

牛骨胶原蛋白源抑菌肽的分离纯化及成分分析

张顺亮, 潘晓倩, 成晓瑜*, 乔晓玲, 陈文华, 曲超, 艾婷
(中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068)

摘要: 牛骨胶原蛋白经中性蛋白酶水解, 采用超滤技术和凝胶层析技术对酶解液进行分离纯化并测定对大肠杆菌的抑菌活性; 借助反向高效液相色谱和基质辅助激光解析/离子化串联飞行时间质谱仪对抑菌肽进行分析。结果表明: 经超滤分离后, 分子质量小于10kD的组分对大肠杆菌的抑菌活性强; Sephadex G-25柱分离得到的峰I和峰IV组分有较强的抑菌活性。经反向高效液相色谱和基质辅助激光解析/离子化串联飞行时间质谱仪分析, 峰I组分中含有的多肽种类多, 分子质量集中在850~1550D之间。峰IV组分含有的多肽种类较少, 分子质量集中在700~900D之间。

关键词: 牛骨; 酶解; 超滤; 抑菌肽

Isolation, Purification and Compositional Analysis of Antibacterial Peptides from Bovine Bone Collagen

ZHANG Shun-liang, PAN Xiao-qian, CHENG Xiao-yu*, QIAO Xiao-ling, CHEN Wen-hua, QU Chao, AI Ting
(China Meat Research Center, Beijing 100068, China)

Abstract: Bovine bone collagen was hydrolyzed by neutral protease, and then the hydrolyte was separated and purified using ultrafiltration and gel chromatography. The antibacterial peptides obtained were analyzed by reverse high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and matrix-assisted laser desorption/ionization cascade time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF-MS). The results showed that the ultrafiltration fractions with molecular weight less than 10 kD had strong antibacterial activity against *Escherichia coli*. The peaks I and IV isolated by Sephadex G-25 gel chromatography had strong antibacterial activity. By RP-HPLC and MALDI-TOF-TOF-MS analysis, the peak I contained a variety of peptides with molecular weight between 850 and 1550 D, whereas the peak IV contained fewer peptides between 700 and 900 D.

Key words: bovine bone; enzymolysis; ultrafiltration; antibacterial peptides

中图分类号: TS251.94

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123(2013)11-0033-04

随着经济与社会的发展, 食品安全问题越来越突出, 其中防腐剂是引起食品安全性问题的来源之一。化学合成防腐剂在具有较高防腐保鲜效果的同时又往往给人类健康带来不良的影响, 甚至会出现致癌、致畸、致突变等危害。在食品领域, 抑菌肽的安全无毒害作用的优势使得它具有作为天然食品防腐剂的潜在应用价值^[1-2]。在食品中添加抑菌肽, 能改善食品抗菌性能且对消费者是安全的。

目前, 抑菌肽的制备方法主要有以下几种: 从动植物体内直接提取法、化学合成法、基因工程法、酶解法^[3-8]。抑菌肽作为天然食品防腐剂的一种, 是高效安全的食品添加剂。随着人们对食品安全、要求的不断提高, 在食品中添加天然防腐剂必然成为一种发展趋势, 也将成为食品防腐领域的研究热点^[9-10]。

2012年, 我国肉类总产量为8384万吨, 畜禽骨产量大约能达到2500万吨, 从目前畜骨的利用来看, 利用率不足20%, 造成了严重的浪费^[11-12]。通过酶解牛骨胶原蛋白产生抑菌肽, 使得畜禽骨得到有效利用, 在带来良好经济效益的同时避免了环境污染^[13-15]。本实验为抑菌肽的研究提供依据, 从而开发出新型天然防腐保鲜剂, 降低食品中化学合成防腐剂的用量, 有利于食品安全和人们的身体健康。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛骨 市购; 中性蛋白酶(6.2×10^4 U/g) 诺维信

收稿日期: 2013-09-08

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B09)

作者简介: 张顺亮(1985—), 男, 中级工程师, 硕士, 研究方向为畜产品加工与屠宰综合利用技术。E-mail: 270157988@qq.com

*通信作者: 成晓瑜(1972—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为畜禽屠宰综合利用技术及食品风味。E-mail: chxyey@yahoo.com.cn



(中国)投资有限公司; 琼脂 国药集团化学试剂有限公司; 营养肉汤 国药集团化学试剂有限公司; Sephadex G-25葡聚糖凝胶 美国Pharmacia公司; 乙腈(色谱纯) 美国Fisher公司; 营养肉汤培养基 北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

骨粉碎机 河北廊坊惠友机械公司; BSZ-100-LCD自动部分收集器、HD-21-88紫外检测仪 上海琪特分析仪器有限公司; F1-45型恒温培养箱、G154DWS湿热灭菌锅 日本三洋公司; LGJ-30真空冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司; 二级生物安全柜 新加坡艺思高科技有限公司; 中空纤维超滤组件 北京旭邦膜设备有限责任公司; 高效液相色谱仪 美国Waters公司; ABI 4700基质辅助激光解析离子化串联飞行时间质谱仪 美国ABI公司。

1.3 方法

1.3.1 牛骨酶解液的制备

按照文献[16]的方法利用中性蛋白酶进行酶解, 得到的酶解液在90℃、10min的条件下使酶失活。并在4℃、8000r/min的条件下离心10min, 收集上清液, 真空冷冻干燥成粉备用。

1.3.2 酶解液超滤分离

采用中空纤维超滤组件, 选取截留分子质量为10kD的滤膜对牛骨胶原蛋白的酶解产物进行分离, 将分子质量大于10kD的物质和分子质量小于10kD的组分分别冷冻干燥备用。

1.3.3 多肽的凝胶层析分离

经超滤后有抑菌活性的多肽组分用Sephadex G-25凝胶层析色谱装置进行分离, 洗脱液为超纯水; 紫外检测仪参数: 灵敏度设0.1Å, $\lambda=220\text{nm}$; 玻璃柱大小2.6cm×40cm; 上样量2mL; 上样液质量浓度100mg/mL; 蠕动泵流速1.0mL/min。

1.3.4 多肽抑菌率测定

本实验测定酶解液分离的各组分对大肠杆菌的抑菌活性, 以抑菌率表示。将菌种培养至对数生长期并用无菌生理盐水进行梯度稀释, 调整浓度为 $1.0 \times 10^3 \text{CFU/mL}$, 吸取细菌培养液200μL至无菌的1.5mL离心管中, 同时设对照。实验管中加入800μL经0.45μm无菌滤膜过滤的浓度为10mg/mL的多肽; 对照管中加入800μL无菌生理盐水。两管同时于37℃条件下振荡培养, 1h后取200μL溶液涂布于计数平板上, 37℃培养24h, 计算平板上的菌落总数。抑菌率的计算公式如下:

$$\text{抑菌率}/\% = (N_{\text{对照}} - N_{\text{实验}}) / N_{\text{对照}} \times 100$$

式中: $N_{\text{对照}}$ 为对照管细菌菌落总数; $N_{\text{实验}}$ 为实验管细菌菌落总数。

1.3.5 抑菌肽组分的反向高效液相色谱测定

将凝胶层析分离得到的抑菌肽溶液经0.45μm的水相滤膜过滤, 然后进样到液相色谱仪器中分析。分析条件: 进样体积20μL; 流速0.8mL/min; 洗脱液: A液为超纯水; B液为乙腈(色谱纯); 梯度洗脱: B液, 0~10min, 2%~10%、10~45min, 10%~100%; 柱温25℃; 检测波长220nm。

1.3.6 抑菌肽组分的基质辅助激光解析/离子化串联飞行时间质谱仪测定

基质辅助激光解析/离子化串联飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-TOF-MS)仪器操作条件: 脉冲氮激光(355nm)离子解析电离源; 质谱信号为多次累加扫描; 质谱扫描范围: m/z 500~5000; 采用正离子反射模式检测^[17]; 样品分析前用标准蛋白混合物对MALDI-TOF-TOF-MS进行校正。

基质制备: 选择 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CHCA)作为基质, 用体积分数为0.1%的三氟乙酸加入超纯水后和乙腈溶液混合(7:3, m/m), 将CHCA加入混合液配制成质量浓度为5g/L的基质溶液, 基质溶液现配现用。

样品制备: 样品稀释到合适的浓度, 取0.8μL点靶, 自然风干再加入0.8μL CHCA基质溶液点靶, 自然风干后进行分析。

2 结果与分析

2.1 超滤分离组分的抑菌活性分析

将酶解后冻干的多肽组分用适量水溶解, 经1.3.2节的方法进行超滤分离, 将分离得到的各组分冻干后, 配制20mg/mL多肽溶液, 按照1.3.4节抑菌方法测定各组分对大肠杆菌的抑菌能力, 如表1所示, 大于10kD分子质量的组分没有抑菌能力, 这可能是因为多肽的分子质量较大, 具有独特的空间结构, 不易与细菌发生作用; 小于10kD分子质量的组分具有较好的抑菌活性, 对大肠杆菌的抑菌率为93.61%。

表1 超滤分离得到的各组分对大肠杆菌的抑菌效果
Table 1 Antibacterial effect of two ultrafiltration fractions on *Escherichia coli*

组分	大于10kD	小于10kD
抑菌率/%	0	93.61

2.2 凝胶分离组分的抑菌活性分析

为得到牛骨胶原蛋白酶解液凝胶层析的洗脱峰, 选定紫外波段的220nm作为测定波长。按照1.3.3节的分离方法将小于10kD分子质量的超滤组分冻干后配制为合适的浓度进行凝胶层析。由图1可知, 小于10kD分子质量的

超滤组分经Sephadex G-25凝胶分离后, 得到4个峰组分。将分离得到的各峰组分收集、冷冻干燥成粉。

配制质量浓度为10mg/mL的峰I、II、III、IV组分溶液按照1.3.4节的方法进行抑菌实验。由图2可知, 四种组分对大肠杆菌的抑菌能力有很大差别, 其中, 峰I组分的抑菌能力最强, 37℃培养24h后, 没有菌落形成; 峰IV组分具有较好的抑菌效果, 抑菌率为91.39%, 峰II和峰III组分几乎不具有抑菌能力。

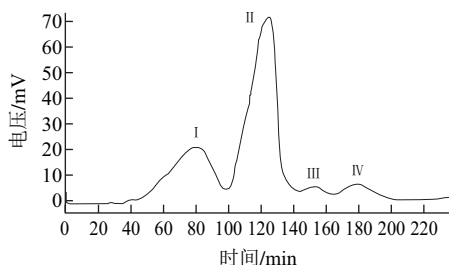


图1 Sephadex G-25凝胶柱分离牛骨酶解物的色谱图

Fig.1 Sephadex G-25 gel chromatographic profile of bovine bone hydrolysate

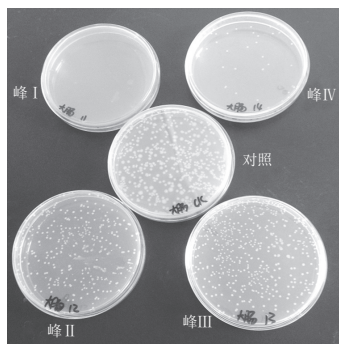


图2 Sephadex G-25分离组分对大肠杆菌的抑菌效果

Fig.2 Antibacterial effect of fractions separated by Sephadex G-25 gel filtration chromatography on *Escherichia coli*

2.3 抑菌肽组分的反相高效液相色谱法分析

将凝胶柱Sephadex G-25层析分离得到的具有较强抑菌活性的峰I和峰IV组分配制成合适的溶液, 经0.45μm的水相滤膜过滤, 进样到高效液相色谱仪中用反相高效液相色谱法(reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析。由图3可知, 峰I组分中含有较多的多肽成分, 出峰时间集中在12~20min, 在保留时间5.058min时有一较大的吸收峰, 此时的流动相水分占的比例较大, 可判定此物质的极性较强。由图4可知, 峰IV组分中含有的多肽成分较少, 主要集中在35~40min之间被检测到。保留时间36.970min时的吸收峰最高, 此时流动相乙腈占的比例大, 可判定此物质的极性较弱。

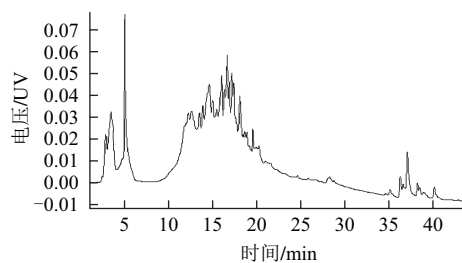


图3 峰I组分的RP-HPLC色谱图

Fig.3 RP-HPLC chromatogram of peak I

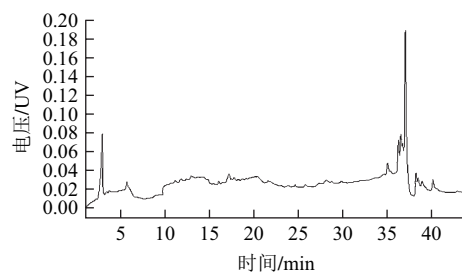


图4 峰IV组分的RP-HPLC色谱图

Fig.4 RP-HPLC chromatogram of peak IV

2.4 抑菌肽组分的MALDI-TOF-TOF-MS分析

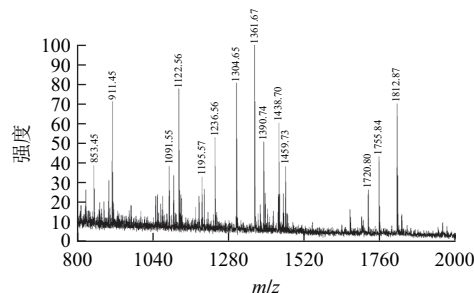


图5 组分I的质谱图

Fig.5 MS spectrum of peak I

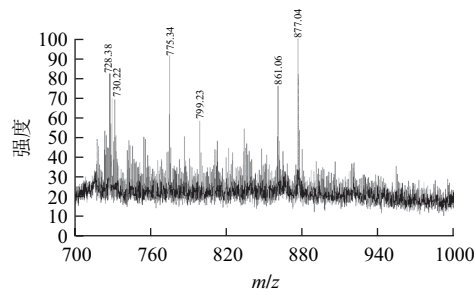


图6 峰IV组分的质谱图

Fig.6 MS spectrum of peak IV

采用MALDI-TOF-TOF-MS法测定具有抑菌效果的峰I和峰IV组分, 因MALDI-TOF-TOF-MS产生的是单电荷的离子, 一般为 $[M+H]^+$ 峰, 因此可根据质谱图计算峰组



分中多肽的分子质量。经一级质谱分析, 峰 I 组分中多肽的分子质量集中在850~1550D之间, 如图5所示, 其中信号较强的母离子为 m/z 1361.67、1304.65、1122.56和911.45。峰IV组分中多肽的分子质量集中在700~900D之间, 如图6所示, 其中信号较强的母离子为 m/z 877.04、775.34、728.38、861.06和730.22。经质谱图检测到的信号验证了RP-HPLC分析的结果: 峰 I 组分的成分多, 而峰IV组分的成分较少。

3 结论

牛骨胶原蛋白经中性蛋白酶酶解、超滤分离后, 得到的小于10kD分子质量的组分具有较好的抑菌活性, 在20mg/mL的浓度下对大肠杆菌抑菌率为93.61%。小于10kD分子质量的组分经Sephadex G-25分离后, 峰 I 组分具有最高的抑菌活性, 在10mg/mL的质量浓度下, 培养基中没有大肠杆菌的菌落形成, 峰IV组分也具有较好的抑菌活性, 抑菌率为91.39%。经RP-HPLC和MALDI-TOF-TOF-MS分析, 峰 I 组分中含有的多肽种类多, 分子质量集中在850~1550D之间。峰IV组分中含有的多肽种类较少, 分子质量集中在700~900D之间。

参考文献:

- [1] 韩文瑜, 孙长江. 抗菌肽的研究现状与展望[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(10): 11-19.
- [2] 单安山, 马得莹, 冯兴军, 等. 抗菌肽的功能、研发与应用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2249-2259.
- [3] BOLSCHER J G M, VAN DER KRAAN M I A, NAZMI K, et al. A one-enzyme strategy to release an antimicrobial peptide from the LFampin-domain of bovine lactoferrin[J]. Peptides, 2006, 27(1): 1-9.
- [4] 孙骞, 罗永康. 猪血红蛋白抗氧化活性肽的分离及脱色技术研究[J]. 肉类研究, 2009, 23(4): 18-20.
- [5] 邱芳萍, 周杰, 李向晖, 等. 天然食品保鲜防腐剂: 林蛙皮抗菌肽[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 279-282.
- [6] 胡志和, 庞广昌, 陈庆森, 等. 不同条件下水解酪蛋白所得到的抗菌肽抑菌效果比较[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 130-133.
- [7] 高维东, 纪银莉, 刘恭, 等. 牦牛乳酪蛋白抑菌肽制备工艺研究[J]. 食品工业, 2013, 34(11): 161-163.
- [8] 李归峰, 赵国建, 肖春玲, 等. 金针菇蛋白酶解制备抑菌肽的工艺优化及功能评价[J]. 中国食品学报, 2012, 12(10): 107-112.
- [9] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(3): 238-250.
- [10] ANDREU D, RIVAS L. Animal antimicrobial peptides: an overview[J]. Biopolymers, 1998, 47(6): 415-433.
- [11] 王卫, 张志宇, 刘达玉, 等. 畜禽骨加工利用及其产品开发[J]. 食品科技, 2009, 34 (5): 154-158.
- [12] 罗通彪. 畜禽鲜骨的开发利用[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(5): 70-73.
- [13] 曾峰, 赵坤, 韩伟伟, 等. 食品生物技术在农产品副产物综合利用中的作用[J]. 食品科学, 2011, 32(S1): 29-32.
- [14] 于福满. 畜禽副产品加工现状和应用前景[J]. 肉类工业, 2010(2): 1-5.
- [15] 张长贵, 董加宝, 王祯旭. 畜禽副产品的开发利用[J]. 肉类研究, 2006, 20(3): 40-43.
- [16] 张顺亮, 成晓瑜, 潘晓倩, 等. 牛骨胶原蛋白抗菌肽的制备及其抑菌活性[J]. 肉类研究, 2012, 26(10): 5-8.
- [17] 喻志强, 唐辰虹, 施荣华, 等. 高效液相色谱和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法分析天花粉蛋白胰酶肽图谱[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(6): 34-37.