

大麻蛋白的营养评价

王显生, 杨晓泉, 唐传核

(华南理工大学轻工与食品学院植物蛋白工程研究中心, 广东 广州 510640)

摘要: 本文以脱脂大麻籽粉为原料, 采用碱溶酸沉法提取大麻分离蛋白 (HPI) 及其 11S 组分 (HPI-11S)、7S 组分 (HPI-7S), 对其进行氨基酸组成分析, 并应用胃蛋白酶-胰蛋白酶体外消化模拟实验评价大麻蛋白的营养价值, 结果表明: 与大豆分离蛋白相比, 大麻蛋白富含人体所需的必需氨基酸, 消化性能更优, 属优质蛋白质。

关键词: 大麻分离蛋白; 氨基酸分析; 体外消化; 大豆分离蛋白

中图分类号: S563.3; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)07-0010-05

Nutritional assessment of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Proteins

WANG Xian-sheng, YANG Xiao-quan, TANG Chuan-he

(Research & Development Centre of Food Protein, College of Food Sciences and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Total hemp protein isolate (HPI) and two major fractions of HPI (HPI-11s and HPI-7s) were extracted from defatted hemp (*Cannabis sativa* L.) flour. Amino acid composition and protein *in vitro* digestibility of HPI, HPI-7s and HPI-11s were analyzed. The results showed that the protein isolates from hempseed are much more nutritional in amino acid nutrition and easily digestible than soybean protein isolate, and can be utilized as a good source of protein nutrition for human consumption.

Key words: hemp protein isolate; amino acid composition; *in vitro* digestibility; soybean protein isolate

大麻籽 (Hempseed) 是桑科植物大麻 (*Cannabissativa* L.) 的种子。大麻可能是首批被人类利用和栽培的植物之一^[1]。由于其具有的精神效应、药用价值以及作为纤维来源和种子作为食物的特性, 在历史上常常是某些地区的重要作物。但是大麻含有致幻成瘾的毒性成分四氢大麻酚 (THC), 易被不法分子用来提炼毒品, 造成社会危害, 因此, 大麻的种植与利用一直受到社会的质疑与否定, 并被列为世界三大毒品之一。在 20 世纪 30 年代中期, 美国立法禁种大麻, 许多国家也随之限制大麻的种植甚至禁种^[2]。自 1980 年代开始, 在对大麻的关注销匿迹半个多世纪后, 以美国和欧盟为代表的发达国家又兴起了研究和开发利用低毒工业大麻 (THC<0.3%) 的热潮, 重新开始了对低毒大麻开发利用。1992 年法国成功地培育试种了低毒大麻新品种。以欧美为首的大麻研究学会和工商团体, 纷纷向政府申请解除禁止种植大麻的禁令, 允许生产工业用大麻。同时世界上也出现了许多大麻生产、加工集团。我国云南省也培育成功了低毒品种“云麻 1 号”, 并成立了云南工业用大麻有限公司^[3]。

大麻籽中蛋白质含量为 20%~25%, 是一种优质

蛋白质来源。本文以大麻蛋白为原料, 采用体外胃蛋白酶-胰蛋白酶复合酶体系, 通过模拟人体胃肠消化环境的消化模型, 分析了大麻分离蛋白 (HPI) 及其 11S 组分 (HPI-11S) 和 7S 组分 (HPI-7S) 的体外消化率, 结合氨基酸评分, 并以 SPI 为对照评价了大麻蛋白的营养价值。

1 材料与方法

1.1 原料与酶制剂

低温脱脂大麻籽粉: 由云南工业大麻有限公司提供, 为经去壳、CO₂ 超临界萃取脱脂后制成的粉末。SPI: 自制, 制备方法参考文献^[4]。胃蛋白酶: Sigma 分装, 效价 1:10000; 胰蛋白酶: Sigma 分装, 效价 1:250。

1.2 仪器、试剂

HHS 型电热恒温水浴锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 凯氏定氮仪 (瑞士 Büchi 公司); 冷冻离心机 (日本 Hitachi 公司); ALPHA1-4 冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); DYCZ-30 型电泳槽 (北京六一仪器厂); ECP3000 三恒电泳仪 (北京六一仪器厂); Versa Dco 凝胶扫描系统 (Bio-Rad 公司)。所用试剂均为分析纯。低分子量标准蛋白 (上海升正生物技术有限公

收稿日期: 2007-05-10

基金项目: 自然科学基金重大项目 (20436020)

司): β -半乳糖苷酶 (116.0 kDa), 牛血清白蛋白 (66.2 kDa), 卵清蛋白 (45.0 kDa), 乳酸脱氢酶 (35.0 kDa), 限制性内切核酸酶 (25.0 kDa), β -乳球蛋白 (18.4 kDa), 鸡蛋清溶菌酶 (14.4 kDa)。

1.3 方法

1.3.1 HPI、HPI-11S 和 HPI-7S 的制备

HPI 的制备文献^[5]方法, HPI 的 11S 组分 (HPI-11S)、7S (HPI-7S) 组分的制备过程如下。

脱脂大麻粉→加入 20 倍(m/v)的 pH 9.0 的去离子水并搅拌 1.5 h→离心 (8000 r/min, 30 min, 4 °C)→上清液→调至 pH 6.4, 4 °C 过夜→离心 (6500 r/min, 20 min, 4 °C)→沉淀→洗涤、中和、预冻→低温真空干燥→11S 组分(HPI-11S)

$$\frac{E}{T} \% = \frac{Ile + Leu + Lys + Met + Cys + Phe + Tyr + Thr + Val + His}{Ala + Asp + Arg + Gly + Glu + Ile + Leu + Lys + Met + Cys + Phe + Tyr + Pro + Ser + Thr + Val + His} \times 100\%$$

并将氨基酸组成与 FAO/WHO 推荐的必需氨基酸需要量模式比较, 计算出其氨基酸评分 (AAS)。

1.3.5 体外消化

大麻蛋白的体外消化实验根据 Chavan 等^[8]和 Nunes 等^[9]报道的体外消化模型进行, 具体操作步骤如下: 取适量蛋白样品溶于 pH 1.5 的 HCl 溶液形成 1%(w/v)的分散液, 置于 37 °C 水浴锅中预热 3~5 min, 然后加入适量的胃蛋白酶进行酶解。分别在不同消化时间 (0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min 和 120 min) 取样待测, 所取的样品用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 中止消化反应。胃蛋白酶消化结束 (120 min) 后, 调节 pH 至 7.0, 加入适量的胰蛋白酶再消化 120 min, 期间在不同消化时间 (0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min 和 120 min) 取样进行 SDS-PAGE 和不溶性氮含量的测定。

1.3.6 氮释放量 (%) 的测定 (TCA-NSI 法)

蛋白消化过程中释放的可溶性氮根据 Ge^[10]采用的方法稍加改动后测定。取 10 mL 不同消化时间的样品溶液加入 10 mL 10% TCA, 静置 30 min 后离心, 弃去上清液, 沉淀部分再用 10 mL 10% TCA 洗涤, 再次离心, 弃去上清液即得 TCA 不溶组分, 然后测定其中的氮含量。消化过程中氮释放量 (%) 按下式计算:

$$\text{氮释放量} (\%) = \frac{N_0 - N_t}{N_{tot}} \times 100\%$$

其中, N_t - 消化 t min 时的 TCA 不溶性氮(mg); N_0 - 蛋白

离心所得上清液→纯水稀释 1 倍, 调 pH 至 4.8→离心 (6500 r/min, 30 min, 4 °C)→沉淀→洗涤、中和、低温真空干燥→7S 组分 (HPI-7S)

1.3.2 化学成分分析

水分的测定, 直接干燥法^[6]; 灰分的测定, 干法灰化^[6]; 脂肪的测定, 索氏抽提^[6]; 蛋白质的测定, 参见 GB/T5009.5-03: 微量凯氏定氮法^[6]。

1.3.3 SDS-PAGE

采用 SDS-PAGE 不连续缓冲系统进行电泳^[5,6]。

1.3.4 氨基酸分析

按照文献^[7]方法进行氨基酸分析, 并采用 Chavan 等^[8]报道的方法计算必需氨基酸比重:

样品中的 TCA 不溶性氮(mg); N_{tot} - 蛋白样品中的总氮量(mg)。

2 结果与讨论

2.1 HPI、HPI-11S 和 HPI-7S 的化学成分

根据等电点不同而制备的四种蛋白样品的基本化学成分分析结果见表 1。

表 1 HPI, HPI-7S, HPI-11S 和 SPI 的化学成分 (n=2)

Table 1 Proximate compositions of HPI, HPI-7S, HPI-11S and SPI (n=2)

Constituents %	HPI	HPI-7S	HPI-11S	SPI
Protein	90.5±0.71	87.6±0.28	93.0±0.38	92.7±0.19
Moisture	2.79±0.12	2.85±0.05	2.61±0.01	2.89±0.04
Ash	2.38±0.01	3.91±0.01	2.54±0.03	2.63±0.01
Fat	0.36±0.17	0.32±0.07	0.41±0.03	0.42±0.42

从表 1 可以看出, HPI 含蛋白质 90.53%, 水分 2.79%, 灰分 2.38%, 还有少量其他物质 (可能是碳水化合物)。HPI 的化学成分与 SPI 相似。三种大麻蛋白中, HPI-11S 的纯度最高, 蛋白质含量为 93.02%, HPI-7S 的纯度最低, 蛋白质含量仅为 87.67%, 这可能是因为其灰分含量最高及与其结合的碳水化合物更多。四种蛋白质的水分含量均在 2.6%~2.9% 间, 油脂含量都极低, 为 0.32%~0.42%。

2.2 氨基酸分析

决定蛋白质营养价值的不只是其含量的高低, 还包括必需氨基酸含量的高低及其比例。表 2 中数据表明, HPI 富含谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸、亮氨酸。

表 2 HPI, HPI-7S, HPI-11S 和 SPI 的氨基酸组成(g/100 g 蛋白质)

Table 2 Amino acid compositions of HPI (including HPI-11S and HPI-7S) and SPI (g/100 g protein)

Amino acids	HPI	HPI-7S	HPI-11S	SPI	FAO/WHO suggested requirements (2-5 year old)
Ile *	3.99 ± 0.08	3.09 ± 0.21	3.30 ± 0.14	4.35 ± 0.11	2.8
Leu *	6.63 ± 0.23	6.17 ± 0.46	6.49 ± 0.27	6.79 ± 0.83	6.6
Lys *	4.16 ± 0.87	3.32 ± 0.25	3.36 ± 0.15	5.23 ± 0.01	5.8
Met *	1.39 ± 0.06	1.50 ± 0.13	2.36 ± 0.12	0.92 ± 0.07	
Cys	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.05 ± 0.00	
Tyr	3.67 ± 0.23	2.95 ± 0.22	3.34 ± 0.15	3.61 ± 0.18	
Phe *	4.57 ± 0.11	4.03 ± 0.31	4.03 ± 0.14	5.14 ± 0.58	
Thr *	4.57 ± 0.35	3.99 ± 0.32	4.01 ± 0.16	3.98 ± 0.13	3.4
Val *	4.98 ± 0.13	4.30 ± 0.32	4.26 ± 0.18	4.28 ± 0.32	3.5
His *	2.81 ± 0.47	3.13 ± 0.22	3.31 ± 0.20	2.81 ± 0.24	1.9
Trp	Not determined				1.1
Asp	9.41 ± 0.39	8.76 ± 0.59	8.82 ± 0.27	11.47 ± 0.71	
Glu	16.14 ± 0.26	15.88 ± 1.19	16.66 ± 0.43	20.67 ± 0.83	
Ser	5.18 ± 0.02	5.53 ± 0.41	5.34 ± 0.41	5.32 ± 0.09	
Gly	3.99 ± 0.06	3.83 ± 0.23	3.88 ± 0.13	3.74 ± 0.27	
Arg	9.91 ± 0.91	7.60 ± 0.59	9.35 ± 0.15	7.35 ± 0.35	
Ala	4.50 ± 0.36	4.27 ± 0.35	4.24 ± 0.06	3.72 ± 0.06	
Pro	4.53 ± 0.39	4.42 ± 0.37	4.31 ± 0.04	5.13 ± 0.33	

Total sulphur-containing amino acids (Met and Cys)	1.55	1.67	2.58	0.96	2.5

Total aromatic amino acids (Phe and Tyr)	8.43	6.97	7.37	8.75	6.3

Total essential amino acids **	37.12	32.64	34.69	37.15	32.8

Total non-essential amino acids	53.67	50.29	52.6	57.40	

E/T (%) ***	45.16	42.38	44.90	42.72	

* Essential amino acids. ** Total essential amino acids exclude the amino acid Trp. *** The proportion of essential amino acids to the total amino acids.

这与 Callaway^[11]的报道一致, 杨永红等^[4]对大麻果实中氨基酸的分析结果也表明谷氨酸含量最高。就必需氨基酸含量而言, HPI, HPI-7S 和 HPI-11S 中的异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸含量均低于 SPI, 其余的则相当或较高。值得注意的是, 虽然含硫氨基酸(蛋氨酸和半胱氨酸)在检测过程中由于 HCl 的水解作用会有所损失, HPI, HPI-7S 和 HPI-11S 中

含硫氨基酸仍然显著远高于 SPI 中的含量。这可能与大麻种子中存在一种富含蛋氨酸和半胱氨酸的蛋白有关。不过, 含硫氨基酸还是大麻蛋白的第一限制氨基酸, 这与大豆蛋白及其他许多植物种子蛋白一样^[12]。从必需氨基酸比重(E/T)来看, HPI 和 HPI-11S 都要高于 SPI。

鉴于学龄前儿童由于生长发育对营养的大量需求

及肠胃功能尚未完善,其必需氨基酸有九种:苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸和组氨酸。精氨酸和半胱氨酸对八个月以下婴儿也属必需氨基酸^[13]。与 1985 年 FAO/WHO 建议的学龄前儿童(2~5 岁)必需氨基酸需要量模式相比,HPI 中只有赖氨酸和含硫氨基酸含量过低,除此之外皆能达到标准。值得注意的是四种蛋白质中,只有 HPI-11S 的含硫氨基酸含量达到了标准。

2.3 体外模拟消化

2.3.1 消化过程的 SDS-PAGE 分析

胃蛋白酶—胰蛋白酶体外模拟人体消化 HPI, HPI-7S, HPI-11S 和 SPI 过程中反映亚基降解情况的 SDS-PAGE 图谱如图 1 和图 2 所示。由图 2 可以看出,在胃蛋白酶消化阶段,SPI 的 11S 组分(酸性亚基和碱性亚基)极易被消化,而 7S 组分则相对较难。在大豆蛋白与胃蛋白酶接触的 1 min 内,其 11S 组分即几乎被完全裂解,形成分子量低于 10 kDa 的寡肽(图 2,泳道 2)。SPI 的 7S 组分各亚基(α' 、 α 和 β 亚基)被胃蛋白酶消化的难易程度有所不同,其中 α' 和 β 亚基几乎不被胃蛋白酶消化,而 α 亚基在消化 30 min(图 1,泳道 5)时开始部分被降解,至胃蛋白酶消化末期则已被完全降解(图 1,泳道 7)。HPI 的消化情况与 SPI 的 11S 组分有些相似,也是在消化开始的 1 min 内即几乎全部裂解,生成 1 条分子量约为 15.5 kDa 的多肽及大量分子量低于 10 kDa 寡肽(图 1,泳道 14),只是在酸性亚基和碱性亚基处还有微量蛋白未被降解,但这部分蛋白在随后的 5 min 内也被完全裂解。15.5 kDa 的多肽也在消化的 0.5 h 至 1 h 内继续被降解成分子量低于 10 kDa 寡肽(图 1,泳道 18)。HPI-11S 的消化情况与 HPI 的颇为相似,也是在消化开始的 1 min 内即全部裂解,生成 1 条分子量约为 15.5 kDa 的多肽及大量分子量低于 10 kDa 寡肽(图 2,泳道 2),该 15.5 kDa 的多肽也是在消化的 0.5 h 至 1 h 内继续被降解成分子量低于 10 kDa 寡肽(图 2,泳道 6)。HPI-7S 的情况也有点类似,不同的只是产生的 15.5 kDa 的多肽在消化的 0.5 h 内就已被降解成分子量低于 10 kDa 寡肽(图 2,泳道 17)。

在随后的胰蛋白酶消化阶段,SPI 的 7S 组分继续被降解,但程度不大,而且产生了 1 条分子量约为 35 kDa 的带。HPI, HPI-11S 和 HPI-7S 的消化情况一样,都是在胃蛋白酶消化阶段产生的小分子量寡肽被继续裂解成分子量更小(已经难以染色或跑出分离胶)的寡肽。

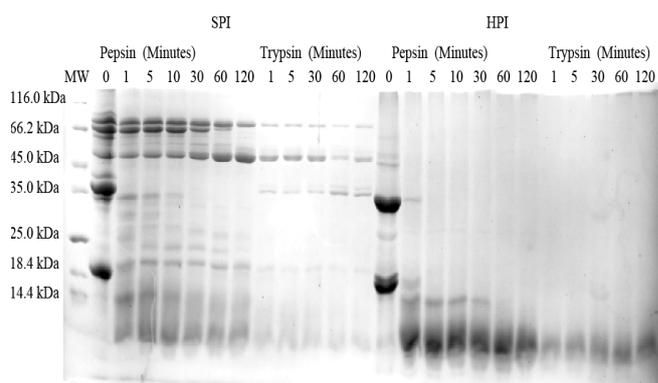


图 1 HPI 和 SPI 体外消化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE profiles for SPI and HPI digested with sequential pepsin and trypsin.

Note: Lanes 1-7: SPI digested by pepsin for 0, 1, 5, 10, 30, 60 and 120 min respectively; Lanes 8-12: the SPI pepsin-hydrolysate further digested by trypsin for 1, 5, 30, 60 and 120 min respectively; Lanes 13-19: HPI digested by pepsin for 0, 1, 5, 10, 30, 60 and 120 min respectively; Lanes 20-24: the HPI pepsin-hydrolysate further digested by trypsin for 1, 5, 30, 60 and 120 min respectively. MW, protein molecular weight markers

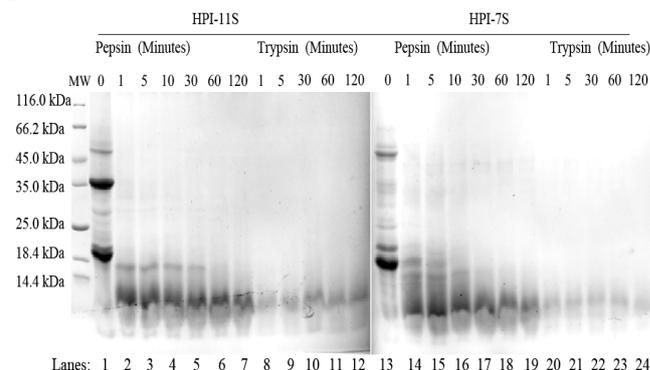


图 2 HPI-11S 和 HPI-7S 体外消化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE profiles for HPI-11S and HPI-7S digested with sequential pepsin and trypsin

Note: Lanes 1-7: HPI-11S digested by pepsin for 0, 1, 5, 10, 30, 60 and 120 min respectively; Lanes 8-12: the HPI-11S pepsin-hydrolysate further digested by trypsin for 1, 5, 30, 60 and 120 min respectively; Lanes 13-19: HPI-7S digested by pepsin for 0, 1, 5, 10, 30, 60 and 120 min respectively; Lanes 20-24: the HPI-7S pepsin-hydrolysate further digested by trypsin for 1, 5, 30, 60 and 120 min respectively. MW, protein molecular weight markers

2.3.2 消化过程的可溶性氮释放分析

蛋白体外消化过程中的可溶性氮释放变化情况可以补充 SDS-PAGE 结果反映蛋白质被消化的情况。如图 3 所示,在胃蛋白酶消化阶段,四种蛋白质的可溶

性氮释放量增加趋势相似,都是在消化的起始阶段(0~30 min)急剧增加,然后增加趋缓,直到胃蛋白酶消化结束而到达最大值。在胃蛋白酶消化 90 min 之前, SPI 的可溶性氮释放量一直显著高于大麻蛋白,这可能是由于大麻蛋白溶解性低使得胃蛋白酶作用位点暴露程度不如 SPI 所致。

在进一步的胰蛋白酶消化阶段,四种蛋白质的可溶性氮释放量的变化发生了分化。在最初的 30 min 内, HPI 和 HPI-11S 的可溶性氮释放量分别由 63.5% 和 67.1% 激增至 83.3% 和 81.9% 之后则增速降低但趋势一样,至消化结束时分别到达 90.8% 和 91.4%。HPI-7S 的可溶性氮释放量在前面的 90 min 内只增加了 12.8%,而在消化结束前 0.5 h 内却增加了 12.0%,原因尚不清楚。SPI 在整个胰蛋白酶消化阶段的可溶性氮释放量增速缓慢,由最初的 63.6% 只增加到 71.0%,虽然在次阶段 SPI 的 7S 组分有部分降解,但其对可溶性氮释放的贡献却不大,而且胰蛋白酶还可能受到 SPI 中存在的胰蛋白酶抑制剂的抑制作用^[14]。结合 SDS-PAGE 分析结果,可以认为,大麻蛋白比大豆蛋白更容易被消化。

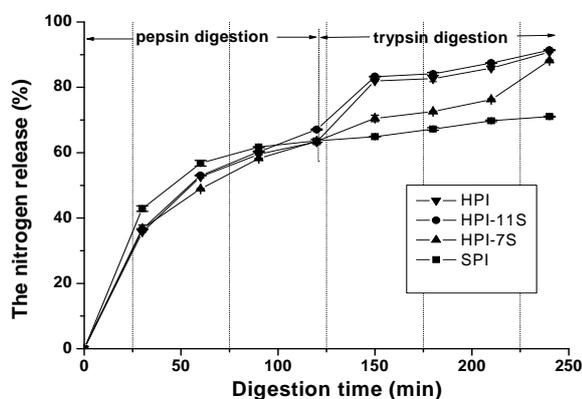


图 3 HPI, HPI-7S, HPI-11S 和 SPI 体外消化过程中氮释放量(%)的变化

Fig.3 The % nitrogen release of HPI, HPI-11S, HPI-7S and SPI during pepsin and subsequent trypsin digestion

Note: The error bars indicate the standard deviations of duplicate measurements

参考文献

- [1] Schultes R.E. Man and marijuana [J]. *Natural History*, 1973, 8:59-82
- [2] 张勇安. 美国大麻政策研究[D].上海:复旦大学,2005
- [3] 郭鸿彦,杨明,谢晓慧,等.云南工业大麻产业化发展前途广阔[J].*中国麻业*,2002 24(4): 46-49
- [4] 王显生,麻浩,向世鹏,等.不同 SDS-PAGE 分离胶浓度下大豆贮藏蛋白亚基的分辨效果[J].*中国油料作物学报*, 2004, 26: 75-80
- [5] Chuan-He Tang, Zi Ten, Xian-Sheng Wang, *et al* Physico-chemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 (23): 8945-8950
- [6] Meng G.-T. Ma C.-Y.. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin[J]. *Food Chemistry*, 2001, 23: 453-460
- [7] Bildngmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L., *et al*. A new, rapid, high sensitivity analysis of amino acid in food type samples[J]. *Journal of Association Official Analytical Chemistry*, 1987, 70(2): 241-247
- [8] Chavan U.D., McKenzie D.B., Shahidi F. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) [J]. *Food Chemistry*, 2001, 74: 177-187
- [9] Nunes A., Correia I., Barros A., *et al*. Sequential in Vitro Pepsin Digestion of Uncooked and Cooked Sorghum and Maize Samples[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(7): 2052-2058
- [10] Ge S.J., Bai H., Yuan H.S., *et al*. Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor[J]. *J. Biotechnol.*, 1996, 50: 161-170
- [11] Callaway J.C., Hempseed as a nutritional resource: An overview [J]. *Euphytica*, 2004, 140: 65-72
- [12] Baldi G., Salamini F. Variability of essential amino acid content in seeds of 22 *Phaseolus* species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1973, 43:75-78
- [13] Chau C.F., Cheung C.K., Wong Y.S. Chemical composition of three underutilized legume seeds grown in China [J]. *Food Chemistry*, 1998, 61, 505-509
- [14] Roychaudhuri R., Sarath G., Zeece M., *et al*. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsininhibitor [J]. *Arch Biochem. Biophys.*, 2003, 412: 20-28

常吃甜食易长白发

美国科研人员发现,50岁左右的女性吃甜食过多,会加速细胞的老化,还会催生白发。这是因为糖属于酸性食品,大量吃糖,会使体液碱度变成中性或弱酸性,促使细胞衰老,导致头发变黄变白。