豌豆蛋白的功能特性研究

梁晗妮，唐传核

（华南理工大学轻工与食品学院蛋白质工程研究中心，广东广州 510640）

摘要：本论文对豌豆球蛋白(7S、11S)和豌豆分离蛋白（PPI）的物化和功能特性进行了分析和比较。结果表明，豌豆球蛋白具有良好的功能特性，其溶解度(PS)、乳化能力、乳化稳定性均显著高于 PPI。荧光光谱和表面疏水性(H_0)分析表明，PPI 是部分变性的蛋白，其制备过程中的酸碱处理导致蛋白分子伸展、H_0增加。DSC 表明，11S 热稳定性比 7S 要高，豌豆分离蛋白和豌豆 7S 出现不同程度的蛋白变性。

关键词：豌豆球蛋白；豌豆分离蛋白；功能特性

文章篇号：1673-9078(2012)12-1640-1644

Study on Functional Properties of Pea Protein

LIANG Han-ni, TANG Chuan-he

(Research and Development Center of Food Proteins, College of Light Industry and Food Sciences ,South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Physicochemical and functional properties of pea globulin (7S, 11S) and pea protein isolate (PPI) were analyzed and compared. The results showed that pea globulin showed excellent functional properties. Its protein solubility (PS), emulsifying ability and stability were much higher than those of PPI. Intrinsic fluorescence spectrum analyses confirmed much loss of tertiary conformation of PPI, which may be attributed to acid and alkaline treatment during PPI preparation resulted in protein denaturation, exposure of hydrophobic groups. DSC showed that thermal stability of 11S was higher than 7 S, and the lower degree of degeneration of the 11S protein. DSC data showed that thermal stability of 11S was higher than 7 S, pea protein isolate and 7S had undergone denaturation.

Key words: pea globulin; pea protein isolate (PPI); functional properties

豌豆(学名 *Pisum sativum* Linn，英文名 pea)，别称：麦豌豆、寒豆、麦豆、雪豆、毕豆、麻累、国豆、蚕豆（吴语）等。原产于地中海南部及地中海沿岸，是一种营养性食品。经常摄入豆类能够降低患糖尿病、癌症、心血管疾病的风险[1]。豌豆种子富含纤维、维生素以及微量和常量元素[2]，特别是含铜、铬等微量元素较多。豌豆所含植物血球凝集素与豆荚含凝集素的作用类似，能凝集人体的红细胞，促进有丝分裂；能激活肿瘤病人的淋巴细胞，产生淋巴毒素，对各种动物细胞有非特异性的伤害作用。因此，豌豆有防治肿瘤的作用[3]。

目前，我国对于豌豆的深加工，主要是利用其中的淀粉制作粉丝，而蛋白一般被用作饲料。随着植物蛋白越来越受到重视，豌豆蛋白在食品加工中可作为食品添加剂替代部分肉蛋白，如火腿肠、香肠等产品的加工，但目前，对于豌豆蛋白质提取以及功能特性研究的文献报道相对较少。因此对于豌豆蛋白的相关功能性质的研究，从而为其找到一条合适的应用途径，这对于豌豆的深加工和综合利用是很有意义的。基于此，本研究对三种豌豆蛋白质-豌豆分离蛋白、豌豆 7S 和 11S 的功能性质进行了比较研究。

收稿日期：2012-07-17

基金项目：国家自然科学基金资助项目（B5091230）

作者简介：梁晗妮（1988-），女，硕士生，主要从事植物蛋白研究

通讯作者：唐传核（1973-），男，副教授，主要从事植物蛋白研究

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆分离蛋白（PPI）、豌豆球蛋白 legumin (11S)、豌豆球蛋白 vicilin (7S)（自制）；大豆色拉油（食品级，市售）；牛血清白蛋白（BSA）（Fitzgeraid 公司）；其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

M-110EH 高压微射流纳米均质机，美国 Microfluidics 公司；F-7000 荧光分光光度计，日本 HITACHI 公司；2501PC 紫外-可见分光光度计，日本岛津公司；CR22G 高速冷冻离心机，日本日立公司；Mastersizer2000 激光纳米粒度测定仪，英国马尔文仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 豌豆分离蛋白、豌豆 legumin 和 vicilin 的制备

豌豆分离蛋白的制备参考 Barac[4]的方法，稍加改动。取 100 g 豌豆粉溶于蒸馏水中[按 1:10（*m*/*V*）的比例]，搅拌 1 h，用 2 M NaOH 溶液调分散液的 pH 值至 9.0，间歇添加 NaOH 溶液以维持溶液的 pH 值，然后离心（8000 ×g，30 min），上清液过 100 目筛收集。调节上清液的 pH 值为 4.5，在 4 ℃下放置 2 h，搅拌后离心（5000 ×g，20 min），弃其上清液，所得沉淀经两次水洗后，复溶于蒸馏水中，用 2 M NaOH 溶液将 pH 值调到 7.5，再次离心取上清液，上清液在 0~4 ℃下透析 48 h，冷冻干燥即得 PPI。

豌豆 7 S 和 11 S 的制备参考 Klassen[5]的方法。取 200 g 豌豆粉溶于磷酸钾缓冲液（50 Mm，pH=7.2，含有 0.5 M NaCl）中[按 1:10（*m*/*V*）的比例]，室温下搅拌 1 h，离心（8000 ×g，20 min），上清液过 100 目筛收集。用 4 ℃的蒸馏水（5V）稀释后，调节稀释液的 pH 值为 4.5，在 4 ℃下放置 2 h。离心（8000 ×g，20 min），沉淀复溶于磷酸钾缓冲液中（5 mL/g），4 ℃下搅拌 1 h，相同的条件下离心，重复两次，收集上清液，4 ℃下透析 2 d 后（透析液为柠檬酸盐-PBS 缓冲液，含有 0.1 M 柠檬酸，0.2 M Na_2HPO_4，0.2 M NaCl，pH=4.8），离心（8000 ×g，20 min），得到的沉淀复溶于磷酸钾缓冲液中，在 0~4 ℃下蒸馏水中透析 48 h，冷冻干燥即得为豌豆 legumin，调节上清液的 pH 值为 4.5，相同条件下离心，得到的沉淀复溶于磷酸钾缓冲液中，在 0~4 ℃下蒸馏水中透析 48 h，冷冻干燥即得为豌豆 vicilin。

1.3.2 SDS-PAGE 分析

根据 Laemmli[6]的方法，在不连续缓冲系统上进行 SDS-PAGE 电泳分析，分离胶和浓缩胶质量分数分别为 14%和 5%。用 SDS-PAGE 样品缓冲液（分别为含有质量分数为 5%的 β-巯基乙醇和不含 β-巯基乙醇的样品缓冲液）配制 8%样品溶液，充分震荡混合均匀，电泳前沸水加热处理 5 min，离心（10000 ×g，10 min）后上样，上样量为 7.5 μL。凝胶电泳于恒定电流下进行，在浓缩胶处电流保持 40 mA，分离胶处增至 80 mA。凝胶染色液采用含有 0.25%的考马斯亮蓝 R-250，脱色液为甲醇、醋酸、水的混合溶液，体积比为：1/1/8。凝胶染色及脱色后，于凝胶成像系统进行成像处理。

1.3.3 热学特性分析(DSC)

称取 2 mg 蛋白样品放入铝盒中，加入 10 μL 10 mmol/L 磷酸缓冲溶液（pH 7.0）压盘。以空铝盒为对照，温度扫描范围：20~120 ℃；升温：5 ℃/min；保护氮气流速：50 mL/min。采用 The universal analyzer 2000 软件计算蛋白质的变性温度（T_d）和变性焓变（ΔH）。

1.3.4 溶解度测定

将三种蛋白样品分别配成 1.0%（*m*/*V*）不同 pH 值的蛋白溶液，pH 范围是：2.0~10.0。采用 Lowry[7]法测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白（BSA）为标准物做标准曲线。蛋白溶解度表示为上清液蛋白浓度占总蛋白浓度的百分比。

1.3.5 荧光光谱分析

采用 RF-5301 PC 荧光分光光度计测定三种蛋白的荧光光谱。蛋白分散于 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)中，蛋白浓度为 0.1 mg/mL。荧光发散光谱分析以蛋白质分子内部的荧光基团为探针，为了降低酪氨酸的影响，荧光光谱在 290 nm 激发，扫描发散光谱为 300~400 nm，激发和发射狭缝宽均为 5 nm。

1.3.6 表面疏水性（H_0）

表面疏水性的测定采用 ANS 荧光探针法。将待测蛋白样品溶于 10 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）中，蛋白质浓度为 1%（*m*/*V*）。向含 4 mL 磷酸缓冲液的塑料离心管分别添加 10、20、30、40 和 50 μL 1%的蛋白质溶液，在测试前添加 20 μL 8 mmol/L ANS 储液，振荡均匀，在 8~15 min 内采用 F4500 荧光分光光度仪检测样品的荧光强度（FI）。激发和发射波长分别 370 nm 和 470 nm，激发和发散狭缝宽均为 5 nm。以相对荧光强度对蛋白质浓度作图，其初始阶段的斜率作为蛋白质的表面疏水性指数（H_0）。

1.3.7 乳化特性测定

乳化特性用乳化能力和乳化稳定性来表征。在测定小烧杯中分别加入 45 mL 1.0% (*m*/*V*)蛋白质溶液（pH 值分别为：3.0、5.0、7.0、9.0）加入 2%的 Na_3N，过夜水化。次日，往蛋白溶液中加入 5 mL 大豆油。用高速分散机 IKA T25 经 10000 rpm 处理 2 min 后，再经过微射流均质机 40 MPa 处理一次。

取 10 mL 乳液置于玻璃管中，以竖直的方式在室温下储藏，记录下不同时间下的清液高度（H_S）和总的高度（H_t）。脂肪上浮率（*CI*）定义为：Creaming index (%)=(H_S/H_t)×100%。

剩余的乳液立即用马尔文粒度分布仪测定油滴的分散粒度，分散系为水。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 分析

图 1 为豌豆分离蛋白、11S、7S 的电泳图谱。7S 是一种不含二硫键的糖蛋白，还原与非还原的电泳图应该具有相似的轮廓，但是图中稍有差别，说明实验

中提取的 7S 为掺杂组分的蛋白。而 PPI 主要由 11S 和 7S 组成，11S 亚基中含有较多的二硫键，因此 PPI 和 11S 在还原和非还原的电泳图上呈现出不同的亚基分布。这与报道[8,9]结果一致：豌豆 11S 球蛋白是六聚体结构，分子量~320 到~380 kDa。成熟的 11S 球蛋白由六对不共价的亚基构成，每对亚基由一个酸性亚基（分子量为~40 kDa）和碱性亚基(分子量为~20 kDa)通过单个二硫键相结合。7S 球蛋白是三聚体结构，分子量~170 kDa，由于缺少半胱氨酸，因此不能形成二硫键。

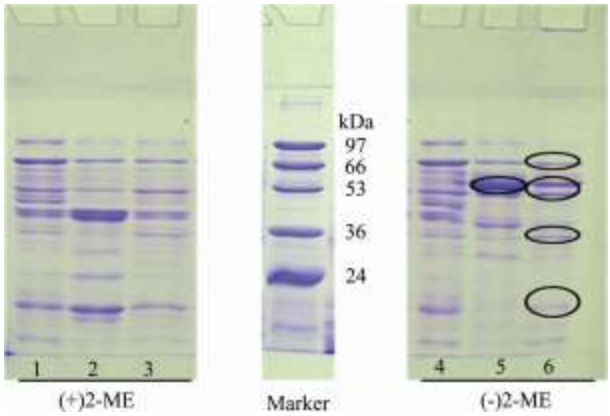


图 1 PPI、Legumin、Vicilin 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of protein (PPI、Legumin、Vicilin)

注：1~3 泳道为 PPI、Legumin（11S）、Vicilin(7S)的还原态谱带；4~6 泳道为 PPI、Legumin、Vicilin 的非还原态谱带。

2.2 DSC 分析

表1 豌豆蛋白的表面疏水性和热性质参数

Table 1 Surface Hydrophobicity (H_0) and Thermal characteristics of pea protein

样品	H_0	热性质参数 DSC			
		T_{d1}/℃	T_{d2}/℃	ΔH_1 (J/g)	ΔH_2 (J/g)
PPI	2734.3	82.1±0.6^a	103±0.9^c	5.319±0.8^c	1.665±1.9^a
7S	1005.1	83.25±0.3^a	-	3.838±0.3^{ab}	-
11S	2075.1	92.34±0.9^b	-	11.955±1.0^c	-

注：H_0 : Surface hydrophobicity of pea protein samples; T_{d1} and T_{d2}: the denaturation temperature of pea protein samples; ΔH: combined enthalpy change of pea protein samples. The symbol '–' represents no detection of thermal transition. Different superscripts (a–c) represent significant difference at $p<0.05$ level among different samples.

豌豆蛋白的热学特性采用 DSC 测定。各样品的热性质参数值如表 1 所示。变性温度（T_d）可反应热稳定性；变性焓值（ΔH），是热吸收峰的积分面积，主要用来反映蛋白的变性程度[10]。在 82 ℃和 103 ℃处 PPI 的 DSC 图谱上有两个峰，分别对应着 7S 和 11S 球蛋白的变性温度；而提取分离出的 7S 和 11S 对应的峰的位置分别在 83 ℃和 92 ℃左右，11S 的热稳定性比 7S 要高，另外从变性焓值可以看出 7S 和 PPI 出现不同程度的蛋白变性，Sirtori[11]报道了相似结论。推测认为这一实验结果与巯基、二硫键在豌豆蛋白中分布有关，11S 中具有二硫键可以起到稳定蛋白构象的作用，而豌豆 7S 由于缺乏含硫氨基酸是一种不含二硫键的蛋白。Kinsella 研究表明，相对而言含有二硫键的蛋白具有较高的热稳定性[12]。

2.3 内源荧光光谱和表面疏水性分析

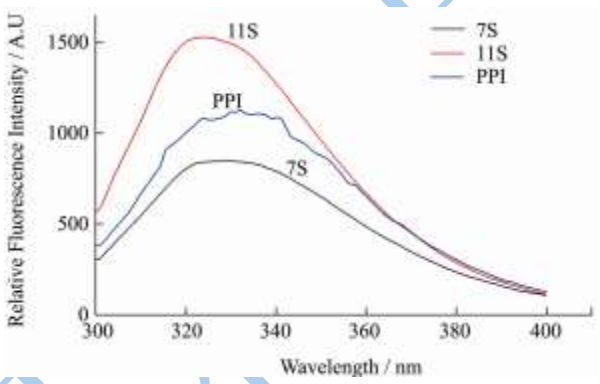


图 2 豌豆球蛋白和分离蛋白内部荧光发射光谱.

Fig.2 Emission fluorescence spectra of pea protein isolate (PPI), pea vicilin (7S) and pea legumin (11S)

ANS 为荧光探针的荧光光谱，用于表征蛋白质水性基团的暴露情况。ANS 是一种对极性敏感的荧光探针，与部分变性的蛋白质分子的疏水基团具有更强的相互作用力，产生增强的荧光发射光谱。ANS 与 PPI，7S，11S 的复合物的荧光峰分别在 329.4 nm，326.2 nm，323.4 nm 处，具有典型的色氨酸残基发射光谱。从图 2 可知，荧光峰强度的顺序为 11S>PPI>7S，表明 11S 的内部疏水基团强于另外两者。而从表 1 可知，三种蛋白的表面疏水性顺序是 PPI>11S>7S，7S 的荧光峰强度与表面疏水性均弱于 11S 和 PPI，这一结果与 pH 7.0 条件下蛋白的溶解度相对应，一般来说，蛋白的表面疏水性越强，亲水性越弱，表现为溶解度较差。

2.4 溶解度

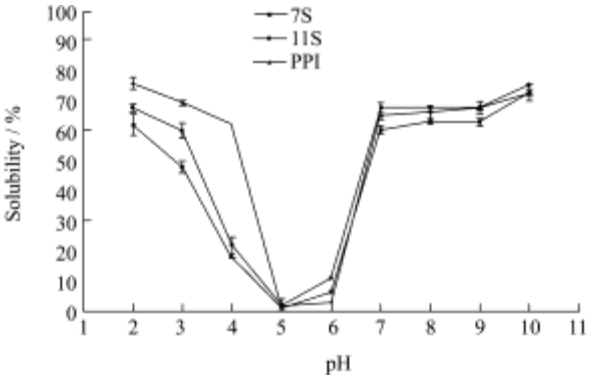


图 3 豌豆分离蛋白、7S、11S 的溶解度-pH 曲线

Fig.3 Protein solubility –pH curve of protein (PPI、7S、11S)

从图 3 可以看出三种蛋白溶解度具有明显的 pH 依赖性，且溶解趋势比较相近。在等电点附近（pH 4~5）,溶解度接近于 0，而在偏离等电点，溶解度迅速增加，原因是偏离等电点增加或减小 pH，使蛋白质表面的静电荷增加，增强了与水的相互作用，提高了蛋白在水相的分散系数，表现为溶解度增加。此外，球蛋白的溶解度高于豌豆分离蛋白，在 pH 2~3 和 pH 7~10 球蛋白的溶解度最高可达到 80%左右，这与 Abaymi[9]报道的商用豌豆蛋白具有类似的溶解特性，但是商用蛋白溶解性稍差。从图中还可以看出豌豆分离蛋白在中性和碱性条件下溶解度相对较高，报道[13]指出这是因为蛋白质分子在碱性条件下，表面的负电荷堆积诱导蛋白构象伸展和疏水性基团的暴露。随后的等电点沉淀过程中，分子间静电排斥力减弱，蛋白分子间通过疏水相互作用等次级作用力而聚集，而在之后的分散过程中蛋白聚集物不能完全的解聚所导致。

2.5 乳化性

蛋白质的乳化特性与其溶解度、表面疏水性和表面电荷分布相关[14]。在蛋白质溶解度较低的情况下，溶解度是决定蛋白质乳化特性的主要因素；而在蛋白质溶解度较高的情况下，表面疏水性是决定蛋白质乳化性的主要因素。

2.5.1 pH 对不同的蛋白乳液乳化能力（油滴的平均粒径）的影响

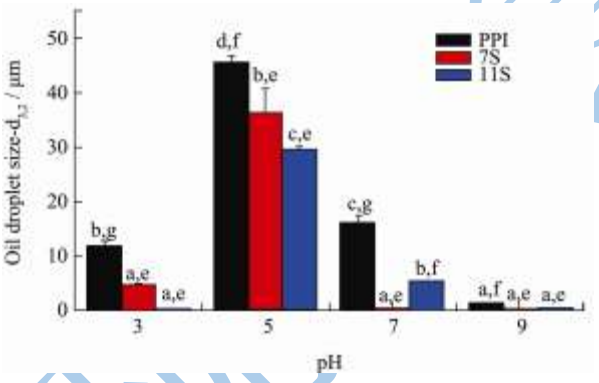


图 4 不同 pH 条件下 PPI、7S、11S 形成乳液中油滴的平均粒径大小

Fig.4 Effect of pH on the emulsifying capacity (oil droplet size) of pea protein isolate (PPI), pea vicilin (7S) and pea legumin (11S) at different pH value

注：不同字母（a~d）表示同一种蛋白乳液，不同 pH 的差异显著性（P<0.05）；不同字母（e~g）表示同一 pH 条件下，三种蛋白乳液的差异显著性（P<0.05）.

如图 4 所示，在等电点附近（pH 为 5）时，三种蛋白乳化能力最差，这可能是因为在等电点时，蛋白分子静电排斥力减弱而聚集，这种折叠起来的结构限制了蛋白分子包裹油滴的能力。乳化能力的大小与三种蛋白在 pH 4~5 范围时溶解性大小成正相关。在远离等点时，乳化活性显著升高。在 pH 3.0 时，11S 的 $d_{3,2}$ 小于 7S，而在 pH 9.0 时，11S 与 7S 的 $d_{3,2}$ 差距较小。这一结果与溶解度相对应，在 pH 3.0 时，11S 溶解度度远远高于 7S，11S 在水中的分散系数较好，有利于蛋白与油相的结合，从而提高蛋白的乳化性能。而在 pH9.0 时，11S 与 7S 的溶解度相差较小，所以乳化活性相似。以上说明豌豆蛋白的乳化活性与溶解度具有正相关性。总体上来说两种球蛋白的乳化能力比豌豆分离蛋白的好。本文发现在蛋白质溶解度较高的情况下(70~80%)，豌豆分离蛋白的表面疏水性指数远远高于豌豆球蛋白(见表 1)，但豌豆分离蛋白的乳化活性却低于豌豆球蛋白，这与尹寿伟[15]报道的关于芸豆蛋白的结果相一致，潜在的机制尚不清楚，推测认为分离蛋白中的小组分弱化其乳化活性。

2.5.2 pH 对不同蛋白乳液的乳化稳定性影响

乳化稳定性是蛋白质乳化性质的评价指标之一，乳液中油滴的凝集会严重的影响乳液的贮藏稳定性。本实验通过脂肪上浮率来表征乳液的乳化稳定性。

表 2 不同 pH 条件下 PPI、7S、11S 形成乳液储藏不同时间的脂肪上浮率

Table 2 Effect of pH on the emulsion stability (Creaming index) of pea protein isolate (PPI), pea vicilin (7S) and pea legumin (11S) at different time.

样品	常温放置(时间)脂肪上浮率 CI/%		
	24 h	3 d	1 week
PPI-3	21.43	57.14	60.0
PPI-5	61.11	62.5	62.5
PPI-7	57.14	58.57	60.0
PPI-9	-	-	30.67
7S-3	-	16.67	18.06
7S-5	56.16	57.53	61.64
7S-7	-	-	-
7S-9	-	-	-
11S-3	-	-	-
11S-5	62.67	64.0	65.33
11S-7	-	18.67	21.33
11S-9	-	-	-

注：-表示没有明显分层现象。

脂肪上浮率越低，乳液的稳定性越好。乳化稳定性变化趋势与乳化能力相一致，在等电点附近具有较低的乳化稳定性，而在中性偏碱性及极端酸性条件下乳化稳定性较好。由表 2 可以看出在 pH 3.0、7.0 和 9.0 处，储藏不同时间时豌豆分离蛋白的脂肪上浮率显

著高于豌豆球蛋白，随着储藏时间的增加，脂肪上浮率呈上升的趋势；在 pH 5.0，三种蛋白乳液在放置第一天就出现明显的分层现象，且具有较高的脂肪上浮率。

3 结论

3.1 豌豆蛋白在等电点区域(pH 4.0~6.0)蛋白质溶解度接近于 0，在中性、碱性和极端酸性(pH 2.0、pH 3.0)条件下，溶解度迅速增加，其中球蛋白的溶解度最高接近于 80%，显著高于分离蛋白(PPI)；

3.2 7S 和 11S 变性温度分别为 83 ℃和 92 ℃左右，11S 的热稳定性比 7S 要高。荧光光谱、表面疏水性分析表明，分离蛋白是部分变性的，其制备过程中的酸碱处理导致蛋白构象改变，疏水性区域暴露。

3.3 在 pH 3.0~9.0，豌豆球蛋白的乳化能力和乳化稳定性显著高于 PPI。在 pH 5.0（等电点附近），三种蛋白的乳化能力与溶解度呈正相关，且乳化能力最低，而偏离等电点区域乳化能力迅速增加。

参考文献

[1] Boye J I, Aksay S, Roufik S, et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques [J]. Food Research International, 2010, 43(2): 537-546

[2] Sandberg A S. Bioavailability of Minerals in Legumes [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88(3): 281-285

[3] 沙金华.豌豆分离蛋白的制备、性质及应用研究[D].江南大学,2009

[4] Miroljub Barac, Slavica Cabrilo, et al. Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (*Pisum sativum*) Genotypes [J]. International Journal of Molecular Science, 2010, 11: 4973-4990

[5] DR Klassen, MT Nickerson. Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides [J]. Food Research International, 2012, 46: 167-176

[6] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 681-685

[7] Lowry OH, Rosembroug HJ, Lewis A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 19: 265-275

[8] Gueguen JCM, Barbot J, Schaeffer F. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength [J]. Science Food Agriculture. 1988, 53: 167-182

[9] Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis [J]. Plant Cell 1995, 7: 945-956

[10] Sathe SK, Salunkhe DK. Solubilization and electrophoretic characterization of the great notthern bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein [J]. Journal of food science, 1981, 46: 82-87

[11] Sirtori E, I Isak, et al. Mechanical and thermal processing effects on protein integrity and peptide fingerprint of pea protein isolate [J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 113-121

[12] Kinsella JE. Relationship between structure and functional properties of food proteins [M]. In:P.F.Fox and J.J.Cowden, Editors, Food proteins, Applied Science Publisher, London 1982

[13] 黄科礼,尹寿伟,杨晓泉.微射流处理对红豆分离蛋白结构及功能特性的影响[J].现代食品科技,2011,27:1062-1065

[14] 李家燕,唐传核.糖苷化对芸豆分离蛋白功能性质的影响[J].现代食品科技,2009,25:584-587

[15] 尹寿伟.芸豆蛋白的物化修饰及相关构效机理研究[D].华南理工大学,2009