

酪蛋白酶解反应复杂产物的色谱定量分析

于艳军, 齐 巍, 何志敏

(天津大学化学工程研究所酶工程研究室, 天津 300072)

摘要 :根据酪蛋白酶解产物的高效凝胶排阻色谱(HPSEC)定性分析结果,选取不同截留相对分子质量的超滤膜对酶解产物进行截分,制得3种相对分子质量分布相对集中的区间组分;建立各组分峰面积与质量浓度之间的线性关系,由此定量计算不同反应时间的酶解产物中相应相对分子质量区间组分的质量浓度。研究表明,将膜分离方法与色谱分析相结合可实现对蛋白质、多肽等复杂体系相对精确的定量分析。

关键词 :酪蛋白;酶促水解;高效凝胶排阻色谱;复杂体系;膜分离;定量分析

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)02-0183-03

Quantitative Analysis of Complicated Casein Hydrolysates by High Performance Size Exclusion Chromatography

YU Yanjun, QI Wei, HE Zhimin

(Enzyme Technology Laboratory, Chemical Engineering Research Center,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract :The enzymatic hydrolysates of casein are so complicated that there has no effective method for quantitative analysis. On the basis of membrane separation and high performance size exclusion chromatography (HPSEC), standard peptides with different relative molecular mass ranges were prepared, and the linear relationships between mass concentration of the standard peptides and the corresponding peak areas were established. Consequently, mass concentration of the different hydrolysates at different reaction time can be accurately calculated. The combination of chromatography and membrane separation is of great importance to the quantitative analysis of the complicated hydrolysates, which can be also applied to the other macromolecular systems, such as carbohydrates.

Key words : casein; enzymatic hydrolysis; high performance size exclusion chromatography; complicated system; membrane separation; quantitative analysis

酪蛋白经单酶或复合酶系水解作用,再经分离纯化可制得近10类百余种生物活性多肽。复杂的酶解产物、多样性的序列结构使该类物质具有免疫调节、自由基清除、抗癌抑菌、溶栓降压、安神麻醉等多种生理功能,是极具开发价值的一类生物活性物质,也是当今国内外研究的热点之一^[1,2]。对酶解体系进行定量分析与表征,将有助于目标活性多肽的高效制备,但由于水解产物极其复杂,若单纯采用传统的凝胶电泳或液相色谱技术,则只能进行定性分析,无法实现定量表征。

基于相对分子质量差异进行分离的高效凝胶排阻色谱(HPSEC)技术是分析酶解产物的一种有效

工具,本课题组采用该技术已对酪蛋白-胰蛋白酶体系的酶解反应过程进行了定性色谱分析,初步推断了反应历程^[3]。本文在已有工作的基础上,进一步将HPSEC技术与膜分离方法^[4]相结合,对酶解产物按相对分子质量大小进行截分,制得区间分布相对较窄的几种多肽标准物组分;再将各组分视作相对单一的物质,建立组分浓度与吸收峰面积之间的线性关系,从而得到较为准确的多样性酶解产物质量浓度分布数值。该分析方法将为酪蛋白酶解过程动力学研究及目标多肽制备工艺优化提供一定的理论指导,并为混合多肽体系以及其他复杂天然高分子物系的色谱定量分析提供一种有效手段。

收稿日期 2004-03-26

作者简介 :于艳军,女,硕士。

通讯联系人 :何志敏,教授,博士生导师, Tel (022)27407799, E-mail zhe@tju.edu.cn.

基金项目 :国家自然科学基金资助项目(No. 20276052 和 No. 20306023)。

1 实验部分

1.1 材料

酪蛋白:生化试剂,购自军事医学科学院天津东方卫生材料厂;胰蛋白酶:Sigma 公司提供;牛血清白蛋白($M_r = 66\ 409$)、卵清蛋白($M_r = 43\ 000$)、牛血红蛋白($M_r = 31\ 000$)、细胞色素 C($M_r = 12\ 327$)和维生素 B12($M_r = 1\ 355$)标准品:购自 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯,市售。

1.2 仪器

自动电位测定仪 ZD-2 型,上海雷磁仪器厂;高效凝胶排阻色谱系统:Echochrom98 色谱工作站,P200 II 型高压恒流泵,UV-200 II 紫外可变波长检测器,大连依利特分析仪器有限公司;凝胶排阻色谱柱:TSK-G3000PW,7.5 mm i. d. \times 30.0 cm, Tosoh 公司;超滤膜:SMB-20 型,有效过滤膜面积为 0.6 m²,截留相对分子质量分别为 10 000 和 100 000,截留率大于 90%,上海原子能研究所;冷冻离心机:Allegra™ 21R Centrifuge, Beckman 公司;冷冻干燥机:Freezone 4.5, Labconco 公司。

1.3 方法

1.3.1 HPSEC 操作条件

流动相:0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0);流速:0.5 mL/min;进样量:20 μ L;检测波长:214 nm;检测时间:45 min;柱温:25 $^{\circ}$ C。

1.3.2 标准品相对分子质量工作曲线

分别对 5 种蛋白质标准品溶液进行 HPSEC 检测,经一元线性回归分析得到标准品的相对分子质量(M_r)与保留时间(t_R)之间的关系式为: $\lg M_r = -0.1899t_R + 6.9879$, $r^2 = 0.9906$ 。

1.3.3 不同相对分子质量区间多肽标准物的制备

将酪蛋白水解 90 min 后加热灭酶,用高速离心机以 9 000 r/min 离心 45 min,得不溶物和上清液。将上清液用截留相对分子质量为 100 000 的超滤膜进行过滤,保存截留液,再将渗透液用截留相对分子质量为 10 000 的超滤膜过滤,保留截留液和渗透液,从而得到 3 种不同相对分子质量区间的多肽溶液,冷冻干燥制得固形物。

1.3.4 多肽标准物浓度与峰面积线性关系的建立

将自制的不同相对分子质量区间的多肽标准物配成不同浓度的溶液,然后进行色谱分析,从而建立各组分峰面积与质量浓度之间的线性关系。

1.3.5 待测酶解产物的制备及预处理

配制一定质量浓度的酪蛋白溶液,静置 12 h,加热至 40 $^{\circ}$ C,调 pH 值为 8.0,按酶与酪蛋白质量比为 1:50 加入胰蛋白酶,在恒温、恒 pH 值、恒搅拌速

率的条件下反应至不同时间。取各时间点酶解液 5 mL,沸水浴加热灭酶 10 min,再经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后,进行 HPSEC 分析。

2 结果与讨论

单一物质的色谱定量分析,一般取其标准品配成不同浓度溶液后进样分析,得到峰面积与浓度之间的线性关系,再将未知浓度样品的峰面积值代入关系式而求得浓度。但蛋白质酶解体系组分多样,且不同物质之间吸光系数差异明显,因此不可简单地以色谱峰总面积计算产物浓度。本文借鉴化学工程领域处理复杂体系的集总思想^[5],先制备相对分子质量范围较窄的多肽组分,并建立其质量浓度与峰面积之间的线性关系,再对复杂酶解体系进行定量分析。

2.1 不同相对分子质量区间多肽组分的制备

酪蛋白酶解过程中产物主要分布在由 7 个吸收峰(见图 1-a)组成的 3 个区间,且各吸收峰强弱随反应时间不同而有明显变化^[6],因此,可根据相对分子质量大小采用膜分离方法将复杂水解产物截分成相对集中的几个区间组分。图 1-b, c, d 是膜截分后得到的各区间组分的液相色谱图,其中最大的多肽对应的相对分子质量数值已在图中标出。

2.2 多肽区间组分的质量浓度与峰面积的关系

用 10 000 超滤膜截分得到的渗透液相对分子质量范围为 11 300 以下(图 1-d),以该渗出液作为一区间组分,得到其色谱峰面积与质量浓度的计算关系式:

$$S = 7.2695m + 1.8629 \quad (1)$$

其中, S 为色谱峰面积, m 为多肽组分的质量浓度。

用 100 000 超滤膜截分得到的渗透液相对分子质量范围为 60 400 以下(图 1-c);可分段积分计算出相对分子质量为 11 300 以下的多肽的峰面积,将其代入式(1),计算出其质量浓度;进一步求得相对分子质量为 11 300 ~ 60 400 这一组分的质量浓度与峰面积之间的关系式为:

$$S = 5.8566m - 2.5013 \quad (2)$$

同理,由图 1-b,经两次迭代计算,可得到相对分子质量为 60 400 ~ 150 000 的多肽组分质量浓度与峰面积之间的关系式为:

$$S = 12.654m + 4.8038 \quad (3)$$

2.3 不同反应时间酶解产物的定量分析

根据超滤膜相对分子质量截分范围将酶解产物划分为 60 400 ~ 150 000(A)、11 300 ~ 60 400(B)和 < 11 300(C)3 个区间组分,将不同反应时间的酶解液色谱数据代入式(1)至式(3),求得相应产物中 3

个较窄相对分子质量区间组分的浓度分布数值,并进行质量恒算,以验证该套方法的可靠性,结果见表

1。进一步,可绘制不同相对分子质量区间组分的质量浓度随酶解时间的变化曲线,见图 2。

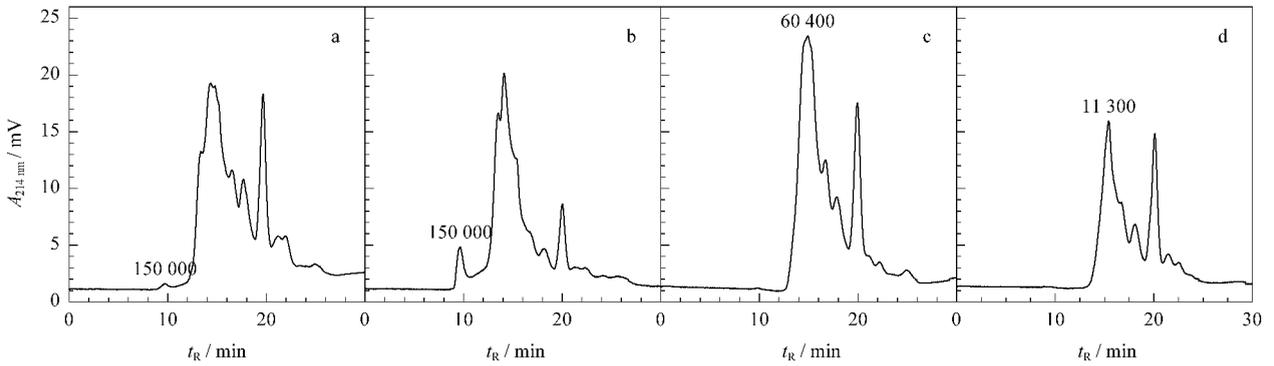


图 1 水解产物及不同相对分子质量区间多肽组分的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of hydrolysates and peptides with different relative molecular mass ranges prepared by membrane separation

a. hydrolysates of casein by trypsin for 90 min; b. retentate of membrane with 100 000 relative molecular mass cut off; c. permeate of membrane with 100 000 relative molecular mass cut off; d. permeate of membrane with 10 000 relative molecular mass cut off.

表 1 不同反应时间酶解产物的色谱定量分析结果

Table 1 Mass concentration of the hydrolysates at different reaction time

Reaction time/min	Insoluble substance ¹⁾	Soluble substances ²⁾			Total mass concentration ³⁾
		A	B	C	
2.5	2.89	2.28	2.01	2.89	10.07
5	2.41	2.15	2.24	3.28	10.08
10	1.68	1.98	2.24	3.28	10.08
20	0.96	1.77	2.59	4.94	10.24
40	0.78	1.61	2.52	5.15	10.06
60	0.69	1.47	2.55	5.19	9.90
90	0.71	1.29	2.66	5.25	9.91

1) not hydrolysate, obtained by high-speed centrifugation.
2) A: M_r 60 400 - 150 000; B: M_r 11 300 - 60 400; C: M_r < 11 300. 3) initial concentration of casein was 10 g/L.

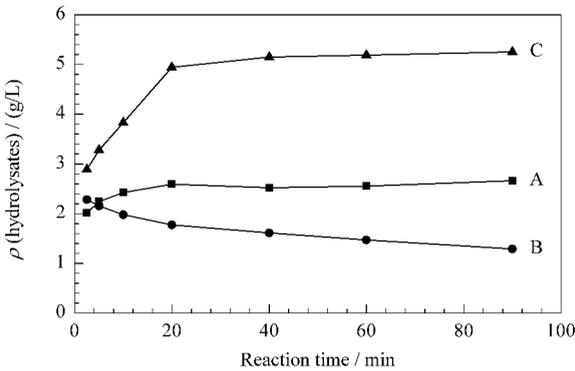


图 2 不同相对分子质量区间组分的质量浓度随时间变化曲线

Fig. 2 Curves of mass concentration of hydrolysates vs reaction time

For A, B, C, see Table 1.

由图 2 可见,在反应初始阶段,体系中小相对分子质量区间组分 C 的浓度增加显著,而生物活性多

肽多集中于此区间,因此延长酶解时间将有利于目标产品的获得,但考虑到工业化生产中降低工艺成本等问题,则较为理想的反应时间是 20 min,因为当反应进行至中后期时,小分子多肽 C 的质量浓度变化已趋于平缓。

3 结语

将膜分离与色谱分析相结合,可较准确地计算反应过程中一定相对分子质量区间多肽组分的质量浓度变化情况,为蛋白质、多糖等生物大分子复杂酶解产物的定量分析提供了一种有效方法。但该方法也存在着一定的误差,需进一步改进,如采用制备色谱代替膜技术获取多肽标准物,则区间组分的划分将更为灵活,而且定量计算的精度也将大幅提高。相信随着生化分离与分析技术的不断完善,多样性酶解产物的色谱定量分析将更为简便、精确。

参考文献:

[1] McDonagh D, FitzGerald R. J International Dairy Journal, 1998, 8 : 39
[2] Pihlanto-Leppälä A. Trends Food Sci Technol, 2001, 11 : 347
[3] Qi Wei, He Mingxia, He Zhimin, Shi Deqing. Chinese Journal of Chromatography (齐 巍,何明霞,何志敏,史德青. 色谱), 2002, 20(1) : 1
[4] Gourley L, Britten M, Gauthier S F, Pouliot Y. J Membr Sci, 1994, 97 : 283
[5] Wei J, Kuo J. Ind Eng Chem Fundam, 1969, 8 : 114
[6] Qi Wei, He Zhimin, Shi Deqing. Chemical Engineering Science, 2003, 58 : 767