

茶花水溶性蛋白的分离纯化及其体外吸附胆酸盐能力的研究

邓雪, 黄惠华

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

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茶花水溶性蛋白, 并通过磷酸盐缓冲液 pH 值的最佳选择改善分离提纯效果。同时在体外模拟人体消化环境, 通过体外吸附胆酸盐能力的测定证实所提取分离得到的茶花水溶性蛋白具有一定的降血脂功能。结果发现: 当磷酸盐缓冲液 pH 值为 5.0 于室温下洗脱的效果最好, 得到的 3 个主要分离组分中峰 III 的体外吸附胆酸盐能力最佳, 其对胆酸钠, 甘氨酸胆酸钠, 牛磺胆酸钠的吸附量分别为 0.78 ± 0.02 、 0.64 ± 0.00 、 1.60 ± 0.02 $\mu\text{mol/mL}$ 。

关键词: 茶花水溶性蛋白; 硫酸铵盐析; 离子交换层析; 体外吸附胆酸盐

文章编号: 1673-9078(2013)1-63-67

In vitro Binding of Bile Salts by Water-soluble Protein Extract from Tea Flower

DENG Xue, HUANG Hui-hua

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Water-soluble protein was extracted from tea flower 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 protein extract had hypolipidemic effect. Besides, the best elution results of water-soluble proteins on DEAE-Sepharose Fast Flow column were achieved at pH 5.0 and 10 mmol/L phosphate buffer as eluent at room temperature. Peak III exhibited the best bile salt adsorption ability among three separation peaks obtained than peak II and I. The bile salt-binding capability of the three bile salts was 0.78 ± 0.02 , 0.64 ± 0.00 , 1.60 ± 0.02 mmol/mL, respectively.

Key words: tea flower water-soluble protein; ammonium sulfate salting-out; ion-exchange column chromatography; *in vitro* bile salt adsorption

茶花[*Camellia sinensis* (L.) O. kuntze]是茶树的生殖器官^[1]。茶树花素有“安全植物的胎盘”、“茶树上的精华”的美誉^[2], 其中蛋白质、茶多糖含量明显高于茶叶的平均水平。茶花在我国产量十分可观, 但很少加以利用, 一般限于将其加工成茶花茶。

高血脂是动脉粥样硬化形成的主要原因, 血液中长期过高的胆固醇, 甘油三酯以及血管壁上过多的脂类易被氧化, 在血管壁上沉积, 导致动脉粥样硬化。因此积极治疗高血脂症, 对预防心脑血管疾病具有重

收稿日期: 2012-08-12

基金项目: 广州市科技计划项目(2010Z1-E221), 广东省科技计划项目(2012B020311004, 2010B020312005)

作者简介: 邓雪(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学

通信作者: 黄惠华(1959-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品科学及农产品加工

要意义^[3]。胆酸盐是指人体和动物胆汁中由胆固醇衍生而来的具有甾核结构的一类两性大分子, 对脂肪和胆固醇的消化吸收和脂溶性维生素的代谢起重要作用。有学者认为饮茶之后, 茶中功能性成分在肠道内能与胆酸盐结合, 一方面影响脂类的消化和吸收, 另一方面介入胆酸盐的肠肝循环, 使胆酸盐排出体外, 促使肝脏中胆固醇不断转化为胆酸盐, 从而降低体内胆固醇含量, 达到降血脂的目的。胡叶碧^[4]等系统地比较了玉米皮膳食纤维(CDF)及其经木聚糖酶酶解后所得产物(XMF)的组成和吸附胆酸盐的特性, 发现通过木聚糖酶的适度降解, XMF在膳食纤维组成、分子量分布及单糖组成上都发生了变化。XMF胆酸盐的吸附能力尤其得到了大幅度的提高。胡国华等^[5]、Hu等^[6]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^[7]、Kahlon 等^[8]发现一些植物蛋白提取物也具有吸附胆酸盐的能力。Kayashita 等^[9]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。

本研究采用硫酸铵盐析法、DEAE-Sepharose FastFlow 离子交换介质对茶花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、时间等因素观察 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换对茶花水溶性蛋白分离纯化的影响,并最终确定 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换操作的最优条件,实现目标蛋白的分离纯化,为茶花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,探讨茶花水溶性蛋白中具有降血脂功能的组分,以期对茶花水溶性蛋白降血脂功能的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

茶鲜花:实验所用茶株采集自华南农业大学实习茶园的金仙品种(华南农业大学1号)。

胆酸钠(SC)、甘氨酸胆酸钠(SGC),日本 TCI 公司;牛磺胆酸钠(STC)、考来烯胺(消胆胺),美国 Sigma 公司;胰酶(蛋白酶 4080 U/g、脂肪酶 33600 U/g、淀粉酶 91000 U/g),四川贝奥生物制药有限公司;胃蛋白酶(1/15000),广州市齐云生物技术有限公司;DEAE-Sepharose Fast Flow,美国 GE 公司;其他试剂均为国产分析纯。

UV-1800 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;THZ-C 恒温振荡器,太仓市实验设备厂;TDL-40B 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;LGJ-10 真空冷冻干燥机北京松源华兴科技发展有限公司;HL-2D 定时数显恒流泵、BSZ-160F 电脑自动部分收集器、层析柱(1.6 cm×50 cm),上海精科实业有限公司。

1.2 茶花干燥

采下的茶鲜花摊开置于通风处,阴干至含水量在 60%左右,将茶花置于 100 °C 的蒸锅中,茶花薄摊不重叠,进行蒸气杀青 2 min,然后 70 °C 鼓风干燥工艺处理制成茶干花。

1.3 茶花蛋白的分离纯化

1.3.1 茶花水溶性蛋白的提取

茶干花经干燥后粉碎至 800 目,先经石油醚脱脂。再将脱脂后的茶花粉采用 pH 5.0 磷酸盐缓冲液(料水比为 1:20 (m/V))在 70 °C 条件下搅拌提取 1 h,并经

4000 r/min 离心 10 min 后收集上清液。

1.3.2 硫酸铵盐析饱和度的确定^[10]

取 9 个烧杯各装入 20 mL 上述茶花蛋白提取液,分别加入一定量的固体硫酸铵,使茶花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 °C 条件下搅拌 1 h,4000 r/min 离心 10 min 后收集沉淀。沉淀用 10 mL 水复溶,得到茶花水溶蛋白溶液,采用考马斯亮蓝法测定其蛋白含量。

1.3.3 茶花蛋白的透析

通过透析处理茶花蛋白中存在的无机离子和有机小分子物质。将茶花蛋白水溶液装入预处理后的透析袋中,置于 4 °C 冰箱中,用 5 倍体积以上的去离子水充分透析,3 小时更换一次,直至用 BaCl₂ 检测不到 SO₄²⁻为止,冷冻干燥后备用^[11]。

1.3.4 DEAE-Sepharose Fast Flow 静态吸附茶花水溶性蛋白

1.3.4.1 静态吸附法

取 50 mL 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液,充分搅拌平衡后静置 15 min,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,加入一定体积的茶花水溶蛋白溶液,充分搅拌吸附后,静置 20 min,用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白含量。

1.3.4.2 静态吸附最适 pH 值的确定

分别选取 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的磷酸盐缓冲液,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,加入一定体积的茶花水溶蛋白溶液,充分搅拌吸附后,静置 30 min,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。

1.3.4.3 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。

1.3.5 吸附等温线的测定

称取一定体积 DEAE-Sepharose Fast Flow 加入到 25 mL 具塞三角瓶中,充分搅拌平衡后,再往三角瓶中分别加入等体积不同浓度的茶花蛋白溶液,充分搅拌吸附后,静置 30 min,测定上清液中的蛋白含量,通过计算得蛋白质吸附量,得吸附等温线。

1.3.6 离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow)

取一定量 DEAE-Sepharose Fast Flow,用 pH 5.0

的 10 mmol/L 磷酸缓冲液配成匀浆, 脱气后填于层析柱中, 床体积约为 70 mL。将透析处理后的茶花蛋白液 10 mg/mL 上样 10 mL, 以用不同浓度洗脱液(NaCl + 缓冲溶液)以一定的流速进行洗脱, 流速为 1 mL/min, 每 5 min 收集一管, 用考马斯亮蓝法逐管检测。

1.4 茶花水溶性蛋白纯化物对胆酸盐吸附作用的测定

1.4.1 胆酸盐含量的比色测定

分别取分析样液 2.5 mL 于具塞试管中, 加入 7.5 mL 质量分数 60% 的硫酸, 于 70 °C 水浴 20 min, 取出冰浴 5 min, 在波长 387 nm 处测定吸光度。由标准曲线求得样液中胆酸盐的浓度^[2]。

1.4.2 人体胃肠道环境模拟

胃环境模拟: 取一定量样品, 加入 1 mL 人工胃液^[13], 在 37 °C 恒温振荡消化 1 h。

肠环境模拟: 以 0.45 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 6.3, 随后加入 4 mL (考来烯胺管中加 5 mL) 10 mg/mL 胰酶 (以 pH 6.3 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制), 在 37 °C 恒温振荡 30 min。

1.4.3 茶花水溶性蛋白纯化物对胆酸盐吸附作用的测定

取 1 mL 茶花水溶性蛋白纯化物, 置于 10 mL 具塞试管中, 经胃肠模拟环境处理后每个样品中加入 4 mL 胆酸盐溶液(牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、胆酸钠浓度均为 1 mmol/L, 以 pH 6.3 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制), 在 37 °C 恒温振荡 1 h, 4000 r/min 离心 10 min, 测定上清液中的胆酸盐含量^[4]。胆酸盐的浓度和酸度对其结合是有影响的, 但是因为本实验要模拟人体内环境所以根据参考文献^[5], 把胆酸盐的浓度定为 1 mmol/L 和 pH 值为 6.3。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵盐析饱和度的确定

通过不同硫酸铵饱和度盐析茶花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 70% 时, 蛋白回收率近 90%, 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 80% 进行盐析获得目标蛋白。将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-Sepharose Fast Flow 静态吸附水溶性蛋白

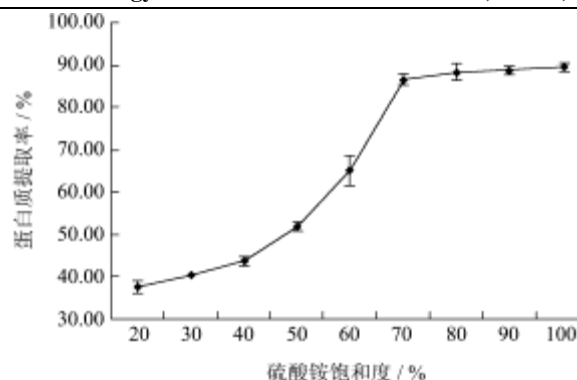


图 1 茶花水溶性蛋白硫酸铵盐析曲线

Fig.1 Ammonium sulfate precipitation curve of tea flower water-soluble proteins

2.2.1 静态吸附最适 pH 值的确定

不同 pH 的缓冲液可通过改变目标蛋白质表面所带的电荷影响其与层析介质的结合。因而选择合适 pH 的缓冲液进行柱平衡、上样、洗脱非常关键^[6]。

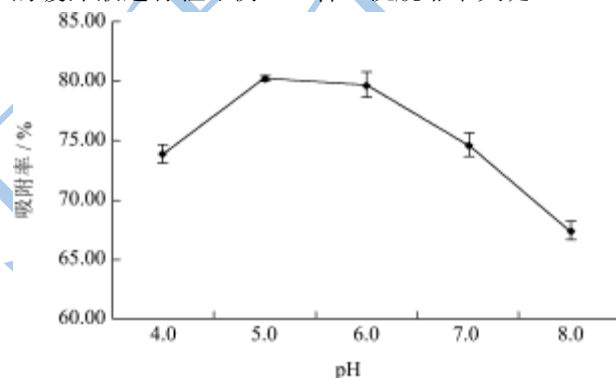


图 2 不同 pH 值对 DEAE-Sepharose Fast Flow 静态吸附的影响

Fig.2 Static adsorption curves of tea flower water-soluble proteins on DEAE-Sepharose fast flow under different pH conditions

由图 2 可知, 当 pH 值为 5.0 时介质对蛋白的吸附率达到最高为 80.24%, 此后吸附率呈下降趋势。因此可以确定 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析缓冲液体系的最适 pH 值为 5.0。

2.2.2 吸附速率曲线的测定

通过测定不同吸附时间吸附液中的蛋白质量浓度, 研究 DEAE-Sepharose Fast Flow 对水溶性蛋白的吸附能力, 结果如图 3 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 15 min 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。

2.2.3 吸附等温线的测定

称取一定体积 DEAE-Sepharose Fast Flow 加入到 25 mL 具塞三角瓶中, 充分搅拌平衡后, 再往三角瓶中分别加入等体积不同浓度 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、

6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mg/mL) 的茶花蛋白溶液, 充分搅拌吸附后, 静置 30 min, 测定上清液中的蛋白含量。

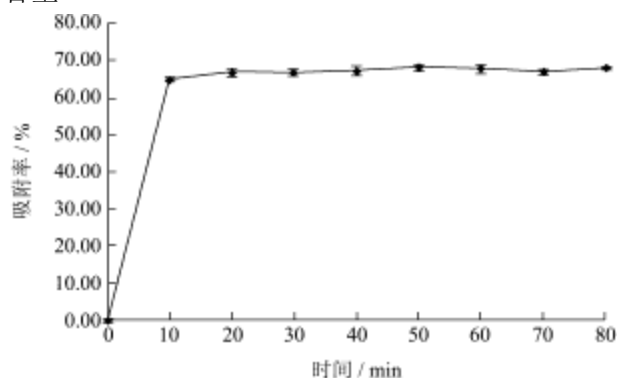


图3 DEAE-Sephacel Fast Flow 吸附速率

Fig.3 Time course of adsorption of tea flower water-soluble protein on DEAE-Sephacel Fast Flow

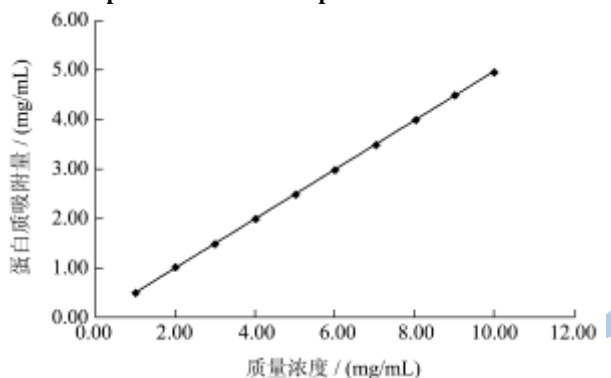


图4 茶花水溶性蛋白的吸附等温线

Fig.4 Adsorption Isotherms of teaflower water-soluble protein on DEAE-Sephacel Fast Flow

通过计算得蛋白质吸附量, 得吸附等温线, 如图4。对茶花水溶性蛋白质量浓度(x)与蛋白质吸附量(y)作回归分析, 发现基本符合一元线性回归模型。回归方程为: $y=0.4966x+0.0047$, 对回归方程作 F 检验, 发现茶花水溶性蛋白对蛋白质吸附量的回归效果显

表1 茶花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

| 样品 | 结合量/($\mu\text{mol/mL}$) | | | | | |
|----------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| | 胆酸钠 | 相对于考来烯胺的结合率/% | 甘氨酸胆酸钠 | 相对于考来烯胺的结合率/% | 牛磺胆酸钠 | 相对于考来烯胺的结合率/% |
| TFWSP1 | 0.15±0.00 ^a | 4.76±0.05 ^a | 0.07±0.01 ^a | 2.79±0.08 ^a | 0.68±0.02 ^a | 21.62±0.06 ^a |
| TFWSP2 | 0.61±0.01 ^b | 18.89±0.03 ^b | 0.28±0.03 ^b | 10.83±0.09 ^b | 1.44±0.01 ^b | 45.72±0.10 ^b |
| TFWSP3 | 0.78±0.02 ^c | 24.06±0.14 ^c | 0.64±0.00 ^c | 24.68±0.07 ^c | 1.60±0.02 ^c | 50.66±0.09 ^c |
| 考来烯胺/(50mg/mL) | 3.23±0.01 ^d | 100.00±0.04 ^d | 2.58±0.02 ^d | 100.00±0.06 ^d | 3.15±0.00 ^d | 100.00±0.03 ^d |

注: 同列肩标字母不同表示有显著性差异($P \leq 0.05$)。

由表1可知, TFWSP1、TFWSP2、TFWSP3 对胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、牛磺胆酸钠均具有吸附作用。其中 TFWSP3 对三种胆酸盐的吸附量大于 TFWSP2

著。相关系数 R^2 为 0.9999。

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

茶花水溶性蛋白上 DEAE-Sephacel Fast Flow 离子交换柱, 依次用磷酸盐缓冲液(pH 5.0, 10 mmol/L)、0.1、0.2、0.3、0.5 mol/L NaCl(磷酸盐缓冲液配制)作为洗脱剂进行洗脱, 主要得到三个组分, 分别命名为 TFWSP1、TFWSP2 和 TFWSP3。洗脱曲线如图5所示。

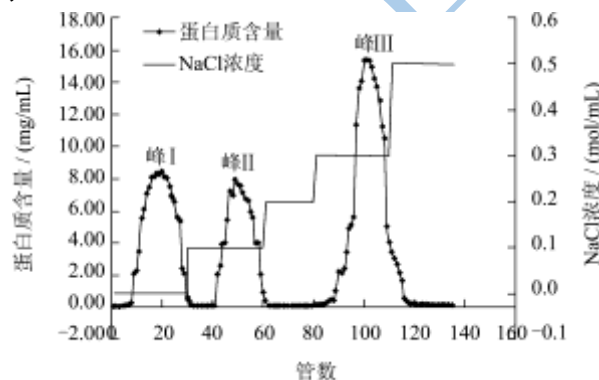


图5 茶花水溶性蛋白质经 DEAE-Sephacel FF 分离的洗脱曲线
Fig.5 DEAE-Sephacel elution chromatography of tea flower water soluble protein

由图5知, 峰无拖尾现象, 表明洗脱完全, 且峰III 响应值最高, 蛋白含量最高。将三个峰分别进行收集, 并进行冷冻干燥。

2.4 茶花水溶性蛋白纯化物对胆酸钠吸附作用的测定

胆酸盐是指人体和动物胆汁中由胆固醇衍生而来的具有甾核结构的一类两性大分子, 对脂肪和胆固醇的消化吸收和脂溶性维生素的代谢起重要作用。实验选择具有代表性的胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠作为吸附对象。将 TFWSP1、TFWSP2、TFWSP3 分别配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 吸附胆酸盐。

和 TFWSP1, TFWSP3 对牛磺胆酸钠的吸附量大于对胆酸钠和牛磺胆酸钠的吸附量。因此可初步确定峰 III 中具有较强吸附胆酸盐的功能因子。

3 结论

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 分离纯化茶花水溶性蛋白的最佳操作方法和参数,即:以 10 mmol/L、pH 5.0 的磷酸盐缓冲体系,0.1 mol/L 和 0.3 mol/L NaCl 磷酸盐作为洗脱液,流速为 1.0 mL/min,于室温下进行洗脱,收集主要分离峰。实验以胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠作为吸附对象,证实了茶花水溶性蛋白纯化物的吸附胆酸盐的能力,揭示了茶花水溶性蛋白纯化物 TFWSP3 吸附胆酸盐的能力最强。

参考文献

- [1] 伍锡岳,熊宝珍,何睦礼.茶树花果利用研究总结报告[J].广东茶业,1996,3:11-23
- [2] 王晓婧,翁蔚,杨子银,等.茶花研究利用现状及展望[J].中国茶叶,2004,26(4):8-10
- [3] 周国华,于国萍.黑木耳多糖降血脂作用的研究[J].现代食品科技,2005,1:46-47
- [4] 胡叶碧,沈滢,王璋.经木聚糖酶处理的玉米皮膳食纤维的组成及其胆盐吸附特性研究[J].食品工业科技,2008,29(2):80-82
- [5] 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
- [6] HU Yebi, WANG Zhang, XU Shiyang. 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
- [7] YOSHIE-STARK Y, WASCHER A. *in vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 179-184
- [8] KAHLON 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
- [9] 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
- [10] 周小理,黄琳,周一鸣.苦荞水溶性蛋白体外吸附胆酸盐能力的研究[J].食品科学,2011,32(23):80-81
- [11] 彭雅莉,胡飞.大麦芽极限糊精酶的分离纯化及酶学特性分析[J].食品科学,2012,33(1):204-206
- [12] 辛勋,陆红云.紫外分光光度法测定速效伤风胶囊中的胆酸含量[J].中国药业,2000,9(1):36-37
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].第二部.北京:中国医药科技出版社,2010:177-178
- [14] KAHLON T S, SMITH G E. *In vitro* binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium spp.*), plums (*Prunus spp.*), prunes (*Prunus spp.*), strawberries (*Fragaria Xananassa*), cherries (*Malpighia punicifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*) [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1182-1187
- [15] 陈亚非,赵谋明.水溶性与水不溶性膳食纤维对油脂、胆固醇和胆酸钠吸附作用研究[J].现代食品科技,2005,21(3):58-60
- [16] 贾俊睿,陈敏,梁新乐,等.DEAE-Sepharose Fast Flow分离纯化刺芹侧耳木质素降解酶[J].安徽农业科学,2009,37(2):448-450