

明绿豆活性蛋白的分离纯化及抗菌性鉴定

李梅青*, 孔祥淋, 王康, 李芬

安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036

摘要: 利用 25% 及 75% 饱和度的硫酸铵沉淀、阳离子交换层析 CM-52 和葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 对明绿豆蛋白进行了分离纯化。实验结果表明: 分离纯化出的该蛋白对两种真菌: 棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*)、玉米纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani Kuha*) 的生长具有一定的抑制作用; 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus Aureus*) 的细菌生长虽有一定的抑制作用, 但较其抗真菌活性相对偏弱。利用高效液相色谱法 (HPLC) 对分离出的抗菌蛋白的分子量进行了测定, 其分子量在 29.7 ~ 33.8 kDa 之间。

关键词: 明绿豆; 活性蛋白; 分离纯化; 抗菌性

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.017

Purification and Antimicrobial Property of the Bioactive Protein from Ming Mung Bean

LI Mei-qing*, KONG Xiang-lin, WANG Kang, LI Fen

School of Tea and Food Science & Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: The bioactive protein was isolated from Ming mung bean by the precipitation with 25% and 75% of saturated ammonium sulfate, ion exchange chromatography on CM-52 and Gel-filtration chromatography on Sephadex G-75. The result showed that the purified protein exhibited antifungal activity against *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* and *Rhizoctonia solani Kuha*. It had inhibitory effect on *Staphylococcus Aureus*, but the antibacterial activity was relatively weaker compared with antifungal activity. The molecular weight of the purified protein was between 29.7 and 33.8 kDa by HPLC analysis.

Key words: Ming mung bean; bioactive protein; isolation and purification; antimicrobial property

植物在生长发育过程中会遭受病原菌的侵袭, 所以在长期进化过程中, 其自身会形成一种非特异的天然免疫系统^[1]。多种具有抗菌作用的物质如过氧化氢酶、裂解酶、次生代谢物质及抗菌蛋白和抗菌肽等在植物中广泛存在^[2]。抗菌蛋白普遍存在于植物中, 这种蛋白可以发挥抵抗真菌、细菌等病原体侵害和增强植物防御昆虫的作用^[3,4], 具有来源广泛, 抗菌谱广, 种类多, 无污染等特点, 在医药、农业和食品工业存在潜在的应用前景^[5,6]。近年来已有 Maganin、Cecropins 和 Nisin 等抗菌蛋白在食品、工业、农业和医药中应用^[7]。

绿豆, 为豆科草本植物绿豆 (*Phaseolus radiatus*) 的成熟种子。绿豆除含有较丰富的营养成分^[8,9]外, 还具有一定的功效。据记载, 绿豆具有治疗和缓

解头痛、眼疾、腹泻、水肿的功能。《本草纲目》云: “绿豆, 消肿治痘之功虽同于赤豆, 而压热解毒之力过之”。《中药辞海》也记录了其解毒和镇定作用, 可“解金石、砒霜、草木一切诸毒”^[10]。现代研究也发现绿豆具有抗氧化、抗肿瘤、抗血管紧张素转化酶等药理学功能, 成为研究的热点^[11-13]。

明光绿豆以其色泽晶莹碧绿, 粒大皮薄、汤清易烂, 清香可口等特点, 质量为全国之冠, 曾经被作为贡品, 被称为“明绿”。2008年, “明光绿豆”(以下简称“明绿豆”)获得国家原产地保护标志。本文采用盐析方法提取明绿豆中的活性蛋白, 通过阳离子交换层析和葡聚糖凝胶层析进一步纯化, 并对其抑菌活性进行研究, 为明绿豆功能性成分的高效利用提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

明绿豆, 安徽燕之坊食品有限公司提供。纤维

收稿日期: 2016-02-03

接受日期: 2016-04-19

基金项目: 合肥农产品加工研究院资助院企合作项目 (2012HAP P002)

* 通讯作者 Tel: 86-013605699537; E-mail: lmq@ahau.edu.cn

素 CM-52, 瑞典 Pharmacia 公司。葡聚糖凝胶 Sephadex G-75, 日本 TOSOH 公司。TSKgel G2000SW_{XL}, 日本 TOSOH 公司。实验所用菌种购于中国药品生物制品检定所。

1.2 主要仪器设备

冷冻离心机, 北京雷勃尔离心机有限公司; Alpha-2 型冷冻干燥机, 英国 LABCONCO 公司; 电脑自动部分收集器及电脑恒流泵, 上海青浦沪西仪器厂; 可见紫外分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; Waters 600 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

2 实验方法

2.1 活性蛋白的分离与纯化

2.1.1 粗蛋白的制备

取 100 g 明绿豆, 加入 0.05 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液 200 mL, 4 °C 浸提 24 h, 匀浆, 纱布过滤, 去除绿豆残渣, 4 °C 下 12000 rpm 离心 20 min, 取上清液加硫酸铵, 使其饱和度达到 25%, 磁力搅拌 30 min 后静置于 4 °C 冰箱中 4 h。然后在 4 °C 下 12000 rpm 离心 20 min, 取上清液, 加硫酸铵使其饱和度达到 75%, 磁力搅拌 30 min 后静置 4 °C 冰箱 12 h, 4 °C 下 12000 rpm 离心 20 min, 收集沉淀物。将沉淀复溶于 0.02 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液。复溶后的蛋白液装入已经处理好的透析袋, 4 °C 下在同样磷酸缓冲液中脱盐 24 h, 聚乙二醇浓缩 1 h。

2.1.2 CM-52 阳离子交换层析

离子交换柱 CM-52 (2.6 cm × 30 cm) 用 0.02 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液平衡, 将脱盐的蛋白液离心后取上清液上样, 继续用上述缓冲液淋洗至基线, 再采用含 0.1 ~ 0.4 mol/L NaCl 的同种缓冲液进行线性洗脱, 流速 0.5 mL/min, 每管 10 min, 自动收集器收集洗脱组分, 280 nm 检测, 分别收集洗脱峰测定抑菌活性。

2.1.3 Sephadex G-75 凝胶层析

收集有抑菌活性的洗脱峰, 蒸馏水透析, 冻干成粉末。用 0.02 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液溶解, 离心后取上清液上样。凝胶色谱柱 Sephadex G-75 (1.6 cm × 60 cm) 用 0.02 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液平衡, 同种缓冲液洗脱, 流速 0.3 mL/min, 每管 10 min, 自动收集器收集洗脱组分, 280 nm 检测, 分别收集洗脱峰测定抑菌活性。

2.2 活性蛋白分子量测定

收集纯化后有抑菌活性的蛋白, 采用 Waters

600 高效液相色谱仪, 测定其相对分子质量。色谱柱: TSKgel 2000SW_{XL} (300 mm × 7.8 mm), 流动相: V (乙腈): V (水): V (三氟乙酸) = 45: 55: 0.1; 检测波长: UV 220 nm; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

分子量校正曲线所用标准品: 牛血清白蛋白 (Mw66430)、细胞色素 C (Mw12500)、乙氨酰乙氨酰乙氨酸 (Mw189)。标准蛋白保留时间 T 与相对分子质量对数 LgMw 两者的线性关系为 $LgMw = -0.2161T + 7.0753$, $R^2 = 0.9909$ 。

2.3 抗真菌活性的测定

采用琼脂纸片扩散法^[14]。培养皿 (100 mm × 15 mm) 中倒入 15 mL PDA 培养基, 凝固后将待测真菌接种到培养基中央, 28 °C 恒温培养箱培养 16 ~ 20 h, 待菌落长至直径约 5 cm, 在距菌落边缘约 0.5 cm 处贴上直径 5 mm 的无菌圆形滤纸片, 并于滤纸片上滴加 10 μL 蛋白液, 28 °C 培养, 观察抑菌现象。

2.4 抗细菌活性的测定

取 0.1 mL 细菌悬液加入冷却后的 LB 琼脂培养基, 摇匀后迅速倒入培养皿 (100 mm × 15 mm), 待凝固后在制好的含菌平板上打直径 2.5 mm 的孔, 每孔加 10 μL 蛋白液, 置 37 °C 培养 24 h, 观察抑菌现象。

2.5 蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝染色法^[15]测定蛋白含量。

3 结果与讨论

3.1 活性蛋白的分离纯化

如图 1 所示, 明绿豆粗蛋白通过阳离子交换层析 CM-52 分离, 得到 3 个洗脱峰。经抑菌试验检测, 具有抑菌活性的蛋白存在于洗脱峰 b 中。峰 b 脱盐后上样于 Sephadex G-75 凝胶柱, 得到 4 个洗脱峰, 如图 2 所示。经抑菌试验检测, b₁ 具有抑菌活性。

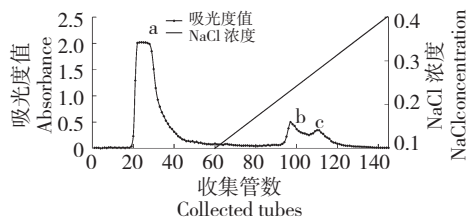


图 1 明绿豆活性蛋白 CM-52 色谱柱洗脱曲线图

Fig. 1 CM-52 column elution curve of the bioactive protein from Ming mung bean

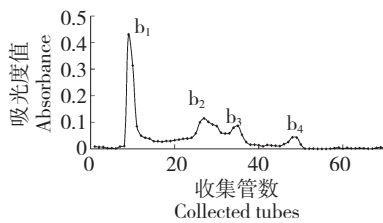


图2 洗脱峰 b 的 Sephadex G-75 色谱柱洗脱曲线图

Fig. 2 Sephadex G-75 column elution curve of fraction b

3.2 抗真菌活性检测

纯化后的活性蛋白对植物致病菌棉花枯萎病菌、玉米纹枯病菌有一定抑制作用。活性蛋白浓度在 $50 \sim 300 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 范围内,抑菌圈直径随活性蛋白浓度的增加而升高,抑制作用逐渐增强,呈现浓度依赖效应;活性蛋白浓度为 $150 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 和 $300 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 时对玉米纹枯病菌的抑制作用较强于棉花枯萎病菌,见图 3。

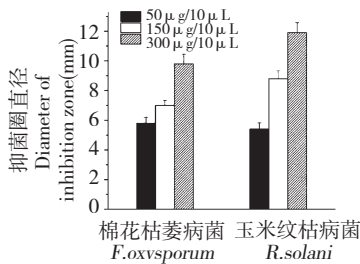


图3 不同浓度活性蛋白对棉花枯萎病菌及玉米纹枯病菌的抑制作用

Fig. 3 Inhibition effects of different concentrations of bioactive protein on *F. oxysporum* and *R. solani*

3.3 抗细菌活性检测

明绿豆活性蛋白在低浓度下对金黄色葡萄球菌不表现抑制作用,活性蛋白浓度为 $400 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 时出现抑菌圈,对金黄色葡萄球菌表现抑制作用;但在 $400 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 时对大肠杆菌仍未表现出抑制作用,见表 1。

3.4 抗真菌活性与抗细菌活性比较

由于不同来源、不同种类的抗菌蛋白和抗菌肽对病原菌抑菌机理不同,对真菌、细菌生长的抑制作用存在差异^[16]。由表 2 的抑菌圈的直径大小说明,活性蛋白浓度为 $400 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ 时,其对棉花枯萎病菌和玉米纹枯病菌的抑制作用相对较强,对金黄色葡萄球菌表现抑制作用,但相对较弱,对大肠杆菌不表现抑制作用。这与许多已报道的抗菌蛋白的性质相一致^[17],有研究发现,从法国菜豆分离出的一种

表 1 不同浓度活性蛋白对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抑制作用

Table 1 Inhibition effect of different concentrations of bioactive proteins on *S. aureus* and *E. coli*

实验菌株 Tested strains	明绿豆活性蛋白浓度 Concentrations		
	$80 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$	$200 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$	$400 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	-	+
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	-	-

注:“-”未表现抑制作用,“+”表现出抑制作用,抑菌圈直径 $0 \sim 10 \text{ mm}$

Note:“-”no inhibition,“+”showed inhibition, inhibitory zone diameter between 0 and 10 mm

抗菌蛋白 TLP 的量为 $300 \mu\text{g}$ 时对棉花枯萎病菌和玉米纹枯病菌等真菌有抑制作用,但对细菌没有抑制作用^[18]。

表 2 明绿豆活性蛋白的抑菌作用

Table 2 Antimicrobial activity of the bioactive protein from Ming mung bean

实验菌株 Tested strains	抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter (mm)
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	10.6 ± 0.36
玉米纹枯病菌 <i>R. solani</i>	12.8 ± 0.70
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	4.2 ± 0.32
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-

3.5 活性蛋白分子量测定

如图 4 所示,采用 HPLC 方法测定纯化后明绿豆活性蛋白的分子量,仅出现一个单峰,峰尖保留时间为 11.783 min ,分子量为 33.8 kDa 。但该峰在保留时间区间 $11.582 \sim 12.042 \text{ min}$ 内峰形表现出良好的对称关系,而随着物质进一步的流出,峰形开始展宽,呈现不对称状态,实验过程中反复调节洗脱条件仍未能达到理想效果,推测该活性蛋白或许非单一组分,故而根据其展宽时间对应的相对分子量,推测其相对分子量在 $29.7 \sim 33.8 \text{ kDa}$ 之间。已有研究表明,具有抗菌作用的几丁质酶分子质量在 $25 \sim$

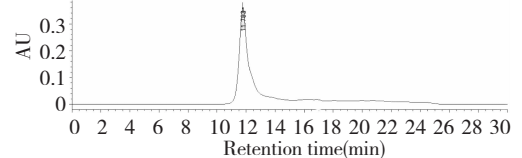


图4 纯化后明绿豆活性蛋白 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of the bioactive protein from Ming mung bean after purification

35 kDa 之间^[19], 本实验结果与该范围相一致, 因此推测此抗菌蛋白可能是几丁质酶及其同工酶, 其具体性质还有待进一步研究。

3.6 纯化过程中蛋白含量变化

如表 3 所示, 最终得到具有抗菌活性的蛋白 3.4 mg, 每 100 g 明绿豆粗蛋白获得抗菌蛋白 90.1 mg; 与王丽波^[20] 提取的南瓜籽抗真菌蛋白得率 1142.1 mg/100 g 相比含量较低, 但明显高于李奕雅^[1] 提取的花生抗真菌蛋白得率 2.02 mg/100 g。

表 3 蛋白质含量测定结果

Table 3 Determination results of content of bioactive protein from Ming mung bean

步骤 Procedure	蛋白含量 Protein content(mg)
硫酸铵分级沉淀 Precipitation with ammonium sulfate	3773.6
CM-52	41.3
Sephadex G-75	3.4

4 结论

本实验通过硫酸铵分级沉淀、阳离子交换层析 CM-52 和葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 等纯化步骤, 得到具有抑菌作用的明绿豆活性蛋白。该蛋白对棉花枯萎病菌、玉米纹枯病菌有一定抑制作用, 抑菌效果在一定范围内呈现浓度依赖效应; 对金黄色葡萄球菌也表现出一定的抑制作用但相对较弱, 其抗真菌活性高于抗细菌活性; HPLC 方法测定该蛋白相对分子量在 29.7 ~ 33.8 kDa 之间。

参考文献

- Li YY(李奕雅), Wang SY(汪少芸), Ye XY(叶秀云), et al. Purification and activity identification of the antifungal protein from *Arachis hypogaea*. *J Chin Inst Food Sci Technol* (中国食品学报), 2006, 6: 243-246.
- Wang Q(王琼), He QJ(何清君). Recent advances in antimicrobial peptides from plants. *J Sichuan Univ, Nat Sci* (四川师范学院学报, 自科版), 2000, 21: 141-145.
- Lam SL, Wang HX, Ng TB. Purification and characterization of novel ribosome inactivating proteins, alpha-and beta-pisavins, from seeds of the garden peapismum sativum. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 253: 135-142.
- Murdock LL, Huesing JE, Nielsen SS, et al. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, 1990, 29: 85-89.

- Li C(李晨), Bai CZ(白承之), Li YY(李玉英), et al. Isolation and antifungal properties of a new protein from adlay seeds(*Coix chinensis*). *Food Sci* (食品科学), 2012, 33: 46-48.
- Liu DD(刘冬冬), Zhou F(周峰), Zhou ND(周楠迪), et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the proteolytic product of laver protein. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 1921-1925.
- Phansri K, Sarnthima R, Thammassirak S, et al. Antibacterial activity of *Bauhinia acuminata* L. seed protein extract with low hemolytic activity against human erythrocytes. *Chiangmai J Sci*, 2011, 38: 242-251.
- Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Chinese Dictionary of Traditional Chinese Medicine(中药大辞典). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986. 2272.
- Mubarak AE. Nutritional composition and anti-nutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chem*, 2005, 89: 489-495.
- Zhao SX(赵守训), Huang TK(黄泰康), Ding ZZ(丁志尊). Chinese Dictionary(中药辞海). Beijing: Chinese Medicine Publishing House, 1997. 642-643.
- Yao Y, Cheng XZ, Ren GX. Contents of D-chiro-Inositol, vitexin, and isovitexin in various varieties of mung bean and its products. *Agric Sci China*, 2011, 10: 1710-1715.
- Kanatt SR, Arjun K, Sharma A. Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls. *Food Res Int*, 2011, 44: 3182-3187.
- Anjum NA, Umar S, Iqbal M, et al. Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbateglutathione cycle metabolism. *Russian J Plant Physiol*, 2011, 58: 92-99.
- Zhu LC(朱立成), Wang XS(王祥胜), Liu W(刘文), et al. Studies on the anti-fungal activity of the extracts from sixteen kinds of Chinese herbs. *Plant Prot* (植物保护), 2007, 33: 83-86.
- Gao JF(高俊凤). Experimental Guide for Plant Physiology(植物生理学实验指导). Beijing: Higher Education Press, 2008. 142.
- Ng TB. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*, 2004, 25: 1215-1222.
- Niu WN(牛卫宁), Guo AG(郭蔼光). Purification and characterization of an antimicrobial protein from seeds of *Ginkgo biloba*. *Acta Bot Borealis-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23: 1545-1549.