

苦荞水溶性蛋白体外吸附胆酸盐能力的研究

周小理, 黄琳, 周一鸣

(上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 200235)

摘要: 通过采用硫酸铵盐析法、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析法提取分离制备苦荞水溶性蛋白, 并通过磷酸盐缓冲液 pH 值、动态层析流速的最佳选择改善分离提纯效果。同时通过体外吸附胆酸盐能力的测定证实所提取分离得到的苦荞水溶性蛋白具有一定的降血脂功能。结果发现: 当磷酸盐缓冲溶液 pH 值为 6.5、流速 1.0 mL/min 于室温下洗脱的效果最好, 得到的 3 个主要分离组分中峰 3 的体外吸附胆酸盐能力最佳。

关键词: 苦荞水溶性蛋白; 硫酸铵盐析; DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析; 体外吸附胆酸盐; 降血脂

in vitro Binding of Bile Salts by Water-soluble Proteins from Tartary Buckwheat Grains

ZHOU Xiao-li, HUANG Lin, ZHOU Yi-ming

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China)

Abstract: Water-soluble proteins were extracted from tartary buckwheat grains by salting out with ammonium sulfate and purified by DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography. Optimal conditions for the salting out and DEAE-Sepharose Fast Flow chromatographic separation of water-soluble proteins were determined. The results of experiments on bile salt adsorption *in vitro* demonstrated that the obtained water-soluble proteins had hypolipidemic effect. Besides, the best results of the elution of water-soluble proteins from DEAE-Sepharose Fast Flow column were achieved using pH 6.5, 10 mmol/L phosphate buffer as eluent at a flow rate of 1.0 mL/min and room temperature. Peak 3 was shown to have the best bile salt adsorption ability among three separation peaks obtained.

Key words: buckwheat water-soluble protein; ammonium sulfate salting-out; DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography; *in vitro* bile salt adsorption; lowering blood plasma

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0077-05

荞麦起源于中国和亚洲北部, 主要的栽培品种有苦荞(*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.)和甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench.)。苦荞含有蛋白质、淀粉、脂肪、粗纤维、维生素、矿物质元素等^[1]多种营养成分, 其中苦荞蛋白约占 15%~17% 左右^[2], 具有降胆固醇^[3]、降血脂^[4]、抗氧化^[5]、抗癌^[6-7]、增强人体免疫力等作用, 是苦荞主要的生物活性物质之一。目前国内外关于苦荞蛋白生理功能的研究主要基于苦荞蛋白的粗提物, 而对于苦荞蛋白中具有生理功能活性的功能因子研究甚少。因此探索研究一种实用、高效的苦荞蛋白提取分离、纯化方法对研究苦荞蛋白功能因子的生理活性尤为重要。

胆酸盐是胆固醇分解后的产物, 通过吸附胆酸盐并将其排出体外可有效降低胆酸盐在肝肠循环过程中的积累, 从而促进胆固醇的代谢, 最终达到降低体内胆固醇的效果。胡国华等^[8]、Hu 等^[9]通过体外吸附胆酸盐实验证实膳食纤维降低胆固醇的机理与吸附胆酸盐并将其

排出体外有关。此外 Yoshie-Stark 等^[10]、Kahlon 等^[11]发现一些植物蛋白提取物也具有吸附胆酸盐的能力。Kayashita 等^[12]通过动物实验发现荞麦蛋白提取物能增加小鼠排泄物中中性甾醇的含量, 认为荞麦蛋白降低胆固醇的机理可能与膳食纤维类似, 但 Kayashita 并未对这一结论进行进一步的实验论证, 因此对荞麦蛋白降低胆固醇的机理尚缺乏足够的说服力。

本研究采用硫酸铵盐析法、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换介质对苦荞水溶性蛋白进行提取、分离及纯化, 同时分别从磷酸盐缓冲液的 pH 值、流速等因素观察 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换对苦荞水溶性蛋白分离纯化的影响, 并最终确定 DEAE 离子交换操作的最优条件, 实现目标蛋白的分离纯化, 为苦荞蛋白功能因子的分离及相关生理活性的研究奠定基础。同时通过体外吸附胆酸盐能力的研究, 探讨苦荞水溶性蛋白中具有降血脂功能的组分及其作用机理, 以期苦荞蛋白降血脂功能的研究提供理论依据。

收稿日期: 2011-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071527)

作者简介: 周小理(1957—), 女, 教授, 本科, 研究方向为食品新资源的深度开发与利用。E-mail: zhouxl@sit.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苦荞 山西黑丰一号。

硫酸铵、磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、胆酸钠、硫酸、糠醛 国药集团化学试剂有限公司；DEAE 琼脂糖凝胶 FF 上海宝曼生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HL-2 恒流泵、BSZ-100 自动部分收集器、层析柱 (1.6cm × 50cm) 上海沪西分析仪器厂；754 紫外-可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司；离心机 上海安亭科学仪器厂；真空冷冻干燥机 江苏海门轻工机械四厂。

1.3 苦荞蛋白的分离纯化

1.3.1 苦荞水溶性蛋白的提取^[13]

苦荞籽粒经干燥后粉碎至 200 目，先经石油醚脱脂。再将脱脂后的苦荞粉采用 pH7.0 磷酸盐缓冲液(料水比为 1:10(m/V))在 20℃ 条件下搅拌提取 2h，并经 4℃、5000r/min 离心 30min 后收集上清液。

1.3.2 硫酸铵盐析饱和度的确定^[14]

取 9 个烧杯各装入 20mL 上述苦荞蛋白提取液，分别加入一定量的固体硫酸铵，使苦荞蛋白提取液中硫酸铵饱和度达到 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%，充分溶解后 20℃ 条件下搅拌 1h，4℃、5000r/min 离心 30min 后收集沉淀。沉淀用 20mL 水复溶，得到苦荞水溶蛋白溶液，采用考马斯亮蓝法测定其蛋白含量。

1.3.3 DEAE-Sepharose Fast Flow 静态吸附苦荞水溶性蛋白

1.3.3.1 静态吸附方法^[15]

取 50mL 烧杯，分别加入一定量的 DEAE-Sepharose Fast Flow 介质和一定体积的磷酸盐缓冲溶液，充分搅拌平衡后静置 15min，吸去上清液，重复 3 次。向层析介质中再加入相同体积的磷酸盐缓冲液待平衡后，加入一定体积的苦荞水溶蛋白溶液，充分搅拌吸附后，静置 30min，用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白含量。

$$\text{吸附量}/(\text{mg/g}) = \frac{(\rho_0 - \rho_1) \times V}{m} \quad (1)$$

$$\text{吸附率}/\% = \frac{\rho_0 - \rho_1}{\rho_0} \times 100 \quad (2)$$

式中： ρ_0 为吸附液的初始质量浓度/(mg/mL)； ρ_1 为吸附平衡后吸附液中的平衡质量浓度/(mg/mL)； V 为

吸附液体积/mL； m 为介质质量/g。

1.3.3.2 静态吸附最适 pH 值的确定

分别选取 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的磷酸盐缓冲溶液，采取与静态吸附相同的操作，与一定量的 DEAE-Sepharose Fast Flow 介质充分搅拌平衡后，加入一定体积的苦荞水溶蛋白溶液，充分搅拌吸附后，静置 30min，测定上清液中的蛋白含量，比较不同 pH 值对介质吸附蛋白的影响。

1.3.3.3 静态吸附最适温度的确定

采取与静态吸附相同的操作，将反应体系分别置于 10、20、30、40℃ 条件下，静置 30min 后，测定上清液中的蛋白含量，比较不同温度对介质吸附蛋白的影响。

1.3.3.4 吸附速率和吸附动力学曲线的测定

采取与静态吸附相同的操作，吸附过程中每间隔一定时间测一次上清液中的蛋白含量，作时间与吸附液质量浓度的 t - ρ 关系曲线，比较在相同条件下吸附时间对吸附蛋白的影响。

1.3.4 DEAE-Sepharose Fast Flow 动态离子交换层析对苦荞水溶性蛋白分离纯化的研究^[16-18]

取一定量 DEAE-Sepharose Fast Flow 介质装于层析柱，填料高度约为 45cm。经缓冲液充分平衡后，取适量苦荞水溶性蛋白液上柱，用不同浓度洗脱液(NaCl + 缓冲溶液)以一定的流速进行洗脱，紫外检测仪于 280nm 波长处测定，收集洗脱液组分。分别观察不同 pH 值及流速对动态洗脱的影响。

1.4 苦荞水溶性蛋白纯化物对胆酸盐吸附作用的测定

1.4.1 胆酸盐的测定^[19]

胆酸盐标准液：分别准确称取胆酸盐 0、20、40、60、80、100、200、400mg 各置于 50mL 容量瓶中，均以蒸馏水溶解并加至刻度。

移取样液(或各不同质量浓度的胆酸盐标准液)1mL 于具塞试管中，加入 6mL 45% 硫酸，混匀，加入 1mL 0.3% 糠醛，混匀，置 65℃ 恒温水浴中反应 30min，冷却至室温后，于 620nm 波长处测吸光度，绘制标准曲线。

1.4.2 苦荞水溶性蛋白纯化物对胆酸盐吸附作用的测定

分别配制 4mg/mL 胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠溶液，加入苦荞水溶性蛋白纯化物，于 37℃ 恒温下反应 1h 后，5000r/min 离心分离 10min。准确移取 1mL 上清液，于 620nm 波长处测吸光度，由标准曲线确定其胆酸盐的质量浓度。再根据反应前后溶液中胆酸盐的浓度差计算苦荞水溶性蛋白纯化物对胆酸盐的吸附量。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵盐析饱和度的确定

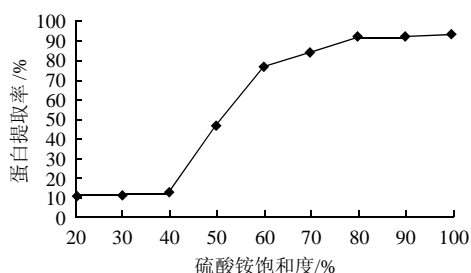


图1 苦荞水溶性蛋白硫酸铵盐析曲线
Fig.1 Ammonium sulfate precipitation curve of tartary buckwheat water-soluble proteins

通过不同硫酸铵饱和度盐析苦荞水溶性蛋白沉淀物中的蛋白, 结果如图1所示。随着硫酸铵饱和度的增加, 沉淀物中的蛋白回收率逐渐上升; 当硫酸铵饱和度高于40%时, 沉淀物中的蛋白回收率呈大幅增加趋势, 当增加到80%时, 蛋白回收率近95%, 且随着硫酸铵饱和度升高, 回收率无太大变化。因此可选择硫酸铵饱和度40%初沉去除杂蛋白, 饱和度80%进行二次沉淀获得目标蛋白。将二次盐析所得到目标蛋白溶解于适量的蒸馏水中, 过夜透析脱盐平衡, 冻干成粉待测。

2.2 DEAE-Sephrose Fast Flow 静态吸附水溶性蛋白

2.2.1 静态吸附最适 pH 值的确定

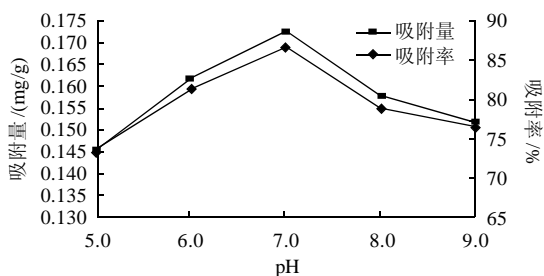


图2 不同pH值对DEAE-Sephrose Fast Flow 静态吸附的影响
Fig.2 Static adsorption curves of tartary buckwheat water-soluble proteins on DEAE-Sephrose fast flow under different pH conditions

由图2可知, 当pH值为7.0时介质对蛋白的吸附率达到最高为86.64%, 此后吸附率呈下降趋势。因此可以确定DEAE-Sephrose Fast Flow 离子交换层析缓冲液体系的最适pH值为7.0。

2.2.2 静态吸附最适温度的确定

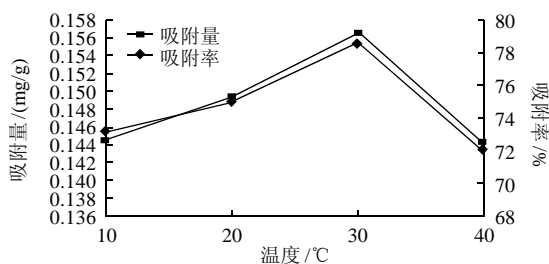


图3 不同温度对DEAE-Sephrose Fast Flow 静态吸附的影响
Fig.3 Static adsorption curves of tartary buckwheat water-soluble proteins on DEAE-Sephrose fast flow under different temperature conditions

由图3可知, 当温度为30°C时, 介质对蛋白的吸附率为78.61%。因此可以确定DEAE-Sephrose Fast Flow 吸附蛋白的最适温度在30°C。

2.2.3 吸附速率和吸附动力学曲线的测定

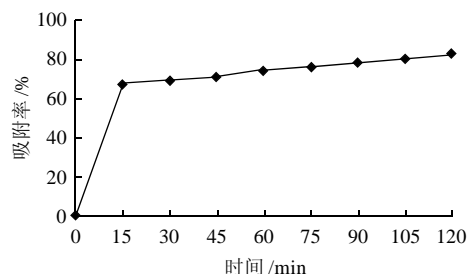


图4 DEAE-Sephrose Fast Flow 吸附速率
Fig.4 Time course of adsorption of tartary buckwheat water-soluble protein on DEAE-Sephrose fast flow

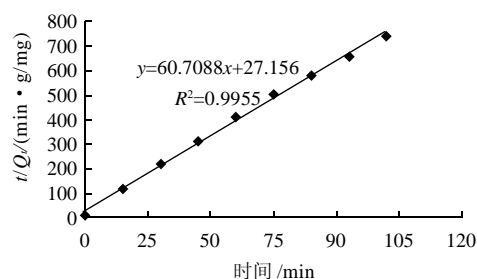


图5 DEAE-Sephrose Fast Flow 对水溶性蛋白的吸附动力学曲线
Fig.5 Adsorption kinetic curve of tartary buckwheat water-soluble protein on DEAE-Sephrose fast flow

通过测定不同吸附时间吸附液中的蛋白质量浓度, 研究DEAE-Sephrose Fast Flow 对水溶性蛋白的吸附能力, 结果如图4、5所示。随着吸附时间的延长, 介质对水溶性蛋白的吸附率逐渐增大。吸附过程中最初的吸附速率较快, 前15min内吸附率近70%, 随着吸附反应的进行, 吸附速率逐渐趋向于平衡, 图5实验数据与方程吻合较好。因此DEAE-Sephrose Fast Flow 对水溶性蛋白的吸附基本符合吸附动力学行为。

2.3 DEAE-Sephrose Fast Flow 动态离子交换层析对水溶性蛋白分离纯化的研究

2.3.1 缓冲液 pH 值对水溶性蛋白分离纯化的影响

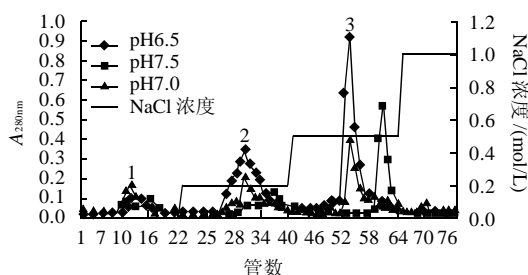


图6 缓冲液 pH 值对离子交换的影响
Fig.6 Effect of phosphate buffer pH on the elution of tartary buckwheat water-soluble protein

在 pH 值对 DEAE-Sepharose Fast Flow 静态吸附水溶性蛋白的影响实验结果基础上,研究了 DEAE-Sepharose Fast Flow 在不同 pH 值(6.5、7.0、7.5)条件下对动态层析的影响,结果如图 6 所示。3 种 pH 值的缓冲液均能得到 3 个主要分离峰。其中 pH 值为 6.5 时,出现的峰峰形较好,无拖尾现象,表明洗脱完全,且峰 3 响应值最高,蛋白含量最高;当 pH 值为 7.0 时杂峰较多,洗脱不完全,使得峰 3 的峰面积较小,蛋白含量降低;当 pH 值为 7.5 时其中峰 1、峰 2 不能完全洗脱,峰形较宽。因此可知 pH 值为 6.5 的缓冲液洗脱效果最好,能将 3 个峰较好地洗脱下来,有助于进一步的分离及性质研究。因此选取 pH6.5 的缓冲溶液体系进行洗脱。

2.3.2 流速对水溶性蛋白分离纯化的影响

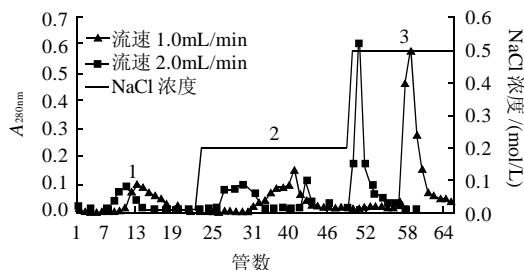


图 7 不同流速对离子交换的影响

Fig.7 Effect of eluent flow rate on the elution of tartary buckwheat water-soluble protein

不同流速(1.0、2.0mL/min)对分离水溶性蛋白的影响,如图 7 所示。当流速为 2.0mL/min 时,出峰时间早于流速为 1.0mL/min,但由于流速加快使得蛋白无法完全洗脱,因此峰 2 过宽,基线不平,与流速为 1.0mL/min 层析图谱相比,分离效果下降。因此选取流速为 1.0mL/min 进行洗脱分离。

2.4 苦荞水溶性蛋白纯化物对胆酸钠吸附作用的测定

胆酸和脱氧胆酸分别约占人体总胆酸的 30% 和 20%^[20],且胆汁酸在人体内一般以钠盐的形式存在,其中牛磺胆酸钠又是一类较难被吸附的结合型胆酸盐,因此实验选择胆酸钠、脱氧胆酸钠和牛磺胆酸钠作为吸附对象具有代表性。

表 1 苦荞水溶性蛋白纯化物对胆酸盐的吸附能力
Table 1 Bile salt adsorption ability of three eluates

胆酸盐	苦荞水溶性蛋白纯化物胆酸盐吸附率/%		
	峰 1	峰 2	峰 3
胆酸钠	9.79 ± 0.0113	88.93 ± 0.0035	93.82 ± 0.0049
牛磺胆酸钠	12.6 ± 0.0123	50.03 ± 0.0106	54.89 ± 0.0078
脱氧胆酸钠	19.68 ± 0.0141	70.21 ± 0.0191	95.38 ± 0.0028

由表 1 可知,苦荞水溶性蛋白纯化物对所选择的 3 类代表性胆酸盐具有吸附作用,其中峰 3 的吸附能力大于另外两个峰,对胆酸钠和脱氧胆酸钠的吸附率均达到 90% 以上,对较难被吸附的牛磺胆酸钠的吸附率也高于 50%。因此可初步确定峰 3 中具有较强降血脂作用的功能因子。

3 结论

苦荞水溶性蛋白是苦荞生物活性物质之一,本研究以 DEAE-Sepharose Fast Flow 作为分离介质,以静态吸附和动态吸附相结合的方法,优选出 DEAE-Sepharose Fast Flow 分离纯化苦荞水溶性蛋白的最佳操作方法和参数,即:以 10mmol/L、pH6.5 的磷酸盐缓冲体系,0.2mol/L 和 0.5mol/L NaCl 磷酸盐作为洗脱液,流速为 1.0mL/min,于室温下进行洗脱,收集主要分离峰。获得了具有较强降血脂生理功能的苦荞水溶性蛋白组分。

实验以胆酸钠、脱氧胆酸钠和牛磺胆酸钠作为吸附对象,证实了苦荞水溶性蛋白纯化物的降血脂能力,揭示了荞麦蛋白通过吸附胆酸盐,抑制其在肠道的吸收并将其排出体外,从而促进胆固醇在体内代谢转化成胆汁酸的降血脂机理。为进一步深入研究苦荞水溶性蛋白的结构、表征和营养功能提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 阮景军,陈惠. 荞麦蛋白的研究进展与展望[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(3): 209-213.
- [2] LI Siqian, ZHANG Q H. Advances in the development of functional foods from buckwheat[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2001, 41(6): 451-464.
- [3] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M. Production of buckwheat protein extract and its hypocholesterolemic effect[J]. Current Advances in Buckwheat Research, 1995, 2: 919-926.
- [4] KAWASAKI M, SAKAMOTO H, TAKAHASHI R, et al. Effects of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) hot-water extract on plasma and liver lipid levels in rats[C]// 岩手: 岩手鼎立大学盛岡短期大学部研究論集, 第 8 号, 2006: 7-12.
- [5] TANG Chuanhe, PENG Jing, ZHEN Dawen, et al. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 672-278.
- [6] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of a buckwheat protein extract retards [α] anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(10): 1837-1839.
- [7] LIU Zhihe, ISHIKAWA W, HUANG Xuxin, et al. A buckwheat protein product suppresses 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats reducing cell proliferation[J]. The Journal of Nutrition, 2001, 131(6): 1850-1853.
- [8] 胡国华, 黄绍华. 米糠膳食纤维对胆酸钠吸附作用的研究[J]. 中国食品添加剂, 2001(2): 10-12.
- [9] HU Yebi, WANG Zhang, XU Shiying. Treatment of corn bran dietary fiber with xylanase increases its ability to bind bile salts, *in vitro*[J].

- Food Chemistry, 2008, 106(1): 113-121.
- [10] YOSHIE-STARK Y, WASCHE A. *in vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2004, 88: 179-184.
- [11] KAHN T S, WOODRUFF C L. *in vitro* binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten[J]. Food Chemistry, 2002, 79(4): 425-429.
- [12] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-Fed rats because of its low digestibility[J]. J Nutr, 1997, 127(7): 1395-1400.
- [13] 郭晓娜, 姚惠源. 苦荞麦抗肿瘤蛋白的分离纯化及结构分析[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 462-465.
- [14] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 23-24.
- [15] 陈刚, 邱家山, 赵红卫, 等. 新型离子交换树脂 CG-6 对人凝血酶原复合物的吸附行为分析及研究[J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(2): 166-174.
- [16] GUO Xiaona, ZHU Kexue, ZHANG Hui, et al. Purification and characterization of the antitumor protein from Chinese Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) water-soluble extracts[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(17): 6958-6961.
- [17] WANG Zhuanhua, ZHANG Zheng, ZHAO Zhuohui, et al. Purification and characterization of a 24 kDa protein from Tartary Buckwheat seeds [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(7): 1409-1413.
- [18] FUJIMURA M, MINAMI Y, WATANABE K, et al. Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.)[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(8): 1636-1642.
- [19] 徐叔云, 卞入濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1145-1146.
- [20] DEBRUYNE P R, BRUYNEEL E A, LI X, et al. The role of bile acids in carcinogenesis[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, 480-481: 359-369.