

任继波,李敬龙,胡文效.葡萄籽蛋白质的分离纯化及电泳分析[J].江苏农业科学,2016,44(4):318-321.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.091

葡萄籽蛋白质的分离纯化及电泳分析

任继波¹,李敬龙¹,胡文效²

(1. 齐鲁工业大学生物工程学院,山东济南 250353; 2. 山东省葡萄研究院,山东济南 250100)

摘要:以脱脂脱酚葡萄籽粕为原料,采用碱液浸提法对籽粕中蛋白质进行提取,确定蛋白质的最佳提取条件为温度 88 ℃、浸提液 pH 值 11.5、料液比 1 g : 25 mL、提取时间 130 min,该条件下蛋白提取率达到 83.5%。结合蛋白提取液性质,设计了一套可行的葡萄籽蛋白质纯化方案,初步确定了纯化方案中几个关键点的工艺参数。利用 SDS-PAGE 电泳对纯化前后的样品蛋白进行检测分析,发现样品蛋白中主要存在 4 种蛋白亚基,分子量分别为 40、37、19、17 ku,纯化后 4 种蛋白亚基占总蛋白的相对含量为 91.5%。

关键词:脱脂脱酚葡萄籽粕;提取;纯化;电泳分析

中图分类号: TS255.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0318-03

我国作为世界第 7 大葡萄酒生产国,2013 年葡萄酒产量达 11.7 亿 L,葡萄酒生产过程中产生的葡萄籽约 5 万 t。葡萄籽是一种资源性副产物,含有丰富的脂肪、蛋白质、碳水化合物及其他活性成分^[1],其中关于葡萄籽油^[2]、葡萄籽原花青素^[3]利用的研究较为常见,而葡萄籽蛋白质的利用研究却鲜有报道。脱脂脱酚葡萄籽粕中粗蛋白含量为 11%~13%。检测发现,小芒森(*Petit Manseng*)葡萄籽蛋白质含有 18 种氨基酸,包括 8 种人体必需氨基酸,且天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸含量较高,植物中普遍缺乏的赖氨酸、精氨酸较为丰富,因此葡萄籽蛋白质在食品、饲料等领域具有较高的应用价值。本研究对葡萄籽中的蛋白质进行了提取与分离纯化,并测定了蛋白亚基成分,旨在为葡萄籽的综合利用提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

脱脂脱酚葡萄籽粕(粗蛋白含量 11.6%),葡萄品种小芒森,产地山东省蓬莱市;有关有机、无机试剂药品均为分析纯。

UV-5200 型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;Kjeltec 2300 型凯氏定氮仪,丹麦福斯分析仪器公司;DYY-6C 型电泳仪电源、DYCZ-28A 型电泳仪,北京市六一仪器厂;ChampGel 5500 型凝胶成像仪及分析系统,北京赛智创业科技有限公司;SHA-B 型恒温振荡器,常州国华电器有限公司;LNG-NF-101 型实验室膜分离设备,上海朗极膜分离设备工程有限公司;PHS-25 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;TDL-5 型高速离心机,上海安亭科学仪器厂;BY-R 18 型医用离心机,北京白洋医疗器械有限公司;ML 204/2 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

收稿日期:2015-03-24

基金项目:山东省农业重大应用技术创新项目。

作者简介:任继波(1989—),男,山东淄博人,硕士研究生,主要从事生物活性物质分离研究。E-mail:renjiboc@hotmai.com。

通信作者:胡文效,研究员,硕士生导师,主要从事生物化工专业生物分离研究。E-mail:1907117599@qq.com。

1.2 方法

1.2.1 测定方法 籽粕含水量测定:水分测定常规法^[4];籽粕粗蛋白测定:凯氏定氮法^[5];提取液蛋白测定:考马斯亮蓝比色法、双缩脲法^[6];蛋白质等电点测定:等电点比色法^[7];蛋白质分子量测定:SDS-PAGE 电泳。

1.2.2 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质等电点的测定 取等量的蛋白质提取液,用 2 mol/L HCl 将 pH 值分别调为 4.6、4.4、4.2、4.0、3.8、3.6、3.4、3.2、3.0、2.8、2.6、2.4、2.2,离心,测上清液中蛋白质浓度。以 pH 值为横坐标,上清液蛋白浓度为纵坐标作图,得到上清液蛋白浓度随 pH 值变化的曲线图。

1.2.3 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质的提取

1.2.3.1 蛋白提取工艺流程 脱脂脱酚葡萄籽蛋白质的提取工艺流程见图 1。

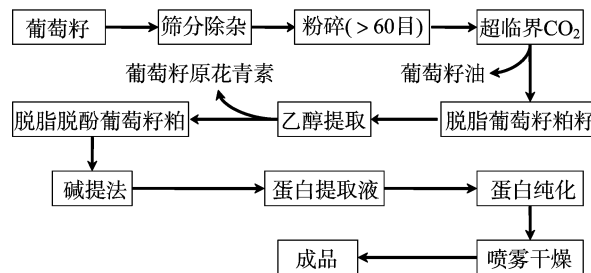


图1 脱脂脱酚葡萄籽蛋白质提取工艺流程

1.2.3.2 提取条件单因素试验 (1)浸提液 pH 值对提取率的影响试验:用 NaOH 分别将水溶液 pH 值调为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,提取温度 55 ℃,料液比 1 g : 20 mL,提取时间 1.0 h。(2)料液比对提取率的影响试验:料液比分别取 1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL、1 g : 30 mL、1 g : 35 mL,提取温度 55 ℃,pH 值 11.0,提取时间 1.0 h。(3)提取温度对提取率的影响试验:提取温度分别设定为 55、65、75、85、95 ℃,pH 值 11.0,料液比 1 g : 20 mL,提取时间 1.0 h。(4)提取时间对提取率的影响试验:提取时间分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,提取温度 55 ℃,pH 值 11.0,料液比 1 g : 20 mL。

1.2.3.3 提取条件的正交试验 在单因素试验基础上,采用

L₉(3⁴) 正交试验设计,考察 pH 值、料液比、温度、时间等 4 个因素(表 1)对葡萄籽蛋白提取率的影响。

表 1 碱液浸提法正交试验因素和水平

水平	因素			
	A:温度(℃)	B:pH 值	C:料液比(g:mL)	D:时间(min)
1	82	10.5	1:22	110
2	85	11	1:25	120
3	88	11.5	1:28	130

1.2.4 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质的初步纯化

1.2.4.1 蛋白纯化工艺流程 脱脂脱酚葡萄籽蛋白纯化工艺流程见图 2。

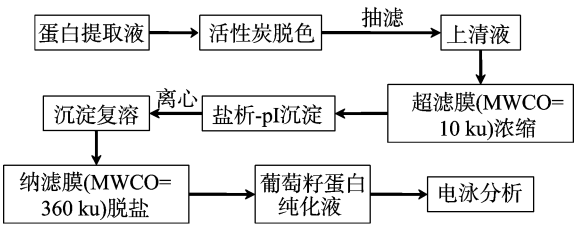


图2 脱脂脱酚葡萄籽蛋白质纯化工艺流程

1.2.4.2 活性炭脱色 取一定量蛋白提取液,加 20 g/L 颗粒状活性炭,充分搅拌均匀后,调 pH 值至 5.0,置于 65 ℃ 恒温振荡器中保温 1 h,2 层滤纸抽滤后得到清液。

1.2.4.3 盐析—等电点沉淀 取经超滤浓缩后的提取液,用 2 mol/L 盐酸溶液调 pH 值至 3.0,加硫酸铵并使其饱和度达 80%,离心分离沉淀,对上清液继续加硫酸铵直至饱和度达 90%,离心分离沉淀。2 次沉淀加少量蒸馏水使其复溶,合并复溶液,加蒸馏水调节蛋白浓度为 10 g/L。

1.2.4.4 超滤浓缩、纳滤脱盐 蛋白提取液经活性炭脱色处理后,采用直径 45.7 mm 的卷式有机膜元件(MWCO = 10 ku)进行浓缩。工艺条件:泵频 30 Hz,运行压力 12 bar,滤出液流量 7.6 L/h。浓缩过程中检测截留液蛋白浓度,当截留液蛋白浓度为处理前蛋白浓度的 2 倍时停止浓缩。浓缩液经盐析-pI 点沉淀后,采用直径 50.8 mm 的卷式有机膜元件(MWCO = 360 ku)进行脱盐。工艺条件:泵频 35 Hz,运行压力 25 bar,滤出液流量 3.8 L/h,蒸馏水补加量 3.8 L/h,用 1% BaCl₂ 检查滤液中是否有 SO₄²⁻ 存在。

1.2.5 蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析 收集洗脱液,根据 280 nm 下的吸光度,选取蛋白浓度最高的峰进行 SDS-PAGE 电泳分析。电泳前,样品采用透析法除盐,并调节蛋白浓度为 2 g/L。电泳浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,蛋白样品与 5 × SDS-样品缓冲液按体积比 4:1 混合,100 ℃ 煮沸 5 min,上样量 40 μL。电泳过程中,电流控制在 10 mA,待样品进入分离胶后加大电流至 20 mA,当前沿指示剂到达分离胶前沿 1.0~1.5 cm 时停止电泳。

2 结果与分析

2.1 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质氨基酸组成

脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质氨基酸组成见表 2。

2.2 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质等电点的测定

由图 3 可见,当蛋白提取液 pH 值为 3.0 时,离心后上清液蛋白浓度最低,因此可判断该点为脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白

表 2 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质氨基酸组成

氨基酸	含量(g/kg)	氨基酸	含量(g/kg)	氨基酸	含量(g/kg)
天冬氨酸	11.5	胱氨酸	3.8	苯丙氨酸*	4.4
苏氨酸*	4.6	缬氨酸*	7.8	组氨酸	3.2
丝氨酸	5.4	蛋氨酸*	0.6	赖氨酸*	4.5
谷氨酸	28.3	异亮氨酸*	4.2	精氨酸	8.0
甘氨酸	12.1	亮氨酸*	7.0	脯氨酸	6.2
丙氨酸	7.1	酪氨酸	2.1	色氨酸*	0.5

注:葡萄品种为小芒森;“*”表示人体必需氨基酸。

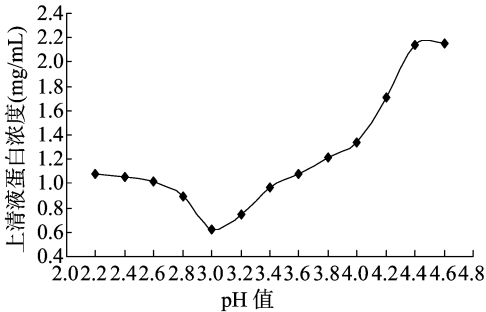


图3 上清液蛋白浓度随 pH 值变化曲线

质的等电点,即 pI = 3.0。

2.3 碱液浸提法各因素对蛋白提取率的影响

由图 4 可见,当 pH 值为 10.0~11.0 时,蛋白提取率快速上升,当 pH 值为 11.0 时,提取率达到 36.3%。但是当 pH 值 > 11.5 时,提取液颜色明显加深,影响蛋白质含量测定。此外,pH 值过高会破坏蛋白质的结构性质,使蛋白提取液散发异味。因此,选择浸提液 pH 值为 11.0。

由图 5 可知,随着料液比增大,蛋白提取率逐渐升高,当料液比达到 1 g:25 mL 后,提取率逐渐趋于平缓。料液比在 1 g:20 mL 至 1 g:25 mL 时,提取率增量最为显著,因此选择料液比为 1 g:25 mL。

由图 6 可知,在较高温度(75~85 ℃)时,蛋白提取率增幅较大,高于 85 ℃ 时蛋白提取率增加不明显。这与以往报道^[7]的在中温(35~40 ℃)下蛋白提取率较高有所不同,可能是所用原料不同所造成。本研究所用葡萄籽为提取完葡萄籽油和葡萄籽原花青素之后的籽粕,而在提取葡萄籽原花青素过程中,提取剂为 70% 乙醇溶液,提取温度为 70 ℃^[8],此过程中高浓度乙醇和高温使葡萄籽中原有蛋白质结构、性质发生改变,因此针对脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质的提取温度会发生改变。综合考虑,选择提取温度为 85 ℃。

由图 7 可知,当提取时间 > 2.0 h 时,蛋白提取率不再随时间延长而增加,因此选择提取时间为 2.0 h。

2.4 碱液浸提法正交试验

从表 3 可见,对蛋白提取率影响最大的因素是 pH 值,其次是提取时间、温度,最后是料液比。蛋白提取最佳工艺条件为 A₃B₃C₂D₃,即浸提温度 88 ℃、浸提液 pH 值 11.5、料液比 1 g:25 mL,提取时间 130 min。按此优化条件进行试验验证,蛋白提取率达 83.5%。

2.5 脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质的电泳分析

从图 8、图 9 可见,葡萄籽粕蛋白提取液纯化前后主要存在 4 种蛋白亚基,分子量分别为 40、37、19、17 ku。纯化前蛋

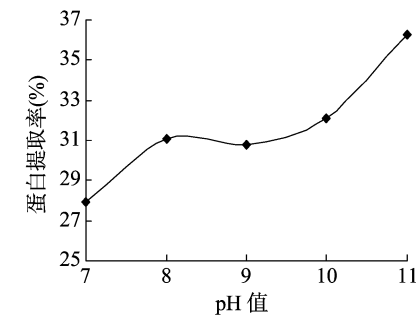


图4 浸提液 pH 值对蛋白提取率的影响

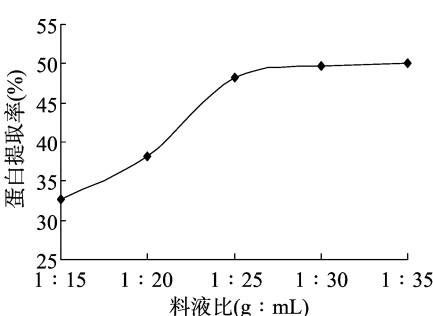


图5 料液比对蛋白提取率的影响

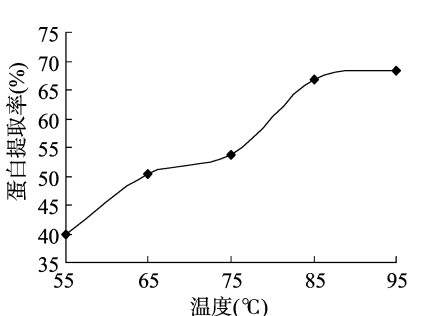


图6 提取温度对蛋白提取率的影响

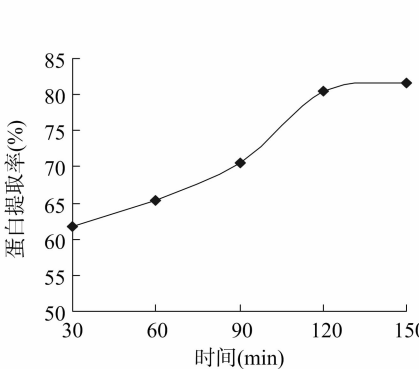
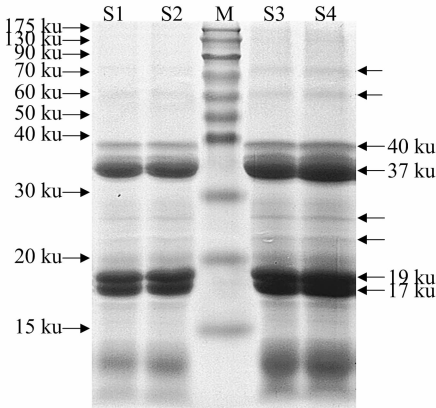
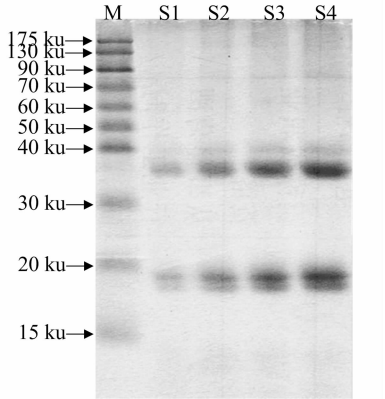


图7 提取时间对蛋白提取率的影响



M—蛋白marker; S1~S4—不同浓度的未纯化样品蛋白

图8 未纯化样品蛋白电泳图谱



M—蛋白marker; S1~S4—不同浓度的纯化样品蛋白

图9 样品蛋白纯化后电泳分析图谱

白亚基条带较为复杂,纯化后高于 40 ku 和低于 17 ku 的蛋白亚基几乎不存在。从表 4 可见,纯化后 4 种主要蛋白亚基的总相对含量从 63.4% 提高到 91.5%。经多次重复试验,样品蛋白电泳图谱分析结果具有较好的重现性和稳定性。

表 3 碱液浸提法正交试验结果

序号	因素水平				蛋白提取率 (%)
	A:温度	B:pH 值	C:料液比	D:时间	
1	1	1	1	1	49.9
2	1	2	2	2	60.0
3	1	3	3	3	78.7
4	2	1	2	3	64.5
5	2	2	3	1	59.0
6	2	3	1	2	74.5
7	3	1	3	2	62.7
8	3	2	1	3	75.2
9	3	3	2	1	79.1
k_1	62.9	59.0	66.5	62.7	
k_2	66.0	64.7	67.9	65.7	
k_3	72.3	77.4	66.8	72.8	
R	9.4	18.4	1.4	10.1	

表 4 样品中 4 种主要蛋白亚基含量

蛋白亚基分子量 (ku)	相对含量 (%)	
	纯化前	纯化后
40	8.7	12.2
37	23.8	37.1
19	15.6	20.7
17	15.3	21.5

3 结论与讨论

3.1 讨论

常用的葡萄籽蛋白提取方法有盐析法、碱液浸提法、酶解法等。王侠对盐析法提取葡萄籽蛋白质条件进行了优化,得出在最佳条件下蛋白提取率为 17%^[9];夏辉等采用碱溶酸沉法对葡萄籽中蛋白质进行了提取研究,结果表明最佳条件下蛋白提取率达 70.6%^[10];叶润等利用复合糖酶对蛋白质进行提取,由于采用复合糖酶处理脱脂葡萄籽粉后降低了葡萄籽中半纤维素含量,蛋白提取率有所提高,达 84.6%^[11]。本研究用脱脂脱酚葡萄籽粕在前期提取葡萄籽油和葡萄籽原花青素过程中,由于高压、高浓度乙醇和高温使葡萄籽中原有蛋白质结构、性质发生改变,蛋白提取条件较之前文献报道^[7]有所差异。在前期试验基础上,选定碱液浸提法为最佳提取方法,通过优化提取条件,使蛋白提取率达 83.5%。

由于蛋白质在溶解性、带电荷性、分子量大小或亲和特异性等方面存在差异^[12],常用的分离纯化方法有吸附法、超滤法、沉淀法(盐沉、有机溶剂沉淀、等电点沉淀)、透析法、色谱法(凝胶过滤、离子交换、亲和色谱、共价色谱)等。王洪新等对茶叶蛋白的初步纯化研究中,采用等电点沉淀-盐析、丙酮脱色、超滤脱盐等方法得到了较纯茶叶蛋白^[13];徐梦辰等以山药蛋白酶解液为原料,采用阴离子交换层析和凝胶层析对酶解液中蛋白组分进行了分离纯化,取得了较好效果^[14]。国内还未见葡萄籽蛋白质纯化方面的研究报道。本研究在脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质提取工艺基础上,针对籽粕蛋白提取液性质设计了一套较为合理的纯化工艺,并采用 SDS-PAGE 电

孙春丽,王紫燕,李春阳,等.市售洋槐蜜多酚类成分及其抗氧化活性研究[J].江苏农业科学,2016,44(4):321-327.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.092

市售洋槐蜜多酚类成分及其抗氧化活性研究

孙春丽¹,王紫燕^{1,2},李春阳³,张红城¹

(1.中国农业科学院蜜蜂研究所/农业部农产品加工中心蜂产品加工分中心,北京 100093;

2.南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095; 3.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:收集了在全国范围内销售的 15 种洋槐蜜样品,通过 HPLC-DAD 对蜂蜜样品多酚类成分进行分析,测定了总酚酸和总黄酮含量,以及蜂蜜清除 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、超氧自由基的能力和还原力。结果表明,市售洋槐蜜质量参差不齐,总酚酸含量从 3.7 mg/g 到 23.3 mg/g;总黄酮含量从 2.2 mg/kg 到 12.9 mg/kg。15 种商品洋槐蜜均具有一定的抗氧化活性。此外,在 15 种商品洋槐蜜中只有 4 个样品具有蜂蜜来源纯正、成分齐全的特点,是品质好的洋槐蜂蜜。

关键词:洋槐蜜;多酚类成分;抗氧化;黄酮;酚酸;质量监控依据

中图分类号: S896.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0321-07

蜂蜜是蜜蜂将采集的植物花蜜,混以蜜蜂唾液腺的分泌物,经过充分酿造而贮藏于巢脾内的甜物质。其中糖类成分占 70% 以上,水分占 16% ~ 25%,蛋白质平均含量为 0.16%^[1]。蜂蜜不仅是一种营养价值高的保健食品,而且具

有多种生物学活性,如抗氧化、解毒、消炎^[2]、抗癌^[3]、保护创面、促进细胞再生^[4]等。一些研究证明,多酚类物质(如酚酸和黄酮)具有强的抗氧化能力^[5]。蜂蜜中含有丰富的多酚类成分,这些成分不仅具有很强的抗氧化活性,而且具有多种生物活性。因此本研究收集了市售 15 种洋槐蜜样品,对其中的多酚类成分及其抗氧化活性进行分析,为洋槐蜜产品的质量监控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 收集在商场及专卖店销售的 15 种洋槐蜜样品,品牌种类用 A、B、C、…、O 代替,其详细信息如表 1 所示。

京:中国标准出版社,2008。

[5] GB 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010。

[6] 王廷华,张云辉,邹晓莉. 蛋白质理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2005:53-54。

[7] 李凤英,崔蕊静,李春华. 葡萄籽蛋白质的提取工艺研究[J]. 中国油脂,2005,30(4):50-53。

[8] 高德艳,胡文效,魏彦峰,等. 葡萄籽中原花青素的提取与分离[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2013(5):6-11。

[9] 王 侠. 葡萄籽中化学成分的提取分离及结构鉴定[D]. 长春:长春中医药大学,2008。

[10] 夏 辉,丁丹华,万 辉. 葡萄籽蛋白提取工艺的研究[J]. 粮油加工,2010(8):37-39。

[11] 叶 润,马宝英,牟德华. 从脱脂葡萄籽中提取蛋白质的工艺研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2009(1):17-21。

[12] 陆 健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:111-112。

[13] 王洪新,胡昌云. 茶叶蛋白质提取及初步纯化研究[J]. 食品工业科技,2004,25(12):69-71,73。

[14] 徐梦辰,丁 轲,吕 莹,等. 山药蛋白酶解液的分离纯化[J]. 北京农学院学报,2014,29(3):94-96。

收稿日期:2015-03-04

基金项目:中国农业科学院科技创新工程(编号:CAAS-ASTIP-2015-IAR)。

作者简介:孙春丽(1988—),女,山东泰安人,硕士研究生,研究方向为食品科学。E-mail:1036724016@qq.com。

通信作者:张红城,副研究员,主要从事食品科学研究。E-mail:460414874@qq.com。

泳对蛋白纯化效果进行分析,为后续制备高纯葡萄籽分离蛋白、食源蛋白产品开发、多肽制备及活性研究等内容奠定基础。

3.2 结论

本研究采用碱液浸提法提取脱脂脱酚葡萄籽粕蛋白质,优化确定的最佳提取条件为温度 88 ℃、浸提液 pH 值 11.5、料液比 1 g : 25 mL、提取 130 min,该条件下蛋白提取率达到 83.5%。采用吸附脱色、盐析-pI 沉淀、超滤、纳滤等方法对蛋白提取液进行了纯化分离,探索纯化工艺中各关键技术点的工艺条件。最后通过 SDS-PAGE 电泳分析纯化前后的样品蛋白,发现样品中含有 4 种蛋白亚基,分子量分别为 40、37、19、17 ku,纯化后 4 种蛋白亚基占总蛋白的相对含量为 91.5%。

参考文献:

[1] 许申鸿,杭 璐,郝晓丽. 葡萄籽化学成分分析及其抗氧化性质的研究[J]. 食品工业科技,2000,21(2):18-20。

[2] 李彦奎,蒋锡龙,魏彦峰,等. 超临界 CO₂ 萃取葡萄籽油工艺研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2013(5):31-34。

[3] 梁红敏,高德艳,张晶莹,等. 葡萄籽多酚功能特性及应用开发现状[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2014(5):55-59。

[4] GB/T 21305—2007 谷物及谷物制品水分的测定常规法[S]. 北