

# 银杏种子和叶的蛋白质分析

梁红 徐斌 潘伟民 张伟锋

(仲恺农业技术学院, 广州 510225)

**摘要:** 采用分级提取方法提取银杏(*Ginkgo biloba* L.)种子和银杏叶蛋白质,并进行各组分蛋白质含量测定和银杏种子后熟过程中蛋白质含量动态变化的分析。结果表明,银杏种子以水溶性和盐溶性蛋白质为主,银杏叶以醇溶性蛋白质为主。银杏叶中主要蛋白质在 HPLC 柱中的保留时间为 3.457 min,相对含量达 70%以上。银杏叶蛋白质含有丰富的亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸和色氨酸,其含量分别为 20.23%、13.35%、4.81%和 3.73%。萌发种子胚体中的蛋白质主要是醇溶性蛋白质和谷蛋白类蛋白质。在种子萌发过程中,胚乳蛋白质含量明显增加,播种后第 3 周和萌发时总蛋白质含量达到高峰。

**关键词:** 银杏;蛋白质;种子;叶

中图分类号: S664.3; Q946.1; Q516 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2000)04-0005-04

**Analysis of proteins in seeds and leaves of *Ginkgo biloba* L.** LIANG Hong, XU Bing, PAN Wei-min, ZHANG Wei-feng (Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(4): 5~8

**Abstract:** By means of multiple-extraction, the proteins of *Ginkgo* seeds and leaves were extracted and the protein contents were determined. The results showed that the seed proteins were mainly water-soluble and salt-soluble and the leaf proteins were mainly ethanol-soluble. The main protein in the ethanol-soluble extract was over 70% relatively. The contents of amino acids Leu, Val, Lys and Trp in the leaf proteins were 20.23%, 13.35%, 4.81% and 3.73% respectively. The embryo proteins of germinated seeds were mainly ethanol-soluble and glutelin-like. During the germinated period, the proteins content of the endosperm increased obviously, in the 3rd week after sowing and germination, total content of endosperm protein reached to peak.

**Key words:** *Ginkgo biloba* L.; protein; seed; leaf

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是集种子、叶和木材等多种用途于一身的经济植物。中医典籍<sup>[1,2]</sup>记载,白果具有清痰止咳、缩小便、益脾气等功效。银杏叶提取物含有银杏黄酮和内酯类物质,是治疗心血管和神经系统疾病的良药。近年来,国内外学者还对白果的营养成分包括蛋白质等,进行了一系列研究<sup>[3-13]</sup>,但对银杏叶的蛋白质以及种子蛋白质组分分析和种子后熟过程中的蛋白质动态变化研究未见报道。本文报道银杏叶和种子蛋白质含量测定和组分分析的初步结果,并结合种子后熟过程中的动态变化及银杏食品加工和综合利用进行讨论。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

银杏种子于 1998 年和 1999 年 8 月下旬购自广东省南雄市及和平县(均为当年种子),室内晾去部

分水分后(含水量 30.25%)装入塑料编织袋,贮存于冰箱中备用。1998 年 12 月 2 日取部分贮藏种子播种于花盆内,作为萌动种子(含水量 45.35%)取材用。1999 年 11 月上旬取贮藏种子埋于细河沙中,进行后熟和催芽,每隔 7 天取材 1 次,供蛋白质测定用。

银杏叶于 1998 年 6 月分别采自南雄市和仲恺农业技术学院农场。一部分经室内晾干后于 50℃ 烘干,粉碎后装瓶备用;另一部分装入塑料薄膜袋后保存于 -20℃ 下,作鲜叶测定用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白质样品制备

##### 1.2.1.1 种子蛋白质样品制备 取种仁 5 g 加蒸馏

收稿日期:2000-01-17

基金项目:广东省科委“百项工程”项目资助(粤科 99B05903X)

作者简介:梁红,男,1958 年 12 月生,广东新会人,博士生,副教授,主要从事生物技术、生物活性物质研究。

水 50 mL 研磨匀浆, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液为水溶性蛋白质; 其沉淀部分加 10% NaCl 50 mL 悬浮 5 min, 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液为盐溶部分; 盐溶后的沉淀再分别加 70% 乙醇和 0.2% NaOH 各 50 mL, 依次悬浮离心, 上清液为醇溶部分和碱溶性部分。上述 4 部分放冰箱过夜, 再 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液供蛋白质和氨基酸含量测定。

1.2.1.2 银杏叶蛋白质样品制备 取银杏鲜叶 50 g (或干叶 10 g) 加蒸馏水 100 mL 研磨匀浆、离心, 得水溶部分, 沉淀部分按种仁提取分离流程 (流程一) 加液、搅拌、离心, 分别提取盐溶、醇溶和碱溶蛋白质, 这 4 部分也置冰箱过夜再离心后供蛋白质和氨基酸含量测定。另取鲜叶 20 g, 先用 95% 乙醇 70 mL 萃取, 再用水、10% NaCl 和 0.2% NaOH 各 60 mL 依次萃取 (流程二), 冰箱过夜无沉淀, 直接供蛋白质和氨基酸含量测定。

1.2.2 蛋白质和氨基酸含量测定 采用考马斯亮

兰 G-250 法, 参照文献 [14] 测定蛋白质含量。按文献 [15] 测定必需氨基酸含量。

1.2.3 银杏叶醇溶性蛋白质 HPLC 分析 液相色谱仪为 HP1100, 柱温 30°C, 250mm × 4mm 的 C18 柱, 流动相为 V(甲醇): V(水) = 50:50, 流速为 1 mL/min, 紫外检测器 280 nm 处测定。

## 2 实验结果

### 2.1 银杏叶与种子的蛋白质含量

银杏叶与种子蛋白质含量的测定结果见表 1, 可以看出, 按流程一萃取, 干叶、鲜叶的蛋白质含量顺序均为: 醇溶蛋白质 > 水溶蛋白质 > 盐溶蛋白质, 碱溶部分为 0; 按流程二萃取, 叶中蛋白质含量顺序为醇溶蛋白质含量最高, 水溶部分其次, 碱溶部分再次, 盐溶部分最低。但不管采用流程一或流程二, 均是醇溶性蛋白质明显高于其他组分。

表 1 银杏叶与白果的蛋白质含量

Table 1 Content of proteins in Ginkgo leaves and seeds

样品 Sample	蛋白质含量 <sup>1)</sup> Protein content (%) <sup>1)</sup>				合计 Total
	水提组分 H <sub>2</sub> O extract	盐提组分 NaCl extract	醇提组分 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH extract	碱提组分 NaOH extract	
贮藏种子 Stored seeds	3.00	0.85	0.06	0.72	4.63
萌动种子 Germinated seeds	1.94	1.28	0.23	1.11	4.56
干叶 Dry leaves	1.200(0.992)	0.218(0.002)	4.557(4.652)	0.00(0.286)	5.975(5.932)
鲜叶 Fresh leaves	0.428(0.153)	0.282(0.004)	0.700(1.102)	0.00(0.162)	1.410(1.421)

<sup>1)</sup> 括号中数字为流程二的分析结果 Datum in the brackets is the result on procedure 2.

从表 1 还可看出, 贮藏种子的蛋白质大部分是水溶性的, 盐溶性其次, 碱溶性再次, 醇溶部分最低, 而萌发种子的水溶性蛋白质含量减少, 盐溶性、碱溶性和醇溶性蛋白质的含量均不同程度地增加, 但总量仍相近。

### 2.2 银杏种子后熟过程中蛋白质含量变化

银杏种子不同后熟时期蛋白质含量的测定结果见表 2。

从表 2 可以看出, 银杏种子完成后熟过程约需 7 周, 在后熟过程中蛋白质发生了不同程度的变化, 总蛋白质含量在播种 (沙埋) 第 3 周达到高峰, 然后逐渐下降, 至种子萌发时又达到另一高峰; 水溶部分主要为清蛋白类蛋白质, 盐溶部分主要为球蛋白类蛋白质, 含量变化趋势与总蛋白相似; 碱溶部分主要是谷蛋白类蛋白质, 在后熟过程中呈下降趋势, 但在播

表 2 不同后熟阶段银杏种子 (鲜重) 的蛋白质含量

Table 2 Content of proteins in Ginkgo seeds in different postmaturity period (FW)

后熟 天数 Days of postma- ture	分析 部位 <sup>1)</sup> Parts analysed <sup>1)</sup>	蛋白质含量 Content of protein (%)				合计 Total
		水提组分 H <sub>2</sub> O extract	盐提组分 NaCl extract	醇提组分 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH extract	碱提组分 NaOH extract	
0	S	3.25	2.65	0.45	2.35	8.70
7	S	4.95	4.10	0.65	1.95	11.65
14	S	4.80	3.74	0.73	0.60	9.89
21	S	6.10	8.50	0.15	1.95	16.70
28	S	5.47	8.48	0.00	1.20	15.15
35	S	5.45	4.90	0.19	1.51	12.05
42	S	5.10	5.45	0.17	1.18	11.90
49	Ed	6.33	7.07	0.76	1.95	16.11
	Eb	0.30	0.00	0.60	0.45	1.35

<sup>1)</sup> S: 种子 seed; Ed: 胚乳 endosperm; Eb: 胚 embryo

种后第1和第3周以及萌发时有较高的含量,醇溶性蛋白质含量较低,在后熟过程中的含量变化没有规律性,但在萌发时达到最大值。种子萌发时,胚乳中蛋白质含量远高于胚,相差10余倍,胚乳中蛋白质以盐溶性和水溶性蛋白质为主,而胚中的蛋白质则以醇溶性和碱溶性蛋白质为主。

### 2.3 银杏叶的醇溶性蛋白质

银杏叶蛋白质主要组分醇溶性蛋白质的HPLC分析结果见表3。可以看出,银杏鲜叶的醇溶部分分离出9种蛋白质,干叶中分离出7种。鲜叶和干叶的醇溶部分各含一种主要蛋白质,相对含量均在

70%以上,绝对含量为0.798%和3.413%。

### 2.4 银杏干叶几种必需氨基酸的含量

银杏干叶的必需氨基酸含量测定结果见表4。银杏叶蛋白质中6种人体必需氨基酸的含量达424.89 mg/g蛋白质。其中亮氨酸和缬氨酸的含量较高,赖氨酸和色氨酸也有一定含量。不同组分的几种氨基酸含量也有较大的差异,水溶性成分以赖氨酸和色氨酸为主,醇溶部分含缬氨酸最多,碱溶部分则含有较多的亮氨酸,而醇溶部分仅含少量色氨酸。银杏叶蛋白质6种人体必需氨基酸中异亮氨酸含量最低。

表3 银杏叶醇溶性蛋白质的HPLC分析

Table 3 HPLC analysis of ethanol-soluble proteins in Ginkgo leaves

样品 Sample	峰号 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	峰高 Peak height	峰面积 Peak area	相对含量 Relative content (%)
鲜叶 Fresh leaves	1	2.265	67 967.211	519 279.594	11.712 0
	2	2.615	8 332.590	114 653.742	2.585 9
	3	2.790	7 939.279	62 340.227	1.406 0
	4	3.015	57 614.164	319 320.313	7.202 1
	5	3.457	176 261.906	3 252 990.500	73.369 2
	6	4.157	2 208.656	49 891.617	1.125 3
	7	4.715	1 276.852	14 482.248	0.326 6
	8	4.890	1 139.541	23 726.115	0.535 1
	9	6.298	2 770.051	59 623.395	1.344 8
干叶 Dry leaves	1	2.248	81 073.016	714 488.563	12.314 3
	2	2.432	19 393.498	126 592.789	2.181 8
	3	2.607	12 274.688	191 348.188	3.297 9
	4	3.015	36 208.133	179 827.938	3.099 4
	5	3.132	32 550.260	233 099.672	4.017 5
	6	3.457	304 618.750	4 202 269.500	72.426 5
	7	6.298	4 666.270	90 612.242	1.561 7

表4 银杏干叶必需氨基酸含量

Table 4 Content of essential amino acids in Ginkgo dry leaves

组分 Constituent	必需氨基酸 Essential amino acids (mg/g)					
	Met	Lys	Trp	Ile	Val	Leu
水溶部分 H <sub>2</sub> O extract		1.52	1.34	0.67		
盐溶部分 NaCl extract			0.20			
醇溶部分 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH extract	3.03	42.48	34.18		117.33	83.95
碱溶部分 NaOH extract		4.05	1.62		16.18	118.34
合计 Total	3.03	48.05	37.34	0.67	133.51	202.29

## 3 讨论

### 3.1 贮藏种子与萌动种子蛋白质含量比较

贮藏种子与萌动种子蛋白质含量相近,但萌动

种子含水量较高,因而按干重计萌动种子蛋白质含量略高。可见,随着种胚的后熟生长,银杏种子的蛋白质含量相应增加,这与于新等的报道<sup>[4]</sup>相类似。萌动种子可溶性蛋白质含量的增加,有利于种子萌发和早期幼苗的生长。



银杏萌动种子可溶性蛋白质含量较贮藏种子高,其营养价值也相应提高,但其种胚的增大又降低其食用价值。梁红等采用辐射使种胚致死而又保持胚乳活性的贮藏方法<sup>[16]</sup>,如果能与种子的代谢活化结合起来,将有可能使种子食品的营养价值提高又避免由于胚体长大而出现的苦味和毒性。水溶液能够把种子可溶性蛋白质的大部分提出。因此,在以银杏种子为原料的银杏食品和饮料生产中,用萌动种子是较为可取的。

### 3.2 银杏叶蛋白质的利用

银杏干叶的蛋白质含量为 5.98%,可作为一种蛋白质资源加以开发利用。特别是生产银杏叶提取物下脚料,更是一种廉价的原料来源。因银杏叶蛋白质中以醇溶性蛋白质为主,为降低生产成本,宜使用工业酒精作为萃取溶剂并对其循环使用。由于银杏叶蛋白质含有丰富的亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸和色氨酸,作为饲料或食品添加剂,也是很有开发前途的。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一九九〇年版一部)[M]. 北京:人民卫生出版社、化学工业出版社,1990. 89~90.
- [2] 《中国药物大全》编委会. 中国药物大全,中药卷[M]. 北京:人民卫生出版社,1988. 297.
- [3] 许慕农,胡大维主编. 银杏栽培和产品加工技术[M]. 北京:中国林业出版社,1996. 1~3.
- [4] 于新,冯彤,庞杰,等. 不同时期银杏种子成分及呼吸变化[J]. 仲恺农业技术学院学报,1998,11(2):19~23.
- [5] Baeumlein H. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation protein of fungi[J]. Journal of Molecular Evolution, 1996, 41(6): 1070~1075.
- [6] Shutov A D. Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins; Evidence for a common single-domain ancestral gene[J]. Journal of Molecular Evolution, 1996, 41(6): 1057~1069.
- [7] Hager K P. Evolution of seed storage protein genes: legmin genes of *Ginkgo biloba*[J]. Journal of Molecular Evolution, 1995, 41(4): 457~466.
- [8] Arahira M. Ginkgo 11S seed storage protein family mRNA; unusual Asn-Asn linkage as post-translational cleavage site[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25(4): 597~605.
- [9] Hager K P. The N-terminal amino acid sequence of the beta-subunit of the legumin-like protein from seeds of *Ginkgo biloba* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(2): 523~525.
- [10] Duke M V. Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba* [J]. Arch Biochem Biophys, 1985, 243(1): 305~314.
- [11] Kimura Y. Purification and some chemical properties of 30KD *Ginkgo biloba* glycoprotein, which reacts with antiserum against beta (1~2) xylose containing glycans[J]. Biosci Biotechnol, 1999, 63(3): 463~467.
- [12] 张红,刘熊,阎隆飞. 银杏与玉米花粉机动蛋白的比较研究[J]. 植物学报,1997,39(11):998~1002.
- [13] Hodisan T. Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plant extracts[J]. J Pharm Biomec Anal, 1998, 18(3): 319~323.
- [14] 天津农学院,北京农学院,仲恺农业技术学院,等合编. 生物化学实验指导[M]. 天津:天津大学出版社,1993. 4~35,69~70.
- [15] 蒋滢主编. 氨基酸的应用[M]. 北京:世界图书出版公司,1996. 168~215.
- [16] 梁红,蔡业统,刘胜洪. 银杏种子辐射保鲜的初步研究[J]. 食品科学,1998,19(2):47~49.

(责任编辑:宗世贤)