量测定

根据GB/T 5511—2008《谷物和豆类 氮含量测定和粗蛋白质含量计算 凯氏法》对冻干马铃薯蛋白粉的蛋白含量进行测定,氮换算成蛋白质含量的换算系数为6.25。实验重复3次,结果取平均值。

1.3.6 水分含量测定

采用Karl Fisher滴定法,实验重复3次,结果取平均值。

1.3.7 氨基酸的测定

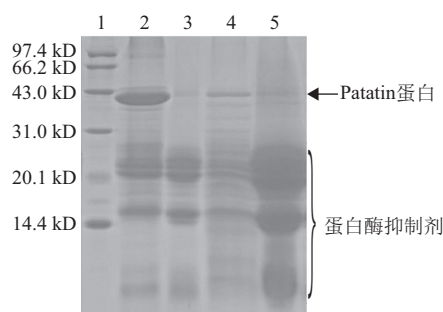
委托珠海出入境检验检疫局技术中心依据GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定》对冻干蛋白粉的氨基酸组成进行分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶抑制剂鉴定结果

由图2可知,洗脱液和超滤浓缩液以蛋白酶抑制剂为主,用XAD7HP树脂作为吸附剂通过EBA技术基本实现了Patatin蛋白和蛋白酶抑制剂的分离。马铃薯淀粉加工分离

汁水中可溶性的蛋白主要由Patatin蛋白和蛋白酶抑制剂组成, Patatin蛋白的分子质量大约为41 kD, 蛋白酶抑制剂包含多个蛋白组分, 亚基分子质量从5 kD到25 kD不等。



1. 标准分子质量; 2. 马铃薯总蛋白; 3. 洗脱液; 4. 穿过液; 5. 超滤浓缩液。

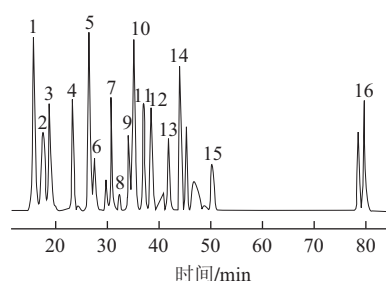
图2 马铃薯蛋白酶抑制剂SDS-PAGE图谱

Fig.2 SDS-PAGE of potato protein inhibitors

凯氏定氮法测定回收马铃薯蛋白的粗蛋白含量为 $(88.7 \pm 0.1)\%$, 水分含量为 $(4.6 \pm 0.0)\%$ 。Patatin蛋白和蛋白酶抑制剂是两类性质和作用完全不同的蛋白, 将Patatin蛋白和蛋白酶抑制剂进行分离具有十分重要的意义^[8]。

马铃薯蛋白酶抑制剂种类繁多, 到目前为止, 编码马铃薯蛋白酶抑制剂的核苷酸序列已公布了100多种 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。马铃薯蛋白酶抑制剂对丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶都具有抑制活力, 含量最高的为丝氨酸蛋白酶抑制剂^[25]。猪胰蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶, 可以通过抑制猪胰蛋白酶水解合成底物的活力来分析回收蛋白酶抑制剂的活力。为了验证本研究回收的马铃薯蛋白为蛋白酶抑制剂, 对回收蛋白抑制猪胰蛋白酶水解 $N\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐的活力进行了分析, 结果为 (410 ± 12) mg/g, 即每克蛋白酶抑制剂可抑制410 mg猪胰蛋白酶。

2.2 氨基酸分析结果



1~16号峰分别为Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr、Phe、His、Lys、Arg和Pro。

图3 马铃薯蛋白酶抑制剂氨基酸分离图谱

Fig.3 Chromatogram of amino acids from potato protease inhibitors

由图3可知, 各种氨基酸实现了较好的分离。回收马铃薯蛋白酶抑制剂的氨基酸组成及含量见表1。Ser含

量最高 $(13.2 \text{ g}/100 \text{ g})$, 其次为Leu $(9.14 \text{ g}/100 \text{ g})$ 、Glu $(8.14 \text{ g}/100 \text{ g})$, 其中Leu为必需氨基酸; 其他必需氨基酸含量较高的有Lys $(6.14 \text{ g}/100 \text{ g})$ 、Phe $(6.05 \text{ g}/100 \text{ g})$ 、Val $(5.54 \text{ g}/100 \text{ g})$ 、Thr $(4.96 \text{ g}/100 \text{ g})$ 和Ile $(4.29 \text{ g}/100 \text{ g})$, 必需氨基酸占总氨基酸的40.80%。Try含量未检测出来, 加上Try, 回收的蛋白必需氨基酸含量会更高。回收的马铃薯蛋白疏水氨基酸含量比较高, 特别是带有支链的Ile、Leu、Val和带有芳香环的Phe、Tyr, 与Singh等^[8]报道的结果一致。

表1 马铃薯蛋白酶抑制剂氨基酸含量

Table 1 Amino acid contents of potato protein inhibitors

氨基酸	含量/(g/100 g)
丙氨酸 (Ala)	2.93
苯丙氨酸 (Phe)	6.05
蛋氨酸 (Met)	0.73
脯氨酸 (Pro)	4.61
甘氨酸 (Gly)	5.4
谷氨酸 (Glu)	8.54
精氨酸 (Arg)	3.87
赖氨酸 (Lys)	6.14
酪氨酸 (Tyr)	5.44
亮氨酸 (Leu)	9.14
苏氨酸 (Thr)	4.96
丝氨酸 (Ser)	13.2
天冬氨酸 (Asp)	6.41
异亮氨酸 (Ile)	4.29
缬氨酸 (Val)	5.54
组氨酸 (His)	3.12
总氨基酸含量	90.37
必需氨基酸占总氨基酸比例	40.80%
非必需氨基酸占总氨基酸比例	59.20%
必需氨基酸/非必需氨基酸	0.69

3 结论

以XAD7HP树脂作为吸附剂通过EBA技术可以实现Patatin蛋白和蛋白酶抑制剂的分离, 分离到的马铃薯蛋白酶抑制剂的胰蛋白酶抑制活力为410 mg/g。回收马铃薯蛋白酶抑制剂氨基酸含量较高的包括Ser、Leu、Glu, 必需氨基酸占总氨基酸的40.80%。马铃薯蛋白酶抑制剂的疏水氨基酸Ile、Leu、Val、Phe和Tyr的含量也比较高。这种具有生物活性的马铃薯蛋白有望用于食品和制药行业。

参考文献:

- [1] POTS A M, GRUPPEN H, van DIEPENBEEK R, et al. The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content: a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(12): 1557-1564.
- [2] BAUW G, NIELSEN H V, EMMERSEN J, et al. Patatins, Kunitz

- protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras[J]. FEBS Journal, 2006, 273(15): 3569-3584.
- [3] BEEKWILDER J, SCHIPPER B, BAKKER P, et al. Characterization of potato proteinase inhibitor II reactive site mutants[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267: 1975-1984.
- [4] KNORR D, KOHLER G O, BETSCHART A. Potato protein concentrates: the influence of various methods of recovery upon yield, compositional and functional characteristics[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1977, 1(3): 235-247.
- [5] PARFENOV I A, REVINA T A, PASHKOVSKY P P, et al. Fragment of the gene encoding chymotrypsin and trypsin inhibitor protein of potato tubers[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, 47: 361-365.
- [6] PARK Y, CHOI B H, KWAK J S, et al. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 6491-6496.
- [7] KIM M H, PARK S C, KIM J Y, et al. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley"[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 346: 681-686.
- [8] SINGH J, KAUR L. Advances in potato chemistry and technology[M]. New York, USA: Elsevier Inc, 2009.
- [9] HU J, EDMONDSON B, RADOSEVICH J. Potato proteinase inhibitor II exhibits activity in elevating fasting plasma cholecystokinin concentrations: United States, 20060204567[P]. 2006-02-04.
- [10] WANG X, SMITH P L, HSU M Y, et al. Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006, 4(2): 403-410.
- [11] BLANCO-APARICIO C, MOLINA M A, FERNÁNDEZ-SALAS E, et al. Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273: 12370-12377.
- [12] HUANG C, MA W Y, RYAN C A, et al. Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein-1 activation through a pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, c-Jun N-terminal kinases, and P38 kinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(22): 11957-11962.
- [13] RALLA K, SOHLING U, SUCK K, et al. Separation of patatins and protease inhibitors from potato fruit juice with clay minerals as cation exchangers[J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(13): 1596-1602.
- [14] STRÆTKVERN K O, SCHWARZ J G. Recovery of native potato protein comparing expanded bed adsorption and ultrafiltration[J]. Food Bioprocess Technology, 2012, 5(5): 1939-1949.
- [15] 齐斌, 郑丽雪, 朴金苗. 马铃薯分离蛋白的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 297-300.
- [16] 崔竹梅, 黄海珊, 秦欢欢, 等. 马铃薯蛋白组分的分离提取和功能性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 76-80.
- [17] CHASE H A, DRAEGER N M. Expanded-bed adsorption of proteins using ion-exchangers[J]. Separation Science and Technology, 1992, 27(14): 2021-2039.
- [18] MCCORMICK D K. Expanded bed adsorption-the first new unit operation in decades[J]. Nature Biotechnology, 1993, 11: 1059-1060.
- [19] GIUSEPPIN M L F, van der SLUIS C, LAUS M C. Native potato protein isolates: WO Patent, WO 2008/069650 A1[P]. 2008-06-12.
- [20] STRÆTKVERN K O, SCHWARZ J G, WIESENBOERN D P, et al. Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice[J]. Bioseparation, 1999, 7(6): 333-345.
- [21] STRÆTKVERN K O, AAE OLANDER M, LIHME A. EBA processing of potato fruit water on mixed mode adsorbent for functional protein recovery: adifficult separation task made possible[C]// DOWNSTREAM. Proceedings 4th International Conference on Expanded Bed Adsorption, Florida, USA, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden, 2002: 51-52.
- [22] STRÆTKVERN K O, LØKRA S, OLANDER M A, et al. Food-grade protein from industrial potato starch effluent recovered by an expanded bed adsorption process[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 118: S33.
- [23] LØKRA S, HELLAND M H, CLAUSSEN I C, et al. Chemical characterization and functional properties of a potato protein concentrate prepared by large-scale expanded bed adsorption chromatography[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(6): 1089-1099.
- [24] LØKRA S, SCHÜLLER R B, EGELANDSDAL B, et al. Comparison of composition, enzyme activity and selected functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(4): 906-913.
- [25] POUVREAU L, GRUPPEN H, PERSMA S R, et al. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(6): 2864-2874.