

聚合草叶蛋白的提取及饲用价值评价研究

何金环, 李凤玲

(郑州牧业工程高等专科学校 生物工程系, 河南 郑州 450011)

摘要: 以聚合草为材料, 研究其叶蛋白提取的最佳条件及其氨基酸组成, 并采用氨基酸评分(AAS)及必需氨基酸指数(EAAI)2种方法对其饲用价值进行评价。结果表明: 影响聚合草叶蛋白(LPC)提取率的因素依次为凝聚方法>固液比>加盐量, 最佳条件组合为65%乙醇沉淀、固液比1:7、含盐量0.3%。聚合草叶蛋白氨基酸总量19.65%, 必需氨基酸的含量占总氨基酸含量的44.2%, 呈味氨基酸的含量占总氨基酸含量的36.5%; 并满足总必需氨基酸/总氨基酸(TEAA/TAA)>0.4, 总必需氨基酸/总非必需氨基酸(TEAA/NEAA)>0.6; 叶蛋白AAS和EAAI分别为47.5和0.916, 高于同期苜蓿叶片(对应分别为30、0.881)。聚合草叶蛋白氨基酸组成平衡且优质, 具有较高的综合开发利用价值

关键词: 聚合草; 叶蛋白提取; 氨基酸组成; 饲用价值; 评价

中图分类号: S54 Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)04-0152-04

Study on the Leaf Protein Extraction and Evaluation of Its Feeding Value in *Symphytum pezegrinum* L.

HE Jin-huan, LI Feng-ling

(Department of Bioengineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: To study the grass leaf protein extraction conditions in *Symphytum pezegrinum* L. and evaluate its feeding value, essential amino acid score (AAS) and essential amino acid index (EAAI) were determined by RP-HPLC. The result showed that the sequence of the factors in affecting extraction ratio of the LPC was flocculation method, solid-liquid ratio and the amount of adding salt. The optimum combination condition was that solid-liquid ratio of 1:7, adding 0.3% salt and ethanol precipitation method. The aggregate total amount of 19.65% grass-protein amino acids, essential amino acids accounted for 44.2%, flavor of amino acids was 36.5%. While meeting the EAA/TAA>0.4, EAA/NEAA>0.6; Leaf protein AAS and EAAI were 47.5 and 0.916, respectively. It was higher than the same period in alfalfa leaves (30, 0.881). The results showed that aggregate balance of amino acid composition of grass and roots and high-quality of *Symphytum pezegrinum* L., and have comprehensive development and utilization of high value.

Key words: *Symphytum pezegrinum* L.; Leaf protein extraction; Amino acid composition; Feeding value; Evaluation

叶蛋白又称绿色蛋白浓缩物(leaf protein concentration, 简称LPC)^[1], 是以新鲜牧草或其他青绿

植物为原料, 经打浆压榨后从其汁液中提取的高蛋白浓缩物。叶蛋白的氨基酸组成较一般谷类和豆类

收稿日期: 2010-10-19

基金项目: 河南省科技攻关项目(072102110011); 河南省教育厅自然科学资助项目(2009A180020)

作者简介: 何金环(1974-), 女, 河南遂平人, 副教授, 硕士, 主要从事生理生化教学和科研工作。E-mail: hejinhuan@tom.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白质优良,与除乳类和蛋类以外的一般动物蛋白质近似,营养价值较高,可以作为家畜饲料,以及人类饮食的蛋白质补充物^[2]。评价蛋白质营养价值主要从“量”和“质”2个方面,氨基酸评分(amino acid score, AAS)是目前广为应用的蛋白质评价方法,不仅适用于单一蛋白质的评价,还可用于混合蛋白质的评价。AAS 是将被测蛋白质的必需氨基酸组成与推荐的理想蛋白质或参考蛋白质氨基酸模式进行比较,能反映蛋白质构成和利用率的关系。另外,早在20世纪50年代, Oser 就提出利用必需氨基酸指数(essential amino acid index, EAAI)来评价饲料蛋白质的质量^[3,4]。动物对饲料中氨基酸的需求与其自身的氨基酸组成显著相关, EAAI 反映了饲料蛋白源的必需氨基酸组成与饲养对象必需氨基酸组成的拟合程度,因此可以更加准确、科学地评价牧草营养价值。

聚合草(*Symphytum pezegrinum* L.)又名紫根草,丛生多年生草本植物^[5],植株可供药用,茎叶可作家畜青饲料。叶丛期到初花期的鲜草粗蛋白含量高于紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)等豆科植物,粗纤维含量低,消化吸收率高,氨基酸较为齐全,特别富含赖氨酸,含量是大豆的5~6倍,胡萝卜素、B族维生素含量也较高^[6]。聚合草传统利用方法是直接青饲、打浆饲喂、调制干草和进行青贮。但因为聚合草叶面有刚毛,适口性较差;叶片量大,水分含量高,青贮、调制干草不易成功;打浆饲喂量有限,限制了聚合草的大面积栽培,使这一廉价的蛋白质资源未能得到较好利用。当前用于生产浓缩叶蛋白的主要原料有苜蓿、甘薯(*Ipomoea batatas* L.)、紫云英(*Astragalus sinicus* L.)等,对聚合草叶蛋白的分离及分析等方面的研究报道较少。因此,本试验筛选了提取聚合草叶蛋白的最佳条件,并利用氨基酸分(AAS)和必需氨基酸指数评价其氨基酸组成和营养价值,旨在为聚合草叶蛋白的提取与开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验地设在郑州牧业工程高等专科学校校内牧草基地(属北暖温带大陆季风性气候区,日平均气温14.3℃,1月份日均温1.5℃(最低-20℃),7月份日均温27.5℃(最高40℃)。≥10℃有效积温为4700~5000℃,平均年降雨量630mm,无霜期220~225d。土壤为黄河冲积物上发育的潮土,质地轻壤)。取3~5a生初花期的聚合草地上部分新鲜茎

叶,洗净,100℃烘干至恒定质量,粉碎过筛(孔径0.15mm),封存备用以测定氨基酸组成。苜蓿初花期的氨基酸组成及含量的试验数据参照刘太宇等^[7]的测试结果。

1.2 试验方法

1.2.1 聚合草LPC提取工艺 聚合草鲜草→打浆(ZG100果蔬榨汁机)→过滤(3层纱布过滤)→滤液→凝聚→过滤→离心(3000r/min)→叶蛋白膏→烘干(70℃,烘箱)→聚合草叶蛋白。

叶蛋白得率=叶蛋白质量/鲜草质量×100%,

蛋白质提取率=(叶蛋白得率×叶蛋白质量)/鲜草蛋白质量×100%。

1.2.2 正交试验 单因素对叶蛋白提取率和蛋白质提取率的试验结果表明^[8]:固液比1:6,含盐量0.6%,乙醇65%,pH值1.5、三氯乙酸沉淀分别为最合适条件。

称取切碎的聚合草叶片9份,10g/份,按照试验设计分析叶蛋白提取的条件及影响因素。选定3因素3水平做正交试验,因素水平见表1。

表1 聚合草叶蛋白提取工艺参数设计

因素水平	固液比(A)	含盐量(B)/%	凝聚方法(C)
1	1:5(A1)	0.3(B1)	盐酸(C1)
2	1:6(A2)	0.4(B2)	三氯乙酸(C2)
3	1:7(A3)	0.5(B3)	乙醇(C3,65%)

1.2.3 氨基酸组成测定 采用反相高效液相色谱法(色谱条件为色谱柱:Hypersil ODS-BP C18柱(4.6mm×250mm,5μm);流动相A:醋酸-醋酸钠缓冲液(pH=7.2);流动相B:甲醇,流速1.0mL/min,流动相采用梯度洗脱方式,荧光检测波长为450nm)测其氨基酸组成和含量,由郑州牧业工程高等专科学校实验中心完成。

氨基酸评分(AAS)是指被测蛋白质每克氮(或蛋白质)中氨基酸量(mg)除以理想模式或参考蛋白质中每克氮(或蛋白质)中氨基酸量(mg)。AAS测定按文献[9]中的方法进行,AAS值用来初步估计蛋白质营养价值,显示待测氨基酸与氨基酸与联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(FAO/WHO)模式中相应氨基酸的接近程度。

EAAI值显示待测蛋白质中所有必需氨基酸与标准蛋白质必需氨基酸的接近程度。利用 Pens-florida^[10]的方法评价饲料蛋白源时采用的公式计算EAAI值。

2 结果与分析

2.1 聚合草叶蛋白提取的最佳条件

由表2可见,按照极差R的大小,影响聚合草

LPC 提取率的因素为 $C > A > B$, 即凝聚方法 $>$ 固液比 $>$ 加盐量; 最佳条件为 A3B1C3, 即固液比 1 : 7, 含盐量 0.3%, 乙醇沉淀法。影响聚合草蛋白质提取率的因素为 $C > B > A$, 即凝聚方法 $>$ 加盐量 $>$ 固液比; 最佳条件为 A3B3C2, 即固液比 1 : 7, 含盐

量为 0.5%, 三氯乙酸沉淀法。综合考虑 3 个指标的影响次序, 以叶蛋白提取率和蛋白质提取率均较高为目标, 同时考虑生产成本, 以 A3B1C3 组合为最佳条件来提取聚合草叶蛋白较合适, 即固液比 1 : 7, 含盐量 0.3%, 65%乙醇沉淀。

表 2 聚合草叶蛋白提取工艺参数组合及结果

试验编号	固液比(A)	含盐量(B)/%	凝聚方法(C)	叶蛋白提取率/%	蛋白质提取率/%
I	1	1	1	1.92	19.17
II	1	2	2	2.53	27.26
III	1	3	3	2.97	22.43
IV	2	1	2	2.76	29.19
V	2	2	3	3.39	26.87
VI	2	3	1	2.14	21.94
VII	3	1	3	3.37	24.36
VIII	3	2	1	2.09	22.56
IX	3	3	2	2.82	30.35

注: 影响聚合草 LPC 提取率各因素的极差 R 值为: $R_A=0.87, R_B=0.12, R_C=3.53$; 影响聚合草蛋白质提取率各因素的 r 值为 $r_A=9.14, r_B=18.03, r_C=23.14$

2.2 聚合草叶蛋白氨基酸组成特点及其评价

由表 3 可知, 聚合草初花期的粗蛋白含量为 25.07%, 苜蓿粗蛋白含量为 27.69%, 聚合草叶蛋白质由 17 种氨基酸组成, 其中必需氨基酸 9 种, 氨基

酸种类齐全, 并同时满足 $TEAA/TA A > 0.4$ 和 $TEAA/NEAA > 0.6$, 与“牧草之王”苜蓿氨基酸组成和含量接近, 说明聚合草的氨基酸组成平衡, 饲用价值高。

表 3 聚合草叶蛋白氨基酸的组成及其含量

指标	初花期		指标	初花期	
	聚合草	苜蓿		聚合草	苜蓿
粗蛋白 CP	25.07	27.69	赖氨酸 Lys*	0.95	1.13
总氨基酸 TAA	19.65	21.61	异亮氨酸 Ile*	1.13	1.21
天冬氨酸 Asp	2.09	2.67	苯丙氨酸 Phe*	1.13	1.15
丝氨酸 Ser	0.89	0.89	缬氨酸 Val*	1.28	1.59
谷氨酸 Glu	2.41	2.67	亮氨酸 Leu*	2.02	1.95
组氨酸 His	0.57	1.02	苏氨酸 Thr*	1.08	1.02
精氨酸 Arg	1.25	1.21	酪氨酸 Tyr*	0.74	0.79
甘氨酸 Gly	1.26	1.22	胱氨酸 Cys*	0.08	0.06
丙氨酸 Ala	1.42	1.78	总必需氨基酸/总氨基酸	44.20	45.30
脯氨酸 Pro	1.07	1.07	总必需氨基酸/总非必需氨基酸	0.79	0.72
蛋氨酸 Met*	0.29	0.18			

注: *表示必需氨基酸

聚合草的必需氨基酸组成、氨基酸评分和必需氨基酸指数见表 4、表 5、表 6。由表 4 可以看出, 聚合草必需氨基酸占总氨基酸含量的百分比(44.2%) 高于 FAO/WHO 模式(35.0%), 高于苜蓿(42.4%),

低于鸡蛋模式(49.7%); 由表 5 可知, 聚合草叶蛋白 AAS(47.5)高于苜蓿(30.0)。从表 6 可以看出, 聚合草初花期的叶蛋白 EAAI(0.916)与苜蓿初花期的叶蛋白 EAAI(0.881)接近。

表 4 聚合草必需氨基酸组成

材料	缬氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸+酪氨酸	蛋氨酸+胱氨酸	赖氨酸	苏氨酸	必需氨基酸含量占总氨基酸含量的百分比
聚合草	6.5	5.8	10.2	9.5	1.9	4.8	5.5	44.2
苜蓿	7.4	5.7	9.1	9.0	1.2	5.2	4.8	42.4
鸡蛋模式	6.6	8.8	6.4	5.5	5.1	7.3	10.0	49.7
FAO/WHO 模式	4.0	7.0	5.5	3.5	4.0	5.0	6.0	35.0

表5 聚合草必需氨基酸评分

材料	缬氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸+酪氨酸	蛋氨酸+胱氨酸	赖氨酸	苏氨酸	氨基酸评分
聚合草	162.5	82.8	185.4	285.5	47.5	96.0	91.6	47.5
苜蓿	185.0	81.4	165.0	257.0	30.1	104.0	80.0	30.0

表6 聚合草必需氨基酸指数

指标	聚合草	苜蓿
必需氨基酸指数	0.916	0.881

3 结论与讨论

牧草蛋白质中氨基酸的种类和比例是评定饲料蛋白质营养价值的关键。经测定,聚合草叶蛋白包含17种氨基酸,其中9种必需氨基酸,8种非必需氨基酸。总氨基酸含量为19.65%,同时满足 $EAA/NEAA=0.79 > 0.6$, $EAA/TAA=0.44 > 0.4$,为家畜的优质蛋白源。聚合草叶蛋白质中4种呈味氨基酸天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸含量较高,占总氨基酸量的36.53%,具有较好的适口性。聚合草的第一限制氨基酸是蛋氨酸和胱氨酸(含硫氨基酸),多数植物蛋白中缺乏的赖氨酸在聚合草叶中含量较高,不是限制性氨基酸,第二限制氨基酸是苏氨酸。

饲料蛋白源的质量直接影响养殖动物的生长发育速度,从而间接影响产量和经济效益。Oser^[3-4]于1959年提出的利用EAAI评价饲料原料的标准: EAAI值大于0.90的为优质蛋白源,在0.80左右的为可用蛋白源,小于0.70的为不适宜蛋白源。在此基础上,胡国宏等^[1]提出新的评价标准,即 $EAAI \geq 0.90$ 的为优质蛋白源, $0.80 \leq EAAI < 0.90$ 的为良好蛋白源, $0.70 \leq EAAI < 0.80$ 的为可用蛋白源, $EAAI < 0.70$ 的为不适宜蛋白源。在选择蛋白源时要从蛋白含量和氨基酸组成2个方面权衡,不能只考虑粗蛋白含量,否则将降低饲料效率,造成饲料浪费。聚合草叶蛋白初花期AAS(47.5)超过苜蓿叶蛋白AAS(30),聚合草EAAI(0.916)与苜蓿(0.881)相当,说明聚合草叶蛋白的氨基酸组成平衡性较好,与含硫氨基酸饲料合理搭配,可作为优质的蛋白饲料。

总之,聚合草作为优质牧草,不仅可以直接青饲、调制干草、打浆饲喂,而且可以用来提取叶蛋白、聚合草多糖、聚合草食用纤维。另外,聚合草根部分也极具开发价值,含有蛋白质、矿物质、维生素、尿囊素等多种营养成分,而且,在饲料、食品、保健品和药物

上具有巨大的发展潜力和巨大的经济效益。聚合草根、茎、叶中尿囊素含量测定及提取方法研究、聚合草根作为饲料添加剂的药理作用及效果研究等方面将是下一步工作的重点。

参考文献:

- [1] 张焱,白志明,董宽虎,等.苜蓿鲜草提取叶蛋白最适条件的研究[J].中国草地学报,2007,29(6):69-72.
- [2] 高娃.内蒙古草业产业化经营现状和发展思路[J].中国草地学报,2008,30(1):102-107.
- [3] Oser B L. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein[J]. Journal of the American Dietetic Association, 1951, 27: 396-402.
- [4] Oser B L. An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins[M]// Albanese A A. Protein and Amino Acid Nutrition. New York: Academic Press, 1959: 281-295.
- [5] 郭孝. 聚合草的栽培技术与合理利用[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(9): 62-64.
- [6] 朱长山,田朝阳,万四新.《河南植物志》紫草科增补与订正[J].河南师范大学学报,2004,32(3):137-138.
- [7] 刘太宇,聂芙蓉,刘庆华,等.黄河滩区6种牧草不同生育期粗蛋白和氨基酸含量的动态分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(1):11-16.
- [8] 李凤玲,何金环.聚合草鲜草叶蛋白提取条件研究[J].中国草地学报,2009,31(2):76-80.
- [9] FAO. Amino acid content of foods and biological data on protein[J]. Nutr Stud, 1970, 24: 5-6.
- [10] Penafloida. An evaluation of indigenous protein sources as potential component in the diet formulation for tiger prawn *penaeus monodon*, using essential amino acid index (EAAI)[J]. Aquaculture, 1989, 83: 319-330.
- [11] 胡国宏,刘英.利用必需氨基酸指数(EAAI)评价鱼饲料蛋白源[J].中国饲料,1995(15):39-31.
- [12] 范润珍,宋文东,彭少伟.高效液相色谱法测定长蛇肌蛋白氨基酸[J].大连水产学院学报,2004,19(4):309-312.
- [13] 冯东勋,赵保国.利用必需氨基酸指数(EAAI)评价新饲料蛋白源[J].中国饲料,1997(7):10-13.