

波纹巴非蛤酶解过程的肽谱变化

陈 忻^{1,2,3}, 陈晓刚¹, 陈杰文¹, 孙恢礼^{2,3}

(1. 佛山科学技术学院理学院, 广东 佛山 528000; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 以波纹巴非蛤为原料, 酶解 1~6h 制备酶解液。在 SDS-PAGE 电泳法测定肽谱的基础上, 再利用液相色谱-质谱联用测定波纹巴非蛤酶解的肽谱变化。结果表明: 酶解前 3h 时酶解液的肽分子的分子质量大概主要集中在 100、50、2kD, 酶解液大都是大分子肽或者中分子肽; 酶解 4、5、6h 时酶解液的肽分子的分子质量基本没变化, 其分子质量主要集中在 400~600D, 即为小分子肽, 酶解 4h 时为酶解终点。

关键词: 波纹巴非蛤; 活性肽; SDS-PAGE 电泳法; 液相色谱-质谱联用

Variations in Peptide Mass Fingerprints of *Paphia undulata* Muscle Hydrolysates during Enzymatic Hydrolysis

CHEN Xin^{1,2,3}, CHEN Xiao-gang¹, CHEN Jie-wen¹, SUN Hui-li^{2,3}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Foshan University, Foshan 528000, China;

2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Paphia undulate* muscles were hydrolyzed with papain and the hydrolysates after hydrolysis for 1, 2, 3, 4, 5 h and 6 h were analyzed by SDS-PAGE and LC-MS/MS. The results revealed that the molecular mass distribution of peptides in *Paphia undulate* muscle hydrolysates was mostly concentrated on 100, 50 kD and 2 kD during the first 3 hours of the hydrolysis, most of them large or small peptides. No substantial difference in the molecular mass distribution of peptides, which was mostly between 400 D and 600 D, was observed among the 4 h, 5 h and 6 h hydrolysates, suggesting that 4 h was the end point of the hydrolysis.

Key words: *Paphia undulate*; bioactive peptide; SDS-PAGE; LC-MS

中图分类号: Q556.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0048-06

21 世纪是海洋经济可持续发展的世纪, 海洋天然活性物质是现代生物学研究热点, 而天然海洋活性肽是海洋活性物质研究的重要组成部分。海洋生物体内的各种活性物质, 是开发研究海洋生化药物与功能性保健食品的原料宝库^[1], 海洋丰富的生物资源为肽的制备提供了充足的物种资源与蛋白质资源。其中, 运用酶工程技术, 是开发利用海洋生物蛋白资源的重要途径。海洋贝类蛋白酶解物含有大量的短肽、多肽、氨基酸等营养成分, 并产生了一些具有特殊生理功能的生物活性肽, 具有调节肠胃运动、调节免疫系统、抗菌、抗血栓、抗病毒、抗癌、抗氧化、清除自由基、促进矿物质元素吸收等方面或者多方面的重要生理功效, 可以被开发为饲料蛋白源、海鲜调味料、保健食品、

营养食品、天然药物、功能化妆品等, 具有广泛的应用前景^[2-5]。

目前, 人们已经对寡肽在动物体内的转运机制进行了大量的研究, 表明动物体内可能存在多种寡肽的转运体系。研究认为, 在蛋白质的多肽链内部普遍存在着功能区, 这些功能区是生物活性肽的可能前体。选择合适的蛋白酶水解这些多肽链, 把具有生物活性的肽片段释放出来, 可制备出具有各种生理功能的生物活性肽^[6]。在营养学上肽类物质的理化特性和营养功能比蛋白质和氨基酸有更多的优点, 应用到各类功能性食品、化妆品、保健品、医疗药品等中, 能增加其附加值和活性^[7-10]。然而胶原多肽的许多的功能特性仅有其中一小部分已被实际应用, 有待深入研究和进一步开发利用。因此, 酶

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2008BAD94B08); 广东省 2009 院省合作项目(2009B091300018);

广东省 2010 院省合作项目(2010B090900027)

作者简介: 陈忻(1968—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为海洋化学。E-mail: fschenxin@tom.com

解制备小分子肽的研究有重要的社会和经济意义。

波纹巴非蛤(*Paphia undulata*), 又名花甲螺, 主要分布在广东、广西及海南沿海。目前, 波纹巴非蛤养殖“工业化”, 产量逐年递增, 但是国内对波纹巴非蛤的利用仍主要以直接食用为主。随着对波纹巴非蛤的营养价值的全面研究, 以波纹巴非蛤为原料, 生产贝类提取物, 研制以贝类为原料的保健食品、药品、化妆品已成为发展趋势^[11-13]。本实验研究酶解波纹巴非蛤过程中肽谱的变化, 为其进一步开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜波纹巴非蛤, 购于佛山山紫市场, 由中国科学院南海海洋研究所孙恢礼研究员鉴定。

木瓜蛋白酶(2×10^6 U/g, 食品级) 广州威佳科技有限公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris 美国 Bio Basic 公司。

1.2 仪器与设备

Agilent6120 型液相色谱质谱联用仪 美国 Agilent 公司; BP252AG 搅拌机 广东美的生活电器制品有限公司; SHZ-82A 恒温振荡器 江苏金坛市富华仪器有限公司; FA2004N 电子分析天平 上海精密仪器有限公司; PHS-3C 型酸度计 上海雷磁仪器厂; 800 型离心沉淀器 上海手术器械厂; 电炉(800W) 高胜五金电器厂; DYY-8C 电泳仪、DYY-24A 电泳槽 北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 酶解液制备的流程

新鲜波纹巴非蛤去壳取肉→取 60g 肉洗净搅拌均匀浆(料水比 1:3(m/V))→加入占蛤肉质量 1% 的木瓜蛋白酶, 充分搅拌, 再平均分为 6 份于 pH 值 6.3 条件下分别恒温酶解 1、2、3、4、5、6h → 水浴加热灭酶 → 离心分离提取上层清液, 制得酶解液 4℃ 保存备用

根据前期工作已发表文献^[11], 以木瓜蛋白酶制备得到的海洋生物活性肽水解度及平均肽链长度最优。

1.3.2 酶解液中分子肽分子质量的测定^[14]

采用 SDS-PAGE 电泳法对酶解液中的小分子肽进行分析。

1.3.3 液相色谱-质谱联用测定酶解液肽谱的变化^[15-16]

Agilent6120 型液相色谱质谱联用仪; 柱子 Agilent: TC-C₁₈ 液相色谱柱(4.6mm × 250mm, 5 μm); 流动相: 甲醇、水体积比为 20:80; 流速: 0.5 mL/min; 相检测器 DAD 波长: 215nm; 时间: 60min。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳法对分子肽的分子质量测定结果

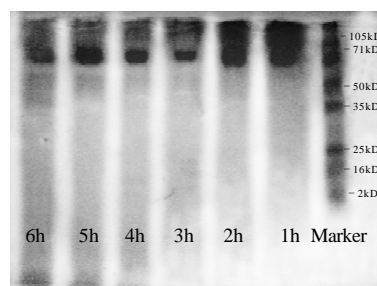


图1 样品的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE of *Paphia undulata* muscle hydrolysates

由图 1 可知, 酶解 1h 时, 酶解液中主要是大分子肽, 其主要分子质量在 50~75kD, 但在电泳带 25、35kD 处也出现了小部分的分子肽; 酶解 2h 时, 50~75kD 的大分子肽开始减少, 25~35kD 范围内的分子肽明显增加, 并在 1.5kD 开始有分子肽出现; 酶解 3h 时, 分子质量为 1.5kD 以下的分子肽明显增多, 其他分子质量的分子肽则相应减少; 酶解 4h 时, 分子质量为 1.5kD 以下的分子肽继续增多, 此时酶解差不多达到终点; 酶解 5、6h 时, 各分子质量的分子肽的分布情况跟酶解 4h 时相似。经分析可知, 酶解的前 4h, 酶解液中的分子肽分子质量有明显的变化, 大分子肽不断酶解成更小的分子肽, 酶解 4h 后的肽谱没有明显的变化。

2.2 液相色谱-质谱联用测定酶解液肽谱的结果

2.2.1 酶解 1h 时酶解液高效液相色谱图结果

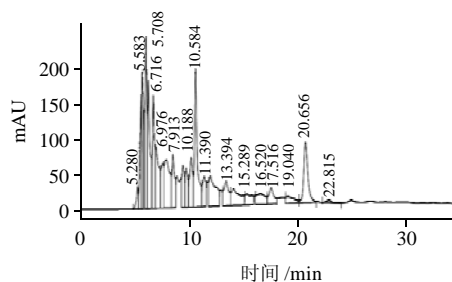
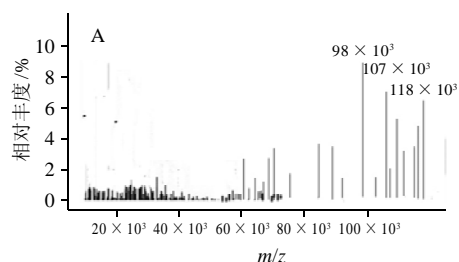
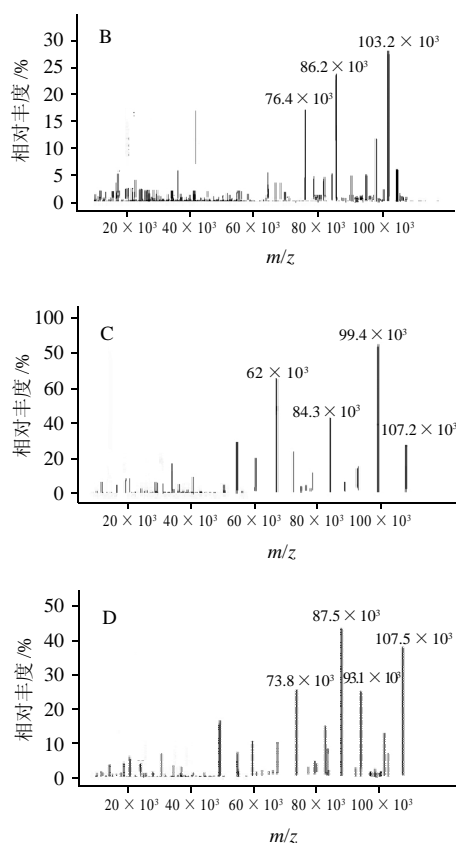


图2 酶解 1h 时酶解液高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of 1 h *Paphia undulata* muscle hydrolysate





A、B、C、D.保留时间分别为6、9、21、37min。

图3 酶解1h时酶解液的阳离子质谱图

Fig.3 Mass spectra of 1 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

由图2可知,酶解液入柱后,在酶解1h的第6、9、21、37分钟附近处出现峰值。其中在第6分钟附近,质荷比为 98×10^3 的碎片离子丰度最高,表示这个碎片离子很稳定(图3A);在第9分钟附近,质荷比为 103.2×10^3 的碎片离子丰度最高,另一较高丰度的质荷比是 86.2×10^3 (图3B);在第21分钟附近,质荷比为 99.4×10^3 的碎片离子丰度最高(图3C);在37min附近,质荷比为 87.5×10^3 和 107.5×10^3 的碎片离子丰度都较高(图3D)。

2.2.2 酶解2h时酶解液高效液相色谱图结果

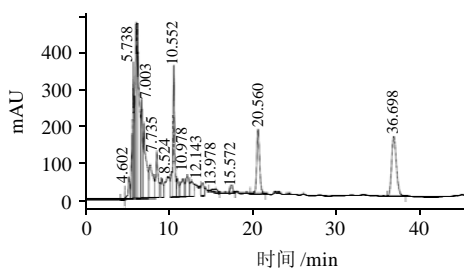
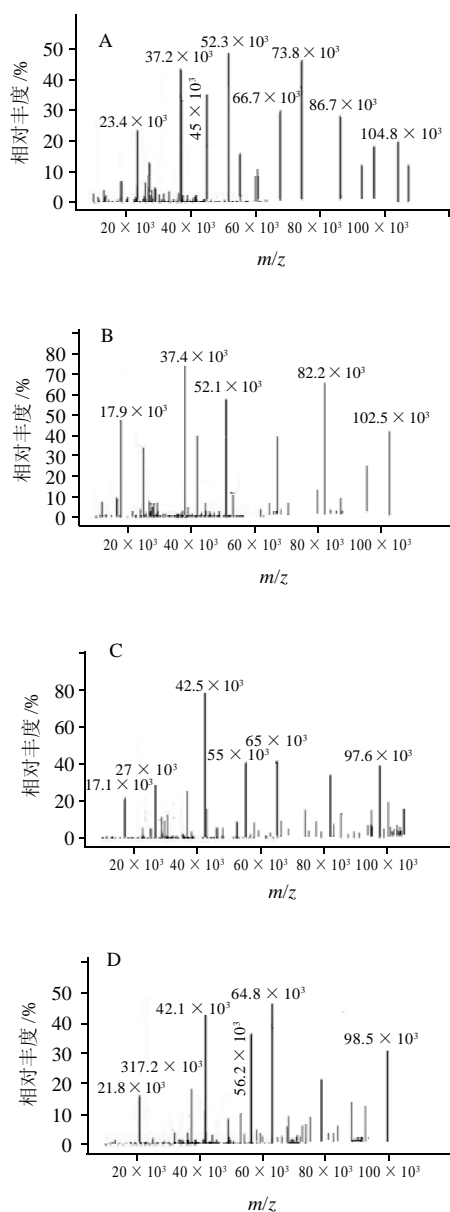


图4 酶解2h时酶解液高效液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of 2 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

A、B、C、D.保留时间分别为11、20、27、45min。

图5 酶解2h时酶解液中阳离子质谱图

Fig.5 Mass spectra of 2h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

由图4可知,酶解液入柱后,在酶解2h的第11、20、27、45分钟附近处出现峰值。由图5可知,在第11分钟附近,质荷比为 52.3×10^3 的碎片离子丰度最高,表示这个碎片离子很稳定,其他的碎片离子的质荷比分别为 37.2×10^3 、 73.8×10^3 也较高,与酶解液1h比较,酶解2h时酶解液的大分子肽 100×10^3 附近的丰度降低了,质荷比为 23.4×10^3 的碎片离子丰度增大;在第20、37、45分钟附近,碎片离子丰度最高的质荷比分别为 37.4×10^3 、 64.8×10^3 、 42.5×10^3 的,碎片离子的质荷比在 100×10^3 附近也同样明显降低了,质荷比在 20×10^3 附近的的分度也都增大。

2.2.3 酶解 3h 时酶解液高效液相色谱图结果

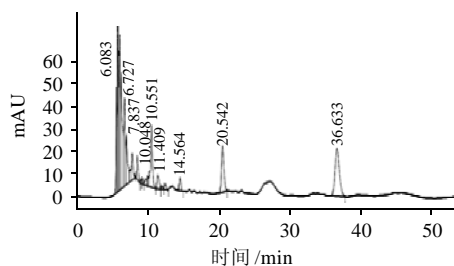
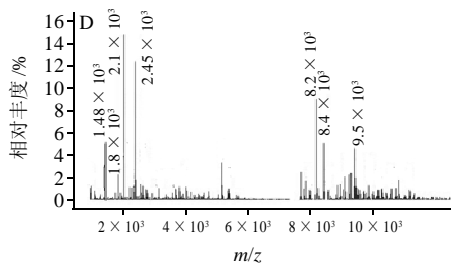
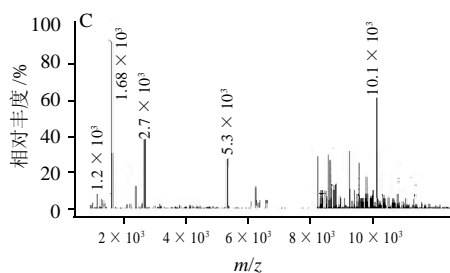
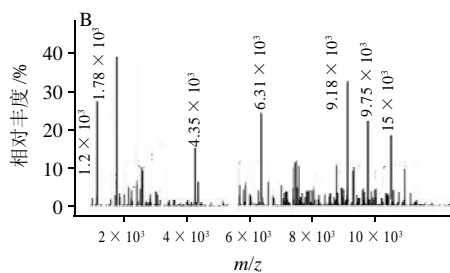
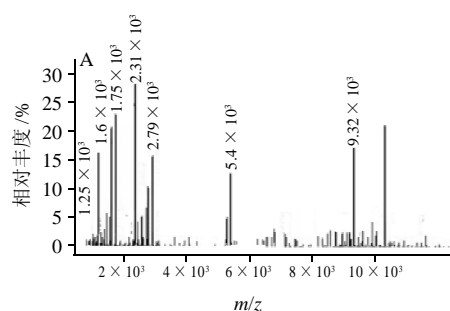


图6 酶解 3h 时酶解液高效液相色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of 3 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

A、B、C、D 保留时间分别为 6、8、21、36 min。

图7 酶解 3h 时酶解液中阳离子质谱图

Fig.7 Mass spectra of 3 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

由图 6 可知, 酶解液入柱后, 在酶解 3h 的第 6、8、21、36 分钟附近处出现峰值。由图 7 可知, 这 4 个峰值当碎片离子丰度最高时的质荷比分别为 2.31×10^3 、 1.78×10^3 、 1.68×10^3 和 2.1×10^3 , 且在这几个质荷比值的附近也存在其他丰度较高的数值, 与酶解 1、2h 酶解液谱图相比较, 此时的质荷比为 10×10^3 附近的丰度大大降低。

2.2.4 酶解 4h 时酶解液高效液相色谱图结果

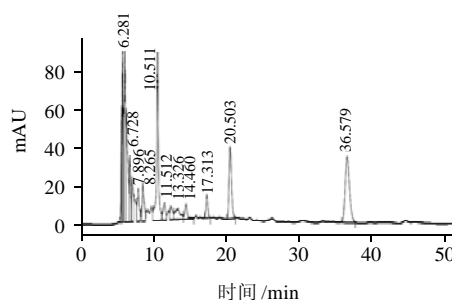
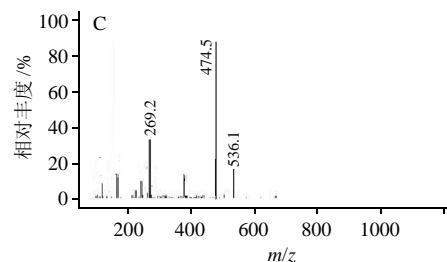
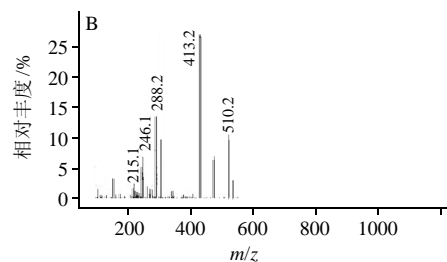
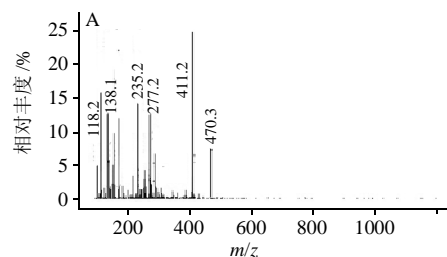
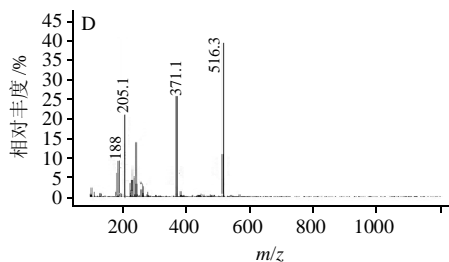


图8 酶解 4h 时酶解液高效液相色谱图

Fig.8 HPLC chromatogram of 4 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate



A、B、C、D.保留时间分别为6、10、20、36 min。

图9 酶解4h时酶解液中阳离子质谱图

Fig.9 Mass spectra of 4 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

由图8可知,酶解液入柱后,在酶解4h的第6、10、20、36分钟附近处出现峰值。由图9可知,这4个峰值当碎片离子丰度最高时的质荷比分别为411.2、413.2、474.5和516.3,且在这几个质荷比值的附近也存在其他丰度较高的数值,与酶解1、2、3h时酶解液谱图相比较,此时的质荷比的数值大大降低,都是在600以下,由此可知酶解4h时的酶解液绝大部分是小分子肽。

2.2.5 酶解5h时酶解液高效液相色谱图结果

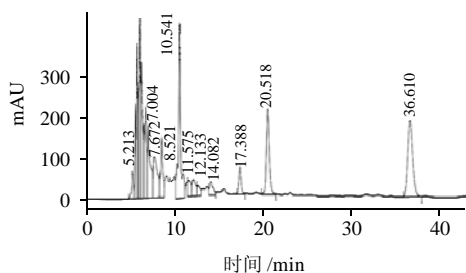
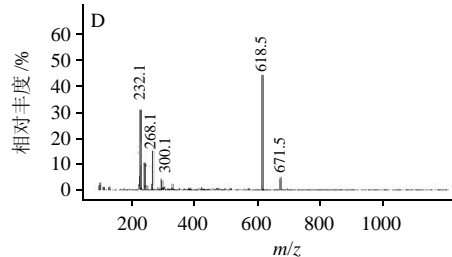
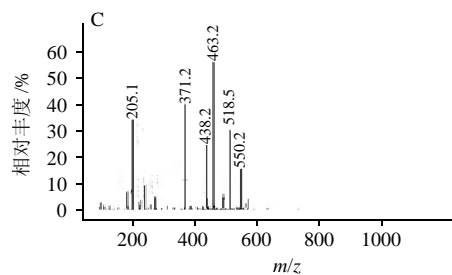
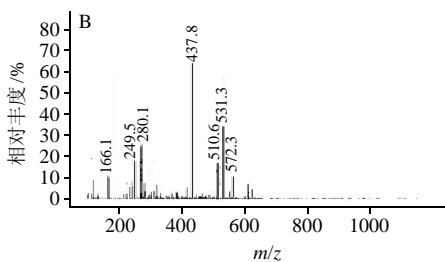
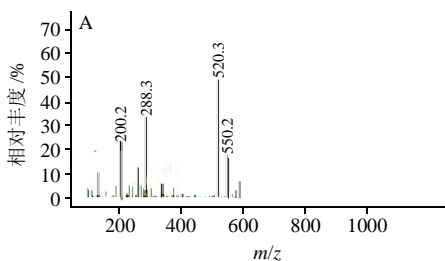


图10 酶解5h时酶解液高效液相色谱图

Fig.10 HPLC chromatogram of 5 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate



A、B、C、D.保留时间分别为11、20、36、45 min。

图11 酶解5h时酶解液中阳离子质谱图

Fig.11 Mass spectra of 5 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

由图10可知,酶解液入柱后,在酶解5h的第11、20、36、45分钟附近处出现峰值。由图11可知,这4个峰值当碎片离子丰度最高时的质荷比分别为520.3、437.8、463.2、618.5,且在这几个质荷比值的附近也存在其他丰度较高的数值,与酶解4h时酶解液谱图相比较,此时的质荷比的数值差别很小,由此可知酶解5h时的酶解液绝大部分也是小分子肽。

2.2.6 酶解6h时酶解液高效液相色谱图结果

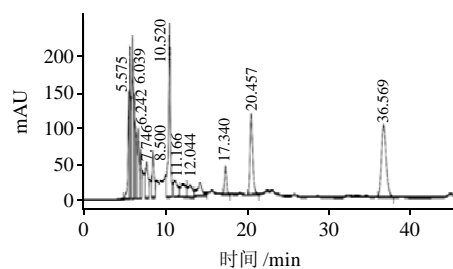
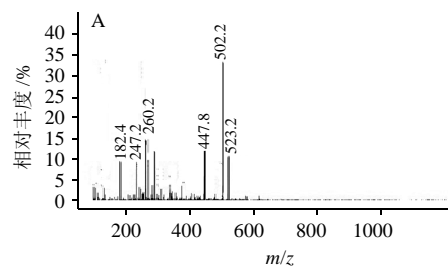
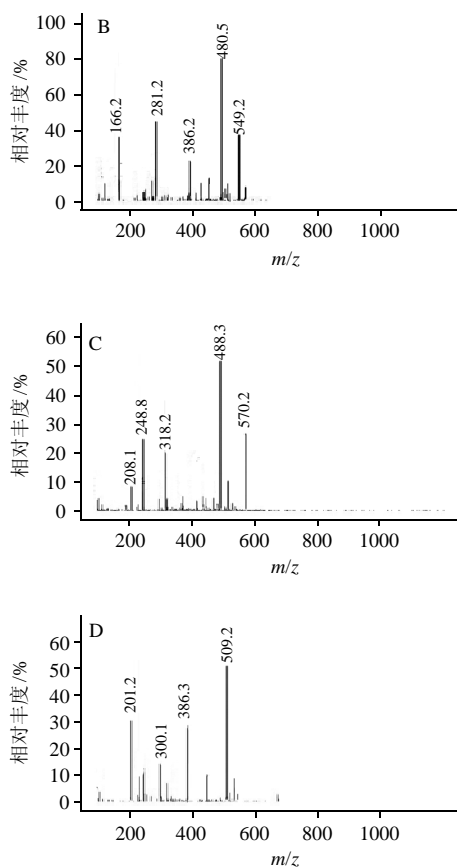


图12 酶解6h时酶解液高效液相色谱图

Fig.12 HPLC chromatogram of 6 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate





A、B、C、D. 保留时间分别为 10、20、27、45 min。

图 13 酶解 6h 时酶解液中阳离子质谱图

Fig.13 Mass spectra of 6 h *Paphia undulate* muscle hydrolysate

由图 12 可知, 酶解液入柱后, 在酶解 6h 的第 10、20、27、45 分钟附近处出现峰值。由图 13 可知, 这 4 个峰值当碎片离子丰度最高时的质荷比分别为 502.2、480.5、488.3、509.2, 与酶解 4、5h 时的酶解液谱图相比较, 此时的质荷比的数值差别很小, 由此可知酶解 4h 时是酶解的终点。

3 结 论

通过木瓜蛋白酶在 50℃、分别酶解时间 1~6h、pH 6.3、加酶量 1%、料水比 1:3 的条件下酶解波纹巴非蛤肉浆,

在 SDS-PAGE 电泳法测定的基础上, 利用液相色谱-质谱联用测定波纹巴非蛤酶解的肽谱变化, 可得酶解 1h 时酶解液的肽分子的分子质量主要集中在 100kD; 酶解 2h 时酶解液的肽分子的分子质量主要集中在 40~65kD; 酶解 3h 时分子质量主要集中在 1.6~2.3kD; 酶解 4、5、6h 时酶解液的肽分子的分子质量基本没变化, 其分子质量主要集中在 400~600D, 酶解 4h 时为酶解终点。

参考文献:

- [1] 何海伦, 陈秀兰, 张玉忠. 海洋生物蛋白资源酶解利用研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9): 70-74.
- [2] 吴园涛, 孙恢礼. 海洋贝类蛋白资源酶解利用[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 120-125.
- [3] 缪辉南, 方旭东. 海洋生物资源开发概况与展望[J]. 氨基酸和生物资源, 1999, 21(4): 12-18.
- [4] 赵二芳, 盖青青, 张海容. 微波萃取沙棘黄酮的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 148-150.
- [5] INFANTE J Z, ROUANET J M, CAPORICCIO B, et al. Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di- and tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 1992, 3(6): 285-290.
- [6] 曹文红, 章超桦, 吴红棉, 等. 几种南海贝类酶解产物的生物活性及其分子质量分布研究[J]. 提取与活性, 2009, 25(2): 52-57.
- [7] 王远亮, 魏小娅. 胶原和明胶在化妆品中的应用[J]. 明胶科学与技术, 1987, 7(3): 103-106.
- [8] 宇晨. 酶制剂研究与应用进展[J]. 医药化工, 2006(5): 8-15.
- [9] 唐忠海, 饶力群. 酶工程技术在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(4): 10-13.
- [10] 段钢, 赵振锋, 钱莹. 酶制剂在蛋白质加工行业的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 104-110.
- [11] 陈忻, 梁海鹰, 刘爱文, 等. 以波纹巴非蛤为原料制备海洋生物活性肽[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 35-37.
- [12] 陈忻, 孙恢礼, 黄汉文, 等. 基于人工神经网络的酶解波纹巴非蛤制备小分子肽的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 54-57.
- [13] 陈忻, 张俊敏, 孙恢礼, 等. 柔性固定化木瓜蛋白酶的制备及在酶解波纹巴非蛤中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 500-503.
- [14] 隋秀芝, 陈育晖, 刘俊用. SDS-PAGE 电泳法测定小分子多肽分子质量的研究[J]. 丝绸, 2001(12): 23-28.
- [15] 邱春江, 陈慧. 高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用技术在食品工业上的应用[J]. 南京工业大学学报, 2004, 26(2): 99-100.
- [16] 付金香, 霍建丽, 田垒, 等. LC-MS 分析艾塞那肽的肽图[J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(5): 544-545.