

鲑鱼骨蛋白酶解物中抗菌活性物质的初步分离纯化*

张建荣¹, 马俪珍², 梁鹏²

1(山西农业大学食品学院, 山西 太谷, 030801) 2(天津农学院食品科学系, 天津, 300384)

摘 要 用胃蛋白酶酶解鲑鱼头、鱼骨, 酶解得到抑菌活性较高的鲑鱼骨酶解液, 然后对酶解液进行初步分离与纯化。鲑鱼骨蛋白抑菌活性最强的酶解物经过超滤(M_w 3 000 u)和 Sephadex G-15 凝胶层析分离纯化, 采用比浊法和滤纸片法测定其抑菌活性。结果表明, 分离纯化后, 酶解混合物对大肠杆菌、藤黄微球菌以及枯草杆菌的抑菌活性都有一定的提高, 其中层析后峰 2 的抑菌活性最强, 峰 2 对大肠杆菌、藤黄微球菌以及枯草杆菌的抑菌活性要比酶解粗品提高 1 倍左右, 且各组分的平均分子质量均在 1 500 u 以下。峰 2 经反相高效液相色谱分析得出, 组分由 70 多种物质组成, 要想得到纯的抗菌活性物质还需要进一步深入研究。

关键词 鲑鱼骨, 酶解, 抑菌活性肽, 分离纯化

目前对肽类物质分离纯化的方法有许多种, 常用的分离方法有: 超滤法、凝胶过滤层析、凝胶电泳、离子交换树脂、反相高效液相色谱、快速蛋白质液相色谱等^[1]。Jeon^[2]等应用超滤技术对鲑鱼蛋白水解物进行分离纯化, 获得 3 个部分的肽片段, 10 ~ 30 ku 的肽片段具有优良的乳化特性和搅打性能, 分子质量介于 3~10 ku 的肽片段, 其抗氧化性能很高, 而分子量小于 3 ku 的肽片段, 具有显著的抑制 ACE 的活性; Jiun-Rongchen^[3]等用胃蛋白酶酶解大豆分离蛋白, 采用凝胶色谱柱和离子交换分离得到的分子质量在 300~5 000 u 的小分子肽具有很好的生理免疫功能。Kim^[4]等利用三步超滤和反相高效液相色谱法从明胶的水解物中分离出 2 条具有抑制 ACE 活性的三肽; Jang^[5]等人用超滤、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱联合的方法从牛肉蛋白水解物中分离出氨基酸序列为 Val-Leu-Gln-Tyr-Lys 的 ACE 抑制肽; Je^[6]将阿拉斯加青鳉鱼骨架蛋白酶解物通过 SP-Sephadex C-25, 再经 Sephadex G-25 柱, 用 NaCl 进行线性洗脱, 收集具有抗氧化活性的流出液, 再用 HPLC 进行纯化, 得到了最具抗氧化活性, 分子质量为 672 u 的肽段 (Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr)。Kunio^[7]将酪蛋白的酶解产物通过阳离子交换柱, 洗出液再依次通过 Sephadex G-25、SP-Sephadex C-25 柱, 得到了纯抗氧化肽。肖向红等^[8]对中国林蛙皮肤抗菌活性肽进行了分离提取, 经 Sephadex G-100、Sephadex

G-25 和聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等, 从林蛙皮肤中分离获得 5 种小分子多肽。Wang^[9]对小麦蛋白进行酶解, 并对酶解物进行超滤, 发现超滤后酶解物的功能特性显著提高, 他认为酶解物的功能特性与分子质量的大小有紧密的关系。

本试验拟采取超滤法和凝胶过滤层析法对鲑鱼骨蛋白酶解液进行初步分离纯化, 然后用反相高效液相色谱对分离组分进行纯度的研究。对所得纯化产物的抑菌性进行测定, 并将酶解物粗品、超滤后组分以及层析后组分进行抑菌活性的比较。

1 材料与 方法

1.1 试验原料

革胡子鲑鱼头及骨(购自天津市王顶堤水产批发市场)。

1.2 主要试剂

胃蛋白酶(pH 3.0, 活力 1.25 万 U/g), 购自天津诺奥酶制剂公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-15, 瑞典 Pharmacia 进口分装; 超滤膜(M_w 3 000 u), 美国 Millipore 公司; 三氟乙酸(色谱纯), 天津科密欧化学制剂公司; 乙腈(色谱纯), 美国 Fisher 公司; 营养琼脂、牛肉膏、蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.3 供试菌种及培养基的配制

大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*), 均由天津农学院微生物实验室提供。

营养琼脂培养基、牛肉膏蛋白胨液态培养基。

1.4 主要仪器

第一作者: 硕士研究生(马俪珍教授为通讯作者)。

* 天津市科委自选项目“鲑鱼的精深加工技术研究”

收稿日期: 2008-08-18, 改回日期: 2008-10-09

超滤装置,美国 Millipore 公司;层析柱(1 cm×60 cm),瑞典 Amersham 公司;DBS-100 型电脑全自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂有限公司;DHL-A 型电脑恒流泵,上海沪西分析仪器厂有限公司;HD-3 型紫外检测仪,上海沪西分析仪器厂有限公司;HDL-A 型电脑采集器,上海沪西分析仪器厂有限公司;高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1200 series),美国 Agilent 公司;色谱柱(Agilent Zorbax SB-C18, 5 μm, 4.6×15 mm),美国 Agilent 公司。

1.5 试验方法

1.5.1 酶解液的制备

将鲢鱼头及鱼骨清洗干净,经 121℃ 高压蒸煮 30 min,匀浆,然后用无水乙醚在 30℃ 下脱脂 3h,脱脂后的匀浆物加水酶解一定时间后于 85℃ 下灭酶 10 min,离心 10 min(4 000 r/min)得到的上清液,即为酶解液。

酶解的工艺条件为:底物浓度 0.277 kg/L,加酶量 1 408 U/g,酶解温度 39.2℃,酶解时间 4.86 h, pH3.0。

1.5.2 酶解物中抑菌活性物质的分离纯化

1.5.2.1 酶解物超滤分离

用截留分子质量为 3 ku 的超滤膜对酶解液进行超滤,得到分子质量小于 3 ku 的滤液,冷冻干燥后进行抑菌活性的测定并进行凝胶层析 Sephadex G-15 分离。

1.5.2.2 色谱检测波长的选择

在进行抑菌活性物质的凝胶层析分离前,首先需要确定样品的最适检测波长,因此先用紫外/可见分光光度计对鲢鱼骨水解样品进行全波长扫描。

1.5.2.3 凝胶层析 Sephadex G-15 分离

称取超滤冷冻干燥后的粉末 0.1 g 溶于 1 mL 蒸馏水中,将 1 mL 上述溶液缓慢上样于 Sephadex G-15 凝胶过滤柱(1.0 cm×60.0 cm),用洗脱液蒸馏水以流速 0.4 mL/min 洗脱,用紫外检测仪测定其吸光度值,并用电脑采集器采集各吸收峰,冷冻干燥后进行抑菌活性的检测,具有抑菌作用的吸收峰,就是含有抑菌活性物质的样品。

1.5.2.4 采用 RP-HPLC 对分离纯化物质进行分析

取 Sephadex G-15 分离纯化所得的抑菌活性最高的组分冷冻干粉溶于蒸馏水(含 0.1% TFA),配成浓度为 10% 的样品,样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液上 RP-HPLC 系统进行样品组分纯度的分析。

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18 5 μm(4.6×150 mm);上样量:20 μL;流动相 A:含 0.1% TFA 的蒸馏水;流动相 B:含 0.1% TFA 的乙腈。

洗脱条件:用流动相 A 和 B 梯度洗脱(0~60 min 20%~80% B),流速 0.5 mL/min,柱温 30℃。

1.5.3 抑菌活性的测定

1.5.3.1 比浊法^[10]

将纯化的大肠杆菌、枯草杆菌和藤黄微球菌分别在营养琼脂斜面培养基上划线,再挑取菌落接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基内,于 37℃ 下培养 12~24 h,使菌数达 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL,作为测定酶解液抑菌性的供试菌液。

在每个试管中加入 5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基,灭菌,冷却后在超净工作台上无菌操作分别接入 0.1 mL 大肠杆菌、枯草杆菌和藤黄微球菌菌液,再依次加入待测酶解液 1 mL,摇匀后 37℃ 培养 12 h。利用可见分光光度计,在 600 nm 处测定其吸光度值 $A_1 \cdots A_n$,分别测定 3 次,并取其平均值,对照组不加酶解液,同样条件下培养测定吸光度 A_0 ,并取其平均值。

$$\text{抑菌率}/\% = [(A_0 - A_n)/A_0] \times 100$$

菌悬液吸光度值与抑菌率成反比,即菌悬液吸光度越小,则对应酶解液抑菌率越大,抑菌效果越好。

1.5.3.2 滤纸片法

① 菌悬液的制备

据多次预试验,挑取培养 24~48 h 大小适中的菌落 2 个,无菌操作加入 9 mL 无菌生理盐水中,搅拌均匀使菌悬液的含菌数为 $(3 \sim 5) \times (10^6 \sim 10^7)$ cfu/mL。

② 培养基平板的制备

将高压蒸汽灭菌并冷却至 50~60℃ 的培养基,无菌操作倾注于干热灭菌的培养皿内,每皿约 15 mL,制成平板待用。

③ 滤纸圆片的准备

用打孔器将厚度为 1.5 mm 的新华牌滤纸打成直径 6 mm 的滤纸圆片,并将滤纸片包裹后,160℃ 干热灭菌 2 h 备用。

④ 方法

用灭菌枪头向每个灭菌平皿中各加入 0.2 mL 供试菌悬液,并用无菌玻璃涂布棒涂布均匀。将灭菌滤纸圆片分别置于不同浓度鲢鱼骨蛋白酶解液中,浸泡 1 min,对照组用无菌蒸馏水浸泡,取出,待纸片微干后贴于平皿上,每个样品作 3 板重复。然后将平皿

倒置于恒温箱中,在 37℃下恒温培养 24 h,观察鲑鱼骨蛋白酶解产物对上述受试菌株生长的影响,用测微尺测定各抑菌圈大小(直径 mm)。

将抑菌圈直径在 12 mm 以上的定为抑菌力强(+++),10~12 mm 定为抑菌力较强(++),6~10 mm 定为抑菌力弱(+),6 mm 为无抑菌力(-)。

2 结果与分析

2.1 色谱检测波长的选择

酶解液样品在可见区(700~300 nm)吸光值均很小,而紫外区 220.5 nm 处有一段较稳定的最大吸收峰。因此选择 220 nm 为检测波长。

2.2 凝胶层析谱图

超滤后的酶解物经 Sephadex G-15 凝胶过滤层析,在 220 nm 处得出的吸收峰见图 1。分 4 部分收集分离组分,29~38 min 收集的液体部分为峰 1,

39~59 min 为峰 2,60~92 min 为峰 3,93~126 min 为峰 4。

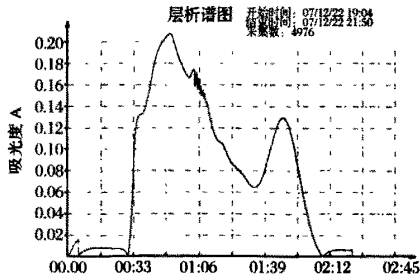


图 1 Sephadex G-15 凝胶层析谱图

2.3 酶解粗品与分离组分抑菌活性的对比试验结果

2.3.1 比浊法试验结果

将超滤以及凝胶层析后的酶解液冷冻干燥后配成一定浓度的溶液与同浓度的酶解粗品进行抑菌活性的比较,结果见表 1。

表 1 酶解粗品与分离组分抑菌活性的比较

	对大肠杆菌的抑菌率/%	对枯草杆菌的抑菌率/%	对藤黄微球菌的抑菌率/%
酶解粗品/1%	35.90	10.74	42.91
超滤后(1%)($M_w < 3000$)	50.86	45.94	57.80
层析峰 1(1%)	21.13	7.98	64.35
层析峰 2(1%)	79.91	47.87	78.37
层析峰 3(1%)	-66.67	7.94	-43.60
层析峰 4(1%)	-89.10	-49.75	-19.36
酶解粗品(6%)	56.49	45.45	61.54
超滤后(6%)($M_w < 3000$)	70.10	66.15	68.51
层析峰 1(6%)	65.74	43.70	58.79
层析峰 2(6%)	80.98	67.34	81.74
层析峰 3(6%)	-46.35	-36.67	-53.57
层析峰 4(6%)	-30.62	-4.72	2.58

由表 1 可以看出,超滤后酶解混合物与酶解粗品相比,超滤后的酶解混合物的抑菌活性要强于酶解粗品,而且随着酶解液的浓度增加,抑菌活性也随之增强;超滤后的样品再经过 Sephadex G-15 凝胶过滤层析,可以得到 4 个组分,不论层析后的酶解液浓度是 1% 还是 6%,层析峰 2 的抑菌活性最强,层析峰 2 的抑菌活性要比酶解粗品增强 1 倍左右。因此,选定峰 2 进行反相高效液相色谱分析。此外,表 1 中有负值出现的现象,我们认为这一浓度或不同的层析峰对不同菌不具有抑菌性,或对此菌还具有一定的促生长作用,这方面还有待于进一步深入研究。

2.3.2 滤纸片法试验结果

在比浊法试验结果的基础上,利用滤纸片法对试

验结果进一步进行验证,不同浓度的酶解粗品、超滤后以及层析后的酶解液对 3 种菌的抑菌圈直径测定结果见表 2 和图 2。

由表 2 和图 2 可以看出,酶解粗品、超滤后以及层析后的酶解液对大肠杆菌的抑制作用和比浊法测定结果一致,即抑菌强弱顺序基本次序为:层析峰 2 > 超滤后 > 层析后峰 1 > 酶解粗品,层析后峰 3 和峰 4 对三种菌都没有抑制作用。样品对于枯草杆菌和藤黄微球菌的抑制作用很弱。

2.4 反相高效液相色谱图

对经过超滤和凝胶过滤层析的抑菌作用较强的峰 2 进一步做反相高效液相色谱图,结果见图 3。

表 2 酶解粗品与分离组分抑菌活性的比较(抑菌圈直径:mm)

	大肠杆菌		枯草杆菌		藤黄微球菌	
酶解粗品(1%)	8.0	+	6.0	—	6.0	—
超滤后(1%)($M_w < 3\ 000u$)	8.5	+	6.0	—	7.0	+
层析峰 1(1%)	9.5	+	6.0	—	7.5	+
峰 2(1%)	10.5	+	6.5	+	8.5	+
峰 3(1%)	6.0	—	6.0	—	6.0	—
峰 4(1%)	6.0	—	6.0	—	6.0	—
酶解粗品(6%)	10.5	++	6.5	+	6.5	+
超滤后(6%)($M_w < 3\ 000u$)	13.0	+++	6.5	+	6.0	—
层析峰 1(6%)	12.5	+++	7.5	+	6.0	—
峰 2(6%)	14.0	+++	8.5	+	6.0	—

1- 超滤后(6%), 2- 酶解粗品(6%),
3- 峰 1(6%), 4- 峰 2(6%), K- 空白

1- 超滤后(1%), 2- 层析峰 1(1%),
3- 峰 2(1%), 4- 峰 3(1%), 5- 峰 4(1%),
K- 空白

图 2 酶解粗品与分离组分抑菌活性的比较

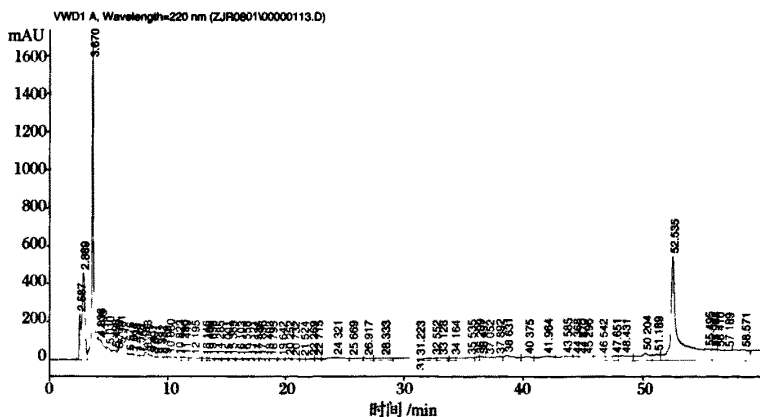


图 3 反相高效液相色谱图

由反相高效液相色谱图可以看出,峰 2 中有 70 多种物质组成,仅经过超滤和凝胶过滤层析还无法将抑菌活性肽分离出来,还需要一些其它的分离方法相结合进行分离。

3 讨论

本试验采用超滤和 Sephadex G-15 凝胶层析这两种分离方法对鲮鱼骨酶解产物抑菌活性物质进行了初步的分离纯化,经过反相高效液相色谱得出分离

组分仍然由 70 多种物质组成,这说明要想得到单一的抑菌活性物质还需要结合其它的分离方法进行分离。Kim 等人^[11]利用超滤法、离子交换层析以及反相高效液相色谱对鱼骨蛋白胃蛋白酶酶解产物抗氧化活性物质进行了分离纯化,得到纯化后的抗氧化活性肽的分子质量为 1 801 u。

本试验选用的 2 种分离方法都是根据要分离组分的分子质量大小进行分离的,许多研究学者认为:多肽分子在水溶液中以带电荷的离子形式存在(等电

点除外),合适的离子交换树脂可以对它们进行交换,同一 pH 值条件下,不同的多肽所带净电荷不同,与离子交换树脂的亲和能力也不同。根据这一特点可以采用不同洗脱能力的洗脱剂将它们进行分离。所以,今后我们可以结合离子交换树脂和制备型液相色谱的分离方法对抑菌活性组分进行进一步的分离,得到单一物质后进行氨基酸序列的分析,并精确其分子组成。

4 小结

鲢鱼骨胃蛋白酶酶解物经过超滤膜和 Sephadex G-15 凝胶层析分离纯化,采用比浊法和滤纸片法测定各个组分的抗菌活性,结果表明:分离纯化后,酶解混合物对大肠杆菌、枯草杆菌以及藤黄微球菌的抑菌活性都有一定的提高,层析后峰 2 的抑菌活性最强,峰 2 对大肠杆菌、枯草杆菌以及藤黄微球菌的抑菌活性要比酶解粗品提高 1 倍左右,且各组分的平均相对分子质量均在 1 500 u 以下。峰 2 经反相高效液相色谱分析得出组分由 70 多种物质组成,要想得到纯的抗菌活性物质还需要进一步的分离。

参 考 文 献

- 1 赵锐,顾谦群.多肽物质分离与分析方法研究进展[J].中国海洋药物,2000(3):48~53
- 2 You J J, Hee G B, Se K K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes[J]. Process Biochemistry, 1999, (35): 471~478
- 3 Jiun RC, Kunio S, Fumio Y. Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean[J]. Nutritional Biochemistry, 1995, 14(6): 310~313
- 4 Kim S K, Byum H G, Park P, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 2 992~2 997
- 5 Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. Meat Science, 2005, 69: 653~661
- 6 Je J Y, Park P J. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack(*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate[J]. Food Research International, 2005, 38(1): 45~50
- 7 Suetsuna K, Ukeda H. Isolation of an octapeptide which possesses active oxygen scavenging activity from peptic digest of sardine muscle[J]. Nippon Suisan Gakkaish, 2000, 65(6): 1 096~1 099
- 8 肖向红,徐义刚,柴龙会.中国林蛙皮肤抗菌活性肽的分离提取[J].东北林业大学学报,2005,33(1):44~46
- 9 Wang J S, Zhao M M, Yang X Q, et al. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration[J]. Journal of Cereal Science, 2006(44): 93~100
- 10 韩晓强,马偈珍.中性蛋白酶酶解羊骨产物抗菌性的研究初探[J].食品研究与开发,2006,27(9):1~4
- 11 Kim S Y, Je J Y, Kim S K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki(*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007(18): 31~38

Primary Purification of Antibacterial Substance from Catfish Bone Hydrolysates

Zhang Jianrong¹, Ma Lizhen², Liang Peng²

1(Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

2(Food Science Department, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China)

ABSTRACT Our research was based on hydrolysate gotten from hydrolyzing the catfish bone by pepsin, and we separated and purified the hydrolysate to test its antibacterial activity. Two methods were used, one is the ultrafiltration membranes(M_w 3 000 u) and the other is Sephadex G-15 gelatin separation and purification, and antibacterial activity was measured by turbidimetry and filter paper method. Result as: the antibacterial ability to *E. coli*, *micrococcus luteus* and *bacillus subtilis* of purified hydrolysate has increased; peak 2 has the highest antibacterial ability, which is about two times the ability of origin hydrolysate, and its composed material molecular weight all are lower than 1 500 u. Liquid chromatogram analysis found that peak 2 was composed of more than 70 kinds of materials. In order to obtain purified antibacterial peptide further separation and purification is needed.

Key words catfish bone, hydrolyzation, antibacterial peptides, purification