

玉米胚芽蛋白的分离及物化特性研究

宋春丽, 任健, 马云飞

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 齐齐哈尔大学农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要: 采用碱溶酸沉法提取玉米胚芽分离蛋白, 利用氨基酸分析和电泳分析胚芽蛋白的氨基酸组成和有效亚基组成。凝胶层析分离玉米胚芽蛋白组分, 并对各组分进行热变性温度及圆二色谱分析。氨基酸分析结果表明, 玉米胚芽蛋白中谷氨酸和赖氨酸含量较高, 其它氨基酸含量较均衡。还原的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)图主要有九条谱带, 其分子量依次为 87.988、76.320、69.650、53.649、48.546、38.164、34.337、32.294 和 24.483 kDa。凝胶层析分离获得两个蛋白组分。差示扫描量热仪(DSC)分析表明分离所得两个组分的干粉变性温度分别为 97.37 °C 和 98.95 °C, 圆二色谱(CD)分析表明两个蛋白组分的二级结构主要为 β -折叠和无规卷曲。

关键词: 玉米胚芽蛋白; 凝胶层析; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳; 差示扫描量热仪; 圆二色谱

文章编号: 1673-9078(2013)6-1255-1258

Isolation and Characterization of Corn Germ Protein

SONG Chun-li, REN Jian, MA Yun-fei

(College of Food and Bioengineering, Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

Abstract: In this work, the isolation and characterization of corn germ protein extracting by traditional method was studied. The results showed an amino acid balance in the obtained protein except for Glu and Lys which showed high contents. SDS-PAGE analysis revealed that there were nine components in corn germ protein isolate with the molecular weight being of 87.988, 76.320, 69.650, 53.649, 48.546, 38.164, 34.337, 32.294 and 24.483 kDa, respectively. Two fractions separated from corn germ protein by gel filtration chromatography were obtained. Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis showed that the denaturation temperature of the obtained fractions were 97.37 and 98.95 °C, respectively. The secondary structure analyzed by (CD) revealed that the main conformation of the obtained fractions were β -sheet and random coil.

Key words: corn germ protein isolate; gel filtration chromatography; SDS-PAGE; differential scanning calorimetry; circular dichroism

我国是玉米生产大国, 但对玉米中蛋白质成分的利用不多。玉米胚芽粕是玉米胚芽制油后获得的副产物, 粗蛋白含量为 23~25%^[1], 在工厂中大多将含有大量蛋白质的胚芽饼等副产品作为饲料出售。如果从该粕中制取分离蛋白, 对提高胚芽蛋白资源的利用将起到积极的作用。国内外有关脱脂玉米胚芽粕的利用研究主要集中在: 采用石油醚、正己烷等有机溶剂脱脂, 然后对脱脂后所得胚芽粕中蛋白组分有关得率和质量^[2]以及功能性质^[3~4]进行研究, 但是就其分离及特性, 尤其是结构特性的研究较少。

本研究首先采用碱溶酸沉法提取玉米胚芽分离蛋白, 利用 SDS-PAGE 和氨基酸分析仪对玉米胚芽分离蛋白有效组分的亚基组成和氨基酸组成进行了分析。

收稿日期: 2013-01-17

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(210067)

通讯作者: 任健(1970-), 男, 教授, 研究方向为植物蛋白深加工技术

然后, 利用凝胶层析分离玉米胚芽蛋白组分, 并对各组分进行热变性温度及二级结构分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

玉米胚芽由吉林黄龙食品股份有限公司提供。十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺(Acr)、N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、四甲基乙二胺(TEMED)、 β -巯基乙醇均为电泳级; 低分子量标准蛋白质为上海生化所产品, 其余试剂均为分析纯试剂。

E7B4B3-7 型冷冻干燥机, 天美公司; J-810 圆二色光谱仪, 日本 JASCO 公司; PYRIS-1 DSC-7 差热分析仪, 美国 Perkin Elmer 公司; H-835-50 氨基酸分析仪, 日本 Hitachi Koki 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 碱溶酸沉法提取玉米胚芽分离蛋白

以玉米胚芽粕粉为原料,采用碱溶酸沉法提取玉米胚芽分离蛋白。提取条件为:NaOH浓度为0.08 mol/L、温度50℃、料液比1:21、浸提时间为1.5 h。

1.2.2 玉米胚芽分离蛋白的氨基酸组成分析

称取150 mg的蛋白样品于安瓿管中,然后加入5 mL 6 mol/L的盐酸溶液进行酸水解,充氮封管后,110℃水解24 h以上。切开封管,洗涤定容,抽干后,采用邻苯二甲醛(OPA)柱前自动衍生^[5](脯氨酸是与氯甲基苄胺 Fmoc 反应的^[6]),上 Agilent 1100 液相色谱仪进行氨基酸组成分析。

胱氨酸和半胱氨酸含量的测定采用在水解之前过甲酸氧化的步骤进行,测定结果以胱氨酸的含量计^[7]。色氨酸的测定采用碱水解的方法^[8],110℃水解20 h,然后再进行洗涤定容、中和、抽干后进行邻苯二甲醛 OPA 柱前自动衍生,上 Agilent 1100 液相色谱仪进行氨基酸组成分析。

1.2.3 玉米胚芽分离蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳

根据 Laemmli (1976)^[9]的方法,浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为12%。蛋白样品溶于0.025 M Tris-Gly 缓冲液中(pH=8.3),点样量20 μL。凝胶用30%甲醇和12.5%三氯乙酸固定,0.1%考马斯亮蓝进行染色,10%甲醇和10%冰醋酸混合液进行脱色,在凝胶成像系统上进行拍照和分析。低分子量标准蛋白为:鸡蛋清溶菌酶(14.4 kDa)、胰蛋白酶抑制剂(20.1 kDa)、牛碳酸酐酶(31.0 kDa)、兔肌动蛋白(43.0 kDa)、牛血清蛋白(66.2 kDa)、兔磷酸化酶 B (97.4 kDa)。

1.2.4 凝胶层析法测定玉米胚芽分离蛋白的分子量分布

选择2.5×85 cm 玻璃柱和 Sephacryl S-200 凝胶。取200 mg 玉米胚芽分离蛋白溶解于10 mL pH 7.2 磷酸盐缓冲液中。加样量10 mL,洗脱液为0.02 mol/L、pH=7.2的磷酸盐缓冲液,洗脱流速0.3 mL/min,部分收集器收集后,测定280 nm的吸光值。分别测定标准蛋白和蓝色葡聚糖2000的洗脱体积 V_e 和外水体积 V_0 ,并绘制标准曲线。标准蛋白为:铁蛋白(ferritin)、过氧化氢酶(catalase)、醛缩酶(aldolase)、伴清蛋白(conalbumin)和卵清蛋白(ovalbumin),分子量分别为438、240、158、75和43 kDa。

1.2.5 玉米胚芽分离蛋白的热变性分析

分别称取凝胶过滤分离所得的玉米胚芽蛋白组分5 mg置于密封铝型样品盒中,然后进行DSC扫描,氮气流速20 mL/min,扫描范围10~140℃,升温速率为10℃/min^[10]。

1.2.6 玉米胚芽分离蛋白圆二色谱(CD)分析

样品溶液的配制:用20 mmol/L, pH=7.2 磷酸盐

缓冲液提前一天配制蛋白溶液,浓度为0.1 mg/mL,将配制好的样品置于4℃冰箱中备用。

CD谱测定条件:测定远紫外区(184~250 nm)CD谱。采用光径0.1 cm,分辨率为0.2 nm,谱带宽度为1.0 nm,灵敏度为20 mdeg,响应时间为0.5 s,扫描速度为100 nm/min。室温下测定,重复扫描8次,累加得到CD谱图^[11]。

谱图处理:谱图经过一起本底清除和溶液空白差减,然后用根据Chen-Yang原理和最小二乘法编写的程序计算 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规卷曲的百分含量。

2 结果与讨论

2.1 玉米胚芽分离蛋白的氨基酸组成

玉米胚芽分离蛋白的氨基酸分析结果见表1。

表1 玉米胚芽分离蛋白的氨基酸组成(%)

Table 1 Amino acid composition of corn germ protein isolated

氨基酸	FAO 标准	玉米胚芽分离蛋白脱脂粕	玉米胚芽分离蛋白	大豆分离蛋白
必需氨基酸				
赖氨酸	5.5	5.9	7.4	6.1
苏氨酸	4.0	4.0	3.7	3.7
色氨酸	1.5	1.6	1.3	1.8
半胱氨酸	3.5	0.68	0.84	2.1
缬氨酸	5.0	6.8	6.8	4.8
亮氨酸	7.5	10.1	8.9	7.7
苯丙氨酸	3.0	4.2	4.9	5.4
异亮氨酸	4.0	4.02	3.98	4.9
非必需氨基酸				
丙氨酸		7.8	6.9	3.9
精氨酸		8.2	8.6	7.8
天冬氨酸		7.4	7.4	10.9
谷氨酸		13.1	13.8	20.5
甘氨酸		6.6	6.2	4.6
组氨酸		3.9	3.8	2.5
脯氨酸		7.6	5.7	4.1
丝氨酸		4.0	4.2	5.5
蛋氨酸		1.71	2.24	0.9
酪氨酸		2.6	2.9	3.7

从表1可以看出,玉米胚芽分离蛋白氨基酸含量中谷氨酸和赖氨酸含量较高,与大豆分离蛋白氨基酸组成比较接近。其他氨基酸含量较均衡。因此只要将玉米胚芽分离蛋白作为原料加入到缺乏谷氨酸和赖氨酸的食物中,就能有效地弥补其谷氨酸和赖氨酸的不足,进一步提高蛋白质的营养价值。

表 2 玉米胚芽分离蛋白的氨基酸种类分布 (%)

Table 2 Amino acid distribution of corn germ protein isolated

氨基酸类别	玉米胚芽蛋白 白脱脂粕	玉米胚芽 分离蛋白	大豆分 离蛋白
疏水性氨基酸 ^a	50.05	45.87	36.2
不带电极性氨基酸 ^b	11.18	11.81	15
碱性氨基酸 ^c	18.12	20.87	16.4
酸性氨基酸 ^d	20.52	21.34	32.4

注：^a包括Gly, Val, Leu, Pro, Met, Phe, Trp和Ile；^b包括Ser, Tyr, Cys和Tys；^c包括Lys, Arg和His；^d包括Asp和Glu。

从表2可以看出,玉米胚芽蛋白脱脂粕的疏水性氨基酸高于其余两种蛋白质组分,其酸性氨基酸和不带电性氨基酸含量最低,玉米胚芽分离蛋白的碱性氨基酸含量最高。

2.2 玉米胚芽分离蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

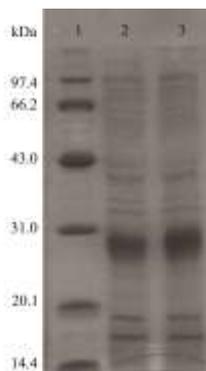


图 1 玉米胚芽分离蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis map of corn germ protein isolated

注:泳道 1 为标准蛋白;泳道 2、3 为玉米胚芽分离蛋白。

玉米胚芽分离蛋白的(SDS-PAGE)电泳图见图 1。从图 1 可以看出,玉米胚芽分离蛋白的 SDS-PAGE 谱图主要有九条谱带。计算结果表明九条谱带对应的分子量依次为 87.988、76.320、69.650、53.649、48.546、38.164、34.337、32.294 和 24.483 kDa。第七条带分子量为 34.337 kDa,含量比较高。

2.3 玉米胚芽分离蛋白的凝胶层析分离

利用 Sephacryl S-200 凝胶层析法分离玉米胚芽分离蛋白,洗脱曲线见图 2。

从图 2 可以看出,玉米胚芽分离蛋白主要含两个组分,此处定义为组分 CGP I 和 CGP II。根据标准蛋白质洗脱峰的位置计算洗脱体积 V_e ,然后以洗脱体积 V_e 与凝胶外水体积 V_0 比为横坐标,标准蛋白分子量的对数值 ($\lg Mr$) 为纵坐标,得到回归方程 $\lg Mr = -1.0206x + 6.683 (x = V_e/V_0)$ 。依据此回归方程计算得出玉米胚芽蛋白两个组分 CGP I 及 CGP II 对应的分子

量分别为 459 和 154 kDa。

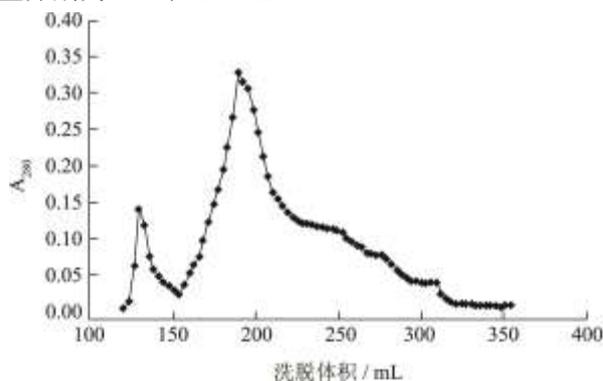


图 2 玉米胚芽分离蛋白的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of corn germ protein isolated

2.4 玉米胚芽分离蛋白的热变性分析

玉米胚芽蛋白组分 CGP I 和组分 CGP II 的变性温度的测定结果见图 3。

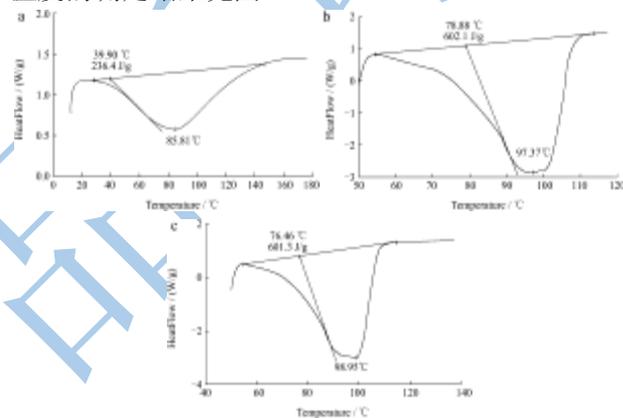


图 3 玉米胚芽分离蛋白及其分离组分的 DSC 曲线

Fig.3 DSC curves of corn germ protein isolated and fractions of CGP I and CGP II

注: a、b、c 分别为玉米胚芽分离蛋白、组分 CGP I、组分 CGP II。

从图 3 可以看出,玉米胚芽分离蛋白热变性温度为 85.81 °C,变性热为 236.4 J/g,与大多数食品蛋白质相比,其变性温度较高。而凝胶层析分离所得的 CGP I 和 CGP II 组分的热变性温度分别为 97.37 °C 和 98.95 °C。两个组分蛋白热变性温度很接近,但比玉米胚芽分离蛋白都高。

2.5 玉米胚芽蛋白圆二色谱(CD)分析

玉米胚芽蛋白组分 CGP I 和组分 CGP II 的远紫外 CD 光谱图见图 4。

采用 spectra manager 软件分析计算玉米胚芽蛋白两组分的结构,计算结果见表 3。

从表 3 可以看出,玉米胚芽分离蛋白中以 β -折叠和不规则卷曲为主,玉米胚芽分离蛋白属于 β -折叠型蛋白质。

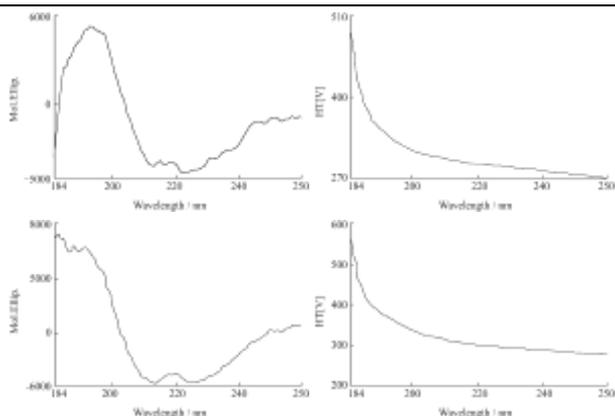


图4 CGPI 和 CGP II 的远紫外 CD 光谱图

Fig.4 Far-UV Circular dichroism spectra of CGPI and CGP II

表3 玉米胚芽蛋白组分 CGP I 与 CGP II 的二级结构

Table 3 Secondary structure composition of CGP I and CGP II separated from corn germ protein

	凝胶层析得组分	
	(CGP I)	(CGP II)
α-螺旋/%	13.8	16.8
β-折叠/%	57.7	45.9
β-转角/%	7.7	10.1
无规则卷曲/%	20.9	27.2

3 结论

3.1 玉米胚芽分离蛋白中谷氨酸和赖氨酸含量较高，而其他氨基酸含量较均衡，与大豆分离蛋白氨基酸组成比较接近。其他氨基酸含量较均衡。

3.2 凝胶层析表明玉米胚芽分离蛋白含有 2 个主要组分，分子量分别为 459 和 154 kDa。

3.3 玉米胚芽分离蛋白 SDS-PAGE 图由 9 条主带组成，分子量分别为 87.988、76.320、69.650、53.649、48.546、38.164、34.337、32.294 和 24.483 kDa。第七条带分子量为 34.337 kDa，含量比较高。

3.4 差示扫描量热仪(DSC)分析表明凝胶分离所得的玉米胚芽蛋白两个组分的干粉变性温度分别为 97.37 °C 和 98.95 °C。

3.5 圆二色谱 (CD) 分析凝胶分离所得的玉米胚芽蛋白两个组分的二级结构主要为 β-折叠和不规则卷曲。

参考文献

- [1] 张鸣镝,姚惠源.玉米胚芽蛋白及其在食品工业中的应用[J].食品科技,2006,5:124-127
- [2] Blessin C W. The functional requirements of proteins for foods [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1971, 48: 477-480
- [3] 陈文麟.玉米胚芽蛋白纯化技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2005
- [4] Guota H O. Effect of supplementation of processed maize germ cake on nutritional quality of maize [J]. Food Science and Technology, 2001, 38: 507-508
- [5] 阎隆飞.蛋白质分子结构[M].北京:清华大学出版社,1999
- [6] Jarrett H W, Cooksy K D, Ellis B, et al. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns [J]. Analytical Biochemistry, 1986, 153: 18-198
- [7] Nasholm T, Sandberg G, Ericsson A. Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives [J]. Journal of Chromatography A, 1987, 396: 225-236
- [8] Moore S. On the determination of cystine and cysteic acid[J]. Journal of Biological Chemistry, 1963, 238: 235-237
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1976, 227, 681-185
- [10] 朱科学,周惠明.麦胚球蛋白的分离制备及理化性质研究[J].中国粮油学报,2005,20:15-18
- [11] 李雪琴.蚕豆蛋白的制备制备及结构与功能性研究[D].江南大学博士论文,2003