

文章编号:1673-1689(2006)01-0089-03

甘薯糖蛋白脱游离蛋白的研究

赵梅, 丁霄霖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究了用 Sevage 法脱除甘薯糖蛋白中游离蛋白的工艺条件, 通过单因素试验, 提出了影响甘薯糖蛋白脱游离蛋白的主要因素, 并通过正交试验进一步优化工艺条件, 确定影响甘薯糖蛋白脱游离蛋白的主次因素分别为样液与试剂的比例、脱蛋白次数、氯仿与正丁醇的比例、脱蛋白时间, 试验结果表明, 样液与试剂的体积比为 2 : 1, 氯仿与正丁醇的体积比为 2 : 1, 脱蛋白次数为 3 次, 脱蛋白时间为 20 min 时, 脱游离蛋白的效果较好。

关键词: 甘薯; 糖蛋白; 脱蛋白

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Study on Removal of Protein from Sweet Potato Glycoprotein

ZHAO Mei, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The technology and condition of removing protein from sweet potato glycoprotein were developed using Sevage method. The best operating condition was determined by experiments of single factor. Major factors affecting the removal rate were determined by the experiments of single factor. The removing technology was chosen by orthogonal test. The significant of the factors affecting the extraction rate was as follow: sample liquid and Sevage liquid ratio, protein removal cycle numbers, chloroform and 1- butanol ratio, and protein removal time. The result showed that the best operation condition was that, sample liquid and Sevage liquid ratio of 2, chloroform and 1- butanol ratio of 2, protein removal cycle numbers of 3, and protein removal time of 20 minutes.

Key words: sweet potato; glycoprotein; removal of protein

糖蛋白是一类十分重要的糖复合物, 广义地讲, 凡是通过共价键与蛋白质相结合的糖复合物都可称为蛋白糖^[1]。但随着这一领域研究工作的广泛开展、大量资料的积累及其对研究对象的日益深入的了解, 现已将蛋白聚糖从糖蛋白中划分出来^[2]。因此目前“糖蛋白”的概念是专指由比较短、往往是分支的寡糖链与多肽链共价相连所构成的

糖复合物。在大多数情况下糖的部分所占的比例比较小^[3]。糖蛋白广泛存在于动物、植物和某些微生物中, 甚至还存在于单细胞有机体和病毒中。在生物体内它以不同的形式存在而发挥作用, 是细胞膜、细胞间基质、血浆、粘液、激素等的重要构成成分^[4,5]。日本营养学家最近发现甘薯中含有一种独特的粘蛋白, 具有抑制胆固醇在体内沉积、增强机

收稿日期: 2004-11-09; 修回日期: 2004-12-25.

作者简介: 赵梅(1978-), 女, 山东潍坊人, 食品科学与工程硕士研究生。
万方数据

体免疫力、减少高血压发生率、减慢人体器官老化速度等特殊生理功能^[6]。

在甘薯糖蛋白的提取、分离、纯化及结构研究中,脱蛋白是一个重要的环节。作者在大量实验的基础上选择了 Sevage 法作为脱除甘薯糖蛋白中的游离蛋白。研究了 Sevage 法脱除甘薯糖蛋白中游离蛋白的最佳条件。为进一步进行甘薯糖蛋白的分离、提取及其结构研究提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

甘薯:常州产,紫罗兰3号;AB104-N型天平:梅特勒-托利多有限公司制造;LXJ-II型离心沉淀机:上海医用分析仪器厂制造;UV755B分光光度计:上海精密科学仪器有限公司制造;DJ-04型中草药粉碎机:上海淀久中药机械制造有限公司制造;SK-1快速混匀器:江苏金坛环保仪器厂制造。

1.2 方法

1.2.1 糖蛋白的分离 原料→清洗→去皮→烘干→粉碎→水浸提→离心分离→上清液醇析→离心→沉淀物分别用乙醚、丙酮洗涤脱脂脱色→沉淀物用少量水溶解→粗糖蛋白液

1.2.2 蛋白质含量的测定 Folin-酚法,以牛血清白蛋白为标准品^[7]。

准确称取牛血清白蛋白 15 mg,置 100 mL 容量瓶中,加水溶解后稀释至刻度制成储备液。分别吸取储备液 0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 置试管中,加水稀释至 1 mL,向各管中加入 Folin-酚甲试剂 5.0 mL,混匀,于 20~25 ℃ 放置 10 min;加 Folin-酚乙试剂 0.5 mL,迅速混匀,于 30 ℃ 水浴保温 30 min,以蒸馏水为空白,在 640 nm 处测定吸光度,得回归方程为 $Y=0.0024X+0.0281$,相关系数为 $R^2=0.9958$,呈良好的线性关系。

1.2.3 Sevage 法 样液中加入氯仿-正丁醇混合液,充分震荡,离心,将水相与氯仿相分开,上层即为脱游离蛋白的糖蛋白溶液。

1.2.4 操作要点 ① 烘干:温度为 60 ℃;② 粉碎:粉碎程度为 80 目;③ 水浸提:温度为室温;④ 离心:转速 3 000 r/min,离心 20 min;⑤ 醇沉:加 3 倍体积分数 97% 的乙醇。

2 结果与分析

2.1 样液与 Sevage 试剂不同比例对脱蛋白效果的影响

采用氯仿:正丁醇为 4:1,脱蛋白时间为 20

min,比较样液与 Sevage 试剂不同比例对甘薯糖蛋白脱蛋白效果的影响。结果见图 1。

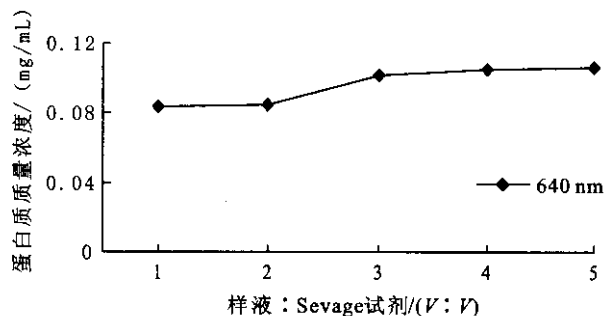


图1 不同比例的样液与 Sevage 试剂对脱蛋白效果的影响

Fig. 1 Effect of the different chloroform and seavage ratio on protein removing

由图 1 可知随着样液与 Sevage 试剂比例的降低,蛋白质的质量浓度逐渐减少。当样液与 Sevage 试剂的比例为 2:1 时,蛋白质质量浓度降低不明显。这是因为样液中的蛋白质一部分是游离蛋白,另一部分是与多糖以共价键连接的糖蛋白。而 Sevage 法是一种较温和的脱蛋白方法,只能脱除游离蛋白。所以当 Sevage 试剂增加到一定程度后,样液中的游离蛋白大部分已被除去,剩下的是结合蛋白。因此样液与 Sevage 试剂的比例为 2:1 时脱蛋白较佳。

2.2 氯仿与正丁醇的比例不同对脱蛋白的影响

采用样液与 Sevage 试剂的比例为 2:1,脱蛋白的时间为 20 min,比较氯仿与正丁醇的不同比例对脱蛋白效果的影响。结果见图 2。

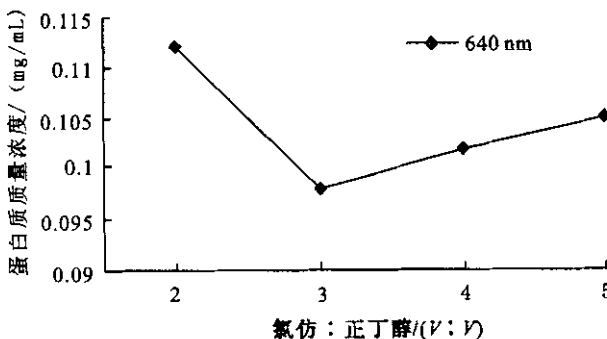


图2 不同比例的氯仿与正丁醇对脱蛋白效果的影响

Fig. 2 Effect of the different chloroform and 1- butanol ratio on protein removing

由图 2 可看出蛋白质的质量浓度随氯仿与正丁醇比例的不断增大,先降低后增大。在氯仿与正丁醇的比例为 3:1(V:V)时,蛋白质的质量浓度最低。这是因为在 Sevage 法脱蛋白中,起主要作用的是氯仿,正丁醇只是促进蛋白变性。样液加入氯仿后通过震荡、离心,变性后的蛋白在氯仿相和水

相间形成一层胶状物。开始时当氯仿量所占比例越大,脱除的蛋白就越多;但氯仿量增加到一定程度后脱蛋白的效果就开始降低,这可能是因为正丁醇所占比例太少与氯仿协同作用的脱蛋白效果就比较低,因而蛋白质的质量浓度又会上升。实验结果为氯仿与正丁醇的比例为 3 : 1(V : V)时脱蛋白效果较佳。

2.3 脱蛋白次数对脱蛋白效果的影响

采用样液与 *Sevage* 试剂的比例为 2 : 1(V : V),氯仿:正丁醇为 3 : 1(V : V),脱蛋白的时间为 20 min,研究脱蛋白次数对脱蛋白效果的影响。结果见图 3。

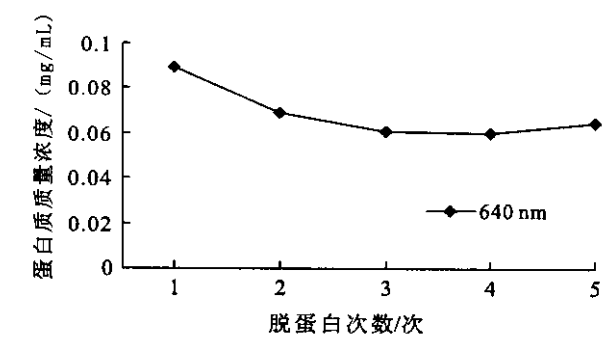


图 3 脱蛋白次数对脱蛋白效果的影响

Fig. 3 Effect of the removal oprotein cycle numbers removing

由图 3 可知蛋白质质量浓度随着脱蛋白次数的增加而减少,但是脱蛋白 3 次后,蛋白质质量浓度降低的就不明显。这是因为 3 次以后大部分的游离蛋白已被脱去。从经济方面考虑以脱 3 次为宜。

2.4 脱蛋白时间对脱蛋白效果的颖响

采用样液与 *Sevage* 试剂的比例为 2 : 1(V : V),氯仿:正丁醇为 3 : 1(V : V),研究脱蛋白时间对脱蛋白效果的影响。结果见图 4。

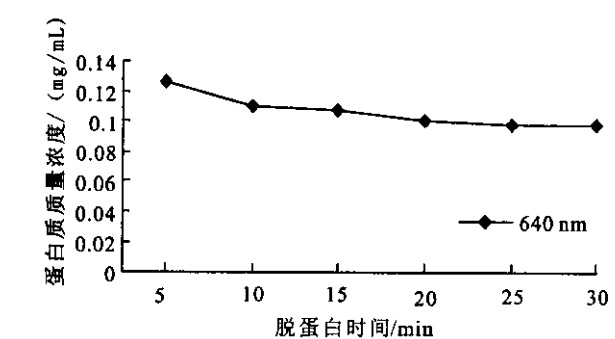


图 4 脱蛋白时间对脱蛋白效果的影响

Fig. 4 Effect of the removal time on protein removing

由图 4 可知随着脱蛋白时间的延长,蛋白质的质量浓度逐渐减少。20 min 以后蛋白质的含量几乎就不再降低。所以选择 20 min 为脱蛋白的时间。

2.5 优化甘薯糖蛋白脱游离蛋白的正交实验

在单因素的实验的基础上,设计了 4 因素 3 水平的正交实验表(见表 1),实验结果见表 2。

表 1 实验因素水平

Tab. 1 The level of experimental factor				
水平	因素			
	A 样液:试剂的比例	A 样液:试剂的比例	C 脱蛋白次数/次	D 脱蛋白时间/min
1	1	2	2	15
2	2	3	3	20
3	3	4	4	25

表 2 $L_9(3^4)$ 实验方案及实验结果分析

Tab. 2 $L_9(3^4)$ experimental scheme and analysis of experimental result					
实验号	A 样液:试剂的比例	B 氯仿:正丁醇的比例	C 脱蛋白次数/次	D 脱蛋白时间/min	蛋白质量浓度/(mg/mL)
1	1(1)	1(2)	1(2)	1(15)	0.106
2	1	2(3)	2(3)	2(20)	0.078 2
3	1	3(4)	3(4)	3(25)	0.069 3
4	2(2)	1	2	3	0.063 1
5	2	2	3	1	0.053 6
6	2	3	1	2	0.077 5
7	3(3)	1	3	2	0.055 2
8	3	2	1	3	0.065 1
9	3	3	2	1	0.064 3
K_1	0.253 5	0.224 3	0.248 6	0.223 9	
K_2	0.194 2	0.196 9	0.205 6	0.155 7	
K_3	0.681 4	0.211 1	0.178 1	0.197 5	
R	0.487 2	0.027 4	0.070 5	0.068 2	

表 2 极差分析结果表明,影响甘薯糖蛋白脱游离蛋白因素的主次顺序为: $A>C>B>D$,最佳脱游离蛋白条件为: $A_2B_2C_3D_2$,即样液与试剂的比例为 2,氯仿与正丁醇的比例为 2,脱蛋白次数为 3 次,脱蛋白时间为 20 min 时,脱游离蛋白的效果较好。

3 结 论

根据试验结果影响甘薯糖蛋白得率的主次因素依次为样液与试剂的比例、脱蛋白次数、氯仿与正丁醇的比例、脱蛋白时间提取时间。甘薯糖蛋白在样液与试剂的比例为 2 : 1(V : V),氯仿与正丁醇的比例为 2 : 1(V : V),脱蛋白次数为 3 次,脱蛋白时间为 20 min 时,脱游离蛋白的效果较好。

(下转第 114 页)

[33]Fishman M L. Characterization of pectin, flash—extraction from orange albedo by microwave heating under pressure[J]. **Carbohydrate Res**, 2000, 323: 126—138.

[34] 周志,汪兴平. 茶多糖提取分离技术研究[J]. **食品与发酵工业**,2002 ,28 (3) :83.

[35] Pare. Microwave-assisted Natural Products Extraction [P]. USA Patent 5002784,1991-03-08.

[36]Lopez-Avila V. Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosobenic assay [J]. **Trends in Analytical Chemistry**, 1996,15 (8) : 334—340.

[37] Chen S S. Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials[J]. **J Microwave and Electro-magnetic Energy**, 1994,29(4): 231.

[38] Suomi J. Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. **J Chromatogr A**, 2000, 868: 73.

[39] Pan X J. Microwave-assisted extraction of tanshinones from salvia miltiorrhiza bunge with analysis by high—performance liquid chromatography[J]. **J Chromatogr A**, 2001, 922: 371.

[40] 姚中铭, 吕晓玲, 褚树成. 栀子黄色素提取工艺的研究[J]. **天津轻工业学院学报**, 2001,(39):423—428.

[41] 陈猛,袁东星,许鹏翔. 微波法萃取辣椒中辣椒素的研究[J]. **食品科学**,1999,(10):25—27.

[42] Incorvia Mattina M J, Iannucci Berger W A, Densonm C L. Micrawave-assisted extraction of taxanes from Taxus Bio-mass [J]. **J Aganic Food Chem**, 1997, 45:4691.

[43] Pan X J. Microwave assisted extraction of tanshinones from salvia miltiorrhiza bunge with analysis by high performance liquid chromatography[J]. **J Chromatogr A**, 2001, 922 : 371.

[44] Carro N. Microwave assisted extraction of monoterpenols in must samples[J]. **Analyst**, 1997, 122 : 325.

[45] Chee K K, Wong M K, Lee H K. Determination of organochlorine pesticides in water by membranous solid-phase extrac-tion, and in sediment by microwave-assisted solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection [J]. **J Chromatography A**, 1996, 736(1 + 2): 211—218.

[46] 王琴,关建山,刘文根. 微波法萃取芝麻油的工艺研究[J]. **中国油脂**,2002,27(4):11—12.

[47] Hong N, Yaylayan V A, Rayhavan G S, et al. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed[J]. **Nat Prod Lett**, 2001, 15 (3):197.

[48] Bureau S, Razungles A, Baumes R, et al. Glycosylated flavor precursor extraction by microwaves from grape juice and grapes[J]. **J Food Sci**, 1996, 61 (3):557.

[49] Kaufmann Beatrice, Christen Philippe, Veuthey Jean-Luc. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withano-lides[J]. **Phytochem Anal**. 2001, 12:327.

[50] Para J R Jocelyn, Sigouin Michel. Microwave-assisted natural products extraction [P]USP: 5002784A, 1991-03-26.

[51] Enders B, Schwedl G. Supercritical fluid extraction, microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the analysis of PCBs in soil and sewage sludge [J]. **Journal Fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung**, 1997, 339(3):2501.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 91 页)

参考文献:

[1] J Montreuil, J F G Vliegenthart. Glycoproteins[J]. **Amsterdam Elsevier**,1995,2:41—43.

[2] Beeley J G. Glycoprotein and proteoglycan techniques,as laboratory techniques in biochemistry and molecular biology[M]. Elsevier. Amsterdam; New York; Oxford,1985.

[3] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,1987.

[4] 孙册,莫汗庆. 糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢[M]北京:科学出版社,1998.

[5] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京:军事医学出版社,1995.

[6] 杨立明,陈赐民. 浅谈甘薯综合开发利用[J]. **国外农学—杂粮作物**,1995,2:44—45.

[7] 胡明方,王光慈. 食品分析[M]. 重庆:西南师范大学出版社,1992.

(责任编辑:杨 萌)