

蚕豆蛋白酶解物分离纯化及降胆固醇活性

陈丹阳, 韩涛

(北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206)

摘要:采用凝胶过滤色谱对经过大孔吸附树脂纯化的蚕豆蛋白酶解物进行分离纯化,以期得到高降胆固醇活性的酶解物组分。结果表明:单因素试验得到蚕豆蛋白酶解物凝胶过滤色谱最佳分离纯化工艺条件为 Sep G-10、G-25 葡聚糖凝胶为柱填充材料,10 mg/mL 的酶解液上样量 4 mL,洗脱剂为去离子水,洗脱流速 1 mL/min。凝胶过滤色谱分离纯化后得到 F1~F6 6 个蚕豆蛋白酶解物组分;与 10 mg/mL 考来烯胺散阳性对照比较, F3、F6 组分对 3 种胆酸盐(胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠)抑制率均高于阳性对照,其中 F6 组分的相对抑制率最高,分别为(274.98 ± 0.19)%、(140.22 ± 0.20)%、(130.99 ± 0.22)%。

关键词:蚕豆;蚕豆蛋白酶解物;胆固醇;凝胶过滤色谱;分离纯化

中图分类号:TS214;TS218

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)01-0061-05

Separation and purification of broad bean protein hydrolysate and its cholesterol lowering activity

CHEN Danyang, HAN Tao

(College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The broad bean protein hydrolysate purified by macroporous adsorption resin was separated and purified by gel filtration chromatography to obtain broad bean protein hydrolysate with cholesterol lowering activity. The results showed that the optimal separation and purification conditions of the broad bean protein hydrolysate by single factor experiment were obtained as follows: with Sep G-10 and G-25 dextran gel as the column filling material, loading amount of 10 mg/mL enzymatic hydrolysate 4 mL, deionized water as mobile phase, elution speed 1 mL/min. After separated and purified by the gel filtration chromatography, the components of F1-F6 six broad bean protein hydrolysates were obtained. Compared with the 10 mg/mL of coletenamine powder positive control, the inhibitory rates of F3 and F6 components to three kinds of cholate salts (sodium cholate, sodium glycocholate, sodium taurocholate) were higher than those of the positive control. The relative inhibition rate of F6 component was the highest, which was (274.98 ± 0.19)%, (140.22 ± 0.20)% and (130.99 ± 0.22)% respectively.

Key words: broad bean; broad bean protein hydrolysate; cholesterol; gel filtration chromatography; separation and purification

蚕豆蛋白是优质蛋白质^[1],但在我国利用率不高^[2]。蚕豆蛋白经酶解后,其酶解物具有促进乳杆菌生长、抗氧化等多种生物活性^[2-3]。本团队前期研究表明^[4],蚕豆蛋白酶解液具有高降胆固醇活

性。低相对分子质量(< 1 000 Da、1 000 ~ 3 000 Da)的多肽具有较高的降胆固醇能力^[5-6],而初始蚕豆蛋白酶解液相对分子质量较大,不易探究其小肽部分,目前除本团队前期报道外还未有其他关于蚕豆蛋白酶解物具有降胆固醇能力的研究报道,故本文在前人研究^[7-11]的基础上,通过对经 DA201-C 大孔吸附树脂纯化后的蚕豆蛋白酶解物进行 Sep G 系列凝胶过滤色谱分离纯化,优化凝胶过滤色谱

收稿日期:2020-04-04;修回日期:2020-10-13

作者简介:陈丹阳(1993),女,硕士研究生,主要从事农产品加工及其功能性研发(E-mail)281871518@qq.com。

通信作者:韩涛,教授(E-mail)taohan00@163.com。

分离纯化工艺条件,以期得到高降胆固醇活性组分,为具有降胆固醇活性的小分子肽获取途径提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蚕豆蛋白酶解物(经75%乙醇从DA201-C大孔吸附树脂洗脱),实验室自制。磷酸盐缓冲液、盐酸、氢氧化钠,国药集团化学试剂有限公司;葡聚糖凝胶 Sep G-10、G-25、G-75、G-100;考来烯胺散;胆酸钠(SG),生工生物工程(上海)股份有限公司;甘氨酸胆酸钠(SGC),阿达玛斯试剂(上海)有限公司;牛磺胆酸钠(STC),生工生物工程(上海)股份有限公司(BBI系列)。

玻璃层析柱(1.6 cm × 80 cm、1.6 cm × 40 cm),BSZ-100自动部分收集器,HL-2恒流泵,ZD-88型振荡培养箱,B260-恒温水浴锅,T6新世纪紫外可见分光光度计,DDS-11C电导率仪,真空抽滤器,旋转蒸发仪,N2000在线色谱工作站,核酸蛋白检测仪,超声清洗器。

1.2 试验方法

1.2.1 酶解物质量浓度测定

采用双缩脲法测定酶解物质量浓度^[12]。

以不同质量浓度的牛血清白蛋白为标准溶液,绘制的标准曲线方程为 $y = 0.059x$, $R^2 = 0.9937$ 。

样品酶解物质量浓度的测定:取酶解物0.5 mL、水0.5 mL,加入4 mL双缩脲试剂,以没有加酶解物的为对照,在540 nm下测定 OD_{540} ,取平均值。根据标准曲线方程,计算待测酶解物质量浓度。

1.2.2 蚕豆蛋白酶解物的凝胶过滤色谱分离纯化工艺

工艺流程为:凝胶预处理—凝胶上柱—平衡—样品上柱—缓冲液冲柱—洗脱—样品收集—凝胶的清洗、再生。

1.2.2.1 洗脱条件优化

以 Sep G-75 为例,凝胶柱 1.6 cm × 80 cm,主要操作条件为:上样量为 4 mL 10 mg/mL 的酶解液,流动相(洗脱剂)为去离子水,洗脱流速为 1 mL/min。单因素试验时,改变一个变量,其他工艺条件不变。

1.2.2.2 凝胶的筛选

凝胶过滤色谱分离效果主要取决于凝胶的孔径大小与被分离组分分子尺寸之间的关系,与流动相的性质没有直接的关系,并且样品分子与固定相之间不存在相互作用^[13-16]。在最佳洗脱条件下,选择 Sep G-100、G-75、G-25、G-10 凝胶过滤色谱进行蚕豆蛋白酶解物分离纯化,根据分离效果,筛选合

适的凝胶,并收集洗脱液组分,凝胶柱尺寸为 1.6 cm × 40 cm。

1.2.3 蚕豆蛋白酶解液降胆固醇能力的测定

参照文献[4],采用体外胆酸盐螯合法测定蚕豆蛋白酶解物对3种胆酸盐(SG、SGC、STC)的抑制率,以此考察蚕豆蛋白酶解物的降胆固醇能力。以考来烯胺散为阳性对照,配制方法:用250 mL容量瓶准确配制1、5、10、20 mg/mL的考来烯胺去离子水溶液,10 000 r/min离心10 min,放入冰箱备用。

1.2.4 数据处理

各试验重复3次,试验结果使用SPSS 19.0和GraphPad Prism 8.3.0软件进行分析和作图。

2 结果与讨论

2.1 凝胶过滤色谱分离纯化蚕豆蛋白酶解物洗脱条件的单因素实验

2.1.1 上样量对分离效果的影响(见图1)

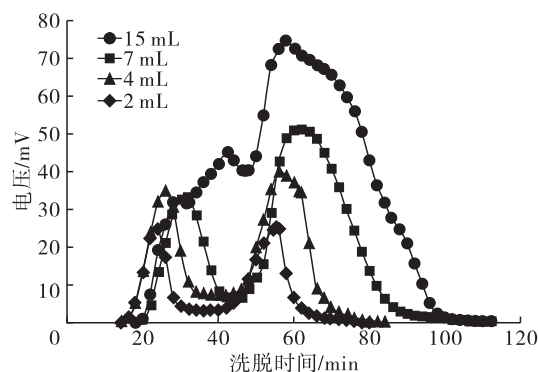


图1 不同的上样量对分离效果的影响

从图1可以看出,上样量为2、4 mL时分离效果接近,比上样量15 mL的分离效果好。上样量7 mL时,两个洗脱峰之间不够平缓,易出现分不开的现象且容易出现拖尾,说明上样量过高会导致分离效果下降。上样量过低,分离纯化后得到各组分的量也少,试验效率低,费时费力;上样量太高,凝胶色谱柱易堵塞,容易形成叠峰使分离效果下降,故选择上样量为4 mL。

2.1.2 流动相对分离效果的影响(见图2)

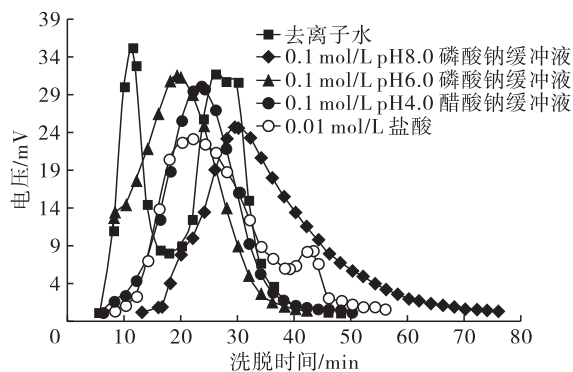


图2 不同的流动相对分离效果的影响

从图2可以看出,采用去离子水作为流动相时,出峰早且峰型尖锐对称,出现第3个峰,且不引入新杂质,得到的洗脱峰不需要脱盐。采用 pH 8.0、pH 6.0 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液以及 pH 4.0 的 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液洗脱时,只出现 1 个峰。0.01 mol/L 盐酸洗脱时,只出现 2 个峰且这 2 个峰没有完全分开,峰型宽且出现拖尾。故选择去离子水作为流动相。

2.1.3 洗脱流速对分离效果的影响(见图3)

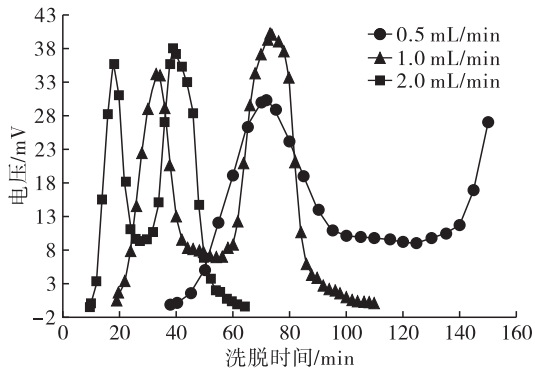


图3 不同的洗脱流速对分离效果的影响

从图3可以看出,洗脱流速为 1 mL/min 时洗脱时间为 110 min,此时洗脱速度较慢,酶解液能够和凝胶充分接触,通过凝胶孔隙分离酶解液。洗脱流速为 0.5 mL/min 时,洗脱时间过长,约 360 min(图中仅为部分洗脱曲线),洗脱速度过慢,酶解液扩散加剧,区带变宽,并且影响工作效率。洗脱流速为 2 mL/min 时,凝胶因流速过大而被压实,且容易出现分离不开导致洗脱峰重叠,影响柱效。

综上,确定最佳的洗脱条件为:10 mg/mL 的酶解液上样量 4 mL,流动相为去离子水,洗脱流速 1 mL/min。

2.2 凝胶的筛选

在最佳洗脱条件下,蚕豆蛋白酶解液在 Sep G-100、G-75、G-25、G-10 柱上的洗脱分离效果见图4。

由图4可知,蚕豆蛋白酶解液在 Sep G-100、G-75、G-25、G-10 柱上洗脱分离效果明显不同,除 Sep G-100 柱分离出 2 个峰外,其余 3 种凝胶柱分离出 3 个峰,但 Sep G-75 分离第 2 个峰时,峰面宽且分离不开。通过 Sep G-10、G-25 洗脱曲线可知,蚕豆蛋白酶解液分别被分为 3 个组分,F1(DA-Sep G-10-1)、F2(DA-Sep G-10-2)、F3(DA-Sep G-10-3)和 F4(DA-Sep G-25-1)、F5(DA-Sep G-25-2)、F6(DA-Sep G-25-3)。依据凝胶过滤色谱分离过程中相对分子质量越大,越先被洗脱下来的原理,推测相对分子质量顺序为

F1 > F2 > F3, F4 > F5 > F6,因此目标小分子活性肽在 F3、F6 的可能性更大。

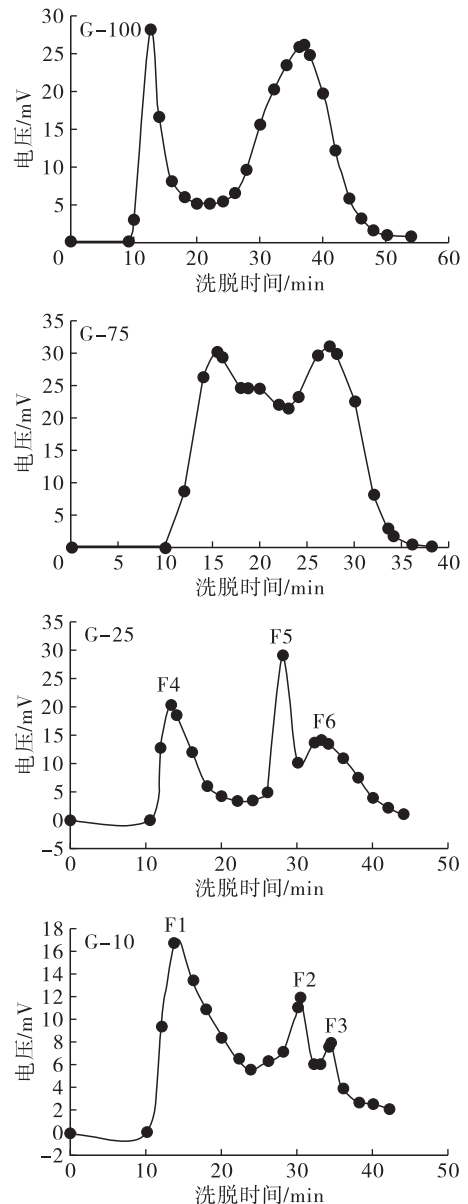


图4 蚕豆蛋白酶解液在 Sep G-100、G-75、G-25、G-10 柱上洗脱分离效果

蛋白质酶解后酶解物片段长度与水解度有关。随着水解度的增加,蛋白质的酶解程度增加,所得到的酶解物分子链越小。蛋白质水解度(D)和酶解物平均链长度(L)的关系见式(1)。

$$D = 1/L \times 100\% \quad (1)$$

经测定,蚕豆蛋白水解度为 12.5% ~ 25%,由公式计算得知,蚕豆蛋白酶解物中平均含有 4 ~ 8 个氨基酸。按照氨基酸平均相对分子质量为 128 Da 计算,蚕豆蛋白酶解物的相对分子质量为 512 ~ 1 024 Da。结合葡萄糖凝胶的分离范围,因此本试验选取 Sep G-10、G-25 葡聚糖凝胶作为柱材料,分离纯化收集后得到 F1 ~ F6 6 个组分。

2.3 凝胶过滤色谱分离纯化前后蚕豆蛋白酶解物的降胆固醇能力

4 mg/mL 的 F1 ~ F6 组分、经乙醇从 DA201 - C

大孔吸附树脂洗脱的蚕豆蛋白酶解物、未经大孔吸附树脂纯化的蚕豆蛋白酶解液原液(20 mg/mL)、考来烯胺散对 SC、SGC、STC 的抑制率测定结果见表 1。

表 1 F1 ~ F6 组分,蚕豆蛋白酶解物、酶解液原液,考来烯胺散对 SC、SGC、STC 的抑制率

%

组分	SC 抑制率	SGC 抑制率	STC 抑制率
F1	39.87 ± 0.19	23.20 ± 0.20	22.62 ± 0.10
F2	40.68 ± 0.11	23.23 ± 0.21	17.24 ± 0.11
F3	67.38 ± 0.10	60.48 ± 0.06	35.26 ± 0.13
F4	64.21 ± 0.16	31.68 ± 0.09	14.50 ± 0.11
F5	35.31 ± 0.14	29.74 ± 0.11	25.23 ± 0.11
F6	94.44 ± 0.13	57.35 ± 0.12	36.24 ± 0.18
蚕豆蛋白酶解物	59.07 ± 0.20	33.63 ± 0.11	25.40 ± 0.14
酶解液原液(20 mg/mL)	54.60 ± 0.11	31.06 ± 0.16	24.38 ± 0.15
1 mg/mL 考来烯胺散	-1.92 ± 0.04	0.95 ± 0.06	-7.00 ± 0.09
5 mg/mL 考来烯胺散	16.93 ± 0.06	27.58 ± 0.08	14.00 ± 0.11
10 mg/mL 考来烯胺散	34.35 ± 0.08	40.90 ± 0.11	27.67 ± 0.11
20 mg/mL 考来烯胺散	44.89 ± 0.11	38.04 ± 0.11	22.17 ± 0.18

由表 1 可知, F1 ~ F6 组分之间降胆固醇能力差异显著($p < 0.05$), 其中组分 F3、F6 的降胆固醇能力均较高, 且组分 F6 的 SC 抑制率极显著高于 F3 ($p < 0.01$)。结合所用凝胶的相对分子质量分离范围可知, 组分 F3 和 F6 的相对分子质量在 1 000 Da 以内。

经乙醇从 DA201 - C 大孔吸附树脂洗脱的蚕豆蛋白酶解物与酶解液原液相比, 对 3 种胆酸盐的抑制率没有显著性差异($p > 0.05$), 可能是因为树脂仅脱除了酶解液中的盐分而未使降胆固醇的组分得到有效的富集。

在阳性对照组中, 随考来烯胺散质量浓度上升, 其对 3 种胆酸盐的抑制率也随之上升。但 20 mg/mL 的考来烯胺散溶液出现不溶物, 对 SGC、STC 抑制率也稍有下降。与阳性对照组(10 mg/mL 考来烯胺散)相比, 组分 F6 对 SC、SGC、STC 的相对抑制率为(274.98 ± 0.19)%、(140.22 ± 0.20)%、(130.99 ± 0.22)% , 极显著高于阳性对照组($p < 0.01$)。

3 结 论

对经 DA201 - C 大孔吸附树脂吸附洗脱得到的蚕豆蛋白酶解物采用凝胶过滤色谱进行分离纯化。选定 Sep G - 10、G - 25 葡聚糖凝胶作为柱填充材料, 在 10 mg/mL 的酶解液上样量 4 mL, 洗脱剂为去离子水, 洗脱流速 1 mL/min 下, 分离纯化收集得到 F1 ~ F6 6 个组分。对 F1 ~ F6 6 个组分测定降胆固醇能力得到: F1 ~ F6 组分之间降胆固醇能力差异显著($p < 0.05$), 其中组分 F3、F6 对 3 种胆酸盐抑制率均高于 10 mg/mL 考来烯胺散阳性对照, 且组分

F6 对 SC、SGC、STC 的相对抑制率最高, 分别为(274.98 ± 0.19)%、(140.22 ± 0.20)%、(130.99 ± 0.22)%。研究表明, 酶解液通过凝胶过滤色谱分离纯化, 相对分子质量范围变窄, 有效降胆固醇活性肽成分得到富集。

参考文献:

- [1] 宋晓敏, 李素芬, 刘建福, 等. 20 种蚕豆样品蛋白质含量与其蛋白组分的分子质量[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 42 - 46.
- [2] 李雪芬, 韩涛, 夏晓楠, 等. 铜螯合亲和层析分离抗氧化活性蚕豆蛋白酶解物[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1): 119 - 124.
- [3] 杨希娟, 党斌, 刘玉皎, 等. 酶解蚕豆蛋白制备多肽酒及其抗氧化性研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(12): 22 - 27.
- [4] 陈丹阳, 韩涛, 杜斌, 等. 酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化[J]. 中国油脂, 2018, 43(10): 46 - 52.
- [5] LIU E Q, LI H, WU Y H, et al. Isolation and identification of hypocholesterolemic peptide derived from black soybean protein [J]. Food Sci, 2013, 34(19): 128 - 132.
- [6] 姚余祥, 张久亮, 何慧, 等. 鹰嘴豆降胆固醇肽的制备及活性[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(1): 33 - 38.
- [7] NAGAOKA S, FUTAMURA Y, MIWA K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β - lactoglobulin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(1): 11 - 17.
- [8] NAGAOKA S, MIWA K, ETO M, et al. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco - 2 cells [J]. J Nutr, 1999, 129(9): 17 - 25.

(下转第 104 页)

表3 30万t仓群(大豆、玉米)投资对比

项目	钢板仓	混凝土仓
规格	Φ27.3 m × 25.68 m	Φ15 m × 36 m
单仓容量/t	12 000	4 660
筒仓数量(座)	25	64
总仓容/万t	30	30
土建费用/万元	180	
仓体费用/万元	138	228
保温费用/万元	35	0
单仓费用/万元	353	228
仓群费用/万元	8 825	14 592
均价/(元/t)	294	486
施工周期	7个月	>13个月

表4 泰州益海筒仓(水稻)投资对比

项目	钢板仓	混凝土仓
规格	Φ20 m × 25 m	Φ21.4 m × 40 m
单仓容量/t	4 300	7 000
筒仓数量(座)	56	24
总仓容/万t	24	16.8
土建费用/万元	90	
仓体费用/万元	80	655
保温费用/万元	24	0
单仓费用/万元	194	655
仓群费用/万元	10 864	15 720
均价/(元/t)	453	936
施工周期	7个月	14个月

钢板仓仓体为镀锌板制作,螺栓拼装,在使用寿命终了后可整体拆除回收利用,钢板仓和混凝土仓的回收价值对比见表5。与混凝土仓对比,钢板仓可拆卸异地重新组装仓,符合我国倡导的绿色环保经济。混凝土仓为整体浇筑,寿命终了无法拆除,无回收再利用的价值。

(上接第64页)

- [9] NAGAOKA S, AWANO T, NAGATA N, et al. Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in caco-2 cells by a soyprotein peptic hydrolysate[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(2):354-356.
- [10] MAJUMDER K, WU J. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysate of ovotransferrin[J]. *Food Chem*, 2011, 126(4):1614-1619.
- [11] PAN D D, CAO J X, GUO H Q, et al. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate[J]. *Food Chem*, 2012, 130(1):121-126.

表5 钢板仓和混凝土仓回收价值对比

项目	钢板仓	混凝土仓
单仓容量/t	12 000	4 660
筒仓数量(座)	25	64
总仓容/万t	30	30
仓体材料	镀锌板	混凝土
单仓质量/t	170	约3 000
单仓期末回收价格/万元	28	0
仓群总计/万元	700	0

5 结束语

从2009年建设1.5万t钢板仓使用后,在仓壁承受非均等压力和抗台风方面很成功,继续建设20多个1.5万~1.65万t钢板仓,按照市场需求,两年前做大型保温仓,储粮的效果比混凝土仓好,把小型的清仓机同步放大应用。为了更好地防爆,提出在筒仓加装集尘斗,降低了粉尘浓度,更加安全。相比混凝土仓,钢板仓投资低,属于绿色工程。储存了大豆、玉米、饲料、糖渣、红薯片等农产品,需要说明的是大型钢板仓不适合储存豆粕。我们不断学习国外先进经验,按照市场大物流大容量储存农产品的需求,向2万t大仓进军。

致谢:感谢捷赛机械(苏州)有限公司刘枫先生和广州星坤机械有限公司王东云先生的技术支持!

参考文献:

- [1] 高恒,李新刚,王丹.一种侧壁发放装配式钢板筒仓:CN 207513281U[P]. 2018-06-19.
- [2] 刘玉兰.油脂制取与加工工艺学[M].北京:科学出版社,2003.
- [3] 左青,汪传玉,闻永贤,等.在南方建仓设计中若干问题的讨论[J].*中国油脂*,2007,32(3):71-73.
- [4] 左青,左晖.立筒仓出仓机械技术应用实践[J].*中国油脂*,2016,41(4):108-110.
- [12] 周慧江,朱振宝,易建华.核桃蛋白ACE抑制肽分离纯化研究[J].*粮食与油脂*,2013,26(2):16-18.
- [13] 胡二坤,郭兴凤,刘洁.凝胶过滤色谱分离纯化玉米蛋白酶解产物研究[J].*粮食与油脂*,2017,30(7):94-98.
- [14] 马丽媛,李晓东,庄建鹏,等.凝胶过滤色谱纯化乳清蛋白降胆固醇肽的研究[J].*中国乳品工业*,2014,42(5):17-20.
- [15] 舒一梅,李诚,付刚,等.凝胶层析法分离猪股骨降血压肽及其体外稳定性[J].*食品科学*,2014,35(24):100-104.
- [16] 钟芳,张晓梅,麻建国.大豆肽的大孔吸附树脂以及凝胶过滤色谱分离[J].*食品与机械*,2006,22(4):25-28,45.