文章编号:1009-038X(2003)06-0071-04

蚕豆蛋白的提取分离及相对分子质量的测定

李雪琴[1], 苗笑亮[2], 裘爱泳[1]
(1. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036; 2. 河南省产品质量监督检验所,河南 450004)

摘 要: 分析了蚕豆清蛋白和球蛋白的组成及其亚基的相对分子质量. 测得蚕豆清蛋白经过 Sepharose CL-6B 柱层析可洗脱出 2 个组分,球蛋白可洗脱出 3 个组分. SDS-PAGE 分析表明,蚕豆球蛋白 7 种亚基的相对分子质量分别为:54 000,41 400,38 000,33 600,18 300,17 500,16700. 蚕豆清蛋白 5 种亚基的相对分子质量分别为:59 000,55 700,42 000,38 000,18 600.

关键词: 蚕豆; 清蛋白; 球蛋白
中图分类号:Q 512.1 **文献标识码**: A

Extraction of Broad Bean Protein and Determination of the Molecular Weight of Its Subunits

LI Xue-qin[1], MIAO Xiao-liang[2], QIU Ai-yong[1]
(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Institute of Products Quality Supervision & Inspection, Zhengzhou 450004, China)

Abstract: This article reported the subunit compositions of albumin and globulin from Broad beans. Two fractions of albumin and three fractions of globulin are obtained by Sepharose CL-6B gel filtration. SDS-PAGE analysis showed that broad bean globulin is composed of seven subunits with molecular weights of 54 000, 41 400, 38 000, 33 600, 18 300, 17 500, 16 700, and albumin is composed of five major subunits with molecular weights of 59 000, 55 700, 42 000, 38 000, 18 600.

Key words: broad bean; albumin; globulin; subunit

蚕豆(Broad bean),学名 *Vicia Faba* L.,别名胡豆、南豆、扁豆、罗汉豆. 蚕豆属一年生草本,直立,不分枝,花白色带红,有紫斑,荚果大而肥厚,种子呈椭圆状,略扁,因豆荚形状如蚕,又在养蚕时成熟,因而得名. 世界上有 40 多个国家种植蚕豆,其中亚洲的种植面积最大. 蚕豆产量在全世界食用豆类作物中居第 6 位,在中国蚕豆的种植面积和产量均居食用豆类作物之首[1].

蚕豆中的蛋白质质量分数达 25%~35%. 与大豆、花生和油菜籽相比,蚕豆含有较低的油脂和较高的淀粉,而与谷类和薯类相比,蚕豆又富含蛋白质. 蚕豆蛋白的氨基酸组成接近人体和动物所需要的理想比例,其中赖氨酸质量分数比谷类高出 3 倍,蚕豆蛋白的第一限制性氨基酸是含硫氨基酸.

收稿日期:2003-04-07; 修回日期:2003-08-07.
作者简介: 李雪琴(1975-),女,湖北宜昌人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生.
万方数据

日本作为蚕豆的主要消费国，视蚕豆为“新蛋白质食物”. 我国主要食用豆类的蛋白质质量分数见表 1.

表 1 我国主要食用豆类蛋白质质量分数[2]

Tab. 1 Protein content of the commonly cultivated legumes in china

豆类	质量分数/%
蚕豆	27.9
豌豆	24.5
豇豆	24.2
绿豆	23.8
红小豆	22.3
菜豆	23.2
大豆	39.0

由表 1 可见，除大豆外，蚕豆的蛋白质质量分数高于其它食用豆类作物. 然而，目前蚕豆在我国主要用作蔬菜、饲料，在食品上的主要用途是采用传统的酸浆法生产粉丝，原料中 90% 的蛋白质随着废水排出而白白浪费，这不仅造成蛋白质资源的极大浪费，而且大量废水的排出造成了严重的环境污染. 我国仅少数厂家将粉丝废水中的蛋白质回收制成豆腐干或作为加工酱油的原料[3]. 由此可见，充分有效的利用蚕豆蛋白质，不仅可以为食品行业提供新的植物蛋白源，而且也可以对传统酸浆法生产粉丝的工艺提供改良途径，提高粉丝厂的经济效益.

作者在蚕豆蛋白质的提取、分离和蛋白亚基相对分子质量的测定方面作了一些基础性的研究工作，旨在为蚕豆蛋白质的综合利用起到抛砖引玉的作用.

1 材料与方法

1.1 实验原料

无锡产鲜蚕豆.

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质测定 微量凯氏定氮法.

1.2.2 蚕豆蛋白氨基酸组成分析 氨基酸自动分析仪.

1.2.3 蚕豆蛋白质的提取 采用如下的缓冲溶液提取蚕豆蛋白：50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0)，其中含 1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟 10 mmol/L) EDTA、0.4 mol/L NaCl、10 mmol/L β-巯基乙醇和质量分数 0.02% NaN_3[4].

提取步骤：称取一定量的脱壳鲜蚕豆，按 m(蚕豆)∶V(缓冲液)=1 g∶3 mL 的比例加入缓冲溶液，用组织捣碎机 10 000 r/min 破碎 2 min，然后在冰浴中搅拌提取 1 h，提取物在 12 000 r/min 冷冻离心 15 min；所得上清液在含有 10 mmol/L β-巯基乙醇的蒸馏水中透析 24 h，其间不断更换蒸馏水，等球蛋白开始沉淀时计时 18～24 h 使沉淀完成，再于 12 000 r/min 冷冻离心 15 min 使清蛋白溶液与球蛋白分离. 上清液为清蛋白，沉淀为球蛋白. 所得清蛋白和球蛋白分别冷冻干燥用于柱层析.

1.2.4 蚕豆清蛋白和球蛋白的 Sepharose CL-6B 柱层析 分别称取 0.1 g 冷冻干燥的清蛋白和球蛋白，溶于 5 mL pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中，搅拌使其溶解，然后于 3 000 r/min 离心 10 min 除去不溶物，取上清液 2 mL 上柱层析(柱长：90 cm，柱直径：1 cm，洗脱体积流量：0.3 mL/min). 波长 280 nm 处检测.

1.2.5 清蛋白和球蛋白的 SDS-PAGE 分析 分别收集清蛋白和球蛋白柱层析的各个峰组分冷冻干燥，用于不连续 SDS-PAGE 分析各个峰组分的亚基组成. 电泳分离胶质量浓度为 11 g/dL[5].

2 结果与讨论

2.1 蚕豆蛋白各组分的质量分数

经微量凯氏定氮法测定实验用鲜蚕豆的粗蛋白质量分数为 33.7%，应用上述分离方法测得蚕豆蛋白质各组分质量分数见表 2.

表 2 蚕豆蛋白质的组成及质量分数

Tab. 2 Composition and relevant content of broad bean protein

蛋白质组分	蛋白质质量分数/%
清蛋白	20.5
球蛋白	68.2
非水溶性蛋白质	11.3

表 2 结果与文献报道值相符，证明该提取方法是可靠的. 蚕豆的球蛋白质量分数比大豆蛋白低，而清蛋白和水不溶性蛋白质质量分数分别为 20.5%和 11.3%，明显高于大豆蛋白.

2.2 蚕豆清蛋白和球蛋白的氨基酸组成分析

将冷冻干燥所得到的清蛋白和球蛋白采用盐酸水解，分析除色氨酸以外的氨基酸组成，结果见表 3.

由表 3 可见，蚕豆蛋白质中天门冬氨酸、谷氨酸、精氨酸和赖氨酸的质量分数较高，而含硫氨基

万方数据

酸如胱氨酸和蛋氨酸的质量分数则偏低. 清蛋白与球蛋白相比含有相对较多的赖氨酸和蛋氨酸. 另外,用上述提取方法所得蚕豆清蛋白的纯度为 75%,而球蛋白纯度达 99%,说明清蛋白中还含有其它非蛋白质类杂质,而且该杂质采用透析的方法无法去除,说明是大分子类物质. 这一点在以下的柱层析过程中也得到了验证.

表 3　蚕豆清蛋白和球蛋白的氨基酸组成

Tab. 3　Amino-acid profiles of broad bean albumin and globulin

氨基酸	清蛋白氨基酸质量分数/%	球蛋白氨基酸质量分数/%
天门冬氨酸	12.36	14.36
谷氨酸	15.80	19.41
丝氨酸	5.44	5.59
组氨酸	2.71	2.24
甘氨酸	4.67	2.82
苏氨酸	5.00	2.95
丙氨酸	5.36	3.48
精氨酸	8.33	8.61
酪氨酸	3.68	3.26
胱氨酸	0.20	0.13
缬氨酸	5.72	4.47
蛋氨酸	1.16	0.34
苯丙氨酸	4.67	5.63
异亮氨酸	4.77	4.68
亮氨酸	7.96	9.16
赖氨酸	7.28	6.71
脯氨酸	4.77	5.27
总计	75	99

2.3　蚕豆蛋白的 Sepharose Cl-6B 柱层析

蚕豆清蛋白和球蛋白的 Sepharose Cl-6B 柱层析结果见图 1,2. 由图 1 可见,清蛋白经过柱层析洗脱出 2 个组分 A_1 和 A_2,图 2 中球蛋白经过柱层析洗脱出 3 个组分 G_1、G_2 和 G_3. 其中 A_1 和 G_1 都在凝胶柱的空体积内流出($K_{av}=0$),洗脱体积相同而且组分混浊,可以推测其主要成分为核酸类物质和碳水化合物,Massimo F. 等人[6]的研究也证明了这一点. 另外 G_3 的洗脱体积与 A_2 相似,说明 G_3 是球蛋白组分中未完全除去的少量清蛋白. 由此不难看出,清蛋白的主要成分为 A_2,而球蛋白的主要成分为 G_2. 因此,以 A_2 和 G_2 作为清蛋白和球蛋白的代表性组分,采用 SDS-PAGE 来分析蚕豆清蛋白和球蛋白亚基的相对分子质量.

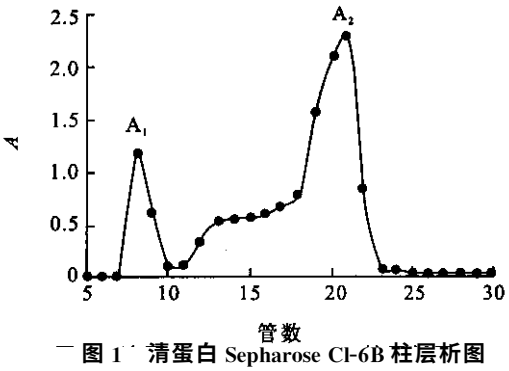


图 1　清蛋白 Sepharose Cl-6B 柱层析图

Fig. 1　Chromatography of albumin on sepharose CL-6B

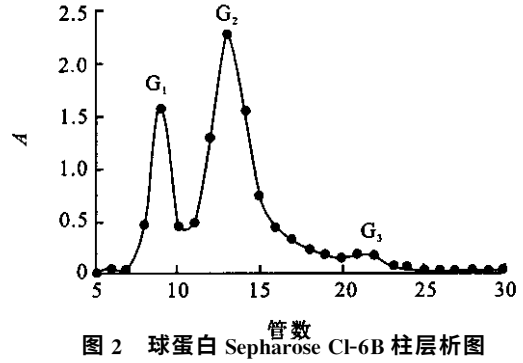


图 2　球蛋白 Sepharose Cl-6B 柱层析图

Fig. 2　Chromatography of globnlin on sepharose CL-6B

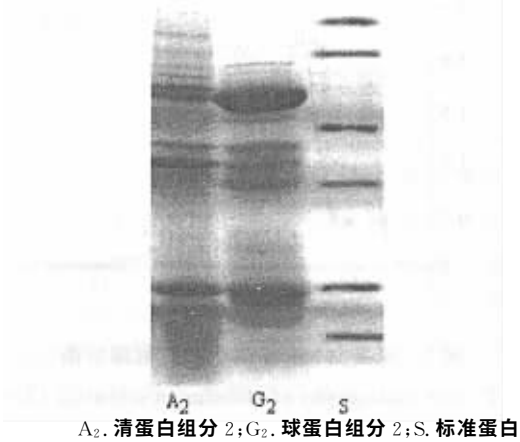
2.4　清蛋白和球蛋白的 SDS-PAGE 分析

将 Sepharose CL-6B 柱层析所得蚕豆清蛋白的 A_2 组分和球蛋白的 G_2 组分分别冷冻干燥,用于 SDS-PAGE 分析(见图 3,图 4),分析其结果及标准蛋白质相对分子质量与迁移率的关系.

结合图 3 和图 4 计算得出,蚕豆清蛋白主要亚基的相对分子质量为:59 000,55 700,42 000,38 000,18 600. 与蚕豆球蛋白相比,清蛋白在相对分子质量较高的区域出现了 4 条谱带,其相对分子质量分别为:80 700,73 800,66 500,62 700,而在球蛋白电泳图谱中未出现这些谱带. 蚕豆球蛋白亚基的相对分子质量为:54 000,41 400,38 000,33 600,18 300,17 500,16 700. 其中相对分子质量在 30 000以上的 4 条谱带为蚕豆球蛋白酸性亚基,相对分子质量在 20 000 以下的 3 条谱带为蚕豆球蛋白的碱性亚基. 上述结论与 Shigeru Utsumi (1980)[7]的研究结果相似:Shigeru Utsumi 在含有 6 mol/L 的脲和 0.2 mol/L 的 2-巯基乙醇存在的条件下,采用 DEAE-Sephadex 柱层析分离出蚕豆球蛋白的酸性和碱性亚基. 他发现蚕豆蛋白至少含有 4 种酸性亚基,其相对分子质量分别为 36 000,36 000,49 000 和 51 000;含有 3 种碱性亚基,其相对分子质量分别为 23 000,20 500,19 000. 他认为,

万方数据

酸性亚基和碱性亚基以等摩尔的形式缔合成蚕豆球蛋白组分. Derbyshire E. (1976)[8]等人则认为蚕豆球蛋白中含有 2 种酸性亚基(相对分子质量为 36 200)和 3 种碱性亚基(相对分子质量为 20 100, 20 900,23 800),与上述结果有出入. 尽管采用的分离方法不同,但蚕豆球蛋白主要亚基的相对分子质量差别不大,主要分布在 3 个区域:相对分子质量在 50 000 的区域,相对分子质量在 30 000～40 000 的区域和相对分子质量在 15 000～20 000 的区域. 与大豆球蛋白相比,蚕豆球蛋白亚基显示出多样性和复杂性的特点.



A_2. 清蛋白组分 2;G_2. 球蛋白组分 2;S. 标准蛋白

图 3 清蛋白和球蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of albumin and globulin

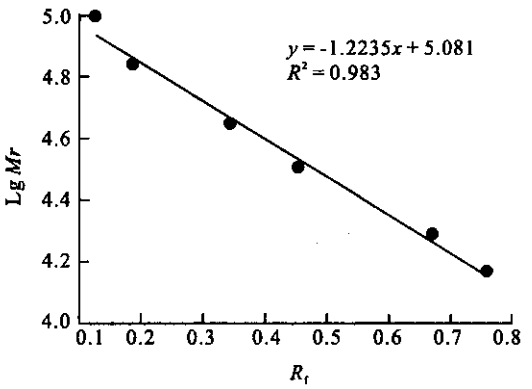


图 4 标准蛋白质相对分子质量与迁移率的关系曲线

Fig. 4 Relationship between Lg(Mr) and Rf of standard protein

3 结 论

作者通过 Sepharose CL-6B 柱层析分离纯化蚕豆清蛋白和球蛋白并采用 SDS-PAGE 测定蚕豆清蛋白和球蛋白亚基的相对分子质量,发现蚕豆清蛋白主要含有 5 种亚基,其相对分子质量为:59 000, 55 700,42 000,38 000,18 600. 蚕豆球蛋白则含有 4 种相对分子质量为 54 000,41 400,38 000,33 600 的酸性亚基和 3 种相对分子质量为 18 300,17 500, 16 700 的碱性亚基.

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 1998.

[2] 龙静宜,林黎奋. 食用豆类作物[M]. 北京:科学出版社. 1989.

[3] 周如太. 豆类粉丝厂废水中蛋白质的回收利用[J]. 饲料工业,1995,16(9):40－41.

[4] Regina L Freitas, Ricardo B, Ferreira, *et al*. Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins[J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2000,51:341－352.

[5] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994.

[6] Massimo F M, Yrkio Kakuda, Rickey Y Y. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants Ⅱ. Structural characterization[J]. **Food chemistry**,1998,63(2):265－274.

[7] Shigeru Utsumi, Zen-ichi Yokoyama, Tomohiko Mori. Comparative studies of subunit compositions of *Vicia faba L*. seeds [J]. **Agric Biol Chem**,1980,44(3):595－601.

[8] Derbyshire E, Wright D J, Boulter D. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds[J]. **Phytochemistry**,1976,15: 3－24.

(责任编辑:杨 萌)

万方数据