

文章编号:1009-038X(2003)05-0030-04

# 小麦胚水溶性提取物中蛋白质的化学特性分析

周惠明, 钱海峰, 朱科学  
(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:**通过凝胶色谱(Sephadex G-100)从小麦胚水溶性提取物中分离出两种蛋白组分 WGPP1 和 WGPP2. 化学组成分析表明, WGPP1 和 WGPP2 的总糖质量分数分别为 47.24% 和 46.96%. 气相色谱分析显示, WGPP1 中的单糖主要为鼠李糖和葡萄糖, WGPP2 中的单糖主要为鼠李糖、甘露糖和葡萄糖. 紫外吸收光谱分析表明, WGPP1 在碱的作用下发生  $\beta$ -消去反应, 说明其糖肽键属 O-型.

**关键词:**小麦胚; 水溶性提取物; 糖蛋白

中图分类号: Q 513.2

文献标识码: A

## Chemical Properties Analysis of the Protein in Water-Soluble Extracts from Wheat Germ

ZHOU Hui-ming, QIAN Hai-feng, ZHU Ke-xue

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

**Abstract:** The gel chromatography separation on Sephadex G-100 showed that two glycoproteins (WGPP1 and WGPP2) existed in WGWE, with the total sugar contents of 47.24% and 46.96%, respectively. Gas chromatography analysis of monosaccharides indicated that rhamnose and glucose mainly existed in WGPP1, while rhamnose, mannose and glucose mainly existed in WGPP2. The UV spectra data at 240 nm were compared by treating WGPP1 with and without alkali. The results indicated that the  $\beta$ -elimination reaction occurred in WGPP1, and the linkage between the glycan and protein of WGPP1 was O-linkage.

**Key words:** wheat germ; water-soluble extracts; glycoprotein

作为小麦加工的一种副产品,小麦胚是一种非常宝贵的资源,具有很高的营养价值<sup>[1]</sup>. 功能食品的兴起,将小麦胚的研究引向更深的层次. 小麦胚中的多种生理活性物质成为研究的热点<sup>[2,3]</sup>,研究人员应用超临界流体萃取、膜分离、离子交换色谱、凝胶过滤色谱等技术提取、分离、纯化小麦胚中的生理活性物质.

但关于小麦胚蛋白质结构与功能的研究报道

很少,作者采用凝胶层析、气相色谱、紫外扫描等分析测试手段,对小麦胚水溶性提取物中糖蛋白进行分离纯化,并对其化学组成、单糖组成和糖肽键特征进行了分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验原料 新鲜小麦胚芽由上海福新面粉

收稿日期 2003-02-27; 修回日期 2003-05-15.

基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK2001020)资助课题.

作者简介 周惠明(1957-),男,江苏无锡人,教授,博士.

厂提供。

**1.1.2 主要试剂** Sephadex G100 为 Pharmacia 公司产品。小分子标准蛋白质为中国科学院上海生物化学研究所产品。其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 主要仪器与设备** ZOPR-52D 高速冷冻离心机:日本东京 Hitachi Koki 公司制造;721-分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品;ZFQ85A 旋转蒸发仪:上海医械专机厂生产;层析柱(规格:1.6 cm×90 cm):上海精科生物有限公司生产;DHL-A 电脑恒流泵和 BSZ-100 自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂产品;UV-1100 紫外分光光度计:北京瑞利分析仪器厂生产;GC-14A 气相色谱仪:日本岛津公司产品。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 小麦胚水溶性提取物制备** 新鲜小麦胚筛掉细粉,灭酶(电热烘箱 105 ℃ 鼓风,15 min),索氏抽提法脱脂后粉碎(过 60 目筛)。

脱脂麦胚粉与去离子水按  $m(g):V(mL)=1:8$  的比例混合,在机械搅拌下 25 ℃ 提取 60 min。提取液在高速冷冻离心机上离心分离(10 000 r/min,15 min),上清液即为小麦胚水溶性提取物(WGWE)。

**1.2.2 小麦胚水溶性蛋白质分离** 采用 80% 饱和度的硫酸铵溶液对 WGWE 进行盐析(25 mL WGWE 中加硫酸铵 15 g),静置 30 min 后,离心分离(10 000 r/min,10 min)。倾去上清液,沉淀用定量的去离子水溶解,静置 30 min 后,重复离心一次,取上清液,进行第二次和第三次盐析。第三次盐析离心得到的沉淀,透析脱盐后冷冻干燥,得到小麦胚水溶性蛋白质。

**1.2.3 小麦胚水溶性蛋白质凝胶层析** 0.5 g 小麦胚水溶性蛋白质用 10 mL 去离子水溶解,3 000 r/min 离心后取上清液 0.3 mL,上 Sephadex G-100 凝胶柱进行层析分离。洗脱液为 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0);体积流量 0.07 mL/min;每 3 mL 收集一管;用紫外光度计检测 280 nm 的吸收值。

**1.2.4 糖含量测定** 采用蒽酮-硫酸法检测<sup>[4]</sup>。

配制 2 g/L 蒽酮试剂:溶解 2 g 蒽酮于浓硫酸中,当日配制使用。

配制 100 mg/mL 标准葡萄糖溶液:葡萄糖烘干后,取 1 000 mg,加蒸馏水溶解并定容到 10 mL,当日配制使用。

标准曲线:量取葡萄糖标准溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 mL,加蒸馏水补足至 1.0 mL,再加入 4.0 mL 蒽酮试剂,迅速浸于冰水浴冷却。各管加完

后一起浸于沸水浴,管口加盖玻璃球,防止水分过度蒸发,准确煮沸 10 min 后取出,用自来水冷却,室温放置 10 min 后,于 620 nm 比色。以同样方法处理的重蒸水为空白。

样品测定:分别取 Sephadex G-100 凝胶柱分离得到的流出物 WGPP1、WGPP2 0.05 mL、0.1 mL,按标准曲线同样的方法进行测定。

**1.2.5 蛋白质质量测定** 采用 Folin-酚试剂法<sup>[5]</sup>。以酪蛋白为标准蛋白,作标准曲线,测定波长为 650 nm。样品根据蛋白质质量作适当稀释后进行测定。根据测得的吸光度,通过标准曲线计算出样品中的蛋白质质量。

**1.2.6 单糖组成分析** 采用衍生化气相色谱法进行分析<sup>[6]</sup>。

WGPP1 和 WGPP2 在 50 ℃ 以下进行真空浓缩,使蛋白质质量浓度提高至 10 mg/mL,取 1 mL,加入 2 mL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液后,抽真空封管;90 ℃ 水解 6 h,水解液以固体 BaCO<sub>3</sub> 中和,之后滤去沉淀,用去离子水洗涤沉淀 2 次,合并滤液,真空浓缩至无水。

加入 10 mg 盐酸羟胺 0.5 mL 吡啶,放入 90 ℃ 水浴反应 30 min,取出后冷却至室温,加入 0.5 mL 醋酸酐,在 90 ℃ 条件下继续反应 30 min,反应物进行气相色谱分析。

气相色谱分析条件:色谱柱:弹性石英毛细管柱,内径 0.32 mm,长 30 m;固定液:OV-1701;载气: N<sub>2</sub>,体积流量 1.5 mL/min;检测器:氢火焰检测器(FID);气化室温度 280 ℃,检测温度 260 ℃,程序升温:180→250 ℃(30 min),升温速度 3 ℃/min。

比较标准单糖和样品的保留时间,确定样品中的单糖种类,根据峰面积计算单糖的摩尔比。

**1.2.7 糖肽键特征分析** 采用 β-消去反应和紫外扫描的方法进行分析<sup>[7]</sup>。

取样品 2 mL,加入 0.2 mol/L NaOH 1 mL,在 45 ℃ 保温 3 h 后,测定紫外吸收光谱。

根据用碱处理前后 WGPP1 和 WGPP2 在 240 nm 处的紫外吸收强度,分析是否发生 β-消去反应,确定 WGPP1 和 WGPP2 是否为 O-型糖肽键。

## 2 结果与讨论

### 2.1 凝胶层析得到 2 个主要组分

小麦胚水溶性提取物经 Sephadex G-100 凝胶柱后的洗脱曲线见图 1。从图中可以看出小麦胚水溶性提取物由多个组分组成,其中有 2 个组分(WGPP1 和 WGPP2)的含量最多,其余组分分离度不是很高,并

且含量相对较少.显然, WGPP1 和 WGPP2 是小麦胚水溶性提取物中蛋白质的主要成分.

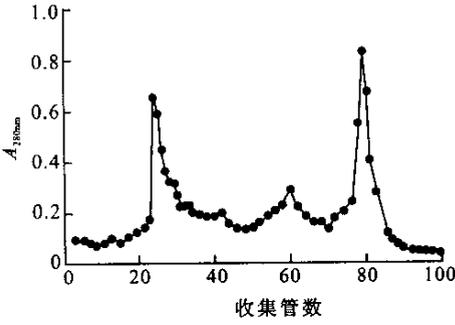


图1 小麦胚水溶性提取物的凝胶层析图

Fig.1 Elution pattern of water-soluble extracts from wheat germ on Sephadex G-100

### 2.2 WGPP1 和 WGPP2 的糖和蛋白质质量浓度

用蒽酮-硫酸法测得 WGPP1、WGPP2 中总糖质量浓度分别为 0.43 mg/mL 和 0.62 mg/mL.

Folin-酚法测得 WGPP1、WGPP2 的蛋白质质量浓度分别为 0.13 mg/mL 和 0.19 mg/mL.

测定结果表明, WGPP1、WGPP2 中都含有糖成分, 并且糖所占的质量分数比较高, 分别达到了 47.24% 和 46.97%.

### 2.3 单糖组成分析结果

WGPP1、WGPP2 的气相色谱分析结果见图 2, 3. 图 4 是标准单糖的气相色谱分析结果.

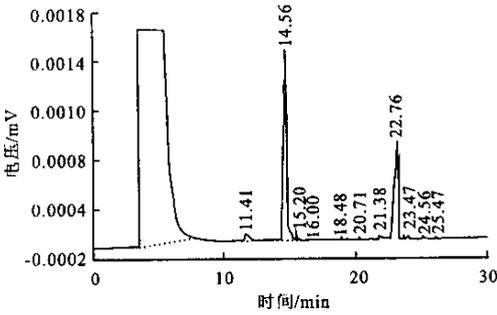


图2 WGPP1 的气相色谱分析图谱

Fig.2 Gas chromatogram of WGPP1

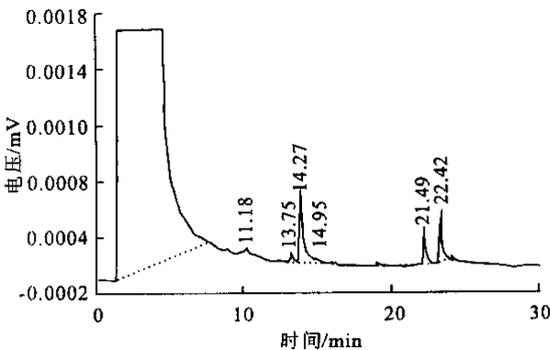


图3 WGPP2 的气相色谱分析图谱

Fig.3 Gas chromatogram of WGPP2

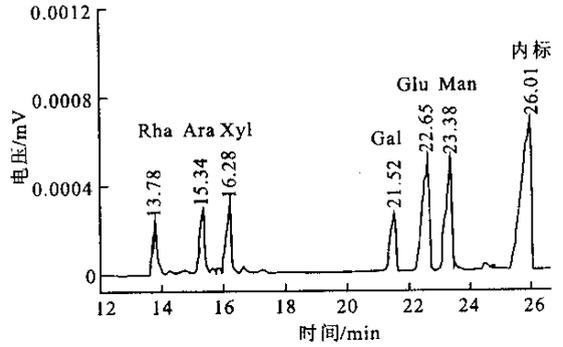


图4 标准单糖的气相色谱分析图谱

Fig.4 Gas chromatogram of standard monosaccharides

在 WGPP1 单糖分析气相色谱图上出现 2 个峰, 与标准单糖图谱相对照可知, 这 2 种单糖分别为鼠李糖和葡萄糖, 其摩尔比为 2:1.

在 WGPP2 单糖分析气相色谱图上出现 3 个峰, 与标准单糖图谱相对照可知, 这 3 种单糖分别为鼠李糖、甘露糖和葡萄糖, 其摩尔比为 3:1:2.

### 2.4 糖肽键特征

WGPP1 用碱处理前后的紫外吸收光谱见图 5, 6; WGPP2 用碱处理前后的紫外吸收光谱见图 7~8.

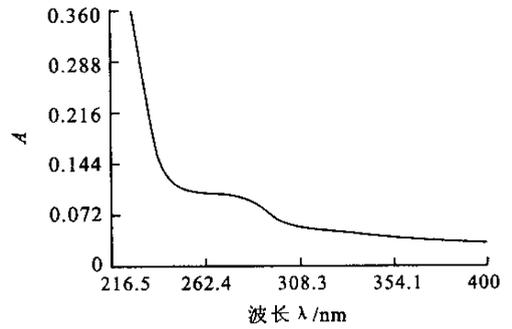


图5 WGPP1(前)紫外吸收光谱图

Fig.5 UV spectra of WGPP1 (without NaOH)

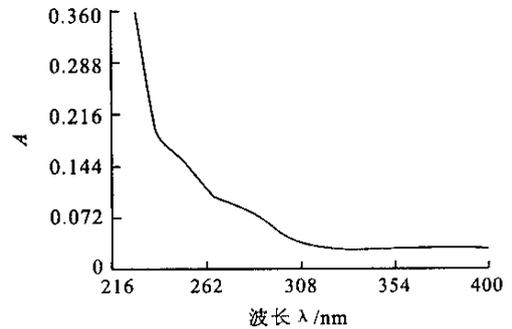


图6 WGPP1(后)紫外吸收光谱图

Fig.6 UV spectra of WGPP1 (with NaOH)

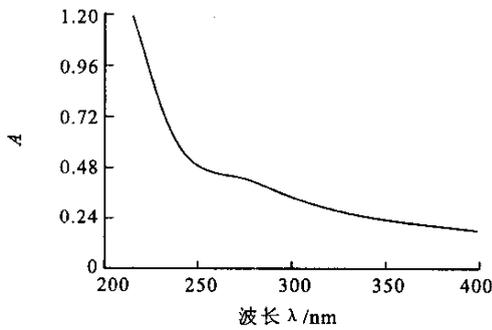


图 7 WGPP2 前紫外吸收光谱图

Fig. 7 UV spectra of WGPP2 (without NaOH)

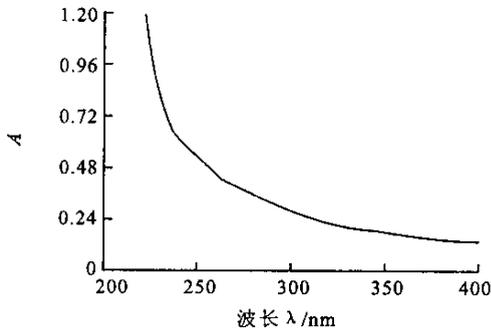


图 8 WGPP2 后紫外吸收光谱图

Fig. 8 UV spectra of WGPP2 (with NaOH)

单糖与蛋白质中某一肽段的连接是糖蛋白的重要结构特征。目前发现的多种连接方式中,主要有两类:一类是糖链与天冬酰胺连接,称为 N-连接

## 参考文献:

- [1] Amado R, Arigoni E. Nutritive and functional properties of wheat germ [J]. *International Food Ingredients*, 1992, 4: 30-34.
- [2] Ge Y, Sun A, Ni Y, et al. Some Nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(12): 6215-6218.
- [3] Krings U, El Saharty Y S, Berger R G. Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ [J]. *Food Chemistry*, 2000, 71(1): 91.
- [4] 李建武,袁明秀. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 216.
- [5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265-275.
- [6] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 37-38.
- [7] Plarter J J, Carlson C M. Studies of mucin-type glycoprotein [J]. *Anal Biochem*, 1975, 65: 153-163.

(责任编辑: 杨萌)

(上接第 29 页)

- [6] Lee D S, Haggard P E, Lee J, et al. Model for fresh produce respiration in modified atmosphere based on principles of enzyme kinetics [J]. *J Food Sci*, 1991, 56: 1580-1585.
- [7] Weichmann J. The effect of controlled atmosphere storage on the sensory and nutritional quality of fruits and vegetables [J]. *Hort Rev*, 1986, 8: 101.
- [8] Makino Y, Iwasaki K, Hirata T. A theoretical model for oxygen consumption in fresh produce under atmosphere with carbon dioxide [J]. *J Agri Eng*, 1996a, 65: 193-203.

(责任编辑: 杨勇)

糖蛋白;另一类与丝氨酸或苏氨酸连接,称为 O-连接。在稀碱溶液的作用下,O-型糖肽键能发生  $\beta$ -消去反应,与糖链连接的丝氨酸转化成  $\alpha$ -氨基丙烯酸,苏氨酸转化为  $\alpha$ -氨基丁烯酸,形成的不饱和氨基酸在 240 nm 处有明显的紫外吸收。

WGPP1 经碱处理后的紫外吸收光谱图上,240 nm 处的吸收明显增加,发生了  $\beta$ -消去反应,说明其糖肽键为 O-型糖肽键,而 WGPP2 经碱处理后的紫外吸收光谱图上,240 nm 处的吸收没有明显增加,没有发生  $\beta$ -消去反应,说明其糖肽键不属于 O-型糖肽键。

## 3 结 论

小麦胚水溶性提取物中含有 WGPP1 和 WGPP2 2 种糖蛋白;化学组成分析表明,WGPP1、WGPP2 中都含有糖成分,并且糖所占的质量分数比较高,分别达到了 47.24% 和 46.97%;气相色谱分析显示,WGPP1 的单糖组成主要为鼠李糖和葡萄糖,这 2 种糖的摩尔比约为 2:1;WGPP2 的单糖组成主要为鼠李糖、甘露糖和葡萄糖,这 3 种糖的摩尔比为 3:1:2;紫外吸收光谱比较,可以看出 WGPP1 在碱的作用下发生  $\beta$ -消去反应,表明在 WGPP1 分子结构中存在 O-型糖肽键。