

河南工业大学
硕 士 学 位 论 文

花生肽的酶法制备及其抗凝血
活性研究

作者姓名 胡永倩
指导教师 章绍兵 副教授
企业导师 朱克瑞 高工
专业领域 食品工程
培养院系 粮油食品学院
完成时间 二〇一五年五月

学校代码_10463_

密 级

河南工业大学
硕 士 学 位 论 文

花生肽的酶法制备及其抗凝血
活性研究

作者姓名 胡永倩
指导教师 章绍兵 副教授
企业导师 朱克瑞 高工
专业领域 食品工程
培养院系 粮油食品学院
完成时间 二〇一五年五月

Enzymatic preparation and anticoagulant activity of peanut peptides

A Dissertation Submitted for the Degree of Master

Candidate: Hu Yong-qian

Supervisor: AProf. Zhang Shao-bing

School of Food Science and Technology

Henan University of Technology, Zhengzhou, China

关于学位论文的独创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在指导教师指导下独立进行研究工作所取得的成果，论文中有关资料和数据是实事求是的。尽我所知，除文中已经加以标注和致谢外，本论文不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含本人或他人为获得河南工业大学或其它教育机构的学位或学历证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对研究所做的任何贡献均已在论文中做出了明确的说明。

若有不实之处，本人愿意承担相关法律责任。

学位论文作者签名：胡永倩

日期：2015 年 6 月 11 日

学位论文使用授权书

本人完全同意河南工业大学有权使用本学位论文（包括但不限于其印刷版和电子版），使用方式包括但不限于：保留学位论文，按规定向国家有关部门（机构）送交学位论文，以学术交流为目的赠送和交换学位论文，允许学位论文被查阅、借阅和复印，将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，采用影印、缩印或其他复制手段保存学位论文。

保密学位论文在解密后的使用授权同上。

学位论文作者签名：胡永倩

日期：2015 年 6 月 11 日

指导教师签名：李佰东

日期：2015 年 6 月 11 日

摘要

花生，作为一种重要的植物油料蛋白资源，含有人体必需的八种氨基酸、是适合人类食用的非常理想的优质食用蛋白源。本文以花生分离蛋白为研究对象，通过酶法制备花生肽，考察不同酶解产物的抗凝血活性；在筛选获得合适蛋白酶的基础上，对其酶解产物进行分离纯化，并通过液质联用分析高抗凝花生肽的一级结构。

通过酶种筛选，确定使用 Alcalase 2.4L 酶解花生蛋白；通过响应面设计试验优化得到其最佳酶解工艺条件：底物浓度 50.mg/mL，加酶量为 5000U/(g 蛋白)，反应温度 55℃，pH 9，酶解时间 2h。花生蛋白的水解度为 19.1%，得到酶解物 60mg/ml 时候凝血酶抑制率可达到 86.62%。

使用制备 RP-HPLC 分离花生蛋白酶解物，通过单因素试验确定其最佳分离条件：乙腈浓度 25%、进样浓度 20mg/mL、进样体积 1mL，流速 5mL/min。在此优化条件下得到 3 个主要花生肽组分（G1，G2 和 G3），其中 G2 组分抗凝血活性最好，浓度为 40mg/mL 时，对凝血酶的抑制率达到 94.2%。进一步采用半制备 RP-HPLC 分离 G2 组分，获得其最佳洗脱条件为：乙腈/水=15/85（v:v），进样浓度 7mg/mL，进样体积 80 μ l，流速 1.5mL/min。

在此分离条件下得到 5 个主要肽组分，其中 G2-R3 的抗凝血效果最好，在 0.41mg/mL 时，可以完全抑制凝血酶的活性即 100.07；G2-R5 的抗凝血效果次之，在 0.40mg/mL 的时抗凝血活性为 100.00%。采用液质联用分别分析组分 G2-R3 和 G2-R5 的结构，发现两者均不是单一组分，在 G2-R3 鉴定出 2 个活性肽结构，分别是 Gly-Asn-His-Glu-Ala-Gly-Glu（分子量:712.19）和 Cys-Phe-Asn-Glu-Tyr-Glu（分子量:803.23）；在 G2-R5 中鉴定出 2 个活性肽结构，分别是 Pro-Ala-Ser-Gln-Gly-Glu（分子量:587.24）和 Asn-Ala-Gly-Leu-Asn-Asp-Pro-Met-Asp-His-Glu（分子量:1211.47）。

关键词：花生肽；酶法；抗凝血；纯化；结构

Abstract

Peanut, as an important resource of oil plant protein, contains eight kinds of essential amino acids that is well balanced of the human body, is high quality edible protein source which is ideally suited for human consumption. In this dissertation, peanut protein was gained with dried peanut, the anticoagulant activity of different kinds of protein isolates was studied and compared. High quality peanut protein was selected for further isolate preparation of peanut peptides, which is prepared by the method of enzymatic, via testing the anticoagulant activity of different hydrolysates, the suitable proteases on further hydrolysis of peanut protein isolate is chosen. The anticoagulant activity of peanut peptide is higher than that of peanut protein; After the peanut peptides is freeze dried, the high anticoagulant activity of peanut peptides was prepared by preparative liquid chromatography, semi-preparative RP-HPLC and SEC-HPLC, then explore and analysis the relationship between the anticoagulant activity and molecular structure via HPLC-MS.

Different degree of hydrolysis, different anticoagulation activity, though the degree of anticoagulant activity of enzymatic hydrolysate is high, the hydrolysis may be low, here comes the conclusion that the hydrolyzed degree of enzymatic hydrolysate and its anticoagulant activity are not necessarily linked. Via the enzyme screening, according to the comparison of the overall enzymatic hydrolysate anticoagulant activity, we determined to hydrolyze peanut protein with the Alcalase 2.4L enzyme. The best hydrolysis process conditions were determined according to the response surface experimental design: substrate concentration 5.0 g/100mL, enzyme dosage is 5000 U/ (G protein), reaction temperature 55 C, pH 9, hydrolysis time 2h. When the density was 60mg/ml, The inhibition rate of thrombin under this condition reached 86.62%, while the degree of peanut enzyme hydrolysis was 19.1%.

Preparation of peanut peptides is separated by liquid chromatograph system, the optimal separation condition is determined through single factor experiment: acetonitrile concentration : 25%, the concentration of sample :20mg/mL, sample volume: 1mL, flow

rate of 5mL/min, Under which condition the peanut peptide separation purity and yield the best: 3 main components were separated, the anticoagulant activity of component G2 is best, At the concentration of 40mg/mL, the inhibition rate on thrombin reached 94.2%.

The G2 component was separated by semi preparative RP-HPLC, according to optimizing separation conditions of single factor test, the best conditions for the elution gradient elution is determined: A flow rate of 1.5 mL/min, the mobile phase with gradient elution: 0 ~ 5min and 100 ~ 85%A; 5 ~ 20 min, 85 ~ 60% A; 20 ~ 26 min, 60 ~ 0%A ~ 28 min; 26 0% A; 28 ~ 30 min, 0 ~ 100% A and 30 ~ 40 min; 100% A (A:100% water, 0.1% TFA; B:100% pure acetonitrile, containing 0.1% TFA), feed concentration for the 1.5 mg/mL; in the same way, when the eluent was at a certain proportion, we determined the best condition: proportion of acetonitrile: water =15:85 (v:v), flow rate of 1.5mL/min, inlet concentration of 7mg/mL, the injection volume 80 μ l.

Through SEC-HPLC the component of G2-R3, G2-R5 was analysed under this condition: the eluate ratio of acetonitrile: water =15:85 (v:v), flow rate of 1.5mL/min, inlet concentration of 7mg/mL, the injection volume 80 μ l, Both of them were not pure. The anticoagulant effect of G2-R3 was the best, and the inhibition rate was 100.07 at 0.41mg/mL, the anticoagulant effect of G2-R5 was second, and the anticoagulant activity was 100% at 0.40mg/mL. The structural of G2-R3, G2-R5 was analysed by MALDI SYNAPT Q-TOF MS, we got four active peptides. Gly-Asn-His-Glu-Ala-Gly-Glu (M:712.19) and Cys-Phe-Asn-Glu-Tyr-Glu (M:803.23) were from G2-R3, Pro-Ala-Ser-Gln-Gly-Glu (M:587.24) and Asn-Ala-Gly-Leu-Asn-Asp-Pro-Met-Asp-His-Glu (M:1211.47) were from G2-R5, in which Asp (aspartic acid) was a main component of cotyledons of peanut protein.

Key words: Peanut peptide; Enzymatic; Anticoagulant; Purification; structure

目 录

第一章 绪论	1
1.1 课题研究的目的是与意义	1
1.1.1 花生的种植及营养成分	1
1.1.2 花生分离蛋白的分类构成和性质	1
1.1.3 花生肽的结构性质和分离方法	3
1.1.4 花生肽的开发应用	4
1.1.5 抗凝血活性肽的应用市场	4
1.2 国内外研究现状	5
1.2.1 花生蛋白的精深加工和应用前景	5
1.2.2 花生肽的多功能性研究	6
1.2.3 抗凝血活性肽探究与分析	7
1.3 本课题的主要研究内容和研究目的	9
1.3.1 花生抗凝血活性肽酶法制备工艺的研究	9
1.3.2 高抗凝血活性花生肽的分离纯化与制备	9
1.3.4 花生肽一级结构的鉴定	9
第二章 花生抗凝血肽的酶法制备工艺	10
2.1 引言	10
2.2 实验材料与设备	10
2.2.1 实验材料	10
2.2.2 实验仪器与设备	11
2.3 实验方法	11
2.3.1 水分含量测定	11
2.3.2 粗蛋白含量测定	11
2.3.3 粗脂肪含量测定	11
2.3.4 蛋白酶活力的测定	11
2.3.5 蛋白质水解度测定	12
2.3.6 花生蛋白及其水解物抗凝血活性测定	12
2.3.7 花生分离蛋白的制备	13
2.3.8 Alcalase2.4L 酶解工艺优化单因素实验设计	13
2.3.9 数据统计与处理	14
2.4 结果与讨论	14
2.4.1 不同来源蛋白质抗凝血酶活性的比较	14

2.4.2 商品蛋白酶活力的测定.....	15
2.4.4 不同蛋白酶对花生蛋白水解物抗凝血活性的影响.....	16
2.4.5 Acalase2.4L 酶解工艺优化.....	19
2.5 本章小结	27
第三章 高抗凝活性花生肽的分离纯化	28
3.1 引言	28
3.2 实验材料与设备	28
3.2.1 实验材料	28
3.2.2 实验仪器与设备	28
3.3 实验方法	29
3.3.1 测定方法	29
3.3.2 实验设计	29
3.4 结论	31
3.4.1 用制备色谱在不同流动相比比例条件下的分离效果.....	31
3.4.2 用制备色谱在不同上样量条件下的分离效果.....	33
3.4.3 用制备色谱在不同流速条件下的分离效果.....	36
3.4.4 高抗凝血活性花生肽选择, 以及其在不同浓度下抗凝血活性的探究.....	38
3.4.5 半制备 RP-HPLC 分离 G2 组分	38
3.4.6 反相高效液相 (RP-HPLC) 分离花生肽各个成分的抗凝血活性.....	56
3.5 本章小结	58
第四章 高抗凝血活性花生肽的结构分析	59
4.1 引言	59
4.2 实验材料与设备	59
4.2.1 实验材料	59
4.2.2 实验仪器与设备	59
4.3 实验设计	60
4.3.1 实验方法	60
4.3.2 实验条件	60
4.4 实验结果与分析	61
4.4.1 液质联用分析 G2-R3	61
4.4.2 液质联用分析 G2-R5	64
4.5 本章小结	67

第五章 结论与展望	68
5.1 结论	68
5.1.1 对花生肽和花生蛋白抗凝血活性的研究	68
5.1.2 对制备花生蛋白和高抗凝血活性花生肽方法的研究	68
5.1.3 对制备分离高抗凝血活性花生肽方法的研究	69
5.1.4 对高抗凝血活性结构和其抗凝血活性之间关系的研究	69
5.2 本论文的创新点	70
5.3 展望	70
参考文献	70
致 谢	76
作者简介	77

第一章 绪论

1.1 课题研究的目的是与意义

1.1.1 花生的种植及营养成分

花生有很多不同的种类，生育期分为 145 天和 120 天等。荚果有大有小，有大花生和小花生之分。花生的分布地广泛，在中国主要在中原地带和长江以南地带种植。花生分为花生果和花生仁，其中花生仁分为胚和种皮，脂肪和蛋白质主要处在于胚中。花生仁中脂肪、蛋白质、碳水化合物含量丰富，其中脂肪含量 50%左右、蛋白质含量 24%~36%、碳水化合物含量 10%~23%^[1]。花生是世界主要种植农作物之一，也是我国六大重要油料作物之一。作为花生的生产大国，我国的花生年产量在世界上首屈一指。作为非常重要的油料蛋白资源，花生蛋白在植物蛋白资源中居第三位,占有百分之十一的蛋白总量，很适合用作食用蛋白资源^[2]。

1.1.2 花生分离蛋白的分类构成和性质

在花生蛋白中，水溶性的蛋白有 15%，等电点为 4.6,盐溶蛋白为其蛋白主要成分，比例约为 85%,等电点为 5.2-6.5^[3]。Cherry 研究表明花生蛋白主要有花生球蛋白和伴花生球蛋白两种类型^[4]。大都认为这两种蛋白均为盐溶蛋白,花生球蛋白可以利用 40%饱和度的硫酸铵可制备,伴花生球蛋白可以选用 85%饱和度的硫酸铵可制备^[5]。花生蛋白可以根据其纯化程度分为花生蛋白粉（纯度低于 56%）、浓缩花生蛋白粉（纯度高于 65%）以及分离花生蛋白粉（纯度高于 85%），当然，也有人按脱脂程度来分：一般脱脂、半脱脂和全脱脂花生蛋白粉^[6]。花生蛋白作为功能性食品，能够有效的帮助患有糖尿病、高血压病、动脉硬化症以及肠胃病的病人恢复健康^[7]。

花生、花生分离蛋白、花生浓缩蛋白的氨基酸组成如下图所示^[8]

表 1 花生、花生分离蛋白、花生浓缩蛋白的氨基酸组成

氨基酸 Amino acids	花生	花生分离蛋白	花生浓缩蛋白	FAO/WHO
拉氨酸 Lysine	3.0	3.0	3.0	5.5
组氨酸 Histidine	2.3	2.4	2.4	-
精氨酸 Arginine	11.3	12.8	12.6	-
天门冬氨酸 Asparagine	14.1	12.3	12.5	-
苏氨酸 Threonine	2.5	2.5	2.5	4.0
丝氨酸 Serine	4.9	5.1	5.2	-
谷氨酸 Glutamicacid	19.9	21.4	20.7	-
脯氨酸 Proline	4.4	4.8	4.6	-
甘氨酸 Glycine	5.6	4.1	4.2	-
丙氨酸 Alanine	4.2	3.9	4.0	-
胱氨酸 Cystine	1.3	1.4	1.4	-
缬氨酸 Valine	4.5	4.4	4.5	5.0
蛋氨酸 Methionine	0.9	1.0	1.0	3.5
异亮氨酸 Isoleucine	4.1	3.6	3.4	4.0
亮氨酸 Leucine	6.7	6.6	6.7	7.0
酪氨酸 Tyrosine	4.1	4.3	4.4	-
苯丙氨酸 Phenylalanine	5.2	5.6	5.6	6.0
色氨酸 Tryptophan	1.0	1.0	1.0	1.0
化学评分 Chemical score	55	55	55	-

花生分离蛋白具有持水性、吸油性^[9]。持水性的用途：可以将其当做添加剂用在各种食品中，加在肉制品中能保持肉的湿度，嫩肉口感自然也就好；加到烘烤食品中，有助于其保留水分，从而使其柔软，进而保留原来风味。由于实验过程对样品粉碎不够彻底，以至于颗粒不均，使得花生分离蛋白的吸油性比较差，如果在生产中采用喷雾干燥方法来提高花生分离蛋白的组织状态，进而改善其相关的特性，增加其吸油性，可以促进脂肪结合和吸收，从而减少加工过程中时脂肪的损失，这样一来，可以使花生分离蛋白的性质也更稳定，从而得到更广泛

的应用。

花生蛋白的生理活性与大豆分离蛋白的非常相似，但却有着大豆蛋白不可比拟的优势。花生蛋白的棉子糖和水苏糖等各种不利于人体消化吸收的糖含量还不足大豆蛋白的六分之一，故花生蛋白的消化系数达高达 90%，不会产生食用大豆蛋白后常出现的腹胀、嗝气等不良反应。另外，花生蛋白的颜色洁白，非常容易溶解，可以添加到各种动植物食品中，用来改善食品品质、强化食品营养，且无任何副作用^[10]。

1.1.3 花生肽的结构性质和分离方法

利用用生物酶工程技术，选取特定的酶，对花生蛋白进行限制性水解，从而得到功能特性良好、生物活性比较高的小分子的肽，即为花生肽^[11]。花生肽是小分子质量的氨基酸聚合物。花生肽一般由 n 个氨基酸组成,当 $2 < n < 10$ 时,称为 n 肽,可统称为寡肽;当 $10 < n < 50$ 时, 统称为多肽^[12]。花生蛋白活性肽的氨基酸序列中一般有 3-6 个氨基酸，分子量多分布在 130-5000 Dalton，主要是低聚肽，且于 500--2000 Dalton 间呈正态分布。花生肽一般呈粉末状，不结块，无杂质或异味，有花生特有的清香气味。其水溶性和持水性皆很好，当 pH 为 2-10 的时候能够全部溶解。

花生肽的营养均衡，包含人体必需的 8 种氨基酸，其中含硫氨基酸的成分很多。花生肽的溶解性、稳定性都优于花生蛋白，可以在 pH2-10 的条件下完全溶解，吸水性和持水性都非常好，能够直接被小肠吸收，和成人体蛋白质和氨基酸，促进蛋白质活性基团发挥作用,表现出蛋白的生理功能迅速补充营养的同时增强免疫力^[13]。一般根据所需要的指标来选择要制备出来的肽。有很多常用的指标为不同的研究学者采用，比如:肽的含量、疏水性、水解度 DH、血管紧张素转化酶 ACE 抑制性、三氯乙酸可溶性氮法 TCA-NSI 和抗氧化性。本实验通过检测所制备的肽的抗凝血酶活性的高低来选择所需要花生肽。

作为和花生蛋白有着类似氨基酸聚合物的花生肽，可以用蛋白质含量的测定方法来测定花生肽含量。目前,关于花生肽含量测定方法，还没有统一标准规定。在测定花生肽含量的过程中，高分子蛋白质都会对肽含量产生严重干扰,必须在测肽含量之前将蛋白其除去。除去花生蛋白常用沉淀法-分为化学和物理法。

化学法中主要用酸、碱、盐和有机溶剂等四类化学试剂。加热沉淀法是常用的物理方法^[14]。

肽的分离纯化的方法有很多种，比如，等电点沉淀，大孔树脂、电泳、超滤、透析袋透析、凝胶过滤层析、反相高效液相色谱等^[15]。其中，反相高效液相色谱（RP-HPLC）和制备液相色谱仪是多肽精细分离的常用手段。

1.1.4 花生肽的开发应用

早在几千年前，花生就被人们誉为长生果^[20]。有着非常吉祥的象征。目前已经有研究发现：花生肽具有抗氧化^[16]、防止高血压、促进生长、增强免疫力和不易致敏的功能活性，其中抗氧化性是花生短肽其它生理功能的基础^[17]。如果将抗氧化花生肽分离纯化出来，也许会从中发现由治疗自由基引发疾病的药物或保健食品^[18]。基于以上花生肽已知的多种活性，花生肽成为新型功能性食品越来越受到人们的关注^[19]。关于对花生肽进行定性定量检测的标准方法需要我们继续研究探讨。花生肽可以不经花生蛋白肽的生产是花生深加工产品，具有良好的风味和持水性，其中含有人体所必需的 8 种氨基酸，尤其是硫氨基酸的含量相当高。花生除了不含胆固醇之外，还有着与人体非常接近的氨基酸组成，非常有利于人体的吸收。具备多种生理功效：增强体力、增加免疫力、防止血压升高、加速脂肪代谢、延年益寿等^[19]。

我们可以在对花生肽的不同功能活性进行了解后，开发出具有各种生理功能活性的花生活性肽保健食品。花生肽凭借其不需要消化直接被小肠吸收，进入人体循环系统的优势，能够在人体内发挥其相应重要功能。所以，作为我国的主要农作物之一的花生，如果能够被生产出高抗凝血活性的花生活性肽产品，其应用前景是非常广阔的。

1.1.5 抗凝血活性肽的应用市场

血栓是指血液成分在血液流动过程中，在心血管系统血管内面剥落处或修补处的表面所形成的一种半凝块状物质^[21]。血栓性疾病包括动脉血栓形成、静脉血栓形成、毛细血管性血栓形成、血栓栓塞性疾病等，其发病率高居各种疾病之首，严重危害人类生命健康^[21]。

临床上的抗凝血药物的抗凝血效果主要通过对凝血酶及其他凝血因子的抑制而实现的。根据药物对凝血酶作用方式分为间接抑制和直接抑制两种方式，间接凝血酶抑制剂是通过抑制凝血酶的产生起到抑制作用或通过“介质”抑制凝血酶活性，直接凝血酶抑制剂是直接参与和凝血酶作用，改变凝血酶的功能特性^[21]。

近年来，随着新的抗血栓形成、抑制血小板活性和溶解血栓的药物以及相应的研究不断出现，将具有抗凝血效果的生物活性肽用于预防血栓形成、溶栓治疗具有广阔的应用前景。来源于食品原料的抗凝血活性肽，因其可以被人体消化和吸收，能有效地进入凝血系统，进而发挥作用。而且，这些活性肽可以进一步被人体降解，在体内的半衰期较短，不会在体内积存，具有较高的安全性。研究花生蛋白酶解物的抗凝血活性，开发出具有抗凝血活性的功能多肽，应用到保健食品和药品中，将会带来很好的经济效益和社会效益。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 花生蛋白的精深加工和应用前景

在对外贸易中,主要出口的是花生的初级加工产品, 约占出口总额的 92.7%,而精深加工产品仅占了 7.3%。但是,能带来较大利润的却是精深加工产品 ,花生经过精深加工可增值 2-10 倍,而经过初级加工仅可增值 0.5-1.0 倍^[22]。

由此,我们可以发现对花生蛋白的精深加工有很大的市场潜力和研究价值,应该受到我们越来越多的关注。很多研究机构发现通过对花生蛋白的精深加工可以开发出具有高蛋白、减肥功能的花生蛋白食品。日本和美国在对花生分离蛋白技术的研究上已经有了很深的造诣, 在世界上首屈一指。他们生产出的很多产品都在乳制品、肉制品、焙烤食品以及其它保健食品诸多行业有广泛应用。

提取花生蛋白的方法有很多种, 目前主要分为冷榨法、浸出法、酸沉法、传统的碱溶酸沉法、水剂法以及膜分离技术等^[46]。刘丽华^[23]《花生蛋白水解工艺的优化及水解产物分子量分布的研究》发现:用碱性蛋白酶在加酶量 75AU/kg、水解温度 45℃、pH7.7、水解时间 2.5 小时的条件下水解花生蛋白, 可以得到高达 84.73%的 1000 道尔顿以下的肽分子组分。封小龙^[23]选择用低温冷沉法分离花生球蛋白和伴花生球蛋白, 通过转谷氨酰胺酶(TG 酶) 交联技术, 使得花生蛋白组分的凝胶性有了很大的改善,

并将其应用于肉制品香肠中，同时，对改性前后花生蛋白组分的物化和结构特性进行了分析和比较，揭示出了 TG 酶改性花生蛋白组分的机理。赵晓燕^[25]等对花生蛋白的研究进展和开发利用现状做了综述，目前的花生蛋白产品主要有花生蛋白粉，生产方法为：压榨、浸出、水剂和膜分离法；花生浓缩蛋白；花生分离蛋白，生产方法有：碱提酸沉法、超滤膜法；花生组织蛋白；花生肽，多肽的生产方法主要有两种：人工合成、蛋白质体外水解。而合成法成本太过于昂贵，应用较少。水解蛋白质来制备肽的方法主要有 3 种：酸水解、碱水解以及酶法水解，其中用作研究最为广泛的是酶法水解。

花生蛋白具有一定功能特性能对食品的特定功能和口味等产生一定的影响，这些主要是由花生蛋白的化学性质和物理性质所决定的。花生蛋白的功能性质既和本身的氨基酸组成，肽链的结构有关又和周围环境比如温度、pH 等有关^[26]。花生蛋白的改性主要是为了满足人们工业生产的需要，从而拓宽其应用领域，主要有物理改性、化学改性、生物改性三种改性方法。将花生蛋白的改性后，其原有的抗乳化性、保湿性、成膜性、抗氧化性及持水性等诸多性能皆得到了提高，使其表现出天然植物蛋白不能体现出来或不能满足生产需要的功能，因此其应用前景可观^[25]。

1.2.2 花生肽的多功能性研究

目前所有短肽主要是通过酸或碱水解、酶法水解、固态发酵等方法制备。花生肽一般是花生蛋白经过水解作用后，再经特殊处理得到的产物，由氨基酸聚合而成，一般相对分子质量比花生蛋白小。每种方法都有各自的优缺点，根据不同的目的选择相应的方法。比如：酸碱水解蛋白质由于反应条件剧烈，会对部分氨基酸造成破坏，或引起氨基酸的外消旋化，或产生氯代丙醇类有害物质，在实验室和实际生产中很少用到。选择适宜的蛋白酶是酶法制备花生肽的关键因素。蛋白酶种类甚多，花生肽的制备有五大酶的来源：植物蛋白酶，动物蛋白酶，细菌蛋白酶，真菌蛋白酶，多酶协同等方法来制备花生肽。

早在十九世纪的二、三十年代，有报道短肽可不经消化被完整吸收进入血液的相关研究^[27]。但是人们还是认为游离氨基酸才是蛋白质的主要吸收形式，后来小肽能够在肠胃中被吸收的证明越来越多，人们才开始越来越重视小肽的生理作用。生物活性肽的吸收机制有六大主要特点：(1)有 10%吸收 (2)不经过消化，直接被吸收(3)主动

吸收(4)吸收时,不需消耗能量,故而不会增加人体胃肠功能负担(5)能够作为载体帮助其他氨基酸的吸收 (6)快速吸收^[28]。

目前有很多关于短肽功能活性的研究。功能性短肽除了其吸收机制优胜于氨基酸之外,还具有很多氨基酸所不具有的功能特性。越来越多的实验证明,短肽具有降低高血压、防止氧化、改善加强元素吸收和矿物质的运输、抗疲劳、对肝损伤有治疗作用、激素作用、免疫调节、抗血栓、降胆固醇、抑制细菌、病毒和抗癌作用、促进生长等诸多功能活性^[29]。

成静等^[30]所用口服液为用花生肽和蒲公英提取物制备而成,研究其对小鼠的急性毒理和对肝的保护功能,实验结果显示口服液无毒,复方花生肽口服液可以辅助保护CCl₄所导致的肝损伤,且明显比单一花生肽或者蒲公英提取物的保护效果好。彭维兵等^[31]关于体外花生肽的抗氧化活性做了相关研究,实验结果证明了花生肽对DPPH自由基具有较好的清除能力和一定的还原能力。

关于对花生肽含量的定量检测,还没有统一的方法。实验中主要用双缩脲法、氨基酸分析仪测定法、凯氏定氮、紫外分光光度等方法进行检测。其中双缩脲法是最应用最广泛的方法,只要实验过程中确定标准曲线的准确性,一般实验结果都很准确,所以,这一步非常重要。现在的研究中酪蛋白作为标准品。紫外分光光度法使用很少,主要是其干扰因素多。虽然凯氏定氮法在测定过程中干扰因素少,但是牵涉到肽的转换系数和蛋白的转换系数是否相同,不同的样品,测定情况不一样,对影响测定结果的准确性的影响极其重要关键^[32]。

活性炭吸附、膜分离、凝胶过滤色谱(GFC)、HPLC和联用技术等现代分离技术是当前用于花生肽分离纯化的诸多方法^[33]。综合考虑各种因素,HPLC和联用技术是当下效果较好的分离技术。

1.2.3 抗凝血活性肽探究与分析

凝血是机体重要的生理防御过程,当凝血机能“亢进”时,即凝血过度,易形成血栓。血栓有引起严重疾病的危险,例如肺栓塞、脑血栓、心肌梗塞、视网膜动静脉阻塞和四肢及周围血管栓塞等。药物治疗在血栓防治过程中起着重要的作用。

目前,已经发现许多具有显著的抗凝血活性的肽类化合物,也已经鉴定得到了部

分活性肽的结构。天然水蛭素（氨基酸序列见表 2）由 65~66 个氨基酸残基组成，相对分子质量约为 7000Da；水蛭素可以阻止凝血酶将纤维蛋白原分解为纤维蛋白单体，从而抑制纤维蛋白单体的凝结^[34]。采采蝇凝血酶抑制剂（氨基酸序列见表 2）是从采采蝇的唾液腺提取物中分离得到的，相对分子质量约为 3530Da；比较 N-端氨基酸的顺序，发现其与已经鉴定过得到的丝氨酸蛋白酶抑制剂和其他天然抗凝剂没有同源性^[35]。

田垒等^[36]用固相合成，将不同疏水性的氨基酸添加在蛇毒抗凝血活性三肽（Pyr-Asn-Trp，其中 Pyr 为焦谷氨酸）的 C 末端上，得到 Pyr-Asn-Trp-Leu，Pyr-Asn-Trp-Phe，Pyr-Asn-Trp-Tyr 和 Pyr-Asn-Trp-Ser，实验表明在抗凝肽的 C-端添加上疏水性越强的氨基酸，其抗凝血效果得到提高。

表 2 部分食物源抗凝血活性肽的氨基酸序列

蛋白源	原料处理	氨基酸序列	参考文献
牛酪乳蛋白	<i>Lactobacillus casei</i> Shiota 发酵	Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val; Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg; Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val	[40]
	Bacillus licheniformis NH1 酶解	Leu-Cys-Arg; His-Cys-Phe; Cys-Leu-Cys-Arg; Leu-Cys-Arg-Arg	
虾虎鱼肉蛋白			[41]
蛋清蛋白	Protease N 酶解	Leu-Ser-Tyr-Arg-Asn; Asn-Leu-Tyr-Arg-Asn; Tyr-Arg-Gly-Tyr; Leu-Tyr-Arg-Pro-Ser; His-Ala-Gly-Leu-Gly-Asn; Tyr-Gly-Leu-Arg; Val-Tyr-Arg-Glu-Glu; Phe-Arg-Val-Lys; Leu-Leu-Ala-Lys-Ala-Tyr; Val-Arg-Tyr-Pro; Val-Pro-Ser-Met-Pro-Arg; Leu-Phe-Arg-Pro; Val-Tyr-Leu-Pro-Arg; Lys-Tyr-Gly-Asn-Trp; Lys-Leu-Lys-Thr-Ser-Thr-Gly-Lys-Pro-Asp-Val-Gly-Pro; Asp-Gly-Gly-Trp-Asn-Thr-Arg-Gly-Pro-Ala-Ala-Pro-Val-Gly	[42]

QianZ.Y 等^[37]研究发现来自绵羊 κ-酪蛋白的糖肽能够减少凝血酶引起的血小板聚合，并呈显著的量效关系。杨万根^[43]等利用 Alcalase 2.4L 和 Protease N 水解蛋清蛋白，结果表明 Protease N 蛋白酶的酶解物抗凝血活性要高于 Alcalase2.4L 酶解物，且在水解度为 15% 时活性最高，并得到了 17 个富含疏水氨基酸和碱性氨基酸的多肽的

氨基酸序列。刘静波^[38-39]以蛋清粉为原料采用 Alcalase 碱性蛋白酶制备食源性抗凝血肽,优化了酶解工艺和蛋清源凝血酶抑制肽的纯化工艺。Rebeca 等^[46]利用 *Lactobacillus casei* Shirota 和 *Streptococcus thermophilus* 发酵牛酪乳蛋白,研究发现只有 *Lactobacillus casei* Shirota 发酵产物具有抗凝血活性。Rim Nasri^[47]等利用多种蛋白酶水解虾虎鱼肉蛋白,其中 *Bacillus licheniformis* NH1 酶解产物具有最高抗凝血活性。表 3 列举了部分已知氨基酸序列的食物源抗凝血活性肽。

1.3 本课题的主要研究内容和研究目的

本课题针对花生蛋白的利用率不高、产品附加值低等问题,通过酶法制备获得具有抑制凝血酶活性的花生肽,并通过多步色谱纯化结合质谱分析鉴定出高抗凝活性花生肽的一级结构。

1.3.1 花生抗凝血活性肽酶法制备工艺的研究

水解之前用碱提酸沉法制得的花生蛋白,通过比较多种酶制剂酶解产物的抗凝抗凝血活性,得到制备抗凝血活性肽的最优方法,确定其加酶量、温度、pH 等条件。

1.3.2 高抗凝血活性花生肽的分离纯化与制备

先用制备液相色谱仪优化分离方法,进行大量分离收集,选择收集出具有高抗凝血酶活性的花生肽组分;再用半制备高效液相色谱优化分离出具有更高抗凝血酶活性的花生肽组分。

1.3.4 花生肽一级结构的鉴定

通过液质联用测定高抗凝血活性花生肽组分的一级结构,分析花生肽结构及其对其抗凝血酶活性的影响。

第二章 花生抗凝血肽的酶法制备工艺

2.1 引言

大分子的蛋白质被蛋白酶水解成小分子肽类和游离氨基酸，其中肽比氨基酸有着更易被人体消化吸收的吸收机制。花生蛋白含有人体必需的八种氨基酸，氨基酸比例合理，水解后得到的花生肽更易于人体消化吸收，具有更高的营养价值。花生肽已被证实有很多功能活性。

本章先测定比较了通过碱提酸沉得到的花生蛋白和蛋白水解物的抗凝血酶活性。通过抗凝血活性的比较，筛选出最优的蛋白酶。再以抗凝血酶活性为指标对最优蛋白酶的水解条件进行优化，得到最能水解出最高抗凝血活性水解物的水解条件。

2.2 实验材料与设备

2.2.1 实验材料

花生：市售

花生分离蛋白（脱红衣和不脱红衣）：实验室自制。

大豆分离蛋白：市售

碱性蛋白酶 2709：北京东华强盛生物科技有限公司，厂家推荐最适条件：温度 60℃、pH8.5。

Alcalase 2.4L：诺维信（中国）生物科技有限公司，厂家推荐最适条件：温度 50℃、pH8.5。

Protex 6L：杰能科（无锡）生物工程有限公司，厂家推荐最适条件：60℃、pH8.5。

凝血酶：索莱宝（北京）生物科技有限公司。

纤维蛋白原：Sigma 公司。

酪蛋白：北京索莱宝生物科技有限公司。

L-酪氨酸：北京索莱宝生物科技有限公司。

其他试剂均为分析纯。

2.2.2 实验仪器与设备

PHS-3C 精密 pH 计	上海大浦仪器有限公司
DHG-9076 电热恒温鼓风干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
FW-200 高速万能粉碎机	北京中兴伟业仪器有限公司
HH-S 型恒温水浴锅	金坛市华峰仪器有限公司
DW-2 增力无极恒速搅拌器	巩义市予华仪器有限责任公司
TD5-4B 离心机	北京时代北利离心机有限公司
BS-210C 电子天平	北京赛多利斯天平有限公司
722S 型分光光度计	上海精密科学仪器有限公司
IGJ-10C 冷冻干燥机	北京四环科学仪器厂
MDF-U460BR 速冻箱	日本三洋公司
FC 型酶标仪	赛默飞世儿仪器有限公司
凯氏定氮仪 KDN-1	上海仪电科学仪器股份有限公司
消解炉 KDN-20	上海仪电科学仪器股份有限公司
SD2 制备液相色谱仪	安捷伦科技（中国）有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 水分含量测定

105℃烘箱法，参照 GB/T5009.3-2003。

2.3.2 粗蛋白含量测定

微量凯氏定氮法，参照 GB/T5009.5-2003。

2.3.3 粗脂肪含量测定

索氏抽提法，参照 GB/T5009.6-2003。

2.3.4 蛋白酶活力的测定

福林法，参照 GB/T 23527-2009 《蛋白酶制剂》。

2.3.5 蛋白质水解度测定

pH-stat 法是根据水解过程中释放的质子而测定蛋白质水解度的。在花生蛋白质水解过程中记录不同时刻为维持反应体系 pH 恒定而消耗的碱，根据消耗的碱的量可按式 (1.1、1.2、1.3) [43] 计算出蛋白质的水解度。

$$DH = \frac{CV}{amh} * 100\% \quad (1.1)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_a}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (1.2)$$

$$pK_a = 7.8 + \frac{298 - T}{298 * T} * 2400 \quad (1.3)$$

其中字母分别代表：

V : NaOH 溶液消耗体积, mL;

C : NaOH 溶液浓度, mol/L;

m : 花生蛋白样品中蛋白质质量, g;

h : 每克原料蛋白质中肽键的毫摩尔数, $h=7.8\text{mmol/g}$ [4];

T : 实验温度, K。

2.3.6 花生蛋白及其水解物抗凝血活性测定

采用酶标仪法[44,43]测定花生蛋白水解物的凝血酶抑制率。将恒温培养箱的温度设定为 37℃, 酶标仪的测定波长设定为 405nm。纤维蛋白原溶液和凝血酶溶液均用 Tris-HCl 缓冲液 (0.05mol/L, pH7.2) 溶解配制。测定步骤: (1) 往酶标板的小孔中加入 0.1% (w/v) 纤维蛋白原溶液 140 μL, 再加入 40 μL 待测的样品溶液, 混匀后读数 (ASB), (2) 加入 10 μL 凝血酶溶液 (12U/mL) 开始反应, 在 37℃ 的恒温培养箱中培养 10min 后, 用酶标仪测定其读数 (AS), (3) 取 40 μL Tris-HCl 缓冲液代替样品溶液, 其它操作同样品管, 测得吸光值 (ACB 和 AC), (4) 按下式 (1.4) [3,7] 计算花生蛋白酶解液抑制凝血酶将纤维蛋白原催化形成纤维蛋白的能力,

$$\text{抑制率} = \frac{[A_C - A_{CB}] - [A_S - A_{SB}]}{A_C - A_{CB}} * 100\%$$

2.3.7 花生分离蛋白的制备

本课题参照刘向军^[45]制备花生蛋白的方法。用万能粉碎机粉碎花生，向蒸馏水中加入粉碎后的花生，使其料液比为 1: 12，将温度设定为 50℃，pH 调为 9.5，将其搅拌 120min，为保持 pH 稳定，期间调整 pH 一次。之后在 3700r/min 条件下离心上一步的搅拌品，时间为 15min，舍弃下面的沉淀，用 1.5mol/L 的 HCL 将上清液的 pH 调节为 4.5，然后在 4℃ 的冰箱中放置 2h，放置后的液体在 3700r/min 的条件下离心 15min，舍弃上清液，用蒸馏水将下面的沉淀复容，复容后的溶液在 -50℃ 条件下冻结实后在冷冻干燥机中干燥。用福林酚法^[47]测定冻干后产品的蛋白质含量 83.1%。

2.3.8 Acalase2.4L 酶解工艺优化单因素实验设计

2.3.8.1 pH 对酶解物凝血酶抑制率的影响

配制底物浓度 50mg/mL 的花生蛋白溶液，使其在温度为 55℃，加酶量为 4000u/g，pH 分别为 8、8.5、9、9.5 的条件下进行水解（pH 过低或者过高可能会对之后测抗凝血酶活性的时候，影响凝血酶对纤维蛋白原的催化作用），酶解过程中用 0.1mol/mL 的 NaOH 维持 pH 恒定，反应时间为 1.5h，反应结束后，测定产物的抗凝血酶活性，通过计算得到温度对花生蛋白水解物的凝血酶抑制率的影响。

2.3.8.2 时间对酶解物凝血酶抑制率的影响

配制底物浓度 50mg/mL 的花生蛋白溶液，使其在温度为 55℃，加酶量为 4000u/g，pH 为 8.5 的条件下进行水解，水解时间分别为 0.5h，1h，1.5h，2h，2.5h，酶解过程中加入 0.1mol/LNaOH 维持 pH 恒定，反应结束后测定反应产物的抗凝血酶活性，通过计算得到水解时间对花生蛋白水解物抗凝血酶活性的影响。

2.3.8.3 时间对酶解物凝血酶抑制率的影响

配制底物浓度 50mg/mL 的花生蛋白溶液，使其在温度为 55℃，pH 为 8.5，加酶量分别为 3000u/g、4000u/g、5000u/g、6000u/g、7000u/g 的条件下水解 1.5h，反应过程中加入 0.1mol/LNaOH 维持 pH 恒定，反应结束后测定反应产物的抗凝血酶活性，通过计算得到加酶量对花生蛋白水解物抗凝血酶活性的影响。

2.3.9 数据统计与处理

用 Design-Expert.8.05b 和 Orign8.0 进行数据的处理和分析。

2.4 结果与讨论

2.4.1 不同来源蛋白质抗凝血酶活性的比较

已知大豆蛋白具有一定的抗凝血活性，而花生红衣里面含有的维生素 K 具有一定的促凝效果，需要对脱红衣和不脱红衣的花生制备的蛋白抗凝血活性进行比较，因此，选择以上三种蛋白质来研究和比较其抗凝血活性。

通过对三种蛋白抗凝血活性的比较发现，三种蛋白都有一定的抗凝血活性，但抗凝血活性均较差（最高仅为 16.2%）。不脱皮和脱皮的花生蛋白在低浓度的时候抗凝血活性均相对大豆蛋白较高，不脱皮的花生较脱皮的花生抗凝血活性略高，说明花生红衣里面的维生素 K 对花生蛋白的抗凝血活性没有显著影响。为进一步提高不脱皮花生制备蛋白的抗凝血活性，选择不同商品酶制剂对其进行酶解。

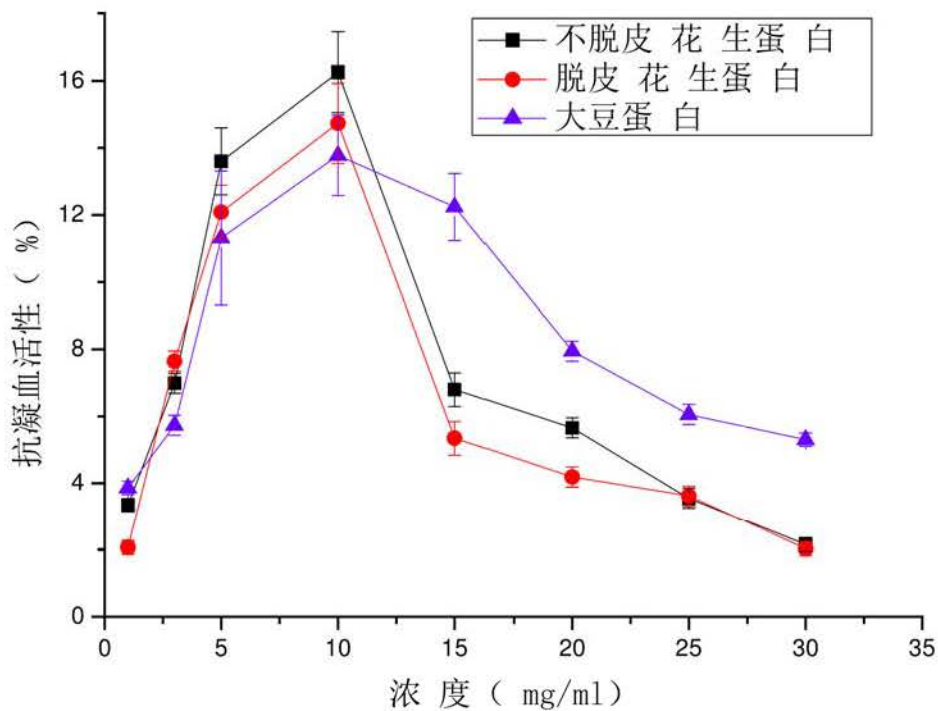


图 1 三种蛋白的抗凝血活性比较

2.4.2 商品蛋白酶活力的测定

以酪氨酸浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 680nm 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线(见图 3), 其方程为: $y=0.0089x+0.0063$ ($R^2=0.9990$)。

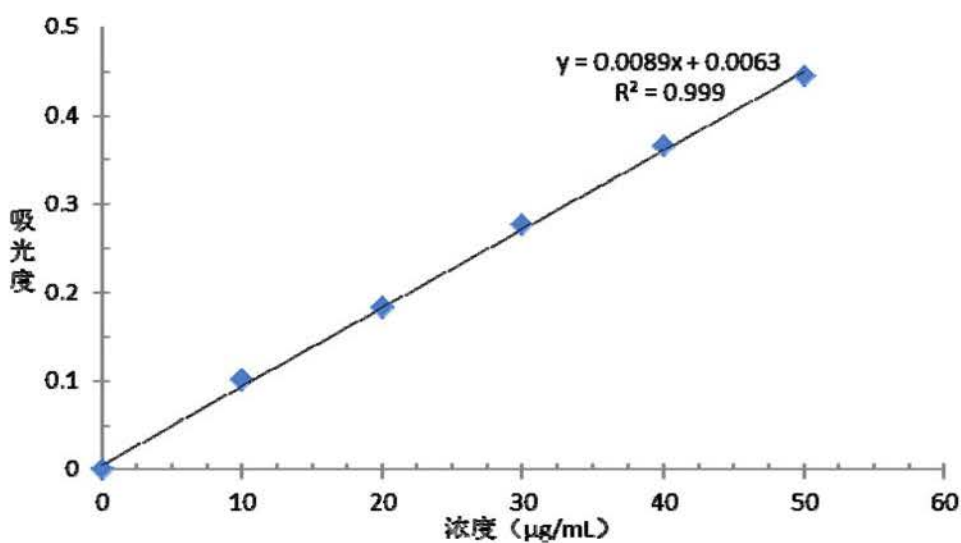


图 2 酪氨酸溶液标准曲线

研究发现, 碱性蛋白酶水解花生蛋白得到的花生肽的水解度(DH) 和羟自由基清除率^[49] 均比中性蛋白酶和酸性蛋白酶的高, 故而水解植物蛋白时使用碱性蛋白酶更合适, 原因可能与在碱性体系中花生蛋白的溶解性更好有关。本实验拟采用的三种碱性蛋白酶活力的测定结果见下表:

表 3 酶活力测定结果

蛋白酶	酶活力
Alcalase2.4L	$1.8 \times 10^5 \text{U/mL}$
2709 碱性蛋白酶	$2.1 \times 10^5 \text{U/g}$
Protex 6L	$1.2 \times 10^5 \text{U/mL}$

2.4.3.不同碱性蛋白酶对花生蛋白水解度的影响

采用不同碱性蛋白酶在各自最适条件下酶解花生蛋白（底物浓度为 3.0g/100mL；酶添加量为 5000U/(g 蛋白)），其水解度随时间变化关系如图 3 所示。

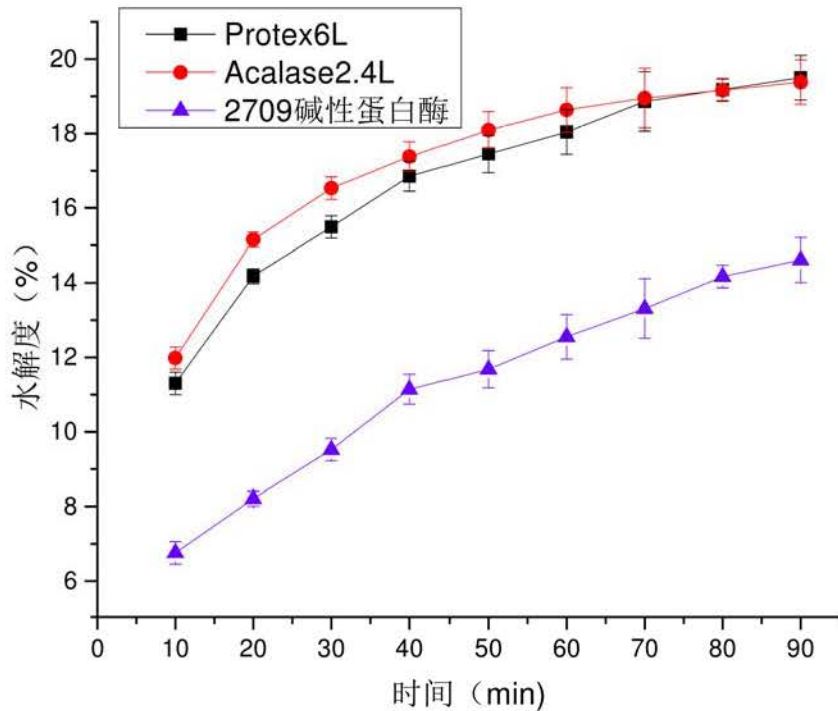


图 3 不同蛋白酶酶解花生蛋白的水解度随时间变化

由图 3 可知，尽管所用蛋白酶的种类不同，但都符合典型的酶解反应进程曲线。Alcalase2.4L 和 protex6L 在反应最初的 20min 显示了最大的水解速率；碱性蛋白酶在 40 分钟的时候也显示除了其最大的水解度。随着反应时间的延长，水解度变化都有不同程度的持续减缓，这主要是由于在反应的最初阶段，蛋白酶可断裂的肽键数目较多，敏感性肽键断裂相对较快，导致水解速度非常快；但是随着酶解反应的进行，可供水解的肽键不断减少，还未水解的肽键相对不太敏感，蛋白酶的催化作用趋于完全，水解速度明显下降。

结果显示：尽管反应体系中加入酶活力的量是相同的，但是不同种类的碱性蛋白酶对花生蛋白水解度的影响也有显著差别。Alcalase 2.4L、Protex 6L 的水解度明显高于 2709 碱性蛋白酶，其中，在相同时间内 Alcalase 2.4L 的水解度最高。在接下来的试验中采用 Alcalase 2.4L 来制备花生肽。

2.4.4 不同蛋白酶对花生蛋白水解物抗凝血活性的影响

用不同蛋白酶酶解花生蛋白，在不同的水解度的条件下酶解液的凝血酶抑制率如

图 3 所示。图 4 为相同一时间 (1.5h) 条件下不同蛋白酶在底物浓度均为 50mg/mL 时，酶解液的抗凝血活性和空白 (不加蛋白酶，其余条件相同) 对照。

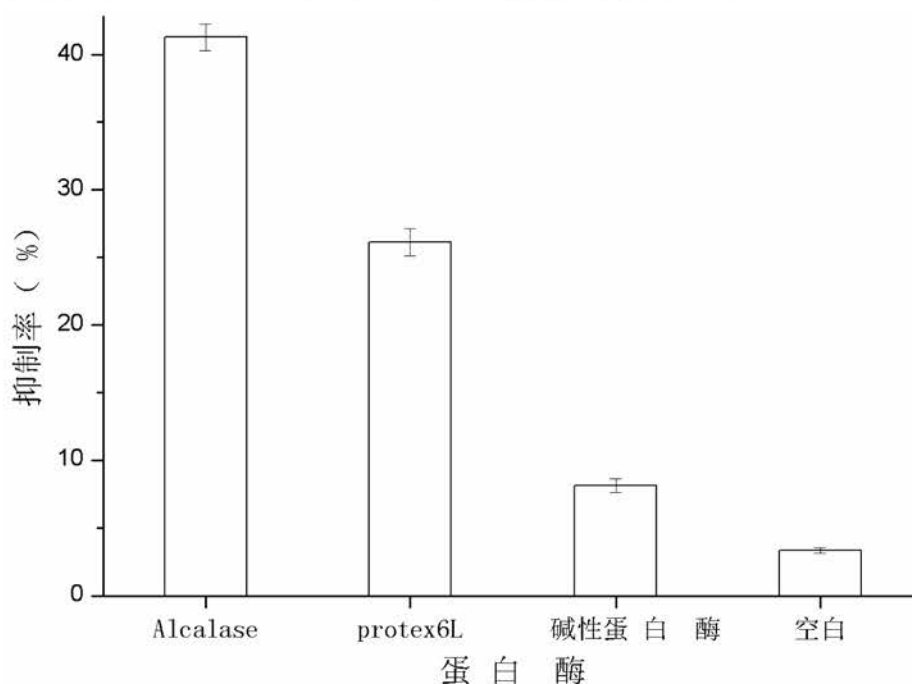


图 4 不同花生蛋白酶酶解液在相同水解时间条件下的的凝血酶抑制率

图 4 中实验结果显示：花生蛋白水解物的抗凝血活性明显要比花生蛋白的抗凝血活性高，可以预见，酶解液中存在可以抑制凝血酶催化纤维蛋白原反应的产物，这说明起抗凝血活性作用的主要是花生肽，或者是水解之后能使更多抑制凝血酶活性的化学键暴露出来。为此，可以分析不同酶种的水解物的抗凝血活性，选出能水解出高活性花生蛋白水解物的蛋白酶，用来对花生蛋白进一步水解。

由图 5 可知，不同蛋白酶的酶解液对凝血酶的抑制率也有所区别，其中 Alcalase 2.4L 水解产物的抑制率最高，在水解度为 6 的时候能够达到 70%左右。尽管 Protex 6L 和 Alcalase 2.4L 酶解液的水解度都可以达到 19%左右，但前者的凝血酶不同水解度阶段的凝血酶抑制率却均较低。同时，也可发现，水解度高的酶解物的抗凝血酶活性并不一定高。

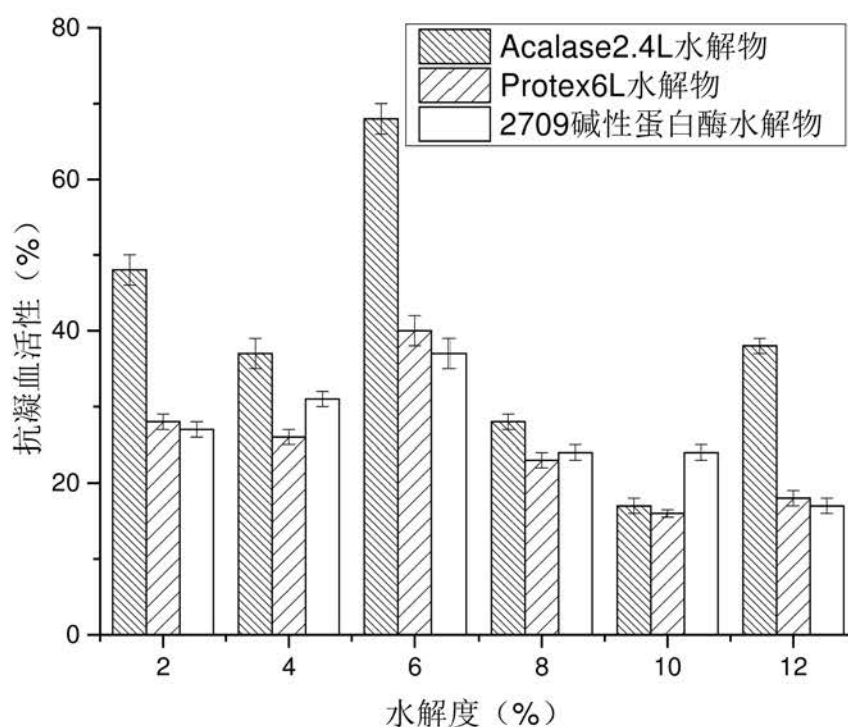


图 5 不同水解度下不同花生蛋白酶酶解液的凝血酶抑制率

Alcalase 2.4L 酶酶解花生蛋白在不同水解度下的凝血酶抑制率有所区别，但是并没有随水解度的变化表现出明显的规律性。这说明了花生蛋白酶解液的凝血酶抑制率和花生蛋白质水解度没有必然的联系。实际上，水解度较低时，蛋白水解不完全，可能会导致部分抗凝血活性较强的多肽不能被水解出来；而过度水解可能会导致部分抗凝血活性较强的多肽被水解为寡肽，造成了抗凝血活性的削弱。因此不能简单地认为花生蛋白水解度越大，抗凝血活性越强。

分析以上两种现象的原因，可能是对于同一种底物，不同蛋白酶的酶切位点差异较大，造成不同蛋白酶同一底物水解产物的抗凝血活性也显著不同。而同一种蛋白酶酶解花生蛋白时，虽然酶切位点有专一性，但是酶解后的肽链的长度是随机的，造成酶解产生具有抗凝血活性的肽的数目和种类以及出现时间也是随机的。本实验选取 Alcalase 2.4L 制备花生凝血酶抑制肽，并进一步对其酶解工艺进行优化。

2.4.5 Acalase2.4L 酶解工艺优化

2.4.5.1 单因素实验

(1) pH 对花生蛋白质凝血酶抑制率的影响

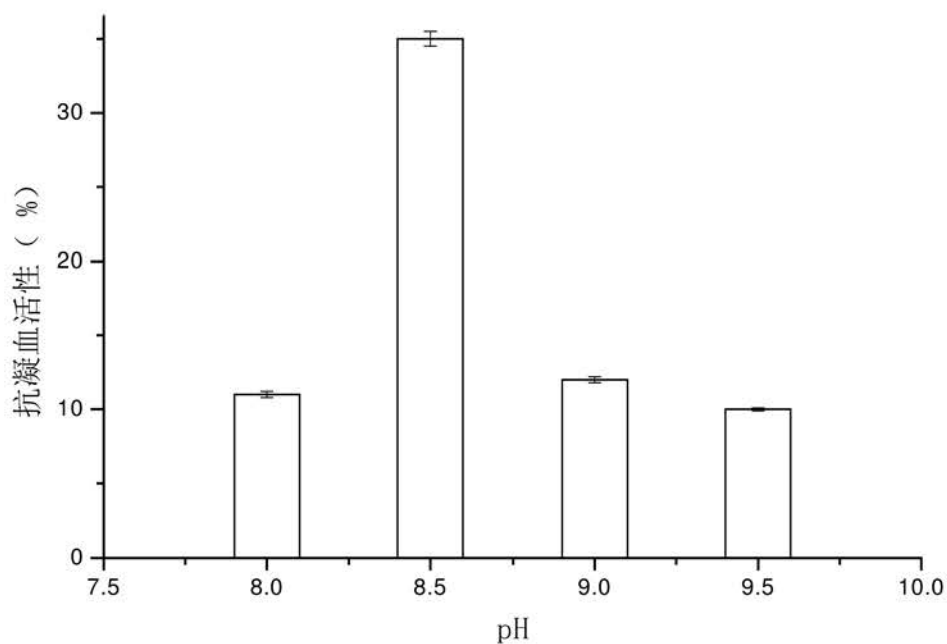


图 6 pH 对花生蛋白酶解物凝血酶抑制率的影响

从图 6 可以看出，在 pH=8.5 的条件下水解的花生蛋白的酶解物的抗凝血酶活性最高。酶活性中心上面的必须基团，随着 pH 的变化而变化，因此，酶的活性对反应过程中环境的 pH 非常敏感，其活性部位只有与蛋白酶处在一定空间构象的时候才能存在，才能实现催化功能，其解离状态随 pH 值的变化而变化，抗凝血活性也会有所不同。

(2) 水解时间对花生蛋白质水解度和凝血酶抑制率的影响

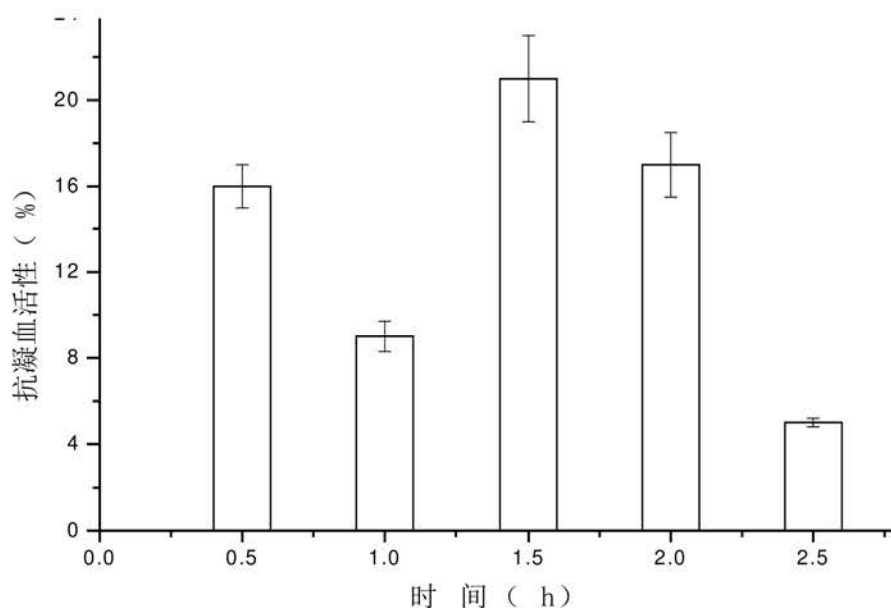


图 7 水解时间对花生蛋白水解度和凝血酶抑制率的影响

由图 79 可知，酶解物的抗凝血酶活性在 1.5h 之前随反应时间的变化没有一定的规律性，在反应时间为 1.5h 的时候酶解物的抗凝血酶活性最高，之后随着反应时间的延长，抗凝血酶活性明显降低，在反应时间为 2.5h 的时候抗凝血活性极其低。这是因为，花生蛋白在较低的水解度时候，蛋白水解不完全，可能会导 m 致部分抗凝血活性较强的多肽不能被水解出来；而如果过度水解的话，部分抗凝血活性较强的肽可能会被水解为没有抗凝血活性的寡肽，造成了花生蛋白酶解物整体抗凝血活性的降低。

(3) 加酶量对花生蛋白质水解度和凝血酶抑制率的影响

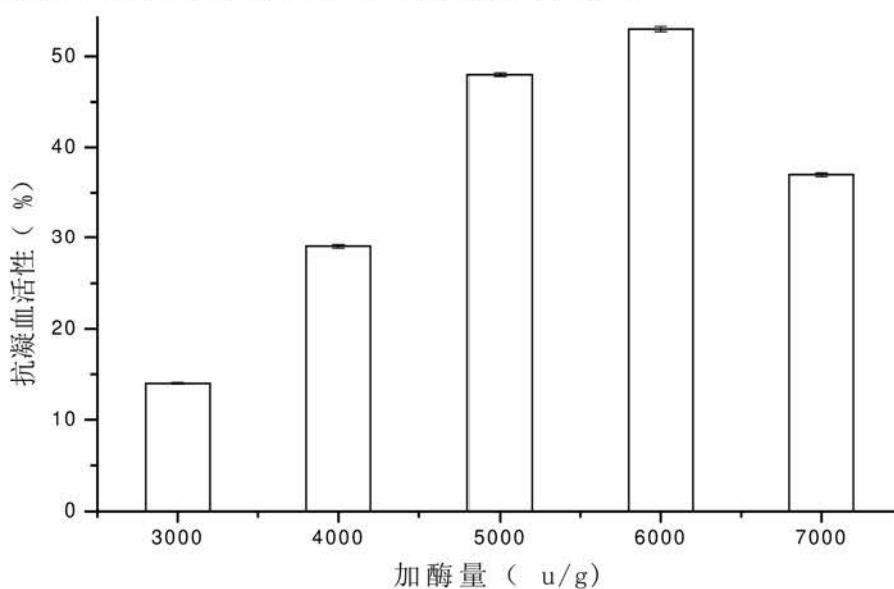


图 8 加酶量对花生蛋白水解度和凝血酶抑制率的影响

由图 8 可知，在本实验的设定范围内，酶解物的抗凝血酶活性随着加酶量的增加，

先增加后降低，在加酶量为 6000u/g 的时候，花生蛋白酶解物的抗凝血酶活性达到最大，加酶量超过 6000u/g 的时候，其抗凝血酶活性又呈现下降的趋势。

由于底物的水解度会随着加酶量的增加而不段的增加，当蛋白酶分子在整个体系中浓度趋于饱和的时候，有些蛋白酶的酶分子和底物接触不到，水解度增加的幅度就会降低。随着水解度的增加，花生蛋白水解物相对分子质量分布范围就越小，因较高的抗凝血酶活性肽和化学键只在一定分子质量范围之内的肽链中产生，水解不足或者过度水解会造成花生蛋白水解物抗凝血酶活降低。

2.4.5.2 Acalase2.4L 水解花生蛋白制备抗凝血活性肽的响应面实验结果

表 4 响应面优化水解实验因素水平编码表

水平	因素		
	X ₁ 酶解 pH	X ₂ 时间 (h)	X ₃ 加酶量 (u/g)
-1	8	1	5000
0	8.5	1.5	6000
1	9	2	7000

为了获得抗凝血酶活性较高的花生多肽，在以上三个单因素水平实验基础上，以加酶量、pH、反应时间为单因素，以花生分离蛋白酶解物的抗凝血酶活性为响应值，设计 3 因素 3 水平的二次回归方程来拟合加酶量、pH、反应时间和酶解物抗凝血酶活性之间的函数关系，采取响应面分析法(ResponseSurface Analysis, RSA) 分析实验结果，做出最优选择。表 4 为试验的因素水平设计， 表 5 为本设计实验的结果。

表 5 响应面设计以及实验结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	抑制率(%)
1	0	0	0	63.15±4.96
2	-1	0	1	43.45±4.36
3	0	-1	-1	52.88±0.72
4	1	1	0	69.47±1.61
5	0	-1	1	44.77±6.43
6	0	0	0	53.54±4.55
7	1	-1	0	50.48±3.09
8	0	0	0	56.55±1.24
9	0	0	0	58.25±2.47
10	0	0	0	51.98±4.70
11	-1	0	-1	48.30±1.44
12	0	1	-1	86.72±4.91
13	1	0	-1	84.17±1.49
14	0	1	1	61.57±0.93
15	-1	-1	0	46.75±0.63
16	-1	1	0	42.90±3.56
17	1	0	1	44.42±1.61

(1) 回归模型的建立以及方差分析

通过软件对水解后得到抑制率的实验结果进行二次多元回归拟合，对上列表 2 中的数据进行方差分析，之后得到模型的二次多项回归方程为:抑制率=56.70-8.39*X₁+8.22*X₂-9.73*X₃-5.35*X₁X₂+1.05*X₁X₃+3.74*X₂X₃+5.71*X₁²-8.73*X₂²-4.26*X₃²

表 6 回归方程与方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	2544.77	9	282.75	4.31	0.0066	显著
x ₁	563.81	1	563.81	6.60	0.0057	
x ₂	540.71	1	540.71	13.18	0.0063	
x ₃	757.58	1	757.58	0.98	0.0026	
x ₁ x ₂	130.53	1	130.53	3.58	0.1004	
x ₁ x ₃	304.68	1	304.68	8.35	0.0233	
x ₂ x ₃	72.59	1	72.59	1.99	0.2012	
x ₁ ²	120.54	1	120.54	3.30	0.1119	
x ₂ ²	4.66	1	4.66	0.13	0.7313	
x ₃ ²	58.80	1	58.80	1.61	0.2448	
残差	255.30	7	36.47			
失拟项	179.01	3	59.67	3.13	0.1497	不显著
纯误差	76.29	4	19.07			
总变异	2800.07	16				

由表 4 可以看出，本实验方程因变量与自变量之间的线性关系明显，回归方程的一次项和二次项显著，本实验设计整体模型的“P>F”值小于 0.05，R²=0.9088，说明此次二次方程的模型比较显著。单因素 x₁ 和 x₂ 实验因素对响应值的影响显著，这表明这两个单因素和响应面应该是二次抛物线的关系。说明该模型与实验具有可行的拟合，即本实验方法可靠性很高。自变量与响应值之间线性关系显著，可以用于该反应产物抗凝血活性高低的理论推测。回归系数 F 显著性检验表明：在本实验中选取的每个单因素的设定水平范围内，对 Acalase2.4L 酶解花生分离蛋白产物抗凝血活性影响的排序依次为：x₃>x₁>x₂，即，加酶量>酶解 pH>酶解时间。

之所以加酶量对实验结果的影响比酶解 pH 和酶解时间显著，是因为加酶量处在相对较低的水平范围内，酶分子在体系中远远没有饱和，其含量的增减对水解造成严重影响，即反应体系处在不稳定状态，抗凝血活性因子也不稳定，造成酶解产物的抗

凝血酶活性有明显变化。

(2) 响应面分析：下列为应用响应面优化分析的方法对本实验回归模型进行分析的3D和平面图的结果。

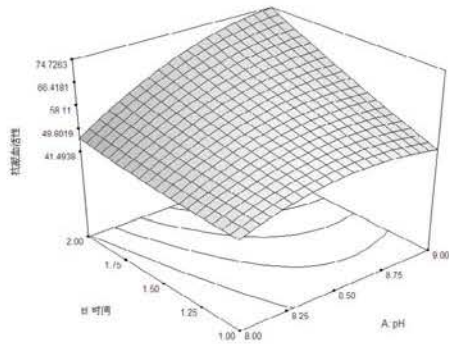


图 9 pH 和时间的响应面

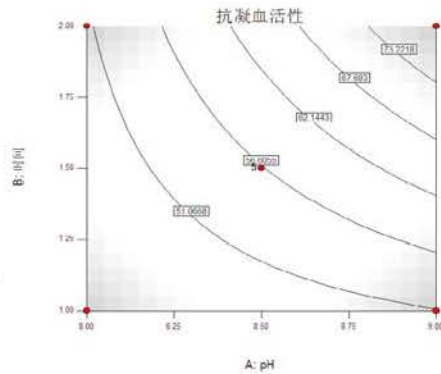


图 10 pH 和时间的平面图

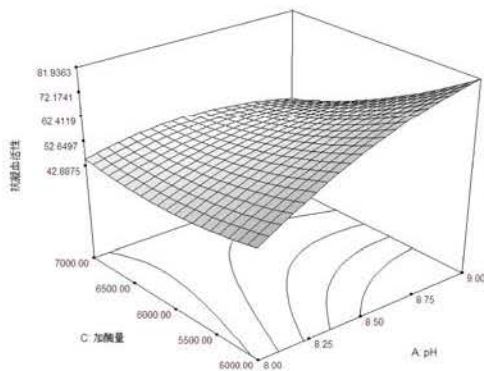


图 11 pH 和加酶量的响应面

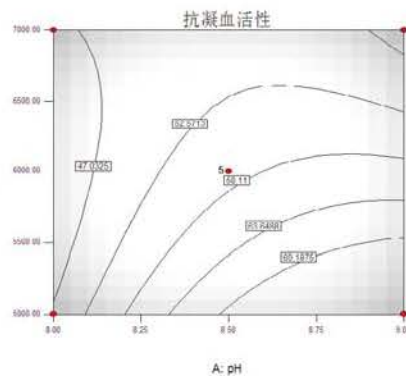


图 12 pH 和加酶量的平面图

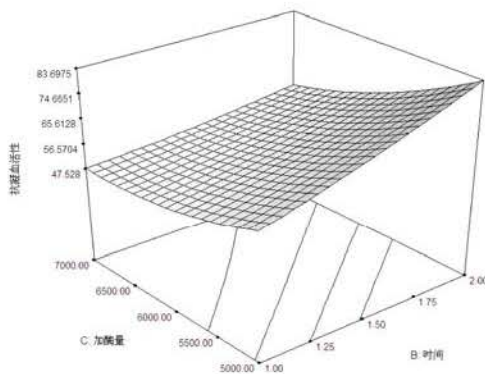


图 13 时间和加酶量的响应面

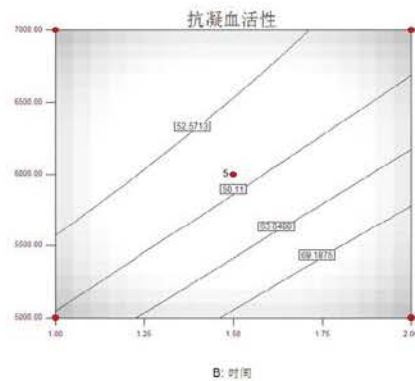


图 14 时间和加酶量的平面图

从上列六图中可以看出可以看出 pH(x_1) 与酶解时间(x_2)、pH(x_1) 与加酶量(x_3)、酶解时间(x_2) 与加酶量(x_3) 的交互作用对花生蛋白酶解产物抗凝血酶活性的影响。

(3) 最高抗凝血活性酶解产物酶解条件的预测和验证

用 design-expert8.05b 软件对实验条件进行优化，优化方案建议选择 pH9，酶解时间 2.0h，加酶量 5000u/g，二次方程优化抗凝血酶活性最优值为 92.86%。

经过实验验证得到酶解物的抗凝血酶活性为 86.22%。说明优化后的 2 次回归方程对花生蛋白酶解物抗凝血酶活性的结果的分析以及预测是可行的。下图为冷冻干燥前后样品在不同浓度下抗凝血活性的拟合曲线。

表 7 冷冻干燥前后酶解物的抗凝血活性

浓度 (mg/mL)	冷冻干燥前	冷冻干燥后
60	111.00	111.00
40	87.00	86.00
20	57.00	63.00
10	32.10	31.90
5	26.25	26.00

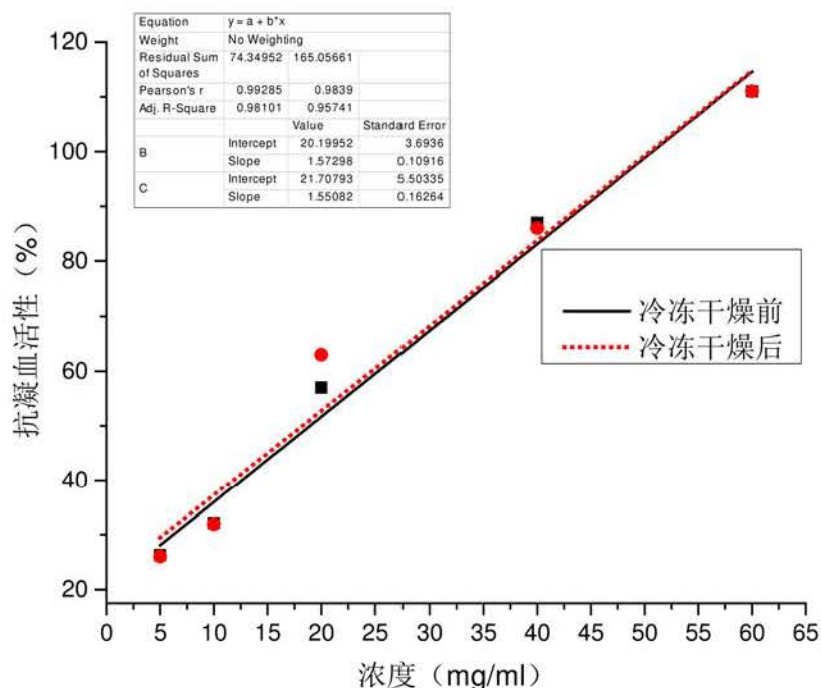


图 15 冻干前后花生肽的抗凝血活性的拟合曲线

由图可知：冷冻干燥前为 $Y=1.4918X_1+25.9207$ ；冷冻干燥后 $Y=1.5072X_2+24.3053$ ，将抗凝血活性 $Y=50$ 代入得到冷冻干燥前 $IC_{50}=17.0480$ mg/mL，冷冻干燥后 $IC_{50}=16.1411$ mg/mL。通过比较二者的 IC_{50} 可以发现冷冻干燥对实验结果没有影响。

2.4.5.3 最优条件下制得酶解物的提取及其花生肽含量测定

采用上一步优化之后的条件对花生分离蛋白进行水解。冷却至室温，在 3700 r/min 的条件下离心 15 min，取上清液，真空旋蒸 1.5h 将其浓缩后在冷冻干燥机中干燥。用凯氏定氮法测定冷冻干燥后的产品的花生肽含量为 80.16%。

2.5 本章小结

(1) 考察了花生脱红衣蛋白、花生不脱红衣蛋白和大豆蛋白的抗凝血活性，发现三者均对凝血酶的抑制有一定的效果。最后确定用不脱红衣的花生制备花生分离蛋白。

(2) 以花生分离蛋白为底物，分别用碱性蛋白酶 2709、Alcalase 2.4 L、Protex 6L 在各自最适条件下对其进行酶解。Alcalase 2.4L 和 Protex 6L 均能在 1.5 h 内均能使底物的水解度达到 19.5%，通过对三种酶酶解花生蛋白产物的抗凝血活性的计算比较，发现 Alcalase 2.4L 蛋白酶酶解花生蛋白得到的酶解物的抗凝血活性最高。

(3) 通过对响应曲面分析确定了 Alcalase 2.4L 酶解花生分离蛋白的最佳工艺条件：底物浓度 5.0 g/100mL，加酶量为 5000 U/(g 蛋白)，反应温度 55℃，pH 9，酶解时间 2h。在此条件下酶解液冻干后花生肽含量为 80.16%，抗凝血酶活性可达到 92.8%。

(4) 通过比较冷冻干燥前后酶解物的抗凝血活性的 IC₅₀ 发现：冷冻干燥过程对酶解物的抗凝血活性没有影响。

第三章 高抗凝活性花生肽的分离纯化

3.1 引言

近些年，出现了很多种多肽和蛋白的纯化技术与方法，分离方法主要有密度梯度离心、等电点沉淀、超滤、盐析、电泳、亲和色谱、离子交换色谱和分子筛等。离心、等电点沉淀、超滤、盐析等方法为粗分离肽的方法，而高效液相色谱法可根据目标肽的来源、极性、相对分子质量大小、性质状态等方面将单一的目标肽从复杂的混合肽产物中分离出来，以其快速的分析，高效率的分离，高级灵敏的检测，比较专一的选择性等独特的优点，成为目前分离纯化多肽的主要手段^[49]。制备液相色谱仪和高效液相色谱（HPLC）是多肽精细分离的常用手段。

本章拟采用制备液相色谱仪和半制备 RP-HPLC 等方法对花生蛋白酶解液多肽进行分离纯化和回收，优化分离条件，测定比较分离纯化组分的抗凝血活性，选择获得具有高抗凝活性的花生肽。

3.2 实验材料与设备

3.2.1 实验材料

花生肽：来自第二章 Alcalase 最优条件下的水解产物。

SephadexG-15：索莱宝（北京）生物科技有限公司。

纤维蛋白原：Sigma 公司。

凝血酶：索莱宝（北京）生物科技有限公司。

三氟乙酸（分析纯）：阿拉丁试剂有限公司。

乙腈（HPLC）：天津科密欧化学试剂有限公司。

其他试剂均为分析纯。

3.2.2 实验仪器与设备

TD5-4B 离心机	北京时代北利离心机有限公司
BS-210C 电子天平	北京赛多利斯天平有限公司
SD2 制备液相色谱仪	Agilent 公司

IGJ-10C 冷冻干燥机

北京四环科学仪器厂

Agilent 1260 高效液相色谱仪

Agilent 公司

FC 型酶标仪

赛默飞世尔（上海）仪器有限公司

DHP-360 恒温培养箱

北京市永光明医疗仪器有限公司

3.3 实验方法

3.3.1 测定方法

3.3.1.1 花生肽含量测定

采用福林酚比色法测定样品中总肽含量^[50]。标准曲线如图：

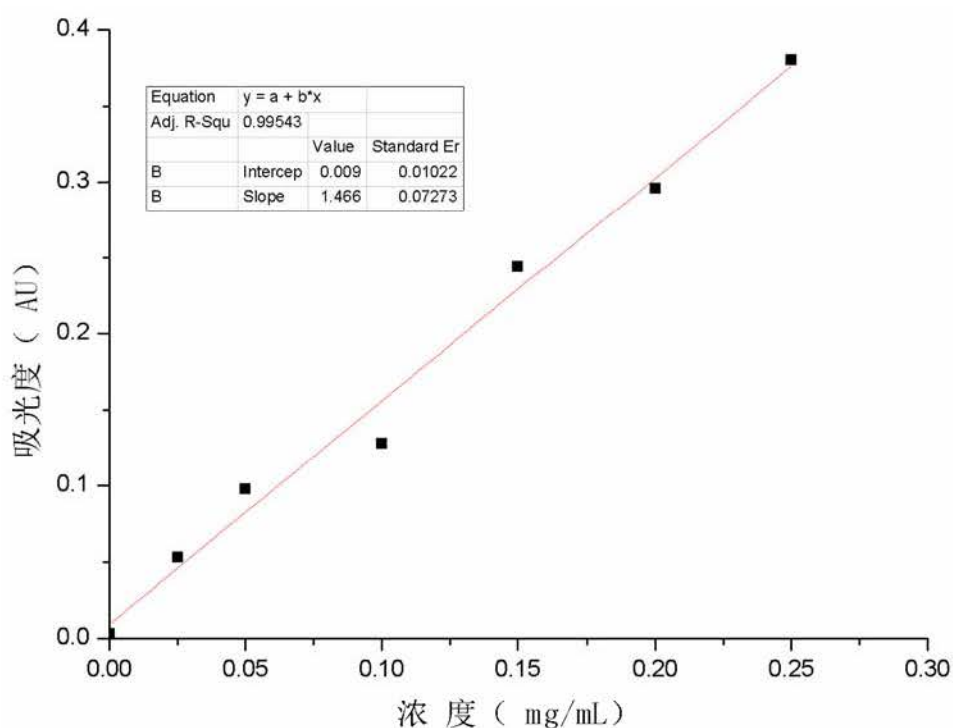


图 16 花生蛋白的标准曲线 ($Y=1.466X+0.009$, $R^2=0.9954$)

3.3.2 实验设计

3.3.2.1 制备色谱分离花生肽

制备液相色谱仪：美国安捷伦 SD2 纯化系统

色谱柱：**反相色谱柱 C-18**（100×250mm），**郑州英诺生物科技有限公司**。

检测波长：220nm

流动相：乙腈和水

定量环：1mL

(1) 流动相洗脱比例的选择

采用定比例洗脱。

(2) 上样量的选择

综合整体设备和柱子的性能，选择用进样体积为 1mL 的定量环，通过改变进样量的浓度，观察洗脱曲线的变化。将上样量分别设定为：5mg/mL，10mg/mL，15mg/mL，20mg/mL，25mg/mL，30mg/mL，35mg/mL，40mg/mL，45mg/mL，50mg/mL。

(3) 流速的选择

流速的选择也是制备色谱分离中一个很重要的因素。增加流速也会有助于提高色谱产率，超过一定值的流速，固定相内的扩散阻力将起到负面作用，使色谱柱的分离能力减弱，即引起组分峰的重叠，不利于分离。为此，分别按以下流速对样品进行洗脱：1mL/min，5mL/min，10mL/min，15mL/min，考察其对花生肽分离效果的影响。

3.3.2.2 半制备反相高效液相色谱（RP-HPLC）分离花生肽组分

HPLC 系统：Agilent1260。

色谱柱：反相色谱柱 C-18（10×250mm），郑州英诺生物科技有限公司。

检测波长：220nm；柱温：30℃；进样体积：100μL。

(1) 梯度洗脱

① 洗脱流速的选择

进样浓度 1mg/mL,洗脱条件：0～5min 100～80%A；5～20min 80～60%A；20～25min 60～0%A；25～27min 0%A；27～29min 0～100%A；29～40min 100%A（A：5%乙腈，含 0.05%TFA；B：80%乙腈，含 0.05%TFA）。

② 洗脱梯度的选择

流速 1mL/min，进样浓度 1mg/mL，TFA 添加量 0.05%，分别按下述洗脱条件洗脱：

1、0～5min 100～80%A；5～20min 80～60%A；20～25min 60～0%A；25～27min 0%A；27～29min 0～100%A；29～40min 100%A（A：5%乙腈，含 0.05%TFA；B：80%乙腈，含 0.05%TFA）

2、0～15min 100～60%A；15～20min 60～0%A；20～25min 0～100%A；25～35min 100%A（A：5%乙腈，含 0.05%TFA；B：80%乙腈，含 0.05%TFA）

3、0～15min 80～60%A；15～25min 60～0%A；25～35min 0～100%A；35～45min

100%A (A: 5%乙腈, 含 0.05%TFA; B: 80%乙腈, 含 0.05%TFA)

0~5min 100~80%A; 5~30min 80~60%A; 30~35min 60~0%A; 35~37min 0%A; 37~39min 0~100%A; 39~50min 100%A (A: 5%乙腈, 含 0.05%TFA; B: 80%乙腈, 含 0.05%TFA)

③ 进样浓度的选择

洗脱梯度为: 0~5min 100~80%A; 5~20min 80~60%A; 20~25min 60~0%A; 25~27min 0%A; 27~29min 0~100%A; 29~40min 100%A (A: 5%乙腈, 含 0.05%TFA; B: 80%乙腈, 含 0.05%TFA), TFA 添加量: 0.05%, 考虑到分离 G1 后, 还要将 G1 个组分收集测定其抗凝血活性, 在上样量分别提高产率, 决定增大进样浓度: 5mg/mL, 7mg/mL, 9mg/mL 条件下分离花生肽。

④ TFA 添加量的选择

上样量: 3mg/mL, 洗脱梯度为: 0~5min 100~80%A; 5~20min 80~60%A; 20~25min 60~0%A; 25~27min 0%A; 27~29min 0~100%A; 29~40min 100%A (A: 5%乙腈, 含 TFA; B: 80%乙腈), TFA 添加量分别为 0.05%, 0.1%, 0.15%的条件下进行洗脱。

优选出分离效果最好条件条件, 重复进样, 收集一定量各洗脱峰, 比较选择出具有最高抗凝血活性的洗脱峰, 对其进行冷冻干燥或得高抗凝血活性肽。

3.4 结论

3.4.1 用制备色谱在不同流动相比比例条件下的分离效果

制备液相色谱仪可实验最大回收率和纯度。为了能够满足在损失花生肽最少的情
况下, 相对精确分离第二章中在最优条件下用 Acalase2.4L 制备的花生肽, 同时, 大
量收集所分离花生肽, 以便于冷冻干燥后对其进行更进一步的分离, 所以选择制备色
谱分离制备花生肽。分析肽最常用的色谱柱是 C18 柱, 柱料为细小的硅胶颗粒, 硅胶
表面用硅烷疏水基团修饰。反相柱柱子的极性都比溶剂弱, 洗脱效果和碳链的长短有
关, 填料中碳链越长的柱子洗脱效果越好。流动相中其他溶剂和水混合所占百分比范
围为 100%-1%。之前制备的花生肽皆是溶于水的极性分子, 在洗脱的过程中, 疏水性
越弱的化合物越不容易从流动相中被挤出去, 即在色谱柱中停留的时间也越短。所以,

在反相色谱柱中，不同的化合物由于其疏水性的不同而得到分离，为了能够较好的分离本实验样品，防止柱子上面沉积，在本章中拟设置流动相的比例的理念为：乙腈所占比例小于 50%。

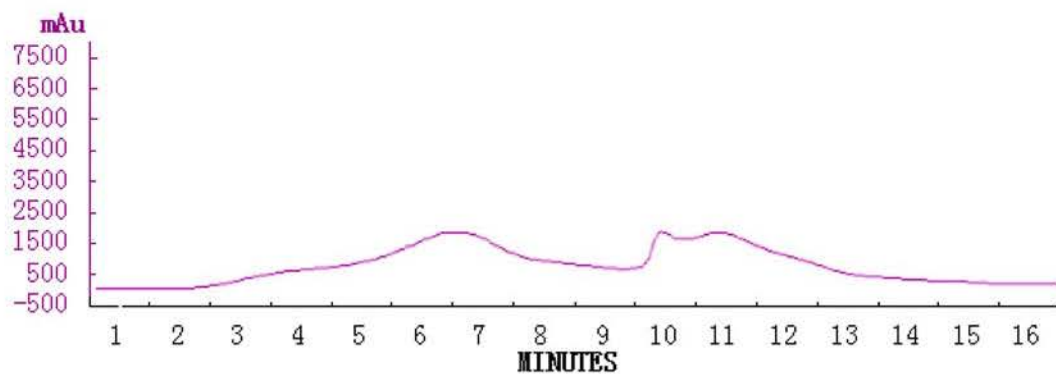


图 17 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 1

(乙腈浓度 25%,上样浓度 20mg/mL,流速: 10mL/min)

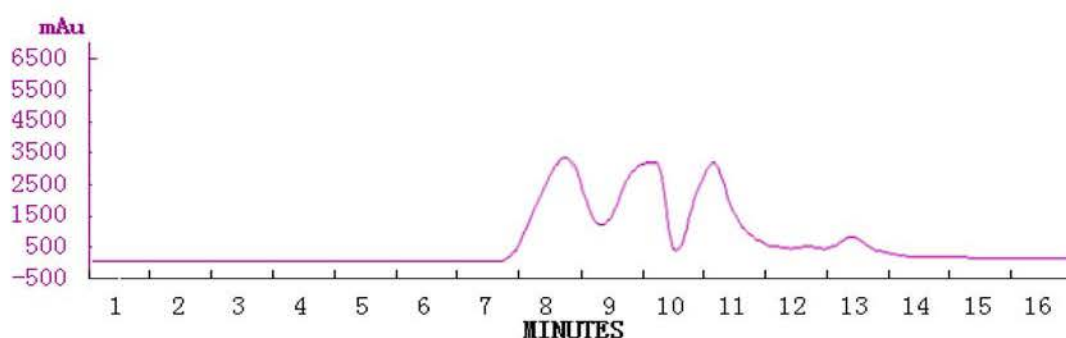


图 18 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 3

(乙腈浓度 35%,上样浓度 20mg/mL,流速: 10mL/min)

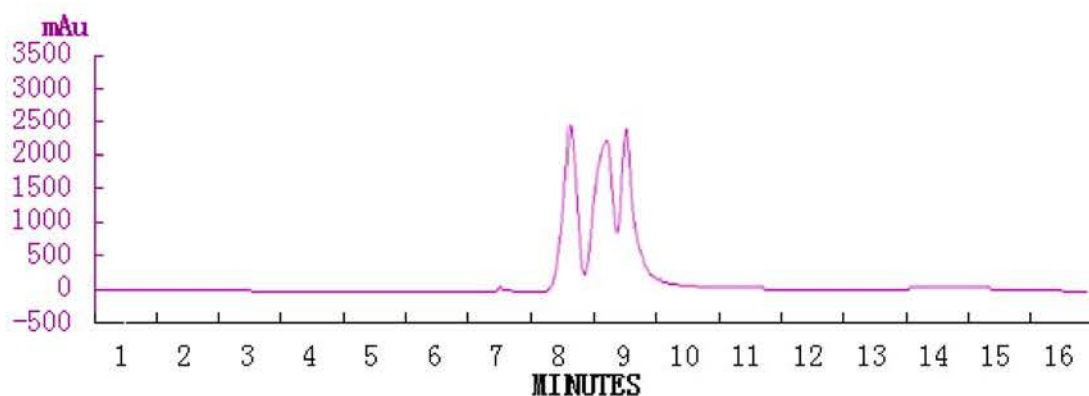


图 19 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 4

(乙腈浓度 45%,上样浓度 20mg/mL,流速: 10mL/min)

由上面一系列的图形可以看出：虽然柱子比较大，但是在 10mL 流速的条件下，

延时不是很长，首峰出峰时间大概都在 9 分钟之前。流动相比率的调整对分离效果有很大的影响。流动相中乙腈含量增加时，流动相的洗脱能力增强，各组分出峰时间缩短，并且两边组分出峰时间的缩短幅度大于中间的组分，因而整个循环周期明显缩短。由产率与流动相消耗的定义可知，洗脱循环周期越短，流动相的消耗就越小，样品的产率越高，故花生肽的产率随乙腈所占流动相的比例的增加而增加。同时，当流动相消耗减小、收集产品的浓度增加时，蒸发回收溶剂的能耗就会降低。但当乙腈浓度增至 45%，循环周期不再有很大缩减，而三种组分峰却逐渐接近趋于重叠，分离难度增大，为保证产品的纯度，必须放弃乙腈比例 45%以及 45%以后更高的产品回收率。综上所述分析，本实验选用的合适的流动相组成为乙腈：水=35/75(v/v)

3.4.2 用制备色谱在不同上样量条件下的分离效果

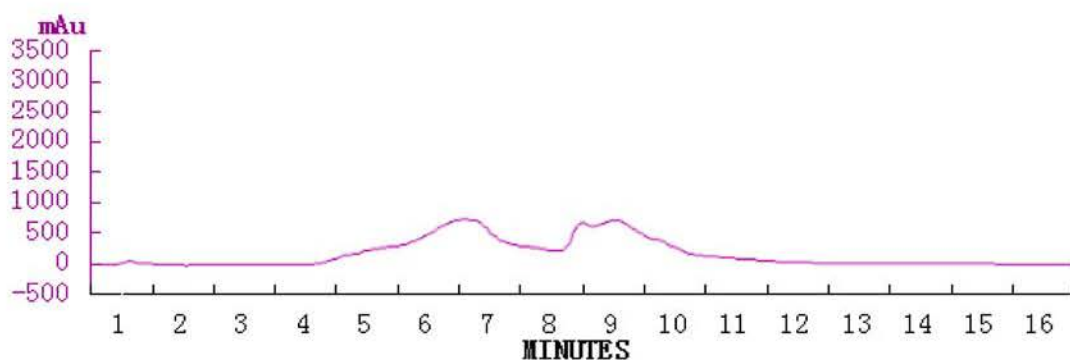


图 20 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 5

(乙腈浓度 35%,上样浓度 5mg/mL,流速: 10mL/min)

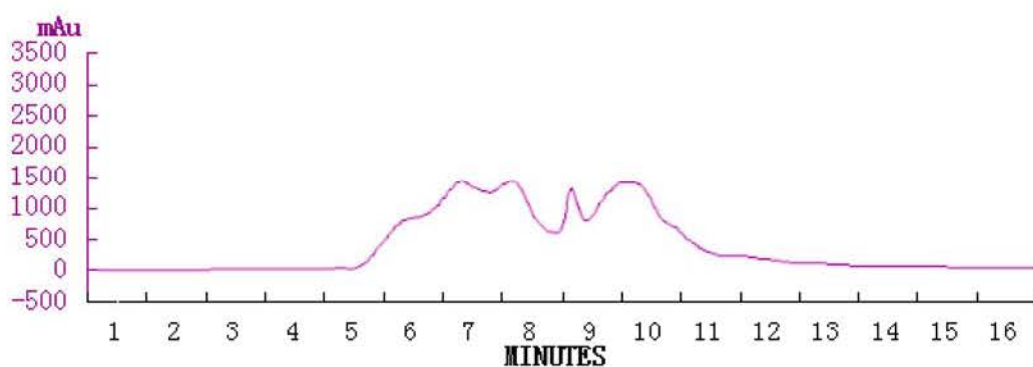


图 21 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 6

(乙腈浓度 35%,上样浓度 10mg/mL,流速: 10mL/min)

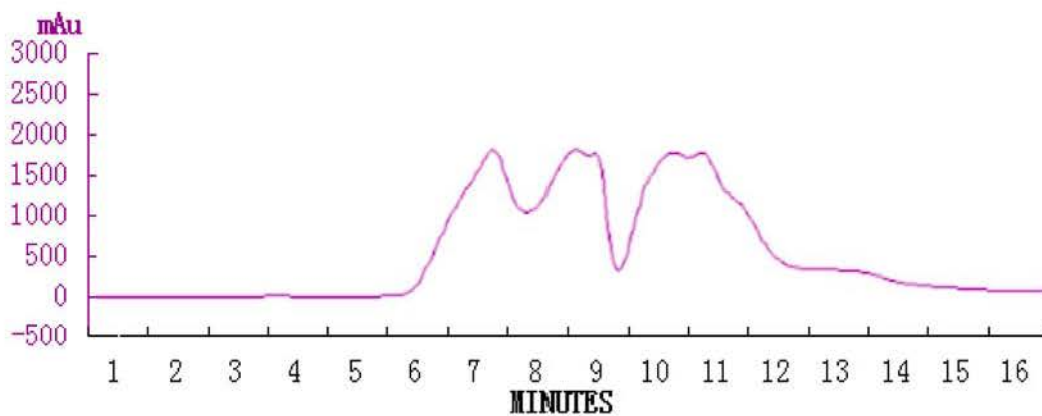


图 22 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 7

(乙腈浓度 35%, 上样浓度 15mg/mL, 流速: 10mL/min)

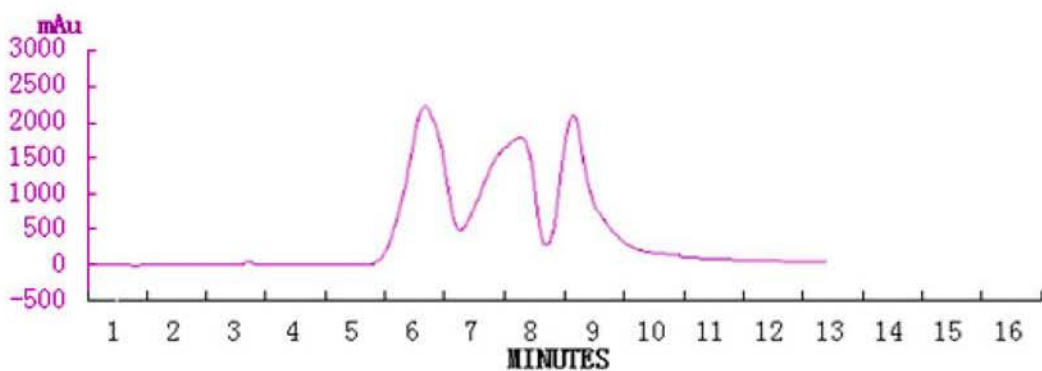


图 23 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 8

(乙腈浓度 35%, 上样浓度 20mg/mL, 流速: 10mL/min)

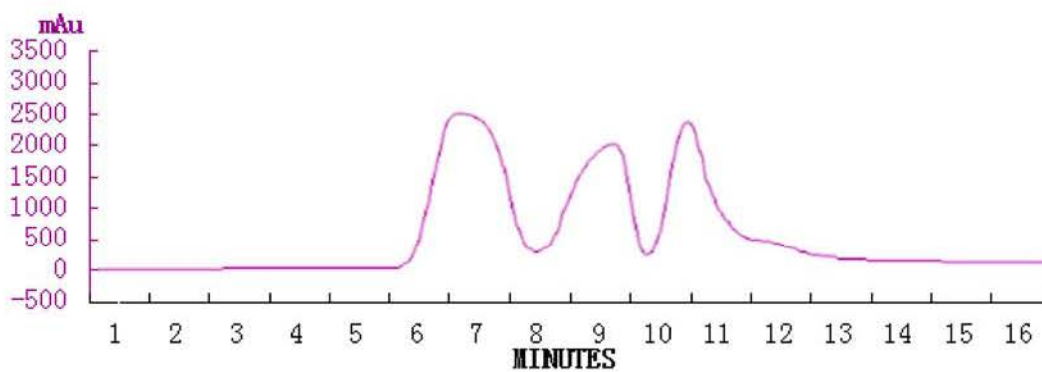


图 24 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 9

(乙腈浓度 35%, 上样浓度 25mg/mL, 流速: 10mL/min)

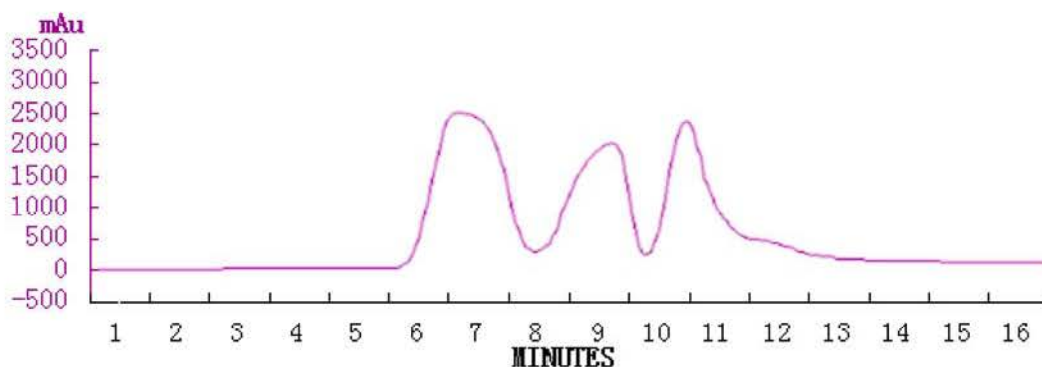


图 25 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 10

(乙腈浓度 35%,上样浓度 30mg/mL,流速: 10mL/min)

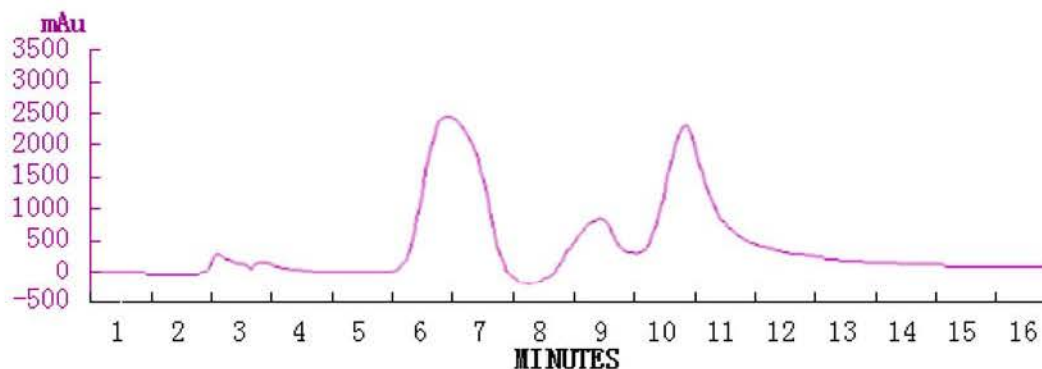


图 26 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 11

(乙腈浓度 35%,上样浓度 35mg/mL,流速: 10mL/min)

从上列各个图形可以看出，进样浓度的大小能够改变峰的形状。进样浓度越低，峰越宽，峰值越小，浓度太低会照成峰变形，拖峰。当进样浓度从 5 mg/mL 增至 35mg/mL 时，一个洗脱的循环周期有所延长，在进样量为 15mg/mL 以及之前的时候，不能有效的分离样品。在进样浓度为 20mg/m 到 25mg/mL 之间，出峰的情况还是比较可观的，三个峰的峰值都比较高。当进样浓度大于 25mg/mL，尽管循环周期没有什么大的变化，但是洗脱峰中间的峰值开始降低，即样品的产率开始下降，这表明在这样的浓度区间进样浓度对样品的产率的所影响，强于洗脱循环周期。当进样浓度继续增加至 35 mg/mL 时，由于色谱柱超载严重，中间的峰降至很低，开始趋近于零，说明该组分在柱子累积，不能得到有效分离，色谱峰变形严重。综合考虑，最终选择上样浓度为 20mg/ml。

3.4.3 用制备色谱在不同流速条件下的分离效果

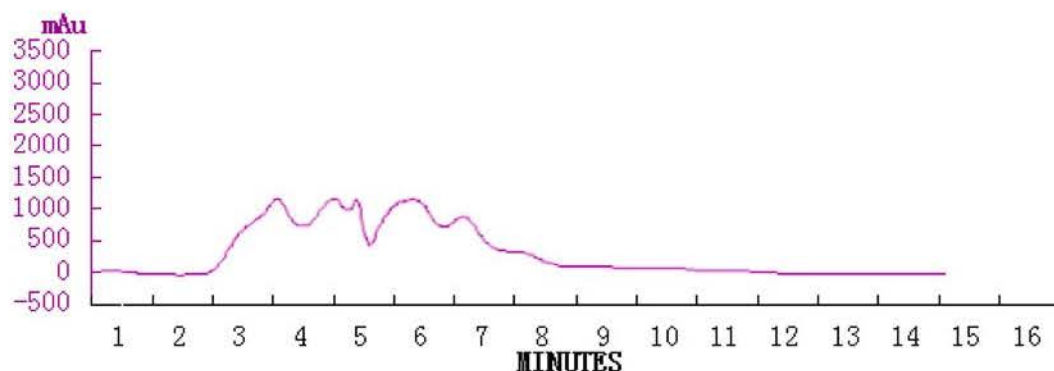


图 27 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 14

(乙腈浓度 35%, 上样浓度 20mg/mL, 流速: 1mL/min)

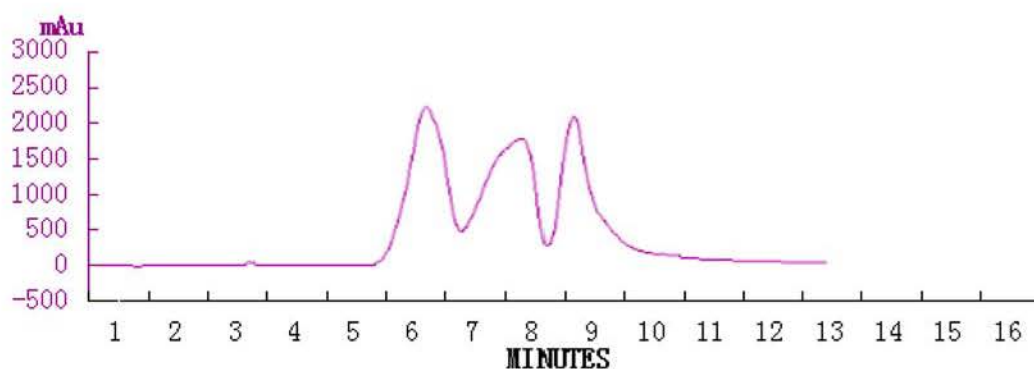


图 28 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 15

(乙腈浓度 35%, 上样浓度 20mg/mL, 流速: 5mL/min)

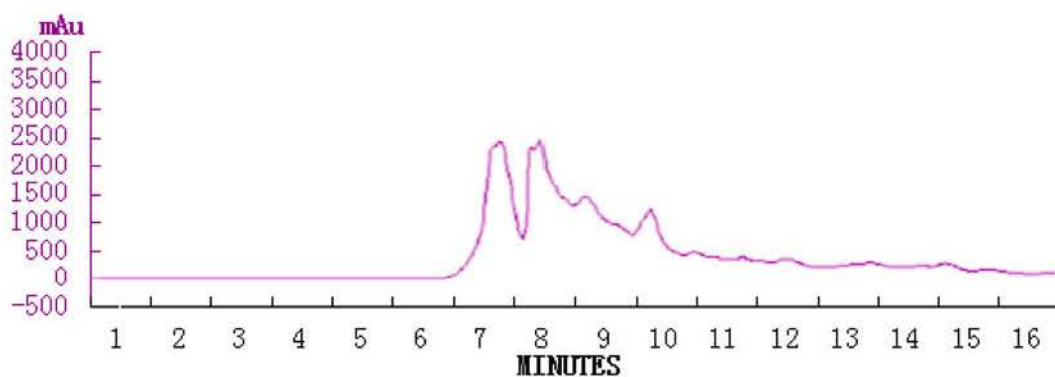


图 29 花生蛋白的制备色谱洗脱曲线 16

(乙腈浓度 35%, 上样浓度 20mg/mL, 流速: 10mL/min)

综合以上各图可知：当流速从 1mL/min 增加到 10mL/min 时，缩短了洗脱循环周期，提高了产率，但是流速大于 10mL/min 时，开始有组分之间重叠，产品纯度降低，主要是因为：不同溶质组分开始慢慢偏离于流动相和固定相之间的平衡分配，从而降低色谱柱的分离能力，色谱峰加剧扩展，增加了流动相的消耗，即加大溶质稀释程度。

流动相消耗的增大将直接导致在接下来旋蒸的时候耗能多，用时长，不利于保持所收集样品原有的性能。所以决定在收集实验中采用 5mL/min 的流速。

又以上优化条件分析发现，当分离条件为乙腈浓度 25%，上样浓度 20mg/mL，流速：5mL/min 的时候，分离效果最好，选这个条件为最优分离条件用来制备分离花生肽。

3.4.4 高抗凝血活性花生肽选择，以及其在不同浓度下抗凝血活性的探究

在上一步中的优化条件下重复收集 G1、G2、G3 组分，真空旋蒸浓缩，冷冻干燥后，分别测定他们在 10mg/mL，20mg/mL，40mg/mL 时候的抗凝血活见图 35。

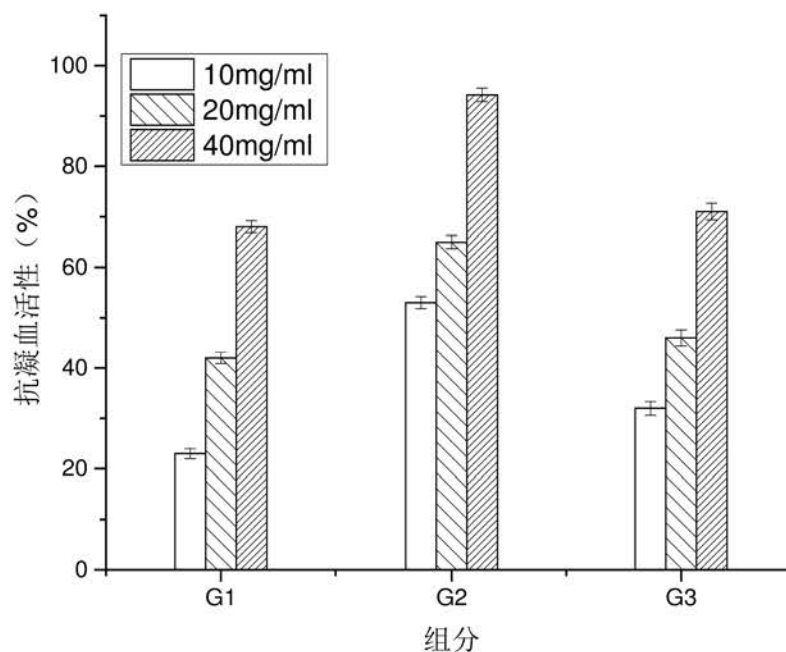


图 30 制备色谱分离花生肽各组分的抗凝血酶活性

由上图可知：通过对在相同浓度条件下的 G1、G2、G3 抗凝血活性的比较发现，G2 组分的抗凝血活性最好。所以选择 G2 作为进一步分离的样品，用以活得高抗凝血活性肽。

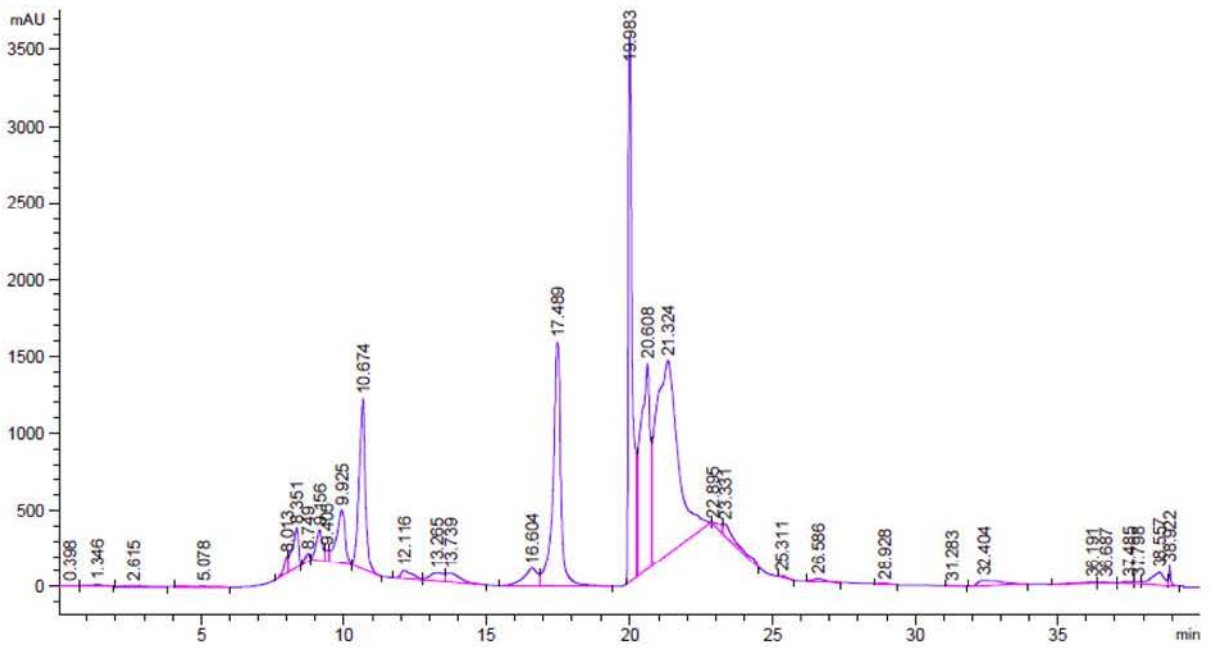
3.4.5 半制备 RP-HPLC 分离 G2 组分

在用半制备 RP-HPLC 分离 G2 组分的时候，选择先用梯度分离 G2 组分，再用定比例无梯度分离 G2 组分，之后比较两种方法在各自最优条件下的分离效果，最后确定用来分离 G2 组分的方法。

3.4.5.1 梯度洗脱花生肽组分

通过改变洗脱梯度，洗脱流速，进样量、TFA 添加量等几个方面来进行优化其分离条件。

(1) 不同洗脱流速对花生肽分离效果的影响



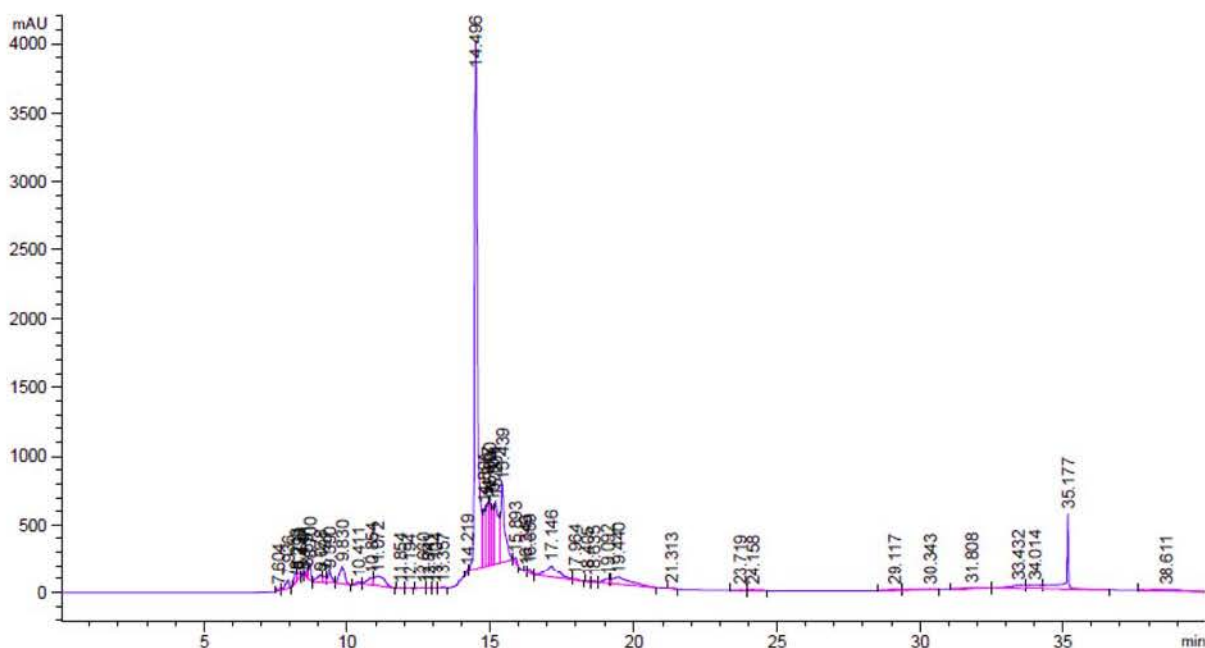


图 33 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 3

(流速: 2mL/min)

由上列三图可以发现流速对样品的分离效果起着重要的作用, 当流速为 1mL/min 时, 每个峰的时间都很长, 所以一个洗脱循环周期也最长; 当流速为 1.5mL/min 时出峰最多, 每个峰的时间都有所缩减, 整个洗脱循环周期也很短, 洗脱的产率和纯度都很高; 当流速增加到 2mL/min 的时候, 虽然整个循环周期最短, 但是各组峰的重叠现象比较严重, 不能有效的将样品中的不同组分分离检测出来, 达不到实验目的。综上所述决定选择 1.5mL/min 为最终洗脱流速

(2) 不同洗脱梯度对花生肽分离效果的影响

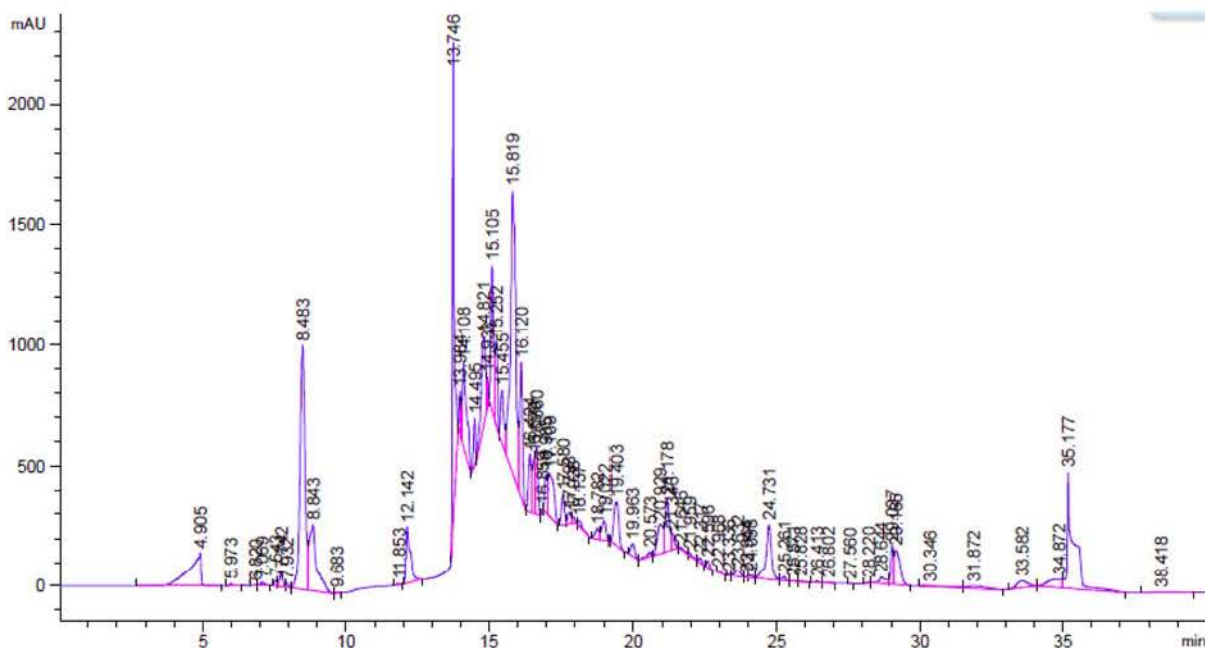


图 34 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 4

洗脱方法 1: 0~5min 100~85%A; 5~20min 85~60%A; 20~26min 60~0%A; 26~28min 0%A; 28~30min 0~100%A; 30~40min 100%A (A: 100%乙腈; 含 0.1%TFA; B: 100%乙腈, 含 0.05%TFA)

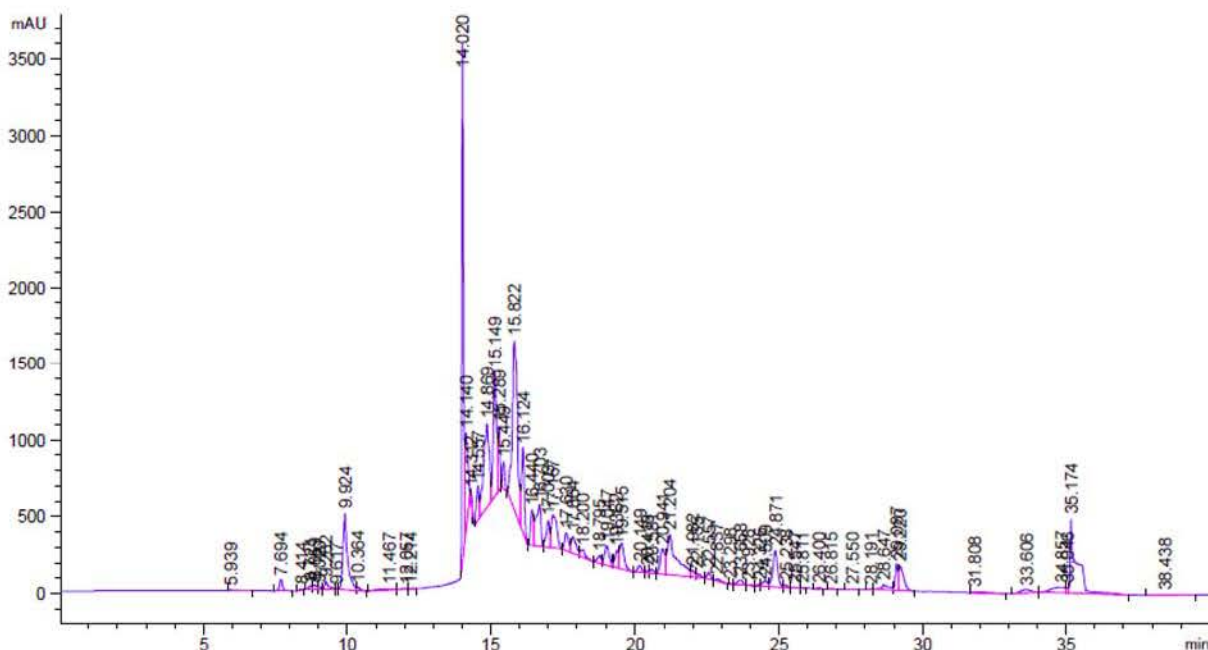


图 35 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 5

洗脱方法 2: 0~15min 100~65%A; 15~20min 65~0%A; 20~25min 0~100%A; 25~35min 100%A (A: 100%乙腈, 含 0.05%TFA; B: 100%乙腈, 含 0.05%TFA)

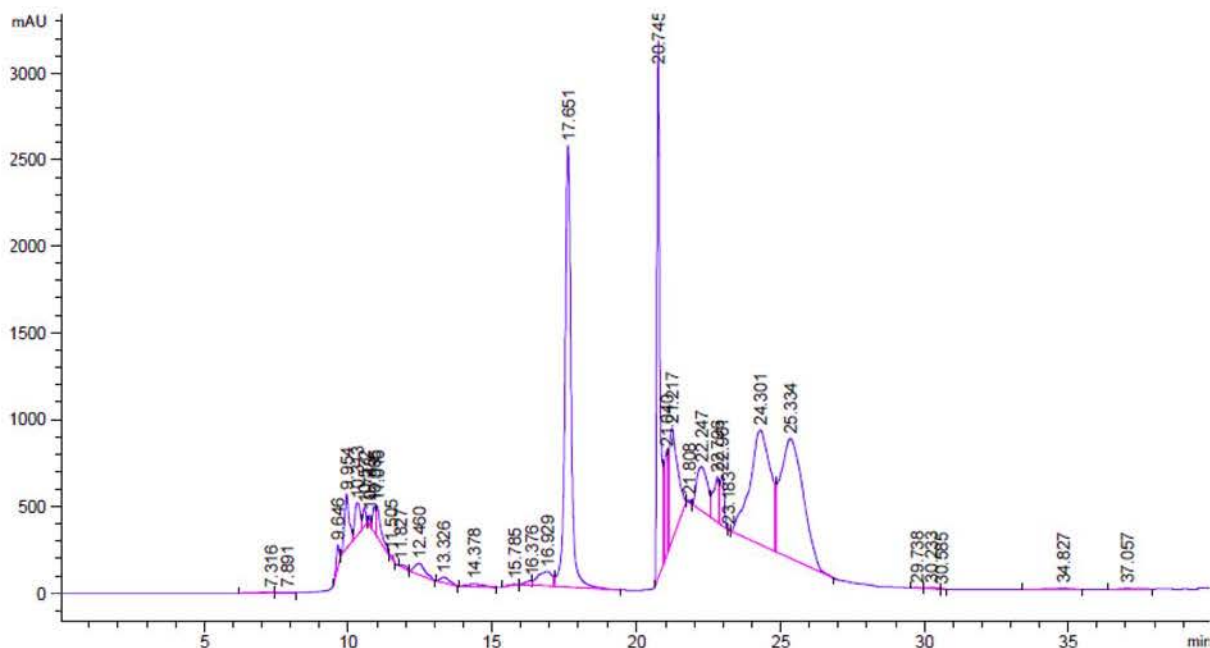


图 36 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 6

洗脱方法 3: 0~15min 85~65%A; 15~25min 65~0%A; 25~35min 0~100%A; 35~45min 100%A (A: 100%乙腈, 含 0.05%TFA; B: 100%乙腈, 含 0.05%TFA)

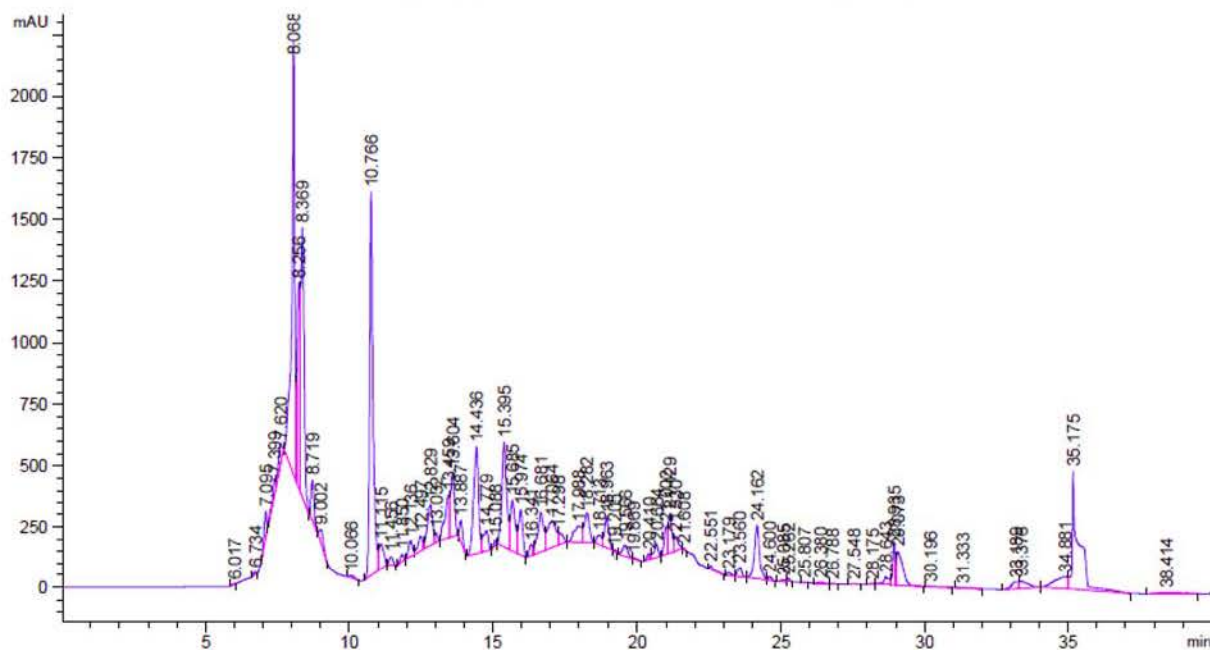


图 37 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 7

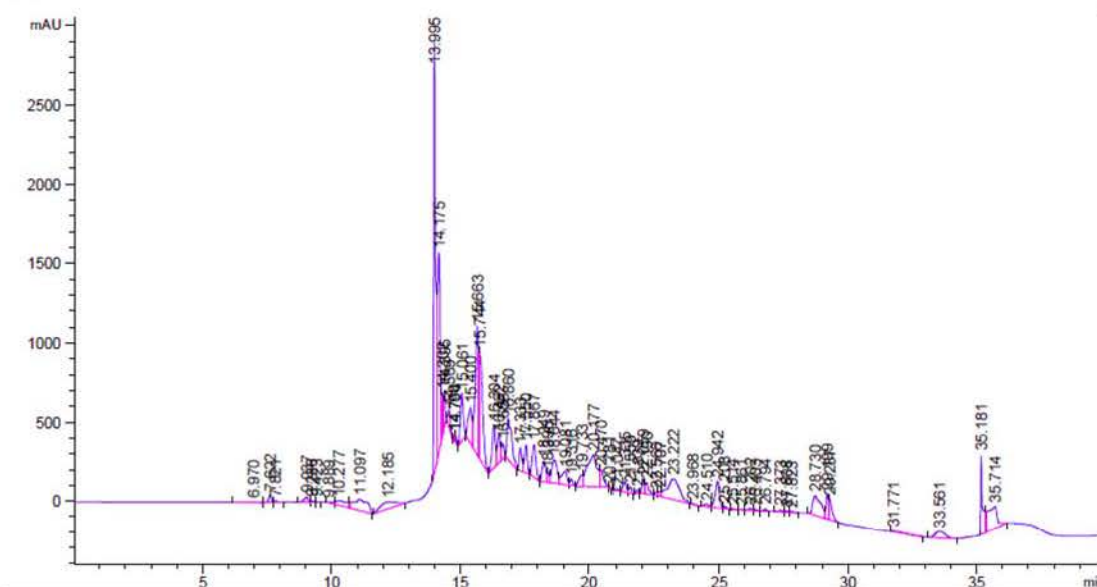
洗脱方法 4: 0~5min 100~85%A; 5~30min 85~65%A; 30~36min 65~0%A; 36~38min 0%A; 38~40min 0~100%A; 40~50min 100%A (A: 0.05%乙腈, 含 0.1%TFA; B: 100%乙腈, 含 0.05%TFA)

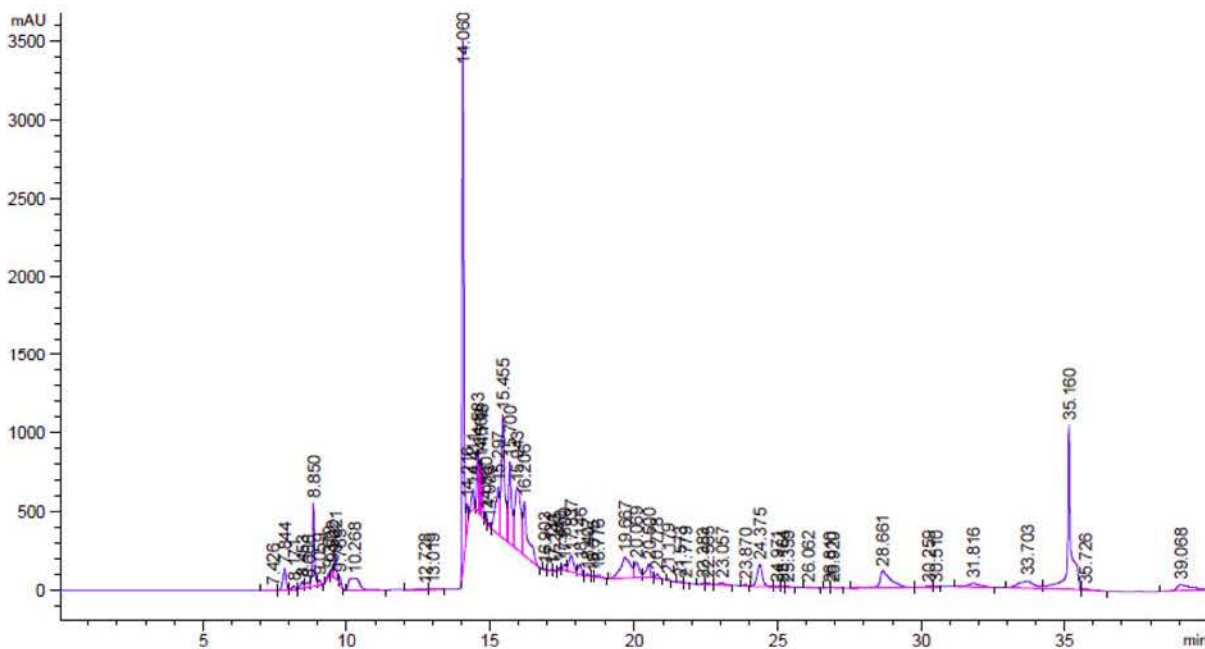
反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 对多肽的分离一般采用初始流动相极性最高, 随着洗脱时间延长降低流动相极性的线性梯度洗脱^[56-58]。在初始流动相中提高水相的比

例，先被洗脱下来的是疏水性最弱的肽组分，而后疏水性强一次被洗脱下来，疏水性越强的组分，停留的时间越长，越难以被洗脱下来。由图 34 至图 37 可以看出，洗脱曲线初期（0~8min），没有肽组分被洗脱出来，主要由于色谱柱有一定的体积，导致出峰时间与开始洗脱时间相比有一段时间的滞后。比较图 34、35、36 三图发现，在洗脱初始阶段 0~5min 设定 100~85%A，可以较好的分离此段花生肽，图 35、36 流动相的极性降低过快，不利于某些花生肽组分的洗脱分离；且 15 分钟以后的出峰重叠现象比图 34 要严重。图 35 的流动相比比例变化范围较少，花生肽各组分分离效果相对最差，图 34 图 35 在后期的洗脱流动相的极性不同，可以看出，图 34 对在洗脱后期对极性较弱的组分的分离效果比较好。图 35 虽然也能出现几个峰，但是峰值低，产率比较低。

综合以上分析，选择洗脱方法 1 对 G1 组分进行进一步的分离优化，通过改变进样量，TFA 添加量，获得更好的分离方法。

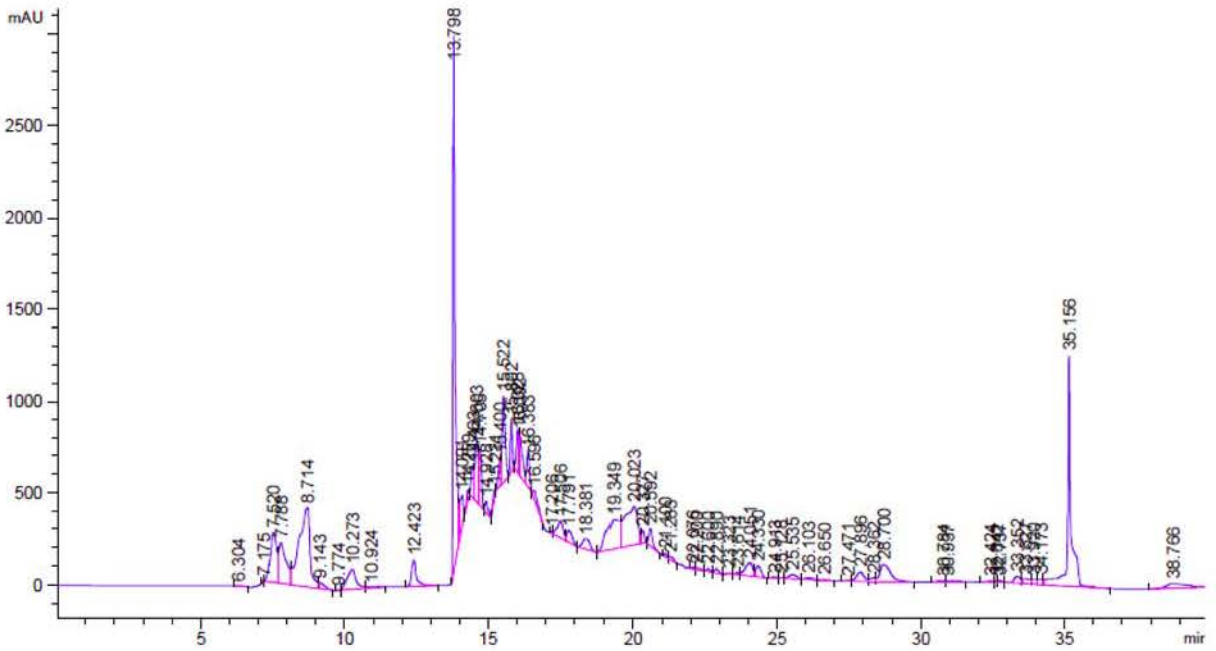
(3)不同进样量对花生肽分离效果的影响

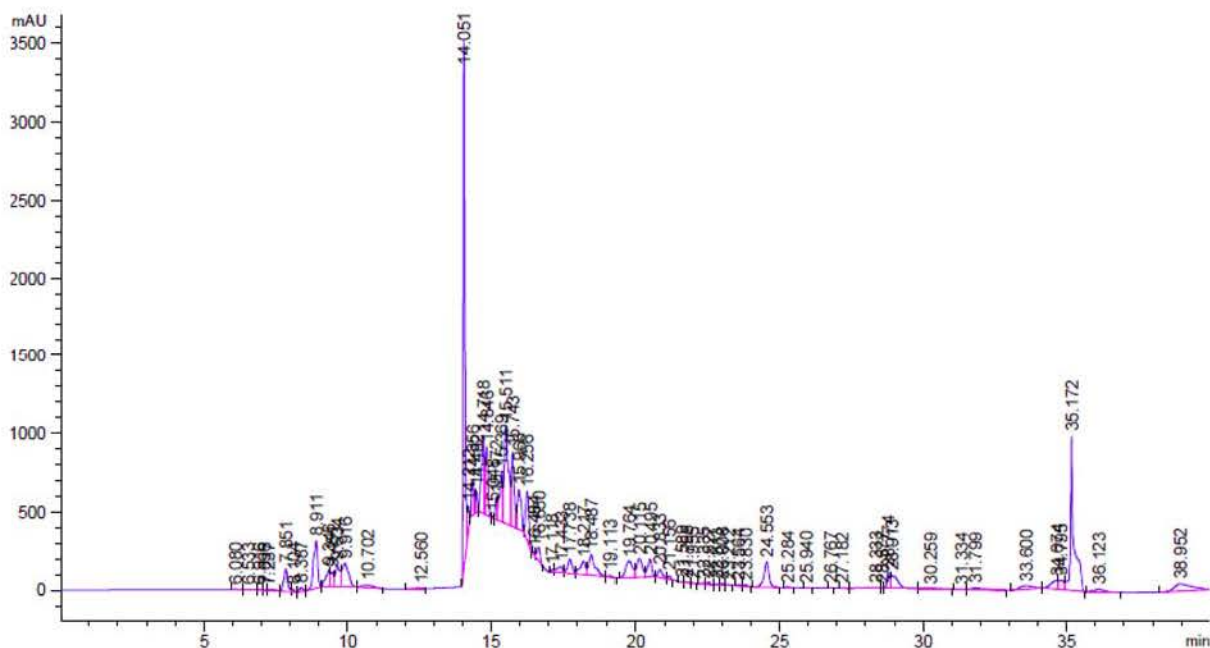




出的洗脱梯度和流速的情况下，选择最佳进样量为 7mg/mL。

(4)不同 TFA 添加量对花生肽分离效果的影响





流动相中添加的 TFA 可以通过与硅胶表面疏水键合相以及固定相上残留的极性表面的作用，来改善峰形、避免峰展宽与峰拖尾，保证检测灵敏度，提高对样品的分离度；TFA 结合花生肽上面的正电荷和极性基团，从而减少极性保留，进而把花生肽带吸附到具疏水性的反相表面。与此同时，固定相上残留的极性表面被 TFA 屏蔽。即滞留在反相固定相表面的 TFA，会发生和多肽及柱床的作用。

改变流动相中添加的 TFA 的浓度，可以对多肽在反相色谱柱上的滞留时间进行微调。TFA 的这种作用有助于优化分离条件、增加复杂色谱可以分析出的信息量。图 46 至图 49 为 G1 组分在不同 TFA 添加量的条件下的分离效果。当 TFA 流动相中的添加浓度为 0.1% 时，分离效果优于其他添加量；当 TFA 添加量为 0.05% 时，部分峰会出现展宽和拖尾的，峰形的重叠现象严重；当添加量大于 0.1% 时，某些组分的出峰时间延迟，峰形重叠更严重。综合分析，选择流动相中 TFA 的最佳浓度选为 0.1%。在之后的分离检测中拟采用本优化结果。

3.4.5.2 非梯度洗脱分离花生肽

通过改变水和乙腈的比例，洗脱流速，进样浓度，进样量等几个方面对其分离条件进行优化。

(1) 不同洗脱液比例对花生肽分离效果的影响 (进样体积: 100 μ l, 流速: 1.5mL/min, 进样浓度: 1mg/mL, TFA 添加量: 0.1%)

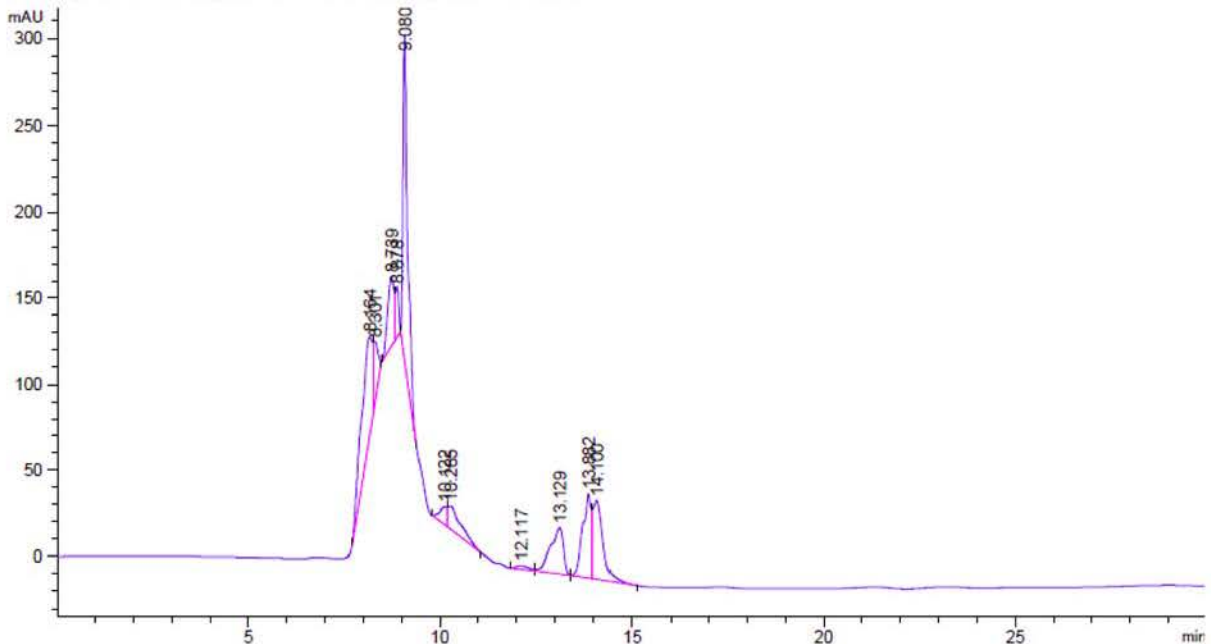


图 45 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 28

(乙腈含量: 35%)

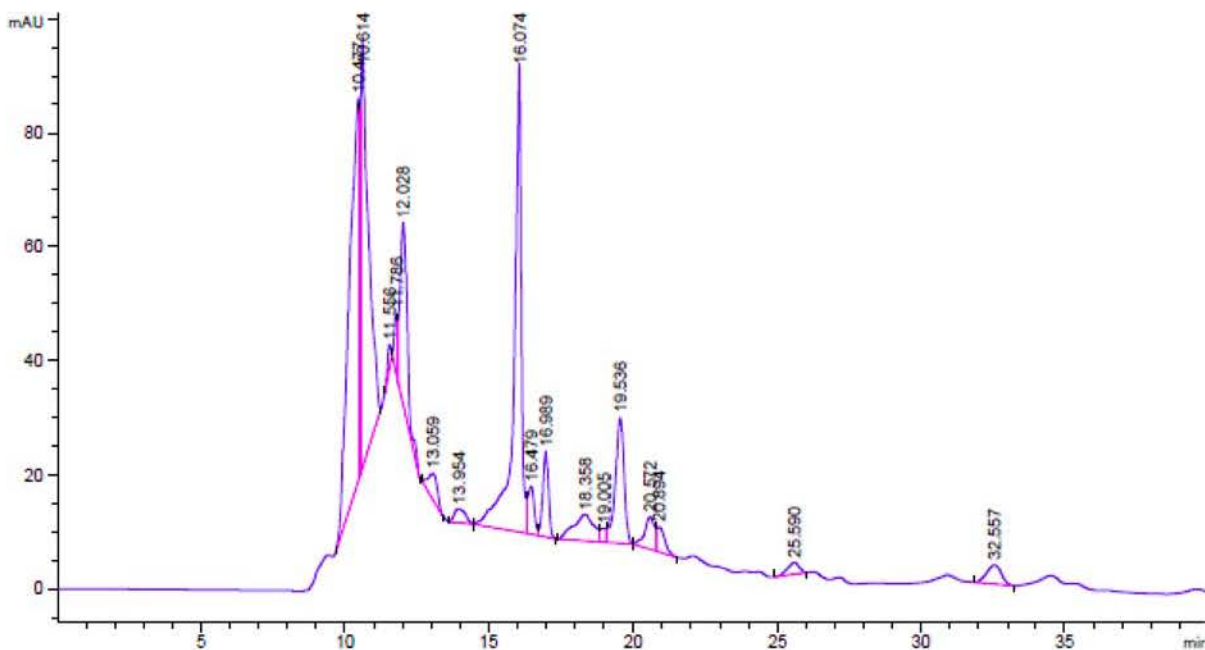


图 46 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 29

(乙腈含量: 25%)

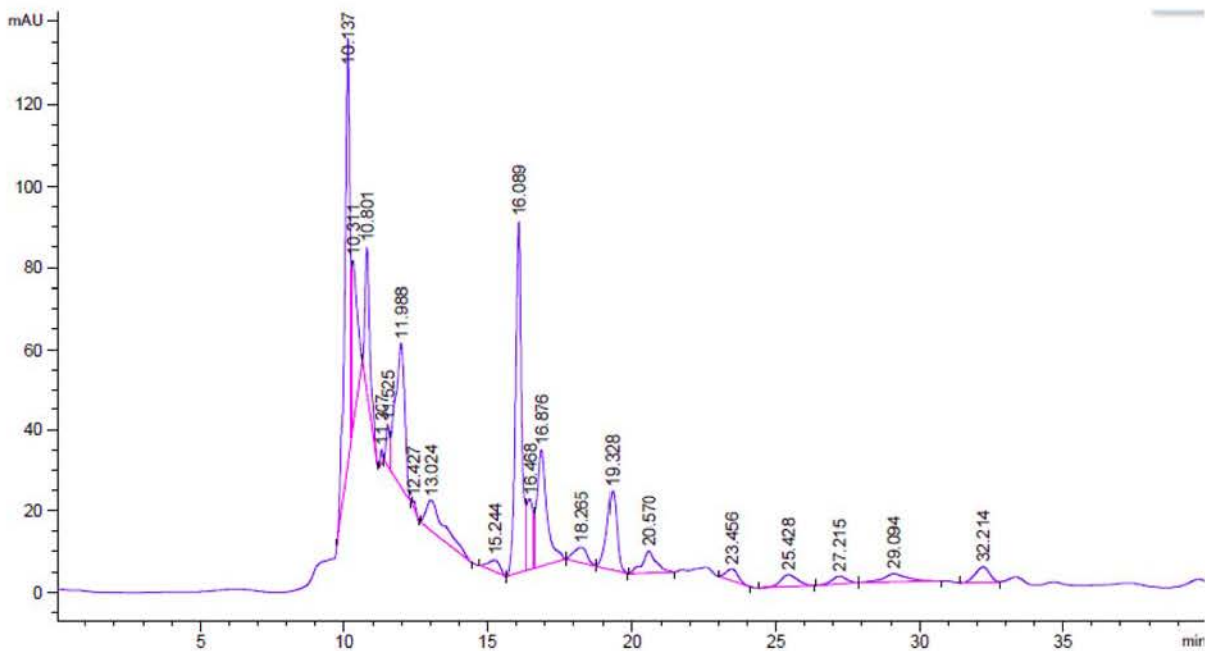


图 47 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 30

(乙腈含量: 15%)

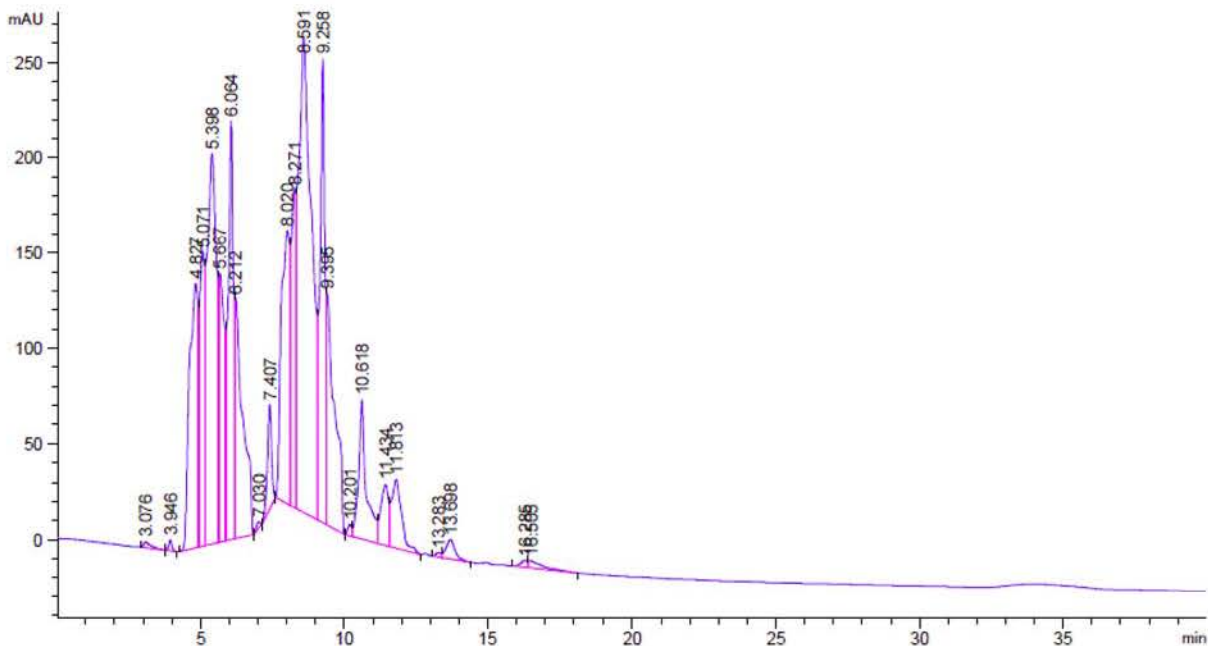


图 48 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 31

(乙腈含量: 5%)

由上列各图可知：增加流动相中乙腈的比例会延迟出峰的时间，说明乙腈的比例越大，流动相极性与越弱，疏水性弱的样品在固体相上停留的时间比较长，越不容易被洗脱下来。乙腈比例为 5% 的时候很快，整个洗脱循环周期很短，出现的峰明显变多，但是叠加峰比多。乙腈所占流动相比比例为 25% 时，产率很低，说明流动相极性太低，样品在这种色谱柱上有残留。乙腈比例为 15% 样品产率比 25% 时候较高，而且出峰形状即分离样品纯度好于 5%，综合分析，选择流动相中乙腈比例为 15% 为最佳比例。

(2) 不同洗脱速度对花生肽分离效果的影响 (乙腈比例: 15%, 进样体积: 100 μ l, 进样浓度: 1mg/mL, TFA 添加量: 0.1%)

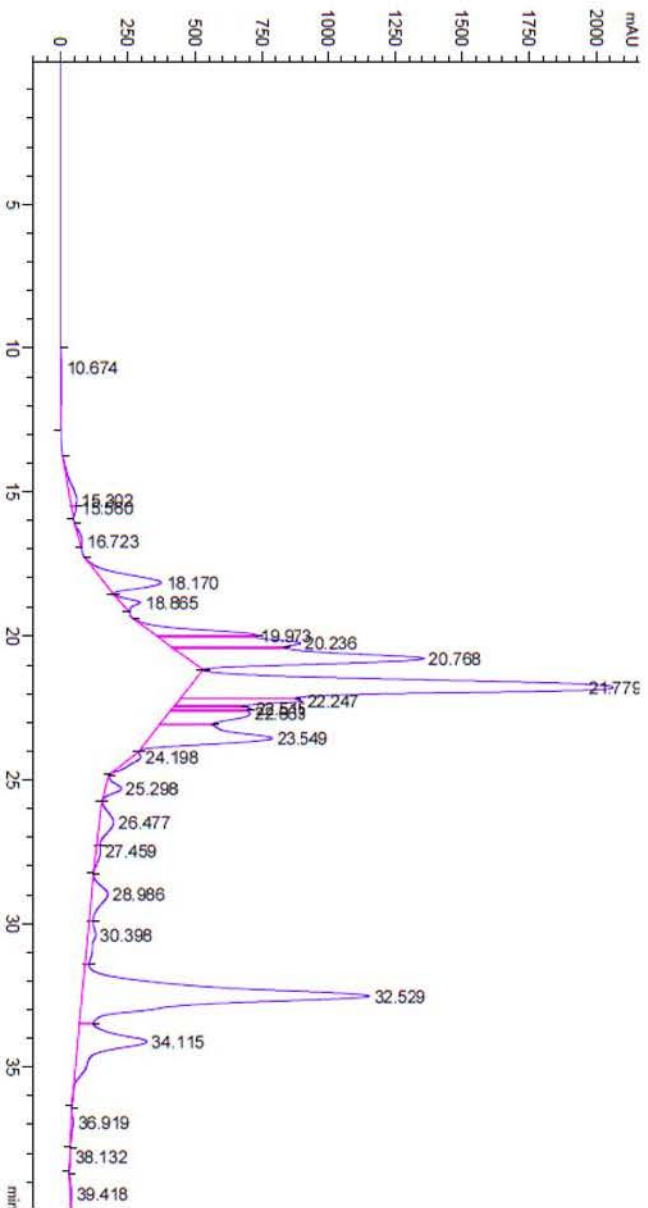


图 49 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 24
(流速: 0.5ml/min)

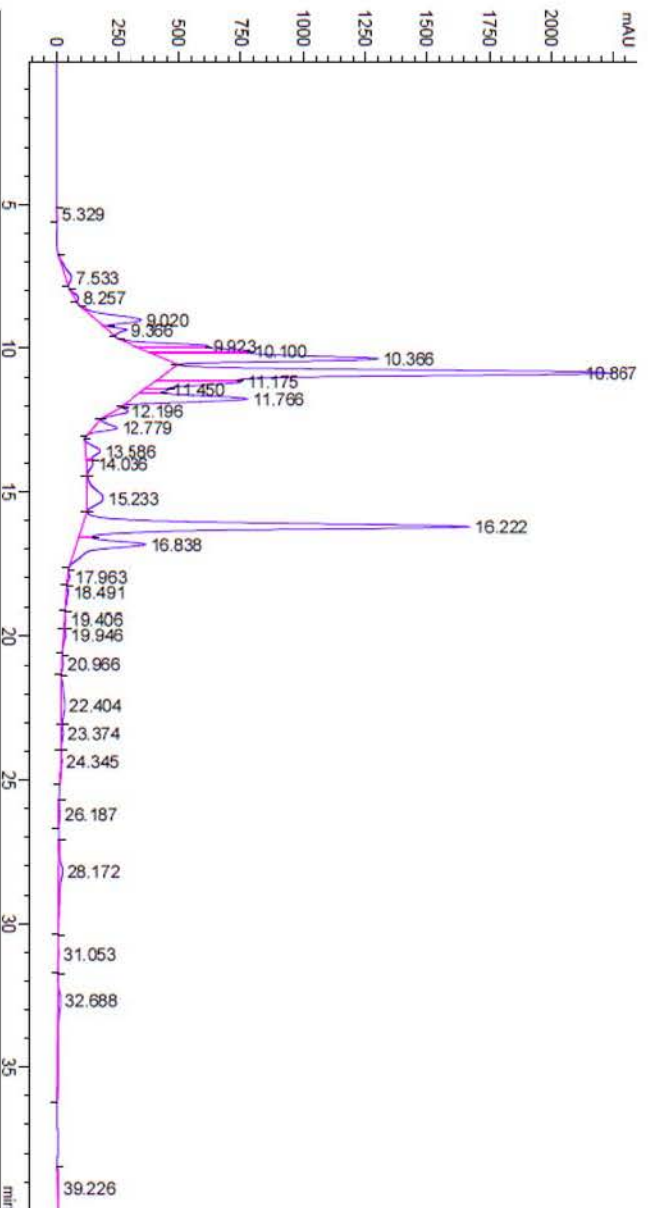


图 50 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 25
(流速: 1.0ml/min)

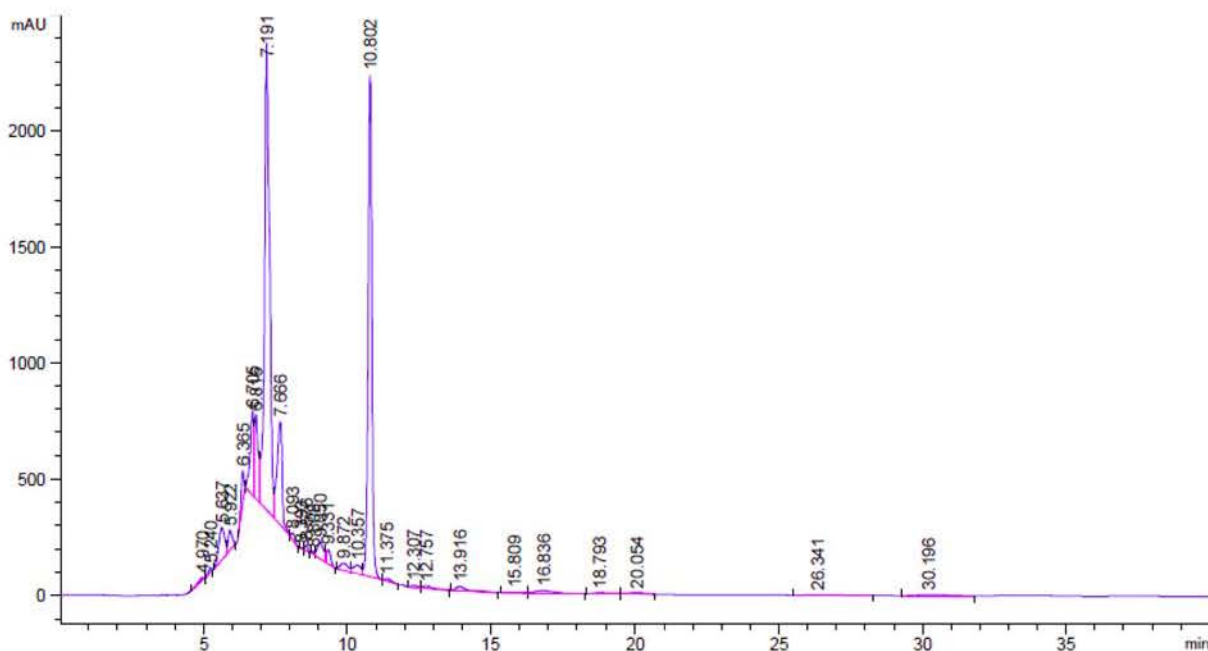


图 51 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 26

(流速: 1.5mL/min)

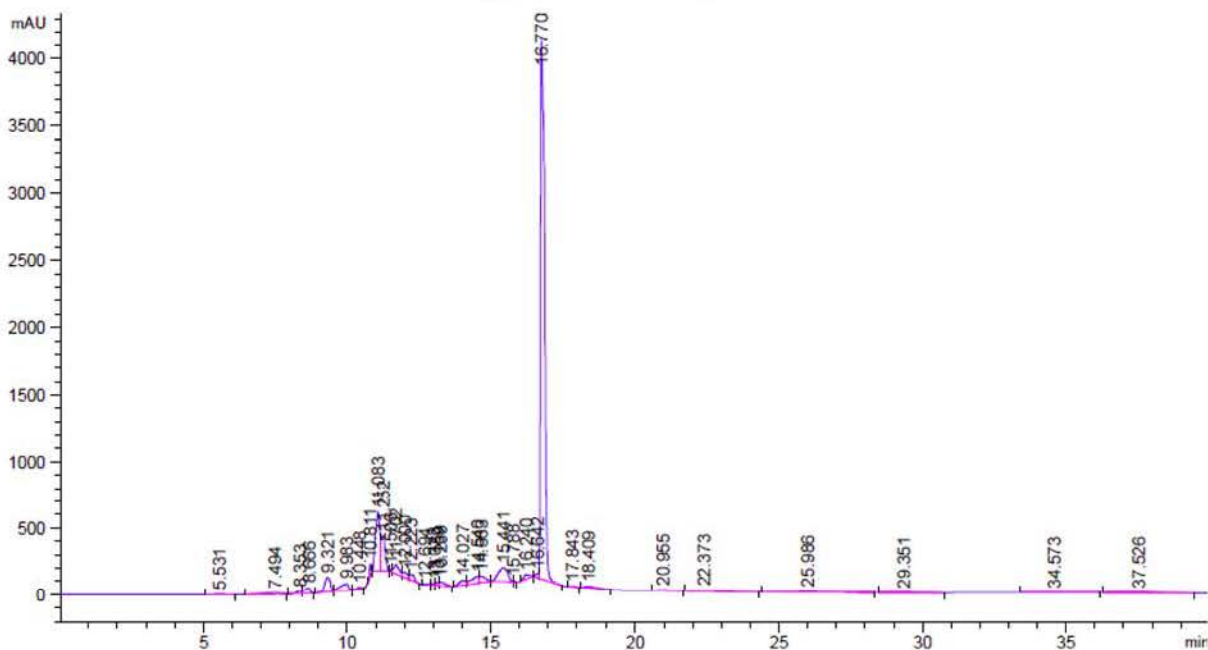


图 52 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 27

(流速: 2mL/min)

由以上四图可知：流速越慢整个洗脱周期循环越长。当流速为 2mL/min 的时候，波峰因为严重重叠而变形，分离组分的纯度最低。虽然图 52 比图 51 的循环周期短，但是波峰趋于重叠。只能为了纯度舍弃产率，选择最佳流速 1.5mol/min。

(3) 不同进样浓度对花生肽分离效果的影响（乙腈比例：15%，进样体积：100 μl，流速：1.5mol/min，TFA 添加量：0.1%）

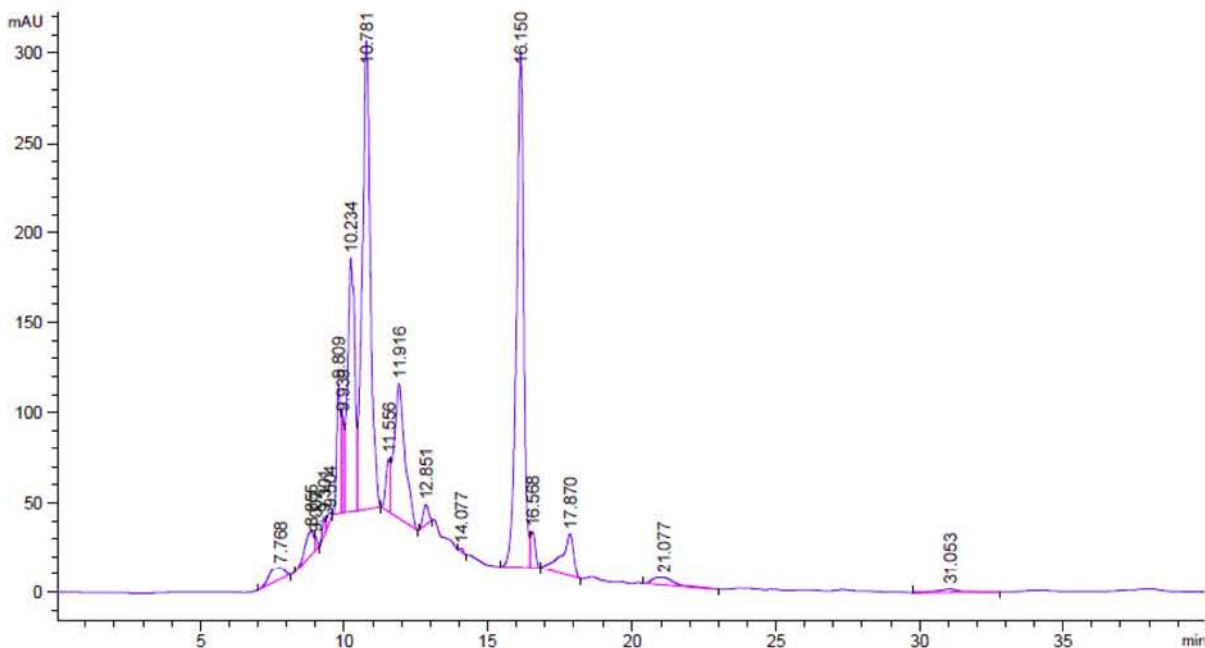


图 53 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 15

(浓度: 1mg/mL)

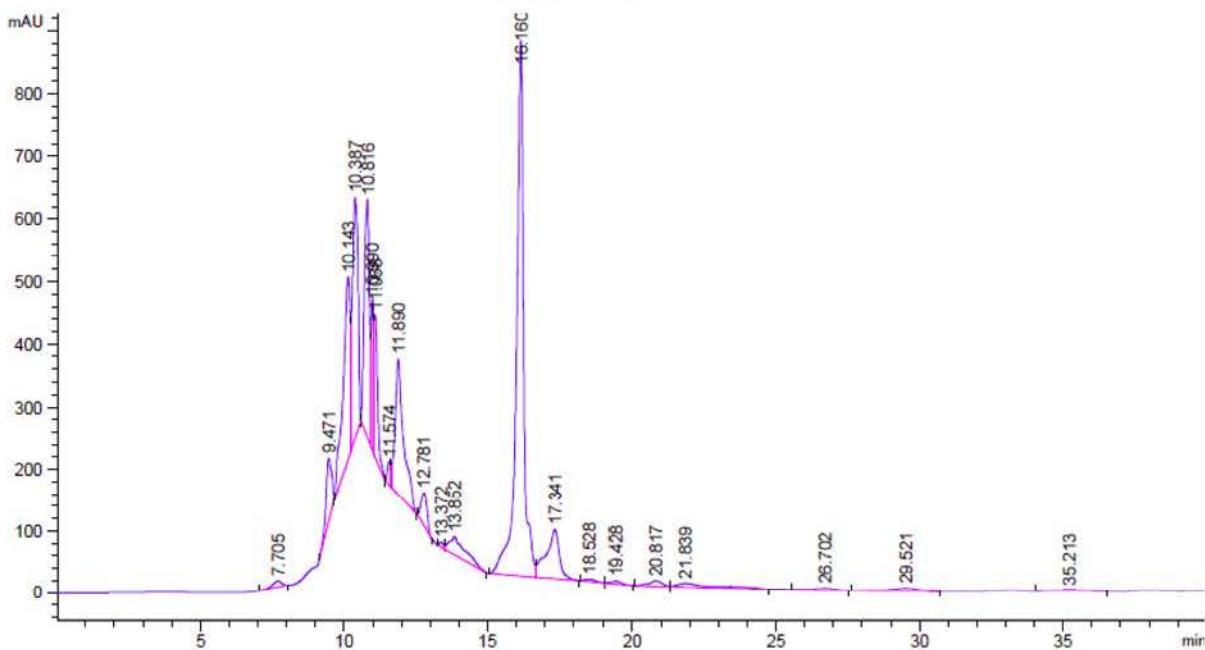


图 54 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 16

(浓度: 3mg/mL)

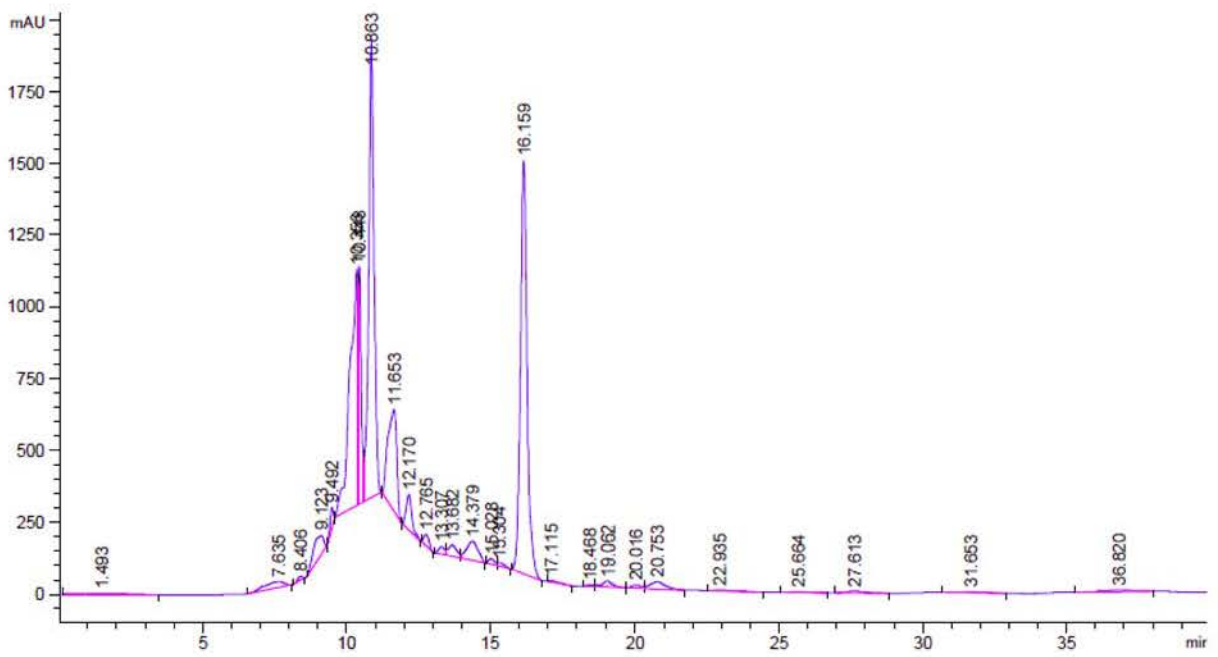


图 55 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 17

(浓度: 5mg/mL)

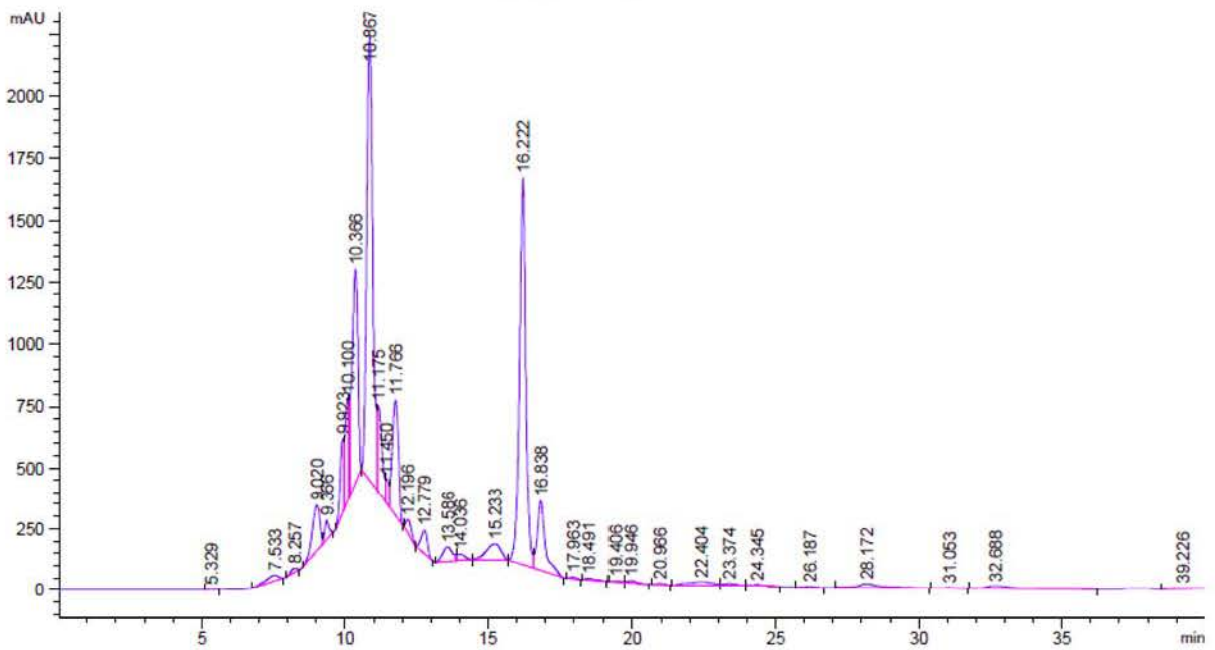


图 56 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 18

(浓度: 7mg/mL)

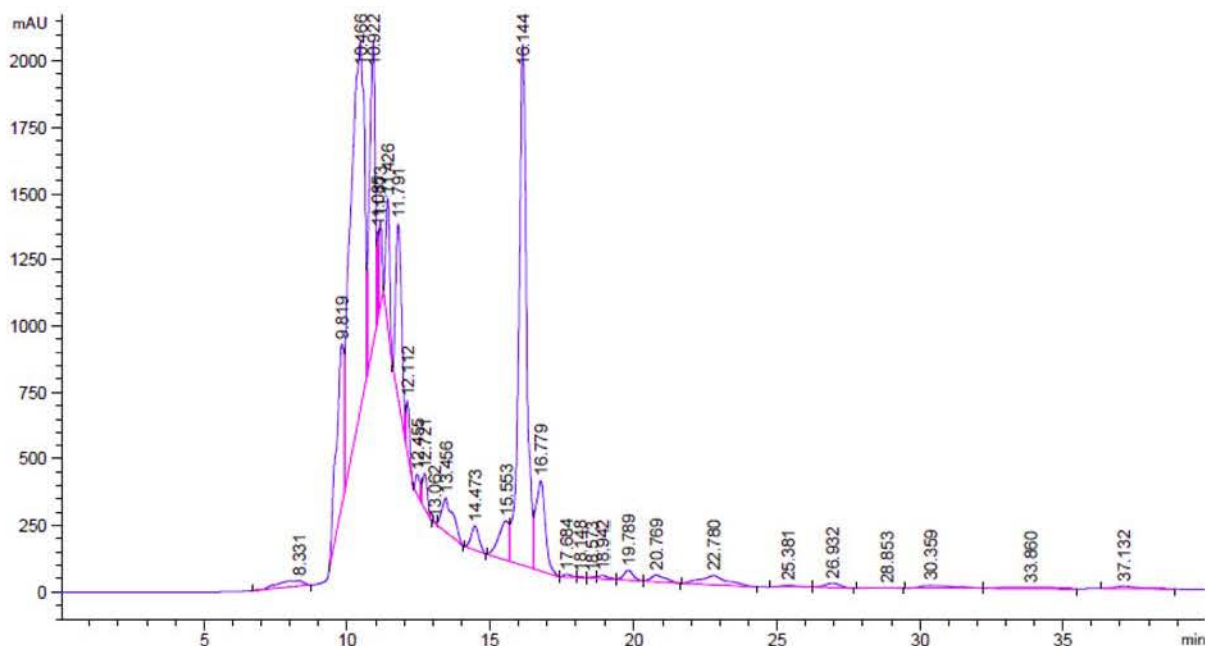


图 57 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 19

(浓度: 9mg/mL)

由以上各图说明：进样浓度越大，峰值越高，即提高浓度可以提高收集样品的产率。进样浓度在小于 7mg/mL 的时候，波峰的形状改变幅度不大，但是升高到 9mg/mL 时候，波峰严重重叠，即不再能成功将样品花生肽分离开，为了能够在满足产物纯度的情况下，尽量提高产率，结合柱子性能（浓度太高会增加柱压，崩溃），综合分析选择进样浓度为 7mg/mL。

(4) 不同进样体积对花生肽分离效果的影响（乙腈比例：15%，流速：1.5mol/min，进样浓度：7mg/mL，TFA 添加量：0.1%）

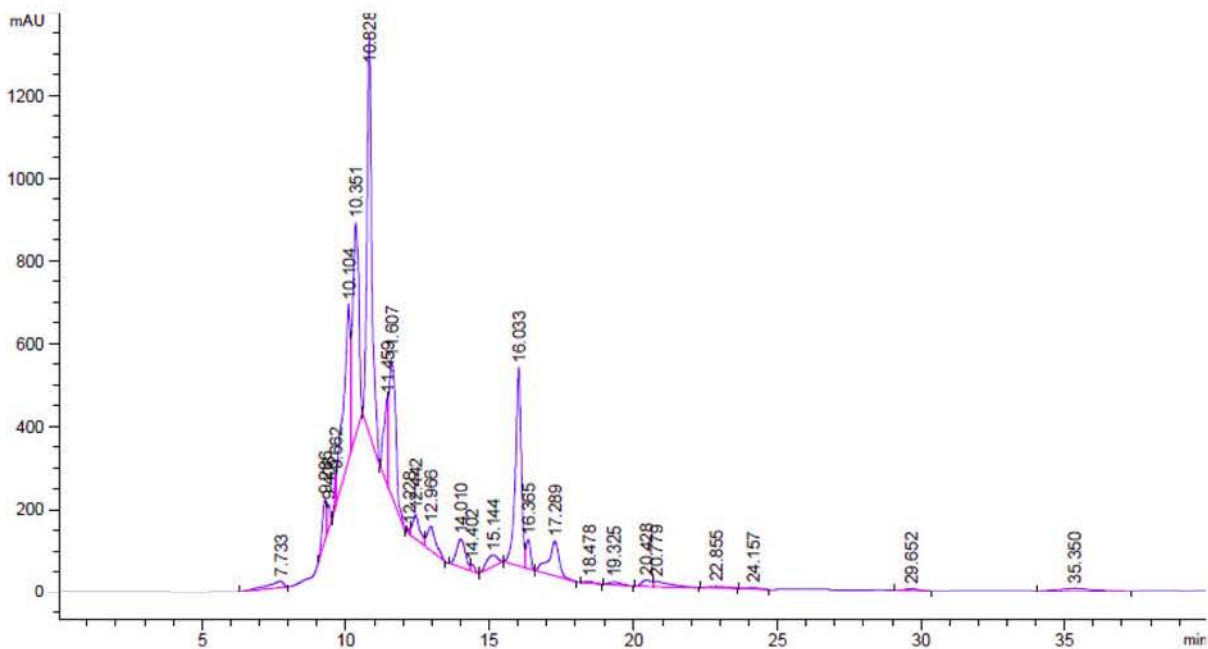


图 58 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 20

(进样体积: 40 μ L)

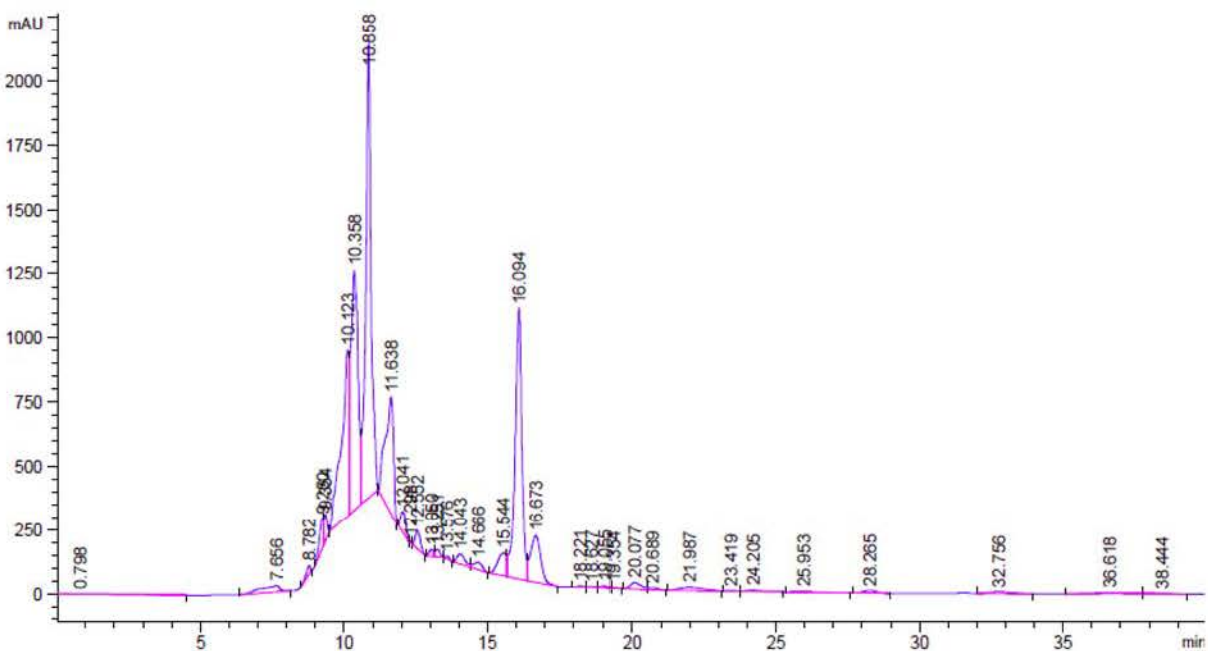


图 59 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 21

(进样体积: 60 μ L)

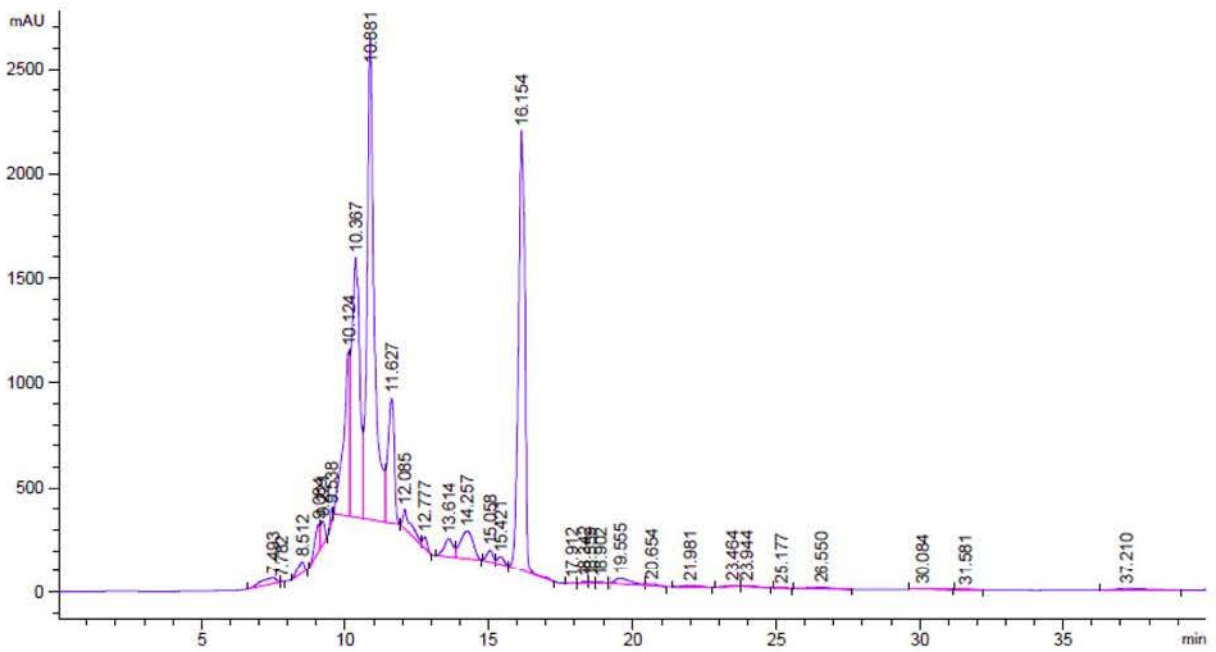


图 60 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 22

(进样体积: 80µL)

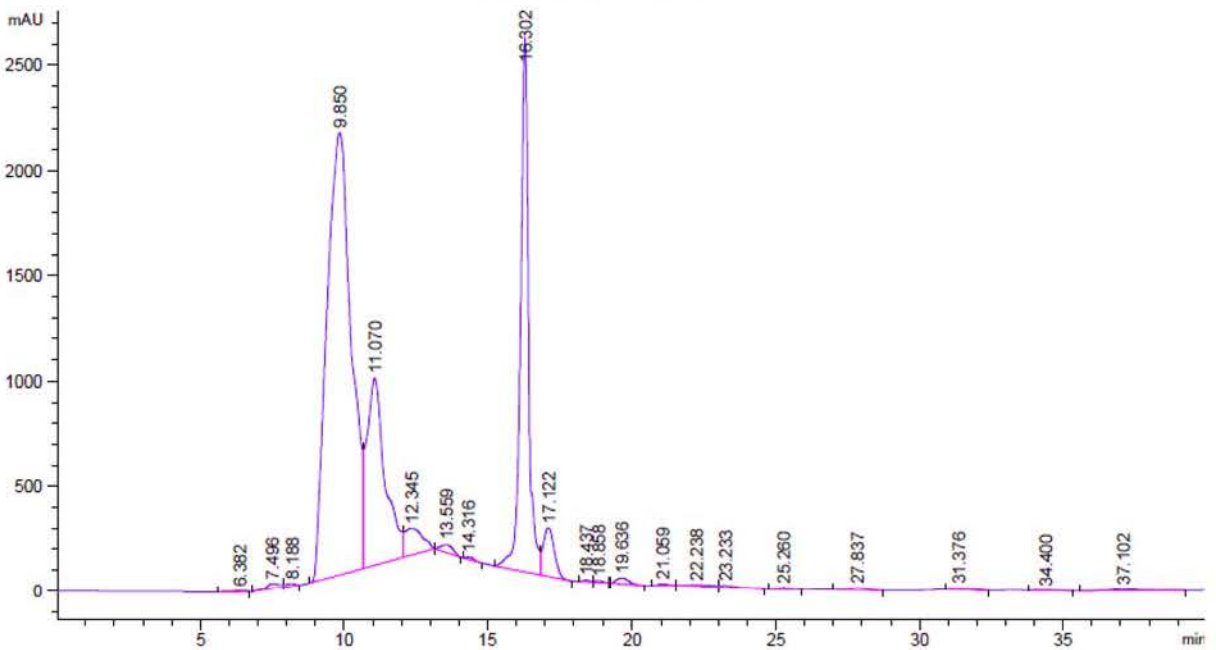


图 61 半制备 RP-HPLC 分离 G1 洗脱曲线 23

(进样体积: 100µL)

综合以上各图可知：进样体积过高，会使得波峰重叠变性，其实，增加上样体积和增加上样浓度的效果很相似，即体积越小，峰值越低，产率越低，但是过高会降低收集分离组分的纯度。综合收集样品的产率、纯度、柱子的性能分析，最终选择最佳花生肽的进样量为 80µL。

3.4.6 反相高效液相 (RP-HPLC) 分离花生肽各个成分的抗凝血活性

在优化之后的分离条件下分离 G2，如图 62 所示，一共收集了 5 个主要成分，真空旋蒸，用双缩脲法测得各组分的浓度为：0.40mg/mL，0.50mg/mL，0.70mg/mL，0.69mg/mL，0.75mg/mL，如图。由图可知，几个组分都含有一定量的花生肽，只是极性不同。为了能够使得测的抗凝血活性结果具有可比性，决定将每一个组分的浓度均稀释为 0.40mg/mL，所测得结果如图。几个组分的浓度虽然一样，但是抗凝血活性有很大的区别，这说明所分离的是几个性质不同的组分。其中，R3 和 R5 的抗凝血活性均能达到接近百分之百。将其测过抗凝血活性之后剩余的部分分别冷冻干燥，进行质谱分析。

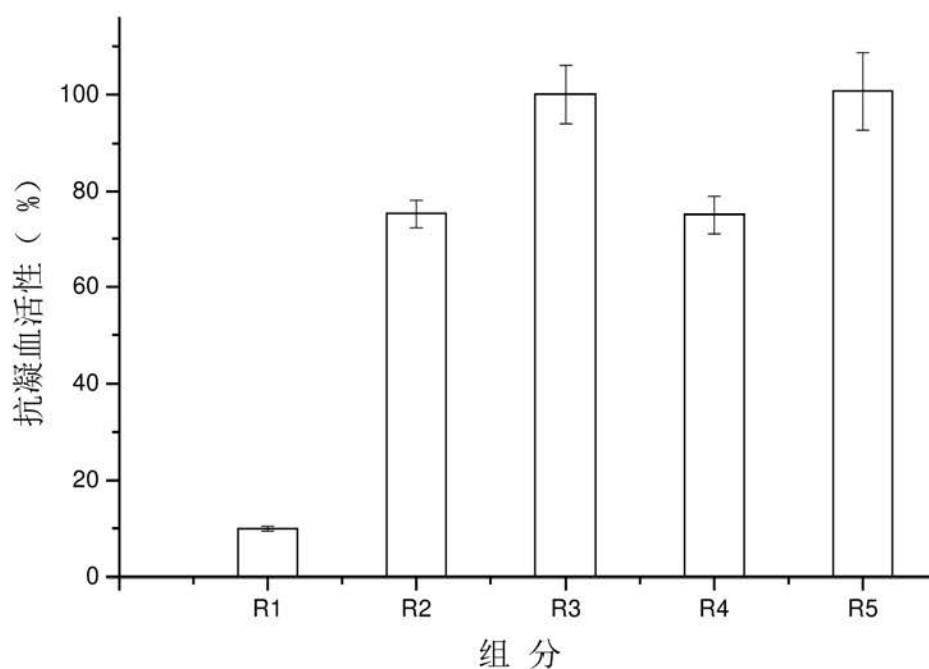


图 62 反相高效液相分离各个组分相同浓度下抗凝血活性比较

3.5 本章小结

(1) 采用制备液相色谱分离花生肽，比较了在不同流动相比比例、进样浓度和洗脱流速下样品的分离效果。结果表明，流动相比比例为乙腈：水=35:75 (v:v)、进样浓度 30mg/mL、流速 10mL/min 时花生肽的分离纯度、产率综合最好，并在此条件下收集得到 3 个主要组分。实验测得，各组分在不同浓度下均显示了一定的抗凝血活性，其中三组分在同浓度时候 G2 组分的抗凝血最高，在 40mg/mL 的时候凝血酶的抑制率达到 94.2%。

(2) 用半制备反相高效液相 (RP-HPLC) 分离 G2 组分，研究发现，无论是梯度洗脱还是定比例洗脱，采用流动相中已经的比例，三氟乙酸的浓度、流动相中流动相的比例以及变换时间、进样浓度和体积、都会对样品的分离效果造成重要的影响。确定梯度洗脱最佳洗脱条件为：流动相的流速 1.5mL/min，洗脱梯度：0~5min 100~85%A；5~20min 85~60%A；20~26min 60~0%A；26~28min 0%A；28~30min 0~100%A；30~40min 100%A (A: 100%水，含 0.1%TFA；B: 100%纯乙腈，含 0.1%TFA)，进样浓度为 1.5mg/mL；定比例洗脱的最佳洗脱条件为：洗脱液比例：乙腈：水=15:85 (v:v)，流速 1.5mL/min，进样浓度 7mg/mL，进样体积 80 μ l。综合考虑收集产品的产率、纯度等，决定选用定比例洗脱条件。在此条件下收集得到 5 个主要成分，其中 G2-R3 的抗凝血效果最好，在 0.40mg/mL 时，对凝血酶的抑制率几乎达到 100%。

第四章 高抗凝血活性花生肽的结构分析

4.1 引言

液质联用(LC-MS)主要可解决如下几方面的问题：①不挥发性化合物分析测定；②极性化合物的分析测定；③热不稳定化合物的分析测定；④大分子量化合物（包括蛋白、多肽、多聚物等）的分析测定；⑤没有商品化的谱库可对比查询，只能自己建库或自己解析谱图。应用 MALDI-TOF-MS 技术对蛋白质可准确测定相对分子质量信息,而采用液质联用技术可得到完整而精确的肽质量图谱^[60],可确证蛋白质氨基酸序列是否正确,并由此推断 DNA 序列是否正确,是鉴定蛋白质一级结构的完整性和准确性的重要方法^[60]。基质辅助激光解吸电离-飞行时间-飞行时间（matrixassist laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight, MALDI-TOF-TOF）串联质谱可直接用于测定肽段的氨基酸序列,其过程是利用基质吸收激光的能量将固相的多肽样品转换成气态带电荷离子，从一级质谱产生的分子离子中选择母离子，进入二级质谱，经惰性气体碰撞诱导解离（collision induced dissociation, CID）后肽链断裂，由所得碎片离子间的质量数差值即可推导出肽的氨基酸序列^[61]。

4.2 实验材料与设备

4.2.1 实验材料

实验材料：G2-R3、G2-R5

4.2.2 实验仪器与设备

色谱仪 UHPLC

WATERS ACQUITY UPLC

检测器 UV detector

WATERS ACQUITY PDA

工作站

Biolynx

质谱仪

WATERS MALDI SYNAPT Q-TOF MS

4.3 实验设计

4.3.1 实验方法

实验方法：液质联用（MALDI SYNAPT Q-TOF MS）

4.3.2 实验条件

4.3.2.1 液相色谱条件（UHPLC CONDITION）：

分析柱：BEH 130 2.1X150 mm 1.7 μ m

流动相 Mobile :A:100% 乙腈 Acetonitrile; B: 0.1 %甲酸 Formic acid , A+B=100%

[Gradient Table] RUN TIME 30min

1%A—1 min--1% A -----3 min -----30%A-----1 min-----100%A

柱温 Temp:45°C

流速 Flow rate:0.3 mL/min

进样量 Injection V:0.5 μ L

4.3.2.2 MS Conditions:

离子方式: ESI+

毛细管（Capillary）电压: 3.0 kVolts

锥孔（Cone）电压: 30 Volts

离子源（Source Block）温度:100°C

脱溶剂气（Desolvation）温度:400°C

Desolvation Gas Flow: 500lit/hr

碰撞（Cone Gas Flow）能量 (L/Hr):50 lit/hr

碰撞能量（Collision Energy)(eV):6 Volts

质量范围(mass range): 50----1500m/z

Detector 电压:1800 Volts

4.4 实验结果与分析

肽链在二级质谱分析中形成的碎片离子主要有以下 3 种^[62]: (1) 序列离子。如果肽离子的正电荷保留在碎片离子的 N 末端, 那么就得到 a, b, c 系列离子; 如果肽离子的正电荷保留在碎片离子的 C 末端, 就得到 x, y, z 系列离子。(2) 中间碎片离子, 包括中间酰基离子和亚氨离子。当两次解离都在肽键部位, 都产生 b, y 分割, 那些至少由 2 个氨基酸残基组成的碎片便称为中间酰基离子。当两次解离时, 一次产生 b, y 分割, 另一次产生 a, x 分割, 形成的碎片即为亚氨离子。因此, 亚氨离子的出现便意味着肽序列中含有相应的氨基酸残基。(3) 卫星离子。当轰击能量较高时, 氨基酸侧链也会被打断, 失去侧链的离子再经过肽键处断裂, 便形成卫星离子。此外, 还可能会产生氨基酸侧链脱氨离子(Gln, Lys, Arg)和脱水离子(Ser, Thr, Asp, Glu)。总体来说, b 系列和 y 系列离子出现的机率较大, 这是因为肽链中酰胺键更容易断裂^[63]。通过质谱分析得到 4 种肽链的序列。

4.4.1 液质联用分析 G2-R3

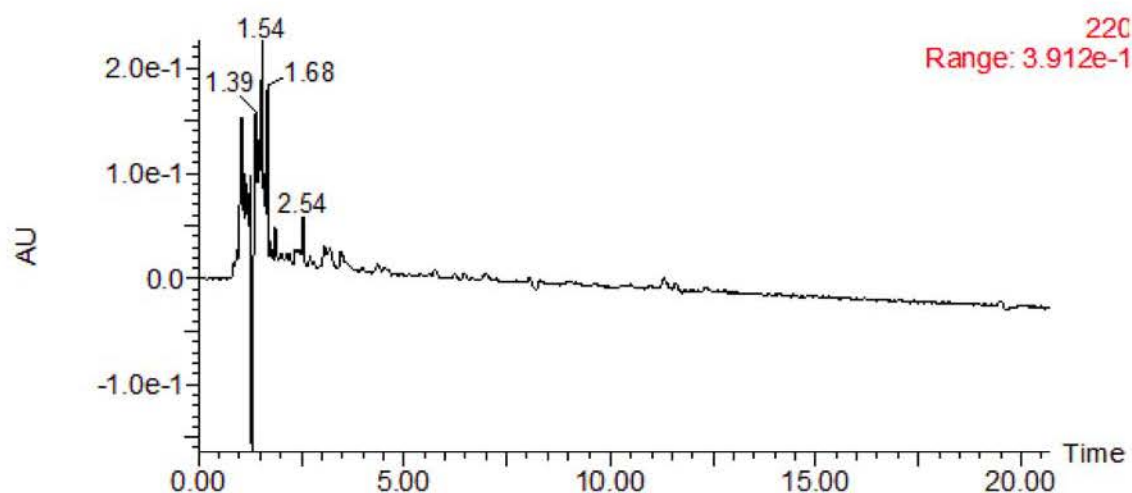


图 63 超高压液相分离 G2-R3

经过 UHPLC 分析可知 G2-R3 还有四个不同组分, 选择其中两个主要组分 (1.54min, 1.68min) 分别命名为 G2-R3-r1 和 G2-R3-r2, 测定其氨基酸序列。

4.4.1.1 G2-R3-r1 (1.54min)

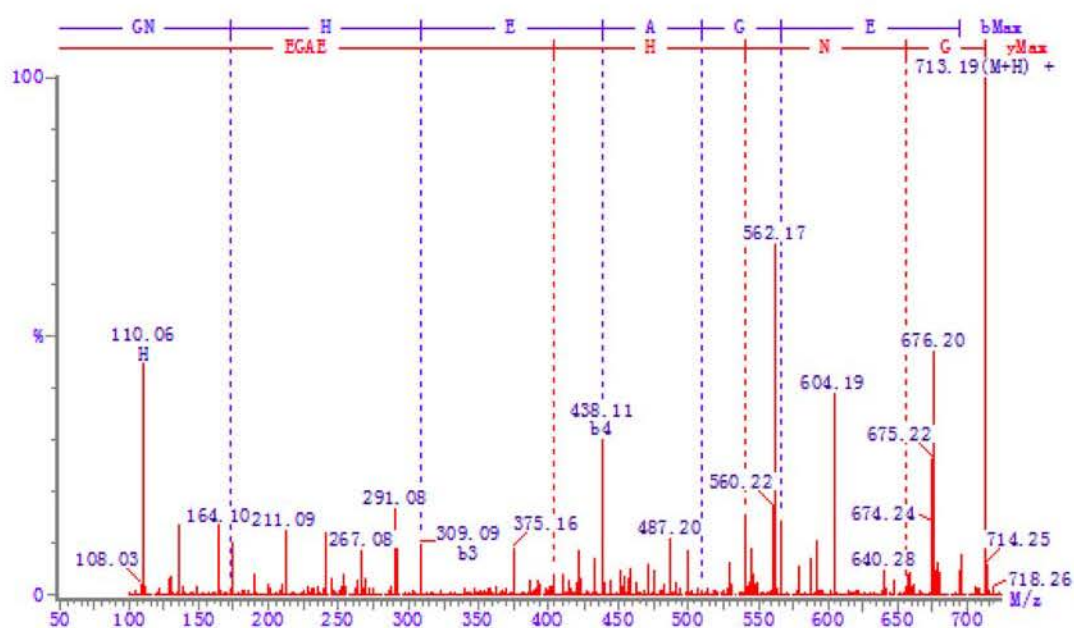


图 64 母离子 (m/z) 为 712.19 的二级质谱图

a	30.03	144.08	281.14	410.18	481.22	538.24	667.28
	---	---	---	0.05	---	0.07	---
b	58.03	172.07	309.13	438.17	509.21	566.23	695.27
	---	0.05	0.04	0.06	0.07	0.07	---
	Gly	Asn	His	Glu	Ala	Gly	Glu
	100	100	100	98	97	99	100
y	713.29	656.26	542.22	405.16	276.12	205.08	148.06
	---	0.10	0.07	0.06	---	---	---
z	696.26	639.23	525.19	388.13	259.09	188.05	131.03
	---	0.09	0.05	---	---	---	---

图 65 母离子 (m/z) 为 712.19 的氨基酸分析

根据图中给出的 b 系列离子 m/z 值 (b₁:102.06, b₂:217.08, b₃:331.13, b₄:402.16, b₅:459.18, b₆:558.25, b₇:695.31) 两两之间的差值可以推知: 在一级质谱中从肽链 C 端被依次轰击下来的 7 个片段的 m/z 值分别为 129.04 (b₇-b₆), 57.02 (b₆-b₅), 71.04 (b₅-b₄), 129.04 (b₄-b₃), 137.06 (b₃-b₂), 114.04 (b₂-b₁), 58.03 (b₁), 其对应的氨基酸残基分别为: Glu (Glu-H-OH, 146-1-17), Gly (Gly-H-OH, 75.07-1-17), Ala (Ala-H-OH, 89-1-17), Glu (Glu-H-OH, 146-1-17), His (His-H-OH, 155-1-17), Asn (Asn-H-OH, 132.12-1-17), Gly (Gly-OH, 75.07-17)。所以, m/z 值为 712.19 的肽离子的氨基酸序列应为: Gly-Asn-His-Glu-Ala-Gly-Glu。其理论相对分子质量和质谱测定值吻合。

4.4.1.2、G2-R3-r2 (1.68min)

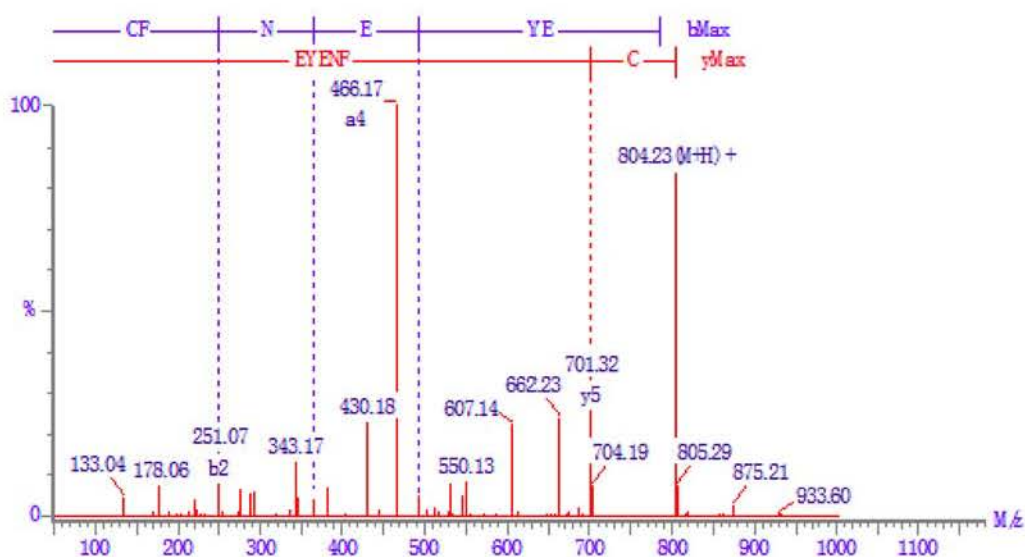


图 66 母离子 (m/z) 为 803.23 的二级质谱图

Observed MW :803.1922 Precursor in charge state:1
 M/z tolerance:0.30 Intensity threshold:153 (0.750%)

a	76.02	223.09	337.13	466.18	629.24	758.28
	—	0.01	—	0.01	—	—
b	104.02	251.09	365.13	494.17	657.23	786.28
	—	0.02	0.04	0.06	—	—
	Cys	Phe	Asn	Glu	Tyr	Glu
	100	56	51	33	32	33
y	804.29	701.28	554.21	440.17	311.12	148.06
	—	-0.04	—	—	—	—
z	787.26	684.25	537.18	423.14	294.09	131.03
	—	-0.05	—	—	—	—

图 67 母离子 (m/z) 为 803.23 的氨基酸分析

根据图中给出的 b 系列离子 m/z 值 (b1:104.02,b2:251.09,b3:365.13,b4:494.17,b5:657.23,b6:786.28) 两两之间的差值可以推出: 在二级质谱中从肽链 C 端被依次轰击下来的 6 个片段的 m/z 值分别为 129.05 (b6-b5), 163.06 (b5-b4), 129.04(b4-b3), 114.04(b3-b2), 147.07(b2-b1), 104.02(b1), 其对应的氨基酸的分别为: Glu (Glu-H-OH, 146-1-17), Tyr (Tyr-H-OH, 181.20-1-17), Glu (Glu-H-OH, 146-1-17), Asn (Asn-H-OH, 132.12-1-17), Phe (Phe-H-OH, 165.19-1-17), Cys (Cys-OH, 121-1-17), 本肽链中含有的半胱氨酸 (Cys) 的匹配度为 100%。所以, m/z 值为 804.23 的肽离子的氨基酸序列应为: Cys-Phe-

Asn-Glu-Tyr-Glu。其理论相对分子质量和质谱测定值吻合。

4.4.2 液质联用分析 G2-R5

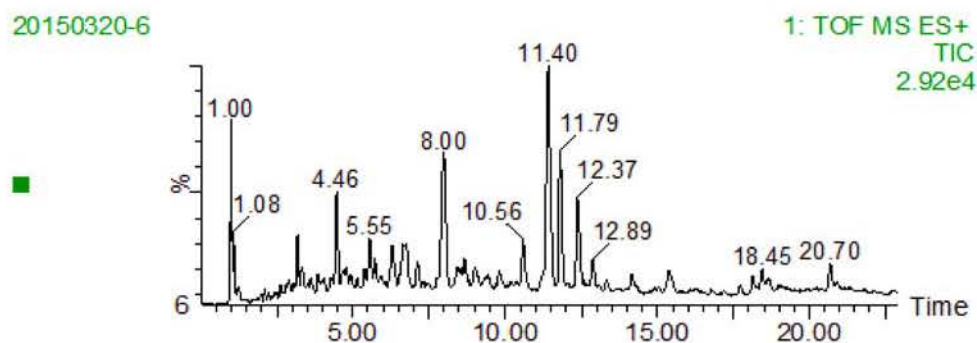


图 68 G2-R5 的总离子色谱图

图为 G2-R5 的总离子色谱图，从中选出两个主要组分（4.46min,11.40min）分别命名为 G2-R5-r1 和 G2-R5-r2。

4.4.2.1、G2-R5-r1 (4.46min)

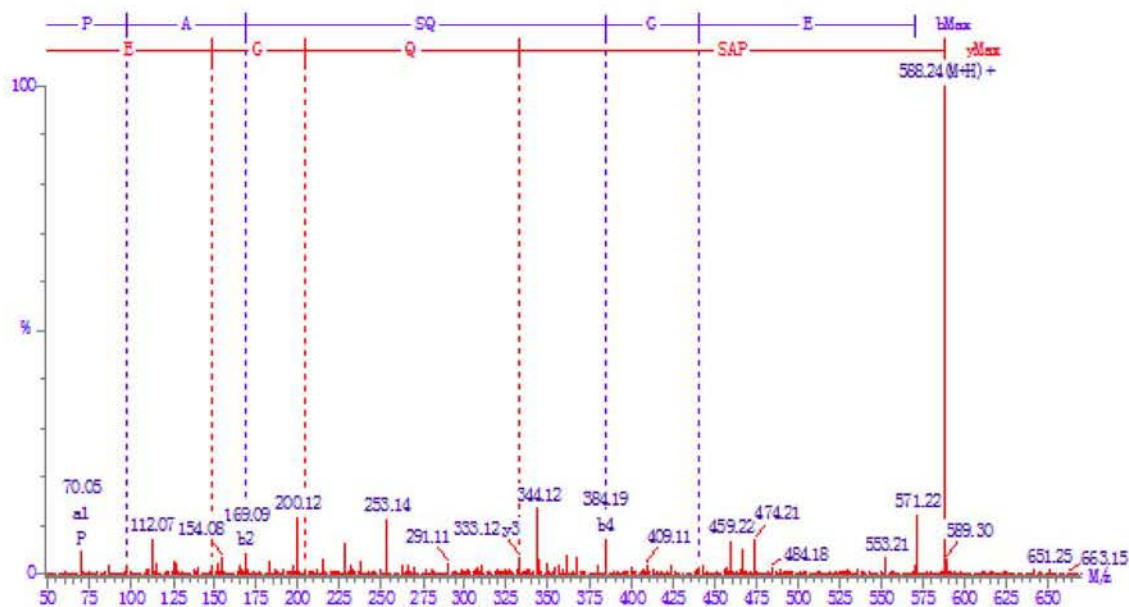


图 69 母离子 (m/z) 为 587.24 的二级质谱图

Observed MW :586.9922 Precursor ion charge state:1
M/z tolerance:0.30 Intensity threshold:19 (0.750%)

a	70.07 0.01	141.10 0.02	228.13 0.03	356.19 0.00	413.21 —	542.26 —
b	98.06 0.01	169.10 0.01	256.13 —	384.19 -0.00	441.21 0.01	570.25 —
	Pro 88	Ala 88	Ser 88	Gln 88	Gly 100	Glu 100
y	588.26 —	491.21 —	420.17 —	333.14 0.02	205.08 -0.02	148.06 0.00
z	571.23 —	474.18 -0.03	403.14 —	316.11 —	188.05 —	131.03 —

图 70 母离子 (m/z) 为 587.24 的氨基酸分析

根据图中给出的 y 系列离子 m/z 值(y1: 148.06; y2: 205.08; y3: 333.14; y4: 420.17, y5:491.21,y6:588.26)两两之间的差值可以推知,在二级质谱中从肽链 N 端被依次轰击下来的 6 个片段的 m/z 值分别为 97.05(y6-y5),71.04(y5-y4),87.03 (y4-y3) ,128.06(y3-y2),57.02(y2-y1),148.06(y1),其对应的氨基酸残基分别为: Pro,Ala,Ser,Gln,Gly,Glu, 所以, m/z 值为 588.24 的肽离子的氨基酸序列应为 Pro-Ala-Ser-Gln-Gly-Glu。其理论相对分子质量和质谱测定值吻合。

4.4.2.2、G2-R5-r2 (11.4min) 相对分子质量

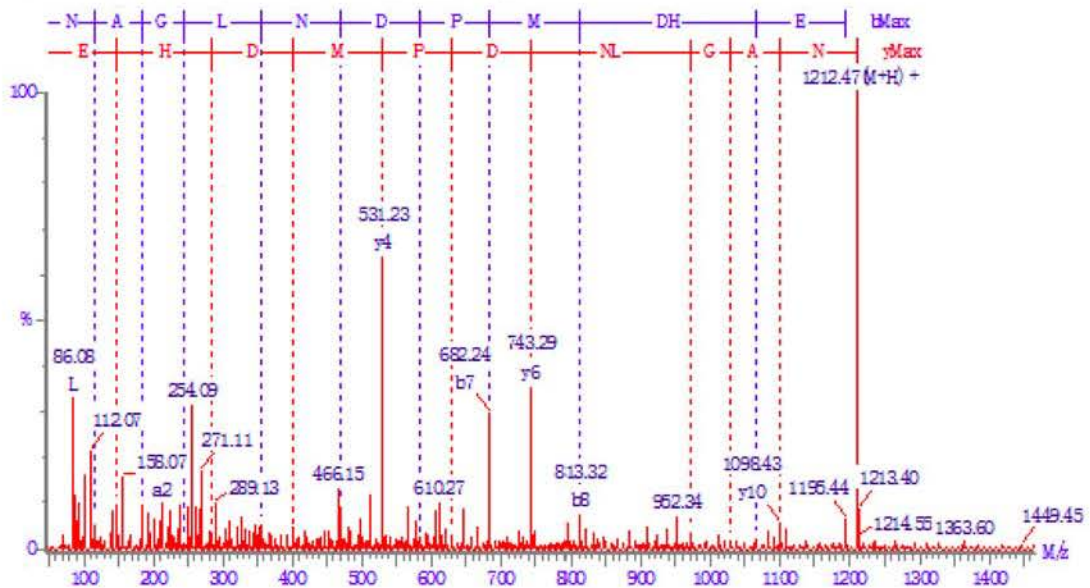


图 71 母离子 (m/z) 为 1212.47 的二级质谱图

Observed MW : 1211.4622 Precursor in charge state: 1
M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 33 (0.750%)

a	87.06 0.01	158.09 0.02	215.11 —	328.20 0.02	442.24 0.04	557.27 -0.03	654.32 —	785.36 0.09	900.39 0.01	1037.45 -0.00	1166.49 —
b	115.05 -0.02	186.09 0.02	243.11 -0.01	356.19 -0.01	470.24 0.04	585.26 0.04	682.32 0.07	813.36 0.04	928.38 —	1065.44 0.07	1194.48 —
	Asn 74	Ala 74	Gly 100	Leu 84	Asn 84	Asp 99	Pro 88	Met 60	Asp 58	His 58	Glu 58
y	1212.50 —	1098.45 0.02	1027.42 0.08	970.39 0.05	857.31 —	743.27 -0.02	628.24 -0.00	531.19 -0.04	400.15 -0.02	285.12 -0.01	148.06 0.02
z	1195.47 —	1081.42 0.01	1010.39 0.00	953.36 -0.02	840.28 -0.08	726.24 -0.02	611.21 -0.01	514.16 -0.05	383.12 —	268.09 -0.03	131.03 —

图 72 母离子 (m/z) 为 1212.47 的氨基酸分析

根据图中给出的 y 系列离子 m/z 值(y1: 148.06; y2: 285.12; y3:400.15; y4: 531.19, y5:628.14,y6:743.27, y7:857.31,y8:970.39,y9:1027.42,y10:1098.45,y11:1212.50)两两之间的差值可以推知,在二级质谱中从肽链 N 端被依次轰击下来的 11 个片段的 m/z 值分别为 114.05(y11-y10),71.03(y10-y9),57.03(y9-y8),113.08(y8-y7),114.04(y7-y6),115.03(y6-y5),97.05(y5-y4),131.04 (y4-y3) ,115.03(y3-y2),137.06(y2-y1),148.06(y1),其对应的氨基酸残基分别为: Asn,Ala,Gly,Leu,Asn,Asp,Pro,Met,Asp,His,Glu 综上所述可知, m/z 值为 1212.47 的肽链氨基酸序列为: Asn-Ala-Gly-Leu-Asn-Asp-Pro-Met-Asp-His-Glu。其理论相对分子质量和质谱测定值吻合。由于质谱不能区分 Leu 和 Ile,所以序列中 Leu 也有可能为 Ile^[64]。

4.5 本章小结

G2-R3-r1 Gly-Asn-His-Glu-Ala-Gly-Glu

G2-R3-r2 Cys-Phe-Asn-Glu-Tyr-Glu

G2-R5-r2 Pro-Ala-Ser-Gln-Gly-Glu

G2-R5-r4 Asn-Ala-Gly-Leu-Asn-Asp-Pro-Met-Asp-His-Glu

由以上四条活性肽的氨基酸组成可以看出：G2-R3-r1 含有 7 种氨基酸，G2-R3-r2 和 G2-R5-r2 均含有 6 种氨基酸，G2-R5-r4 有 11 种氨基酸。其中出现频率最高的是 Asp,Asn,Glu;其次是 Gly,Ala。其中 Asp（天冬氨酸）是花生子叶蛋白的主要成分。凝血酶分子含有一个催化三联体(Asp102、His57 及 Ser195),这是凝血酶的催化活性位点^[21]。Cherkasova^[65]等发现 Pro-Gly+Gly-Pro 具有很高的抗凝血活性，其中含有在本实验中高频率出现的氨基酸 Gly，可以预想：通过合成 Asp-Asn-Glu-Gly，可能开发出更高活性和专一性的凝血酶抑制物。

第五章 结论与展望

5.1 结论

5.1.1 对花生肽和花生蛋白抗凝血活性的研究

(1) 考察了花生脱红衣蛋白、花生不脱红衣蛋白和大豆蛋白的抗凝血活性，发现三者均对凝血酶的抑制有一定的效果。最后确定用不脱红衣的花生制备花生分离蛋白。

(2) 通过比较不同浓度下花生蛋白和花生酶解物的抗凝血活性，发现花生蛋白的抗凝血酶活性远不及花生酶解物，说明花生酶解后能够将具有抗凝血活性的短肽释放出来，决定对花生分离蛋白进行水解来制备具有高抗凝血活性的物质。

(3) 检测发现碱性蛋白酶 2709、Alcalase 2.4L、Protex 6L 三种蛋白酶本身并不具有抗凝血酶活性，不会影响实验结果的准确性，即花生蛋白和花生酶解物是起抗凝血活性作用的全部因素。

(4) 通过比较冷冻干燥前后酶解物的抗凝血活性的 IC₅₀ 发现：冷冻干燥过程对酶解物的抗凝血活性没有影响。

5.1.2 对制备花生蛋白和高抗凝血活性花生肽方法的研究

(1) 以晒干的花生为原料，采用刘向军（略有改动）制备花生蛋白的方法即碱提酸沉的方法来提取花生分离蛋白。将用万能粉碎机磨碎的花生粉末进行索氏抽提，在 pH9.5 的条件下碱提、在 pH4.5 的条件下酸沉，离心、溶解、冷冻干燥后，得到蛋白质含量为 83.1% 的花生蛋白。

(2) 通过对响应曲面和方差分析确定了 Alcalase 2.4L 酶解花生分离蛋白的最佳工艺条件：底物浓度 5.0g/100mL，加酶量为 5000U/(g 蛋白)，反应温度 55℃，pH 9，酶解时间 2h。在此条件下酶解液冻干后花生肽含量为 80.16%，在浓度为 60mg/mL 的时候抗凝血酶活性可达到 86.62%。明显优化条件后酶解物的抗凝血活性有很大提高。

(3) 通过对响应曲面分析确定了 Alcalase 2.4L 酶解花生分离蛋白的最佳工艺条件：底物浓度 5.0g/100mL，加酶量为 7000U/(g 蛋白)，反应温度 55℃，pH 8.5，酶解时间 2h。在此条件下酶解液冻干后花生肽含量为 80.16%，抗凝血酶活性可达到 92.8%。

5.1.3 对制备分离高抗凝血活性花生肽方法的研究

(1) 采用制备液相色谱分离花生肽, 比较了在不同流动相比比例、进样浓度和洗脱流速下样品的分离效果。结果表明, 在条件为流动相比比例为乙腈: 水=25:75 (v:v)、进样浓度 20mg/mL、流速 5mL/min 时花生肽的分离纯度、产率综合最好, 并在此条件下收集得到 3 个主要组分, 其中在同浓度时候 G2 组分的抗凝血最高: 浓度为 40mg/mL 的时候凝血酶的抑制率达到 94.2%。收集得到的分离产物的抗凝血活性的 IC₅₀ 明显比之前制备出来的产物抗凝血活性高。说明通过液相制备色谱仪纯化了具有高抗凝血活性的花生肽。

(2) 用半制备反相高效液相 (RP-HPLC) 分离 G2 组分, 研究发现, 无论是梯度洗脱还是定比例洗脱, 采用流动相中的比例, 三氟乙酸的浓度、流动相中流动相的比例以及变换时间、进样浓度和体积、都会对样品的分离效果造成重要的影响。综合考虑收集产品的产率、纯度等, 决定选用定比例洗脱条件。在优化条件下条件下收集得到 5 个主要成分, 其中 G2-R3 的抗凝血效果最好, G2-R3 的抗凝血活性次之, 在 0.40mg/mL 时, 对凝血酶的抑制率均接近 100%, 此时已经活得具有高纯度、高抗凝血活性的花生肽。

5.1.4 对高抗凝血活性结构和其抗凝血活性之间关系的研究

采用液质联用分别分析组分 G2-R3 和 G2-R5 的结构, 在 G2-R3 鉴定出 2 个活性肽结构, 分别是 Gly-Asn-His-Glu-Ala-Gly-Glu (分子量:712.19) 和 Cys-Phe-Asn-Glu-Tyr-Glu (分子量:803.23); 在 G2-R5 中鉴定出 2 个活性肽结构, 分别是 Pro-Ala-Ser-Gln-Gly-Glu (分子量:587.24) 和 Asn-Ala-Gly-Leu-Asn-Asp-Pro-Met-Asp-His-Glu (分子量:1211.47)。

5.2 本论文的创新点

从花生蛋白酶解物中分离鉴定出几种具有抗凝血活性的肽。研究单一活性肽的氨基酸序列与抗凝血活性之间的关系。

5.3 展望

花生是世界重要的油料作物，花生肽作为花生的深加工产品，已经被人们广泛应用于保健食品系列。用酶标仪法测得花生蛋白具有一定的抗凝血活性，但是效果不是很明显，由于本实验分离制备出具有高抗凝血活性的花生肽，并用液质联用技术对制备出的花生肽进行了识别，并分析了具有抗凝血活性肽的氨基酸序列。根据已经测出的结构可以合成具有高抗凝血肽结构，进一步加工成具有预防脑血栓的功能的保健食品。

参考文献

- [1] 裴剑慧,马荣山. 我国花生资源的开发利用[J].中国食物与营养, 2006(2):24-26.
- [2] Ram A., Singh S. K., Larroche C., et al. Oil cakes and their biotechnological applications: a review [J] Bioresource Technology, 2007, 98(10) : 2000- 2009.
- [3] 高焕春,李文英,吕晓玲.花生蛋白质稳定性及加工品工艺条件的研究[J].中外技术情报,1995,12: 39-4.
- [4] Cherry J.P., Dechary J.M., Ory R.L. Gel electrophoretic analysis of peanut proteins and enzymes.I.Characterization of DEAE-cellulose separated fractions [J]. Food Chemistry,1973, 21(4): 652-625.
- [5] 杜寅. 花生蛋白主要组分的制备及凝胶特性研究[D]:[硕士学位论文].北京:中国农业科学院,2012. 38.
- [6] 孟凡莉. 花生肽的酶法制备、分离纯化及其抗氧化活性研究[D].合肥工业大学,2010.
- [7] 刘阳,邢福国. 花生蛋白的开发和利用现状[J]. 食品科技, 2008,33(7):173-176.
- [8] 周瑞宝. 花生加工技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2003.
- [9] 杨伟强,李鹏,袁涛等. 从花生蛋白粉中提取花生分离蛋白的条件优化[J],2009,1,34-37.
- [10] 张宇昊,王强. 花生蛋白的开发与利用[J]. 花生学报.2005,34(4):12-16.
- [11] 许均华. 花生分离蛋白肽解制备工艺优化及其功能特性研究[D].中南大学,2012
- [12] 阚建全. 食品化学[M].第二版.北京:中国农业出版社,2008,58.
- [13] 王晓坤,侯利霞,王金水等. 花生肽的提取纯化及生物活性研究进展[J].油脂工程,2011(3):54-57.
- [14] 张云茹,张彩琴,余瑛等.生物化学实验”蛋白质沉淀反应与盐析作用”解析[J].实验室科学,2011,14(1): 60-63.
- [15] 张建荣,马俪珍,梁鹏. 鲶鱼骨蛋白酶解物中抗菌活性物质的初步分离纯化[J], 食品与发酵工业,2009,2,48-52.
- [16] Wang J.Y., ShueY .S., Chang H.M.. Antioxidative activity of roasted and

- defatted peanut kernels [J]. *Food Research International*, 2001, 34: 639~ 647.
- [17] Chavan V.D., McKenzie D. B., Shahidi F.. Functional Properties of Protein Isolates From Beach Pea *Food Chem*[J], 2001, (74):177-187.
- [18] 胡志超,陈有庆,王海鸥. 我国花生田间机械化生产技术路线[J]. *中国农机化*, 2011, 04.
- [19] 刘聃. 花生蛋白肽的检测及抗氧化活性研究[D]. 西南大学, 2013.
- [20] 刘大川,刘晔,沈娜娜. 花生肽的制备及其功能[J]. *中国油脂*, 2008, 3(1), 119-224.
- [21] 杨万根. 蛋清蛋白水解物的制备结构及其生物活性的研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.
- [22] 刘博文,刘晓庚. 浅谈中国花生产业发展的优势与策略[J]. *粮食科技与经济*, 2011, 36(1):9-11, 23.
- [23] 刘丽华,何东平,张声华. 花生蛋白水解工艺的优化及水解产物分子量分布的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(10):106-110.
- [24] 封小龙. 花生蛋白组分制备、改性及应用研究[D]. 中国农业科学院,农产品加工研究所研究生院, 2013.
- [25] 赵晓燕,孙秀平,陈锋亮. 花生蛋白的研究进展与开发利用现状[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(12):118-122.
- [26] Mohamed A .A., Xu, J .Y.. Effect of ionic strength and pH on the thermal and rheological properties of soy protein-amylopectin blend [J] .*Food Chemistry*, 2003, 83: 227- 236.
- [27] Chung S.Y., Swanson H.E., Catignani G.L.. Effects of alkali treatment and treatment in the presence of fructose on digestibility of food Proteins as determined by and immobilized digestive assay. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 1986, 34:579- 584.
- [28] Decker E., A&Cram A. D.. Antioxidant activity of carnosine in cooked ground Pork. *Meat Sci*, 1993, 34:245.
- [29] 张宇昊. 花生短肽制备及其功能活性研究[D]. 中国农业科学院,农产品加工研究所研究生院, 2007.
- [30] 成静,袁宏丽,莫朝晖等. 复方花生肽口服液对化学性肝损伤的保护作用[J], *食品工*

业科技, 2014,7 (21) : 362-364.

[31] 彭维兵,陈维云,王雪等. 花生肽的体外抗氧化活性研究[J].2013,26(6),28-30,44.

[32] 刘聃. 花生蛋白肽的检测及抗氧化活性研究[D].重庆,西南大学,2013.

[33] 许均华,李高阳. 花生肽酶法制备及分离纯化的研究进展[J],油脂工程.2011,5:59-63.

[34] Kikelj D.. Peptidomimetic thrombin inhibitors[J]. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003/2004, 33: 487- 491.

[35] Zavalova L. L., Basanova A. V., Baskova I. P.. Fibrinogen - Fibrin System Regulators from Bloodsuckers[J]. Biochemistry (Moscow), 2002, 67(1): 135- 142. Translated from Biokhimiya, 2002, 67: 157-166.

[36] 田垒, 霍建丽, 王卫国等. 新的抗凝血三肽及其改造物的合成和生物活性[J]. 西北药学杂志, 2009, 24: 191-194.

[37] Qian Z. Y., Jolles P., Migliore-Samour D., et al. Sheep k-casein peptides inhibit platelet aggregation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995,1244(2-3):411-417.

[38] 刘静波, 王菲, 王翠娜等. 酶解蛋清粉制备抗凝血肽的工艺优化[J]. 吉林大学学报(工学版), 2012, 42(1): 250-255.

[39] 刘静波, 王菲, 张燕等. 蛋清源凝血酶抑制肽的纯化[J]. 吉林大学学报(工学版)2012, 42(1): 466-469.

[40] Rojas-Ronquillo R., Cruz-Guerrero A., Flores-Nájera A.. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by Lactobacillus casei Shirota[J]. International Dairy Journal, 2012, 26: 147-154.

[41] Nasri R., Amor I. B., Bougatef A., et al. Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2012, 133: 835-841.

[42] 杨万根, 张煜, 王璋等. 蛋清蛋白酶解物的抗氧化、抗凝血酶活性及生化特性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29: 202-207.

[43] 潘牧. 脱皮冷榨菜籽粕中菜籽蛋白的制备及其性质的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.

[44] 章绍兵. 水酶法从油菜籽中提取油和生物活性肽的研究[D]. 无锡: 江南大学,

2008.

[43] 潘牧. 脱皮冷榨菜籽粕中菜籽蛋白的制备及其性质的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.

[45] 王章存, 康艳玲. 花生蛋白研究进展[J]. 粮食与油脂, 2007, (7): 12-13.

[46] 刘向军, 花生乳状液体系蛋白质的酶解动力学及破乳机制研究[D]. 河南: 河南工业大学, 2013.

[47] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., et al. Repair of simple rectovaginal fistulas[J]. Diseases of the Colon & Rectum. 2011, 13(3): 147-151.

[48] 刘德明. 酶法制备花生多肽工艺条件优化研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(7): 89-94.

[49] Purcell A. W., Aguilar M. L., Hearn M. T. W., Conformational effects in the RP-HPLC of poly peptides, Journal of chromatography, 1995, 711, 71-79.

[50] 邱学伟, 杨培民, 代龙等. 福林酚比色法测定水蛭仿生酶解小肽的含量[J]. 医学信息, 2011, 24(5), 2557-2558.

[51] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010, 附录: 34.

[52] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 34.

[53] 邱学伟, 杨培民, 代龙, 等. 福林酚比色法测定水蛭仿生酶解小肽的含量[J]. 医学信息, 2011, 24(5), 25-57.

[54] Lowry OH., Rosebrough N. J., Farr A. L., et al. 福林酚试剂法测定蛋白质[J]. 陈祥娥, 译. 边玲, 校. 食品与药品, 2011, 139(3): 147.

[55] 黄敬, 倪方慧. 福林酚法测定软胶囊中肽含量[J]. 江西医学检验, 2004, 22(3): 260.

[56] 张源淑, 邹思湘. 反相高效液相色谱法分析结构相似酪啡肽[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 172-174.

[57] 马岩, 张万军, 卫军营等. 反相高效液相色谱双梯度洗脱分离肽混合物及质谱分析[J]. 色谱, 2011, 29(03): 205-211.

[58] 吕艳. 酶解小麦蛋白制取谷氨酰胺活性肽的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.

[59] Zhou L., Beuerman R. W., Barathi A., et al Analysis of rabbit tear proteins by

high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 401-412.

[60] Lu Z., Wang S., Cai Y., et al Primary structure determination of recombinant human erythropoietin by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-time of flight-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2006, 34: 591-597.

[61] 赵晓光,杨松成,马龙华. 新一代串联飞行时间质谱仪及其创新技术[J]. *现代仪器*, 2007,(4): 5,9-14.

[62] K. A. Cherkasova, L. A. Lyapina, and I. P. Ashmarin, Comparative Study of Modulatory Effects of Semax and Primary Proline-Containing Peptides on Hemostatic Reactions[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2001,132(7),20-22

[63] 盛泉虎. 串联质谱蛋白质鉴定方法的研究[D].上海:中国科学院上海生命科学研究院, 2003.

[64] 章绍兵. 利用电喷雾串联质谱测定菜籽抗氧化肽的结构[J],*河南工业大学学报(自然科学版)*, 2009,30(2),1-4.

[65] Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., et al. Electrospray ionization-principles and practice[J]. *Mass Spectrom Rev*, 1990, 9:37-40.

致 谢

本研究是在我的导师章绍兵教授的悉心指导下完成的。从论文的选题、设计、实验和最后的完成都离不开导师的教导和帮助。导师的耐心指导和鼓励使我克服了实验中遇到的困难。两位导师严谨的科学态度、深厚的专业学识、诲人不倦的育人精神令人钦佩，也使我受益匪浅，借此论文完成之际，谨向导师致以由衷的谢意！

同时，在论文的研究与实验过程中，我也得到了食品工程与品质控制课题组陆启玉老师、李华老师、席俊老师、赵贝贝老师、丁长河老师、任顺成老师、王岸娜老师、金华丽老师、谢岩黎老师、卫敏老师和何保山老师的热情指导和帮助，他们为本论文提出了许多宝贵的意见，在此向他们表示诚挚的感谢！

论文的顺利完成也离不开刘向军，郑子懿，王子伟，王晶晶和牛巧娟，范云露，史巧巧，魏芳，李翠翠，马宇翔等师兄师姐在实验和生活中给予我的帮助；感谢姜海燕，郭颖，韩金玉，高学梅，张豫辉，张贞贞，邹军军等同学的帮助；感谢赵子霖，胡永倩，何爱丽，李中哲，邝焕焕，胡思，闫慧丽，赵会，李园园，徐泽健，沈耀衡，张克，张珂，耿曼璐等师弟师妹的帮助，谢谢你们在这三年的学习生活中的关心和帮助。

特别要感谢我的敬爱的父母和哥哥，感谢他们对我的信任与支持，感谢他们在家的牵挂和惦念。

无声无息间，两年的硕士研究生学习即将结束。回首，离家、复试、入学时的情景还依然清晰。两年里，有导师老师的谆谆教诲，有父母哥哥的殷殷期望，有同学和有朋友的热情帮助，在此，唯有写下满满的谢意与祝福。

胡永倩

2015年5月

作者简介

个人资料

姓名：胡永倩

性别：女

出生时间：1990.3

籍贯：河南 周口

教育背景

2009-2013 就读于河南工业大学粮油食品学院，获得学士学位。

2013-至今 就读于河南工业大学粮油食品学院，攻读硕士学位。