

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.022

丁妍妍,王璟,贾津亚,等.桐柏野大豆种子粗蛋白质测定及方法探讨[J].广西植物,2013,33(1):122-125

Ding YY,Wang J,Jia JY,et al. Determination of crude protein of tongbai *Glycine soja* seeds and discussion of methods[J]. *Guihaia*,33(1):122-125

桐柏野大豆种子粗蛋白质测定及方法探讨

丁妍妍,王璟,贾津亚,韩琼,张乃群*

(南阳师范学院 生命科学与技术学院,河南 南阳 473061)

摘要:野大豆因其高蛋白、低油脂含量等特点,越来越引起人们的关注。为了快速精确测定野大豆粗蛋白质含量,采用半微量凯氏法和消化—分光光度法对采自桐柏的8个野大豆样品进行蛋白质含量的测定,并分析比较两种测定方法。试验结果显示,采用消化—分光光度法测定的野大豆的蛋白质含量与经典的半微量凯氏法测定结果一致。半微量凯氏法适用范围广,测定结果精确,而消化—分光光度法相对于半微量凯氏法简化了试验操作,缩短了分析时间,又没有特殊的仪器设备和试剂要求,更便于普及应用。

关键词:野大豆;半微量凯氏法;消化—分光光度法;粗蛋白质测定

中图分类号:S529 文献标识码:A 文章编号:1000-3142(2013)01-0122-04

Determination of crude protein of tongbai *Glycine soja* seeds and discussion of methods

DING Yan-Yan, WANG Jing, JIA Jin-Ya,

HAN Qiong, ZHANG Nai-Qun*

(School of Life Sciences and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: Wild soybean (*Glycine soja*) has many excellent characteristics like high protein and low fat content. For the purpose to determine wild soybean crude protein content fast and precisely, we used semi-micro Kjeldahl method and digestion-spectrophotometry to determine the 8 wild soybean samples collected from Tongbai, then analyzed and compared the two methods. Test results showed that, the two methods had the same determination results. Semi-micro Kjeldahl method had a wide range of applications and accurate determination results, while digestion-spectrophotometry simplifies the test operation, shortened the analysis time, and required no special equipment and reagents, it was more convenient for popularize application.

Key words: *Glycine soja*; semi-micro Kjeldahl method; digestion-spectrophotometry; determination of crude protein

野大豆分布在我国从寒温带到亚热带的广大地区,喜水耐湿,多生于山野、河流沿岸、湿草地、湖边、沼泽附近或灌丛中。野大豆因其高蛋白、低油脂含量等特点,有较高的营养价值。其貌不扬的野大豆,蕴藏着各种可利用的抗性基因——如抗虫、抗病、抗旱、耐盐碱等,是大豆产业发展的决定性因素(徐刚等,2009)。因此,人们对野大豆的研究报道越来越

多(Wang *et al.*, 2012; Natarajan *et al.*, 2006)。据报道大豆蛋白质的氨基酸组成与牛奶蛋白质相近,在营养价值上与动物蛋白等同(孟滕等,2008)。每天摄入25g大豆蛋白,有减少患心脑血管疾病的风险(林智,2010)。

目前测定大豆蛋白质含量的常用方法主要有凯氏定氮法(GB2905-82, GB/T5511-2008, GB5009.5-

* 收稿日期:2012-07-05 修回日期:2012-10-25

基金项目:河南省自然科学基金(102102110159);河南省教育厅自然科学基金(2010A180018);SPCP项目(ZB-2011-83)

作者简介:丁妍妍(1988-),女,河南淮滨人,硕士生,从事植物资源研究,(E-mail)1057715890@qq.com。

* 通讯作者:张乃群,教授,主要从事植物资源研究,(E-mail)zhnq2002@yahoo.com.cn。

2010)、双缩脲法、紫外吸收法、考马斯亮蓝法(郭颖娜等,2008)、分光光度法(杜先锋等,1997)等,由于这些方法操作繁琐或要求特殊仪器设备而难于普及推广。本研究采用国家标准《谷类、豆类作物种子

粗蛋白质测定法(半微量凯氏法)》(GB2905-82)和消化一分光光度法(曹坎涛,2011)测定野大豆的蛋白质含量,进而对两种测定方法进行比较,以期找到简便、快速、精确的野大豆粗蛋白质测定方法,为桐

表 1 8 个样品的地理信息
Table 1 Geographic information of 8 samples

样品 Sample	TYD001	TYD002	TYD003	TYD004	TYD005	TYD006	TYD007	TYD008
纬度 Latitude (N)	32°33'06"	32°28'40"	32°26'26"	32°37'42"	32°26'09"	32°24'57"	32°34'46"	32°21'31"
经度 Longitude (E)	113°38'32"	113°38'36"	113°32'57"	113°37'25"	113°38'04"	113°18'22"	113°36'30"	113°24'58"
海拔 Elevation (m)	155.1	124.2	143.2	209.7	113.3	192.1	175.2	150.1

柏野大豆高蛋白样本的发现和利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2011 年 10 月采自桐柏的 8 个野大豆样品,依次为 TYD001-TYD008,其地理信息详见表 1。

1.2 试验方法及计算

1.2.1 试样的选取和制备 选取有代表性的种子挑拣干净,按四分法缩减取样,取样量 20 g。将种子放在 60~65 °C 烘箱中干燥 8 h 以上,用粉碎机磨碎,95%通过 40 目筛,装入磨口瓶备用。

1.2.2 试验方法 半微量凯氏法分为试样消化、蒸馏、吸收和滴定 4 个过程。其原理是样品中含氮有机化合物与浓硫酸在催化剂作用下共热消化,含氮有机物分解产生氨,氨又与硫酸作用,生成硫酸铵。然后加碱蒸馏放出氨,氨用过量的硼酸溶液吸收,再用盐酸标准溶液滴定求出总氮量换算为蛋白质含量。方法依据国家标准 GB2905-82,并参考 GB/T5511-2008。消化一分光光度法是将试样与浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜混合加热破坏有机物质,使其中的碳和氢分别变成二氧化碳和水逸出,蛋白质脱氮生成硫酸铵(同半微量凯氏法的消化过程),其铵离子与碘化汞钾在碱性溶液中生成黄色络合物,比色测定铵离子,根据其含氮量和蛋白质换算系数即可推算出蛋白质的含量(张生明,2010)。

1.2.3 计算公式 (1)半微量凯氏法 粗蛋白质(%,干基)=[(V₂-V₁)×N×0.0140×K×100/W×(100-X)]×100 …………… (1)

式中,V₁和V₂依次是滴定空白和试样时消耗酸标准溶液的体积(mL),N是盐酸标准液的当量浓度,K是氮换算成粗蛋白质的系数,W是试样重

量(g),X是试样水分含量(%),0.0140是每毫克当量氮的克数。

(2)消化一分光光度法 蛋白质(%)=[(a×K×100)/(W×V₂/V₁×10⁶)]×100 …………… (2)

式中,a为样品管扣除空白后的含氮量(μg),K为蛋白质的换算系数,W为样品重量(g),V₁为样品消化液总体积(mL),V₂为比色时所取样品消化液体积(mL)。

1.2.4 测定结果记载 平行测定的结果用算术平均值表示,最后结果保留两位小数。

1.2.5 氮换算成粗蛋白质的系数 换算系数依据中华人民共和国国家标准“谷类、豆类作物种子粗蛋白质测定法(半微量凯氏法)GB2905-82”,K=6.25。

2 结果与分析

2.1 样品中的水分含量

取 8 个称量瓶标号并称重,依次装入粉碎后的豆粉再称重,在(105±2)°C烘箱中干燥 2 h 后称重,并依次记载各称量值。计算可得出豆粉重量、豆粉中的水分重量和豆粉的含水量。其中,豆粉含水量(%)=豆粉中含有的水分重量/烘干前豆粉的重量。测得 8 个样品 TYD001-TYD008 的含水量依次为 1.01%、1.1%、1.2%、1.3%、0.3%、0.3%、0.9%、2.3%。

2.2 样品粗蛋白质含量

2.2.1 半微量凯氏法 依据国家标准 GB2905-82 测试 8 个样品的粗蛋白质含量,每个样品重复测试 3 次,其中对照滴定消耗标准酸的体积平均值为 0.258 mL,将数据代入 1.2.3.1 计算公式,计算出 8 个样品蛋白质含量在 44.30%~51.28%之间(表 2)。

2.2.2 消化一分光光度法 配制铵离子标准液,再稀释成标准应用液(1 mL≈10 μg“N”)。用 722 型

表 2 8 个样品蛋白质含量 (半微量凯氏法)
Table 2 Protein contents of 8 samples (semi-micro Kjeldahl method)

样品 Sample	TYD001	TYD002	TYD003	TYD004	TYD005	TYD006	TYD007	TYD008
标准酸滴定 Standard acid titration (mL)	10.228	11.720	9.896	10.488	10.624	10.343	10.235	11.047
蛋白质含量 Protein content (%)	44.75	51.28	44.30	45.89	46.48	45.25	44.78	48.34

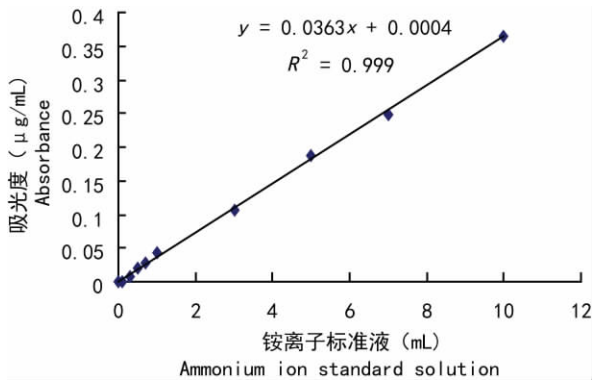


图 1 铵离子吸光度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of ammonium ion absorbance

表 3 8 个样品吸光度、含氮量和蛋白质含量 (消化—分光光度法)

Table 3 Absorbance, nitrogen contents and protein contents of 8 samples (digestion-spectrophotometry)

样品 Sample	TYD001	TYD002	TYD003	TYD004	TYD005	TYD006	TYD007	TYD008
吸光度 Absorbance ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.261	0.280	0.258	0.267	0.271	0.263	0.264	0.282
含氮量 Nitrogen content (μg)	71.79	81.98	70.96	73.44	74.56	72.34	71.63	77.58
蛋白质含量 Protein content (%)	44.87	51.24	44.35	45.90	46.60	45.21	44.77	48.49

TYD002 号蛋白质含量最高。

2.3 两种方法测定结果对比

由表 2 和表 3 可知,两种粗蛋白质测试方法得出的结果并非完全一致,但将测定结果用统计学方法处理,经 t 值检验, $P > 0.05$,可以认为两种测试方法间无显著性差异或者说这两种测试结果间的差异无统计学意义。

3 结论与讨论

检验样品中蛋白质含量时,往往只限于测定总氮量,然后乘以蛋白质换算等数,得到蛋白质含量,这里的“蛋白质含量”实际上还包括核酸、生物碱、含氮类脂、叶啉和含氮色素等非蛋白质氮化合物,故称为粗蛋白质(马丹,2008)。本试验利用半微量凯氏法和消化—分光光度法测定 8 个野大豆样品的粗蛋白含量,两种测试结果一致。但半微量凯氏法所需仪器多为特制的玻璃仪器,易于破损,特别是蒸馏装置复杂,不便于操作,试验过程所需时间较长(李宁,

分光光度计测定吸光度,绘制标准曲线(图 1)。

由标准曲线可得方程 $y = 0.0363x + 0.0004$,其中 x 代表铵离子标准应用液的量, y 代表吸光度。

再依次测定 8 个样品的吸光度,重复 3 次。将数据代入方程 $y = 0.0363x + 0.0004$,并依据铵离子标准应用液,可知各样品铵离子含量即扣除空白后的含氮量(a)值。本试验中样品重量为 0.5 g(W),样品消化液总体积为 500 mL(V_1),比色时所取样品消化液体积 1.0 mL(V_2),代入 1.2.3.2 计算公式,得到样品蛋白质含量(表 3)。

由表 3 可知:8 个样品的蛋白质含量在 44.35%~51.24%之间。其中 TYD003 号蛋白质含量最低,

2006)。而且半微量凯氏法的硼酸—指示剂混合液的配置很关键,pH 精度要求高,否则会对试验结果造成较大的误差。同时在蒸馏过程中,电炉加热的温度控制要平稳,使蒸汽产生的量保持均匀,否则,会造成锥形瓶中的蒸馏液回流到凯氏蒸馏装置反应室中,导致试验失败(陈辉等,2004)。消化—分光光度法与半微量凯氏法相比,消化—分光光度法不需要蒸馏、吸收、滴定过程,设备和操作简化,准确度较高,重现性也较好,同时可通过增加消化液用量来提高检测灵敏度,有一定的实用价值,易于推广使用(曹坎涛,2011)。消化—分光光度法是在半微量凯氏法基础上的改进,省去了繁琐的操作及相应的特殊仪器,是值得推广的食品蛋白质含量测定方法。

全国野大豆蛋白质平均含量为 46.8%,比栽培大豆高出 4.65%,有的野大豆蛋白质的含量高达 55%(黄仁术,2008)。本试验数据显示:河南桐柏野大豆粗蛋白含量在 44.30%~51.28%之间,其中只有 2 个样品的粗蛋白含量在全国野生大豆粗蛋白平均含量之上,表面看似桐柏野大豆蛋白质含

量不算高,但实际情况是由于样品采集时间和采集方法的原因造成的。由于野生大豆的炸荚特性,采集时多数豆荚是没有成熟的青荚,其种子成熟度不够,直接影响了其蛋白质的含量值。因此,野生大豆材料的采集应分多次采集成熟度较高的豆荚。另外,测试结果没有反映出粗蛋白质含量与材料生长所在地理位之间的相关性,还需要作进一步研究。栽培大豆是我国主要的油料及粮食作物,作为其近缘种的野大豆具有许多优良性状,因此在作物育种上可利用野大豆培育优良的栽培大豆品种。同时,野大豆营养价值高,又是牛、马、羊等各种牲畜喜食的牧草,因此对我国丰富的野大豆种质资源,必须加强保护和开发利用。

本研究测定了 8 个桐柏野生大豆样品的粗蛋白质含量,对比两种测试方法,统计分析测试结果一致,为今后大量进行类似检测采用消化—分光光度法这一更加简便可行的方法提供了依据。同时,8 个野大豆样品粗蛋白质含量的数据显示,仅有 2 个样品高于全国野大豆蛋白质含量的平均值,据此反思取样方法,探讨并提出了针对野生大豆材料的特性应采取的取样措施。

参考文献:

- 中华人民共和国国家标准(GB2905-82). 1985. 谷类、豆类作物种子粗蛋白质测定法(半微量凯氏法)[J]. 农业测试分析, 2(2):63-65
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 2009. GB/T5511-2008/ISO20483:2006. 谷物和豆类氮含量测定和粗蛋白质含量计算(凯氏法)[S]. 北京:中国标准出版社
- 中华人民共和国卫生部. 2010. GB5009.5-2010. 食品中蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社
- 陈辉,刘振林,张忠义. 2004. 凯氏定氮法测定牛奶中蛋白质的不确定度分析[J]. 中国卫生检验杂志, 14(3):373-374
- 郭颖娜,孙卫. 2008. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 河北化工, 31(4):36-38
- 曹坎涛. 2011. 蛋白质测定方法改进[J]. 河北化工, 34(10):26-27
- Du XF(杜先锋), Zhang YA(张延爱). 1997. Aooroach to the quantitatove determination of protein content in food-stuffs(食品中蛋白质之氮定量方法的比较与研究)[J]. J Anhui Norm Univ; Nat Sci Edit(安徽师大学报·自然科学版), 20(1):63-65
- Huang RS(黄仁术). 2008. Resources value and cultivation techniques of Glycine soja(野大豆的资源价值及其栽培技术)[J]. Res Dev & Market(资源开发与市场), 24(9):771-772
- Li N(李宁). 2006. The comparison on various methods for determining different proteins(几种蛋白质测定方法的比较)[J]. J Shanxi Agric Univ(山西农业大学学报), (2):132-134
- Lin Z(林智). 2010. The determination of the protein content in food(食品中蛋白质含量的测定)[J]. Contemp Chem Ind(当代化工), 39(2):224-226
- Ma D(马丹). 2008. Kjeldahl determination of protein content(凯氏定氮法测定食品中蛋白质含量)[J]. Metrol & Meas Techniq(计量与测试技术), 35(6):57-58
- Meng T(孟滕), Meng FW(孟凡文), Zhang D(张达), et al. 2008. Analysis of some quality characteristics in soybean mutants(大豆突变新品系部分品质性状的分析)[J]. Guihaia(广西植物), 28(3):382-385
- Natarajan SS, Xu CP, Bae HH, et al. 2006. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis[J]. J Agric Food Chem, 54(8):3114-3120
- Wang ZY, Song FB, Cai H, et al. 2012. Over-expressing GsGST14 from *Glycine soja* enhances alkaline tolerance of transgenic *Medicago sativa*[J]. Biol Plant, 56(3):516-520
- Xu G(徐刚), Yao YA(姚银安). 2009. Application of proteomics technology on researches of adaptation mechanisms of plants to adverse stresses(蛋白质组学在研究植物响应逆境机理上的应用)[J]. Guihaia(广西植物), 29(3):372-376
- Zhang SM(张生明). 2010. In the Qinghai Province hhllessbarley straw stalk the protein contentdetermines(青海省青稞秸秆中蛋白质含量的测定)[J]. Sci&Technol Inf(科技信息), (13):12-13
- [J]. Nutr Res Pract, 3(3):208-211
- Havaux M, Brigitte K, Agnieszka S. 2009. Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress[J]. BMC Plant Biol, 9(130):1-22
- Lineweaver H, Burk K. 1934. The determination of enzyme dissociation constants[J]. Am Chem, 56(3):658-666
- Naotaka H. 1999. The role of band 3 protein in oxygen delivery by red blood cells[J]. Ind J Clin Biochem, 14(1):49-58
- Nelson M, Snell E. 1986. Enzymes of vitamin B₆ degradation. Purification and properties of 5-pyridoxic-acid oxygenase from *Arthrobacter* sp. [J]. Biol Chem, 261(32):15115-15120
- Sakai A, Denslow, Amanda A, et al. 2005. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 during plant defense responses[J]. PMPP, 66:244-255
- Wada H, Snell EE. 1962. Enzymatic transamination of Pyridoxamine. II. Crystalline pyridoxamine-pyruvate transaminase[J]. Biol Chem, 237:133-137
- Wen QB(温其标). 1997. Analysis of B6 vitamers in cereals by high performance liquid-phase chromatography(应用高效液相色谱分析谷物中的维生素 B₆) [J]. J S Chin Univ Tech; Nat Sci Edit(华南理工大学学报·自然科学版), 25(11):99-102
- Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, et al. 2006. Molecular cloning, expression and characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase[J]. Biochem, 396:499-507
- Zeng HB(曾海彬), Zhang JY(张剑韵), Huang LQ(黄龙全). 2011. Analysis of vitamin B₆ vitamers in tobacco plants by high performance liquid chromatography(采用高效液相色谱技术分析烟草内的维生素 B₆ 化合物) [J]. Guihaia(广西植物), 31(5):695-698

(上接第 121 页 Continue from page 121)