

# 干莲子及其磨皮粉中蛋白质的组成特性比较

王发祥, 贺伟, 李微, 俞健, 李向红, 王建辉, 刘永乐\*

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114)

**摘要:**以凯氏定氮法、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)和体积排阻高效液相色谱(size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)法对比了干莲子与其磨皮粉中蛋白质含量及其亚基组成和分子质量分布。结果表明:干莲子与其磨皮粉蛋白含量分别为188.10、186.54 mg/g;二者水溶性、盐溶性蛋白质组分含量均超过总蛋白的60%,酸溶性、碱溶性蛋白质组分含量均不足总蛋白的23%。干莲子与其磨皮粉蛋白质的SDS-PAGE图谱几乎一致,含量较多的蛋白质亚基分子质量主要集中在15~20 kD和30~50 kD;蛋白质的分子质量分布也高度相似,各组分HPLC洗脱峰基本一致,但莲子蛋白质中酸溶性蛋白的种类较多、碱溶性蛋白的含量较大。本研究表明莲子磨皮粉蛋白质的组成特性与莲子蛋白质基本一致,可以替代莲子用于生产莲子蛋白粉或其他含莲蛋白食品。

**关键词:**莲子; 莲子磨皮粉; 副产物; 蛋白质; 组成; 比较

## Comparison of Composition Characteristics of Proteins in Lotus Seed with Its Peel Waste

WANG Faxiang, HE Wei, LI Wei, YU Jian, LI Xianghong, WANG Jianhui, LIU Yongle\*

(Aquatic Resource Food Processing Engineering Research Center of Hunan Province, College of Chemistry and Biology Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China)

**Abstract:** The contents, subunit compositions and molecular weight distribution of total protein and proteins with different solubility in lotus seed and its peel waste were analyzed using Kjeldahl method, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) and size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography (SEC-HPLC). The results showed that the protein contents of lotus seed and its peel waste were 188.10 and 186.54 mg/g, respectively. They were similar in terms of the composition of proteins with different solubility; water and salt soluble proteins as well as acid and alkali soluble proteins altogether represented more than 60% and less than 23% of the total proteins, respectively. The SDS-PAGE profiles of proteins from lotus seeds and its peel waste showed a high similarity, and the molecular weights of main protein subunits were 15–20 and 30–50 kD. The HPLC elution patterns of total and water soluble proteins in lotus seed and its peel waste were highly similar, indicating similar molecular weight distribution, except that the elution peaks of acid soluble proteins and relative intensity of alkali soluble proteins separated from lotus seeds were more or larger than those from its peel waste. This study proved that the peel waste had similar protein composition characteristics with lotus seed, and could be used as an alternative material for producing lotus seed protein powder or other related foods.

**Key words:** lotus seed; peel waste; by-products; protein; composition; comparison

中图分类号: TS210.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)01-0059-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201501011

莲为多年水生草本植物,是我国特有植物,2012年全国种植面积达150万 亩以上。莲子为莲的成熟种子,自古以来就是公认的老少皆宜的鲜美滋补佳品,除具有镇静、强心、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤等作用外,还是一种营养价值很高的食物,含有丰富的糖类、蛋白质、维

生素及钙、铁、磷等多种人体所必需的矿质元素<sup>[1-5]</sup>。干莲子蛋白质含量平均为17.3%,其氨基酸组成种类齐全,必需氨基酸含量占氨基酸总量的27.8%;每100 g干莲子中含钙89 mg,含磷285 mg,含钾量在所有动、植物食品中位居榜首<sup>[6-7]</sup>。因此,莲子的各类加工产品深受消费者

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B08); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31201427; 31101214); 湖南省自然科学基金项目(12JJ6028)

作者简介: 王发祥(1978—),男,副教授,博士,主要从事食品生物技术研究。E-mail: wfaxiang@163.com

\*通信作者: 刘永乐(1962—),男,教授,博士,主要从事大宗农产品加工技术研究。E-mail: lyle19@163.com

喜爱,具有广阔的市场前景,而莲子的加工率和加工水平也在逐年提高。

莲子表层有一层红色的种皮,会影响莲子产品的外观和口味,目前主要使用机械磨皮的方式脱除。机械磨皮过程中会产生占莲子总质量20%左右的磨皮粉,按全国莲子年产量40万t计算,每年约产生莲子磨皮粉8万t。研究表明,莲子磨皮粉中含有丰富的营养成分,除含有较多的粗蛋白、粗脂肪、碳水化合物、灰分和粗纤维外,此外还含有酚类、鞣质、皂苷、蒽醌、黄酮和生物碱等成分<sup>[8]</sup>。然而,目前相关莲子加工企业对莲子磨皮粉没有充分利用,主要用于生产饲料,有的甚至直接扔掉,造成了极大的资源浪费和环境污染。因此研究莲子磨皮粉的综合利用,对于提高莲子产业的经济效益,保护环境和资源的充分利用都有着重要的实际意义。

一直以来,国内外关于莲子蛋白质的研究较多<sup>[9-11]</sup>,但现有对莲子磨皮粉蛋白质的研究报道,近年来,已有研究者开始关注莲子磨皮粉的综合利用问题,开展了莲子皮中蛋白质、原花青素、果胶多糖等的提取工艺优化等研究<sup>[6,12-14]</sup>,但还停留在初步研究水平,尚需进一步深入。本研究比较了莲子与其磨皮粉中总蛋白质及不同溶解性蛋白组分的含量、亚基组成、分子质量分布等组成本特性,为莲子磨皮粉替代莲子用于生产莲子蛋白粉或其他含莲蛋白食品,实现物尽其用提供理论依据,也对莲子磨皮粉蛋白质的有效利用具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

干莲子为市售普通红皮圆粒湘莲,磨皮粉为其机械磨皮的副产物,均由湖南粒粒珍湘莲有限公司提供。

标准品甲状腺球蛋白、醛缩酶A、牛血清白蛋白、卵清白蛋白、辣根过氧化物酶、腺苷酸激酶、肌红蛋白、核糖核酸酶、抑肽酶、VB<sub>12</sub> 美国Sigma公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 美国Amresco公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

JY-10A多功能粉碎机 浩瀚工贸有限公司;LC20高效液相色谱系统 日本岛津公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 莲子粉及其磨皮粉制备

称取适量(约250g)干莲子于多功能粉碎机中磨粉5min,取出过100目筛备用,即为莲子粉;同样的方法处理莲子磨皮粉备用,即为磨皮粉样品。

#### 1.3.2 莲子磨皮粉基本成分分析

蛋白质含量测定参考GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》测定;淀粉含量测定参考GB/T 5009.9—2003

《食品中淀粉的测定》;粗脂肪含量测定参考GB/T 5009.7—2003《食品中还原糖的测定》;水分含量测定参考GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》。

#### 1.3.3 总蛋白质样品及其不同溶解性组分样品制备及蛋白质含量测定

参考刘永乐等<sup>[10]</sup>最优条件提取莲子粉和磨皮粉的蛋白质,即为莲子和磨皮粉总蛋白质样品。

精确称取约2g莲子粉或磨皮粉样品(精确至0.01g)于50mL的离心管中,加入18mL蒸馏水,均质0.5min,25℃条件下浸提30min,8000r/min离心10min,沉淀再以9mL蒸馏水提取1次,合并两次上清液,即为水溶性蛋白提取液。所得沉淀依次按上述方法分别用盐溶液(0.5mol/L NaCl溶液)、酸溶液(pH 2.0 HCl溶液)、碱溶液(pH 12.0 NaOH溶液)浸提,即得盐溶性蛋白提取液、酸溶性蛋白提取液、碱溶性蛋白提取液。

各蛋白提取液以凯氏定氮法测定其蛋白质含量。

#### 1.3.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gelelectrophoresis, PAGE)分析

分别准确吸取各种蛋白质样品200μL于1.5mLEppendorf管中,加入等体积的2×上样缓冲液,沸水浴5min,10000r/min离心3min,所得上清液即为电泳样品。参考李强等<sup>[15]</sup>的方法以12%的分离胶进行SDS-PAGE分析。

#### 1.3.5 体积排阻高效液相色谱(size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)分析

各种蛋白质样品以0.2mol/L的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)(含2% SDS, pH 7.0)稀释10倍,室温下用磁力搅拌器搅拌10min,10000r/min离心10min,上清液用0.45μm微孔滤膜过滤,备用。参考Liu Yongle等<sup>[16]</sup>的方法,不同蛋白质样品以进行SEC-HPLC分析,上样量为20μL,检测波长220nm;色谱条件为:Shodex KW-804蛋白柱(8.0mm×300mm),紫外检测器,柱温为25℃,流动相为0.2mol/L的PBS缓冲液(含2% SDS, pH 7.0),洗脱速率为1mL/min。

同时以甲状腺球蛋白(669kD)、醛缩酶A(158kD)、牛血清白蛋白(67kD)、卵清白蛋白(43kD)、辣根过氧化物酶(40.2kD)、腺苷酸激酶(32kD)、肌红蛋白(17kD)、核糖核酸酶(13.7kD)、抑肽酶(6.5kD)和VB<sub>12</sub>(1.35kD)为标准品,同样条件下进行SEC-HPLC分析,以保留时间为横坐标,分子质量对数值为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程为: $y=0.5706x+10.596$ ( $R^2=0.9501$ )。根据标准曲线估算样品中蛋白质峰的分子质量大小<sup>[17]</sup>。

#### 1.4 数据统计分析

每组实验进行3次平行,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $\bar{x}$ 和 $s$ 通过Excel软件计算。不同处理间的显著性分析采用DPS数据处理系统以随机区组设计模块中的Duncan's新复极差法进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 莲子磨皮粉中基本营养成分分析

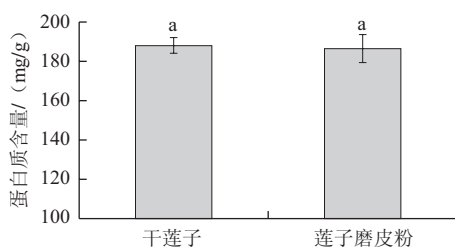
表1 莲子磨皮粉中的主要营养成分含量

Table 1 Major nutritional constituents of peel waste from lotus seed

成分	蛋白质	淀粉	脂肪	水分	其他成分
含量/%	18.65±0.23	40.69±0.21	1.87±0.05	11.23±0.13	27.56

由表1可知,莲子磨皮粉中蛋白含量为18.65%,淀粉含量为40.69%,脂肪含量为1.87%,其他成分为如粗纤维、果胶、灰分等含量为27.56%,可见莲子磨皮粉中含有丰富的蛋白质等营养成分。

### 2.2 干莲子及其磨皮粉中蛋白质含量比较



小写字母相同表示无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

图1 莲子及其磨皮粉蛋白含量分析

Fig.1 Total protein contents in lotus seeds and its peel waste

由图1可知,干莲子的总蛋白质含量为188.10 mg/g,莲子磨皮粉的总蛋白质含量为186.54 mg/g,二者无显著性差异。

### 2.3 干莲子与其磨皮粉中蛋白质组分比较

根据可溶性蛋白质的溶解性,可将其分为水溶性蛋白、盐溶性蛋白、酸溶性蛋白、碱溶性蛋白和醇溶性蛋白5组,其中水溶性蛋白主要为清蛋白,盐溶性蛋白主要为球蛋白,酸溶和碱溶性蛋白主要为谷蛋白。由于干莲子中醇溶性蛋白含量不足0.4%<sup>[18]</sup>,本研究主要对比干莲子与其磨皮粉中其余4组蛋白质组分的含量,结果如表2所示。干莲子蛋白质中水、盐溶性蛋白质总含量超过总蛋白的60%,酸、碱溶性蛋白质总量不足23%,这与唐佩华等<sup>[18]</sup>的结果一致;磨皮粉中蛋白质组成与莲子非常接近,除碱溶性蛋白质含量比干莲子低1.4%外,其他3类蛋白质组分无明显差别。说明莲子磨皮粉可以代替干莲子用作制备莲子蛋白质产品的原料,以提高其附加值。

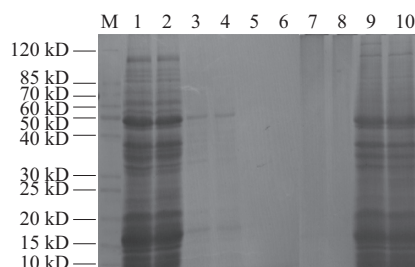
表2 莲子及其磨皮粉中各种溶性蛋白质的含量

Table 2 Contents of proteins with different solubility in lotus seed and its peel waste

类别	干莲子		莲子磨皮粉	
	含量/(mg/g)	占总蛋白质含量比例/%	含量/(mg/g)	占总蛋白质含量比例/%
水溶性蛋白质	95.94±3.94 <sup>a</sup>	51.01±2.17	95.69±4.36 <sup>a</sup>	51.31±2.34
盐溶性蛋白质	20.20±1.69 <sup>a</sup>	10.74±0.90	19.32±2.16 <sup>a</sup>	10.36±1.16
酸溶性蛋白质	8.59±0.67 <sup>a</sup>	4.57±0.36	8.39±1.11 <sup>a</sup>	4.50±0.60
碱溶性蛋白质	33.50±2.45 <sup>b</sup>	17.81±1.35	30.60±1.16 <sup>b</sup>	16.41±0.62
其他蛋白质	—	15.87	—	17.42

注:—,未测定。其他蛋白质占总蛋白质含量比例为100%减去以上4种蛋白质比例之和所得。同行小写字母相同表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 SDS-PAGE结果分析



M. 标准蛋白质; 1. 干莲子水溶性蛋白质; 2. 磨皮粉水溶性蛋白质; 3. 干莲子盐溶性蛋白质; 4. 磨皮粉盐溶性蛋白质; 5. 干莲子酸溶性蛋白质; 6. 磨皮粉酸溶性蛋白质; 7. 干莲子碱溶性蛋白质; 8. 磨皮粉碱溶性蛋白质; 9. 干莲子总蛋白质; 10. 磨皮粉总蛋白质。

图2 莲子及其磨皮粉中总蛋白质及各种可溶性蛋白质的电泳图谱

Fig.2 SDS-PAGE profile of protein samples from lotus seed and its peel waste

由图2可知,干莲子与其磨皮粉中总蛋白质SDS-PAGE图谱非常相似,前者比后者仅多一条大于120 kD的条带,其余可清晰分辨的15~30条蛋白条带几乎完全一致,含量较多的蛋白质主要集中在15~20 kD和30~50 kD;二者水溶性和盐溶性蛋白质组分的SDS-PAGE图谱均没有明显差别,说明二者的亚基组成特性基本一致。由于样品制备时采用了同样的提取条件,盐溶性蛋白质样品中蛋白质条带信号较弱,可能未检测到全部条带<sup>[19-20]</sup>,但同时也说明了其含量相对于水溶性蛋白质较低,这与表2的结果一致;酸溶性、碱溶性蛋白质样品中未检测到条带,除与含量低有关外,也可能与其点样时的pH值条件及溶解性有关。

### 2.5 SEC-HPLC结果分析

体积排阻色谱法又称尺寸排阻色谱法,是按分子大小顺序进行分离的一种色谱方法,被广泛应用于分析大分子物质分子质量的分布。

由图3可知,二者图谱非常相似,最大洗脱峰均出现在9.6 min左右,峰面积约占70%,根据标准曲线计算,分子质量约130 kD,结合SDS-PAGE分析结果(蛋白质亚基分子质量主要在15~50 kD),说明莲子与其磨皮粉

的蛋白质主要以120~130 kD的聚合体形式存在；另外2个峰面积大于10%的洗脱峰保留时间分别为11.3 min和12.6 min，对应分子质量约为14 kD和2.5 kD；此外，保留时间为5.8 min左右时，有一较小的洗脱峰，由于所用色谱柱的洗脱极限为 $10^3$  kD，因此分子质量大于 $10^3$  kD，应该为复杂的蛋白质聚集体<sup>[16]</sup>。

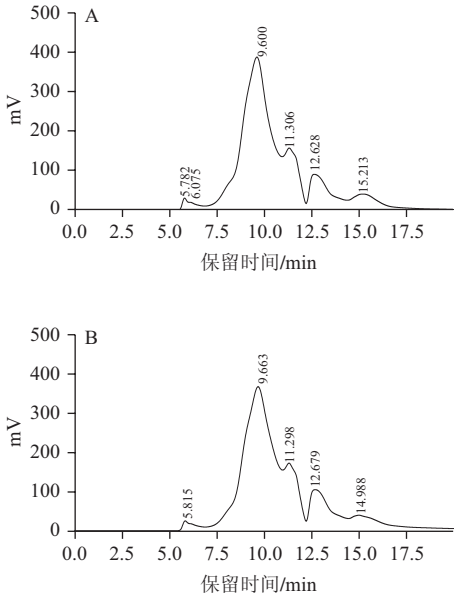


图3 干莲子(A)及其磨皮粉(B)中全蛋白质的HPLC图谱  
Fig.3 HPLC of total protein in lotus seed (A) and its peel waste (B)

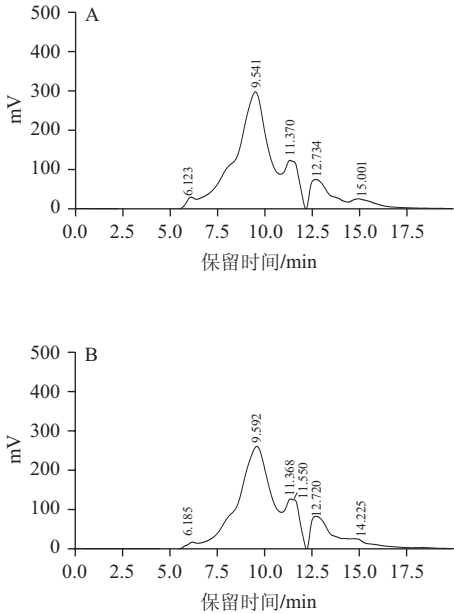


图4 干莲子(A)及其磨皮粉(B)中水溶性蛋白质组分的HPLC图谱  
Fig.4 HPLC of water soluble proteins in lotus seed (A) and its peel waste (B)

水溶性蛋白质的SEC-HPLC色谱图与总蛋白质类似(图4)，干莲子与磨皮粉的蛋白质样品也无明显差异。

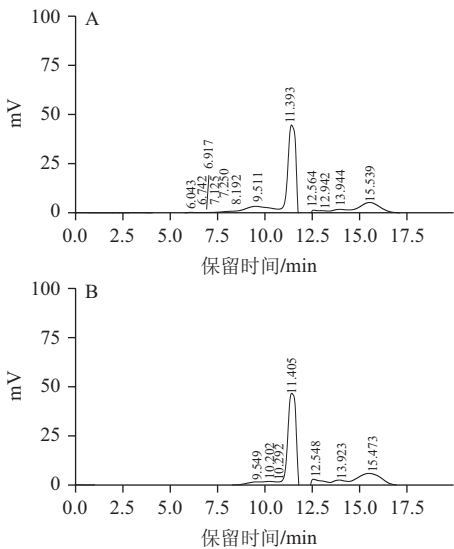


图5 莲子(A)及其磨皮粉(B)中盐溶性蛋白质组分的HPLC图谱  
Fig.5 HPLC of salt soluble proteins in lotus seed (A) and its peel waste (B)

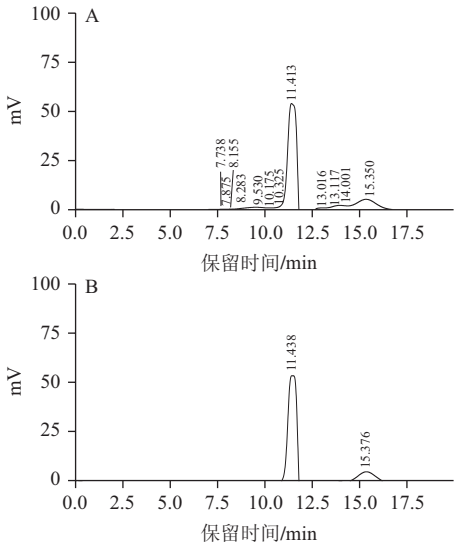
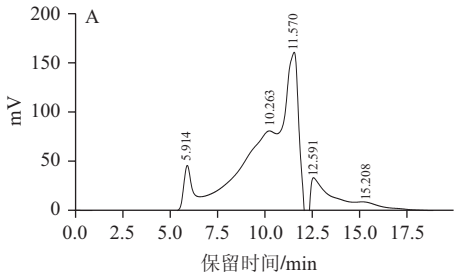


图6 莲子(A)及其磨皮粉(B)中酸溶性蛋白质组分的HPLC图谱  
Fig.6 HPLC of acid soluble proteins in lotus seed (A) and its peel waste (B)

盐溶性和酸溶性蛋白质组分的SEC-HPLC色谱图(图5、6)类似，干莲子与磨皮粉样品均存在一定差异：莲子蛋白质中检测到的峰较多，说明分离到的蛋白质种类稍多，但差异峰的信号都很弱，表明其含量很低；而两种蛋白质样品信号较强的峰(如保留时间11.4 min，对应分子质量约为12 kD)则基本一致。





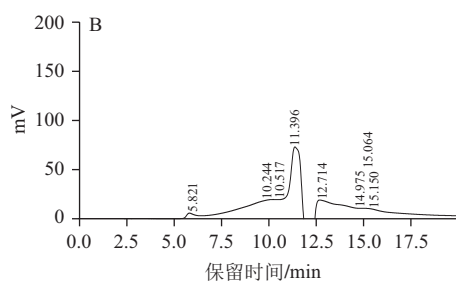


图7 莲子(A)及其磨皮粉(B)中碱性蛋白质组分的HPLC图谱  
Fig.7 HPLC of alkali soluble proteins in lotus seed (A) and its peel waste (B)

由图7可知,干莲子和磨皮粉碱性蛋白质洗脱峰的保留时间基本相同,明显的峰均出现在5.9、10.2、11.5、12.7 min左右(对应分子质量分别为>1 000、60、11、2 kD),但莲子碱性蛋白质中的强度明显较强,说明其含量较大。

### 3 结论

磨皮粉为干莲子机械磨皮的副产物,产量大,淀粉、蛋白质等营养成分丰富,其蛋白质含量为186.54 mg/g,与莲子的蛋白质含量为188.10 mg/g相当;莲子与其磨皮粉中蛋白质的组成非常接近,水溶性、盐溶性蛋白质组分含量超过总蛋白质含量的60%,酸、碱性蛋白质组分含量不足总蛋白质含量的23%,是一种易于消化吸收的优质植物蛋白质。SDS-PAGE分析表明,莲子与其磨皮粉中含量较多的蛋白质亚基分子质量主要集中在15~20 kD和30~50 kD,前者与后者的SDS-PAGE图谱相比仅多一条大于120 kD的条带,其余可清晰分辨的15~20条蛋白带条带几乎完全一致;SEC-HPLC分析表明莲子与其磨皮粉蛋白质的分子质量分布也高度相似,主要蛋白质组分的洗脱峰几乎完全一致,差异主要为莲子蛋白质中酸性蛋白质的种类较多、碱性蛋白质的含量较大。因此,本研究证明莲子磨皮粉中的蛋白质的组成特性与莲子蛋白质非常接近,可以用于替代莲子用于生产莲子蛋白质粉或其他含莲蛋白质食品,为莲子磨皮粉的综合利用和提高其附加值提供了理论依据和实验参考。

### 参考文献:

- [1] 郑宝东, 郑金贵, 曾绍校. 我国主要莲子品种营养成分的分析[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 153-156.
- [2] WU Jinzhong, ZHENG Yuanbin, CHEN Tiqiang. Evaluation of the quality of lotus seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn from outer space mutation[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 540-547.
- [3] MAN Jianmin, CAI Jinwen, CAI Canhui. Comparison of physicochemical properties of starches from seed and rhizome of lotus[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(2): 676-683.
- [4] POORNIMA P, WENG C F, PADMA V V. Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest[J]. Biofactors, 2013, 89(3): 379-385.
- [5] SRIDHAR K R, BHAT R. Lotus: a potential nutraceutical source[J]. Journal of Agricultural Technology, 2007, 3(1): 143-155.
- [6] 徐虹, 王馨仪, 曹杨, 等. 莲子红皮蛋白微波辅助盐提工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 87-91.
- [7] 蔡联辉, 曾虹燕, 王亚举, 等. 莲子蛋白质的氨基酸组成及其营养评价[J]. 营养学报, 2010, 32(5): 503-506.
- [8] 陈轩, 周坚. 莲子皮化学成分的初步分析[J]. 农业机械, 2011(10): 139-141.
- [9] ZENG Hongyan, CAI Lianhui, CAI Xiling, et al. Structure characterization of protein fractions from lotus (*Nelumbo nucifera*) seed[J]. Journal of Molecular Structure, 2011, 1001(1/3): 139-144.
- [10] 刘永乐, 王发祥, 俞健, 等. 响应曲面法优化莲子蛋白质的提取条件[J]. 长沙理工大学学报: 自然科学版, 2012, 9(4): 1-4.
- [11] 张羽, 郑铁松, 陈静. 莲子蛋白质提取工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 144-147.
- [12] 彭芳刚, 李绮丽, 吴卫国. 响应面法优化红莲外皮原花青素的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1349-1354.
- [13] 王超, 李娜, 黄师荣. 红湘莲莲皮粉果胶多糖的提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 146-149.
- [14] 李杨, 周坚, 万盈, 等. 超声波辅助提取莲子皮多糖工艺优化[J]. 粮食与饲料工业, 2011(2): 42-44.
- [15] 李强, 刘永乐, 王发祥, 等. 草鱼肌肉蛋白质在冷藏过程中的变化[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 55-58.
- [16] LIU Yongle, LI Xianghong, ZHOU Xiaoling, et al. Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44: 2205-2210.
- [17] 周小玲, 刘永乐, 李向红, 等. 蛋白质谷氨酰胺酶对米谷蛋白的分子结构及功能性质的影响[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5): 99-105.
- [18] 唐佩华, 姜在阶, 梅楚红, 等. 莲子蛋白的组成、溶性和品质[J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 1998, 34(4): 532-537.
- [19] 张羽. 莲子中蛋白质的分离及其食品功能特性研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2008: 28-30.
- [20] GIORGIERI S, PAÑAK K, DÍAZ L E, et al. Comparative analysis of storage proteins of *Lotus* spp. seeds by CGE and SDS-PAGE[J]. Journal of Capillary Electrophor, 1998, 5(5/6): 177-179.