

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.05.030

大孔树脂纯化苜蓿叶蛋白肽的工艺优化

Optimization on purification technology of alfalfa leaf protein peptide by macroporous adsorption resin

许英一¹ 吴红艳¹ 王宇² 王彪¹XU Ying-yi¹ WU Hong-yan¹ WANG Yu² WANG Biao¹

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江省农科院畜牧兽医分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

(1. College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China)

摘要:通过对比 6 种大孔树脂对苜蓿叶蛋白肽吸附效果, 筛选最佳大孔吸附树脂, 并研究其对苜蓿叶蛋白肽的吸附—解吸特性。试验结果表明, 纯化苜蓿叶蛋白肽的最适大孔吸附树脂为 DA201-C 型, 最佳工艺条件为: 上样流速 0.5 mL/min, 上样浓度 10 mg/mL, 75% 乙醇溶液为洗脱剂, 洗脱流速 0.5 mL/min, 洗脱体积 200 mL。在该条件下苜蓿叶蛋白肽含量较最初提高了 46.95%, 糖含量降低了 81.88%, 盐和其他杂质含量降低了 70.97%。DA201-C 型大孔吸附树脂对苜蓿叶蛋白肽有较好的纯化效果。

关键词: 苜蓿; 叶蛋白肽; 大孔吸附树脂; 纯化

Abstract: The best macroporous adsorption resin was selected by comparing the adsorption effects of six macroporous adsorption resins on Alfalfa Leaf Protein (ALPP), and the adsorption-desorption characteristics of ALPP were studied. The results showed that the best type of macroporous adsorption resin for purifying ALPP was DA201-C. The optimum conditions were as follows: flow rate of sampling was 0.5 mL/min, concentration of sampling was 10 mg/mL, 75% ethanol solution was an eluent, the elution flow rate was 0.5 mL/min and the elution volume was 200 mL. Under these conditions, content of ALPP increased by 46.95%, content of sugar decreased by 81.88%, content of salt and other impurities decreased by 70.97%. DA201-C macroporous adsorption resin had better purification effect on ALPP.

Keywords: Alfalfa; leaf protein peptides; macroporous adsorption

基金项目: 黑龙江省教育厅基本业务专项(编号: LTSW201724); 黑龙江省自然科学基金项目(编号: C201456)

作者简介: 许英一(1971—), 女, 齐齐哈尔大学教授, 硕士。

E-mail: wyxyy-1@163.com

收稿日期: 2019-01-18

resin; purification

紫花苜蓿(*medicago sativa*)是一种多年生的优良豆科牧草, 有“牧草之王”的美称, 是国内外主要栽培的牧草之一^[1-3]。苜蓿叶蛋白的营养价值高, 粗蛋白含量高达 50%~60%, 并且氨基酸组成配比合理^[4], 据文献^[5]报道许多氨基酸及其衍生物具有抗氧化能力, 如半胱氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸等, 可作为优良的蛋白原添加于饮料、焙烤等食品中。但由于苜蓿叶蛋白溶解性等功能性性质较差, 限制了其在食品中的应用。研究^[6-8]表明, 蛋白肽具有抗氧化、降血压、调节血清中血脂水平、抗癌、提高免疫等功能。谢正军等^[9]通过提取、酶解和超滤从苜蓿叶蛋白中分离得到了相对分子质量不同的可溶性苜蓿叶蛋白及其酶解粗肽和精制肽, 比较了其抗氧化活性, 发现苜蓿叶蛋白几乎没有抗氧化活性, 而酶解后的粗肽以及超滤后的精制肽均表现出较强的抗氧化活性, 而且精制肽的抗氧化活性强于粗肽。因此, 将酶解后的粗肽纯化后更适合应用于食品工业。

近年来, 大孔树脂被广泛应用于多酚、生物碱、二氢槲皮素、皂苷等活性成分的分离纯化^[10-11]。马寒冰等^[12]进行了不同型号的大孔吸附树脂的静态吸附和解吸试验, 确定 DA201-C 型大孔吸附树脂对大豆多肽的吸附性能及脱盐效果最佳, 多肽含量提高了 70.35%, 糖和盐含量分别降低了 70.80% 和 93.93%。李华等^[13]采用超滤与大孔树脂吸附、乙醇分级洗脱分离纯化抗氧化黑豆肽, 确定 DA201-C 型树脂对抗氧化肽的分离效果优于其他 3 种树脂, 体积分数为 75% 乙醇洗脱组分具有相对最强的 ORAC 值。综上, 前人对豆科肽类的纯化研究较多, 纯化效果也较好。但对苜蓿叶蛋白肽的制备及纯化研究较

少。谢正军^[14]研究了苜蓿叶蛋白酶解物超滤和脱盐工艺,采用先超滤再经大孔吸附树脂脱盐后,苜蓿叶蛋白酶解物的蛋白质含量仅提高了 1.73%。为简化纯化步骤,本研究拟采用不经超滤仅用大孔吸附树脂脱盐工艺纯化苜蓿叶蛋白肽,并对苜蓿叶蛋白肽的纯化工艺进行优化,为植物叶蛋白肽类化合物进一步分离纯化提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

紫花苜蓿:黑龙江省农科院畜牧兽医分院;

大孔树脂:DA201-C 型,郑州华溢科技新材料股份有限公司;

大孔树脂:D101、HPD 500、HPD 600 型,河北沧州宝恩化工有限公司;

大孔树脂:AB-8、X-5 型,南开大学化工厂;

其他化学试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

高速药物粉碎机:WK-600A 型,青州市精诚机械有限公司;

分光光度计:722N 型,上海精密科学仪器有限公司;

高速冷冻离心机:日立 CR21G 型,天美(中国)科学仪器有限公司;

电热恒温水浴锅:HHS21-4 型,上海跃进医疗器械厂;

恒流泵:HL-2S 型,上海青浦沪西仪器厂;

电脑全自动部份收集器:DBS-100 型,上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 苜蓿叶蛋白肽的酶法水解制备工艺

苜蓿叶蛋白粉→配制一定底物浓度(g/mL)的水溶液→预热(50℃,30 min)→调节 pH 8.5→加入一定量的碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L→置于恒温水浴振荡器(120 r/min,50℃)酶解 2 h→灭酶(沸水浴 10 min)→离心(4 000 r/min,20 min)→上清液即为苜蓿叶蛋白肽

1.2.2 大孔吸附树脂预处理 用 2 倍树脂床体积(2 BV) 5%的 HCl,以 2 BV/h 的流速过柱浸泡 2 h,用水洗至中性,再用 2 BV 2%的 NaOH 溶液以同样流速过柱浸泡 2 h,再用水洗至中性抽滤,备用。不同大孔吸附树脂的物理结构参数见表 1。

1.2.3 大孔吸附树脂筛选 准确称取已处理好的 6 种不同类型大孔吸附树脂各 10.000 0 g,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,各加入质量浓度 5 mg/mL 的苜蓿叶蛋白肽溶液 30 mL,将锥形瓶塞好塞子后置于恒温水浴振荡器

表 1 不同大孔树脂的物理结构参数

Table 1 Physical structure parameters of different macroporous resins

型号	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	极性	平均孔径/nm
DA201-C	1 000~1 300	非极性	3~4
D101	500~550	非极性	10~11
AB-8	450~500	弱极性	13~14
X-5	500~600	非极性	29~30
HPD500	500~550	极性	5.5~7.5
HPD 600	550~600	极性	10~12

中振荡 10 h(25℃,150 r/min),待吸附完全后抽滤,测定被吸附后的苜蓿叶蛋白肽液质量浓度。吸附完全的 6 种树脂用 100 mL 蒸馏水冲洗至流出液呈中性,加入 30 mL 体积分数为 75%的乙醇,在 25℃,150 r/min 振荡 10 h 进行解吸,过滤,测定滤液中苜蓿肽的质量浓度,按式(1)、(2)计算不同型号的大孔吸附树脂对苜蓿叶蛋白肽溶液的吸附率及解吸率。

$$W_1 = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$W_2 = \frac{C_2 \times V_1}{(C_0 - C_1) \times V} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

W_1 ——吸附率,%;

C_0 ——吸附前溶液中肽的浓度,mg/mL;

C_1 ——吸附后溶液中肽的浓度,mg/mL;

W_2 ——解吸率,%;

C_2 ——解吸液中肽的浓度,mg/mL;

V_1 ——解吸液的体积,mL;

V ——吸附液的体积,mL。

1.2.4 大孔吸附树脂(DA201-C)静态吸附—解吸试验

(1) 静态吸附与解吸试验:于 100 mL 具塞锥形瓶中加入已处理好的大孔吸附树脂 10.000 0 g,再加入 30 mL 质量浓度为 5 mg/mL 的苜蓿叶蛋白肽液,置于恒温水浴振荡器中振荡 10 h(25℃,150 r/min),分别测定 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 h 被吸附后的酶解液浓度,按式(1)计算吸附率。绘制静态吸附曲线。

将充分吸附苜蓿叶蛋白肽的大孔树脂置于 100 mL 锥形瓶中,加入体积分数为 75%的乙醇 30 mL,同样在 25℃,150 r/min 振荡 10 h 进行解吸,分别测定 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 h 解吸液中的肽浓度。按式(2)计算解吸率。绘制静态解吸曲线。

(2) 酶解液浓度对吸附效果的影响:准确称取预处理过的大孔吸附树脂 10.000 0 g 于 100 mL 锥形瓶中,分别加入 2.5,5.0,7.5,10.0 mg/mL 的苜蓿叶蛋白肽液 30 mL,在 25℃,150 r/min 的恒温水浴振荡器中振荡

10 h,待充分吸附后过滤,测定滤液中肽液的质量浓度。计算吸附率。

(3) 乙醇体积分数对解吸效果的影响:对充分吸附了苜蓿叶蛋白肽溶液的大孔吸附树脂抽滤,分别用体积分数为25%,50%,75%,100%的乙醇解吸,收集10 h后的解吸液,过滤,测定滤液中肽液的质量浓度。计算解吸率。

1.2.5 大孔吸附树脂(DA201-C)动态吸附—解吸试验

(1) 上样流速对 DA201-C 型大孔吸附树脂吸附性能的影响:配制质量浓度为 10 mg/mL 的苜蓿叶蛋白肽溶液,分别以 0.5,1.0,2.5 mL/min 的流速流经层析柱,每 10 mL 收集 1 管,测每次流出液中苜蓿叶蛋白肽的浓度,计算树脂的吸附率。

(2) 上样浓度对 DA201-C 型大孔吸附树脂吸附性能的影响:分别配制质量浓度为 5,10,15 mg/mL 的苜蓿叶蛋白肽溶液,以 0.5 mL/min 的流速流经层析柱,每 10 mL 收集 1 管,测每次流出液中苜蓿叶蛋白肽的浓度,计算树脂的吸附率。

(3) 洗脱流速对 DA201-C 型大孔吸附树脂解吸性能的影响:将浓度为 10 mg/mL 的苜蓿叶蛋白肽溶液,以 0.5 mL/min 的流速进行动态吸附。结束后抽滤,然后用体积分数为 75% 的乙醇溶液分别以 0.5,1.0,2.5 mL/min 的流速过柱解吸,每 10 mL 收集 1 管解吸液,测每次流出液中苜蓿叶蛋白肽的浓度,计算树脂的解吸率。

(4) 洗脱体积对 DA201-C 型大孔吸附树脂解吸性能的影响:将浓度 10 mg/mL 的苜蓿肽,以 0.5 mL/min 的流速进行动态吸附。结束后抽滤,用体积分数为 75% 的乙醇溶液以 0.5 mL/min 的洗脱流速过柱解吸,每 10 mL 收集 1 管解吸液,测每次流出液中苜蓿叶蛋白肽的浓度,计算树脂的解吸率。

1.2.6 DA201-C 型大孔吸附树脂对苜蓿叶蛋白肽的纯化效果 测定经 DA201-C 型大孔吸附树脂纯化前后的苜蓿叶蛋白肽的含量、糖含量、盐含量。

1.2.7 总糖含量测定 蒽酮比色法^[15]。

1.2.8 蛋白含量测定 Folin 酚法^[16]。

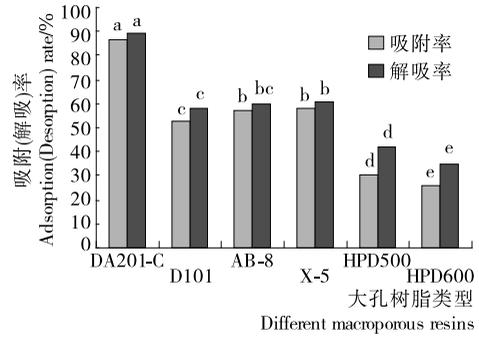
1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,所有试验均重复 3 次,各试验数据均以平均值和标准误差表示,采用 Duncan 法比较因素水平间的差异性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂筛选

由图 1 可知,非极性树脂对苜蓿肽的吸附和解吸能力较强,与陈飞平^[17]研究的结果相符,也说明苜蓿肽的疏水性较高。6 种大孔树脂的吸附率和解吸率有显著性差异($P < 0.05$),DA201-C 型的吸附率达到 87.00%。采用体积分数 75% 乙醇溶液对吸附后的 DA201-C 型大孔树脂进行洗脱,解吸率亦最高为 89.37%,DA201-C 型大



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 1 6 种类型大孔树脂吸附及解吸性能

Figure 1 Adsorption and desorption properties of six types of macroporous resins

孔吸附树脂的吸附率和解吸率明显高于其他类型,因此本试验筛选 DA201-C 型大孔吸附树脂为纯化苜蓿叶蛋白肽的最适大孔树脂。在 6 种大孔树脂中,由于 DA201-C 型大孔树脂为非极性树脂,比表面积最大,且平均孔径相对较小,因此对疏水性多肽有较强的吸附性,而对分子量较大的蛋白吸附力差,可以达到分离纯化小分子苜蓿叶蛋白肽的目的^[17]。

2.2 大孔吸附树脂(DA201-C)静态吸附—解吸试验

2.2.1 静态吸附—解吸动力学曲线 由图 2 可知,苜蓿叶蛋白肽吸附率和解吸率分别在前 1 h 和前 3 h 迅速增加,之后增加缓慢,基本达到平衡,属于快速平衡型。因此,DA201-C 型大孔树脂对苜蓿叶蛋白肽具有良好的吸附和解吸性能。

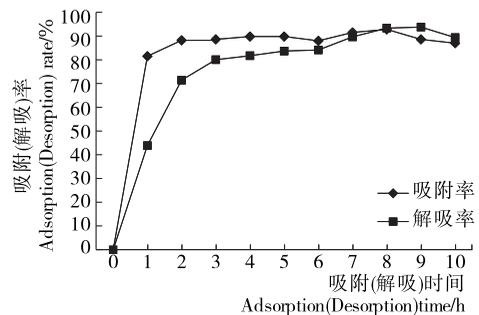


图 2 DA201-C 型大孔树脂静态吸附—解吸动力学曲线
Figure 2 The kinetic curve of static adsorption and desorption of DA201-C macroporous resins

2.2.2 酶解液质量浓度对树脂静态吸附效果的影响 由图 3 可知,随苜蓿肽溶液浓度的增加,大孔树脂的吸附率先上升后下降,在苜蓿肽溶液浓度为 7.5 mg/mL 时最大,为 88.95%。这与邓慧玲^[18]的研究结果相符,可能是酶解液浓度达到一定时,肽分子数量增多,在扩散过程中相互碰撞,反而阻碍了向大孔树脂扩散的速度,导致吸附率下降。因此,酶解液的质量浓度控制在 7.5 mg/mL。

2.2.3 乙醇体积分数对树脂静态解吸效果的影响 由

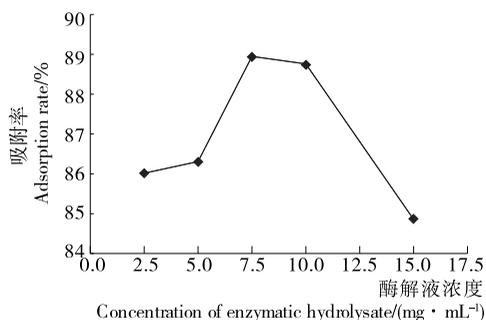


图 3 酶解液质量浓度对吸附性能的影响

Figure 3 Influence of mass concentration of enzymatic hydrolysate on the adsorption efficiency

图 4 可知,随着乙醇体积分数的增加,大孔树脂的解吸率先上升后下降。解吸效果在乙醇体积分数 75% 最好。可能是高浓度乙醇会使蛋白质和一些肽类物质沉淀而解吸困难。

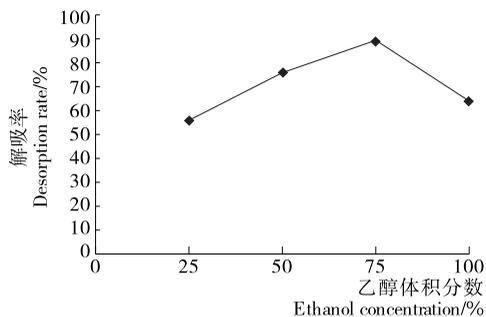


图 4 乙醇体积分数对解吸效果的影响

Figure 4 Influence of ethanol concentration on the desorption efficiency

2.3 大孔吸附树脂 (DA201-C) 动态吸附—解吸试验

2.3.1 上样流速对 DA201-C 型大孔吸附树脂吸附性能的影响 由图 5 可知,随着上样流速的增大,吸附率降低;上样流速为 0.5 mL/min 时,吸附率最大。可能是大孔树脂的吸附需要一个接触和扩散的过程,如果流速过快,酶解液来不及扩散到树脂的内表面就提早泄露而造成

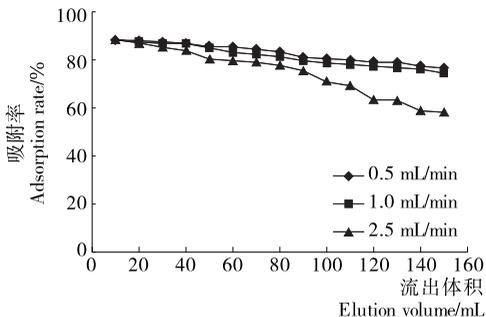


图 5 上样流速对吸附性能的影响

Figure 5 Influence of sample loading flow rate on the adsorption efficiency

成样品流失^{[17]44},吸附率就会下降。

2.3.2 上样浓度对 DA201-C 型大孔吸附树脂吸附性能的影响 由图 6 所示,在动态时各酶解液浓度均随着流出液体体积的增加使吸附率降低,但相比较浓度为 10 mg/mL 吸附率降低的慢。由于某一型号的大孔吸附树脂吸附量一定,若酶解液浓度过高超出了吸附量,会造成水解物的损失,而较低的样品浓度会造成吸附率下降。因此确定 10 mg/mL 为最佳上样浓度。

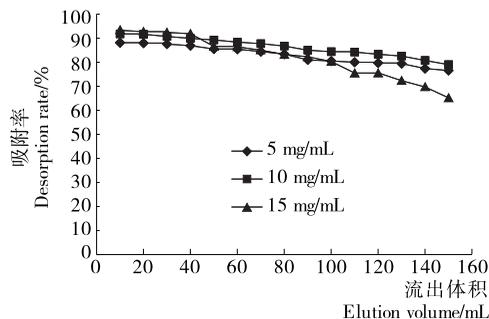


图 6 上样浓度对吸附性能的影响

Figure 6 Influence of sample loading concentration on the adsorption efficiency

2.3.3 洗脱流速对 DA201-C 型大孔吸附树脂解吸性能的影响 由图 7 可知,随着洗脱体积增大,3 种洗脱流速的大孔树脂解吸率均先迅速增加到最高点而后降低直至平稳,且均在洗脱体积 10 mL 达最高点。而当洗脱流速为 0.5 mL/min 时,解吸率最高,且解吸率从最高点下降至平稳趋势看,当洗脱流速为 0.5 mL/min 时,下降速度快,即最先达到洗脱平衡。因此本试验选择 0.5 mL/min 时作为最佳的苜蓿叶蛋白肽的洗脱流速。

2.3.4 洗脱体积对 DA201-C 型大孔吸附树脂解吸性能的影响 由图 8 可知,随着洗脱体积增加,解吸率先升到最高点,当洗脱体积 > 50 mL 后,解吸率较低,表明大部分苜蓿叶蛋白肽已被洗脱下来了。而在 200 mL 时,解吸率趋于平缓,解吸率达到 6.4%,表明流出液中水解物含量已经很少,因此将 75% 乙醇洗脱剂体积定为 200 mL。

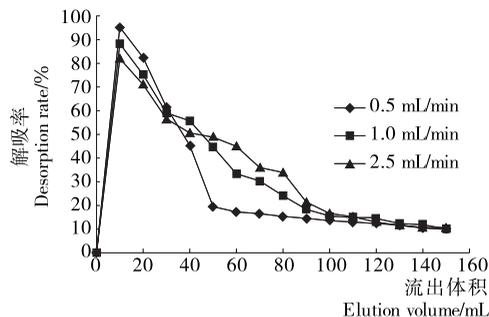


图 7 洗脱流速对解吸性能的影响

Figure 7 Influence of elution flow rate on the desorption efficiency

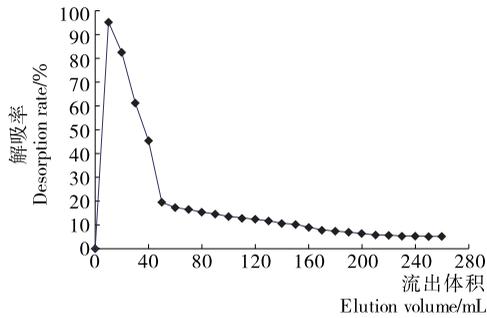


图8 洗脱体积对解吸性能的影响

Figure 8 Influence of elution volume on the desorption efficiency

2.3.5 DA201-C型大孔吸附树脂对苜蓿叶蛋白肽的纯化效果 根据优化过程的结果分析,采用动态吸附。确定在上样浓度为 10 mg/mL,上样流速为 0.5 mL/min,采用 DA201-C 型大孔吸附树脂对苜蓿叶蛋白水解物进行动态吸附,再以 200 mL 的 75%乙醇溶液作为洗脱剂,0.5 mL/min 的洗脱流速对吸附后的大孔树脂进行解吸,收集洗脱液经旋转蒸发和冷冻干燥,得到纯化后的苜蓿叶蛋白肽,测定吸附前后的酶解物成分含量,其成分分析见表 2。

表 2 苜蓿叶蛋白酶解液纯化前后成分分析[†]

Table 2 Composition analysis of alfalfa leaf protease hydrolysate before and after purification %

样品	苜蓿叶蛋白肽含量	糖含量	无机盐及其他
纯化前	60.45±1.54 ^b	2.87±0.11 ^a	36.68±0.84 ^a
纯化后	88.83±2.40 ^a	0.52±0.04 ^b	10.65±0.05 ^b

[†] 同列字母不同表示差异显著(P<0.05)。

由表 2 可看出,纯化后的苜蓿叶蛋白酶解液中苜蓿叶蛋白肽含量由 60.45% 提高到了 88.83%,纯度较之前提高了 46.95%。而糖含量由 2.87% 降低至 0.52%,纯度降低了 81.88%。无机盐等杂质的含量由 36.68% 降低至 10.65%,纯度降低了 70.97%,苜蓿叶蛋白酶解液营养成分在纯化前后有显著性差异(P<0.05),说明 DA201-C 型大孔吸附树脂能去除苜蓿叶蛋白酶解液中大部分无机盐及糖类。

3 结论

本试验首先对 6 种大孔吸附树脂进行筛选,确定 DA201-C 型大孔吸附树脂为苜蓿叶蛋白肽纯化的最适材料。通过静态吸附—解吸和动态吸附—解吸试验得到该工艺的最佳纯化条件为上样流速 0.5 mL/min,上样浓度 10 mg/mL,采用 75%乙醇溶液解吸,洗脱流速 0.5 mL/min,洗脱体积 200 mL,在该条件下苜蓿叶蛋白肽含量较纯化前明显提高,说明优化的工艺参数可行。本试验探讨了采用大孔吸附树脂纯化苜蓿叶蛋白肽的优

化工艺,若将其应用于食品或者保健品,还需要进一步动物试验和临床试验,研究苜蓿叶蛋白肽体内、体外抗氧化活性及抗氧化作用机理,为工业化生产高活性成分的苜蓿叶蛋白肽提供新方法。

参考文献

- [1] 刘玉凤,王明利,石自忠,等.我国苜蓿产业技术效率及科技进步贡献分析[J].草业科学,2014,31(10):1990-1997.
- [2] 徐丽君,徐大伟,逢焕成,等.中国苜蓿属植物适宜性区划[J].草业科学,2017,34(11):2347-2358.
- [3] ZHANG Jian-guo, CAI Yi-min, KOBAYASHI R, et al. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80(10): 1455-1460.
- [4] 单战,玉柱,薛艳林.贮藏条件对苜蓿叶蛋白功能性酶的影响[J].中国草地学报,2007,29(6):34-37.
- [5] UCHIDA K, KAWAKISHI S. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper(II)/ascorbate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(1): 13-16.
- [6] 吴建中.大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D].广州:华南理工大学,2003:4-5.
- [7] 柳杰.花生粕抗氧化肽的研究[D].无锡:江南大学,2010:1-2.
- [8] 魏连会.酱油中水溶性肽的提纯及抗氧化活性研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2013:3-4.
- [9] 谢正军,金征宇,徐学明,等.苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J].食品与生物技术学报,2009,28(5):627-632.
- [10] 杨彬,金小青,李彩霞,等.太空茄子叶黄酮大孔树脂纯化工艺优化及抗氧化性研究[J].食品与机械,2018,34(5):158-163.
- [11] 李琼,陈恺,陈燕勤,等.大孔吸附树脂分离纯化核桃青皮总多酚[J].食品与机械,2015,31(1):175-180.
- [12] 马寒冰,廖永红,徐曼,等.DA201-C大孔吸附树脂纯化大豆多肽条件优化[J].中国调味品,2014,39(9):43-48.
- [13] 李华,刘恩岐,唐仕荣,等.酶法制备黑豆抗氧化肽及其分离纯化与氨基酸组成分析[J].食品科学,2013,34(9):271-276.
- [14] 谢正军.苜蓿叶蛋白和酶法制备抗氧化肽的研究[D].无锡:江南大学,2009:64.
- [15] 王永华.食品分析[M].2版.北京:中国轻工业出版社,2011:74-75.
- [16] 王丽燕.生物化学实验指导[M].北京:北京理工大学出版社,2017:35-37.
- [17] 陈飞平.苜蓿 ACE 抑制肽的分离纯化及其性质评价[D].重庆:西南大学,2013.
- [18] 邓惠玲.猪血红蛋白 ACE 抑制肽的制备及其理化性质研究[D].重庆:西南大学,2013:28-29.