

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2018.05.001

燕麦蛋白组分分离提取及其 SDS-PAGE 电泳分析

王美玉¹, 梁亚萍², 王 愈¹, 陈振家¹

(1. 山西农业大学 食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801;

2. 山西农业大学医院, 山西 太谷 030801)

摘要: 通过单因素实验对燕麦蛋白组分的分离提取工艺进行了优化, 并通过 SDS-PAGE 电泳对燕麦蛋白组分进行亚基分析。结果表明: 燕麦清蛋白提取的最佳温度为 40 ℃, 球蛋白提取最佳盐浓度为 7%, 醇溶蛋白提取的最佳乙醇浓度为 75%, 谷蛋白提取的最佳碱浓度为 0.05 mol/L, 蛋白质提取率为 83.1%。SDS-PAGE 实验结果显示: 燕麦清蛋白在 10~100 kD 范围内均有分布, 燕麦球蛋白由 2 个亚基组成, 分子量分别在 97.4~100 kD 和 43~66.2 kD 范围内, 燕麦醇溶蛋白亚基大部分集中在 18.39~40.72 kD 之间, 燕麦谷蛋白部分亚基分布在 20.67~26.66 kD 与 43.29~50.80 kD 之间。

关键词: 燕麦蛋白; 分离提取; SDS-PAGE; 亚基

中图分类号: TS 210.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2018)05-0001-05

Separation and extraction of oat protein components and analysis by SDS-PAGE

WANG Mei-yu¹, LIANG Ya-ping², WANG Yu¹, CHEN Zhen-jia¹

(1. School of food science and engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801;

2. Hospital of Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801)

Abstract: The separation and extraction process of protein components in oat were optimized by single factor experiments and the protein subunit components of oat were analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the optimal temperature for extraction of oat albumin was 40 ℃, the optimal salt concentration for globulin was 7%, the optimal ethanol concentration for prolamin was 75%, the optimal alkali concentration for glutenin was 0.05 mol/L, the extraction rate of oat protein 83.1%. The results of SDS-PAGE showed that the oat albumin distributed in the range of 10~100 kD; the oat globulin was composed of two subunits with molecular weight in the range of 97.4~100 kD and 43~66.2 kD respectively; the distribution range of most oat prolamin subunits was 18.39~40.72 kD; and the distribution range of some oat glutenin subunits was between 20.67~26.66 kD and 43.29~50.80 kD.

Key words: oat protein; separation and extraction; SDS-PAGE; subunit

燕麦属禾本科燕麦属, 生长特性与其他谷物相似, 是一年生草本植物^[1], 适于生长在北纬 40.8 度到 71 度之间的地区^[2-3]。燕麦产量约占世界粗

粮产量的 57%, 在世界谷物生产中排名第六, 仅次于小麦、玉米、大米、大麦和高粱^[4]。我国燕麦播种面积约 80 万 hm², 产量 85 万 t, 居世界第八位^[5]。燕麦中的蛋白质含量 (12.4%~24.5%) 在谷类食品中是最高的, 其中清蛋白 7%~11%、球蛋白 52%、醇溶蛋白 15%、谷蛋白 19%~22%^[6], 氨基酸平衡性好, 蛋白质功效比超过 2.0, 生物价

收稿日期: 2018-03-20

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2017YFD0400200);

山西农业大学博士科研启动专项(2016ZZ06)

作者简介: 王美玉, 1994 年出生, 女, 硕士研究生。

通讯作者: 陈振家, 1981 年出生, 男, 博士, 副教授。

为72~75^[7],而且清蛋白和球蛋白所占比重大,赖氨酸和天冬氨酸含量高,而脯氨酸和谷氨酰胺含量较低^[1],必需氨基酸比例合理,利用率高,是低成本高营养价值蛋白质的潜在来源^[8]。目前对燕麦麸蛋白质的Osborne分类法已有报道^[9-11],但对于燕麦蛋白质的研究报道还较少。本研究旨在优化Osborne法分离提取燕麦蛋白组分工艺的基础上,通过SDS-PAGE电泳,确定燕麦蛋白各组分提取的最佳条件和亚基组成,为燕麦蛋白质的进一步研究和应用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 实验材料

市售燕麦。

1.1.2 主要试剂

石油醚、无水乙醇、氢氧化钠、氯化钠、三氯乙酸、盐酸、浓硫酸(均为分析纯):天津市凯通化学试剂有限公司;考马斯亮蓝G250、SDS、 β -巯基乙醇、溴酚蓝、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、过硫酸铵、氢氧化钾、甘油、低分子量蛋白质Marker:北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 实验仪器

DYY-7C型电泳仪:北京市六一仪器厂;723可见分光光度计:上海菁华科技有限仪器公司;HH系列数显恒温水浴锅:金坛市科析仪器有限公司;RE-52AA旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;SHZ-III循环水真空泵:上海亚荣生化仪器厂;TS-2000 ADecoloring Shaker:Kylin-Bell Lab Instrument公司;HC-2064高速离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脱脂燕麦粉制备

燕麦籽粒经挑选去杂后,磨制成粉,按料液比1:5加入石油醚,磁力搅拌脱脂4h,抽滤除去油脂石油醚混合溶液,沉淀置于空气中待石油醚挥发完全后,收集备用。

1.2.2 Osborne法分离提取燕麦蛋白组分

1.2.2.1 燕麦清蛋白提取 称取一定量脱脂燕麦粉,按料液比1:10加入蒸馏水,分别在水浴锅中恒温(25、40、50)搅拌1.5、2、3、4h,

取一定量溶液,以10000 r/min速度离心5min,测定上清液中蛋白质量浓度。

1.2.2.2 燕麦球蛋白提取 称取一定量脱脂燕麦粉,按照上述步骤除去清蛋白,所得沉淀分别加入NaCl溶液(2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%),磁力搅拌0.5、1、2、3h,取定量溶液,以10000 r/min速度离心5min,测定上清液中蛋白质量浓度。

1.2.2.3 燕麦醇溶蛋白提取 称取一定量脱脂燕麦粉,按照上述步骤除去燕麦清蛋白、球蛋白后,所得沉淀中分别加入乙醇溶液(65%、70%、75%、80%、85%、90%),磁力搅拌0.5、1、2、3h,取一定量溶液,以10000 r/min速度离心5min,测定上清液中蛋白质量浓度。

1.2.2.4 燕麦谷蛋白提取 称取一定量脱脂燕麦粉,依次提取,除去燕麦清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白后,所得沉淀中分别加入NaOH溶液(0.01、0.03、0.05、0.07、0.09、0.10 mol/L),磁力搅拌0.5、1、2、3h,取一定量溶液,以10000 r/min速度离心5min,测定上清液中蛋白质量浓度。

1.2.3 燕麦蛋白质量浓度测定

用考马斯亮蓝法^[12]进行测定。

1.2.4 SDS-PAGE电泳

依照Laemmli等人^[13]的方法。浓缩胶浓度为5%,分离胶浓度为12%,样品上样量为5 μ L。恒压电泳,电流为16 mA,浓缩胶电压为100 V,分离胶电压为150 V。电泳结束后,电泳胶片先固定3h后,再染色,脱色结束后,用成像仪进行成像。

2 结果与分析

2.1 提取温度对清蛋白质量浓度的影响

热是使蛋白质变性最常见的物理因素,大多数蛋白质在45~50 时已可觉察到变性,到55 时变性进行得很快。70 以下时蛋白质变性仅涉及非共价键的变化,但在70~80 以上,将会破坏蛋白质的二硫键,产生不可逆变性^[14]。因此本实验选取了30、40、50 三梯度进行实验,并与室温(25)条件下进行了比较。由图1可知,除25 外,随提取时间的延长,蛋白质浓度曲线整体呈下降趋势,50 时下降明显,说明此时燕

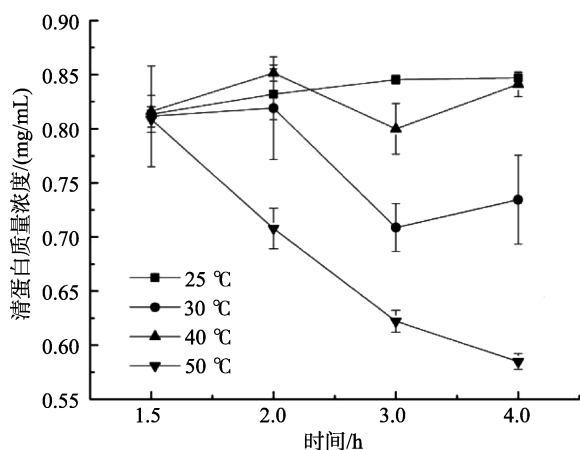


图 1 温度对燕麦清蛋白质量浓度的影响

麦清蛋白已经开始变性，造成部分沉淀，使得溶解度降低。在 30 和 40 下，清蛋白浓度都是在 2 h 时有所提高，之后随时间延长蛋白浓度有所波动，但总体呈下降趋势。说明随着提取时间的延长，也会造成部分清蛋白的变性沉淀。40 提取 2 h 时，清蛋白浓度最高，所以确定清蛋白提取温度为 40，时间为 2 h。

2.2 NaCl 溶液浓度对球蛋白质量浓度的影响

盐以两种不同的方式影响蛋白质的稳定性，低浓度时，离子通过非特异性的静电相互作用与蛋白质作用，稳定了蛋白质的结构；高浓度时，盐具有影响蛋白质结构稳定性的离子特异效应^[15]，且在相同离子强度下燕麦球蛋白在 NaCl 溶液中的溶解度大于在一些二价盐溶液中的溶解度^[16]，由图 2 可以看出，当盐浓度为 7%和 8%时，随时间变化，蛋白质量浓度曲线基本重合且最高，说明此时盐离子与燕麦球蛋白相互作用，很好地稳定了蛋白质的结构，使燕麦球蛋白的溶解性达到最

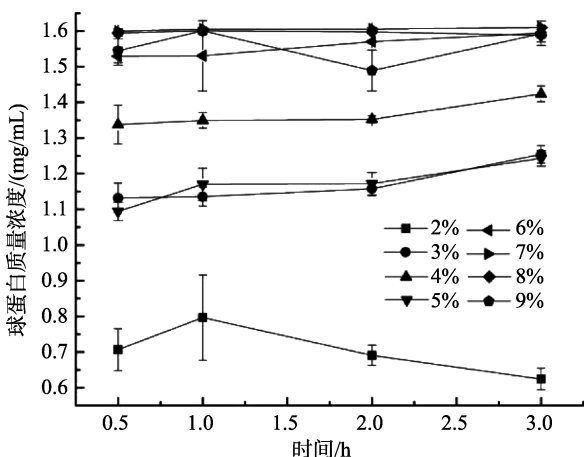


图 2 NaCl 溶液浓度对球蛋白质量浓度的影响

大，9%时蛋白质量浓度开始下降，说明此时的盐离子浓度已经破坏了燕麦球蛋白的稳定性，溶解度降低。所以确定盐浓度为 7%时最佳。

2.3 醇溶液浓度对醇溶蛋白质量浓度的影响

有机溶剂以不同方式影响蛋白质的疏水相互作用、氢键和静电相互作用的稳定性。在低浓度时，一些有机溶剂能提高几种酶对变性的稳定性^[17]。然而在高浓度时，有机溶剂将导致蛋白质变性。由图 3 可以看出，乙醇溶液体积分数为 75%时，提取的醇溶蛋白质量浓度最高，说明此时燕麦醇溶蛋白与乙醇溶液相互作用，稳定了蛋白质结构，溶解度提高，当乙醇溶液体积分数大于 75%时，导致了蛋白质变性沉淀，溶解度降低。

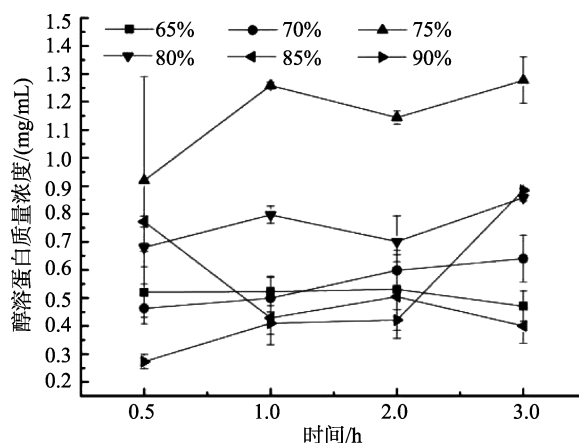


图 3 醇溶液浓度对燕麦醇溶蛋白质量浓度的影响

2.4 NaOH 溶液浓度对谷蛋白提取的影响

由图 4 可知，氢氧化钠浓度为 0.03 mol/L 和 0.05 mol/L 时，随时间延长，蛋白质量浓度曲线开始呈显著上升趋势，2 h 之后则上升较缓，且在 2 h 之后，0.05 mol/L 的碱浓度提取的谷蛋白质量

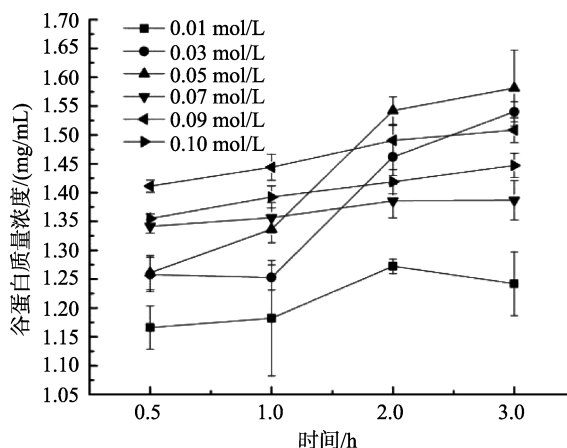
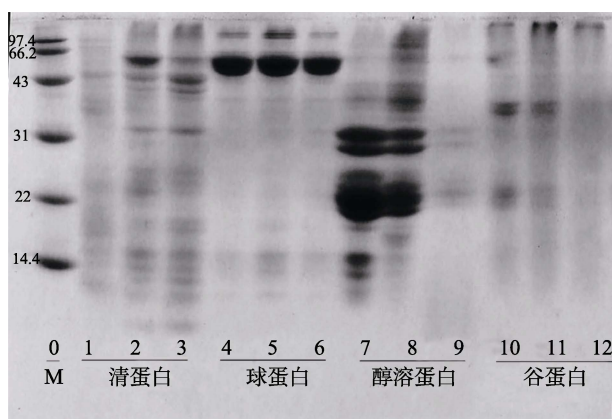


图 4 NaOH 溶液浓度对燕麦谷蛋白质量浓度的影响

浓度最高,故碱溶液浓度确定为 0.05 mol/L。添加 NaOH 会加速淀粉的糊化速度^[18],实验结果表明,当碱溶液浓度高于 1.0 mol/L 后,由于在提取过程中造成燕麦淀粉的糊化,溶液会成胶状,无法离心分离,在下一步研究中可以考虑先将淀粉除去,再进一步研究。

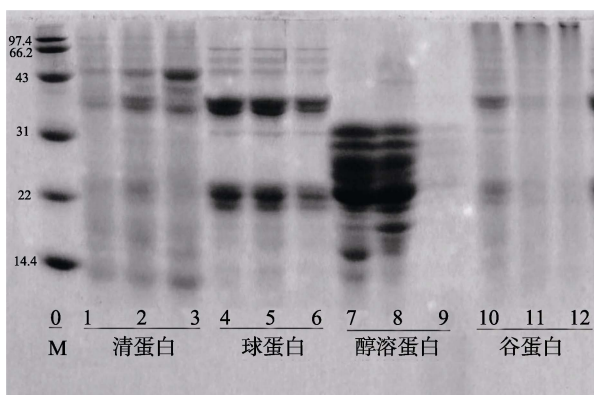
2.5 燕麦蛋白组分 SDS-PAGE 分析

由图 5 和图 6 可知,不同提取条件对蛋白亚基组成有较大影响。燕麦清蛋白亚基在 10~100 kD 范围内均有分布,25 提取所得燕麦清蛋白亚基条带较少,可见 25 条件下未能提取清蛋白有效组分,50 提取所得清蛋白亚基分布与 40 有较大不同,结合提取率数据,推测 50 的提



从左到右,泳道 0: 蛋白标样;泳道 1、2、3: 清蛋白(25、40、50);泳道 4、5、6: 球蛋白(5%、7%、9%);泳道 7、8、9: 醇溶蛋白(70%、75%、80%);泳道 10、11、12: 谷蛋白(0.01、0.05、0.1 mol/L)

图 5 燕麦蛋白组分电泳图谱(未加 β -ME)



从左到右,泳道 0: 蛋白标样;泳道 1、2、3: 清蛋白(25、40、50);泳道 4、5、6: 球蛋白(5%、7%、9%);泳道 7、8、9: 醇溶蛋白(70%、75%、80%);泳道 10、11、12: 谷蛋白(0.01、0.05、0.1 mol/L)

图 6 燕麦蛋白组分电泳图(加 β -ME)

取条件下,部分蛋白变性导致亚基组分分布发生变化,此外,添加 β -ME 后,清蛋白的部分亚基条带消失,说明清蛋白中的部分亚基含有二硫键。不同提取条件对燕麦球蛋白的亚基组成影响较小,3 个盐浓度提取所得燕麦球蛋白在电泳图谱中均呈现相同的亚基条带,分子量在 43~66.2 kD 之间,含有二硫键,二硫键断裂后形成的低分子量亚基分别在 31~43 kD 和 14.4~22 kD 范围内;燕麦醇溶蛋白亚基分布范围较广,但大部分亚基集中在 18.39~40.72 kD 之间,与 Kim 等人^[19]描述的 20~40 kD 基本相符,不同醇浓度对燕麦醇溶蛋白亚基组成影响较大,其中乙醇浓度为 75% 时提取所得的蛋白亚基条带最多,这可能正是造成乙醇浓度为 75% 时蛋白质质量浓度最高的原因,当乙醇浓度为 80% 时,只提取出了少量的 18.39~40.72 kD 之间的亚基,当乙醇溶液浓度为 70% 时,还提取出了相对分子质量较小的亚基(9.78~18.39 kD),而低分子质量的亚基氨基酸组成不同于典型的醇溶蛋白,它们可能像小麦和大麦一样,主要包含蛋白酶和 α -淀粉酶抑制剂^[20],燕麦醇溶蛋白大部分亚基不含二硫键。燕麦谷蛋白亚基主要有两条,分别分布在 20.67~26.66 kD 与 43.29~50.80 kD 之间,随着 NaOH 浓度的增加,分离胶顶端颜色加深,而 20.67~26.66 kD 与 43.29~50.80 kD 之间两个亚基组分则逐渐减少,所以推测低浓度的 NaOH 溶液有利于提取出低分子量的燕麦谷蛋白亚基,而高浓度的 NaOH 溶液有利于提取出大分子量的亚基,当 NaOH 浓度为 0.5 mol/L 时,既可以提取出部分小分子量亚基也可提取出部分大分子量亚基,这可能正是此时燕麦谷蛋白质量浓度最大的原因。

3 结论

燕麦清蛋白提取的最佳温度为 40,球蛋白提取的最佳盐浓度为 7%,醇溶蛋白提取的最佳乙醇浓度为 75%,谷蛋白提取的最佳碱浓度为 0.05 mol/L。提取的蛋白含量(占粗蛋白)依次为:清蛋白 19.40%、球蛋白 36.42%、醇溶蛋白 10.29%、谷蛋白 17.02%,蛋白质提取率可高达 83.1%。SDS-PAGE 结果表明:不同提取条件对燕麦清蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白的亚基组成有较大影响。燕

麦清蛋白亚基在 10~100 kD 范围内均有分布, 燕麦球蛋白由 2 个亚基组成, 分子量分别在 97.4~100 kD 和 43~66.2 kD 范围内, 燕麦醇溶蛋白亚基大部分亚基集中在 18.39~40.72 kD 之间, 燕麦谷蛋白部分亚基分布在 20.67~26.66 kD 与 43.29~50.80 kD 之间, 其中燕麦清蛋白和球蛋白含有二硫键。

参考文献:

- [1] KULP K, PONTE J G. Handbook of cereal science and technology[M]. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2000: 131-376.
- [2] SCHRICKEL D J. World Oats Use and Marketing[M]. Proceedings of the Second International Oats Conference. Springer Netherlands, 1986: 197-199.
- [3] SCHRICKEL D J, WEBSTER F H. Oats production, value, and use[M]. 1986: 111.
- [4] HOFFMAN L A. The U. S. oats industry[M]. U. S. dept. of Agriculture Economic Research Service, 1987.
- [5] 胡新中, 李小平. 燕麦荞麦产品加工现状与思考[J]. 农业工程技术: 农产品加工业, 2013(12): 24-27.
- [6] 皇甫红芳, 苏占明, 李刚. 燕麦的营养成分与保健功效[J]. 现代农业科技, 2016(19): 275-276.
- [7] MOHAMED A, BIRESAW G, XU J Y, et al. Oats protein isolate: thermal, rheological, surface and functional properties[J]. Food Research International, 2009, 42(1): 107-114.
- [8] GUAN X, YAO H. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 345-351.
- [9] 管骁, 姚惠源. 燕麦麸蛋白的组成及功能性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 72-76.
- [10] 王婵. 燕麦麸蛋白的提取条件及其理化性质研究[D]. 天津科技大学, 2013.
- [11] XIAO G, YAO H Y. Composition and Functional Properties of Oat Bran Protein[J]. Food Science, 2006, 27(7): 72-76.
- [12] 周跃男, 王湛, 赵小川, 等. 浅谈蛋白质含量的定量检测方法[J]. 食品研究与开发, 2014(7): 127-130.
- [13] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [14] 管斌, 林洪, 王广策. 食品蛋白质化学[M]. 化学工业出版社, 2005.
- [15] FENNEMA O R. Food Chemistry, Third Edition[M]. Crc Press, 1996.
- [16] PETERSON D M. Subunit structure and composition of oat seed globulin[J]. Plant Physiology, 1978, 62(4): 506-509.
- [17] ASKURA T K, ADACHI, SCHWARTZ E. Stabilizing effect of various organic solvents on protein[J]. Biol. Chem, 1978, 253: 6423-6425.
- [18] 王琳, 许杨杨, 朱轶群, 等. 碱液处理对荞麦淀粉物理性能和结构的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(6): 79-83.
- [19] KIM, CHARBONNIER, MOSSE. Heterogeneity of avenin, the oat prolamin. Fractionation, molecular weight and amino acid composition[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1978, 537: 22-30.
- [20] DAUSSANT J, MOSSE J, VAUGHAN J. Seed proteins[M]. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 1983.
- [21] WALBURG G, LARKINS B A. Oat seed globulin: subunit characterization and demonstration of its synthesis as a precursor[J]. Plant Physiology, 1983, 72: 161-65. 

欢迎订阅2019年

《粮食与饲料工业》月刊

创刊于1972年

《粮食与饲料工业》杂志是集粮食和饲料于一刊的综合性科技期刊, 系国家期刊奖百种重点期刊、全国优秀农业期刊技术类一等奖期刊、中国科技核心期刊、湖北省优秀期刊、中国期刊网全文收录期刊、中国学术期刊光盘版全文收录期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、美国《化学文摘》(CA) 收录期刊、英国《食品科技文摘》(FSTA) 固定收录源刊。

主要栏目: 小麦制粉/稻谷碾米/粮食流通与仓储/粮油食品及深加工/饲料加工/饲料资源开发利用/饲料添加剂/饲料及饲养/环保与气力输送/检测分析/(信息) 博采等



大16开本, 每本5元, 全年60元

地址: 武汉市卓刀泉南路3号 邮编: 430079
电话: 027-50657638 87406138
传真: 027-50657739 87803774
E-mail: lsyslgy@126.com
http://www.lsyslgy.com



每月15日出版
邮发代号: 38-151