

苦荞蛋白质的低消化性研究 II

—— 酶解产物的超微结构分析和分子量分布

郭晓娜, 姚惠源, 陈正行

(江南大学食品学院, 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 苦荞麦蛋白质氨基酸组成平衡, 生物价高, 并且具有独特的生理功能。体外消化实验表明其蛋白质的消化率较低, 通过扫描电镜对四种蛋白质组分酶解产物的超微结构进行观察发现, 胃蛋白酶作用于四种组分的方式是不同的, 胃蛋白酶不仅可以作用与清蛋白和球蛋白的表面, 而且随着水解进程的延长胃蛋白酶还可以作用与清蛋白和球蛋白的内部结构, 因此其体外消化率相对较高。而对于醇溶蛋白和谷蛋白, 其高级结构相对较为稳定, 胃蛋白酶只能作用于其表面, 很难作用其内部结构, 所以这两种蛋白组分的体外消化率相对较低。此外还通过高效液相对其酶解物的分子量分布进行研究, 结果表明, 清蛋白和球蛋白的酶解产物分子量相对较低, 组分多, 酶解程度高。醇溶蛋白酶解物的组成较为简单, 这可能是由于被胃蛋白酶作用的位点较少所造成的。而谷蛋白, 其酶解物的分子量分布广, 高分子量的组分所占比例大, 这表明其被酶解的程度相对较低。

关键词: 苦荞麦; 蛋白质; 扫描电镜 (SEM); 高效液相 (HPLC); 体外消化

Study on Microstructure and Molecular Weight Distribution and Digestibility *in vitro* of Tartary Buckwheat Protein Hydrolysates

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

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

Abstract: Tartary buckwheat protein consists of well-balanced amino acid with higher biological value, and it has some special physiological properties. *In vitro* pepsin digestibility assay showed that its digestibility was rather low. Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the microstructure of four protein fractions hydrolysates. The results showed that the four protein fractions were digested by pepsin with different patterns. Albumin and globulin are more digestible, since they are digested by being hydrolyzed from the outer surface to the inner part. Prolamin and glutelin were rather resistant to pepsin digestion because of their complex structure. High performance liquid chromatography was used to determine the molecular weight distribution of the four protein fractions hydrolysates. The results revealed that the hydrolysates of albumin and globulin are

收稿日期: 2005-08-29

作者简介: 郭晓娜 (1978-), 女, 博士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。

- | | |
|---|--|
| [1] 汪伟宁, 王大新, 王晓琳, 等. 无机盐水溶液体系的纳滤膜分离实验研究[J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(3): 257-262. | [7] KOHMURA M, NIO N, KUBO K, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(8): 2107-2114. |
| [2] 饶家麟, 柯文庆. 鲑鱼蒸煮液蛋白质水解物之抗氧化特性[J]. 台湾农业化学与食品科学, 2001, 39(5): 363-369. | [8] MILYOSHII S, TANAKA H. Angiotensin I -converting enzyme inhibitor derived from Ficus Carica[J]. Agril Biol Chem, 1989, 53(10): 2763-2767. |
| [3] 姜平平, 吕晓玲, 姚秀玲, 等. 紫心甘薯花色苷抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 8-11. | [9] MATSUFUJI H, MATSUI T, SEKI E, et al. Angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline hydrolyzate derived from Sardine muscle[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2244-2245. |
| [4] 贾之慎, 邬建敏, 唐孟成. 比色法测定Fenton反应产生的自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 184-186. | |
| [5] 倪莉, 王璋, 许时婴. 血管紧张素转化酶抑制剂-丝素肽的分离、纯化和结构鉴定[J]. 色谱, 2001, 19(3): 222-225. | |
| [6] 翁瑞光. 罗葡萃取物于模式系统之抗氧化性[J]. 食品科学(台), 1998, 25(3): 268-270. | |

composed of low molecular weight fractions, and the zymolysis is better. But the hydrolysates molecular weights of prolamins are rather variable because of its structure.

Key words: tartary buckwheat; protein fractions; SEM; HPLC; *in vitro* pepsin digestibility

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0183-04

荞麦属于蓼科(Polygonaceae), 荞麦属(Fagopyrum), 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。

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。日本学者Kayashita等认为, 荞麦蛋白质独特的生理功能与其低消化性有关。前一篇文章中主要通过体外实验, 用胃蛋白酶进行酶解, 研究了热处理、二硫键及芦丁对其蛋白质组份体外消化率的影响, 研究发现, 四种组分的消化率有着明显不同, 与清蛋白和球蛋白相比, 醇溶蛋白和谷蛋白的消化率较低, 这可能与它们本身的结构有关, 因此, 本文主要通过扫描电镜对蛋白质组分酶解物的超微结构进行初步研究, 并采用高效液相对酶解物的分子量分布进行分析测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

苦荞粉 四川省凉山州小杂粮粉厂。

1.1.2 试剂

胃蛋白酶 四川德阳生化制品厂; 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 日本东京日立Koki有限公司; 恒温水浴锅 江苏省医疗器械厂; PHS-3C 精密pH计 上海雷磁仪器厂; DSHZ-300 恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂; SX-40 扫描电子显微镜 日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 扫描电镜样品的制备

按照前一篇文章中的方法, 采用胃蛋白酶将四种蛋白组分样品分别酶解30min和2h, 反应结束后, 调节溶液pH至8.0, 终止反应, 离心(800×g, 5min), 沉淀物立即用2.5%(V/V)的戊二醛于4℃固定1h, 用磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗; 再用1%(V/V)锇酸固定1h, 用磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗; 然后经50%、70%、90%、100%

(V/V)乙醇逐级脱水, 用醋酸异戊酯置换出乙醇后, 采用临界点干燥法进行干燥, 经离子溅射喷金后, 置于扫描电子显微镜(SEM)下观察、拍照。

1.2.2 酶解物的分子量分布

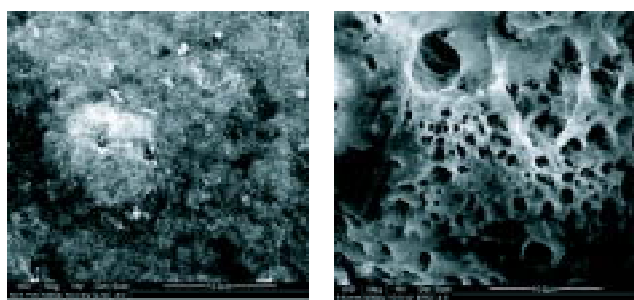
四种蛋白质组分酶解3h后, 酶解液经灭酶, 离心, 微孔过滤膜过滤后上TSKgel2000色谱柱, 以细胞色素C(MW12500), 抑肽酶(MW6500), 杆菌酶(MW1450), 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451), 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189)为标准品, 测定酶解物的分子量分布。

高效液相色谱仪: Waters 600(配2487紫外检测器和M32工作站); 色谱柱TSKgel2000 SWXL 300mm×7.8mm; 流动相乙腈/水/三氟乙酸, 45/55/0.1(V/V); 检测UV220nm; 流速0.5ml/min; 柱温30℃。

2 结果与分析

2.1 扫描电镜分析

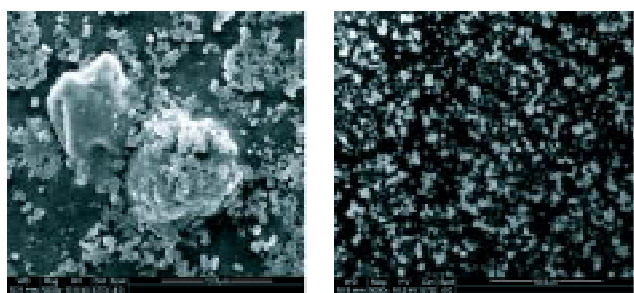
苦荞清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白酶解物的扫描电镜图(SEM)见图1~4。经过胃蛋白酶30min水解, 清蛋白可以明显的看出水解过的蛋白质基质, 蛋白质颗粒与颗粒之间没有明显的界限, 视野中的蛋白质颗粒看上去较为平坦(图1A); 球蛋白有一些水解过的蛋白质碎片出现, 蛋白质颗粒形状不太规则, 有部分凹陷出现(图2A); 醇溶蛋白的蛋白质颗粒比较完整, 颗粒呈不规则球形, 颗粒与颗粒之间有一定的界限, 水解程度较小(图3A); 谷蛋白的颗粒形状与醇溶蛋白有些相似, 呈不规则球形, 颗粒表面有凹陷出现, 但十分的浅。经过胃蛋白酶水解2h, 四种蛋白组分的电镜图都发生了明显变化, 清蛋白整个图片如蜂窝状, 这说明胃蛋白酶作用于清蛋白时, 并不只是在蛋白质表面进行, 还作用于蛋白质内部, 所以经过2h水解, 蛋白质变得如空穴一般(图1B); 球蛋白被水解的只剩蛋白质碎片, 推测胃蛋白酶的作用方式很可能是从蛋白质表面开始, 由外到里, 逐步进行, 这与胃蛋白酶作用于高粱蛋白的方式十分相似^[6](图2B); 醇溶蛋白经过2h水解, 已经没有明显的蛋白质颗粒出现, 蛋白质基质表面凹凸不平(图3B); 谷蛋白水解过的基质表面相对较为平坦, 凹陷较浅, 胃蛋白酶很难深入内部进行, 这可能与蛋白质内部结构有关, 二硫键的破坏可以部分提高其消化率也说明其蛋白质结构较为稳定, 难以被胃蛋白酶作用(图4B)。



A : 30 min 水解; B : 2 h 水解。

图1 清蛋白扫描电镜图

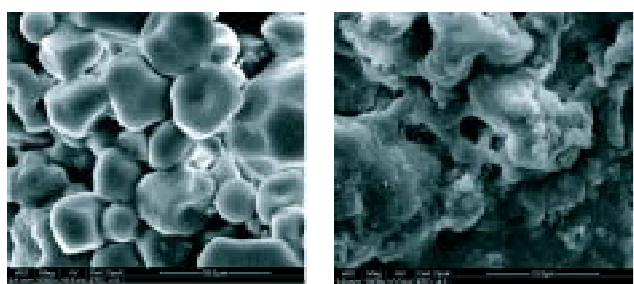
Fig.1 Scanning electron microscopy micrographs of albumin



A : 30 min 水解; B : 2 h 水解。

图2 球蛋白扫描电镜图

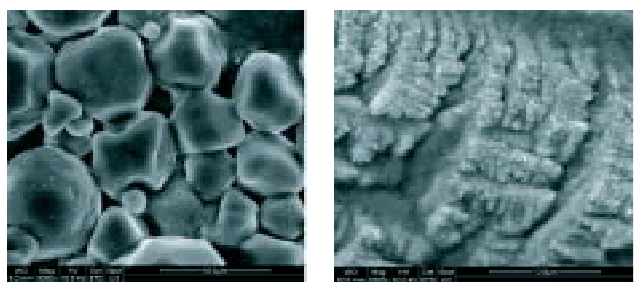
Fig.2 Scanning electron microscopy micrographs of globulin



A : 30 min 水解; B : 2 h 水解。

图3 醇溶蛋白扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron microscopy micrographs of prolamin



A : 30 min 水解; B : 2 h 水解。

图4 谷蛋白扫描电镜图

Fig.4 Scanning electron microscopy micrographs of glutelin

2.2 分子量分布

苦荞四种蛋白组分经胃蛋白酶水解 3 h 后, 酶解产物的分子量分布如图 5~8 所示。图 5 为清蛋白酶解物的分子量分布图谱, 从图中可以看出, 清蛋白酶解物的组分较为复杂, 一共有 13 种不同分子量的肽构成, 分子量分布在 5350Da 以下, 分子量为 5350Da 左右的组分占 11.68%, 分子量为 1276、622 和 202Da 的组分分别占 13.25%、17.86% 和 17.23%。球蛋白酶解物一共有 9 种组分构成(图 6), 分子量约为 9951Da 的组分占 12.73%, 分子量为 6716Da 左右的组分最多, 占 36.4%。另外分子量为 620 和 203Da 的组分所占比例也较大, 分别为 14.69% 和 15.31%。醇溶蛋白酶解物的组成相对来说, 较为简单(图 7), 主要由 6 种组成比例接近的组分构成, 这可能与较难被胃蛋白酶水解有关, 作用位点太少, 产生的碎片较少。谷蛋白酶解物的分子量分布图谱如图 8 所示, 所得组分的分子量偏大, 主要分布在 10900~2785Da 之间, 其中 10903Da 的组分占 16.24%, 6707Da 的组分最多, 占 27.03%。这表明谷蛋白经胃蛋白酶消化后, 所产生的低分子量碎片少, 主要还是一些高分子量的碎片, 因此其消化率较低。

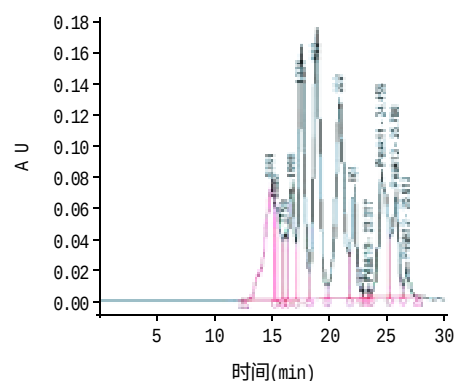


图5 清蛋白酶解产物的分子量分布图谱

Fig.5 Molecular weight distribution profile of albumin hydrolysates

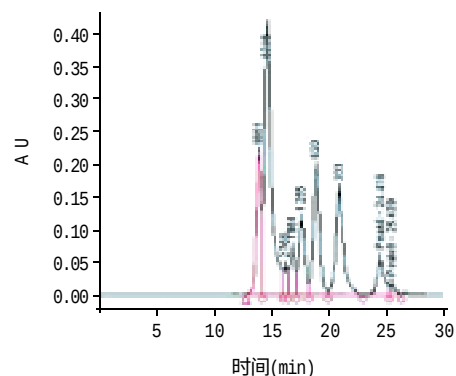


图6 球蛋白酶解产物的分子量分布图谱

Fig.6 Molecular weight distribution profile of globulin hydrolysates

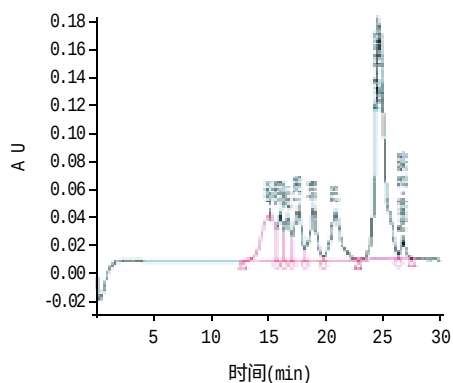


图7 醇溶蛋白酶解物的分子量分布图谱
Fig.7 Molecular weight distribution profile of prolamin hydrolysates

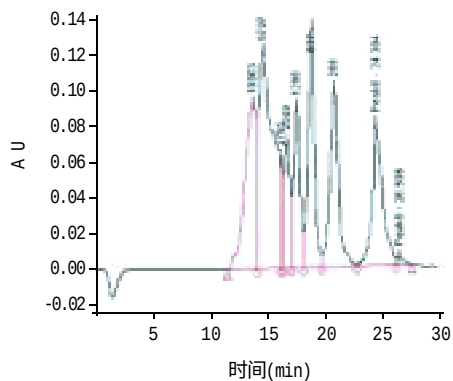


图8 谷蛋白酶解产物的分子量分布图谱
Fig.8 Molecular weight distribution profile of glutelin hydrolysates

3 结 论

苦荞麦蛋白质氨基酸组成均衡,并且具有较高的生物价,开发利用前景好。通过扫描电镜对其四种蛋白质组分酶解产物的超微结构进行观察发现,胃蛋白酶作

用于四种组分的方式是不同的,胃蛋白酶不仅可以作用与清蛋白和球蛋白的表面,而且随着水解进程的延长胃蛋白酶还可以作用与清蛋白和球蛋白的内部结构,因此其体外消化率相对较高。而对于醇溶蛋白和谷蛋白,其高级结构相对较为稳定,胃蛋白酶只能作用于其表面,很难作用其内部结构,所以这两种蛋白组分的体外消化率相对较低。此外还通过高效液相对其酶解物的分子量分布进行研究,结果表明,清蛋白和球蛋白酶解物的分子量相对较低,组分多,被酶解的程度高。醇溶蛋白酶解物的组成较为简单,这可能由于被胃蛋白酶作用的位点较少所造成的。而谷蛋白,其酶解物的分子量分布广,高分子量的组分所占比例大,这表明其被酶解的程度相对较低。

参考文献:

- [1] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. 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: 1395-1400.
- [2] TOMOTAKE H, et al. 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 Biotechnol Biochem, 2001, 65(6): 1412-1414.
- [3] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of a buckwheat protein extract retards 7,12-Dimethylbenz [α] anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(10): 1837-1839.
- [4] TOMOTAKE H, et al. 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] ROM D L, SHULL J M, CHANDRASHEKAR A, et al. Effects of cooking and treatment with sodium bisulfite on *in vitro* protein digestibility and microstructure of sorghum flour[J]. Cereal Chemistry, 1992, 69: 178-181.

信 息

金针菇和日本冬菇可抗癌

新加坡国立大学医学院研究人员发现,金针菇含有一种蛋白,可以预防哮喘、鼻炎、湿疹等过敏症,也可以提高免疫力,甚至可以抗病毒感染和癌症。

国立大学儿科系蔡考圆教授透露,过敏症是一种由Th2细胞激素引发的免疫系统失调疾病。抗体本来应该对抗侵袭身体的外来物质,但当免疫系统失调时,患者所产生的抗体不去对抗“外敌”,反而去“打”自己身体里的细胞组织。

金针菇的茎含有一种大量的蛋白,可以刺激身体产生更多Th1细胞激素,来抑制Th2细胞激素所引发的疾病。她说:“我们体内其实含有许多对抗疾病的机制,但当一些部分失调时,我们就得借助外在因素来把它调整回来,金针菇的蛋白扮演的就是这一角色。”此外,蔡教授还发现,这种蛋白也可以刺激宫颈癌病人体内的天然抗癌机制,靠病人自己的免疫能力来对抗癌细胞。