

文章编号:1673-1689(2006)03-0088-05

苦荞粉蛋白质的分级制备及理化性质

郭晓娜, 姚惠源, 陈正行

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对苦荞粉蛋白进行了分级制备, 并对其理化性质进行测定分析。结果表明, 苦荞蛋白组分中清蛋白的质量最高(43.82%), 其次为谷蛋白(14.58%), 醇溶蛋白(10.50%), 球蛋白的质量最低(7.82%); 还原和非还原条件下的 SDS-PAGE 表明 4 种蛋白组分中均有二硫键的存在; 与 FAO/WHO 推荐的氨基酸模式相比, 除了球蛋白一些必需氨基酸稍微缺乏之外, 其余 3 种组分均含有充足的必需氨基酸; DSC 分析表明苦荞清蛋白和球蛋白的变性温度分别为 81.34 °C 和 98.43 °C。

关键词: 苦荞蛋白质; SDS-PAGE; DSC; 理化性质

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Fractionation and Physi-chemical Properties of Tartary Buckwheat Protein

GUO Xiao-na, YAO Hui-yuan, CHEN Zheng-xing

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Buckwheat protein was reported to have some physiological properties. It is a valuable and potential ingredient for food industry. The present study was conducted to fractionate tartary buckwheat protein, and evaluate its physi-chemical properties. The results showed that albumin was the predominant protein fraction (43.82%) followed by glutelin (14.58%), prolamin (10.50%), and globulin (7.82%); SDS-PAGE analysis under nonreductive and reductive conditions showed that disulfide bonds existed in the four fractions. Compared with FAO/WHO reference pattern, the four fractions had adequate amounts of essential amino acids for child and adult except that several essential amino acids in globulin were slightly inadequate. DSC analysis showed that denaturation temperature of albumin and globulin was 81.34 °C and 98.43 °C, respectively.

Key words: tartary buckwheat; protein; SDS-PAGE; DSC; physicochemical properties

荞麦属于蓼科(Polygonaceae), 荞麦属(Fagoprum), 是双子叶植物。中国是荞麦生产大国, 荞麦的分布极其广泛, 其中甜荞主要分布在内蒙古、

甘肃、山西等省, 苦荞主要分布在西南地区的云南、四川、贵州等省, 尤其是四川省的凉山州是中国苦荞麦分布最集中, 种植面积最大的产区。

收稿日期: 2005-03-24; 修回日期: 2005-06-13.

作者简介: 郭晓娜(1978-), 女, 河南新密人, 粮食、油脂及植物蛋白工程博士研究生.

万方数据

近年来荞麦蛋白的生理功能逐渐引起许多学者的关注,如:降低血液胆固醇^[1-2],阻止 7,12—二甲苯蒽诱发的乳腺癌^[3],抑制胆结石的形成^[4],抗衰老^[5]等。国际谷物协会(ICC)把荞麦称之为一种新的潜在的颇具开发前景的功能性食品配料。随着我国经济建设的快速发展,人们生活水平的日益提高,人们对于健康的消费也日益剧增。大力开发利用中国的苦荞资源,不仅可以满足国民的健康需求,而且能够为加快西部地区的发展做出贡献。

最近几年很多有关荞麦蛋白的生理功效的文献陆续发表,然而有关荞麦蛋白理化性质的研究相对较少,尤其是对于中国特有品种—苦荞更是较少。本文主要对苦荞粉蛋白质的分级分离、多肽链组成和相对分子质量分布、氨基酸组成以及热力学特性等理化性质进行了研究,这在国内外未见相关报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料 苦荞粉:购于四川省凉山州小杂粮粉厂。

1.1.2 主要试剂 丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺均为电泳级;低相对分子质量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 ZOPR-52D 冷冻离心机:日本东京 Hitachi Koki Co 公司产品;Agilent 1100 液相色谱:美国安捷伦公司产品。DYY-Ⅲ 23A 型电泳槽和 ECP300 三恒多用电泳仪:北京市六一仪器厂产品;PYRIS-1 差热扫描量热分析仪:美国 Perkin Elmer 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 脱脂方法 取一定量的苦荞粉按照 1:5 (g:mL)加入正己烷,室温下脱脂 12 h,其间换正己烷 4~5 次,脱脂后将苦荞粉置于通风橱中挥发 48 h,脱脂苦荞粉装入具塞试剂瓶中,置于冰箱 4℃ 保存备用。

1.2.2 苦荞粉蛋白质的分级制备

1) 清蛋白 取 100 g 脱脂苦荞粉,加入到蒸馏水中(料水比为 1:10),室温下搅拌提取 1 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,沉淀重复提取一次,离心,上清液合并后浓缩,冷冻干燥所得产品即为清蛋白组分。

2) 球蛋白 清蛋白提取后的沉淀加入到 1 mol/L NaCl 中(料水比为 1:10),室温下搅拌提取

1 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,沉淀重复提取一次,离心,上清液合并后于 4℃透析 48 h,沉淀冷冻干燥后即 为 球 蛋 白 组 分。

3) 醇溶蛋白 球蛋白提取后的沉淀加入到 55% 正丙醇中(料水比为 1:10),室温下搅拌提取 1 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,沉淀重复提取 1 次,离心,上清液合并后旋转蒸发浓缩,然后冷冻干燥,所得产品即为醇溶蛋白。

4) 谷蛋白 醇溶蛋白提取后的沉淀加入到 0.05 mol/L NaOH 中(料水比为 1:10),室温下搅拌提取 1 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,沉淀重复提取一次,离心,上清液合并后加入三氯乙酸至最终浓度 10%,于 4℃,10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用冷丙酮洗涤两次,冷冻干燥,所得产品即为谷蛋白。

1.2.3 SDS-PAGE^[6] 采用不连续系统凝胶配置,分离胶浓度 12 g/dL,浓缩胶浓度 4 g/dL,电极缓冲液(内含 0.1 g/dL SDS、0.05 mol/L Tris-0.384 mol/L 甘氨酸缓冲液 pH 8.3)。

用垂直板电泳槽,以 1 g/dL 琼脂封底。

1)20 mL 分离胶配置:6.66 mL 分离胶贮液(30 g/dL Acr—0.8 g/dL Bis)、2.50mL 分离胶缓冲液(pH 8.9 Tris—HCl)、0.20 mL 10 g/dL SDS、2.00 mL 1 体积分数 TEMED、8.54 mL 重蒸馏水、0.10 mL 10 g/dL AP 混合而成。

2)10 mL 浓缩胶配置:3.00 mL 浓缩胶贮液(10 g/dL Acr—0.5 g/dL Bis)、1.25 mL 浓缩胶缓冲液(pH6.7Tris—HCl)、0.10 mL 10 g/dL SDS、1.00 mL 1% 体积分数 TEMED、4.60 mL 重蒸馏水、0.05 mL 10 g/dL AP 混合而成。

每个样品加 20 μL,采用 SDS-PAGE 低相对分子质量标准蛋白。电泳开始时电流为 10 mA 左右,待样品进入分离胶后,改为 20 mA 左右,当染料前沿距硅胶框底边约 1 cm 时停止电泳。

凝胶采用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.4 氨基酸组成分析 样品溶于一定量的 5.7 mol/L 的盐酸溶液中,移入水解管封管后,在 110℃水解 20~24 h,切开封管,抽干后,采用 OPA 柱前自动衍生,上 Agilent 1100 液相色谱仪进行氨基酸组成分析。

1.2.5 样品的 DSC 测定 称取 1 mg 蛋白冷冻干燥制品置于铝盒中,然后再用微量注射器向铝盒中添加 10 μL 的 0.01 mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液,然后将样品置于 4℃过夜平衡。以空铝盒为空白对照,氮气流速 20 mL/min,扫描范围为 20~120

℃,升温速率为 10 ℃/min。

2 结果与讨论

2.1 苦荞蛋白质组分的含量与及纯度

苦荞蛋白质组分的含量及纯度见表 1。从表中我们可以看出,清蛋白含量最高,占总蛋白的 43.82%,其次为谷蛋白(14.58%),醇溶蛋白(10.50%),球蛋白的含量最低,占总蛋白的 7.82%。由此可见,苦荞中主要的蛋白组分是可溶性蛋白(清蛋白和球蛋白),溶解性能很好,这是蛋白质最主要的功能性质,这也为苦荞蛋白在食品工业中的应用奠定基础。

表 1 苦荞蛋白质的组分组成比例及蛋白质含量
Tab.1 Distribution and purity of protein fractions of defatted tartary buckwheat flour

组分	各组分的蛋白质 质量分数/%	占总蛋白的 质量分数/%
清蛋白	41.80	43.82
球蛋白	92.94	7.82
醇溶蛋白	30.77	10.50
谷蛋白	75.49	14.58

2.2 苦荞蛋白质组分的 SDS-PAGE 分析

苦荞蛋白质组分的 SDS-PAGE 分析见图 1,低相对分子质量蛋白电泳标准曲线见图 2。从图 1 可以知道,在非还原条件下,清蛋白主要亚基的相对分子质量分别为 64 000,57 000,41 000 和 38 000 Da,此外,有一些含量较低的亚基分布在 22 000~14 000 Da 之间;球蛋白主要亚基的相对分子质量分别为 64 000,57 000,41 000,38 000,34 000,28 000,26 000,23 000,21 000,19 000 和 15 000 Da;醇溶蛋白主要亚基的相对分子质量分别为 17 000 和 15 000 Da,其次有两个含量较低的亚基分别为 20 000 和 14 000 Da;谷蛋白亚基的相对分子质量分布在 66 000~14 000 Da 之间,并且一些亚基相对分子质量较大,不能进入 4 g/dL 的浓缩胶,分辨率较低。

在还原条件下,清蛋白主要亚基的相对分子质量分别为 41 000,38 000,21 000 和 20 000Da,此外,有一些含量较低的亚基分布在 20 000~13 000 Da 之间;球蛋白主要亚基的相对分子质量分别为 41 000,38 000,29 000 和 24 000 Da,而且还有 5 条含量较高的谱带,集中分布于 20 000~13 000 Da 之间;醇溶蛋白主要亚基的相对分子质量分别为 29 000,26 000,17 000 和 15 000 Da;谷蛋白亚基的

相对分子质量分布在 43 000~14 000 Da 之间,并且仍有一些亚基相对分子质量较大,不能进入 4 g/dL 的浓缩胶。

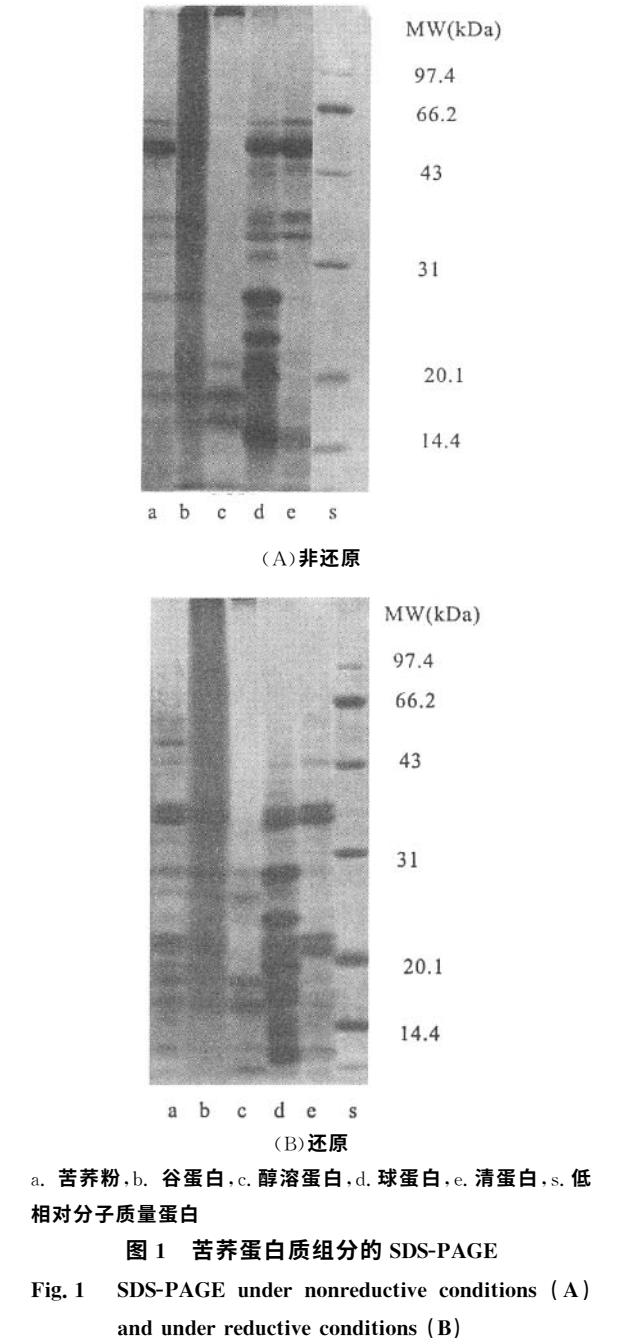


图 1 苦荞蛋白质组分的 SDS-PAGE
Fig.1 SDS-PAGE under nonreductive conditions (A)
and under reductive conditions (B)

2.3 苦荞蛋白质组分的氨基酸分析

苦荞蛋白质组分的氨基酸分析见表 2。清蛋白含有较高的组氨酸、苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和赖氨酸;球蛋白含有较高的蛋氨酸和赖氨酸;醇溶蛋白含有较高的组氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;谷蛋白含有较高的组氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。与推荐的氨基酸模式相比,除了球蛋白一些必需氨基酸稍微缺乏之外,4 种组份均含有充足的必需氨基酸。

对于非必需氨基酸来说,4 种组份中都含有较高含量的谷氨酸和天冬氨酸。

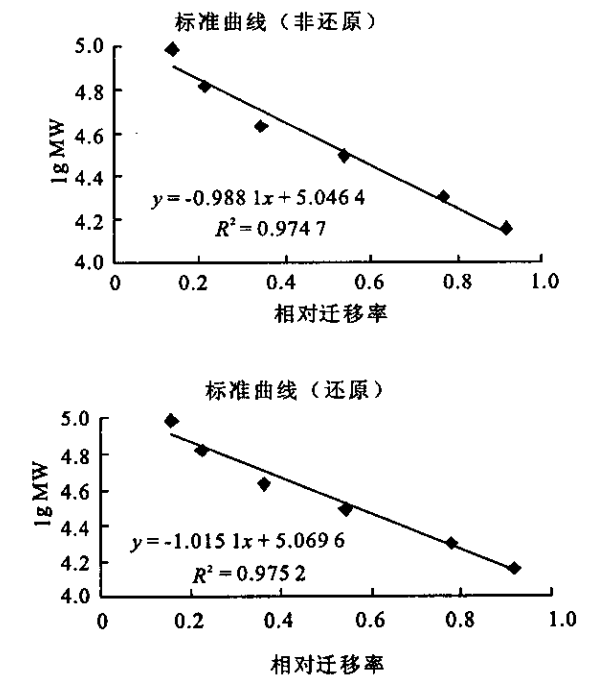


图 2 低相对分子质量蛋白质电泳标准曲线
Fig. 2 The standard curve of electrophoresis

表 2 苦荞蛋白质组分的氨基酸分析
Tab. 2 Amino acid composition of protein fractions (g/100g protein)

氨基 酸	清 蛋 白	球 蛋 白	醇溶 蛋 白	谷 蛋 白	FAO/WHO 推荐模式	
					小孩	成人
Asp	10.54	9.72	7.07	9.97		
Glu	20.20	30.29	11.61	20.52		
Ser	5.45	3.87	4.36	5.01		
His	2.51	1.99	3.87	2.67	1.9	1.6
Gly	6.04	4.40	6.43	5.69		
Thr	3.69	2.91	5.54	3.61	3.4	0.9
Ala	5.58	8.31	3.11	5.73		
Arg	8.76	4.58	14.67	8.15		
Tyr	2.73	2.84	4.63	3.36		
Cys	2.99	2.52	3.41	2.48		
Val	4.78	3.37	5.88	5.31	3.5	1.3
Met	1.60	5.18	1.63	1.81	2.5	1.7
Phe	5.28	3.92	4.56	4.89	6.3	1.9
Ile	3.74	2.42	4.29	4.14	2.8	1.3
Leu	6.18	4.49	9.06	6.64	6.6	1.9
Lys	5.90	5.31	4.30	5.29	5.8	1.6
Pro	3.97	3.85	5.54	4.67		

2.4 苦荞蛋白质组分的 DSC 分析

热变性温度是食品蛋白质的一个重要的加工

影响因素,因为蛋白质的变性会导致蛋白质高级结构的展开,各种食品功能性质的明显降低或丧失。因此测定食品蛋白的变性温度及过程对于蛋白质的应用具有重要的指导意义。

苦荞清蛋白和球蛋白 DSC 分析结果如图 3 和图 4 所示。实验中醇溶蛋白和谷蛋白没有检测到变性温度,估计在制备过程中已经变性。清蛋白的变性温度为 81.34℃,球蛋白的变性温度为 98.43℃。这与其它谷物相比,明显高于其它谷物蛋白的热变性温度,这表明苦荞蛋白质的热稳定较好。

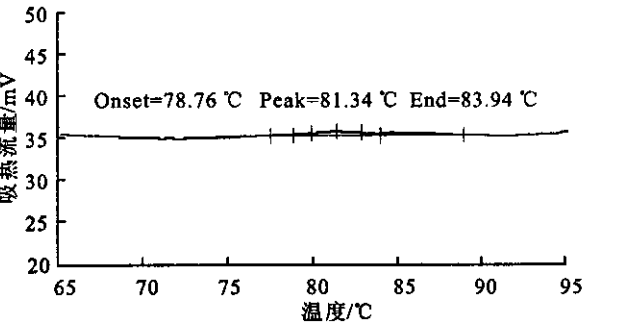


图 3 苦荞清蛋白 DSC 分析扫描曲线
Fig. 3 Thermogram of buckwheat albumin obtained by DSC

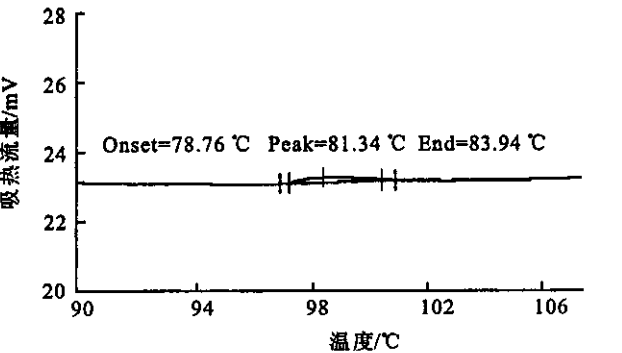


图 4 苦荞球蛋白 DSC 分析扫描曲线
Fig. 4 Thermogram of buckwheat globulin obtained by DSC

3 结 论

苦荞蛋白质组分中清蛋白的质量分数最高(43.82%),其次为谷蛋白(14.58%),醇溶蛋白(10.50%),球蛋白的质量分数最低(7.82%);还原和非还原条件下的 SDS-PAGE 表明 4 种组分中均有二硫键的存在;与 FAO/WHO 推荐的氨基酸模式相比,除了球蛋白一些必需氨基酸稍微缺乏之外,4 种组份均含有充足的必需氨基酸;DSC 分析表明苦荞清蛋白的变性温度为 81.3℃,而球蛋白的为 98.4℃。

参考文献：

[1] Jun Kayashita. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. **J Nutr**, 1997, 127:139.

[2] Hiroyuki Tomotake. Stronger suppression of plasma cholesterol and enhancement of the fecal excretion of steroids by a buckwheat protein product than by a soy protein isolate in rats fed on a cholesterol-free diet[J]. **Biosci Biotechol Biochem**, 2001, 65 (6): 1412—1414.

[3] Jun Kayashita. Consumption of a buckwheat protein extract retards 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats[J]. **Biosci Biotechol Biochem**, 1999, 63 (10): 1837—1839.

[4] Hiroyuki Tomotake. A buckwheat protein products suppression gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters[J]. **J Nutr**, 2000, 130(7): 1670—1674.

[5] 张政, 苦荞蛋白复合物的营养成分及其抗衰老作用的研究[J]. **营养学报**, 1999, 21(2): 159—162.

[6] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994,216—222.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 40 页)

参考文献：

[1] Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast[J]. **Proc Natl Acad USA**,1978, 75(4):1929—1933.

[2] Beggs J D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid[J]. **Nature**,1978, 275: 104—109.

[3] Bundock P, Amkeden D R, Beijersbergen A G M, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **The EMBO Journal**, 1995, 14(3): 3206—3214.

[4] Piers K L,Heath J D,Liang X Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,1996, 93: 1613—1618.

[5] Li Yanli, Shen Wei, Zhuge Jian. Isolation and sequence analysis of the gene *Ura3* encoding the orotidione-5'-phosphate decarboxylase from candida glucerinogenes WL2002-5 an industrial glycerol producer[J]. **Yeast**, 2005, 22(6): 423—430.

[6] 匡小婴,饶志明,诸葛健,等. 影响根癌农杆菌电击转化条件的研究[J]. **食品与生物技术学报**,2005,24(4):13—16.

[7] Frank L W Takken,Ringo van Wijk, Caroline B Michielse, et al. A one-step method to convert vectors into binary vectors suited for *Agrobacterium*-mediated transformation curr[J]. **Genet**,2004, 45: 242—248.

[8] 单世华, 李春娟, 张君诚,等. 农杆菌质粒 DNA 提取方法的改良与鉴定[J]. **生物技术**, 2003, 13(4): 19—20.

[9] 周小玲, 沈微, 诸葛健,等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. **微生物学通报**, 2004, 31(4): 89—92.

[10] Bundock P, Hooykaas P J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome gy illegitimate recombination[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1996, 93: 15272—15275.

(责任编辑:李春丽)