

瓜蒌子副产物中蛋白质的提取及其分子性质研究

Studies on extraction and molecular properties of Gualou seed (*Semen Trichosanthis*) protein prepared from by-products

李向红 李敏 刘永乐 俞健 王发祥 王建辉

LI Xiang-hong LI Min LIU Yong-le YU Jian WANG Fa-xiang WANG Jian-hui

(1. 长沙理工大学食品与生物工程系, 湖南长沙 410114; 2. 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南长沙 410114)

(1. Department of Food and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Provincial Engineering Technology Research Center of Aquatic Food Resources Processing, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:采用分步提取法从瓜蒌子提油副产物中提取蛋白质, 并对其分子性质进行分析。结果显示: 瓜蒌子提油副产物中主要包含盐溶蛋白(提取率达 55.3%)和碱溶蛋白(提取率为 15.8%), 其中碱溶蛋白质分子上可能连接有色素基团, 导致其溶液为深褐色; 利用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定两种蛋白质的亚基分子量分布, 结果表明瓜蒌子中盐溶蛋白与碱溶蛋白的亚基分子量主要分布在 10~32 kDa; 体积排阻色谱分析显示碱溶蛋白中分子质量大于 10^6 Da 的蛋白质聚集体含量较盐溶蛋白多; 电子扫描显微镜观察发现盐溶蛋白微观上为直径 2~5 μm 的规则球状, 而碱溶蛋白为结构致密的聚集体。

关键词:瓜蒌子; 副产物; 盐溶蛋白; 碱溶蛋白; 分子性质

Abstract: In present study, Gualou seed proteins were extracted from its by-products, and the molecular properties of the proteins were also observed. The results showed that the Gualou seed proteins mainly consisted of salt-soluble protein (55.3% of extracting yield) and alkali-soluble protein (15.8% of extracting yield), and the alkali-soluble protein may be linked with pigments because the protein solution appeared to be dark brown. Sodium dodecyl sulfonate-polyacrylamide gelelectrophoresis analysis was used to test the subunit molecular weight distribution and the result revealed that subunits of salt-soluble and alkali-soluble proteins mainly distributed from 10 to 32 kDa. The molecular weight distribution of the samples, observed by size

exclusion chromatography showed that there were more fractions with large molecules larger than 10^6 Da in alkali-soluble protein. Microstructural observation by scanning electron microscopy displayed that the salt-soluble proteins were globular proteins with size of 2~5 μm , while alkali-soluble protein were aggregates with compact structure.

Keywords: Gualou seed; by-product; salt-soluble protein; alkali-soluble protein; molecular properties

瓜蒌(*Semen Trichosanthis*), 又名栝楼, 是中国传统的中药材^[1-2], 主产于山东、安徽、河南, 现已经扩大到河北、山西、陕西、整个长江流域, 以及华南、西南等地区。瓜蒌的果实、皮、仁、根、茎、叶等均可入药, 其种子即瓜蒌子主要含有脂肪酸、甾醇、三萜皂甙、蛋白质、多种氨基酸、维生素, 以及钙、铁、锌、硒等 16 种无机元素, 具有极高的营养价值^[3-5]。

瓜蒌子中油脂含量达到 26%~51%, 且富含不饱和脂肪酸^[6], 因此目前对瓜蒌子的研究^[7-9]多集中于对其功能性油脂的提取及其性质的分析上。然而, 瓜蒌子提油副产物中蛋白质含量高达 30% 以上, 且大多为生物活性蛋白, 目前这些副产物常被当作垃圾直接丢弃, 造成了极大的资源浪费和环境污染。迄今为止关于瓜蒌子中蛋白质的研究报导有限, 而且主要集中于对其有效蛋白成分进行比较^[10], 而对蛋白质的形态、结构等未进一步深入研究。在前期研究的基础上, 本研究拟采用改进的分步提取法提取瓜蒌子提油副产物中的蛋白质, 并采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和体积排阻色谱(SEC-HPLC)分析各蛋白样品的分子量组成^[11-12], 采用电子扫描显微镜(SEM)观察蛋白质表面微观结构^[13-15], 可为深入了解瓜蒌子蛋白质的价值及拓宽其应用范围提供一定的理论支持。

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号: 31101214, 31571867); 湖南省自然科学基金项目(编号: 13JJ4054); 湖南省教育厅优秀青年项目(编号: 14B009); 湖南省教育厅产业化培育项目(编号: 2015CY001)

作者简介:李向红(1979—), 女, 长沙理工大学副教授, 博士。
E-mail: xianghongl@163.com

通讯作者:刘永乐

收稿日期:2015-10-16

1 材料与方方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜干燥的瓜蒌子:湖南郴州产;

NaCl、HCl、NaOH、乙醇、考马斯亮蓝 R250、甘油、2-巯基乙醇、溴酚兰、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、甲醇、醋酸、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

标准蛋白(电泳用):上海瑞永生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高速万能粉碎机:FW100型,天津泰斯特仪器有限公司;

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S型,巩义市予华仪器有限责任公司;

pH计:DELTA 320型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

快速混匀器:SK-1型,金坛市医疗仪器厂;

高速离心机:LG10-24A型,北京金立离心机有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1型,北京博医康实验仪器有限公司;

紫外-可见分光光度计:UV2600型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

垂直电泳槽:迷你型,北京市六一仪器厂;

稳压稳流电泳仪:YY-5型,北京市六一仪器厂;

高效液相系统:LC-20A型,日本岛津公司;

环境扫描电镜:QUANTA200型,美国FEI公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质的分步提取 在前期研究^[16]工作的基础上,采用分步提取法提取瓜蒌子提油副产物中的蛋白质,提取工艺:

瓜蒌子超临界CO₂提油副产物→正己烷进一步脱脂→室温下自然干燥24h→粉碎过200目筛→蒸馏水提取水溶蛋白(料液比1:10, m:V)→离心→上清液冷冻干燥,沉淀采用5%的NaCl溶液提取盐溶蛋白(料液比1:10, m:V)→离心→上清液冷冻干燥,沉淀采用70%的乙醇溶液提取醇溶蛋白(料液比1:5, m:V)→真空抽滤→抽滤后的乙醇溶液真空干燥,沉淀水洗→0.05 mol/L NaOH溶液提取碱溶蛋白(料液比1:10, m:V)→离心→上清液用1 mol/L的HCl溶液调节pH值至等电点5.0→离心→透析→冷冻干燥→碱溶蛋白

提取过程中提取温度为室温,每步提取时间为1h,离心速度8000 r/min,离心时间15 min。

1.2.2 常规成分检测及蛋白质提取率测定

(1) 蛋白质含量的测定:采用凯氏定氮法,氮换算为蛋白质的系数为6.25^[17];

(2) 水分含量测定:采用直接干燥法^[18];

(3) 灰分含量测定:采用干法灰化法^[19];

(4) 蛋白质提取率测定:将分步提取的瓜蒌子蛋白干燥后称重,凯氏定氮法测定蛋白质的百分含量,按式(1)计算提

取率^[20]。

$$\text{蛋白提取率} = \frac{\text{提取的蛋白质质量}}{\text{原料中蛋白质质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 瓜蒌子蛋白质分子性质表征

(1) 亚基分子量分布:采用垂直板SDS-PAGE蛋白电泳法^[21]测定蛋白质亚基分子量分布,选取分离胶质量分数为12%,浓缩胶质量分数为5%;蛋白质溶液的质量浓度为2 mg/mL;染色液用考马斯亮蓝 R250;标准蛋白的分子量范围为10~200 kD。

(2) 相对分子量分布:采用体积排阻色谱法^[22](SEC-HPLC)测定。称取一定质量的瓜蒌子蛋白质用200 mmol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液(2% SDS)配制成质量分数0.05%的蛋白样品溶液,室温下搅拌30 min,8000 r/min离心10 min后,上清液用0.45 μm的微孔滤膜过滤后采用高效液相系统进行分析,色谱柱选用KW-804蛋白柱,流动相为200 mmol/L的磷酸盐缓冲溶液(2% SDS, pH 7.0),洗脱速率1 mL/min,在280 nm处检测洗脱液,柱温20℃。

(3) 超微结构的检测:采用扫描电镜观察瓜蒌子蛋白质的超微结构。因为蛋白质样品带电量小或不带电,且易发生飘移,所以需进行喷金处理,处理时间为60 s。

2 结果与分析

2.1 常规成分检测及蛋白质提取率分析

采用分步提取法提取瓜蒌子超临界CO₂提油副产物,对每步所得溶液冷冻干燥后发现,瓜蒌子中仅包含微量的水溶蛋白和醇溶蛋白,主要存在的是盐溶蛋白和碱溶蛋白,所以在后续研究中仅对这两种蛋白质的提取率、常规成分含量和分子性质进行分析,其蛋白质提取率及其常规成分的测定结果见表1。表1显示,盐溶蛋白的提取率为55.3%,碱溶蛋白的提取率为15.8%,前期研究通过凯氏定氮法测得瓜蒌子提油副产物的蛋白含量为30.2%,结合表1的数据可以发现,若将盐溶液(将其pH值调至8.0)提取法结合碱提取法对瓜蒌子蛋白进行两步提取其提取率可达71.1%,高于传统的单一法提取蛋白质^[12]。本研究中提取的碱溶蛋白的溶液为深褐色(见图1),采用活性炭对其脱色的效果也不明显,可能瓜蒌子碱溶蛋白上连接有色素基团,导致其溶液呈现较深的颜色,张荣超等^[10]对中国不同产区瓜蒌子的有效成分进行比较和研究,发现一种从瓜蒌种子中分离得到的蛋白质—瓜蒌素(分子量27 kDa)是一种碱性糖蛋白单链毒素,其与单克隆抗体缀合制备免疫毒素可用于对肿瘤的治疗,也可用于抑制和杀死存在于人体中的病毒等。本研究所提取的碱溶蛋白中可能包含有瓜蒌素,但还有待进一步提纯并解析其结构。

表1 蛋白质提取率及其常规成分检测结果(干基)

样品	蛋白质提取率	蛋白质含量	水分含量	灰分含量
盐溶蛋白	55.3	80.4	10.42	5.09
碱溶蛋白	15.8	87.8	10.82	3.18



左侧为碱溶蛋白, 右侧为盐溶蛋白

图 1 瓜蒌子蛋白质溶液

Figure 1 Protein dispersions of Gualou seed

2.2 瓜蒌子蛋白质分子性质表征

2.2.1 SDS—PAGE 分析瓜蒌子蛋白质亚基分子量分布

图 2 为瓜蒌子蛋白质的 SDS—PAGE 图谱, 经由 Gel-Pro Analyzer 软件分析图谱得到表 2。由图 2 和表 2 可知, 瓜蒌子盐溶蛋白与碱溶蛋白的亚基分子量都主要分布在 10~32 kDa。在瓜蒌子盐溶蛋白中分子量为 15.287 kDa 的亚基所占比例最大, 为 35.72%, 分子量为 31.646 kDa 的亚基所占比例为 21.77%; 碱溶蛋白中分子量为 31.670 kDa 的亚基所占比例最大, 为 46.71%, 分子量为 15.478 kDa 的亚基占总亚基量的 28%, 相比于瓜蒌子碱溶蛋白, 瓜蒌子盐溶蛋白小分子量的亚基含量较多。

2.2.2 SEC—HPLC 测定瓜蒌子蛋白质相对分子量分布

由图 3 可知, 盐溶蛋白中保留时间为 9.3 min 左右的蛋白为其主要组成部分, 占总量的 71.40%, 对比 Shodex KW-804 蛋白柱的标准曲线^[23], 可计算出其分子量主要分布于 200~300 kDa; 可以发现在 6 min 左右洗脱出一个峰, 因为柱子的洗脱极限为 10^6 Da, 因此估计此部分为分子量大于 10^6 Da 的蛋白质聚集体。

碱溶蛋白中, 出峰时间在 6.0~12.2 min 的几种蛋白质分离的不是特别明显。与盐溶蛋白相比, 保留时间为 6 min

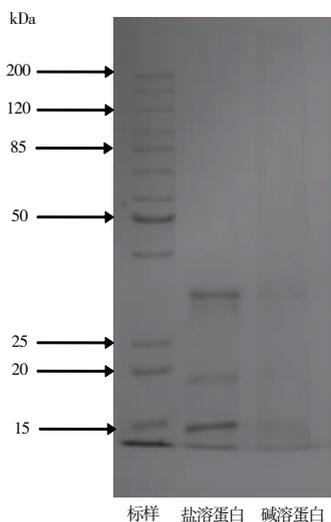


图 2 瓜蒌子蛋白质的电泳图谱

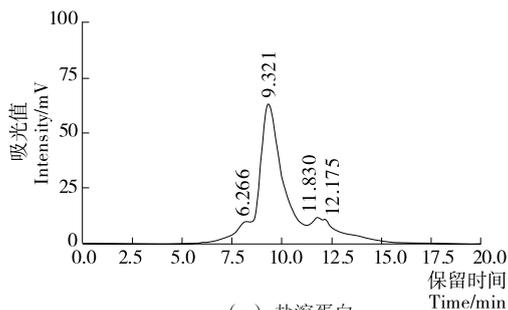
Figure 2 The electrophoresis graph of Gualou seed proteins

的大分子部分达到其总量的 7.45%; 保留时间为 9.5 min 左右的宽峰部分占总量的 69.67%, 与标曲对比可知其分子量主要分布在 67~158 kDa, 瓜蒌素的相对分子质量为 27 kDa^[10], 所以可能其只是碱溶蛋白中包含较少的一种组分; 出峰时间为 12.8 min 左右的蛋白占 20.27%, 其相应的分子量在 6 500 Da 左右, 而对比 SDS—PAGE 电泳分析结果,

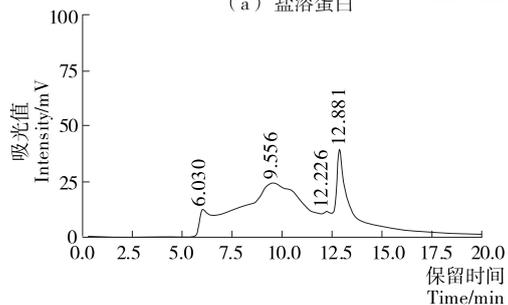
表 2 瓜蒌子蛋白质各条带的光密度值及相对分子质量

Table 2 Integrated optical density (IOD) and relative molecular weight of each band of Gualou seed proteins

样品条带	标样		盐溶蛋白		碱溶蛋白	
	分子量/kDa	光密度值	分子量/kDa	光密度值	分子量/kDa	光密度值
1	200	493.30	31.646	6 882.6	31.670	5 308.0
2	150	528.86	29.791	3 216.2	15.478	3 210.4
3	120	527.47	19.227	5 409.0	10.421	2 843.1
4	100	869.59	15.287	11 294.0		
5	85	1 203.30	10.271	4 810.4		
6	70	979.81				
7	60	1 550.40				
8	50	3 728.80				
9	40	3 043.70				
10	25	5 668.50				
11	20	7 720.70				
12	15	5 912.60				
13	10	8 752.60				
合计		40 980		31 612		11 362
泳道内		96 365		84 780		82 768
总值						



(a) 盐溶蛋白



(b) 碱溶蛋白

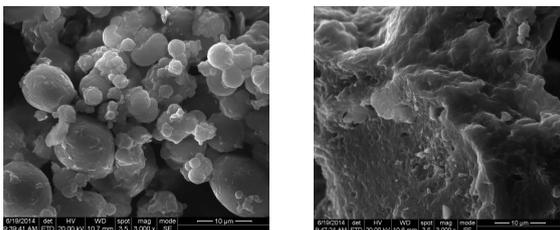
图 3 瓜蒌子蛋白质的体积排阻色谱图

Figure 3 The SEC—HPLC chromatogram of Gualou seed proteins

没有在相应位置发现此分子质量亚基的清晰条带,原因可能是电泳分辨率不够,小分子质量的部分没有呈现出明显的条带。总的来说,与碱溶蛋白相比,盐溶蛋白的相对分子质量分布更集中,可能是分子大小比较均匀。

2.2.3 扫描电镜观察瓜蒌子蛋白微观结构 瓜蒌子蛋白质通过扫描电镜进行表面微观结构分析结果见图4。由图4可知:瓜蒌子盐溶蛋白为规则的球状,表面较光滑,直径主要集中在 $2\sim 5\ \mu\text{m}$,分子大小较均匀,与SEC—HPLC结果一致。说明在pH 8.0,盐浓度为5%的溶液中,瓜蒌子球蛋白能较好保持其形态完整性,不变性。低浓度的盐溶液提取的主要是球蛋白,根据其提取率可推知瓜蒌子蛋白中球蛋白所占比例达到55%左右。从图4还可以看出,瓜蒌子球蛋白间存在一些物质导致蛋白质相互粘连,可能的原因是蛋白质纯度不够(蛋白质质量百分含量仅为80.4%,表1),需要进一步地分离纯化。

由图4(b)可知,瓜蒌子碱溶蛋白质表面粗糙,形状不规则;其次,瓜蒌子碱溶蛋白的微观结构表现为相互连接成块,没有断裂层,结构中孔隙较少,较为致密。从碱溶蛋白溶液的颜色推测其可能包含有色素基团,因此微观结构上表现出蛋白质和色素类物质呈胶合状态,蛋白质的网络结构中充满色素类化合物。



(a) 盐溶蛋白 (b) 碱溶蛋白

图4 瓜蒌子蛋白质的扫描电镜图

Figure 4 Scanning electron microscopic pictures of Gualou seed proteins ($\times 3000$)

3 结论

本研究采用分步提取法从瓜蒌子提油副产物中提取了蛋白质,并对其分子性质进行分析。结果显示,盐溶蛋白的提取率为55.3%,而碱溶蛋白的提取率仅15.8%,碱溶蛋白分子上可能连接有色素基团导致其蛋白含量较低且溶液为深褐色;SDS—PAGE分析发现瓜蒌子盐溶蛋白跟碱溶蛋白的亚基分子量都主要分布在 $10\sim 32\ \text{kDa}$;SEC—HPLC结果显示瓜蒌子盐溶蛋白中主要包含分子质量在 $200\sim 300\ \text{kDa}$ 的部分,碱溶蛋白中分子质量大于 $10^6\ \text{Da}$ 的蛋白质聚集体含量较盐溶蛋白多,其他主要是分子质量在 $67\sim 158\ \text{kDa}$ 的部分;电镜观察发现盐溶蛋白是直径集中在 $2\sim 5\ \mu\text{m}$ 的球蛋白,而碱溶蛋白为较致密的蛋白质聚集体。本试验为进一步根据应用目的(食用或药用)提纯、解析瓜蒌子蛋白提供了一定的数据支持。

参考文献

- 1 江明性. 药理学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 255.
- 2 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究[M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1996: 585.
- 3 中国油脂植物编写委员会. 中国油脂植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 525~574.
- 4 巢志茂, 刘静明. 双边栝楼化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(2): 97.
- 5 贡瑞生, 张黎明, 郑建科, 等. 山东栝楼氨基酸及微量元素的分析[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(6): 673~674.
- 6 李赤翎, 俞建, 刘仲华. 栝蒌籽中多不饱和脂肪酸的提取与分离研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(6): 145~147.
- 7 闫永婷, 何家庆. 瓜蒌籽油的理化性质及其脂肪酸组成分析[J]. 中国林副特产, 2008, 10(5): 29~31.
- 8 李赤翎, 俞建, 刘仲华. 抗氧化剂对瓜蒌子油抗氧化性能的影响研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(7): 98~100, 106.
- 9 张荣超, 辛杰, 王真真, 等. 瓜蒌子有效提取物质研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(10): 2157~2159.
- 10 张荣超, 辛杰, 郭庆梅, 等. 不同产区瓜蒌子有效成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013(18): 71~73.
- 11 姚强, 张晨, 陈怡平, 等. 超高压对花生分离蛋白分子结构影响及机理研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2345~2348.
- 12 吴少辉, 张成桂, 刘光明. 高效液相色谱法在蛋白质分离检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(8): 63~65.
- 13 田少君, 杨敏, 郭兴凤, 等. 不同物理法改性醇洗大豆浓缩蛋白功能性及微观结构比较研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(7): 27~30.
- 14 刘永乐, 王发祥, 周小玲, 等. 酶法脱酰胺对米谷蛋白分子微观结构的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 69~71.
- 15 Wanderley S, Loraine C, Marcia A. Strategies and results of field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) in the study of parasitic protozoa [J]. Micron, 2008, 39(2): 77~87.
- 16 李赤翎, 夏闻, 俞建, 等. 瓜蒌籽粗蛋白的提取研究[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 218~219.
- 17 全国文献工作标准化委员会第七分委会. GB/T 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 18 全国文献工作标准化委员会第七分委会. GB/T 5009.3—2010 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 19 全国文献工作标准化委员会第七分委会. GB 5009.4—2010 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 20 李乐, 吴晖, 赖富饶. 不同提取pH条件下火麻仁蛋白组分的功能性质研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 16~19, 39.
- 21 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970(227): 680~685.
- 22 李向红, 刘永乐, 俞健, 等. 莲子磨皮粉中蛋白质的提取、组成及性质[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 129~133.
- 23 李娜, 李向红, 刘永乐, 等. 提取方法对米谷蛋白分子理化性质的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 43~46.