

采用大孔吸附树脂提纯螺蛳腹足肌酶解产物的研究

夏树华 王 璋 许时婴

(江南大学食品学院,无锡,214036)

摘 要 利用 DA201-C 大孔吸附树脂对螺蛳腹足肌酶解产物进行脱盐及糖原分离。结果表明,用不同浓度的乙醇进行洗脱时,洗脱组分的疏水性氨基酸含量及 ACE 抑制活性随乙醇浓度的增大而增大;依次用 25% 和 75% 乙醇进行阶段洗脱时,脱糖率为 78.59%,脱盐率为 93.79%;酶解糖原比碱提糖原的相对分子质量大而纯度较低。

关键词 螺蛳, 大孔吸附树脂, ACE 抑制活性, 糖原

用 Proleather FG-F 蛋白酶对螺蛳腹足肌进行酶解,同时采用 pH-stat 法测定水解度,力图从中获得较高的 ACE 抑制活性。由于不断加入碱维持反应体系的 pH 值,导致酶解产物中残留了大量的无机盐,灰份含量高达 9.82%,影响了对它活性的研究,更影响了进一步的分离提纯(如离子交换色谱等)。同时,原料中大部分糖原也由于在碱性溶液中溶解性较好而进入到酶解产物中。本实验将酶解产物进行初步提纯,去除其中的无机盐,将糖原与肽组分进行了分离,并对不同条件下的洗脱组分进行分析,将分离出的糖原与碱法提取的糖原进行了比较。

目前生物活性物质的脱盐方法主要有透析、超滤和纳滤等,但它们对小分子物质脱盐效果不佳^[1]。吸附色谱法是最有可能对小分子有机物质进行脱盐的方法,它是根据溶质在吸附剂表面上的吸附强度不同而对溶质进行分离^[2]。其中大孔吸附树脂对多肽具有选择性吸附,用乙醇等有机溶剂洗脱也较为方便。

大孔吸附树脂对化合物的吸附作用主要是基于化合物的疏水基团与非极性吸附剂之间的范德华引力^[3],同时也通过本身的多孔网状孔穴结构对分子大小不同的化合物加以筛选,具有表面积大、吸附容量大、吸附迅速、解吸容易、再生处理方便等特点。

表 1 DA201-C 大孔吸附树脂的性质

性质	指标
极性	非极性
粒度/mm	0.4~1.25
比表面积/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	1 000~1 300
平均孔径/ \AA	30~40
孔容积/ $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	1.0~1.1

第一作者:博士研究生。

收稿日期:2005-10-20

1 材料和方法

1.1 材 料

螺蛳,购自无锡青山市场,手工去壳,将腹足肌部分分离出来;DA201-C 大孔吸附树脂,江阴市有机化工厂,部分性质见表 1。

1.2 仪器与试剂

SHZ-88 台式水浴恒温振荡器,江苏太仓市实验设备厂;DDS-11C 电导率仪,上海雷磁仪器厂;玻璃层析柱 $5.6 \times 30 \text{ cm}$,上海华美实验仪器厂;氨基酸自动分析仪,美国安捷伦 1100;Proleather FG-F,日本天野酶制品株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 成分分析

糖含量:苯酚-硫酸法;肽含量:Lowry-Folin 法;灰分含量:马弗炉灰化法。

1.3.2 螺蛳腹足肌的酶解

将螺蛳腹足肌经匀浆干燥后用中药粉碎机粉碎,配成质量分数为 5% 的水溶液并调至 pH10,用高速分散机分散,超声波处理 20 min,加入 5% Proleather FG-F(E/S),60℃ 下水解 4h,沸水浴灭酶 15 min,离心取上清液经真空浓缩后干燥制得粉末状酶解产物。

1.3.3 酶解产物的脱盐

1.3.3.1 静态吸附实验

于 250 mL 具塞锥形瓶中加入 10 g 预先处理过的干树脂,用无水乙醇充分溶胀,用去离子水洗净无水乙醇,再加入 50 mL,20 mg/mL 的酶解产物溶液,放入 25℃ 恒温水浴中振荡(振荡速度为 150 次/min),不同时间取样,计算树脂的吸附率(%)。

1.3.3.2 动态吸附及解吸实验

柱条件如下:

色谱柱: $5.6 \times 20 \text{ cm}$;床体积:500mL;树脂:

DA201-C;上样量:10 g(含肽 6.2 g,其余为糖原和盐分);上样流速 40 mL/h;以蒸馏水冲洗流速 100 mL/h;用乙醇洗脱流速 100 mL/h 上样后先用去离子水洗脱层析柱,收集水洗液测定电导率、糖含量和肽含量,当水洗液电导率与水几乎一致或不再变化时,用一定浓度的乙醇洗脱,收集洗脱峰,浓缩蒸去乙醇,再进行冷冻干燥。

$$\text{解吸率}(\%) = \frac{\text{解吸液肽含量}}{\text{原液肽含量} - \text{水洗液肽含量}} \times 100\%$$

1.3.4 糖原的制备和比较

1.3.4.1 酶解糖原的制备工艺

收集酶解产物过大孔吸附树脂后的水洗组分,经浓缩后加入乙醇(至乙醇终浓度为 40%),离心取沉淀冷冻干燥,制得酶解糖原。

1.3.4.2 碱解糖原的制备工艺

螺蛳肉打浆后加入等体积 30% KOH,在 100℃ 加热 1 h,冷却至室温后加入乙醇至乙醇终浓度为 40%,过滤得到的沉淀再溶入水中,冰醋酸调 pH 至中性,再次过滤得清液,清液中加入阳离子交换树脂,室温下连续搅拌 24 h,过滤后清液中加入等体积的乙醇,得到沉淀,水溶解后采用 sevag 法脱蛋白,再加入乙醇,收集沉淀物,冷冻干燥。

1.3.5 肽和糖原的相对分子质量分布的测定

糖原测定的色谱条件:

色谱柱:Ultrasphere Linear 300 mm×7.8 mm (id)×2;流动相:0.1 mol/L NaNO₃;流速:0.9 mL/min;柱温:45℃;样品制备:样品溶解于流动相中,用微孔过滤膜过滤后供进样。

测定肽的色谱条件如下:

仪器:Waters 600 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站);色谱柱:TSKgel2000 SWXL 300 mm×7.8 mm;流动相:V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=45:55:0.1;检测:UV220 nm;流速:0.5 mL/min;柱温:30℃。

1.3.6 ACE 酶抑制活性的测定

样品溶于超纯水,离心(7 200×g,15 min),取上清液进行 ACE 抑制活性测定。取 10 μL 样品和 20 μL ACE(0.1U 溶于 1.0 mL, pH 8.3, 0.05 mol/L 硼酸缓冲液,其中含 0.3 mol/L NaCl)于 37℃ 保温 6 min,加入 40 μL, 6.5 mmol/L 底物(hippuryl-L-His-L-Leu 溶于相同的缓冲溶液中),37℃ 下反应 30 min 后,加入 80 μL, 1mol/L 的 HCl 溶液终止反应,至室温,取 10 μL 反应产物进样,通过 RP-HPLC 洗脱图

谱定量马尿酸生成量,以马尿酸的生成量来判断样品对 ACE 活性的抑制作用,同时做空白对照。

ACE 抑制活性根据下式计算:

样品的 ACE 活性抑制率(%)=(对照的马尿酸峰值-样品的马尿酸峰值)×100/对照的马尿酸峰值
色谱条件如下:

HPLC 系统: HEWLETT PACKARD SERIES 1050;检测器: Waters490 Programmable Multiwavelength Detector MILLIPORE;色谱柱: Symmetry C18 3.9 mm×150 mm P.N.;流速:1.0 mL/min;检测波长:228 nm;进样量:10 μL;柱温:30℃;流动相:12% 乙腈(含 0.5% 乙酸)。

2 结果与讨论

2.1 静态吸附率

DA201-C 大孔吸附树脂在静态吸附过程中对螺蛳酶解产物的吸附率随时间的变化规律见图 1。可以看出,静态吸附过程中,最初的 1 h 内吸附率增加十分迅速,而 3 h 后吸附率的增加明显趋缓。

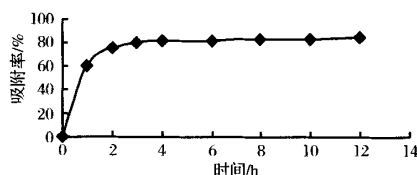


图1 静态吸附率随时间的变化

2.2 酶解产物的 pH 值对动态吸附率的影响

酶解产物中的肽在溶液中的伸展方式会随 pH 值的变化而不同,肽与大孔吸附树脂间是通过范德华力或氢键相互作用结合的,这也会受 pH 值影响,因此上样时酶解液的 pH 值会对动态吸附率产生较大影响,在图 2 中可以明显看出这一点。一般认为酸性化合物在酸性条件下,碱性化合物在碱性条件下可以分别得到较好的吸附。螺蛳酶解产物中酸性氨基酸(Asp 和 Glu)的含量远远超过碱性氨基酸(Lys 和 Arg)的含量,这可以解释其在酸性范围内吸附率较高。但 pH 值过低则水解液会出现部分沉淀,这些沉淀会随洗脱液而

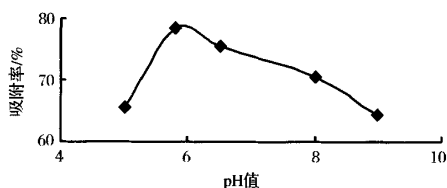


图2 水解液的 pH 值对动态吸附率的影响

流出,从而降低了吸附率,实验中最终选择 pH5.8 作为吸附 pH 值(此时吸附率达 78.4%)。

2.3 动态吸附及解吸

从开始上样到用去离子水洗脱结束整个阶段的流出液中糖含量、肽含量及电导率的变化如图 3。从中可以看出,电导率(反映盐含量)和糖含量均在洗脱体积 600 mL 处达到最大值,而未被吸附的肽的出峰位置则较靠后且峰值较小,在洗脱体积超过 1 300 mL 后(2~3 个床体积)它们的变化都趋于平缓。由于大孔吸附树脂几乎不会吸附无机盐离子,且可以对分子大小不同的化合物加以筛选,而酶解产物中的糖大部分为大分子糖原,因而糖和盐的出峰位置比带有一定疏水性的小分子的肽要靠前一些。

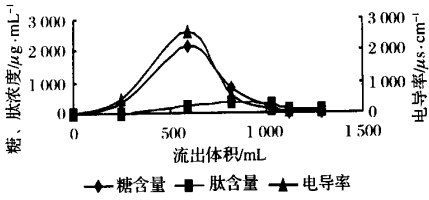


图 3 酶解产物的动态吸附和脱盐脱糖曲线

水洗阶段结束后,依次用 25%、50% 和 75% 的乙醇进行阶段洗脱,洗脱图谱如图 4。用乙醇对大孔吸附树脂进行洗脱实质上是一种由疏水性质决定的置换过程,乙醇能削弱蛋白质非极性侧链的排水倾向^[4],可基于组成肽链的氨基酸疏水性不同对酶解产物进行分离。疏水性氨基酸含量高的组分也需要较高浓度的乙醇来解除与树脂之间的疏水性相互作用,反之亦然。从图 3 中可以看出,随洗脱乙醇浓度的增大酶解产物组分的含量依次减小,由 25% 乙醇洗脱下来的疏水性较弱的组分所占比例最大,其余 2 组分含量很少。

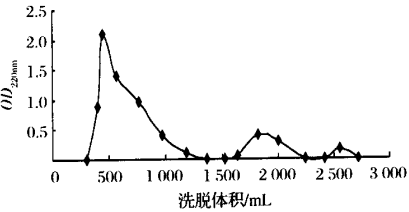


图 4 酶解产物的乙醇阶段洗脱曲线

实验中还发现,采用 75% 的乙醇一次性洗脱时有一小部分相对分子质量较大的组分溶解性不好,在树脂上部成絮凝状,导致解吸率下降,后依次采用 25% 和 75% 乙醇进行阶段洗脱,既可提高解吸率又

可避免过高浓度的乙醇对酶解产物的影响(如表 2)。

表 2 不同体积分数乙醇的解吸效果

解吸条件	解吸率/%
依次用 25%、50% 和 75% 乙醇进行阶段洗脱	90.42
用 75% 乙醇 1 次性洗脱	83.23
依次用 25% 和 75% 乙醇进行阶段洗脱	86.64

2.4 洗脱产物的分析

酶解产物经 DA201-C' 大孔吸附树脂吸附,用 25% + 75% 乙醇洗脱后,分别从成分含量、氨基酸组成、ACE 抑制活性、相对分子质量分布范围等几个方面对洗脱产物进行了分析。

2.4.1 肽、糖原、灰分含量的变化

结合表 3 和图 3 可以看出,酶解产物经 DA201-C' 大孔吸附树脂提纯后,糖原和灰分的含量都大大下降,脱除得较为彻底,脱糖率为 78.59%,脱盐率达 93.79%,同时肽的损失很少,得到纯化。

表 3 洗脱产物中肽、糖原、灰分含量的变化 %

成分	肽	糖原	灰分
吸附前	62.23	28.17	9.82
洗脱后	93.07	6.03	0.61

2.4.2 氨基酸组成的变化

不同组分中氨基酸组成的分析结果如表 4 所示。脱盐前,酶解产物的疏水性氨基酸含量为 35.39%,脱盐后这一指标分别变为 47.26% (依次用 25% 和 75% 乙醇进行阶段洗脱所得组分)、46.1% (25% 乙醇洗脱组分)、48.63% (50% 乙醇洗脱组分)及 49.62% (75% 乙醇洗脱组分),这说明经过大孔吸附树脂吸附,酶解产物中的疏水性氨基酸得到了有效富集。

2.4.3 洗脱组分的 ACE 抑制活性

对不同的洗脱组分(0.5 mg/mL)进行 ACE 抑制活性的测定,结果如图 5 所示。

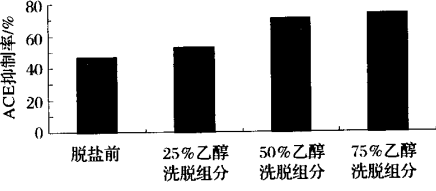


图 5 不同洗脱组分的 ACE 抑制率

肽段的 ACE 抑制活性与其中的疏水性氨基酸密切相关,从图 5 中可以看出,随着乙醇浓度的增大,洗脱组分的 ACE 抑制活性也逐渐增大,并且都大于脱盐前的酶解产物,这与其中疏水性氨基酸含量的变化是吻合的。

表 4 不同组分的氨基酸组成

氨基酸	样 品				
	25%及75%乙醇 阶段洗脱组分	25%乙醇 洗脱组分	50%乙醇 洗脱组分	75%乙醇 洗脱组分	脱盐前酶 解产物
谷氨酸(Glu)	0.148	0.169	0.121	0.127	0.175
天冬氨酸(Asp)	0.087	0.098	0.082	0.091	0.110
亮氨酸(Leu)*	0.103	0.104	0.102	0.121	0.087
赖氨酸(Lys)	0.055	0.067	0.080	0.079	0.068
精氨酸(Arg)	0.078	0.076	0.074	0.053	0.122
丙氨酸(Ala)*	0.054	0.054	0.036	0.040	0.037
甘氨酸(Gly)	0.069	0.035	0.045	0.037	0.055
丝氨酸(Ser)	0.046	0.047	0.036	0.037	0.044
苏氨酸(Thr)	0.041	0.029	0.041	0.044	0.049
缬氨酸(Val)*	0.054	0.053	0.054	0.056	0.050
苯丙氨酸(Phe)*	0.060	0.056	0.064	0.066	0.039
异亮氨酸(Ile)*	0.054	0.050	0.064	0.068	0.046
脯氨酸(Pro)*	0.074	0.073	0.091	0.067	0.046
蛋氨酸(Met)*	0.024	0.025	0.023	0.025	0.018
半胱氨酸(Cys)	0.003	0.007	0.009	0.012	0.003
组氨酸(His)	0.010	0.010	0.025	0.025	0.020
酪氨酸(Tyr)*	0.051	0.046	0.051	0.053	0.030
* 疏水性氨基酸总量	47.26	46.1	48.63	49.62	35.39

经测定依次用 25% 和 75% 乙醇洗脱所得组分的 ACE 抑制活性的 IC₅₀ (半抑制浓度, 即抑制率为 50% 时的底物浓度) 为 0.44 mg/mL, 而吸附前未经提纯的酶解产物的 IC₅₀ 为 0.69 mg/mL, 可见经过大孔吸附树脂的提纯, 螺蛳酶解产物的活性得到了提高, 这与其多肽及疏水性氨基酸含量的提高密切相关。

2.4.4 相对分子质量分布范围的变化

酶解产物洗脱前后的相对分子质量分布范围如图 7 所示。可以看出, 酶解产物的相对分子质量分布

基本相似, 洗脱后向低相对分子质量方向略有移动, 少量相对分子质量大于 20 000u 的较大组分被脱除。脱盐后相对分子质量在 150~2 000u 范围内的短肽比例占 87.09%。从营养吸收和生物活性的角度来看, 一种酶解产物中的短肽含量越高越好, 并且具有 ACE 抑制活性的多肽主要集中在分子量较小的组分^[5], 因此洗脱组分的高活性也是与其相对分子质量分布范围密切相关的。

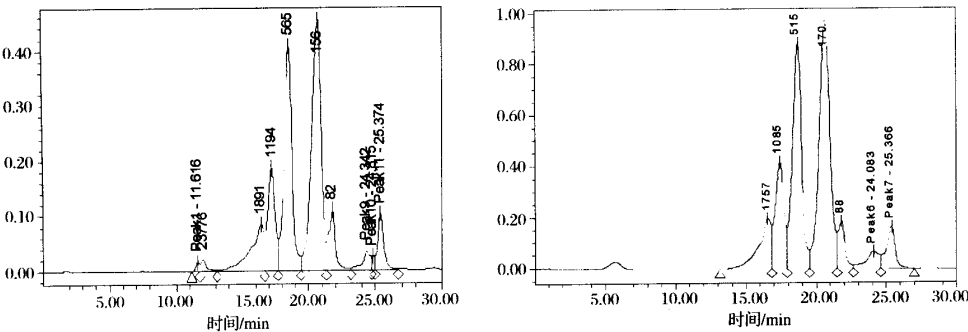


图 7 酶解产物的相对分子质量分布范围的比较(a 为吸附前, b 为洗脱后)

2.5 酶解糖原与碱解糖原的比较

碱水解与蛋白酶水解是分离蛋白质与聚糖常用的 2 种方法^[6]。在动物体内聚糖主要以糖原的形式存在。由于制备工艺的不同, 碱解糖原与酶解糖原有很大不同。酶解产物在经过大孔吸附树脂提纯过程中

糖原也被分离出来。在本实验中, 碱解糖原的提取率为 18.7%, 蛋白质含量 < 0.01%, 而酶解糖原的则分别为 60.1% 和 1%。图 8 为碱解糖原与酶解糖原的相对分子质量的比较。

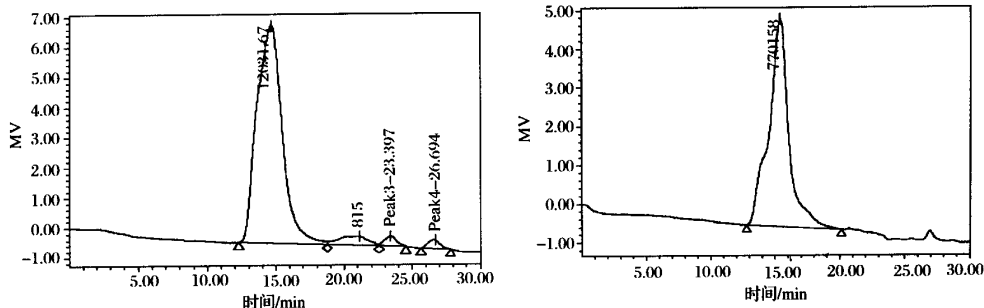


图8 酶解糖原与碱解糖原的相对分子质量的比较(a为酶解糖原,b为碱解糖原)

通过图8可以看出,酶解糖原的相对分子质量高达120万,而碱解糖原则只有77万,出现这种情况的原因是酶水解条件较为温和,得到的糖链端基还保留着长度不一的肽链,反应后的离心清液仍残留组织蛋白,其中一部分可随聚糖一起被乙醇沉淀析出,因而酶解糖原的纯度较低。而碱水解条件较为强烈,彻底破坏糖蛋白中 α -糖肽键,较为彻底地去除蛋白组分,同时会使糖原部分降解。

3 结论

通过对螺螄酶解产物在DA201-C大孔吸附树脂的吸附与解吸过程以及洗脱产物的测定,可得出以下结论:

(1)通过选择适当的条件,大孔吸附树脂对酶解产物的吸附率可达78.4%,依次采用25%和75%乙醇进行阶段洗脱时解吸率为86.64%。

(2)经大孔吸附树脂的提纯,酶解产物的脱糖率为78.59%,脱盐率达93.79%。

(3)洗脱组分中疏水性氨基酸得到了富集,ACE抑制活性有所提高。

(4)酶解糖原比碱提糖原的相对分子质量大而纯度较低。

参考文献

- 1 Tang Zhigang, Zhou Rongqi, Duan Zhanting. Adsorption and desorption behaviour of taurine on macroporous adsorption resins[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2001, 76: 752~756
- 2 史景江, 马熙中. 色谱分析法[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1999, 12
- 3 苏拔贤. 生物化学制备技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998
- 4 Mishra A K, Ahluwalia J C. Alcohol induced conformational transitions of proteins and polypeptides[J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1983, 21: 322~330
- 5 Hong-Son Cheung, Feng-lai Wang, Miguel A. Ondetti, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme[J]. J Biol Chem, 1980, 255 (2): 401~407
- 6 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 科学技术出版社, 1997

Application of Macroporots Adsorption Resin in Purification of *Bellamya purificata* Hydrolysates

Xia Shuhua Wang Zhang Xu Shiying

(Food Science School, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT DA201-C macroporous adsorption resin was used to purificate *Bellamya purificata* Hydrolysates. The result showed that when different concentrations of alcohol 25%, 50% and 75% were used to flush the medium, the hydrophobic amino acid and the ACE inhibiting rate of the fraction increased with the alcohol concentration. When 25% and 75% alcohol was used to elute the medium, the desalting ratio of 93.79% and 78.59% glycogen was obtained. The M_w of glycogen extracted by enzymatic method was higher and the purity was lower than that extracted by alkaline method.

Key words *Bellamya purificata*, macroporous adsorption resin, ACE inhibitory activity, glycogen