

大孔树脂对罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽脱盐作用的研究

夏光华, 申铤日, 酒志强, 黄霜霞

(海南大学食品学院, 海南海口 570228)

摘要: 为了探索罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽的最佳脱盐工艺, 本文采用DA201-C大孔吸附树脂对抗氧化肽进行脱盐试验。结果表明: DA201-C大孔吸附树脂对抗氧化肽的静态吸附率和吸附量分别为82.56%和54 mg/g; 动态吸附和解吸最佳的上样浓度为60 mg/mL, 最佳上样流速为1 mL/min, 解吸剂为75%乙醇。抗氧化肽经过DA201-C大孔吸附树脂处理后脱盐率为97.13%, 回收率为81.16%, 质量浓度为0.245 mg/mL时对ABTS自由基的清除率提高至39.58%。采用DA201-C大孔吸附树脂对罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽进行脱盐处理是一种简便有效的方法。

关键词: 罗非鱼; 抗氧化肽; 脱盐; 大孔树脂

文章编号: 1673-9078(2013)5-1052-1056

Desalination of Macroporous Adsorption Resin on Antioxidant Peptides from Tilapia Skin Collagen

XIA Guang-hua, SHEN Xuan-ri, JIU Zhi-qiang, HUANG Shuang-xia

(College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The desalting technology of antioxidant peptides from tilapia skin collagen by DA201-C macroporous adsorption resin was investigated. The results showed that the static absorption rate and absorbing capacity were 82.56% and 54mg/g, respectively. The best loading sample concentration, sampling flow rate and eluent were 60 mg/mL, 1 mL/min and 75% alcohol, respectively. Under these conditions, the desalination rate was 97.13% and recovery of peptides was 81.16%. The antioxidant activity was increased to 39.58% at the concentration of 0.245 mg/mL. In conclusion, it was available and effective to desalt the antioxidant peptides from tilapia skin collagen by using DA201-C macroporous adsorption resin.

Key word: tilapia; antioxidant peptide; desalting; macroporous adsorption resin

罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)又称非洲鲫鱼,属鲈形目、鲷鱼科,具有生长快、食物杂、抗逆性强、繁殖快、肉质好、易养殖、产量高等特点。我国是世界上最大的罗非鱼生产国,年产量约占世界年产总量的一半。在生产鲜鱼片和冻鱼片等产品的同时产生了大量鱼皮、鱼骨、鱼头等下脚料^[1]。这些下脚料若不有效利用,不仅会造成极大的浪费,还会造成环境污染^[2]。为了副产物的高附加值化利用,本文利用罗非鱼皮采用热水法提取制备胶原蛋白,并采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和 Orientase 20A 三种酶酶解胶原蛋白

收稿日期: 2013-01-15

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD28B06); 海口市重点科技计划项目(2011-079)

作者简介: 夏光华(1987-),男,研究生,研究方向:水产品加工与贮藏

通讯作者: 申铤日(1968-),男,博士,教授,研究方向:海洋生物资源利用、食品科学、组织工程学

制备抗氧化活性肽,但在酶解制备过程中,由于调节 pH 值给酶解液带来大量盐分。抗氧化活性肽中过量的盐分不仅给产品的后续纯化及分析带来麻烦,而且影响产品的风味,危害人体健康,因此,需要对酶解液进行脱盐处理。

目前适合于大分子生物活性物质的脱盐方法主要包括透析、超滤和纳滤等,小分子物质可以采用电渗析、大孔树脂法和离子交换树脂法进行脱盐。电渗析脱盐法因回收率不高、能耗大而没有得到广泛的应用^[3];离子交换树脂法阴阳离子树脂需要大量的酸碱进行前处理,并且肽液得率低。大孔吸附树脂为非离子的高分子吸附剂,具有大孔网状吸附结构,可根据肽的极性和分子量进行分离,具有吸附和筛选功能。大孔树脂用于脱盐具有吸附容量大、吸附迅速、解吸容易、回收率高、对脱盐原料理化性质影响小等特点^[4-5],因而,被广泛用于生物活性物质的脱盐。陈

季旺等^[6]采用 DA201-C 大孔树脂对鱼降血压肽进行脱盐精制; 范文^[7]等采用 DA201-C 大孔树脂对腐乳多肽进行脱盐处理, 脱盐率高达 98.19%, 肽回收率大于 90%, 并且抗氧化活性得到了提高。周存山^[8]等采用 D3520 大孔树脂对麦胚蛋白 ACE 肽进行脱盐处理, 效果较好。

本实验采用 DA201-C 大孔树脂对鱼皮胶原蛋白抗氧化活性肽进行脱盐处理, 确定 DA201-C 大孔树脂对抗氧化活性肽的最佳脱盐条件, 为抗氧化活性肽的分离纯化、活性测定及工业化生产提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼皮购于海南省泉溢食品有限公司; 碱性蛋白酶、中性蛋白酶和脂肪酶, 广西庞博生物工程有限公司; Orientase 20A, 日本 HBI 株式会社; Folin-酚试剂乙液 Sigma 公司; 盐酸、柠檬酸钠、氢氧化钠、无水乙醇等均为分析纯, 实验用水为超纯水; DA201-C 大孔树脂 江苏苏青树脂有限公司。

1.2 仪器与设备

RE52-AA 旋转蒸发器、SHZ-III型循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂; THZ-22(82 型)台式恒温振荡器, 太仓市实验设备厂; BS124S 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; LGJ-10 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 7200 型分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HD-A 电脑采集器, 南京大学普阳仪器科学研究所; BT100-2J 蠕动泵, 保定兰格恒流泵有限公司; HD-2 核酸蛋白检测仪, 南京大学普阳仪器科学研究所; FE30 实验室电导率仪、EL303 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 鱼皮胶原蛋白小肽的制备^[9]

罗非鱼皮去除鱼鳞和色素→脂肪酶和碱性蛋白酶处理 5 h→蒸馏水反复冲洗→鱼皮切成小块→在冰箱中用 0.1% 的 NaOH 浸泡处理 24 h→沉淀物用蒸馏水浸泡 1~2 h→0.3% 的柠檬酸处理 15 min→沉淀物用蒸馏水于 90℃ 热水浴中提取 2 h→提取液除杂后喷雾干燥备用→取适量用蒸馏水溶解, 分别在适宜的条件下用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和 Orientase 20A 酶酶解制得胶原蛋白抗氧化肽→冷冻干燥备用

1.4 大孔树脂对抗氧化肽的静态吸附和解吸试验

1.4.1 大孔树脂预处理

将 DA201-C 大孔树脂用无水乙醇浸泡处理 24 h, 充分溶胀后用无水乙醇冲洗至 220 nm 处无吸收峰, 用去离子水洗净, 然后用 2 mol/L 的氢氧化钠和盐酸分别处理, 最后用去离子水洗至中性, 抽干备用^[10]。

1.4.2 静态吸附试验

称取 10 g 干树脂于锥形瓶中, 加入 30 mL 胶原蛋白抗氧化肽酶解液, 在室温下, 将锥形瓶放入恒温摇床中 150 r/min 振荡 8 h, 至吸附平衡, 每隔 1 h 测定吸附液中小肽浓度, 按下式计算吸附率和吸附量。

$$\text{吸附率}/\% = \frac{(C_0 - C_1)}{C_0} \times 100$$

$$\text{吸附量}/(\text{mg}/\text{g}) = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{m}$$

注: C_0 为原肽液中小肽浓度 (mg/L); C_1 为吸附后液体中小肽浓度 (mg/L); V 为吸附液体积 (mL); m 为 DA201-C 大孔树脂质量 (g)。

1.4.3 静态解吸试验

将吸附抗氧化肽的树脂从吸附体系中通过过滤分离出来, 然后分别采用不同浓度的乙醇作为洗脱剂, 对树脂进行洗脱, 按下式计算解吸率。

$$\text{解吸率}/\% = \frac{C_2 \times V_1}{(C_0 - C_1) \times V} \times 100$$

注: C_0 为原肽液中小肽浓度 (mg/L); C_1 为吸附后液体中小肽浓度 (mg/L); V 为吸附液体积 (mL); C_2 为解吸液中小肽浓度 (mg/L); V_1 为解吸液体积 mL。

1.5 大孔树脂对抗氧化肽的动态吸附和解吸试验

1.5.1 最佳上样浓度和流速的确定

室温条件下, (1) 将胶原蛋白小肽液分别配成 40、50、60 mg/mL 上样; (2) 采用已确定的最佳上样浓度分别以 0.5、1.0、1.5 mL/min 的流速上样, 以流出液的 $A_{220\text{nm}}=0.05$ 为穿透点, 比较不同上样浓度和流速的穿透体积, 以确定最佳上样浓度和流速。

1.5.2 动态吸附和解吸试验

采用湿法装柱, 将处理好的树脂缓慢装入 1.0 cm×30 cm 的层析柱中, 平衡基线后, 在室温下, 将浓度为 60 mg/mL 抗氧化肽溶液以 1 mL/min 的流速上样, 紫外检测器在 220 nm 下检测流出液的吸光值, 先用去离子水洗脱, 每毫升洗脱液收集一管后添加 3 mL 蒸馏水, 测其电导率, 当电导率值保持不变时, 用浓度为 75% 乙醇溶液以 1.5 mL/min 的流速进行洗脱, 收集洗脱峰, 冷冻干燥。

1.6 肽含量测定

参照 Lorry 等^[11]的方法进行。

1.7 ABTS·⁺清除活性

ABTS 与一定浓度的过硫酸钾在暗处反应 12~16 h, 经活性氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS·⁺, 然后加入酶解物, 若该酶解物具有抗氧化活性, 则会与 ABTS·⁺ 发生反应而使反应体系褪色。取 5.0 mL 7 mmol/L 的 ABTS 溶液, 加入 88.0 μL 140 mmol/L 的过硫酸钾, 在室温下置于暗处反应 12~16 h, 形成

ABTS储备液。在波长734 nm处,用磷酸缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)将ABTS储备液稀至吸光度为0.70±0.02,备用。准确量取0.1 mL样品溶液,加入3.9 mL ABTS溶液,混匀,在室温下反应6 min,于波长734 nm处测定吸光度 A_E ^[12]。同时吸取3.9 mL ABTS溶液,加入0.1 mL PBS于波长734 nm处测定吸光度 A_B 。ABTS·+清除率按式(2)计算:

$$ABTS \text{ 自由基清除率} / \% = \frac{(A_B - A_E)}{A_B} \times 100$$

注: A_B 空白样吸光度; A_E 为试样吸光度。

1.8 脱盐率测定

采用马弗炉灰化法测定灰分,参照 GB/T5009.4-2003^[13]。脱盐率按下式计算。

$$\text{脱盐率} / \% = \left(\frac{m_0 - m_1}{m_0} \right) \times 100$$

注: m_0 原液中灰分含量; m_1 洗脱液中灰分含量。

2 结果与讨论

2.1 大孔树脂对抗氧化活性肽的静态吸附与解吸试验

2.1.1 大孔树脂的静态吸附能力

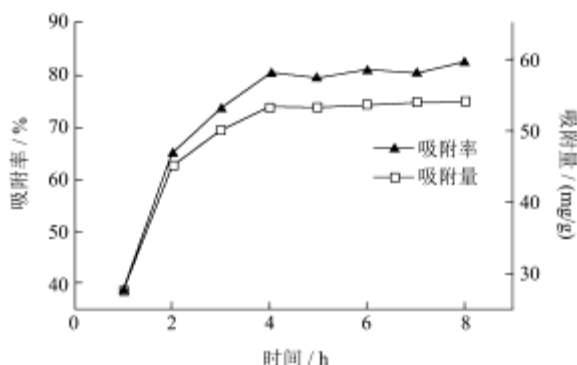


图1 DA201-C大孔树脂静态吸附动力学曲线

Fig.1 The static state absorption dynamics curve of DA201-C macroporous resins

DA201-C大孔树脂是由偶极矩很小的单体聚合而成的非极性树脂,网孔结构表面疏水性较强。酶解液是相对分子质量较小的小肽混合物,混合物中的大量的疏水性氨基酸通过疏水作用从水中吸附到大孔树脂的疏水性表面,而溶液中的无机盐则不能吸附到树脂上。DA201-C大孔树脂对抗氧化活性肽的静态吸附能力如图1所示,由图可知,静态吸附过程中,前4 h 吸附率迅速增加,4 h 后达到吸附平衡,吸附率为82.56%,吸附量为54 mg/g。DA201-C大孔树脂对鱼皮胶原蛋白抗氧化肽具有良好的吸附效果。

2.1.2 大孔树脂的静态解吸

大孔树脂通过疏水作用吸附抗氧化肽,吸附作用

力微弱,可以通过改变体系的亲水-疏水平衡来引起吸附的增加或解吸。解吸过程中应选择具有最能溶解被吸附物质、沸点低、易于回收、经济等特点的溶剂,一般选择溶解度参数小的溶剂作为解吸剂。常见的溶剂有水、甲醇、乙醇、丙酮等,溶解度参数分别为23.2、14.5、12.7、10.0。结合试验需求,本试验采用不同浓度的乙醇水溶液作为解吸剂。

大孔树脂对抗氧化肽的静态解吸结果如图2,由图可知,解吸率随着乙醇浓度的增加而增大,水的解吸率6.71%,75%乙醇的解吸率高达83.48%,但当乙醇浓度为90%时,解吸率有所下降,可能是因为溶液中有部分分子量较大的多肽在高浓度乙醇中的溶解度减小,从而影响了了解吸过程,导致解吸率的降低。

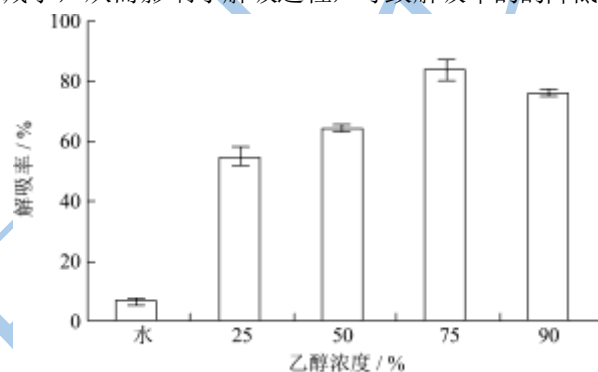


图2 乙醇浓度对解吸率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on desorption rate

2.2 大孔树脂对抗氧化活性肽的动态吸附与解吸试验

2.2.1 上样浓度对大孔树脂吸附性能的影响

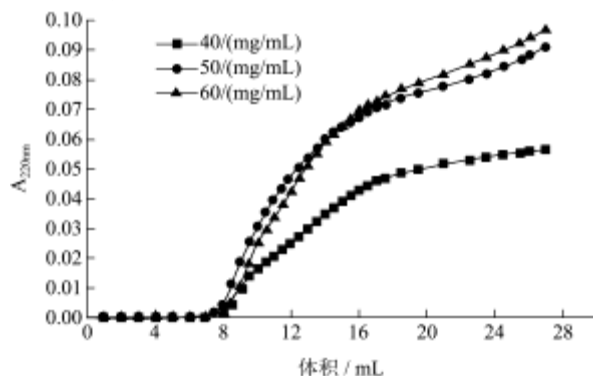


图3 不同上样浓度时抗氧化肽的穿透曲线

Fig.3 Breakthrough curve of different concentrations of antioxidant peptides

根据 Freundlich 和 Langmuir 经典吸附式可知,在大孔树脂的吸附容量范围内,抗氧化肽的吸附量随着抗氧化肽浓度的增高而增大。DA201-C大孔树脂对不同浓度鱼皮胶原蛋白抗氧化肽的吸附曲线见图3,由图可知,随着上样浓度的增大,吸附曲线的斜率增大,吸附率增大,穿透体积减小,树脂吸附达到饱和的时

间亦减小,因而,最佳上样浓度为 60 mg/mL。

2.2.2 上样流速对大孔树脂吸附性能的影响

上样流速主要通过影响溶质在树脂内部的扩散来影响树脂的吸附性能,过大的流速导致溶质来不及在树脂内部扩散而提早泄露,树脂的吸附量降低;流速过小虽然能够使溶质在树脂内部充分扩散,但吸附时间延长,工作效率降低。DA201-C 在不同上样流速的条件下对胶原蛋白抗氧化肽的影响如图 4 所示,由图可知,随着流速的增加,吸附曲线斜率变大,吸附速率增大,但穿透点提前,吸附量下降,综合考虑,选取流速为 1 mL/min 为最佳上样流速。

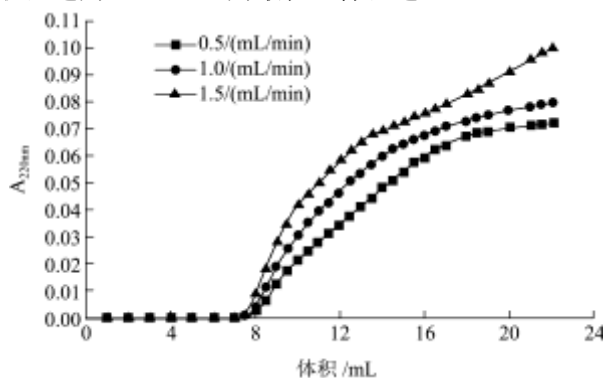


图 4 不同流速时抗氧化肽的穿透曲线

Fig.4 Breakthrough curve of antioxidant peptides at different flow rates

2.2.3 动态吸附与解吸

DA201-C 大孔树脂主要通过范德华力、氢键作用以及树脂本身多孔网状结构和巨大的比表面积进行的物理吸附来吸附活性肽^[4]。大孔树脂表面的疏水性较强,可与极性溶液中的非极性小分子的疏水性基团发生吸附作用。罗非鱼皮胶原蛋白经过三种酶水解后,由于肽键的断裂和蛋白质分子构象的改变,使得蛋白质水解成小肽,包埋在蛋白质分子内部的疏水性基团暴露到小肽分子表面,小肽分子疏水性增加,并通过疏水作用吸附到大孔树脂的疏水表面和网孔内部,然而,大孔树脂对无机盐离子没有吸附作用,无机盐离子随着溶剂被洗脱出来^[15-16]。从而与小肽分子分离,达到脱盐的目的。洗脱剂对大孔树脂的洗脱实质上是一种由疏水性质决定的置换过程,洗脱剂能够消弱小分子肽非极性侧链的排水倾向^[17],从而将疏水性肽从大孔树脂上洗脱下来。小分子肽中疏水性氨基酸含量越高,与大孔树脂间的疏水作用越大,洗脱用的洗脱剂浓度越高。

DA201-C 大孔树脂对抗氧化肽的动态吸附的电导率和水洗脱液的吸光值随洗脱体积的变化曲线如图 5 所示。由于大孔树脂对无机盐离子无吸附作用,无机盐的出峰位置比树脂未吸附肽的要靠前。在洗脱体

积为 15 mL 左右电导率减至最低并趋于平稳,说明抗氧化肽溶液中的盐分已被完全洗脱出来。洗脱体积在 20 mL 以后,洗脱液中肽含量开始降低并逐渐趋于平稳,说明未被大孔树脂吸附的抗氧化肽已经完全被洗脱出来。

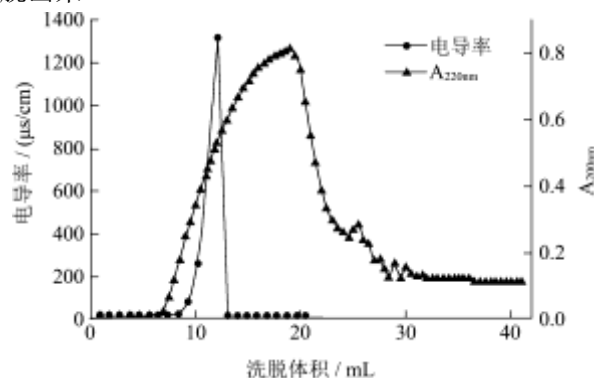


图 5 抗氧化肽的动态吸附曲线

Fig.5 Dynamic absorbing curve of antioxidant peptides

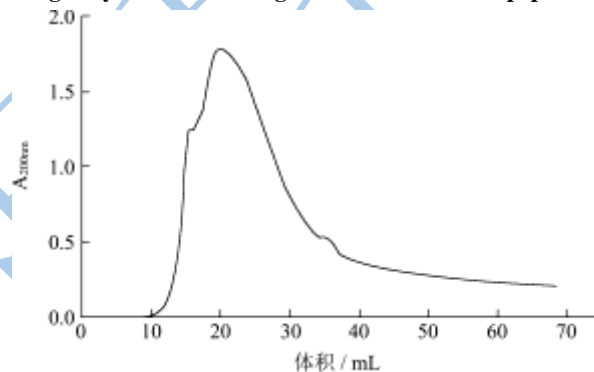


图 6 抗氧化肽的解吸曲线

Fig.6 Desorption curve of antioxidant peptides

脱盐后,吸附在 DA201-C 树脂上的鱼皮胶原蛋白抗氧化肽用 75%的乙醇溶液进行洗脱,结果如图 6 所示。乙醇通过消弱抗氧化肽非极性基团的排水倾向,将抗氧化肽从大孔树脂上洗脱下来。由图 6 可知,洗脱体积为 20 mL 时,出现洗脱高峰,大部分抗氧化肽集中在 10~50 mL 的洗脱体积处被洗脱下来。

2.3 DA201-C 大孔树脂对抗氧化肽的脱盐效果分析

根据上述试验结果,采用上样浓度为 60 mg/mL,以流速为 1 mL/min 上样,上样至流出液 $A_{220nm}=0.05$ 时停止上样,蒸馏水洗至电导率平稳后,用 75%的乙醇溶液以 1.5 mL/min 的流速洗脱,收集洗脱液真空浓缩后冷冻干燥,分析其脱盐效果。抗氧化活性肽经大孔树脂脱盐处理后灰分含量显著减小,脱盐率达到 97.13%,乙醇洗脱后抗氧化肽的回收率达到 81.16%。因此,采用大孔树脂可以有效的去除抗氧化肽中的盐分。胶原蛋白抗氧化肽经过大孔树脂脱盐处理后,质量浓度为 0.245 mg/mL 时对 ABTS 自由基的清除率由 30.4% 提高至 39.58%。

3 结论

3.1 通过大孔树脂的静态吸附和解吸试验, 确定了 DA201-C 大孔吸附树脂对罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽的吸附率为 82.56%, 吸附量为 54 mg/g; 75%乙醇静态解吸率最高, 为 83.48%。

3.2 大孔树脂动态吸附和解吸试验结果表明: 最佳上样浓度为 60 mg/mL, 最佳上样流速为 1 mL/min; 采用上述条件上样至流出液 $A_{220nm}=0.05$ 时停止上样, 蒸馏水洗至电导率平稳后, 以 75%的乙醇溶液以 1.5 mL/min 的流速洗脱, 抗氧化肽的脱盐率为 97.13%, 回收率为 81.16%, 质量浓度为 0.245 mg/mL 时对 ABTS 自由基的清除率提高至 39.58%。因此, DA201-C 大孔树脂可以有效的脱除罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽中的盐分, 提高产品的纯度, 为抗氧化肽的分离纯化和活性研究奠定基础。

参考文献

- [1] 段振华, 易美华. 罗非鱼的加工技术[J]. 水产科技情报, 2005, 32(6):250-251,255
- [2] 刘成梅, 梁汉蓁, 刘伟. 罗非鱼皮多肽(TSP- I)抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 11(11):148-151
- [3] Tang Z G, Zhou R Q, Duan Z T. Adsorption and desorption behaviour of taurine on macroporous adsorption resins [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2001, 76(7): 752-756
- [4] MILLS G C. Removal of salts from aromatic amino acids, their metabolites and related compounds using an XAD-4 resin [J]. Journal of Chromatography A, 1986, 355: 193-200
- [5] GOKMEN V, SERPEN A. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of dark colored compounds from apple juice using adsorbent resin [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 53(3): 221-227
- [6] 陈季旺, 孙勤. 鱼降压肽的大孔树脂脱盐及理化性质[J]. 食品科学, 2009, 30(24):158-162
- [7] 范文, 阮长青. DA201-C大孔树脂对腐乳多肽脱盐作用的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(8):105-109
- [8] 周存山, 马海乐. 麦胚蛋白降压肽的大孔树脂脱盐研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3):142-146
- [9] 夏光华, 申铨日, 蔡锦红, 等. 三酶法制备罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽及活性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(23):175-179
- [10] 袁怀波, 赵国华, 等. 利用大孔吸附树脂纯化葛根异黄酮的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(2):62-65
- [11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent [J]. J Biochem, 1951, 193: 265-269
- [12] DUDONNE S, VITRAC X, COUTIERE P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays [J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(5): 1768-1774.
- [13] 卫生部食品卫生监督检验所. GB/T5009.4-2003 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [14] 赵利, 王璋, 许时婴. 大孔吸附树脂对酪蛋白非磷肽的脱色和色谱分离[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4):69-71
- [15] 夏树华, 王璋, 许时婴. 采用大孔吸附树脂提纯螺蛳腹足肌酶解产物的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2):116-120
- [16] 程新梅. 大孔吸附树脂分离技术在中药制药工业中的应用[J]. 中国药房, 2008, 19(18):1431-1433
- [17] Mishra A K, Ahluwalia J C. Alcohol induced conformational transitions of proteins and polypeptides [J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1983, 21(3): 322-330