

鹰嘴豆分离蛋白分离纯化

张涛, 江波, 沐万孟, 李艳红

(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以 Native-PAGE 或 RP-HPLC 为纯度检测手段, 运用 Sephacryl S-200 和 DEAE-Sephacryl CL-6B 对 CPI 进行分离纯化, 得到分子量为 170kD (标记为 B) 和 110kD 标记为 (D) 的两个主要组分, 这两个主要组分分别占蛋白质总量的 60.4% 和 17.7%。

关键词: 鹰嘴豆; 蛋白质; 分离纯化

Purification of Chickpea Protein Isolates

ZHANG Tao, JIANG Bo, MU Wan-meng, LI Yan-hong

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Chickpea protein isolates (CPI) were separated and purified with Sephacryl S-200 and DEAE-Sephacryl CL-6B successively, and two major fractions were obtained, accounting for 60.4% and 17.7% of the total proteins, which molecular weights were 170 kD (signed as B) and 110 kD (signed as D), respectively.

Key words: chickpea; protein; purification

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0158-04

蛋白质的功能性质不仅与其来源、加工方法等有关, 而且与蛋白质的物理化学性质、结构特征等密切相关, 包括蛋白质的大小、形状、氨基酸组成及序列、带电情况及其分布、疏水/亲水比例、二级结构(α -螺旋、 β -折叠、转角、无规卷曲)及其含量分布、三级及四级结构、分子内或分子间交联以及蛋白质在溶液环境中的分子伸展情况(即分子柔性)等^[1], 而蛋白质的分离纯化研究对其结构特性研究极为重要。

鹰嘴豆是世界第二大消费豆类, 产量居世界豆类第三^[2-6], 是目前世界上栽培面积较广的食用豆类作物之一。作为植物蛋白质的重要来源, 对鹰嘴豆分离蛋白的制备方法及其功能性质研究较多^[4, 7-11]。但有关鹰嘴豆分离蛋白的分离纯化研究尚未见报道。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

鹰嘴豆 新疆市售。

Sephacryl S-200、DEAE-Sephacryl CL-6B Pharmacia 公司; 四甲基乙二胺(TEMED)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺 Merck 公司; 乙腈(色谱纯) 上海国大化工有限公司; 蓝葡聚糖(200 万, 生化试剂)、丙烯酰胺

Sigma 公司; 其他所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

层析柱(ϕ 1.6cm \times 150cm, ϕ 2.6cm \times 20cm) 上海锦华层析设备厂; HL-2 恒流泵、BS-100A 型自动部分收集器 上海市沪西仪器厂; HD-93-1 型紫外检测仪 上海金达生化仪器厂; 垂直板电泳槽(仪) Bio-Rad 公司; HPLC 色谱仪 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 鹰嘴豆分离蛋白的制备

参照文献[9]制备。

1.3.2 Sephacryl S-200 凝胶过滤

凝胶 Sephacryl S-200 在洗脱缓冲液中平衡后脱气并装入 ϕ 16mm \times 1.5m 柱中。0.5ml 2mg/ml 的蓝葡聚糖(200 万)液测定凝胶柱的外水体积 V_0 。1.0ml 1.0% 铬酸钾测定内水体积 V_i , 即总体积 V_t 。洗脱缓冲液: pH7.6 的磷酸盐缓冲液, 含 0.0325mol/L K_2HPO_4 、0.0026mol/L KH_2PO_4 、0.4mol/L NaCl、离子强度 0.5mol/L 和 0.01mol/L 疏基乙醇^[12]。样品制备: 0.5g CPI 溶于 10ml pH7.6 的磷酸盐缓冲液中, 4℃、10000 \times g 离心 15min, 取上清液并在缓冲液中透析 12h 平衡, 更换缓冲液 4 次。上样量: 4ml, 蛋白质 46.4mg。检测器于 280nm 波长处紫

收稿日期: 2007-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20436020)

作者简介: 张涛(1973-), 女, 讲师, 研究方向为天然资源的开发及产品深加工。E-mail: ztsk@163.com

外检测。纯度检测采用 Native-电泳。

1.3.3 DEAE-Sepharose CL-6B 层析

用起始磷酸盐缓冲液平衡柱子(φ 2.6cm × 20cm)后上样,洗脱流速为 100ml/h。起始缓冲液: pH7.6 的磷酸盐缓冲液,含 0.0325mol/L K₂HPO₄、0.0026mol/L KH₂PO₄。洗脱缓冲液: 起始缓冲液中加入不同浓度的 NaCl 溶液分步梯度洗脱, NaCl 浓度 0~0.5mol/L(如图 3、4 所示),每个梯度洗脱两个柱体积(200ml)。样品制备: S-200 分离纯化后得到的组分,在 DEAE 起始缓冲液中透析脱盐、10kDa 超滤膜浓缩后上样。上样量为 40ml,蛋白质 120mg。检测器于 280nm 波长处紫外检测。纯度检测: 采用反相高压液相色谱。

1.3.4 反相高压液相色谱(RP-HPLC)分离纯化

HPLC 系统: Agilent 1100。柱类型及规格: Zorbax 300SB C₁₈(4.6 × 250mm), 产自美国 Waters 公司。检测波长: 220nm。温度: 30℃。进样量: 10μl。洗脱液流速: 1ml/min。洗脱液: A、B 两种洗脱液, A 为 5% 的乙腈(加 0.05% 的三氟乙酸(TFA)), B 为 80% 的乙腈(加 0.05% 的 TFA)。洗脱条件: 梯度洗脱, 上样前先用 A 液平衡, 上样后 5%~80% 的乙腈洗脱 15min 后, B(80% 的乙腈)液继续洗脱 5min, 再用乙腈浓度逐渐降低的模式(乙腈浓度从 80% 到 5%)洗脱 5min。洗脱条件如表 1 所示。

表 1 RP-HPLC 洗脱方法
Table 1 Elution method of RP-HPLC

时间(min)	0	15	20	25
A(5% 乙腈, 0.05% TFA)	100	0	0	100
B(80% 乙腈, 0.05% TFA)	0	100	100	0

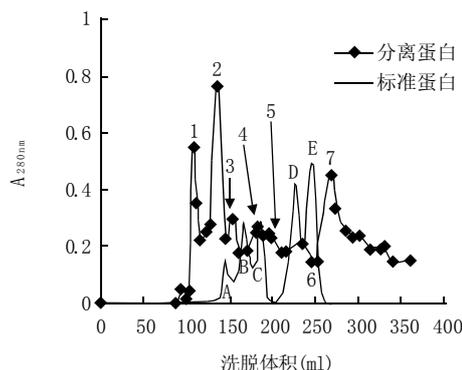
1.3.5 Native-电泳

参照文献[13]并略做修改。浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4% 和 10%, 电流 20mA, 染色液 1% 考马斯亮蓝 R250, 上样浓度 2mg/ml, 上样量 10μl。

2 结果与分析

2.1 S-200 凝胶过滤色谱分离纯化及其纯度鉴定

根据分子筛效应,用 S-200 凝胶过滤色谱对 CPI 进行分离纯化,结果如图 1 所示。CPI 分成分子量不同的七个组分,首先洗脱出来的第一个峰略带混浊,是由一些可见杂质离子及大分子聚合物组成。根据洗脱体积与标准蛋白质分子量的关系(图 2)计算出它们的分子量和用 Follin-酚法测得的各个峰的蛋白质含量与上样量的比,结果见表 3。由表 3 可知, CPI 含有两个主要组分峰 2 和 3, 分子量分别为 170kD 及 112kD, 蛋白质含量分别占总量的 50.8% 和 28.5%。



流速 16.5ml/h, 280nm 紫外检测; 蛋白质标准分子量 A 为二磷酸果糖酶(Mw 158000); B 为牛血清蛋白(Mw 68000); C 为鸡蛋蛋白(Mw 45000); D 为胰凝乳蛋白酶原(Mw 25000); E 为细胞色素 C(Mw 12500)。

图 1 S-200 凝胶分离色谱
Fig.1 Chromatography of S-200

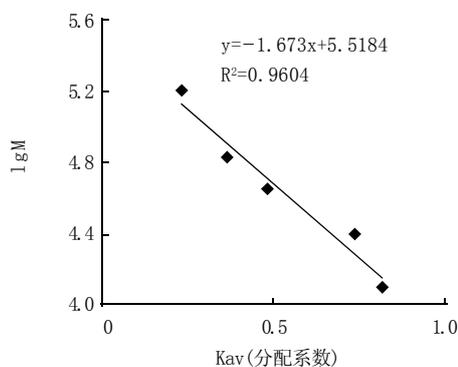


图 2 S-200 洗脱体积与分子量的关系

Fig.2 Relationship between molecular weight and elution volume of S-200

表 3 S-200 各峰的蛋白质组成及含量

Table 3 Protein fractions and contents of peaks from S-200

色谱峰	1	2	3	4	5	6	7
Kav	0	0.17	0.28	0.47	0.55	0.79	0.98
分子量(kD)	330	170	112	54.0	39.5	15.9	7.50
占百分数(%)	4.95	50.8	28.5	4.83	6.17	3.05	1.70

用 Native 电泳对这两个峰(峰 2 和 3)的纯度进行检测,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出, S-200 分离纯化结果与 Native 电泳结果吻合, CPI 含有两个主要组分,分子量较高者含量较高;由图 3 还可以看出,峰 2 和 3 有部分交叉,两个峰电泳图的共性是蛋白带较宽,表明每个峰都不是均一分子量的蛋白质而是由一个分子量范围的蛋白质组成。因而再根据蛋白质的带电特性用 DEAE-Sephadex CL-6B 进一步对 S-200 得到的两个峰 2 和 3 进行分离纯化。

2.2 DEAE-Sephadex CL-6B 分离纯化

DEAE-Sephadex CL-6B 对 S-200 的峰 2 及峰 3 进一



0 为 CPI; 1、2、3、4 分别为峰 1、2、3、4。

图3 S-200 Native 电泳
Fig.3 Native-PAGE of S-200

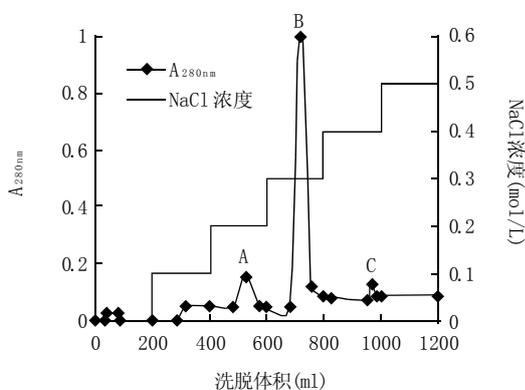


图4 S-200 峰 2 DEAE-Sepharose CL-6B 分离纯化图谱
Fig.4 DEAE-Sepharose CL-6B separation chromatography of S-200 peak 2

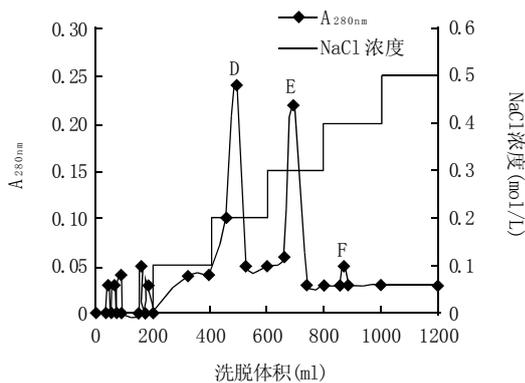


图4 S-200 峰 3 DEAE-Sepharose CL-6B 分离纯化图谱
Fig.4 DEAE-Sepharose CL-6B separation chromatography of S-200 peak 3

表 4 DEAE-Sepharose CL-6B 各峰的含量

Table 4 Protein constitutes and contents of peaks from DEAE-Sepharose CL-6B

名称	S-200 峰 2			S-200 峰 3			CPI	
	A	B	C	D	E	F	B	D
洗脱离子强度	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2
占百分数(%)	8.7	90.1	1.2	46.7	51.3	2.0	60.4	17.7

步分离纯化的结果分别如图 4、5 所示。

由图 4 可以看出, 有少量蛋白质首先被起始缓冲液洗脱, 这一部分是不能被离子交换剂所吸附的杂质。NaCl 浓度为 0.1mol/L 时, 没有组分被洗脱; 在 NaCl 浓度为 0.2、0.3 和 0.4mol/L 时, 分别有不同量的蛋白质被洗脱下来, 标记为组分 A、B、C, 含量分别占总量的 8.7%、90.1% 和 1.2% (表 4)。说明组分 B 为 S-200 峰 2 的主要组分, RP-HPLC 对其纯度进行鉴定, 结果如图 5 所示。

图 5 记录了 S-200 峰 3 的 DEAE 分离纯化图谱, 可以看出部分蛋白质首先被起始缓冲液洗脱。当 NaCl 浓度为 0.2、0.3、0.4mol/L 时, 有不同量的蛋白质洗脱下来, 分别标记为组分 D、E、F, 含量分别占总量的 46.7%、51.3% 和 2% (表 4)。表明组分 D、E 为 S-200 峰 3 的两个主要组分。

对图 4 与图 5 可以看出, A 与 D 为同一个组分, 而 B 与 E 为同一个组分, 说明 S-200 分离纯化得到的峰 2 中含有峰 3 的一部分, 而峰 3 中也含有部分峰 2 的成分, 结果与图 3 吻合。DEAE 结合 S-200 的结果计算可知, CPI 中分子量为 170kD 的组分含量为 60.4%, 分子量为 110kD 的组分含量为 17.7%, 并分别标记为 B 和 D。

2.3 RP-HPLC

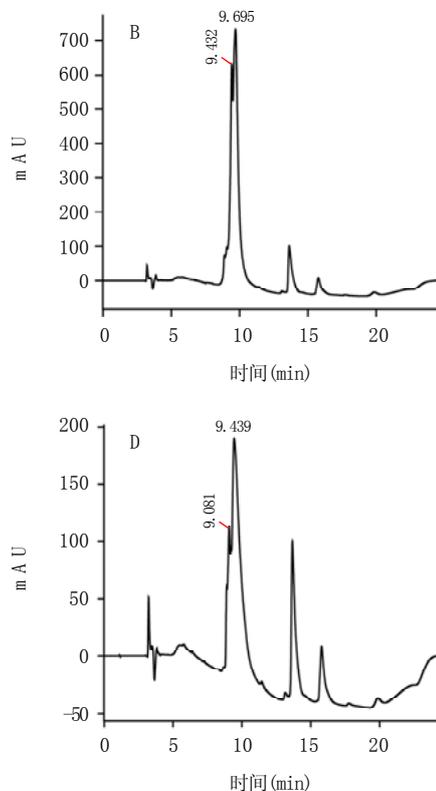


图 6 C₁₈ RP-HPLC 纯度(DEAE-Sepharose CL-6B 分离纯化后) 鉴定图谱

Fig.6 C₁₈ RP-HPLC chromatography

表5 C₁₈ RP-HPLC 分析结果
Table 5 Analysis results of C₁₈ RP-HPLC

名称	B			
保留时间(min)	9.432	9.696	9.081	9.439
含量(%)	35.11	64.89	18.51	81.49

根据蛋白质的表面疏水性差异, 利用 C₁₈ 反相色谱柱对 DEAE 分离纯化得到的组分 B、D 进行纯度鉴定, 结果见图 6 及表 5。由图 5 可以看出, B 和 D 在 C₁₈ 柱上的保留时间分别为 9.696min 和 9.439min, 但同时都有一个裂解峰, 保留时间分别为 9.432min 和 9.081min(除此之外均为溶剂峰)。

在进行 C₁₈ 反相分离色谱分离时, 一般都在洗脱液中加入一定量的 TFA, 通过离子键与蛋白质结合, 掩盖蛋白质表面电荷, 从而通过表面疏水性的差异分离蛋白质。由于 TFA 的加入将低了体系 pH, 造成部分蛋白质裂解。

由表 5 可以看出, 组分 B 的两个裂解峰的含量分别为 35.11% 和 64.89%, 组分 D 的两个裂解峰的含量分别为 18.51% 和 81.49%。说明组分 B 较 D 遇酸更易解聚。

由以上分析可以看出, CPI 经过 S-200 和 DEAE-Sepharose CL-6B 分离纯化后, 可以得到纯度很高的单一组分用于结构分析。有关组分 B 和 D 的定性检测在进一步的研究中。

3 结论

鹰嘴豆分离蛋白主要由两个主要组分组成, 分子量分别为 170kD (标记为 B) 和 110kD 标记为 (D), 这两个主要组分分别占蛋白质总量的 60.4% 和 17.7%。

参考文献:

[1] KINSELLA J E, SONCIE W G. Food proteins[M]. Champaign I L: The American oil Chemists' Society, 1989: 21-47.

[2] POLTRONIERI F, AREAS J A G, COLLI C. Extrusion and iron bioavailability in chickpea (*Cicer arietinum*L.) [J]. Food Chemistry, 2000, 70: 175-178.

[3] CLEMENTE A, VIOQUE J, SANCHEZ-VIOQUE R. Effect of processing on water adsorption and softening kinetics in chickpea (*Cicer arietinum*L.) seeds[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 78: 169-174.

[4] GIL J, NADAL S. Variability of some physicochemical characters in desi and kabuli chickpea types[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1996, 71: 179-184.

[5] SINGH U, SUBRAHMAYAM N. Cooking quality and nutritional attributes of some newly developed cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*L.) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 55: 37-46.

[6] 张涛, 江波, 王璋. 鹰嘴豆营养价值及其应用[J]. 粮食与油脂, 2004, (7): 18-20.

[7] PAREDES-LOPEZ O, ORDORICA-FALOMIR C. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(3): 726-729.

[8] SANCHEZ-VIOQUE R, CLEMENTE A, VIOQUE J, et al. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum*L.): chemical composition, functional properties and protein characterization[J]. Food Chemistry, 1999, 64: 237-243.

[9] 张涛, 江波, 王璋. 鹰嘴豆分离蛋白的乳化性及结构关系[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30: 10-14.

[10] 张涛, 江波, 王璋. 鹰嘴豆分离蛋白的胶凝性[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 108-113.

[11] 张涛, 江波, 王璋. 鹰嘴豆分离蛋白的功能性质[J]. 食品科技, 2005(4): 19-22.

[12] YAMAGISHI T, YAMAUCHI F, SHIBASAKI K. Isolation and partial characterization of heat-denatured products of soybean 11S globulin and their analysis by electrophoresis[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1980, 44: 1575-1582.

[13] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 54-115.