

骨素及骨素酶解液中蛋白质及肽的电泳分离

张崧, 王新惠, 王卫, 卢小芳, 胡建玉

(成都大学肉类加工四川省重点实验室, 四川成都 610106)

摘要: 为了分离纯化骨素及其酶解产物中的蛋白质及肽, 并比较骨素蛋白与骨蛋白和肌肉蛋白的差异, 本文以骨蛋白和肌肉蛋白为参照, 采用十二烷基磺酸钠凝胶电泳法(SDS-PAGE)对骨素蛋白及其酶解产物中的肽进行分离。利用不同浓度的分离胶(5%、7.5%、10%、15%)对骨素蛋白、骨蛋白和肌肉蛋白样品进行分离, 结果发现, 各种浓度的分离胶均可以分离骨蛋白和肌肉蛋白, 但是不能分离骨素蛋白。对骨素蛋白酶解液采用N-三(羟甲基)甲基甘氨酸凝胶电泳法分离, 能有效分离骨素酶解液中的肽。对SDS-PAGE电泳分离时骨蛋白的迁移比和分离胶的相关性分析发现, 骨蛋白的迁移比与分离胶浓度间呈指数相关, 且具有极显著的相关性($R^2 \geq 0.996$, $p < 0.01$)。利用该相关性并结合蛋白质的分子量与迁移比的相关性方程, 可以通过蛋白质的分子量选择合理的分离胶浓度, 或者通过迁移比预测蛋白质的分子量。

关键词: 骨素; 电泳; 酶解液; 蛋白

文章编号: 1673-9078(2015)6-178-182

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.028

Electrophoretic Separation of Proteins and Peptides in Bone Extract and Bone Extract Hydrolysates

ZHANG Yin, WANG Xin-hui, WANG Wei, LU Xiao-fang, HU Jian-yu

(Key Laboratory of Meat Processing of Sichuan, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: Bone extract (BE) and BE hydrolysate proteins and peptides were isolated and purified, and the differences in BE protein, bone protein, and muscle protein were compared. Bone protein and muscle protein were used as the controls, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to separate BE protein and BE hydrolyzed peptides. The effect of different running gel concentrations (5%, 7.5%, 10%, 15%) on the separation of BE protein, bone protein, and muscle protein was investigated. The results showed that bone protein and muscle protein were separated successfully, while BE protein was not separated by SDS-PAGE. In contrast, BE hydrolysate peptides were separated by N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycine gel electrophoresis. Analysis of the relationship between the electrophoresis migration ratio of BP and the running gel concentrations for SDS-PAGE revealed an extremely significant ($R^2 \geq 0.996$, $p < 0.01$) correlation between the migration ratio and the running gel concentration. Combining this correlation with the correlation equation of the molecular weight of the proteins and the migration ratio allows us to choose the running gel concentration according to the molecular weight of a protein, or in turn to calculate the molecular weight of a protein based on its migration ratio.

Key words: bone extract; electrophoresis; hydrolysate; protein

畜禽骨是大宗畜禽加工副产物, 其营养价值高。畜禽骨中不仅含有丰富的蛋白质、矿物质, 而且其中的钙、磷等微量元素容易被人体消化吸收^[1-2]。在畜禽骨回收利用中, 常将其中的蛋白质和微量元素作为利用重点。近年来, 高压蒸煮畜禽骨, 提取其中的骨素是畜禽骨利用的一个新亮点^[3-4]。提取的骨素可用于制作骨味香精、麦拉德反应基料等^[5]。但是由于提取的骨

素风味不强烈, 导致骨素在食品工业中的应用不广泛, 而且使用范围也受到严重限制^[6-8]。为了改善这一制约骨素在食品工业中应用的关键制约因素。国内外学者采用酶解、麦拉德反应等方式改善其风味^[5, 9-10]。我们课题组及其他学者的研究发现, 酶解骨素有利于提高其鲜味^[6-8]。但是对于酶解导致骨素鲜味增强的原因尚不明确。

最近的研究发现, 水解大豆蛋白产生的肽具有一定的呈鲜效果^[11]。酶解骨素产生的鲜味是否与产生的鲜味肽有关, 目前国内外的相关研究报道较少。探明骨素酶解液中的肽是否呈现鲜味, 只有对骨素及其酶解液中的肽进行有效分离纯化, 才能对其呈鲜效果进

收稿日期: 2014-09-24

基金项目: 四川省教育厅资助项目(14ZA0320)

作者简介: 张崧(1981-), 男, 博士, 副教授, 主要从事畜产品加工与保藏研究

通讯作者: 王卫(1958-), 男, 教授, 研究方向为肉类加工与保鲜贮运

行评价。目前国内外用于肽的分离方法主要有电泳法、超滤、凝胶层析、离子交换层析法、亲和层析法、大孔吸附树脂法、疏水作用层析、高效液相色谱法^[12]，其中的电泳法相对其他方法而言操作成本较低，而且表现出良好的分离效果^[13]。因此，为了建立有效的分离纯化骨素及其酶解液中鲜味肽的电泳分离法，并实现骨素酶解液中的鲜味肽分离纯化，本文采用 SDS-PAGE 电泳法，对骨素及其酶解液中的肽进行分离纯化，以便为进一步评价其结构和风味提供方法基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪后腿骨购于成都大学附近的鑫大百货超市。巯基乙醇、十二烷基磺酸钠 (SDS)、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、甘氨酸、琼脂、TEMED、三(羟甲基)氨基甲烷均为生化试剂。甘油、溴酚蓝、过硫酸铵、盐酸、冰醋酸、甲醇、考马斯亮蓝-R250 及其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 骨素提取

将清洗干净的猪骨头，经破碎机破碎成 2~3 cm 的块状，然后以骨水比 1:15 加入到提取罐高温高压 (0.15 Mpa, 121 °C) 蒸煮 4 h，将提取液用 200 目筛过滤、静置 2 h 后采用油水分离器分离得到骨素。

1.2.2 电泳样品制备

猪骨电泳液：剔除猪后腿骨上的残肉，采用 LK-600A 摇摆式粉碎机粉碎 15 min。称取过 40 目的骨粉 2 g，加入 18 mL 5% (5 g/100 mL) 的 SDS 溶液。在 85 °C 的水浴中加热 1 h 后，在 20 °C、11000 g 下离心 5 min。溶解的样品按体积比 1:1 与样品缓冲液混合 (0.5 mol/L 的 Tris-HCl, pH 6.8, 含 4 g/100 mL 的 SDS, 20 g/100 mL 的甘油和 10 g/100 mL 的 β-巯基乙醇) 煮沸 3 min。

猪肉电泳液：称取 2 g 猪后腿肌肉，加入 18 mL 5% (5 g/100 mL) 的 SDS 溶液。混合物用 FJ-200 均质机在 2000 r/min 下均质 1 min，均质液在 85 °C 的水浴中加热 1 h 后，在 20 °C、11000 g 下离心 5 min。溶解的样品按体积比 1:1 与样品缓冲液混合 (0.5 mol/L 的 Tris-HCl, pH 6.8, 含 4 g/100 mL 的 SDS, 20 g/100 mL 的甘油和 10 g/100 mL 的 β-巯基乙醇) 煮沸 3 min。

骨素及其酶解液电泳液：量取 2 mL 骨素及其酶解液^[13]，加入 18 mL 5% (5 g/100 mL) 的 SDS 溶液。

在 85 °C 的水浴中加热 1 h 后，在 20 °C、11000 g 下离心 5 min。溶解的样品按体积比 1:1 与样品缓冲液混合 (0.5 mol/L 的 Tris-HCl, pH 6.8, 含 4 g/100 mL 的 SDS, 20 g/100 mL 的甘油和 10 g/100 mL 的 β-巯基乙醇) 煮沸 3 min。

1.2.3 电泳分离

十二烷基磺酸钠凝胶电泳 (SDS-PAGE)：根据文献^[14]，对各种电泳进行分离。将大约含 20 μg 蛋白的样品液上到凝胶上，在 15 mA 的电流下跑电泳。

N-三(羟甲基)甲基甘氨酸凝胶电泳 (Tricine-SDS-PAGE)：根据文献^[15]，对各种电泳样品进行分离。

1.2.4 电泳胶分析

采用 Gel-Pro Analyzer 4.0 对电泳胶的光密度 (O.D) 进行分析，根据电泳胶的光密度分布对条带的分子量进行定量。

光密度(O.D)(x,y) = (-log(强度(x,y)) - 空白) / (入射光强度 - 空白)

式中强度(x,y)指电泳胶点(x,y)处的光强度；空白指无光透过时的强度；入射光强度指所用光源的强度。

1.2.5 电泳条带迁移距离

将电泳图片转换为 pdf 文件，然后用 Adobe Acrobat 7.0 Professional 对分离条带的距离进行测量。计算迁移比 (条带的移动距离/分离胶面的总长)。

1.2.6 数据分析

采用 Excel2010 对数据进行计算和统计分析。

2 结果与讨论

2.1 分离胶浓度对骨蛋白和骨素蛋白的分离

为了比较骨蛋白和骨素蛋白的差异，并分析不同分离胶浓度对骨及骨素蛋白的分离效果，采用浓缩胶浓度 4%，分离胶浓度分别为 5%、7.5%、10% 和 15% 对骨及骨素蛋白进行分离 (图 1)。图中条带显示，在不同分离胶浓度下，骨蛋白 (BP) 的分离效果好，均有明显的谱带，但是骨素蛋白 (BE) 在不同分离胶浓度下，均难以被分离。图 1 显示，根据出带位置及条带清晰度，在四种不同浓度分离胶中，10% 的分离胶对骨蛋白的分离效果较好。

SDS-PAGE 电泳对猪骨蛋白的分离效果好，类似结果在鸡骨蛋白的电泳谱带中也有体现^[8]。骨素是骨头的提取物，理论上两者的电泳谱带应该类似。但是图 1 的分离结果显示，两者表现出与理论推测完全不符的结果。导致这一现象的可能原因是样品的制备工艺的差异。骨蛋白是猪骨粉经 SDS 溶解后制得的电泳

样品，而骨素是鲜骨经过高压蒸煮后制得骨素再经 SDS 溶解后制得的。高压蒸煮导致原始的骨蛋白变性严重，另外，骨素中残留的部分骨油也可能是干扰骨素蛋白分离的原因。

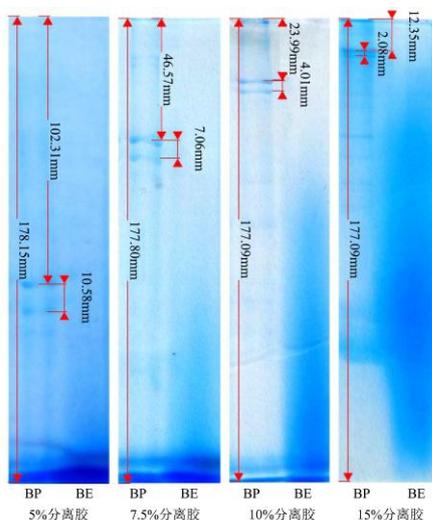


图1 骨蛋白和骨素蛋白电泳分离效果比较

Fig.1 SDS-PAGE comparison of bone protein and bone extract

注：图中BP为骨蛋白；BE为骨素。

图1显示，骨蛋白的第一条带出现距离随着分离胶浓度的增加而减少。为了分析不同分离胶浓度与蛋白质迁移距离的关系，以便于选择合适的分离胶浓度对蛋白质实现有效分离，对图中的蛋白质迁移比和分离胶浓度进行回归分析，所得结果见图2。

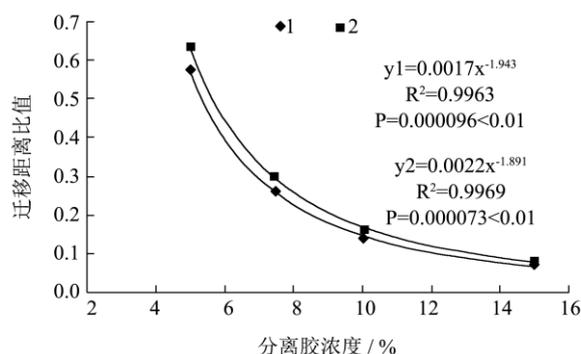


图2 分离胶浓度与骨蛋白和骨素蛋白电泳分离效果的关系

Fig.2 Correlation between running gel concentration and protein migration distance ratio

注：图中1为图1中第一条BP带；2为第二条BP带。

图2中的回归分析结果显示，两个蛋白带的迁移比均与分离胶的浓度呈指数相关。由图中相关系数的平方值 0.9963 和 0.9969、显著性分析 p 值 0.000096 和 0.000073 可知，蛋白质的迁移比与分离胶浓度呈极显著相关 ($p < 0.01$)。因此，可利用图2的回归方程，通过设计某分子量蛋白质的迁移比，进而计算选择何种浓度的分离胶可实现对蛋白质的分离。

2.2 相同分离胶浓度下各种物质的电泳分离效果比较

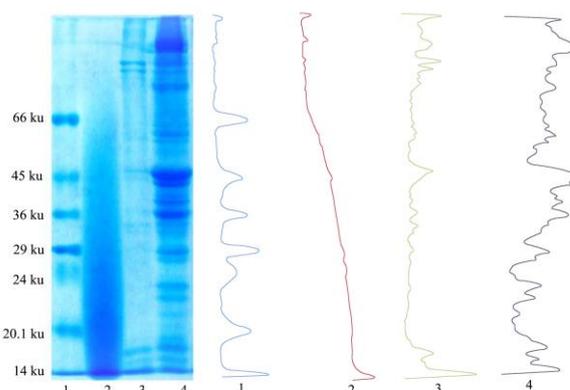


图3 各种蛋白质的电泳分离及分离效果比较

Fig.3 SDS-PAGE of protein from bone, bone extract, pork, and marker

注：图中1为标准蛋白；2为骨素蛋白；3为骨蛋白；4为肉蛋白。

根据图1中不同分离胶浓度下骨蛋白的分离情况，选择10%的分离胶对骨蛋白、骨素蛋白、肌肉蛋白进行分离效果比较(图3)。图3的分离结果显示，10%的分离胶对骨蛋白和肉蛋白均能分离出清晰的条带，但是骨素仍然不能被有效分离。为了更清楚地辨别各种蛋白样品的分离情况，对电泳胶中的谱带进行光密度分析(图中曲线1~4)。由图3中曲线1~4可以更清楚地看到，骨蛋白和肉蛋白均有明显的光密度峰，而骨素无光密度峰。

比较图3中骨蛋白和肌肉蛋白的电泳条带和光密度分布可知，骨蛋白的电泳条带只有少部分与肌肉蛋白具有相同的迁移距离。而且，相对于肌肉蛋白，骨蛋白的条带明显少于肌肉蛋白。这可能是由于构成骨蛋白质和肌肉蛋白质的成分不同所致。构成畜禽骨的蛋白质以胶原蛋白为主，其次为碱性蛋白质和弹性蛋白；而肌肉蛋白由肌原纤维蛋白质(包括肌球蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白、肌钙蛋白)、肌浆蛋白质(内源酶、肌红蛋白)、基质蛋白质(胶原蛋白)构成^[16]。肌肉蛋白的成分较骨蛋白丰富，这可能是导致骨蛋白的电泳条带较肌肉蛋白少的主要原因。

为了进一步分析图3中骨蛋白和肌肉蛋白的分子量，对标准蛋白的迁移比和分子量对数进行回归，所得回归曲线见图4。图4中回归系数的平方为0.9912，显著性分析p值为0.00016<0.01。由此可知，迁移比与分子量的对数之间具有极显著的相关性。因此，所得回归方程可用于骨蛋白和肌肉蛋白中各条带分子量

预测。

根据图4中的回归方程,计算骨蛋白的第1和第2条带的分子量,分别为88.42和84.87。这一结果与张恒等人所得的结果相符合^[8],但是由本方法得到的结果更精确。对图1中骨蛋白的迁移比与图3中的迁移比进行误差计算,得出两次电泳胶中第1、2条带的相对误差分别为5.11%和5.05%。由此可知,不同分离胶对蛋白质条带的迁移比影响较小。因此,图4中所得迁移比与分子量的对数之间的相关性具有普遍性,只要电泳胶条件一致,就可以利用图4中所得方程,通过迁移比预测某一条带的分子量。

将图2的回归结果与图4的回归结果综合应用,就可以实现由分子量推测迁移比,进而预测选用多少浓度的分离胶就可以对某种已知分子量范围的蛋白质进行有效分离;相反,在已知某一分离胶浓度下蛋白质的迁移比时,反过来可以预测该蛋白质的分子量。尽管本文只重点对10%的分离胶的分子量与迁移比进行了分析,但是本实验的尝试,为后续类似研究提供了方法基础和依据。

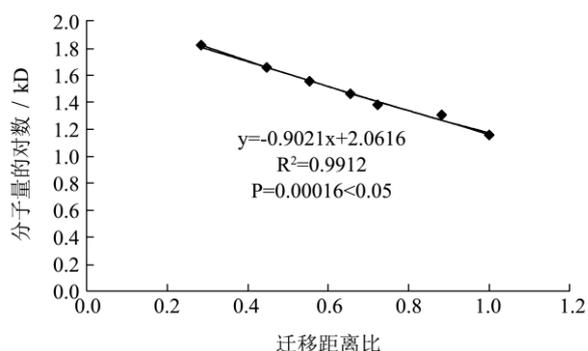


图4 迁移距离比与分子量间的关系

Fig.4 Correlation of protein migration distance ratio and relative molecular weight

2.3 骨素酶解液电泳分离

由图1和图3的电泳图结果可知,利用SDS-PAGE难以对骨素蛋白进行有效分离。为了进一步探索骨素蛋白的电泳法分离,采用乙醚对骨素脱脂,以排除脂肪对电泳分离的影响,并采用Tricine-SDS-PAGE对骨素蛋白进行分离,所得分离图谱见图5。图5显示,即使对骨素脱脂,依然难以实现骨素蛋白的分离,但是当采用木瓜蛋白酶对骨素进行酶解后,所得骨素酶解液却显示比较清晰的条带。比较图5中酶解骨素和木瓜蛋白酶的电泳条带,两者并不相同。因此,酶解骨素所得的条带不是因为木瓜蛋白酶中的蛋白质所致。

木瓜蛋白酶属于内切酶,可水解蛋白质和多肽中

的赖氨酸和精氨酸的羧基端,并能优先水解在肽键的N-端具有二个羧基的氨基酸或芳香L-氨基酸的肽键。因此,木瓜蛋白酶水解骨素后使骨素中的大分子蛋白质或多肽形成分子量更小的短肽及少部分游离氨基酸。研究发现,木瓜蛋白酶酶解骨素可以提高骨素的水解度,同时酶解使骨素的鲜味增加^[4]。因此,图5中骨素酶解液能利用电泳法分离的结果,为进一步研究骨素酶解液中肽的呈味效果奠定了基础。

电泳法不能对骨素蛋白进行有效分离,但对骨素酶解液却能够实现较好分离。导致这一结果的可能原因是,骨素的制备工艺使大部分骨蛋白变性严重,部分骨蛋白形成复杂的蛋白质碎片,这样致使骨素在用电泳胶分离时,难以形成清晰的条带。但是通过酶解的方法,可以使骨素中蛋白质碎片被水解,形成分子量分布比较集中的小肽,因而骨素酶解液在电泳分离时显示较清晰的条带。

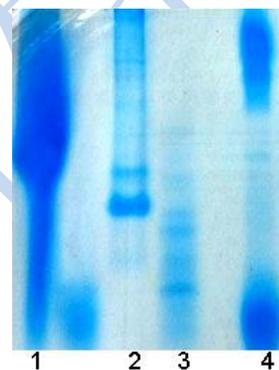


图5 骨素酶解液电泳分离

Fig.5 Tricine-SDS-PAGE of bone extract hydrolysate

注:图中1为脱脂骨素,2为骨粉,3为骨素酶解液,4为木瓜蛋白酶。

3 结论

利用不同分离胶浓度(5%、7.5%、10%、15%)的SDS-PAGE对骨素蛋白、骨蛋白和肌肉蛋白进行分离,结果发现,SDS-PAGE可以对骨蛋白和肌肉蛋白分离,但不能对骨素蛋白分离。比较各分离胶浓度对骨蛋白和肌肉蛋白的分离效果,发现10%的分离胶浓度对骨蛋白和肌肉蛋白的分离效果较好,骨蛋白的条带较肌肉蛋白的少。将骨素酶解后改用Tricine-SDS-PAGE进行分离,结果发现Tricine-SDS-PAGE能够使骨素酶解液中的肽得到有效分离。对SDS-PAGE中骨蛋白的迁移比和分离胶的相关性分析发现,骨蛋白的迁移比与分离胶浓度间存在极显著的指数相关性($R^2 \geq 0.996$, $p < 0.001$),且具有普遍性。利用该相关性并结合蛋白质分子量的对数与迁移比的相关性,可以根据蛋白质的分子量选择合理的分离胶浓

度, 或者通过迁移比预测蛋白质的分子量。这为未知蛋白样品在分离胶浓度选择及电泳分离后凝胶中分离条带的分子量预测提供了方法依据。

参考文献

- [1] KARAKAS P, VERSTEEGH H A, HONING T Y, et al. Nutritive value of the meat and bone meals from cattle or pigs in broiler diets [J]. Poultry Science, 2001, 80(8): 1180-1189
- [2] 赵霞, 马丽珍. 酶解骨蛋白的研究[J]. 食品科技, 2003, 7: 99-101
ZHAO Xia, MA Li-zhen. Study of enzymatic hydrolysis of bones [J]. Food Science and Technology, 2003, 7: 99-101
- [3] 张杰. 骨素精粉的制备及其补钙效果的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2011
ZHANG Jie. Preparation of refined bone extraction powder and its supplemental effect on calcium status of rats [D]. Jiling: Jiling University, 2011
- [4] 张崑, 王卫, 欧全文, 等. 骨素酶解液喷雾干燥工艺的响应面法优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 233-237
ZHANG Yin, WANG Wei, OU Quan-wen, etc. Optimization of spray drying process of bone extract hydrolysate liquid by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(9): 233-237
- [5] 孙红梅, 张春晖, 李侠, 等. 鸡骨素及其酶解液Maillard反应产物滋味成分研究. 现代食品科技[J]. 2013, 29(8): 1872-1876
SUN Hong-mei, ZHANG Chun-hui, LI Xia, et al. Taste compounds in maillard reaction products of chicken bone extract and its enzymatic hydrolysate [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1872-1876
- [6] LINDER M, FANNI J, PARMENTIER M, et al. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2006(60): 949-952
- [7] 刘甲. 呈味肽的研究及其在调味品中的应用[J]. 肉类研究, 2010, 5: 88-92
LIU Jia. Research and application of present flavor peptides [J]. Meat Research, 2010, 5: 88-92
- [8] 张恒, 郭应龙. 鸡骨蛋白酶解过程中的产物性质研究及电泳分析[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 111-114
ZHANG Heng, WU Ying-long. Nitrogen and taste changes in chicken bone protein during enzymatic hydrolysis with flavourzyme and tricine-SDS-PAGE analysis of polypeptide degradation [J]. Food Science, 2011, 32(5): 111-114
- [9] 肖作兵, 牛云蔚, 张健, 等. 肉味香精前体物的制备技术研究[J]. 香料香精化妆品, 2005, 5: 5-7
XIAO Zuo-bing, NIU Yun-wei, ZHANG Jian, etc. Research of technology on manufacturing precursor of meat flavor [J]. Flavour Fragrance cosmetics, 2005, 5: 5-7
- [10] 杨铭铎, 沈春燕, 张根生. 猪骨呈味物质提取的研究(I)-酶解猪骨最佳工艺条件[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 210-212
YANG Ming-duo, SHEN Chun-yan, ZHANG Gen-sheng. Study on flavour components extraction in pig bone(i)-optimum processing conditions of pig bone enzymolysis [J]. Food Science, 2007, 28(9): 210-212
- [11] SU Guo-wan, CUI Chun, ZHENG Lin, et al. Isolation and identification of two novel umami and umami-enhancing peptides from peanut hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2), 479-485
- [12] 刘玉军, 魏永利, 代龙. 肽的分离纯化研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(1): 180-181.
LIU Yu-jun, WEI Yong-li, DAI Long. Research progress on isolation and purification of peptide [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 39(1): 180-181.
- [13] 张崑, 王卫, 张佳敏, 等. 骨素酶解工艺条件的响应面法优化[J]. 食品工业, 2012, 33(5): 57-59
ZHANG Yin, WANG Wei, ZHANG Jia-min, et al. Application of response surface method to optimizing the hydrolysis processing of pig bone extract by papaya protease [J]. The Food Industry, 2012, 33(5): 57-59
- [14] LAEMMLI U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [15] HERMANN Sch ägger. Tricine-SDS-PAGE [J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 16-22
- [16] BELITZ H D, GROSCH W, SCHIEBERLE P. Food Chemistry (4th revised and extended Edition) [M]. Springer, 2009