

离子交换色谱分离海洋胶原肽及其抗氧化活性研究*

金振涛,任玮,陈亮,蔡木易,易维学

(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

摘 要 以工业化生产的海洋鱼皮胶原肽为研究对象,研究了从中分离抗氧化活性肽的方法。分别探索了分子排阻色谱和离子交换色谱直接梯度洗脱以及先等度洗脱,再梯度洗脱3种洗脱方法的分离效果,发现离子交换色谱先等度洗脱,再梯度洗脱分离效果最好,共分成5个洗脱峰。优化出此方法下的最佳洗脱液pH为5.5,最佳上样量为50mg。在优化的分离条件下分离并富集样品,脱盐后测定分离前后抗氧化活性,与原胶原肽相比,3[#]、4[#]、5[#]峰均显示出较强的抗氧化活性,其中3[#]峰活性最强,提高了10.6倍。这对工业化生产高抗氧化活性肽具有一定参考价值。

关键词 海洋胶原肽,分子排阻色谱,离子交换色谱,抗氧化活性

近年来的研究表明,人类摄取的蛋白质经过消化的多种酶水解后,不是仅以氨基酸的形式吸收,更多的是以小肽的形式被直接吸收(70%),而且二肽和三肽的吸收速度比同一组成的氨基酸要快。体外酶解食物蛋白得到的食源性低聚肽不仅具有原组成蛋白的营养功能,而且具有了小肽的易吸收特性以及一系列原蛋白和组成氨基酸所不具备的独特的生理功能,这使得食源性低聚肽的研究成为当前一大热点^[1,2],研究人员从不同来源的蛋白原料如大豆蛋白^[3~6]、玉米蛋白^[7]、小麦蛋白^[8]、乳蛋白^[9~11]、鱼皮蛋白^[12]等为原料,制备或生产出一系列具有抗氧化、降血压以及降血脂等功能的低聚肽产品。

胶原蛋白是近年来功能食品市场一大热点,这主要是由于它具有促进细胞的新陈代谢,改善皮肤细胞的生存环境,延缓细胞老化,进而使人的皮肤柔润光滑而有弹性等功能,这些功能主要由于其所具有的抗氧化活性^[13,14]。酶解胶原蛋白所得到的胶原肽结合了胶原蛋白所具有的抗氧化活性和低聚肽的易吸收等特点,因而具有独特的应用优势。

本研究以工业化生产的深海鱼皮胶原蛋白酶解产物海洋胶原肽为样品,摸索并优化出抗氧化肽的离子交换色谱条件,对今后工业化生产高抗氧化活性肽产品具有一定参考价值。

第一作者:硕士研究生(蔡木易教授级高工为通讯作者)。

*“863”国家高技术研究发展计划“现代食品生物工程技术专题”项目“工业化水平食源性低聚肽结构测定与体内外功能评价体系的建立”课题(2007AA10Z327)

收稿日期:2008-10-27,改回日期:2008-12-29

1 材料和方法

1.1 实验材料

海洋胶原肽粉(北京中食海氏生物技术有限公司);1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)(Sigma公司);Sephadex G-15(GE Healthcare),SP-Sephadex C-50(Amersham Pharmacia Biotech);其它所用试剂为分析纯试剂。

1.2 主要仪器

DBS-100 电脑全自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂;DHL-A 电脑恒流泵,上海沪西分析仪器厂;TH-1000 梯度混合器,上海沪西分析仪器厂;UV-2100 紫外可见分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;pH211 pH计,HANNA Instruments;QL-901 涡轮混合仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;SHB-III A 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;RE-52A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 分子排阻色谱 Sephadex G-15 分离胶原肽

柱型:1.6 cm×90 cm;洗脱液:过膜蒸馏水(蒸馏水过 $\Phi=0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,以后所用缓冲液都经此步处理);洗脱流速:0.2 mL/min;上样量:10 mg;检测波长:220 nm。

1.3.2 离子交换色谱 SP-Sephadex C-50 分离胶原肽

柱型:2.5 cm×50 cm;洗脱液:0.02 mol/L 醋酸缓冲液;洗脱流速:0.9 mL/min;检测波长:220 nm。

1.3.2.1 直接梯度洗脱和先等度洗脱,再梯度洗脱2种方法分离胶原肽摸索与比较

在 50mg 上样量,缓冲液 pH4.0 条件下分别摸索直接梯度洗脱和先等度洗脱,再梯度洗脱 2 种洗脱方法的分离情况,找出较佳分离方法。

1.3.2.2 先等度洗脱,再梯度洗脱条件下最佳 pH 值研究

在 1.3.2.1 所述较佳分离方法条件下,固定上样量 50mg,分别摸索 pH=4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,7.0 (pH=7.0 时使用磷酸缓冲液)不同 pH 条件下的分离情况,优化 pH 值。

1.3.2.3 先等度洗脱,再梯度洗脱条件下最佳上样量研究

在 1.3.2.2 研究优化出的 pH 条件下分别摸索上样量 25mg,50mg,100mg 条件下的分离情况,优化上样量。之后在之前研究出的优化条件下分离并反复收集样品,合并相同峰,45℃ 旋转蒸发浓缩后分别用 Sephadex G-10 凝胶脱盐,旋转蒸发浓缩后冷冻干燥备用。

1.3.3 抗氧化活性测定^[15,16]

在试管中依次加入 1.5 mL 样品,1.5 mL DPPH 溶液(2×10^{-4} mol/L,溶于 99% 乙醇中),振荡摇匀,室温避光反应 30 min 后以无水乙醇做参比,在 517nm 测定吸光值 A_i ,同时测定 DPPH 与乙醇混合液吸光值 A_c ,待测液与等体积乙醇混合液吸光值 A_j 。样品对 DPPH 自由基的清除能力用清除率 R 表示,公式为:

$$R/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100$$

自由基清除率为 50% 时样品浓度记为 IC_{50} 。

分别测定胶原肽以及 1.3.2.3 分离的各峰抗氧化活性(浓度均为 4mg/mL)。

2 结果与讨论

2.1 分子排阻色谱 Sephadex G-15 分离胶原肽

分子排阻色谱主要通过分子量大小进行分离,该法肽的回收率很高,活力不受破坏且结果处理方便,是目前广泛使用的肽的分离方法之一,也是所有色谱技术中操作最简单、条件最温和的方法之一^[17]。若以水为流动相进行洗脱,可避免之后脱盐的麻烦,故本实验首先摸索此条件下的分离效果,结果如图 1 所示。从图 1 可看出,分子排阻色谱对胶原肽分离效果较差,未达到有效分离。这主要是由于胶原肽整体分子质量在 1000u 以下,且组分复杂,分布集中,此种类型填料不能对其实现有效分离。

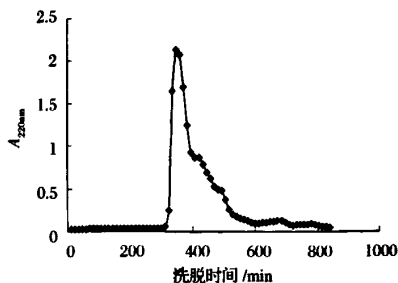


图 1 分子排阻色谱分离胶原肽

2.2 离子交换色谱 SP-Sephadex C-50 分离胶原肽

离子交换色谱是利用溶质分子带不同性质的电荷和不同的电荷量而实现分离的一种色谱技术^[18]。一般结构差别很小的短肽在一定 pH 值和离子强度条件下电荷性质会有一定的差异。SP-Sephadex C-50 离子交换剂本身带有强的功能基团磺丙基(SP^-),且颗粒较细,适合带电量不大且分子较小的物质的吸附。

2.2.1 直接梯度洗脱和先等度洗脱,再梯度洗脱两种方法分离胶原肽摸索与比较

梯度洗脱是分离复杂组分时的首选,一般采用先等度洗脱,再梯度洗脱方法,其原理是先用缓冲液洗脱出与填料结合较弱的组分,再采用梯度增加离子强度的方法逐步洗脱出结合较紧密的组分。此法需更换缓冲液,对分离稳定性有一定影响,而且操作较为繁琐。直接进行梯度洗脱分离效果不及前者,但结果稳定,操作简单。若直接梯度洗脱能对胶原肽实现有效分离则能提高试验稳定性与效率,故首先对这 2 种不同洗脱方法进行摸索,结果如图 2 和图 3 所示。可看出对于组分比较复杂的胶原肽,离子交换色谱 2 种不同的洗脱方法都实现了有效分离,洗脱效果明显好于分子排阻色谱。而先等度洗脱,再梯度洗脱效果要明显好于直接梯度洗脱,故采用先等度洗脱,再梯度洗脱方法分离胶原肽。下面对其分离条件进行优化。

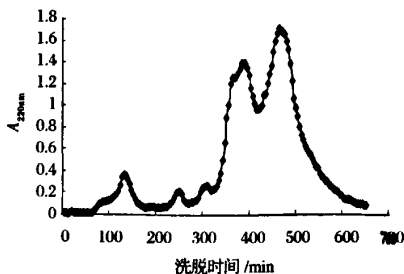


图 2 SP-Sephadex C-50 直接梯度洗脱分离胶原肽

2.2.2 先等度洗脱,再梯度洗脱条件下最佳 pH 值

研究

SP-Sephadex C-50 为阳离子交换剂,洗脱过程中,带较多负电荷的物质因电荷排斥首先被洗脱下来,而带正电荷较多的物质只能在较高盐浓度条件下才能被洗脱下来^[18]。而对低聚肽类样品,决定其所带电荷的正负和多少的最主要因素是 pH 值,其它因素影响相对较小,故首先对 pH 进行优化,结果如图 3~图 8 所示。

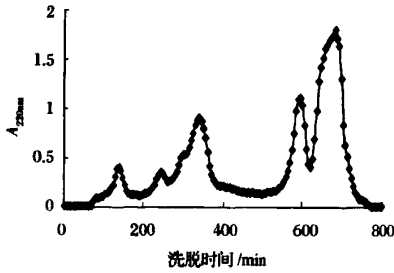


图 3 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱分离胶原肽, pH=4.0

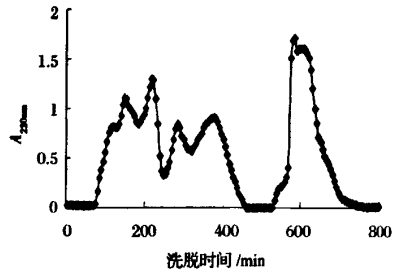


图 4 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱分离胶原肽, pH=4.5

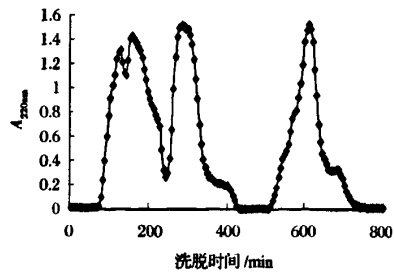


图 5 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱分离胶原肽, pH=5.0

对离子交换色谱条件的摸索,有文献选择采用试管法^[17],但实际效果并不明显,且误差较大,故本实验选用实际分离摸索。从图中可看出, pH 对胶原肽洗脱效果影响很大。在 pH4.0 时,大部分组分带上了正电荷,梯度洗脱分成两大峰;部分带上了负电荷,带强负电荷组分较少,整体分离效果不佳;在 pH=

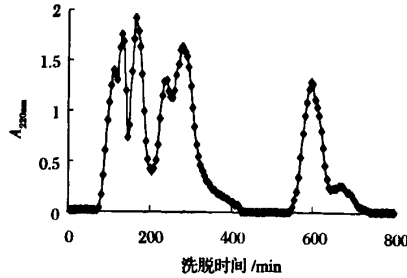


图 6 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱分离胶原肽, pH=6.0

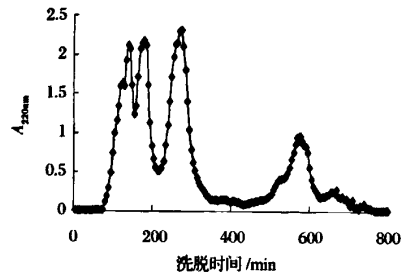


图 7 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱分离胶原肽, pH=7.0

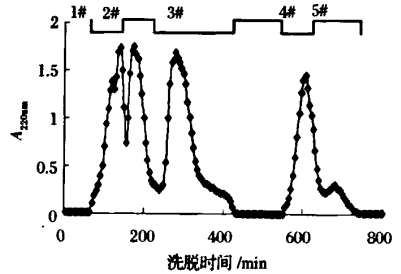


图 8 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱分离胶原肽, pH=5.5

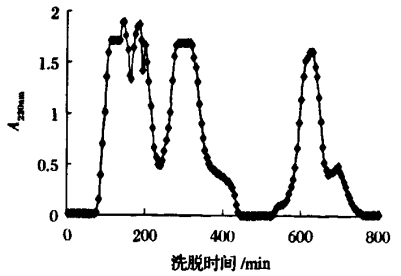


图 9 上样量 100mg

4.5 时,大部分组分已带上负电荷,电荷大小分布较连续,分离效果比较差;在 pH=7.0 时,大部分组分带上较强负电荷,分离效果也不好;在 pH5.0,5.5 以及 6.0 时,整体电荷分布较为均匀,带负电荷的组分分布也较为分散,其中 pH5.5 和 pH6.0 时分离效果

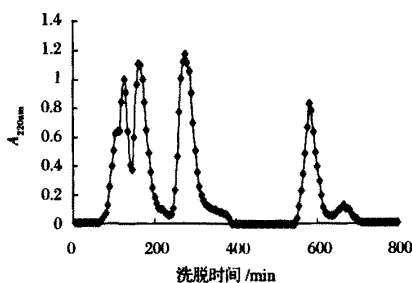


图 10 上样量 25mg

相对最好,同时由于缓冲液 pH 越小,分离时介入的盐会越少,将会减少后续脱盐的压力,故选用 pH5.5 作为分离胶原肽最佳 pH。

2.2.3 最佳上样量摸索

在制备型色谱分离中,合适的上样量至关重要。上样量太小则浪费时间和成本,上样量太大则不能得到理想的分离效果,本实验对缓冲液 pH5.5 时的最适上样量进行摸索。如图 8,图 9 和图 10 所示,可看出,100mg 的上样量明显过量,而 25mg 的上样量与 50mg(如图 8 所示)洗脱效果相差无几,故 50mg 的上样量是比较合适的。

2.3 胶原肽及离子交换色谱各洗脱峰抗氧化活性测定(DPPH 法)

DPPH 是一个稳定的以氮为中心的自由基,在有机溶剂中非常稳定,其孤对电子在 517nm 附近有强吸收(显深紫色)。当有机清除剂存在时,孤对电子被配对,吸收消失或减弱,通过测定吸收减弱的程度,即可评价抗氧化剂对 DPPH 自由基清除活性^[19]。同时若受试物能清除它,则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧自由基等自由基的有效浓度、打断脂质过氧化链反应的作用。此方法对抗氧化剂抗氧化活性的评价相对全面。

实验得出胶原肽清除 DPPH 的 IC_{50} 为 20.719 mg/mL,与本实验室其它食源性低聚肽相比清除 DPPH 活性处于中游,然而经过一步分离纯化后部分峰活性提高较多,测得各峰 4 mg/mL 时活性如表 1 所示,活性最高的为 3[#] 峰,清除率达 72.9%,4[#] 峰、5[#] 峰活性也较高,分别为 62.1%、48.9%,均远高于胶原肽的 16.3%。1[#] 峰和 2[#] 峰此浓度下无明显清除 DPPH 活性。进一步测定 3[#] 峰的 IC_{50} 为 1.952 mg/mL,相比于原胶原肽其活性提高了 10.6 倍,此活性优于文献中报道的食源性低聚肽^[15,20](胶原肽本身抗氧化活性较差)。

实验中胶原肽经过一步分离纯化后 3[#] 峰,4[#]

峰,5[#] 峰抗氧化活性整体都较高,合并这 3 个峰则同样能够得到活性较高的抗氧化活性肽组分,且得率较高,同样具有一定应用价值。

表 1 胶原肽及其分离各组分抗氧化活性

组分(4 mg/mL)	胶原肽	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]
DPPH 清除率/%	16.3	4.1	3.6	72.9	62.1	48.9

3 结论

(1)探索了分子排阻色谱 Sephadex G-15 对胶原肽的分离情况,效果较差。

(2)比较了离子交换色谱 SP-Sephadex C-50 直接梯度洗脱和先等度洗脱,再梯度洗脱 2 种方法对胶原肽的分离情况,结果显示,2 种方法都实现了对胶原肽的有效分离,而先等度洗脱,再梯度洗脱效果更好。

(3)在离子交换色谱 SP-Sephadex C-50 先等度洗脱,再梯度洗脱条件下对其缓冲液 pH 和上样量进行优化,结果显示 pH5.5 时分离效果最好,此时其最佳上样量为 50mg。

(4)对胶原肽及离子交换色谱各洗脱峰抗氧化活性测定显示通过一步离子交换色谱胶原肽分成 5 个洗脱峰,经过脱盐后,较原胶原肽相比,3[#]、4[#]、5[#] 峰均显示出较强的抗氧化活性,其中 3[#] 峰活性最强,提高了 10.6 倍。这对工业化生产高抗氧化活性肽具有一定参考价值。

参 考 文 献

- 1 黄家音,朱禹洁,沈金玉. 降血压肽研究进展[J]. 食品与发酵工业,2006,32(6):81~86
- 2 李勇,蔡木易. 肽营养学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2007.1~5
- 3 Chen Huaming, Koji Muramoto, Fumio Yamau-chi. Structural analysis of antioxidative peptides from soy-bean β -conglycinin[J]. J Agric Food Chem,1995,43:574~578
- 4 Pena-Ramos E A, Xiong Y L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system[J]. Journal of Food Science,2002,67:2 952~2 956
- 5 Wu Jianping, Ding Xiaolin. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International,2002,35:367~375
- 6 Pak VV, Koo MS, Kasymova TD, et al. Isolation and Iden-

- tification of Peptides from Soy 11S-Globulin with Hypocholesterolemic Activity[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2005, 41(6): 710~714
- 7 张强, 阚国仕, 陈红漫. 玉米抗氧化肽的分离制备及其体外抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(5): 36~39
 - 8 蒲首丞, 王金水, 王亚平. 响应面法对酶水解谷朊粉制备生物活性肽的优化研究[J]. 粮食与饲料工业, 2005(5): 23~25
 - 9 Tsuge N, Eikawa Y, Nomura Y, et al. Antioxidant activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1991, 65: 1 635~1 641
 - 10 Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2000(11): 128~131
 - 11 Murakami M, Tonouchi H. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -Lactosin B) isolated from a commercial whey product[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 1 967~1 974
 - 12 Kim SK, Byun HG. Isolation and Characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of allaska pollack skin [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 1 984~1 989
 - 13 袁炳毅. 生物技术制剂及其在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 1996, (1): 52~55
 - 14 陈冬英. 胶原蛋白与化妆品[J]. 香料香精化妆品, 2001(6): 18~20
 - 15 Li Bo, ChenFeng. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2007, 102: 1 135~1 143
 - 16 Niranjan Rajapakse, Eresha Mendis. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38: 175~182
 - 17 张晓梅. 降血压和降胆固醇大豆肽的分离纯化[D]. 无锡: 江南大学, 2006. 15
 - 18 陆建. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京, 化学工业出版社, 2005. 53~55
 - 19 王萍, 葛丽花. 阿魏酸低聚糖的体外抗氧化性质的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 8~11
 - 20 张一江, 曹文红, 毕春波. 海湾扇贝酶解产物清除自由基活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34, (4): 60~63

Isolation of Marine Collagen Peptide with Ion Exchange Chromatography and Research of the Anti-oxidative Activity

Jin Zhentao, Ren Wei, Chen Lian, Cai Mui, Yi Weixue

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT Industrial product Marine Collagen Peptide was taken as the research object, the isolation effects of size exclusion chromatography and ion exchange chromatography were studied respectively. The ion exchange chromatography was studied by two different ways: gradient elution directly and first isocratic elution, then gradient elution. The results showed that the elution effect of first isocratic elution, then gradient elution was the best, and the peptide was separated into 5 elution peaks. In this elution condition, the pH of the eluent and the volume of the sample were optimized respectively, the results were 5.5 and 50mg. The sample was separated about 10 times, the elution peaks were collected and desalted respectively, and the antioxidative activities were determined. Compared to the sample peptide, peak 3*, 4*, 5* showed strong activity, with peak 3* has the strongest activity, which was 10.6 times of the sample peptide. This research of the anti-oxidative activity of Marine Collagen Peptide provides advice to industrial manufacturing.

Key words marine collagen peptide, size exclusion chromatography, ion exchange chromatography, anti-oxidative activity