

不同贮藏时间的莲子蛋白质提取及其理化特性研究

刘星星¹, 杜雨芊², 黄学勇¹, 罗火林¹, 方菲菲¹, 罗丽萍^{1*}

(1.南昌大学生命科学学院 江西省植物资源重点实验室,江西南昌 330031;

2.南昌市食品化妆品监督所,江西南昌 330038)

摘要:为研究莲子在陈化过程中蛋白质变化规律,本文首先通过正交实验对莲子蛋白质提取条件进行优化,再利用优化的条件,分别以不同贮藏时间的莲子为材料,提取获得莲子蛋白。采用 SDS-PAGE 电泳和氨基酸分析仪,研究提取蛋白质的相对分子量(Mr)组成及氨基酸组成。结果表明:莲子蛋白的优化提取条件为:pH11,料液比 1:30,提取时间 2h,提取率达 60.11%;随着贮藏时间的增加,莲子蛋白组成发生了一定变化,Mr 在 26~43ku 的蛋白质含量逐渐变少;当年莲子蛋白的总氨基酸含量最高,但随着陈化过程的进行,含硫氨基酸中蛋氨酸含量下降。贮藏过程中莲子蛋白质结构等的变化是莲子陈化的主要原因之一。

关键词:莲子,陈化,SDS-PAGE,氨基酸

Extraction and physico-chemical properties of protein from lotus seeds with different storage times

LIU Xing-xing¹, DU Yu-qian², HUANG Xue-yong¹, LUO Huo-lin¹, FANG Fei-fei¹, LUO Li-ping^{1*}

(1.School of Life Science, Key Laboratory of Plant Resources in Jiangxi Province, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Food and Cosmetics Supervision, Nanchang 330038, China)

Abstract: Lotus seed is easy to aging during storage. To investigate the variation of the protein in aging process, lotus seeds with different storage times were as material for this study. After optimizing the protein extraction conditions by orthogonal experiment, the lotus seeds protein was obtained, and its Mr and amino acid constituents were researched by using SDS-PAGE electrophoresis and Amino Acid Automatic Analyzer, respectively. The results showed that the optimum extraction condition were pH11, solid-liquid ratio 1:30, and extraction time 2h, the extraction rate was 60.11%. With the extension of storage time, the protein content with Mr 26~43ku reduced gradually. The total amino acid content was highest in the fresh lotus seeds, but as the aging process, the content of methionine which is one of sulphur-containing amino acid was decreased. The lotus seeds protein changed during storage, which is one of the main reasons of aging.

Key words: lotus seeds; aging; SDS-PAGE; amino acid analysis

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)11-0058-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.11.003

莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)是睡莲科莲属多年生水生草本植物,是特种宿根经济植物,也是我国重要的优质特产资源^[1]。莲子营养十分丰富,含有大量的蛋白质、多糖、生物碱及微量营养素^[2-4],是一种老少皆宜的食疗佳品及著名的药食同源食物。

干莲子中含有约 25% 的蛋白质。早期研究表明

蛋白质的变化并不是影响陈化大米品质的主要因素^[5],因为在储藏过程中,大米总蛋白质含量基本不变。但后来发现,陈化过程中,虽然总蛋白质含量基本不变,但是其内在结构和功能特性方面发生一定的变化,比如二硫键的交联作用使得小分子量蛋白质形成大分子量蛋白质,而大分子量的蛋白质又易

收稿日期:2014-09-03

作者简介:刘星星(1990-),女,硕士研究生,研究方向:植物资源与系统植物学。

*通讯作者:罗丽萍(1972-),女,博士,教授,研究方向:食物资源开发与利用。

基金项目:江西省科技厅(20123BCB22004);江西省教育厅(KJLD12051)。

[12] Gao XL, Cui C, Ren JY, et al. Changes in the chemical composition of traditional Chinese-type soy sauce at different stages of manufacture and its relation to taste [J]. International

Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(2): 243-249.

[13] 冯云子,崔春,高献礼,等.中式酱油与日式酱油非挥发性成分的比较[J].食品与发酵工业,2010,36(7):62-66.

与淀粉结合形成复合物,影响谷物的糊化特性^[6-7]。大米在陈化过程中,游离氨基酸的含量也会发生变化,比如亲水氨基酸(天冬氨酸)含量会下降,疏水氨基酸(丙氨酸)含量上升,含硫氨基酸中蛋氨酸含量下降。稻谷在贮藏过程中,由于疏水基团的暴露,亲水氨基酸的减少,使得蛋白质溶解性下降^[8]。蔡联辉等^[9]发现氨基酸组成对莲子的品质有着较大的影响,同时也是莲子营养品质的重要指标。

目前,国外对莲子的研究主要集中在形态解剖及提取物的抗氧化作用^[10]及抗性淀粉的结晶性能^[11]。国内有关于莲子主要成分的测定和提取、莲子营养和功效成分、食品加工及育种等方面的研究报道^[4,12-13],也有对其蛋白质及功能特性进行研究^[14]。课题组对比了不同贮藏时间莲子的化学成分和功能特性变化,主要涉及直链、支链淀粉含量和淀粉颗粒、脂类氧化水解、蛋白质巯基交联形成二硫键等的变化,由此引发的协同作用导致淀粉颗粒不易糊化,造成莲子蒸煮品质下降的研究^[15]。但是将莲子蛋白质单独提取出来,并研究其与陈化机理的关系还未见报道。本文以不同贮藏时间的莲子为材料,利用优化的条件提取获得其蛋白质,测定了蛋白质的相对分子量、氨基酸组成及含量,并探讨了莲子在陈化过程中蛋白质组成变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

莲子:由江西省广昌县白莲科学研究所提供,品种为“太空莲3号”。当年莲子为2013年8月收获,陈年莲子分别是2012年(贮藏一年)、2011年(贮藏两年)、2010年(贮藏三年)、2009年(贮藏四年)、2008年(贮藏五年)收获,均产于广昌县白莲科学研究所基地,经去种皮、胚芽,烘干后真空包装。分别将6个年份莲子经粉碎后过80目筛,4℃冷藏备用。实验时间为2013年9~11月。

Tris-HCl, 巯基乙醇, 4mol/L 氢氧化钠, 1mol/L 盐酸, 5×SDS-PAGE Loading buffer, 30% 丙烯酰胺混合溶液, 10% AP(过硫酸铵), 10% SDS, 染色液, 脱色液, 0.1% 的 SDS 溶液。以上试剂均为现配现用。

TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺):电泳级生化试剂;彩色预染蛋白 Marker(10~170ku:英特生物技术有限公司;无水乙醚、甲醇、冰醋酸均为国产分析纯。

Easy Chem Plus 型全自动离子分析仪 北京易科泰生态技术有限公司;Hitachi L-8900 型全自动氨基酸分析仪 日本日立公司;Thermo orion 410A + 型 pH 计 美国奥立龙公司;HY-4 型调速多用振荡器 国华电器有限公司;1600 型离心机 上海力康仪器有限公司;DRC-1000 型冻干机 上海茸研仪器有限公司;752C 型紫外可见分光光度计 上海第三分析仪器厂;JA1003N 型电子分析天平 上海市精密科学仪器有限公司;RH-KT/C 型磁力搅拌器 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 莲子蛋白质提取条件优化及制备 采用碱提酸沉法^[16]。准确称取 20g 干燥脱脂莲子粉,按照一

定料液比加入不同 pH 碱溶液,恒温水浴振荡提取后,3500r/min 离心 15min,收集上清液,1mol/L 盐酸将其 pH 调至 4.5,进行酸沉蛋白操作,然后在 4℃ 的冰箱中静置过夜,收集酸沉蛋白沉淀,经去离子水洗涤后冻干。冻干粉置于-20℃ 的冰箱中备用,采用全自动离子分析仪测定其总含氮量,以 N×6.25 为粗蛋白的含量。

莲子蛋白提取率(%)=(上清液蛋白质的质量/原料莲子粉中的总蛋白质质量)×100。

选定提取液 pH、料液比、提取时间 3 个因素作单因素实验^[17],考察各单因素对蛋白质提取率的影响。在单因素的基础上,采用 L₉(3³) 正交表进行正交实验,因素水平见表 1。

表 1 L₉(3³) 正交实验因素水平

Table 1 L₉(3³) Factors and levels of the orthogonal test

水平	因素		
	A pH	B 料液比(w/v)	C 时间(h)
1	9	1:20	1
2	10	1:30	2
3	11	1:40	3

1.2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳 分别称取各年莲子蛋白冻干粉 2mg,加入 50μL 的 1×Loading buffer,煮沸 5min,11000×g 离心 20min 后,取 20μL 上清点样,采用 5% 浓缩胶及 12% 分离胶进行垂直平板电泳分析,蛋白质质量运用 Quantity One 软件进行分析^[18]。

1.2.3 氨基酸组成分析 分别称取各年蛋白质冻干粉各 0.1g 于试管中,加入 10mL 6mol/L 的 HCl 溶液,封口后放入消煮炉中,110℃ 水解 24h,冷却后用蒸馏水定容至 50mL,摇匀后用 0.45μL 的水相滤头过滤 200μL 至大口离心管中,放入 60℃ 的烘箱里浓缩至无液体,然后加入 1mL 0.02mol/L 的 HCl 溶解,静置 30min 后,采用氨基酸分析仪测定氨基酸含量(除色氨酸)^[9]。

2 结果与分析

2.1 莲子蛋白质提取条件正交实验结果

选取提取液 pH(A)、料液比(B)、时间(C)3 个因素,按 L₉(3³) 正交表进行实验。从表 2 可知,影响莲子蛋白提取率的因素依次为:A>B>C。最佳提取条件组合为 A₃B₂C₂,即 pH11、料液比 1:30、提取时间 2h。由于该组合在实验中没有出现,所以追加实验用于验证。经验证可知,在 A₃B₂C₂ 条件下,莲子蛋白的提取率达 60.11%。根据资料^[14]显示,莲子蛋白的组分包括醇溶、水溶、盐溶、酸溶和碱溶蛋白。其中盐溶蛋白占总蛋白的 7.64%,而碱提酸沉法没有涉及加盐提取,因此优化提取液、料液比和提取时间水平条件后,本实验提取率仍然不高。蔡联辉等^[19-20]研究发现莲子残渣蛋白主要是一些非蛋白混合物、不可溶性蛋白质组分和混溶蛋白。

2.2 莲子蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

由图 1 a 可知,莲子蛋白 Mr 主要集中在 10~26、34~55 和 95~130ku 之间。直观观察可见不同贮藏时间莲子蛋白电泳条带的强弱存在较大差异,尤其是

Mr 在 26~43ku 的蛋白质含量逐渐变少,但难以发现条带数目的差异。根据相关资料^[14-15,21],图 1a 中,相对分子量在 95~130ku 之间的条带应该是球蛋白,而在 10~55ku 可能有球蛋白、谷蛋白和酸溶蛋白。张旻等^[15]发现莲子中清蛋白、谷蛋白和酸溶蛋白含量较少,球蛋白含量最高。球蛋白含有较高的酸性氨基酸和疏水性氨基酸,随着贮藏时间的延长,蛋白质变性后其空间构象也会发生变化,导致这两种氨基酸外露,影响其功能特性并加剧蛋白质变性。图谱中轻微拖尾现象可能是醇溶蛋白和谷蛋白会发生交融,产生的混溶蛋白导致^[20];另一方面,在样品处理过程中,多余的脂肪未处理完全。进一步运用 Quantity One 软件(图 1b)进行自动识别,发现 2013(当年)、2012(贮藏 1 年)、2011(贮藏 2 年)、2010(贮藏 3 年)、2009(贮藏 4 年)和 2008(贮藏 5 年)年莲子蛋白分别具有 18、17、17、16、16、13 条条带,条带的粗细与吸光值成正比,条带越粗,该段蛋白含量也越多。以当年莲子为参考比对相似度发现,随着贮藏时间延长,相似度分别为 34.2%、33.1%、25.9%、25.2%、9.5%,总体呈现下降趋势,且以贮藏 5 年的莲子相似度最低。

表 2 正交实验结果

Table 2 Schedule and results of orthogonal test

实验号	A	B	C	提取率(%)
1	1	1	1	36.90
2	1	2	2	57.51
3	1	3	3	40.00
4	2	1	2	45.53
5	2	2	3	50.69
6	2	3	1	52.00
7	3	1	3	53.81
8	3	2	1	59.68
9	3	3	2	55.02
k ₁	44.8	45.41	49.53	
k ₂	49.41	55.96	52.69	
k ₃	56.17	49.01	48.17	
R	11.37	10.55	4.52	
优选水平	3	2	2	

2.3 莲子蛋白中氨基酸含量的分析

不同贮藏时间莲子蛋白氨基酸测定结果见表 3。从莲子蛋白中共检出了 17 种氨基酸,不同年份莲子蛋白氨基酸总量分别是 4.436、3.749、4.240、3.766、4.331、4.106mmol/L,当年莲子蛋白中总氨基酸含量最多;其中必需氨基酸总量分别为 0.863、0.740、0.843、0.719、0.812、0.794mmol/L。必需氨基酸和非必需氨基酸总量随着贮藏年份的增加变化趋势不明显。选用 FAO/WHO 成人推荐值对莲子蛋白质必需氨基酸进行分析,发现不同贮藏时间莲子蛋白中的苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸及赖氨酸的含量远远高于 FAO/WHO 的推荐值。异亮氨酸的含量分别是 1.32%、1.02%、1.14%、1.27%、1.36% 和 1.26%,近似或超过 FAO/WHO 的推荐值。相较其它谷物而言,莲子含有丰富的赖氨酸,故莲子可平衡谷类营养

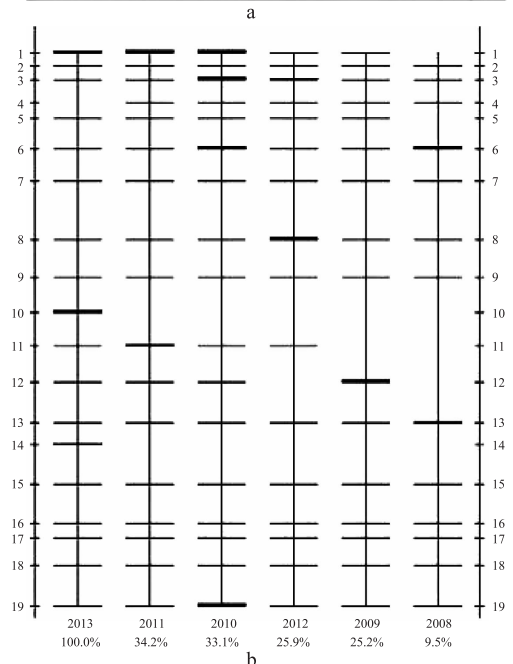
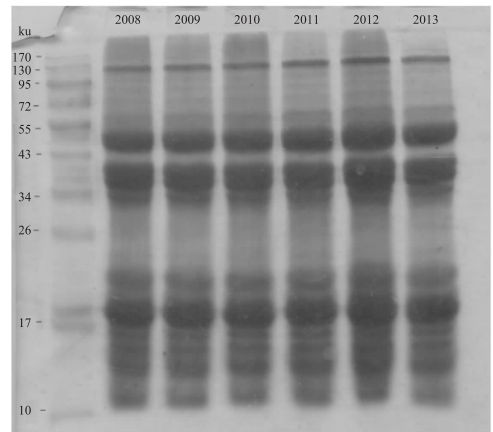


图 1 不同年份莲子蛋白质 SDS-PAGE 电泳图(a)和 Quantity One 软件分析图(b)
Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis(a) and Quantity One software analysis chart of proteins(b) in different years lotus seeds

的不足,提高蛋白质的生物效用。

3 结论

本文通过正交实验,优化了莲子蛋白质提取条件,在 pH11,料液比 1:30,提取时间 2h 时,提取率最大达 60.11%,并将其应用于不同贮藏时间莲子蛋白质的提取。对提取的莲子蛋白进行 SDS-PAGE 电泳及氨基酸分析。研究表明,随着储藏时间的增加,莲子蛋白组成在贮藏过程中发生了一定变化,Mr 在 26~43ku 的蛋白质含量逐渐变少;当年莲子蛋白的总氨基酸含量最高,随着陈化的过程,含硫氨基酸中的蛋氨酸含量下降。研究结果对于明确蛋白质组分变化对莲子质构特性的影响,以及阐明莲子的陈化机理具有积极意义。

参考文献

- [1] 郑宝东. 中国莲子种质资源主要品质的研究与应用[D]. 福建: 福建农林大学, 2004.

表3 不同贮藏时间莲子蛋白质氨基酸组成
Table 3 Amino acids analysis in protein of lotus seeds

氨基酸	不同年份含量(mmol/L)						FAO/WHO (%)
	2013	2012	2011	2010	2009	2008	
Asp(天冬氨酸)	0.474	0.400	0.457	0.404	0.464	0.441	0.9
Thr*(苏氨酸)	0.132	0.114	0.127	0.109	0.119	0.121	
Ser(丝氨酸)	0.370	0.308	0.341	0.300	0.352	0.341	
Glu(谷氨酸)	0.856	0.733	0.799	0.714	0.801	0.802	
Gly(甘氨酸)	0.360	0.296	0.352	0.316	0.376	0.331	
Ala(丙氨酸)	0.283	0.237	0.279	0.244	0.288	0.260	
Cys(半胱氨酸)	0.022	0.019	0.022	0.020	0.023	0.021	
Val*(缬氨酸)	0.100	0.090	0.097	0.083	0.089	0.096	1.3
Met*(蛋氨酸)	0.035	0.027	0.033	0.026	0.031	0.028	1.7
Ile*(异亮氨酸)	0.056	0.051	0.054	0.043	0.044	0.054	1.3
Leu*(亮氨酸)	0.209	0.179	0.204	0.171	0.191	0.192	1.9
Tyr(酪氨酸)	0.098	0.083	0.098	0.086	0.098	0.089	
Phe*(苯丙氨酸)	0.168	0.139	0.168	0.148	0.179	0.152	1.9
Lys*(赖氨酸)	0.163	0.140	0.160	0.139	0.159	0.151	1.6
NH ₃	0.586	0.485	0.554	0.526	0.634	0.547	
His(组氨酸)	0.074	0.063	0.070	0.061	0.069	0.068	
Arg(精氨酸)	0.249	0.215	0.232	0.200	0.223	0.234	
Pro(脯氨酸)	0.199	0.170	0.193	0.174	0.192	0.179	
必需氨基酸	0.863	0.740	0.843	0.719	0.812	0.794	
总氨基酸含量	4.436	3.749	4.240	3.766	4.331	4.106	

注:2013年、2012年、2011年、2010年、2009年和2008年分别代表当年、贮藏1、2、3、4、5年。同列不同字母表示显著差异($p < 0.05$)。“*”代表必需氨基酸。

[2] Man JM, Cai JW, Cai CH, et al. Comparison of physicochemical properties of starches from seed and rhizome of lotus[J]. Carbohydr Polym, 2012, 88(2):676-683.

[3] Zhang Y, Zeng HL, Wang Y, et al. Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its prebiotic effects[J]. Food Chem, 2014, 155(15):311-318.

[4] 郑宝东, 郑金贵, 曾绍校. 我国主要莲子品种营养成分的分析[J]. 营养学报, 2003, 25(2):153-156.

[5] Castellion M, Matiacevich S, Buera P, et al. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage[J]. Food Chem, 2010, 121(4):952-958.

[6] Martin M, Fitzgerald MA. Protein in rice grains influence cooking properties[J]. J Cereal Sci, 2002, 36(3):285-294.

[7] 王兰, 刘玉秀, 汪宝忠, 等. 储藏期小麦蛋白亚基与加工品质变异关系的研究——小麦储藏过程中蛋白质的变化与面粉品质关系的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(1):9-15.

[8] 陈银基, 鞠兴荣, 董文, 等. 稻谷中脂类及其储藏特性研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(13):320-323.

[9] 纵伟, 赵光远. 大叶紫薇果仁蛋白质和氨基酸的分析研究[J]. 现代食品科技, 2006, 4(22):228.

[10] Du H, Zhao X, You JS, et al. Antioxidant and hepatic protective effects of lotus root hot water extract with taurine supplementation in rats fed a high fat diet[J]. J Biomed Sci, 2010, 17(Suppl 1):S39.

[11] Zhang Y, Zeng HL, Wang Y. Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its

prebiotic effects[J]. Food Chem, 2014, 155(15):311-318.

[12] 郑宝东, 郑金贵, 曾绍校. 我国主要莲子品种中三种功效成分的研究[J]. 营养学报, 2004, 26(2):158-160.

[13] 刘楠, 乔旭光, 赵艳艳. 微山湖野生白莲子淀粉的性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2):151-154.

[14] 张羽. 莲子中蛋白质的分离及其食品功能特性研究[D]. 南京:南京师范大学, 2008.

[15] 张旻. 通芯白莲储藏过程中品质和化学成分的变化[D]. 南昌:南昌大学, 2010.

[16] Parrado J, Miramontes E, Jover M, et al. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food[J]. Food Chem, 2006, 98(4):742-748.

[17] 王洪新, 胡昌云. 茶叶蛋白质提取和初级纯化研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(12):71-71.

[18] 雍彬, 姜玉松, 樊汶樵, 等. 不同方法对甘薯块根可溶性蛋白的提取效果[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(2):211-216.

[19] Sapirstein HD, Fu BX. Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin, and residue protein in wheat flour and relationships to breadmaking quality[J]. Cereal Chem, 1998, 75(4):500-507.

[20] 蔡联辉, 曾虹燕, 王亚举, 等. 莲子蛋白质的氨基酸组成及其营养评价[J]. 营养学报, 2010, 32(5):503-506.

[21] 唐佩华, 姜在阶, 梅楚红, 等. 莲子蛋白的组成、溶性和品质[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 1998, 34(4):532-537.