

菜豆凝集素的灭活研究

姚云艳¹, 王静^{2,*}, 曹维强³

(1.东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030;2.中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,北京 100081;3.惠州出入境检验检疫局,516001)

摘要:菜豆凝集素(PHA)是一种能使动物红细胞凝集的蛋白质,是菜豆中毒主要的致毒物。本文旨在研究 PHA 的灭活方法,分别用湿热、酸碱和金属离子 3 种方法处理 PHA, 研究理化处理对 PHA 活力的影响。研究表明, 95℃、40min, 100℃、30min 或 105℃、10min 的湿热处理, 可使 PHA 的活力完全丧失。在 pH1.0~5.0 或 pH9.5~13.0 的范围内提取菜豆蛋白质, 可使 PHA 活力显著丧失。菜豆蛋白质抽提液中加入三价金属离子和部分二价、一价金属离子也可显著降低 PHA 的活力。

关键词:菜豆, 凝集素, 活力

Abstract: Kidney bean protein (PHA) is one kind of protein which can agglutinate animal's erythrocyte. It is the main toxin in kidney bean poisoning. The purpose of this article was to study the methods of PHA inactivation. Dry-heating, humid-heating, acid-alkali treatment and metal ions were applied to evaluate their effects on the activity of PHA. The experimental results indicated that humid-heat (95℃ for 40min, 100℃ for 30 min or 105℃ for 10 min) completely inactivated the PHA. The activity of PHA significantly decreased when bean protein was extracted under pH1.0~5.0 or pH9.5~13.0. Trivalent and some bivalent or mono-valent metal ions markedly inhibited the activity of PHA.

Key words: kidney bean; hemagglutinin; activity

中图分类号: TS255.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2006)11-0159-03

菜豆是世界很大一部分人口的日粮蛋白质的重要资源, 近些年来在文献报道中出现了很多因摄食生的和烹调不充分的菜豆而引起中毒的报道^[1]。菜豆中毒的原因至今尚无全面阐述, 据研究报道, 其主要致毒物为血细胞凝集素(haemagglutinin)^[2]。菜豆中的血细胞凝集素(*Phaseolus vulgaris*, 简称 PHA)是植物界中广泛存在的一类能够可逆地结合到特异单糖或

多糖上的蛋白质, 其相对分子量为 126~136kDa, 含有 4 个亚基, 每个亚基都有一个与糖结合的部位^[3]。PHA 的毒性主要表现在它可以和小肠细胞表面的特定部分发生结合作用^[4], 而这种结合可对肠细胞的生理功能产生明显的不良影响, 损害胃肠细胞从胃肠道中吸收蛋白质、糖类等营养成分的功能, 从而导致营养素缺乏, 生长抑制。因此, 对 PHA 的灭活研究迫在眉睫。由于 PHA 具有罕见的稳定性^[5], 其对干热钝化处理有抗性^[6,7], 干热处理对 PHA 的活力影响较小, 故本研究重点探讨了湿热、酸碱和金属离子三种处理对 PHA 活力的影响, 旨在为菜豆食用的安全方面提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菜豆 黑龙江产, 品种为将军油豆; 兔血 采自本实验室自养的兔子, 以生理盐水洗涤 3 次, 配制成浓度为 2% 的红细胞悬浮液, 置于 4℃ 备用; 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质浓度测定 考马斯亮蓝法。

1.2.2 PHA 活力测定 取适量待测样品, 用植物高速粉碎机粉碎后, 用 0.85% 的生理盐水 4℃ 下浸提, 冰箱中过夜, 然后于 4℃ 下以 12000r/min 冷冻离心 30min, 收集上清液。在微量 V 型血凝板上按文献方法^[8]进行活力测定。以产生 50% 血凝作用所需的最低蛋白质微克数为一个 PHA 单位活力(hemagglutination unit, HU), 则 PHA 活力表示为每克菜豆抽提液中的总蛋白数除以 PHA 单位活力^[9]。

1.2.3 湿热处理 在恒温箱中, 选用 70、75、80、85、90、95、100、105℃ 共 8 个温度梯度和 10、20、30、40、50、60min 6 个时间梯度对抽提液进行湿热处理后, 再进行蛋白质浓度和 PHA 活力测定, 并以初始 PHA 活

收稿日期: 2006-02-07 *通讯联系人

作者简介: 姚云艳(1980-), 女, 硕士, 研究方向: 食品营养、安全与检测。

力为 100 作对照进行比较。

1.2.4 酸碱处理 配制 pH1.0~13.0、级差为 0.5pH 的系列缓冲液,将样品与缓冲液以 1:6 比例混合,在不同 pH 下于 4℃ 下抽提过夜,12000r/min 冷冻离心 30min 后,各取上清液进行蛋白质浓度和 PHA 活力测定,并以初始 PHA 活力为 100 作对照进行比较。

1.2.5 金属离子处理 在上清液中分别加入 $AlCl_3$ 、 $FeCl_3$ 、 $ZnCl_2$ 、 $Pb(NO_3)_2$ 、 $FeSO_4$ 、 $CuCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $AgNO_3$ 、 KCl 共 10 种金属盐溶液,使其中的金属离子浓度为 0.01mol/L,在室温静置 1h,再进行蛋白质浓度和 PHA 活力测定,并以初始 PHA 活力为 100 作对照进行比较。

2 结果与讨论

2.1 菜豆初始 PHA 的活力

实验测得菜豆初始 PHA 的活力为 7635HU/g,具有很高的凝血及抗营养活性。因此,摄食生的或未煮透的菜豆能够使动物机体不能正常地消化吸收蛋白质,从而抑制动物的生长与代谢,甚至引起机体中毒或生长缓慢^[10]。

2.2 湿热处理对 PHA 活力的影响

不同时间和温度湿热处理对 PHA 活力的影响见表 1。

表 1 湿热处理对 PHA 活力的影响

温度 (℃)	处理时间 (min)						
	0	10	20	30	40	50	60
70	100	82.2	70.3	65.5	57.9	51.6	47.7
75	100	75.6	63.1	56.2	50.0	45.3	39.2
80	100	63.3	55.5	47.9	42.2	37.8	32.2
85	100	52.7	45.1	39.8	35.6	31.4	27.9
90	100	41.0	36.6	31.5	27.8	19.2	12.3
95	100	32.1	18.7	10.5	0.0	0.0	0.0
100	100	16.5	11.2	0.0	0.0	0.0	0.0
105	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

从表 1 中可知,菜豆提取物经湿热处理后,其 PHA 活性降低较明显。在同一温度下,随着处理时间的增加,PHA 的活性明显降低;在同一处理时间下,随着温度的升高,PHA 活性也明显降低。表明 PHA 的失活随时间累加,而较高温度有利于减少失活时间。在 95℃、40min,100℃、30min 或 105℃、10min 以上时 PHA 的活力完全丧失,并且在这些条件下处理菜豆中的蛋白质,也不致于过度变性而影响其营养价值。因此,湿热处理可以作为灭活 PHA 的有效方法。

2.3 pH 对 PHA 活力的影响

pH 对 PHA 活力的影响见图 1。

由图 1 可知,在 pH5.5~9.0 的范围内,PHA 的活力基本保持不变。在 pH 高于 9.0 时,PHA 的活力急速下降,当 pH 为 11.5 时,PHA 的活力完全丧失。在 pH 低于 5.0 时,由于兔红细胞发生溶血,不能直接测

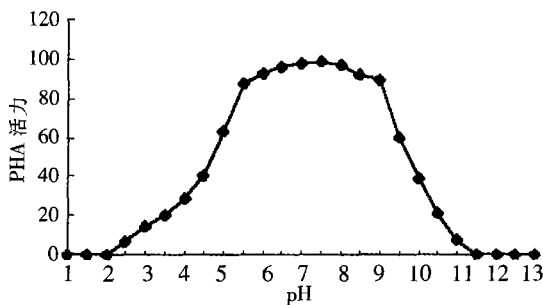


图 1 pH 对 PHA 活力的影响

定 PHA 的活力,但经 pH 为 10.0 的 0.02mol/L Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲液中和至 pH 为 7.0 后,仍可测定 PHA 的活力。与 pH 高于 9.0 时相似,PHA 的活力也显著降低,在 pH 为 2.0 时,PHA 的活力也完全丧失。上述结果与朱建标等^[12]在洋刀豆凝集素上的研究结果类似。由此可见,在极端 pH 下提取蛋白质会造成蛋白质品质下降,因此,采用稀酸或稀碱溶液浸提菜豆中的蛋白质,同时控制一定的 pH,既可显著灭活大部分的 PHA 活力^[11],又能保持菜豆蛋白质的良好品质。

2.4 金属离子对 PHA 活力的影响

金属离子对 PHA 的影响见表 2。

表 2 金属离子对 PHA 活力的影响

金属盐	金属离子	活力
$AlCl_3$	Al^{3+}	0.0
$FeCl_3$	Fe^{3+}	0.0
$ZnCl_2$	Zn^{2+}	79.2
$Pb(NO_3)_2$	Pb^{2+}	5.5
$FeSO_4$	Fe^{2+}	28.8
$CuCl_2$	Cu^{2+}	49.6
$CaCl_2$	Ca^{2+}	94.2
$MgSO_4$	Mg^{2+}	90.5
$AgNO_3$	Ag^+	23.7
KCl	K^+	100.0
对照组	无	100.0

从表 2 中可知,3 价的 Al^{3+} 和 Fe^{3+} 对 PHA 有很强的抑制作用,使其活力完全丧失。而 2 价金属离子的处理效果却有较大差异, Pb^{2+} 能抑制 PHA 大部分活力,但 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 则只能抑制 PHA 少部分活力,其他的 2 价金属离子的抑制作用介于它们之间。1 价金属离子中, Ag^+ 对 PHA 活力有抑制作用, K^+ 无抑制作用。目前金属离子对 PHA 活力的非特异性抑制作用机理目前还不清楚,可能是由于其与 PHA 分子上的特定位点相结合后破坏了 PHA 特定的空间构象,从而使介导血细胞凝集作用的“桥”结构不能形成而丧失凝集活力^[13]。另外,在 0.01mol/L 金属离子浓度下,均未见抽提液出现沉淀或浑浊现象,表明蛋白质并未发生变性。因此,适宜的金属离子处理也不失为灭活 PHA 的有效方法。

3 结论

PHA 是菜豆中最主要的致毒物之一,具有较好的稳定性,不易失活。PHA 具有很强的耐热性,传统

的干热处理并不能有效地钝化它的活力^[4]。但这种稳定性是相对的,合适的理化处理仍能有效地钝化 PHA 的活力。本研究表明,采用 95℃、40min、100℃、30min 或 105℃、10min 的湿热处理,可使 PHA 的活力完全丧失。在 pH1.0~5.0 或 pH9.5~13.0 范围内,采用一定 pH 的稀酸或稀碱溶液浸提菜豆中的蛋白质,可使其中的 PHA 活力显著丧失。3 价(如 Al³⁺、Fe³⁺)金属离子也可完全抑制 PHA 的活力,部分 2 价金属离子(如 Pb²⁺)和少数 1 价金属离子(如 Ag⁺)也能较好地抑制 PHA 活力。因此可见,在不影响菜豆蛋白质品质的条件下,适宜的湿热、酸碱和金属离子处理能有效钝化菜豆中 PHA 的活力。

参考文献:

[1] 马龙江. 济宁市 10 起学校豆角中毒调查[J]. 中国学校卫生, 2001, 22(2): 168.
 [2] J K P Weder, L Telek. Antinutritional factors in anasazi and other pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L)[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1997, 51: 85~98.
 [3] Jaffe W G, Brucher O. Toxicity and specificity of different phytohemagglutinins of beans (*Phaseolus vulgaris*)[J]. Arch Latinoamer Nutr, 1972, 22: 267~281.
 [4] 吴永宁. 现代食品安全科学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 390~392.
 [5] 高莹, 瞿礼嘉, 陈章良. 植物凝集素的分子生物学研究[J].

生物技术通报, 2002(5): 18~22.
 [6] S K 阿罗拉. 豆类的化学和生物化学[M]. 科学出版社, 1987. 223~225.
 [7] 励建荣, 顾振宇, 于平. 大豆凝血素的灭活研究[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(2): 48~51.
 [8] 孙册, 朱政, 莫汉庆. 凝集素[M]. 北京: 科学出版社, 1986. 20~21.
 [9] Coffey D G, Uebersax M A, Hosfield G L. Evaluation of hemagglutinating activity of low temperature cooked kidney beans[J]. Food Sci, 1985, 50: 78~81.
 [10] Bardocz S, Grant G, Pusztai A. The effect of phytohemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat[J]. Br J Nutr, 1996, 76: 613~626.
 [11] Bressani R, Brenes R G, Garcia A. Chemical composition, aminoacid content and protein quality of canavalia spp seeds[J]. J Sci Food Agric, 1987, 40: 17~23.
 [12] 朱建标, 王洪新. 洋刀豆凝集素的灭活研究[J]. 郑州工程学院学报, 2002, 23: 89~93.
 [13] Desai N, Anthony K, Neuberger. A studies on the chemical modification of soybean agglutinin [J]. Carbohydrate Res, 1988, 178: 183~190.
 [14] Kadam SS, Smithard RR, Eire MD, et al. Effects of heat treatments of antinutritional factors and quality of protein in winged bean[J]. J Sci Food Agric, 1987, 39: 265~267.

(上接第 158 页)

纽甜甜度高, 甜味性能好, 使用成本低, 作为甜味剂使用有非常好的市场前景。对其合成方法进行研究, 对该品种的产业化有十分重要的意义。

参考文献:

[1] Indra Prakash, Ihab Bishay, Steve Schroeder. Neotame: synthesis, stereochemistry and sweetness [J]. Synthetic Communications, 1999, 29(24): 4461~4467.
 [2] Orlovshi, Vladislav, Prakash. US patent 6,465,677(2002).
 [3] Prahash Indra, WO 0187,927.
 [4] Nofre, Claude, Tinti. US patent[P], 5,480,668(1996).
 [5] Prahash Indra. US patent[P], 6,077,962(2000).
 [6] Prakash, Indra, Zhao, Robert Y. US patent[P], 6,627,431.
 [7] Prakash, Indra, WO 0190,138.
 [8] Prakash, Indra, Ager, David J, Katritzky, Alan R. US patent[P], 5,856,584.

[9] Gulkova. Collect Czech Chem Commun[J], 1992, 57: 2215~2226.
 [10] Sanders Noel Anthony. EP 0391652.
 [11] Legarda Ibanez Juan Jose. EP 0374952.
 [12] Wiberg K B. Journal of American Chemistry Society[J], 1981, 103: 4473.
 [13] Ebner, Jerry R, WO 0102,332.
 [14] Whitmore F C, Homeyer A H J. Journal of American Chemistry Society[J], 1933, 55: 4557.
 [16] Prakash, Indra, Guo Zhi. US patent[P], 5,994,593.
 [17] Wilson, Harold W. WO Patent PCT Int[P], Appl WO 99, 02.
 [18] Katritzky, Alan R, Prakash, Indra. US Patent[P], 5,770, 775.
 [19] Pospisek J, Blaha K, Collect Czech. Chem Comm[J], 1987, 52: 514.

一套《食品工业科技》在手 纵观食品工业发展全貌