

离子交换层析法分离猪股骨降血压肽的研究

舒一梅,李 诚*,郑丽君,潘姝璇,陈 娜,郭 威,王诗熠,付 刚
(四川农业大学食品学院,四川雅安 625014)

摘 要:猪股骨酶解液经超滤、凝胶层析初步分离后,为了得到高活性且纯度较高的降血压肽,采用离子交换层析对凝胶层析分离后的高活性组分进一步分离。通过对洗脱液pH、离子强度、流速三个因素进行研究,确定了最佳分离条件:以pH=6.0、0.05mol/L磷酸盐缓冲液为A液、B液为含1mol/LNaCl的pH=6.0、0.05mol/L磷酸盐缓冲液,洗脱流速为0.8mL/min。结果显示:离子交换层析分离得3个组分,其中组分1的活性最高,其IC₅₀值为0.1012mg/mL;再利用凝胶层析将组分1进行脱盐,其峰2的IC₅₀值达到0.0836mg/mL,脱盐率达到86.60%±0.5%。

关键词:酶解,降血压肽,离子交换层析,凝胶层析,ACE 半抑制浓度

Separation and purification of pig femoral collagen antihyper-tensive peptides by ion exchange chromatography

SHU Yi-mei, LI Cheng*, ZHENG Li-jun, PAN Shu-xuan, CHEN Na, GUO Wei, WANG Shi-yi, FU Gang

(College of Food, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In order to obtain high activity and purity of antihypertensive peptides, the method of ion exchange chromatography was used to separate the solution after the preliminary separation and characterization by ultrafiltration and gel permeation chromatography. The eluent pH, ionic strength, velocity of the three factors were studied. The optimal conditions for analysis were as follows: elution of pH=6.0, the flow rate was 0.8mL/min, the ionic strength was 1.0mol/L. The results showed that the fraction was then purified by ion exchange chromatography into 3 peaks, in which peak 1 had the strongest ACE inhibitory activity with an IC₅₀ of 0.1012mg/mL. And the peak 1 was further desalinated by gel permeation chromatography to obtain 4 peaks, and the peak 2 had the highest ACE-inhibitory activity with an IC₅₀ of 0.0836mg/mL, the desalination rate 86.60%±0.5%.

Key words: enzymolysis liquid; antihypertensive peptides; ion exchange chromatography; gel chromatography; half inhibitory concentration of ACE

中图分类号: TS251

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)02-0253-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.02.046

降血压肽具有来源广泛、降压效果理想、天然低毒副作用等特点,是国内外一直研究的热点。利用廉价的猪股骨为原料,采用酶解的方法可以得到具有降血压活性的酶解液,但酶解液组成成分复杂,不利于降压产品的开发,必须进一步分离纯化^[1-2]。离子交换层析是发展最早的层析技术之一,与化学方法相比,它分离条件温和,不引起分子结构的变化^[3-4],具有灵敏度高、重复性、选择性好、分析速度快等特点,常用的有离子交换树脂、离子交换葡聚糖、离子交换纤维和离子交换琼脂糖等。目前,离子交换色谱已经

成为分离提取生物活性肽的最常用的有效方法,生物活性肽通过静电作用与固定相中的带电基团结合,由于不同活性肽具有不同电荷和电荷量,所以解吸及移动速度不同,从而可以实现分离^[5-6]。

本实验室所制备酶解液经超滤、凝胶层析分离之后得到的组分纯度不高,为得到纯度较高的降血压肽,采用离子交换层析进一步分离,以期分离出高纯度的猪股骨降血压肽,开发以其为功能因子的保健食品或治疗高血压的药物具有较高的实用价值。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

猪股骨骨粉 实验室自制; Sephadex G-25 BIORAD公司; 阳离子交换树脂 BIORAD公司; 木瓜蛋白酶(800U/mg)、风味蛋白酶(20U/mg)、碱性蛋白酶(200U/mg) DSM公司; ACE、HHL 美国Sigma公

收稿日期: 2014-06-06

作者简介: 舒一梅(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:畜产品质量与安全。

* 通讯作者: 李诚(1964-),男,硕士研究生,教授,研究方向:畜产品加工与质量安全控制。

司;其他试剂 均为国产分析纯试剂。

蛋白层析仪 BIORAD公司;超滤管(5ku) 密理博公司;QT-2漩涡混匀器 上海琪特分析仪器有限公司;UV-3200 MAPADA紫外分光光度计;冷冻干燥机、高速冷冻离心机、移液枪 Thermo Fisher;超纯水装置 优普公司;pH计 方舟科技;层析柱1.6cm×60cm 1cm×20cm上海沪西分析仪器厂;BSZ-100型自动部分收集 上海沪西分析仪器厂;WLB-78C恒流泵 浙江新昌国康仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 猪股骨降血压肽的制备 按照实验室前期猪股骨酶解降血压肽的优选条件制备猪股骨降血压肽,其工艺流程为:新鲜猪股骨→清洗→高压蒸煮→粉碎→加酶水解→灭酶→离心→上清液→冷冻干燥^[7]。将酶解液用截留分子质量为5ku的超滤管进行超滤,冻干备用。

1.2.2 凝胶层析分离 将超滤后分子量<5ku的滤液通过Sephadex G-25进行凝胶层析分离,分离条件为:去离子水为洗脱液,控制流速为0.6mL/min,上样量为1%(以床体积的百分比计算),检测波长为214nm。

1.2.3 离子交换层析分离操作步骤 根据目的多肽的性质来选择合适的离子交换填料^[8-9]。本实验选用UNO-S阳离子交换树脂进行分离^[10-11]。为了达到最好的分离效果,本实验探讨了洗脱液pH、离子强度以及流速对分离效果的影响。

采用蛋白层析仪对收集凝胶层析后的高活性组分进行线性梯度洗脱,以UNO-S阳离子交换树脂为填料。用超纯水将蛋白层析仪的AB泵冲开,用A(不同pH的0.05mol/L磷酸盐缓冲液)液平衡柱子,再上样(每一条件进行6次以上平行实验,直到每次平行实验的分离图谱一致)。利用A液和B液(含1mol/L NaCl的不同pH的0.05mol/L磷酸盐缓冲液)进行线性梯度洗脱,其洗脱程序为:A液100%~0、B液0~100%,收集洗脱液,清洗交换剂、管道和装置。结合每管在214nm的吸光度值,考察不同流速、离子强度、pH对分离效果的影响,测定各组分IC₅₀值,收集体外ACE抑制率最高的组分。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 不同pH洗脱液对分离效果的影响 B液为含1mol/L NaCl的0.05mol/L磷酸盐缓冲液,控制流速为1mL/min。分别采用不同pH的0.05mol/L磷酸盐缓冲液为A液,设定不同pH为:6.0、6.5、7.0,研究不同pH的洗脱液对分离纯化效果的影响,确定最适pH。

1.2.4.2 不同离子强度对分离效果的影响 采用pH=6.5,0.05mol/L磷酸盐缓冲液为A液,B液为含不同量NaCl的pH=6.5,0.05mol/L磷酸盐缓冲液,控制流速为1mL/min,设定不同离子强度(mol/L)为:0.5、1.0、1.5。考察不同离子强度对分离纯化效果的影响,确定最适离子强度。

1.2.4.3 不同流速对分离效果的影响 采用pH=6.5,0.05mol/L磷酸盐缓冲液为A液,B液为含1mol/L NaCl的pH=6.5,0.05mol/L磷酸盐缓冲液,设定不同流速(mL/min)为:0.8、1.0、1.2。考察不同流速对分离纯

化效果的影响,确定最适流速。

1.2.5 脱盐 经离子交换层析后,得到的高活性猪股骨降血压肽组分含有大量的盐,为了进一步提高其ACE抑制活性,采用Sephadex G-25为填料,对该组分进行脱盐,重复该实验6次^[12-13]。采用国标中的硝酸银滴定法测定脱盐率^[14]。

$$\text{脱盐率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{脱盐后Cl}^- \text{浓度} \times \text{收集液体积}}{\text{脱盐前Cl}^- \text{浓度} \times \text{上样体积}}\right) \times 100$$

1.2.6 指标的测定

1.2.6.1 ACE抑制率的测定

ACE抑制率的测定主要采用紫外分光光度法^[15-16]。

1.2.6.2 IC₅₀值测定方法 将样品配制成不同的浓度(实验点≥5),分别测定其ACE抑制率,以样品浓度为横坐标,ACE抑制率为纵坐标,绘制圆滑曲线,用对数几率图解法计算出IC₅₀值。

1.2.6.3 蛋白质浓度的测定 蛋白质浓度的测定主要采用Lowry法蛋白含量检测试剂盒测定。

2 结果与分析

2.1 凝胶层析分离

分离出的组分2的抑制率最高,如图1,经计算其IC₅₀值为0.4016mg/mL。

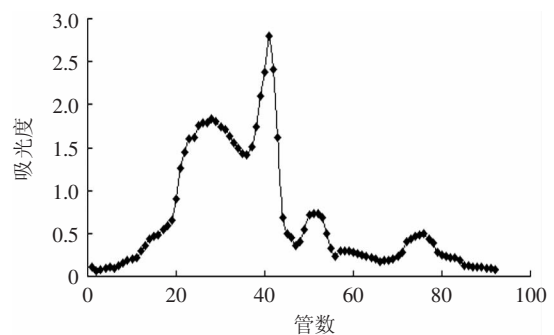


图1 凝胶层析分离曲线

Fig.1 The separation pattern of gel chromatography

2.2 离子交换层析分离

2.2.1 不同pH洗脱液对分离效果的影响 由图2知,洗脱液的pH对分离效果影响较大,当pH为6.0时,可以得到3个峰,当pH为6.5时,也能得到3个峰,但与pH=6.0相比,峰1峰型较圆、峰2和峰3分离程度不如前者,当pH为7.0时,只能得到2个峰,分离效果不佳,因此洗脱液的pH选用6.0。

2.2.2 不同离子强度对分离效果的影响 由图3知,离子强度对分离效果影响并不大,在各个离子强度下,都分离出了3个峰,综合考虑成本以及峰型这两方面,采用1mol/L的离子强度较合适。

2.2.3 不同洗脱流速对分离效果的影响 由图4知,流速对分离效果影响较大。在流速为0.8、1.0mL/min的条件下,能分离出3个峰,前者峰1较后者尖,前者分离较好。但当流速为1.2mL/min时,只能得到2个峰,未能分开峰2与峰3。因此,为了保持较高的分离效果,采用0.8mL/min的分离速度。

2.2.4 确定最佳分离条件 综合以上得出最佳洗脱

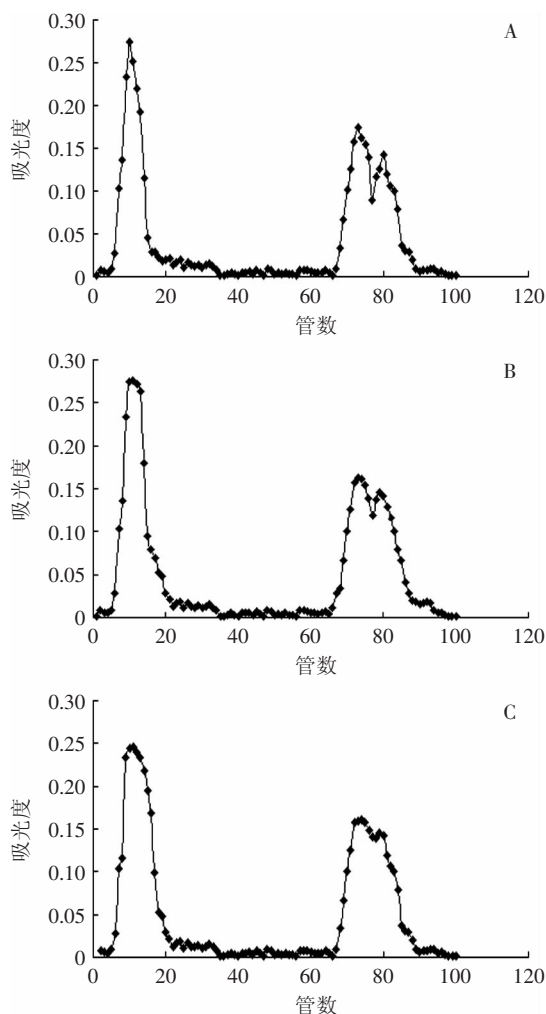


图2 不同pH的分离图谱

Fig.2 The separation pattern of different pH
注: A.pH为6.0; B.pH为6.5; C.pH为7.0。

条件: 采用pH=6.0磷酸盐缓冲液为A液, B液为含1mol/L NaCl的pH=6.0, 0.05mol/L磷酸盐缓冲液, 洗脱流速为0.8mL/min。将凝胶层析分离后的组分2冷冻干燥配成蛋白质浓度为10mg/mL, 按优选的最佳分离条件再进行多次验证, 如图5。在此区间形成3个洗脱峰, 分别测定IC₅₀值。测得其中组分1的抑制率最高, 如图6, 其IC₅₀值为0.1012mg/mL, 表明该分离条件稳定可行。

2.2.5 脱盐 离子交换层析后所得到的组分1经凝胶层析脱盐后, 得到了两个洗脱峰, 通过测定其IC₅₀值, 发现峰2有较高的ACE抑制活性, 其IC₅₀值为0.0836mg/mL(峰1 IC₅₀值为0.3612mg/mL), 较脱盐之前活性提高了1.3倍, 其脱盐率达到了86.6%±0.5%。洗脱曲线如图7所示。

洗脱液pH、离子强度、流速三个因素对分离猪股骨降血压肽有不同程度的影响。离子强度过大或小都会导致分离不开, 流速过大也使分离效果不佳, 流速过小又会降低分离效率, 本研究探索出的最佳的分离条件为猪股骨降血压肽产品的开发提供了一定实验基础。经离子交换分离的高活性组分的脱盐也是纯化的关键。传统的脱盐方法透析、纳滤等不适用

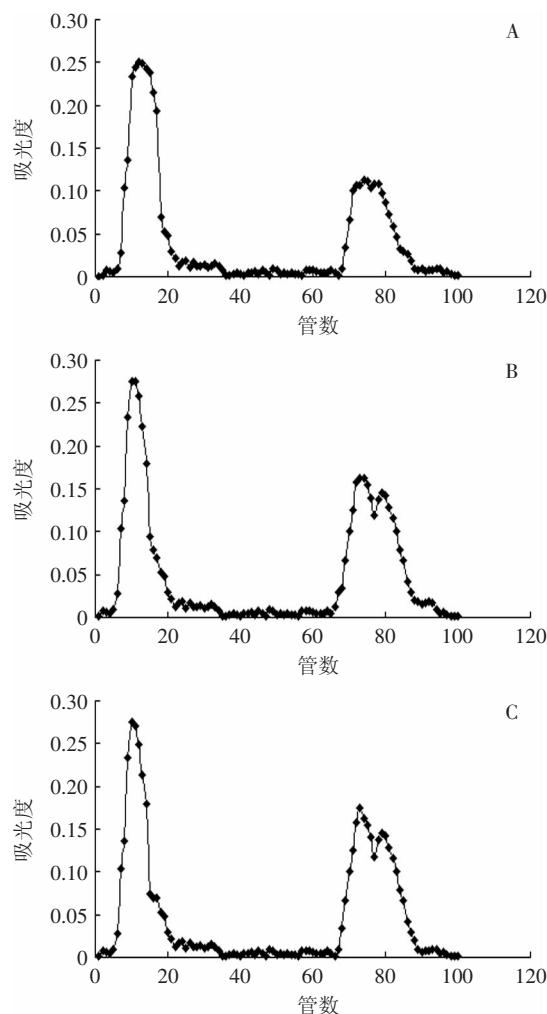


图3 不同离子强度的分离图谱

Fig.3 The separation pattern of different ionic strength
注: A.离子强度为0.5mol/L; B.离子强度为1mol/L; C.离子强度为1.5mol/L。

小分子的脱盐, 适用的电渗析脱盐又能源消耗大, 回收率低。而凝胶层析脱盐操作简便, 成本低, 回收率高, 脱盐效果好。

国内外也有较多的学者利用离子交换层析研究不同蛋白源的降血压肽的分离纯化, 如李世敏等^[17]利用玉米蛋白酶解得到的酶解液, 用离子交换层析进行初步分离, 得到的组分中活性最高的ACE抑制率比酶解液的抑制率高出一倍。Leslie等^[18]利用离子交换层析分离出高活性的苜蓿蛋白降血压肽, 等等。降血压肽没有特定的功能基团, 所以采用简单直接的分离方法无法分离出单体, 采用膜分离技术、凝胶层析技术、离子交换层析等多种手段相结合, 以使分离出单一的猪股骨降血压肽组分, 促进猪股骨降血压肽的工业化生产。

3 结论

通过离子交换层析, 分离到了活性较高猪股骨降血压肽, 其IC₅₀值为0.1012mg/mL, 确定了最佳洗脱条件为: 以pH=6.0磷酸盐缓冲液为A液, B液为含1mol/L NaCl的pH=6.0, 0.05mol/L磷酸盐缓冲液, 洗脱流速为0.8mL/min。再经过脱盐后, 分离出的猪股骨

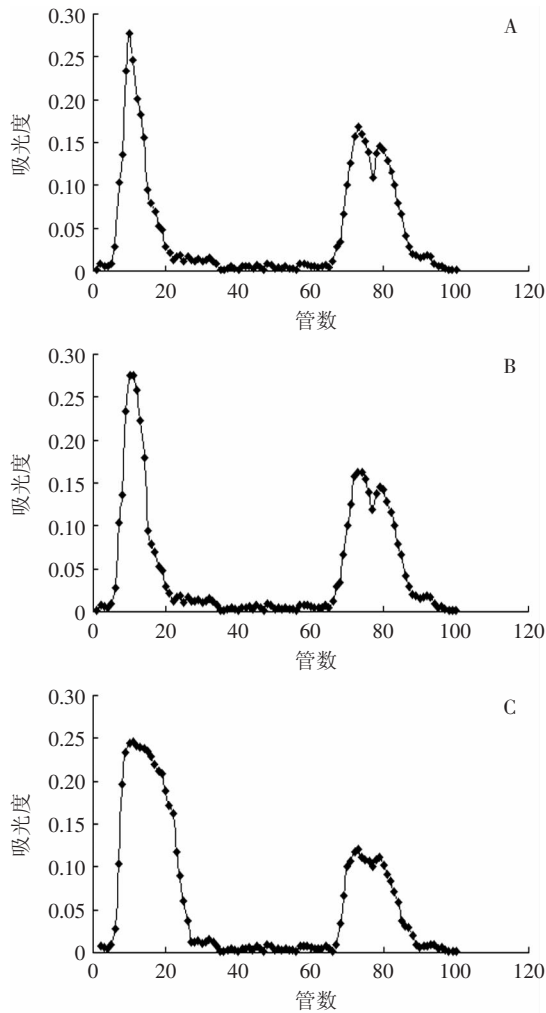


图4 不同流速的分离图谱

Fig.4 The separation pattern of different flow rates

注: A.流速为0.8mL/min; B.流速为1mL/min; C.流速为1.2mL/min.

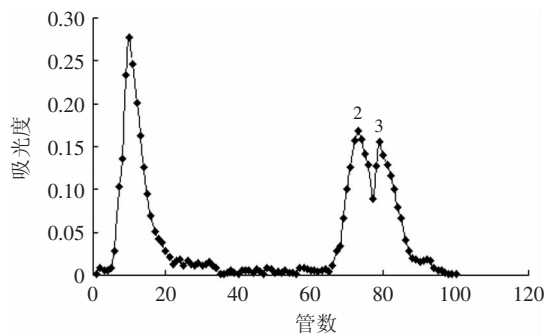


图5 最佳洗脱曲线

Fig.5 The best separation pattern of Antihypertensive Peptides

降血压肽活性提高到了0.0836mg/mL,脱盐率达到86.6%±0.5%,较刘小红等^[7]用离子交换层析分离的降血压肽组分的ACE抑制活性提高了5.8倍。

参考文献

[1] 万顺刚. 蛋黄ACE抑制肽分离纯化研究[J]. 广西大学学报, 2007(4):6-12.
 [2] Eriksen E K, Vegarud G E, Langsrud T, et al. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses[J].

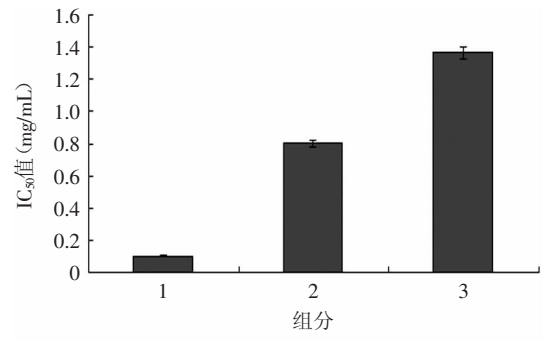


图6 各个组分的IC₅₀值

Fig.6 The IC₅₀ of each component

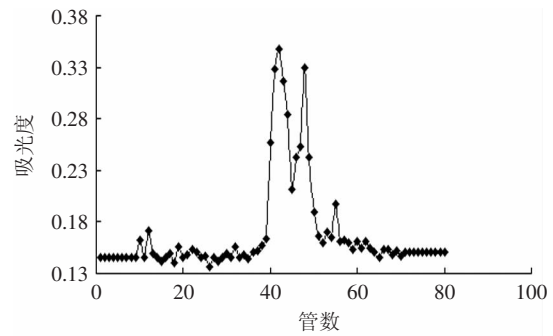


图7 组分1的脱盐洗脱曲线

Fig.7 The separation pattern of peak 1 after desalination

Small Ruminant Research, 2008, 79(1):29-37.

[3] Netsanet Shiferaw Terefe, Olga Glagovskaia, Kirithi De Silva, et al. Application of stimuli responsive polymers for sustainable ion exchange chromatography[J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(2):208-225.

[4] Bertrand Guélat, Lydia Delegrange, Pascal Valax, et al. Model-based prediction of monoclonal antibody retention in ion-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1208(12):17-25.

[5] Ion Exchange Chromatography. principles and methods[M]. Sweden: Pharmacia Fine Chemicals, 2002:16-19.

[6] 陈来同, 徐德昌. 生化工艺学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997:63-66.

[7] 刘小红, 李诚, 付刚, 等. 猪股骨头胶原蛋白降血压肽的分离纯化[J]. 食品科学, 2014, 35(4):50-55.

[5] Lieselot Vercruyssen, Guy Smagghe, Toshiro Matsui, et al. Purification and identification of an angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the gastrointestinal hydrolysate of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*[J]. Process Biochemistry, 2008, 43:900-904.

[6] Kunio Suetsuna, Jiun-Rong Chen. Identification of Antihypertensive Peptides from Peptic Digest of Two Microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*[J]. Marine Biotechnology, 2001(3):305-309.

[10] 喇文军, 刘冬, 张丽君, 等. 离子交换层析法分离纯化玉米降血压肽的研究[J]. 食品工程, 2007(3):57-60.

[11] 杨兆勇, 王文礼, 苏秀兰. 天然产物中的多肽的分离、分析及其药用价值[J]. 内蒙古医学院学报, 2004, 26(2):137.

(下转第260页)

压杀菌的优越性,也需要将超高压与热杀菌作比较。因此选择 $A_2B_2C_1$ 、 $A_2B_2C_2$ 、 $A_2B_3C_1$ 与高压蒸汽灭菌的菌落总数和 V_C 保留量进行对比验证,结果见表4。

表4 杀菌工艺验证实验方案与结果

Table 4 Test plan and results of sterilization process

实验方案	因素	
	菌落总数(cfu/g)	V_C 保留量(mg/100g)
$A_2B_2C_1$	78	11.723
$A_2B_2C_2$	62	10.964
$A_2B_3C_1$	51	11.347
高压蒸汽	21	4.234
未处理	20700	13.792

从表4可以看出,4种杀菌工业均能满足商业无菌要求。杀菌处理后,水煮笋的 V_C 含量均有所降低。 V_C 的消耗其实是氧化反应的结果,包装内部的氧气能够氧化相当于自身两倍含量的 V_C ,生成脱氢抗坏血酸(DHAA)^[15],高压高温条件能加速此反应的进程。同时,结果表明,温度对 V_C 含量的影响程度要大于时间, $A_2B_3C_1$ 组的 V_C 保留率(82.2%)与 $A_2B_2C_1$ (84.9%)相差不大,但其杀菌效果较后者为优。虽然高压蒸汽杀菌效果最好,但其对 V_C 的损害亦是最大的,处理后 V_C 仅存30.7%。因此综合以上结果,发现 $A_2B_3C_1$ 为最优方案,即软包装水煮笋的超高压工艺条件为压强350MPa、保压时间15min,温度25℃,此条件能满足杀菌要求,且 V_C 保留率远高于热处理,为82.2%。

3 结论

软包装水煮笋超高压灭菌工艺优化结果显示,超高压处理可有效杀灭软包装水煮笋中的微生物,且对灭菌处理条件敏感的 V_C 影响较小。最优工艺条件为:处理压强350MPa,保压时间15min,温度25℃。压强对灭菌效果影响最大,保压时间次之,最后是温度;温度对 V_C 含量影响最大,保压时间次之。按优化工艺条件处理的水煮笋,能满足商业无菌要求,并且 V_C 保留率为82.2%。

参考文献

[1] 黄伟素,陆柏益.竹笋深加工利用技术现状及趋势[J].林业

科学,2008,44(8):118-123.

[2] Zyngiel W, Kolenda H. The influence of high pressure processing parameters on quality and stability of preserved carrot juices[J]. *Zywnosc Nauka Technologia Jakosc*, 2009, 42(3):408-413.

[3] Matser A M, Krebbers B, van den Berg R W, et al. Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, 15:79-85.

[4] Ming Miao, Qingxin Wang, Tao Zhang, et al. Effect of high hydrostatic pressure(HHP) treatment on texture changes of water bamboo shoots cultivated in China[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59:327-329.

[5] 李庆领,吴俊飞,杨洪顺.超高等静压芦笋杀菌保鲜方法:中国,101731310 A[P]. 2010-06-16.

[6] 肖丽霞,陈计峦,赵晓丹,等.绿竹笋超高压处理和热处理加工品质比较研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(3):148-150.

[7] 赵玉生,赵俊芳.超高压杀菌对鲜榨猕猴桃汁中 V_C 含量变化的影响[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(11):24-25.

[8] 温升南,程燕锋,杜冰,等.不同杀菌处理方法对菠萝汁理化性质的影响[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(10):977-980.

[9] Krebbers B, Koets M, van den Wall F, et al. Effects of high pressure processing on the quality of green beans[J]. *Progress in Biotechnology*, 2002, 19:389-396.

[10] 徐吉祥,王飞生,罗月红,等. HACCP在软包装即食笋生产中的应用[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(5):574-576, 583.

[11] 江苏省农科院综合实验室. GB 6195-86 中华人民共和国国家标准水果、蔬菜维生素C含量测定法(2,6-二氯酚酚滴定法)[S]. 北京:中国标准出版社,1986.

[12] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所. GB 4789.2-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[13] 张守勤.超高压生物技术及应用[M]. 北京:科学出版社,2011.

[14] van den Broeck I, Ludikhuyze L, Weemaes C, et al. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1998, 46:2001-2006.

[15] C Pénicaud, B Broyart, S Peyron, et al. Mechanistic model to couple oxygen transfer with ascorbic acid oxidation kinetics in model solid food[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 104(1):96-104.

(上接第256页)

[12] 李翠蓉.凝胶层析脱盐技术应用[J]. *石河子科技*, 2009(6):43-45.

[13] 周存山,马海乐,余筱洁,等.麦胚蛋白降压肽的大孔树脂脱盐研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(3):142-146.

[14] GB/T12457-2008 食品中氯化钠的测定[G].

[15] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971(20):1637-1648.

[16] SUN Weizheng, ZHAO Haifeng, ZHAO Qiangzhong, et al. Structural characteristics of peptides extracted from Cantonese

sausage during drying and their antioxidant activities [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, 10(4):558-563.

[17] 李世敏,张丽君,刘冬,等.玉米降血压肽的分离纯化研究[J]. *食品科学*, 2006(7):69-72.

[18] Leslie Boudesocque, Romain Kapel, Cedric Paris, et al. Concentration and selective fractionation of an antihypertensive peptide from an alfalfa white proteins hydrolysate by mixed ion-exchange centrifugal partition chromatography[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 905:23-30.