

薏苡仁蛋白质组分研究*

王灵芝 袁建娜 张小华 乔延江[△]

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要 目的: 对药食两用功能的薏苡仁蛋白质四类组分和氨基酸含量进行分析。**方法:** 采用旋光法、索氏提取法、烘干法、马弗炉法分别进行淀粉、粗脂肪、水分和灰分的测定;采用顺序抽提法依次进行清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白的提取,用 Brandford 和凯氏定氮法进行蛋白质含量分析;采用氨基酸分析仪进行氨基酸含量测定。**结果:** 薏苡仁总蛋白含量为 14.17%,其中清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白含量分别为 0.20、0.88、6.34 和 5.30 mg/100mg 鲜重,分别占总蛋白质含量的 1.43%、6.20%、44.74%和 37.38%;薏苡仁粉经酸水解后共检测到 15 种氨基酸,除 Trp 外,人体必需氨基酸和半必需氨基酸均有检测到;各氨基酸含量也存在着差异,含量最高的为 Glu(3.59 mg/100mg),含量最低的为 Met(0.17 mg/100mg)。**结论:** 薏苡仁蛋白中醇溶蛋白和谷蛋白含量较丰富,为今后进一步开发薏苡仁功能食品提供了理论数据。

关键词: 薏苡仁;蛋白质;氨基酸

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)23-4416-03

Protein Composition Analysis of *Coix Lacryma-Jobi L. var. ma-yuen* (Roman.) Stapf Seeds*

WANG Ling-zhi, YUAN Jian-na, ZHANG Xiao-hua, QIAO Yan-jiang[△]

(School of Chinese material medica, Beijing University of Chinese medicine, Beijing, 100102, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the major proteins and amino acid composition of *Coix* seeds. **Methods:** Polarimetry, Soxhlet extraction and drying method were respectively used to analyze the starch, crude fat and water content. Muffle furnace was applied when the ash percentage was measured. Albumins, globulins, coixins and glutelins were sequentially extracted and then quantified. Amino acid content was measured by amino acid analyzer Hitachi L 8900. **Results:** The total protein content of *Coix* seeds was 14.17%, among which the contents of albumins, globulins, coixins and glutelins were 0.20, 0.88, 6.34 and 5.30 mg/100 mg fresh weight, accounting for 1.43%, 6.20%, 44.74% and 37.38% of total protein content, respectively. A total of 15 kinds of amino acid were detected in this research, including all essential and semi-essential amino acids for human beings except for Trp. There was a wide range of amino acid contents, from Glu, the highest composition (3.59 mg/100 mg) to Met, the lowest (0.17 mg/100 mg) one. **Conclusions:** Coixins and glutelins are the most abundant proteins of *Coix* seeds, and this research provides valuable sights for exploring functional food from *Coix* seeds.

Key words: Seeds of *Coix*; Protein; Amino acid

Chinese Library Classification (CLC): R282.7 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)23-4416-03

薏苡仁为禾本科植物薏苡 (*Coix lacryma-jobi L. var. ma-yuen* (Roman.) Stapf) 的干燥成熟种仁,主产于我国福建、河北、辽宁等地,为传统常用中药,具有利水渗湿、健脾、除痹、清热排脓等功效,可用于治疗水肿、小便不利、脚气、脾虚泄泻、湿痹拘挛、肺痈、肠痈等^[1]。现代研究表明,薏苡仁含有多种药理活性的物质,如酯类、不饱和脂肪酸类、糖类及内酰胺类等,具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、降血糖^[4]的功能,且已有药物已成功上市^[5]。蛋白作为生命结构和功能的重要组成部分,因此具有重要研究价值,近几十年来禾本科植物种子蛋白也获得广泛研究。种子储藏蛋白根据其溶解特性可分为四大类:清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白^[6]。目前有大量关于小麦、大麦、玉米、高粱、水稻等重要作物种子储藏蛋白研究,我国尚未有关于薏苡仁蛋白质组成的详细报道,本实验对薏苡仁蛋白质组成、分子量大小做

了较详细研究,并对氨基酸组成进行了分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

薏苡仁购自北京同仁堂药店(产地福建,批号为 20110702),经北京中医药大学药系刘春生教授鉴定为禾本科植物薏苡的干燥果仁。其它试剂均为分析纯。

DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),BP221S 型电子分析天平(Sartorius 公司),Neofuge 23R 型台式高速冷冻离心机(Heal Force Development Ltd),SR-JX-4-13 型高温电阻炉(北京市永光明医疗仪器长),WXG-4 型旋光仪(上海申光仪器仪表有限公司)。

1.2 实验方法

* 基金项目 国家自然科学基金委青年科学基金项目(81102750) 北京中医药大学中药信息工程科研创新团队(CXTD-11)

作者简介:王灵芝(1974-),女,博士,主要研究方向为生物制药

[△]通讯作者:乔延江(1956-),男,教授,博士,研究方向为中药信息工程、中药信息开发。E-mail: yjqiao@263.net

(收稿日期: 2012-03-14 接受日期: 2012-04-10)

1.2.1 主要成分含量测定 蛋白质含量测定 薏苡仁研成粉末，并过 40 目筛。总蛋白质含量、醇溶蛋白和谷蛋白含量测定采用凯氏定氮法^[7] 精密称定 100 mg 固体或者 5 mL 蛋白溶液于凯氏烧瓶中，然后依次加入浓硫酸(95%-98%)和催化剂并于热源上消化，直至消化终点。将定容的消化液蒸馏，并用 0.01 M 的稀盐酸滴定。

样品中蛋白质含量%=(A-B)× 0.01× 14× 6.25× N/ (C× 1000) × 100%

A 为滴定样品用去的稀盐酸平均体积 (mL) B 为滴定空白用去的稀盐酸平均体积(mL) 0.01 为稀盐酸的当量浓度，14 为氮的原子量，6.25 为系数，N 为样品的稀释倍数，C 为称量样品的重量(g)。清蛋白、球蛋白含量测定采用 Brandford 方法^[8]。旋光法进行淀粉含量测定^[9]，烘干法进行水分测定^[10]，马弗炉法进行灰分测定^[11]，索氏提取法进行粗脂肪含量测定^[12]。

1.2.2 蛋白质顺序抽提 采用顺序抽提法进行薏苡仁四大类蛋白的提取^[13,14]。薏苡仁粉末经石油醚脱脂，真空干燥，依次用双蒸水、0.5 M NaCl、70%乙醇（5% β- 巯基乙醇，0.5% NaAc）、0.0125 M 硼酸钠缓冲液(1%SDS，2% β- 巯基乙醇)来抽提清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白。每组分震荡抽提 1 小时，离心 9277 rcf 15 min，收集上清液，沉淀用来提取下一组分。

1.2.3 SDS-PAGE 采用垂直板不连续体系^[15]：分离胶浓度 15%，浓缩胶浓度 5%。蛋白溶液加入上样缓冲液后，100℃变性 5 min，上样量 20 μg，恒压电泳。当溴酚蓝指示剂距胶底 5 mm 时，停止电泳。考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.4 氨基酸含量分析 精密称定样品粉末溶于 6 M HCl，110℃真空水解 24 h。水解产物真空干燥后溶于适量 0.02 M HCl，日立 L-8900 测定氨基酸含量^[13]。

2 结果

2.1 薏苡仁总蛋白及其它组分含量分析

薏苡仁主要成分见表 1 淀粉为 70.84± 0.49%，总蛋白含量为 14.17± 0.27%，而粗脂肪、灰分和水分含量分别为 3.83± 0.32%、1.50± 0.01%和 10.68± 0.11%。

2.2 薏苡仁蛋白组分分析

采用顺序抽提法依次用双蒸水、0.5 M NaCl、70%乙醇(5% β- 巯基乙醇，0.5% NaAc)和碱性溶液提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白，经 SDS-PAGE 电泳后，分离结果如图 1 和图 2 所示。清蛋白(图 1,3)电泳条带较多，主要分布在 70-10 kD 之间，且各蛋白间表达量无明显差异。球蛋白(图 1,2)电泳条带相对较少，主要分布在 50-10 kD 之间，且蛋白表达量存在着明显差异，在 50、32、14 和 10 kD 左右存在着高丰度表达蛋白。醇溶蛋白按照分子量可分为 4 大类即 α (19 和 22 kD)、β (14 kD)、γ (16 and 27 kD)和 δ (10 kD)，在薏苡仁中表达量最高的是 α- 醇溶蛋白，其次是 γ，而 β 和 δ - 醇溶蛋白表达量较低，条带不明显。谷蛋白条带也较丰富，且存在着表达差异。对四大类蛋白定量分析结果如表 2 所示，清蛋白含量为 0.20± 0.02 mg/100 mg(鲜重)，占薏苡仁总蛋白的 1.43%，含量最低，其次是球蛋白，占蛋白质含量的 6.20%。四类蛋白中，含量最高的醇溶蛋白，其绝对含量和相对含量分别为 6.34± 0.07 mg/100 mg 和 44.74%，谷蛋白含量为 37.38 mg/100 mg。因此，薏苡仁储藏蛋白中以醇溶蛋白和谷蛋白为主，占总蛋白含量的 82.22%。

2.3 薏苡仁氨基酸组成分析

采用酸水解法，进行薏苡仁氨基酸含量测定，共检测到 15 种氨基酸，其中含量最高的是 Glu 为 3.59 mg/100 mg，其次是 Leu 和 Pro 分别为 2.35 mg/100 mg 和 1.89 mg/100 mg。人体必需氨基酸和半必需氨基酸 Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His 和 Arg 的含量分别为 0.42、1.23、0.17、0.54、2.35、0.46、0.24、0.30 和 0.44 mg/100 mg。

表 1 薏苡仁主要成分含量(%)
Table 1 Main composition of Coix (%)

Compositon	Protein	Starch	Crude fat	Ash	Water
	14.17± 0.27	70.84± 0.49	3.83± 0.32	1.50± 0.01	10.68± 0.11

表 2 薏苡仁蛋白质组分分布(%)
Table 2 Protein composition of Coix (%)

	Albumins	Globulins	Coixin	Glutelins	Residual
Content (mg/100 mg fresh weight)	0.20± 0.02	0.88± 0.01	6.34± 0.07	5.30± 0.17	0.29± 0.04
Percentage of total protein content fresh weight	1.43	6.20	44.74	37.38	1.88

3 讨论

作为禾本科植物的重要成员之一，薏苡仁的起源、进化、药物价值的开发始终是研究热点之一^[2-4,16,17]。随着蛋白质组学的蓬勃发展，薏苡仁中蛋白结构和功能的研究逐渐引起了人们的兴趣。Zhou 选取了薏苡仁 22-KDα- 醇溶蛋白基因家族位点，进行了比较基因组学研究^[18]，并提出了高粱、玉米和薏苡该基因家族的进化模型，即三类基因均经历了两轮的基因扩增：早期

的局部基因复制和后期的快速基因扩增。通过氨基酸序列比对发现，甘蔗、玉米、高粱和薏苡仁醇溶蛋白氨基酸序列同源性在 50%以上，有的可高达 85%^[19]。根据溶剂不同将储藏蛋白分为：清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白，其中后两者所占比例较高。醇溶蛋白作为禾本科植物主要的储藏成分，约占总蛋白量的 50%左右^[19]，本实验中醇溶蛋白占总蛋白的 44.74%，与 Otto-boni 报道的 68.3%有一定的差异^[20]，其主要原因在于 (1)不同产地、不同品种、不同收获季节的材料间蛋白含量存在着明显

表 3 薏苡仁氨基酸含量分析(mg/100 mg)
Table 3 Total amino acid content of Coix

Amino acid	Mean± SD
Asp	0.89± 0.05
Thra	0.42± 0.00
Ser	0.63± 0.20
Glu	3.59± 0.16
Gly	0.29± 0.02
Al ^a	1.54± 0.12
Val ^a	1.23± 0.15
Met ^a	0.17± 0.07
Ilea	0.54± 0.02
Leu ^a	2.35± 0.15
Phe ^a	0.46± 0.13
Lys ^a	0.24± 0.03
His ^a	0.30± 0.04
Arg ^a	0.44± 0.08
Pro	1.89± 0.12

注：^a 人体必需 / 半必需氨基酸。
Note:^a(semi-)essential amino acid for human being.

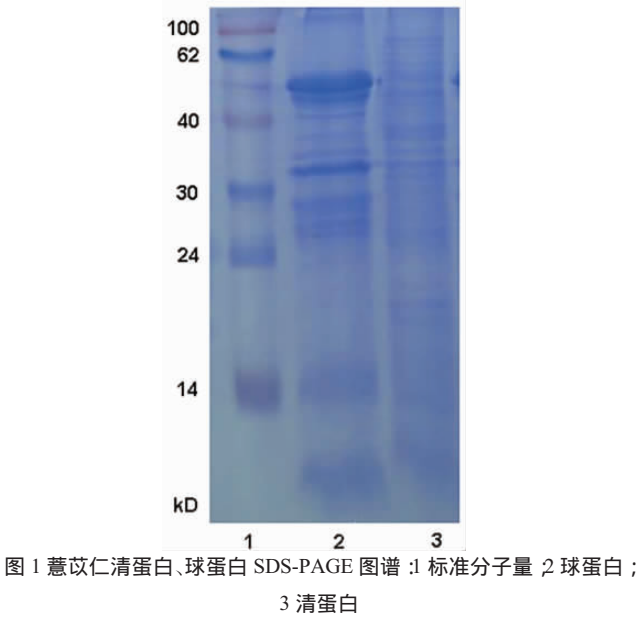


图 1 薏苡仁清蛋白、球蛋白 SDS-PAGE 图谱 :1 标准分子量 2 球蛋白 ; 3 清蛋白

的差异 (2)不同的提取方法导致实验结果的差异 ,本实验所用的提取液为 70%乙醇(5% β- 巯基乙醇) ,固液比 1 :10 ;而后者使用的抽提液为异丙醇(5% β- 巯基乙醇) ,固液比为 1 :3 ;提取液和固液比的不同 ,导致了提取效率的差异。
薏苡作为药食两用植物 ,在民间有着广泛的应用价值 ,因此 ,本研究对其氨基酸含量进行了测定。结果表明 ,薏苡仁营养价值较高 ,共检测到 Thr、Val、Met、Ile、Phe、Lys、Leu、Arg 和 His

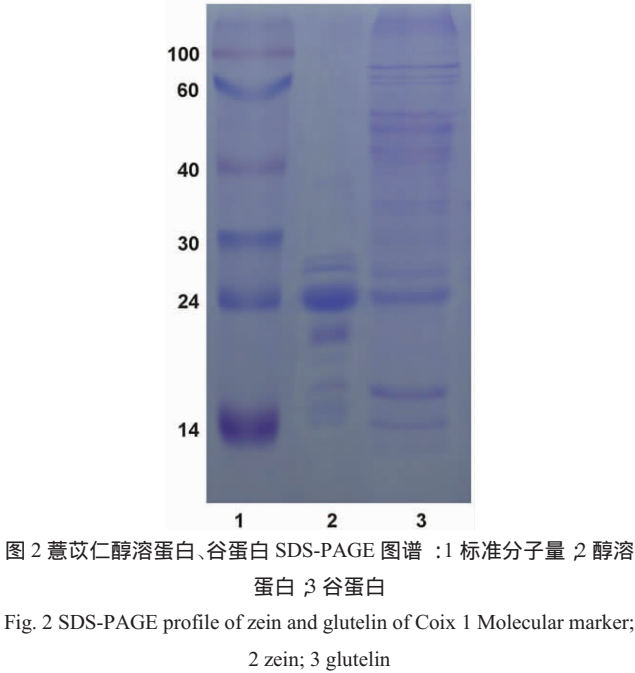


图 2 薏苡仁醇溶蛋白、谷蛋白 SDS-PAGE 图谱 :1 标准分子量 2 醇溶蛋白 ;3 谷蛋白
Fig. 2 SDS-PAGE profile of zein and glutelin of Coix 1 Molecular marker; 2 zein; 3 glutelin

9 种人体必需或半必需氨基酸 ;由于本实验采用酸水解法 ,在水解过程中 Trp 的吲哚环高温下易被氧化而破坏 ,因而未检出 ,Cys 和 Tyr 可能由于含量较低而未检测到。

因此 ,本研究较系统的研究了薏苡仁蛋白质组成、含量和氨基酸分布 ,为今后利用薏苡仁蛋白质开发功能食品提供了理论和实践基础。

参 考 文 献 (References)

[1] 张廷模.中药学[M].北京,高等教育出版社,2008,116-117
Zhang Ting-mo. Chinese material medica [M]. Beijing, Higher Education Press,2008,116-117

[2] Yu F, Gao J, Zeng Y, et al. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity [J]. J Ethnopharmacol, 2008,119:252-258

[3] Manosroi J, Khositsuntiwong N, Manosroni A. Biological activities of fructooligosaccharide (FOS)-containing Coix lachrymal-jobi Linn. extract [J]. J Food Sci Technol, DOI 10.1007/s13197-011-0498-6

[4] 吴岩, 原永芳. 薏苡仁的化学成分和药理活性研究进展[J]. 华西药学杂志, 2010,25(1):111-113
Wu Yan, Yuan Yong-fang. Progress on the research of chemical compositions and pharmacological activities of Coix seeds [J]. West China J Pharmaceu Sci,2010,25(1):111-113

[5] 张珞,于正洪,史兆荣. 中药注射液治疗肺癌研究进展 [J].现代肿瘤医学 ,2011,19(11) :2349-2351
Zhang Luo, Yu Zheng-hong, Shi Zhao-rong. Progress on the research of traditional Chinese medicine injection against lung cancer [J]. J Modern Oncol,2011,19(11):2349-2351

[6] Chen L, Fischer H, Jensen U. Accumulation of seed storage proteins and the taxonomy of Poaceae[J]. Pl Syst Evol,1997,206:243-257

[7] 李建武,肖能庆,于瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京大学出版社,2004 :160-164
Li Jian-wu, Xiao Neng-qing, Yu Rui-yuan, et al. The principle and method of biochemistry experiment [M]. Beijing University Press, 2004:160-164

(下转第 4432 页)

- [J]. Mol. Cell Biochem, 2000, 209: 17-27
- [5] Shan, Y., Pepe, J. Induction of heme oxygenase-1 reporter gene constructs by metalloporphyrins in cultured cells [J]. Hepatology, 1999, 30: 512A
- [6] Jung-Woo Bae, Mi-Jeong Kim. Protective effects of heme oxygenase-1 against MPP⁺-induced cytotoxicity in PC-12 cells [J]. Neurol Sci, 2010, 31: 307-313
- [7] Cuadrado A, Rojo AI. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14: 429-442
- [8] Anne R. kinderlerer, Isabel Pombo Gregoire. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin [J]. Blood, 2009, 113(7): 1598-1607
- [9] Hill-Kapturczak, Chang. Heme oxygenase and the kidney [J]. DN A Cell Biol, 2002, 21: 307-321
- [10] Elbirt, K. K., Bonkovsky. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role [J]. Proc. Assoc. Am. Physicians, 1999, 111: 438-447
- [11] Bonkovsky, Elbirt, K. K. Heme oxygenase: its regulation and role [J]. World Scientific, River Edge, NJ, USA, 2002: 690-706
- [12] Dore S, Ferris CD. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 96: 2445-2450
- [13] Shan, Y., Pepe, J. Mapping of the chick heme oxygenase-1 promoter for responsiveness to metalloporphyrins [J]. Arch. Biochem. Biophys, 2002, 399: 159-166
- [14] Abraham, N. G. Differential effect of cobalt protoporphyrin on distributions of heme oxygenase in renal structure and on blood pressure in SHR [J]. Cell Mol. Bio. (Noisy-le-grand), 2002, 48: 895-902
- [15] Fu, S. H. Cobalt-protoporphyrin treatment enhances murine islets engraftment [J]. Transplant. Proc, 2004, 36: 2205-2206
- [16] Glanemann, M., Schirmeire. Cobalt proporphyrin induce heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration [J]. Transplant. proc, 2005, 37: 3223-3225
- [17] Hsu, B. R. A single-dose of cobalt-protoporphyrin protects islet Beta cells from glucocorticoid suppression [J]. Transplant. Proc, 2005, 37: 1826-1827
- [18] Ying shan, Richard W. Lambrecht, et al. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin [J]. The FASEB Journal, 2006, 20: 2258-2267
- [19] Helena Parfenova, Pierluigi Carratu. Epileptic seizure cause extended postcal cerebral vascular dysfunction that is prevented by HO-1 overexpression [J]. Heart, 2005, 288(6): 2843-2850
- [20] Angelo A. Chora, Paulo Fontoura. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117(2): 438-447

(上接第 4418 页)

- [8] 李建武, 肖能庆, 于瑞元等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京大学出版社, 2004, 174-176
- Li Jian-wu, Xiao Neng-qing, Yu Rui-yuan, et al. The principle and method of biochemistry experiment [M]. Beijing University Press, 2004, 174-176
- [9] 秦大鹏. 高淀粉玉米籽粒淀粉机理的生理生化机制 [D]. 山东农业大学硕士论文, 2008, 19-20
- Qin Da-peng. Physiological and biochemical mechanisms of starch accumulation in high-starch maize [D]. Shandong Agricultural University Master Thesis, 2008, 19-20
- [10] 国家药典委员会, 中国药典 (一部) [S]. 中国医药科技出版社, 2010: 附录 52
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (vol.1) [S], China Medical Science Press, 2010: appendix 52
- [11] 国家药典委员会, 中国药典 (一部) [S]. 中国医药科技出版社, 2010: 附录 53
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (vol.1) [S], China Medical Science Press, 2010: appendix 53
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 高等教育出版社, 2000: 225-227
- Li He-sheng. Experimental principles and techniques of plant physiology and biochemistry [M]. Higher Education Press, 2000: 225-227
- [13] Wang LZ, Xu CZ, Qu ML, et al. Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from Zea mays ssp. mexicana into cultivated maize [J]. J Cereal Sci, 2008, 48: 387-393
- [14] Wallace JC, Lope MA, Paiva E, et al. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2 maize [J]. Plant Physiol, 1990, 92: 191-196
- [15] 分子克隆实验指南 [M]. (第三版) 萨姆布鲁克. 科学出版社, 2008, 1713-1720
- Molecular Cloning: A laboratory manual on the WEB [M]. (Third Edition). SAMBROOK J. Science Press, 2008, 1713-1720
- [16] Qin F, Li J, Li X, et al. AFLP and RFLP linkage map in Coix [J]. Genet Resour Crop Ev, 2005, 52: 209-214
- [17] Ma K, Kim K, Dixit A, et al. Assessment of genetic diversity and relationships among Coix lacryma-jobi accessions using microsatellite markers [J]. Biol Plantarum, 2010, 54(2): 272-278
- [18] Zhou L, Huang B, Meng X, et al. The amplification and evolution of orthologous 22-kDa α -prolamin tandemly arrayed genes in coix, sorghum and maize genomes [J]. Plant Mol Biol, 2010, 74: 631-643
- [19] Figueira TRS, Serrano GCM, Arruda P. Evolution of the genes encoding seed storage proteins in Sugarcane and maize [J]. Tropical Plant Biol, 2008, 1: 108-119
- [20] Ottoboni LMM, Leite A, Targon MLN, et al. Characterization of the storage protein in seed of Coix lacryma-jobi var. Adlay [J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 631-635