文章编号：1009－038X(2003)04－0069－03

大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽的脱盐和色谱分离

赵 利， 王 璋， 许时婴
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214036）

摘 要：利用 DA201-C 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽脱盐并进行分离分级. 结果表明，大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽的脱盐率在 97% 以上，酪蛋白非磷肽的回收率约在 95%，同时用不同体积分数的乙醇对酪蛋白非磷肽进行阶段洗脱，酪蛋白非磷肽均可以分离出 3 个组分.

关键词：大孔吸附树脂；酪蛋白非磷肽；色谱分离
中图分类号：O 657.7　　**文献标识码**：A

The Application of Macroporous Adsorption Resin in Desalt and Chromatographic Separation of Casein Non-phosphate Peptides

ZHAO Li， WANG Zhang， XU Shi-ying
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: DA201-C macroporous adsorption resin was used to desalt and casein non-phosphate peptides were separated with Sephadex G-25. The result showed that the desalting ratio reached about 97%, whereas the recovery of casein non-phosphate peptides was about 95%. Three concentrations of different alcohol 30%, 50% and 70% were used to separate casein non-phosphate, and the peptides were fractionated to three peaks.

Key words: macroporous adsorption resin; casein non-phosphate peptides; chromatography

大孔吸附树脂是一类新型非离子型高分子吸附剂，它是由苯乙烯、二乙烯苯或甲基丙烯酸酯等聚合而成的高分子网状孔穴结构，在整个颗粒内部及外部都具有表面活性. 其本身由于范德华力或氢键的作用，具有吸附性能；同时又具有网状结构和很高的比表面积能对分子大小不同的化合物进行筛选[1,2].

酪蛋白的疏水性一般比其它蛋白质高. α_{S1}-酪蛋白含有 3 个强的疏水区域 α_{S1}-(1～40，90～110，130～199). α_{S2}-酪蛋白的 α_{S2}-(90～120) 区域有一个强的疏水性羧基末端和一个较弱的疏水性段. β-酪蛋白是疏水性最强的酪蛋白，富含疏水性残基的 C-末端占有整个链长的 3/4，这种特定结构决定了 β-酪蛋白具有强疏水性. κ-酪蛋白中 N-末端的副 κ-酪蛋白占整个链长的 2/3，具有较高的疏水性[3]. 酪蛋白非磷肽(CNPP)是酪蛋白中的磷酸肽分离后的副产物，大部分是酪蛋白中疏水性较强的肽段. 在分离纯化 CNPP 的过程中，先采用凝胶过滤色谱按不同相对分子质量进行分离，如果下一步分离涉及到离子交换色谱或高效液相色谱等步骤，CNPP 中由于制备过程和凝胶过滤所引入的较高质量浓度的无机盐会妨碍直接进行下一步骤，CNPP 的脱盐是一个必要的环节. 此外，具有不同活性的 CNPP 中氨基酸的组成各有特点，如阿片激动肽的氨基末

收稿日期：2002－12－31； 修回日期：2003－03－12.
作者简介：赵利(1967－)，女，江西大余人，食品科学与工程博士研究生.

万方数据

端存在 Tyr 残基,且在第三或第四位上存在另一个芳香族氨基酸残基(Phe 或 Tyr)[4],抑制血管紧张素转化酶(ACE)活性肽的 C-末端含有 Pro 或 C-末端 3 个氨基酸残基位置含有疏水性氨基酸[5]. 这样,CNPP 中不同活性肽间的疏水性存在一定的差异,理论上可以根据这些性质将 CNPP 分离.

为了探索一条分离肽的新途径,研究了大孔吸附树脂对 CNPP 的吸附性质[6],探索大孔吸附树脂对 CNPP 色谱分离的可能性.

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

酪蛋白:内蒙古绿宝石乳业集团公司产品;Alcalase FG 2.4L (Novo Nordisk A/S 2800 Bagsvaerd, Denmark);Sephadex G-25:Sigma 公司产品;DA201-C 系列大孔吸附树脂:江阴市有机化工厂生产;HD-3 紫外检测器:上海沪西分析仪器厂产品;DDS-11C 电导率仪:上海雷磁仪器厂生产.

1.2 方法

1.2.1 CNPP 的制备工艺 称取一定量的酪蛋白,在搅拌下加入一定量的水,用 2 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值为 8.0~9.0,在 60 ℃ 条件下使酪蛋白全部溶解. 加入适量 Alcalase,并用 2 mol/L 氢氧化钠维持水解液 pH 值,根据加碱量控制水解液达到 20% 水解度. 加入 1.0~1.2 g/dL 无水氯化钙,搅拌至溶后在搅拌状态下缓慢加入适量乙醇使最终乙醇体积分数达到 70%,离心,上清液先经真空浓缩除去乙醇,再经冷冻干燥即得 CNPP.

1.2.2 凝胶过滤分离 CNPP 取经冷冻干燥的 CNPP,用 pH 值3.6,0.2 mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液溶解配制 30 g/dL CNPP 溶液 20 mL,用 Sephadex G-25 柱层析(2 cm × 200 cm),以 pH 值 3.6,0.2 mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液按 22 mL/h 体积流量洗脱,同时用紫外检测仪在波长 220 nm 进行检测,收集组分.

1.2.3 DA201-C 大孔吸附树脂分离 CNPP

1) 大孔吸附树脂的预处理:将一定量的树脂先用无水乙醇浸泡 24 h,然后用无水乙醇洗至 220 nm 处无吸收峰,再用去离子水洗净.

2) CNPP 的脱盐及回收:在室温条件下,CNPP 经 Sephadex G-25 柱层析所得到的组分溶液流过 DA201-C 大孔吸附树脂层析柱(1 cm × 20 cm),体积流量 30 mL/h,用紫外检测器检测流出液的 A_{220nm},以 A_{220nm} 等于 0.01 为透过点. 实验中所用 CNPP 组分的体积均小于透过点通液量,用去离子水以同样体积流量洗柱至流出液的电导率与去离子水一致,再用体积分数 70% 乙醇解吸. 乙醇解吸所得溶液中多肽质量浓度的测定是将乙醇蒸发后加去离子水定容,按 Folin-酚法测定.

CNPP 的回收率 = 解吸后多肽的质量浓度/(吸附前 CNPP 溶液中肽的质量浓度 × CNPP 溶液的上样体积)

大孔吸附树脂的脱盐率 = (水清洗液中钙离子的质量浓度 × 水洗液体积)/(吸附前 CNPP 溶液中钙离子的质量浓度 × CNPP 溶液的上样体积)

3) CNPP 的分离 在室温条件下,CNPP 经过 Sephadex G-25 柱层析所得到的组分溶液流过 DA201-C 大孔吸附树脂层析柱(2.6 cm × 30 cm),体积流量 160 mL/h,用紫外检测器检测流出液的 A_{220nm},以 A_{220nm} 等于 0.01 为透过点. 实验中所用 CNPP 组分的体积均小于透过点通液量. 用去离子水洗涤层析柱至流出液的电导率与去离子水一致,然后用体积分数为 30%,50% 和 70% 乙醇阶段洗脱层析柱,收集组分.

4) 多肽的呈色反应:双缩脲反应[7].

5) CNPP 组分中钙质量浓度的测定:络合滴定法[8].

2 结果与讨论

2.1 Sephadex G-25 凝胶过滤分离酪蛋白非磷肽

Sephadex G-25 分离 CNPP 的结果见图 1. CNPP 可被分离出 5 个峰,收集组分 A(37~82 管)、组分 B(84~92 管)、组分 C(94~108 管)、组分 D(111~122 管)和组分 E(126~165 管). 用双缩脲反应检测发现,CNPP 组分 A、B 和 C 呈现紫玫瑰色,而组分 D 和 E 没有此种颜色反应,说明二肽以上的多肽主要存在于组分 A、B 和 C 中. 所以对活性肽的分离可局限于组分 A、B 和 C 三者.

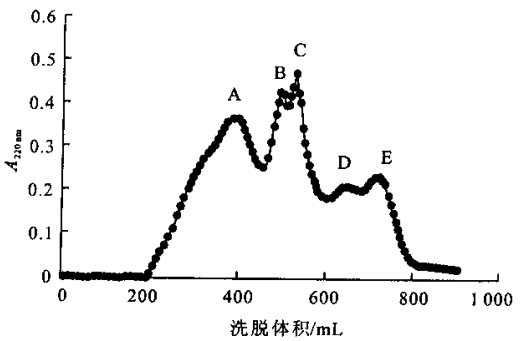


图 1 CNPP 的 Sephadex G-250 凝胶过滤过色谱图

Fig. 1 Felution profile from gel filtration chromatography on Sephadex G-250 of CNPP

万方数据

2.2　CNPP 组分的脱盐和回收

大孔吸附树脂是一类不同于离子交换树脂的吸附和筛选性能相结合的分离材料,它是分离有机化合物尤其是水溶性化合物的有效手段.对有机物的选择性良好,无机盐的存在非但不干扰吸附反而有利于吸附[9,10].

吸附树脂对分子的吸附作用力微弱,只要改变体系的亲水-疏水平衡,就可以引起吸附的增加或解吸[6].解吸剂是以最能溶解吸附质为原则,但是要求沸点低、易于蒸馏回收[2].一般可以用溶剂的溶解度参数来预测,溶解度参数越小的溶剂解吸效率越高.常见溶剂水、甲醇、乙醇和丙酮的溶解度参数分别为 23.2,14.5,12.7 和 10.0[11].实验中采用乙醇-水溶液做解吸剂.

CNPP 组分的脱盐和回收率见表 1.从表中可以看出,DA201-C 大孔吸附树脂对 CNPP 组分的脱盐效果非常好,均达到 97% 以上.而 DA201-C 大孔吸附树脂对 CNPP 的回收率亦很高,约在 95%.因此,DA201-C 大孔吸附树脂可以用来将 CNPP 中的无机盐去除.

表 1　CNPP 组分的脱盐和回收率

Tab.1　The desalt ratio and recovery of CNPP

CNPP 组分	脱盐率/%	回收率/%
A	97.07	95.51
B	99.65	94.84
C	98.88	96.11

2.3　大孔吸附树脂分离酪蛋白非磷肽

在用不同体积分数乙醇进行解吸时发现,分别用体积分数为 30%,50%,70% 和 95% 乙醇解吸 CNPP 的回收率不同,且从 30%,50% 增加到 70%,乙醇解吸时 CNPP 组分 A 的回收率增加,而体积分数 95% 乙醇解吸时 CNPP 组分 A 的回收率略有下降[9].这可能是与 CNPP 组分中肽的极性不同有关.从图 2～4 可以看出,用体积分数 30%,50% 和 70% 的乙醇进行阶段洗脱,CNPP 组分 A、B 和 C 都可以被分离出 3 个组分峰,但是 3 个组分峰的比例各不相同,说明 CNPP 组分 A、B 和 C 中所含不同极性肽的比例不同.

构成多肽的不同氨基酸的侧链结构各异,它决定了不同氨基酸的疏水性值不同.目前各种氨基酸的疏水性值已知,据此可以计算出蛋白质和多肽的疏水性值.疏水性氨基酸按疏水性值的大小顺序排列为 Trp、Ile、Tyr、Phe、Pro、Leu、Val、Lys、Met、Cys、Ala、Arg 和 Thr.多肽的疏水性值大小与多肽肽链长度有关,同时也与组成它的氨基酸的疏水性值有关.由此可知,CNPP 组分 A、B 和 C 中多肽组成均很复杂,它们的相对分子质量大小及疏水性值各异,在多肽实际分离过程中可以根据此特性来分离.

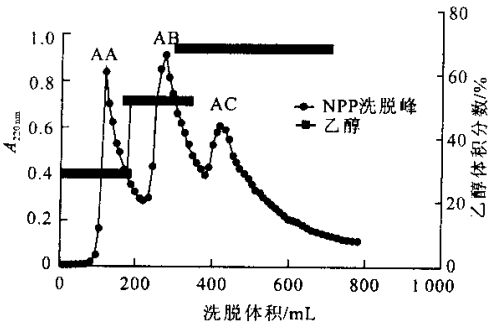


图 2　CNPP 的 Sephadex G-250 洗脱峰 A 经 DA201-C 大孔吸附树脂分离谱

Fig.2　Chromatogram of DA201-C macroporous adsorption resin of NPP peak A from Sephadex G-250

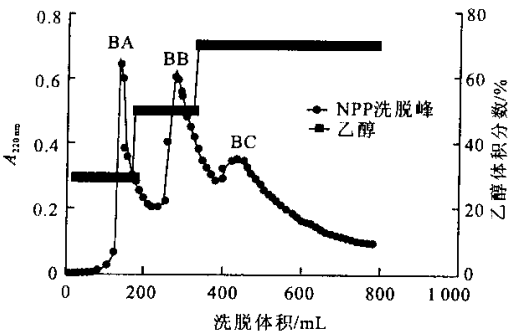


图 3　CNPP 的 Sephadex G-250 组分峰 B 经 DA201-C 大孔吸附树脂分离谱

Fig.3　Chromatogram of DA201-C macroporous adsorption resin of NPP peak B from Sephadex G-250

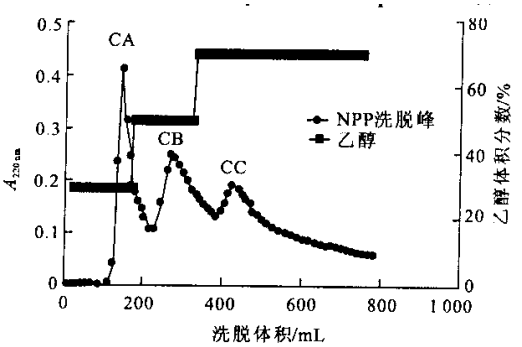


图 4　CNPP 的 Sephadex G-250 洗脱峰 C 经 DA201-C 大孔吸附树脂分离图谱

Fig.4　Chromatogram of DA201-C macroporous adsorption resin of NPP peak C from Sephadex G-250

(下转第 79 页)

万方数据

周期相同的条件下,发酵液的酶活力可以提高 20% 左右.

参考文献:

[1] Marchal L M, Jonkers J, Franke G TH. The effect of process conditions on α-amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch :an experimental design approach[J]. **Biotechnology and Engineering**, 1999, 63(3) :348 - 357.

[2] Ramesh M V, Lonsane B K. Characteristic and novel feature of thermostable α-amylase produced by *Bacillus licheniformis* M27 under solid-state fermentation[J]. **Starch**, 1990, 42 :233 - 238.

[3] 林剑,郑舒文. 溶氧等参数对耐高温 α-淀粉酶发酵的影响[J]. 食品科学,2002,(4) :54 - 57.

[4] 钱存柔. 微生物实验[M]. 北京 :北京大学出版社, 1984. 32 - 109.

[5] 天津轻工业学院,无锡轻工业学院,大连轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京 :中国轻工业出版社,1983. 5 - 62.

[6] 布林顿·麦·米勒. 工业微生物学[M]. 居乃琥,朱庆裴译. 北京 :中国轻工业出版社,1986. 106 - 199.

[7] 刘如林. 微生物工程概论[M]. 天津 :南开大学出版社,1995. 225 - 228.

[8] 大连轻工业学院. 生物化学[M]. 北京 :中国轻工业出版社,1987. 89 - 115.

[9] 郭尽力,任万忠,林剑,等. 谷氨酸对苏云金芽孢杆菌生长及伴胞晶体的影响[J]. 微生物学杂志,2001,(3) :45 - 49.

(责任编辑 :李春丽)

(上接第 71 页)

3 结 论

DA201-C 大孔吸附树脂对 CNPP 组分的吸附性强,CNPP 组分的回收率均在 95% 左右,而对无机盐离子基本不吸附,对 CNPP 组分的脱盐率均在 97% 以上. 此外,DA201-C 大孔吸附树脂对 CNPP 组分可以进行分级. 被分离出的各组分中活性肽的氨基酸组成与疏水性的关系有待于进一步验证.

参考文献:

[1] 张虹,柳正良,王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(1) :41 - 44.

[2] 宓晓黎,杨焱,成恒嵩,等. 大孔吸附树脂技术应用于复方中成药制备工艺的研究[J]. 离子交换与吸附,1997,13(6) :594 - 598.

[3] 郭本恒. 乳品化学[M]. 北京 :中国轻工业出版社, 2001. 138 - 142.

[4] Chang K J, Killian A, Hazum E, *et al*. Morphiceptin (NH4-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH2) : A potent and specific agonist for morphine (μ) receptors[J]. **Science**, 1981,212 : 75 - 77.

[5] Ondetti M A, Rubin B, Cushman D W. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme : a new class of orally active antihypertensive agents[J]. **Science**, 1977, 196 : 441 - 444.

[6] 赵利,王璋,许时婴. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽吸附性的研究[J]. 食品工业科技,2002,12 :28 - 31.

[7] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京 :人民教育出版社,1980. 71 - 72.

[8] 华中师范学院,东北师范大学,陕西师范大学. 分析化学实验[M]. 北京 :人民教育出版社,1981. 114 - 116.

[9] 张虹,柳正良,王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(1) :41 - 44.

[10] 李伯庭,王湘,李小进. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药,1990,21(8) :42 - 44.

[11] 何炳林,黄文强. 离子交换与吸附树脂[M]. 上海 :科技教育出版社,1995.

(责任编辑 :杨 萌)

万方数据