

牛骨酶解产物中咸味肽组分的分离纯化及成分研究

张顺亮, 成晓瑜*, 乔晓玲, 陈文华

(中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068)

摘要: 采用 Sephadex G-15 和 G-50 凝胶色谱柱分离牛骨酶解产物, 结合感官分析, 得到 Sephadex G-15 的峰 II 和 G-50 的峰 III 两个咸味组分; 用反向高效液相色谱和基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪分析咸味组分: Sephadex G-15 得到的咸味组分中主要有两种成分, 相对分子质量在 800~1000 之间; Sephadex G-50 得到的咸味组分中主要有 3 种组分, 相对分子质量在 800~2000 之间。两种咸味肽组分的极性较强, 且均有相对分子质量为 849.38 的多肽。

关键词: 牛骨酶解物; 分离; 咸味肽; 组分分析

Isolation, Purification and Composition Analysis of Salty Peptides from Enzymolyzed Bovine Bone

ZHANG Shun-liang, CHENG Xiao-yu*, QIAO Xiao-ling, CHEN Wen-hua

(China Meat Research Center, Beijing 100068, China)

Abstract: In this study, bovine bone hydrolysate was prepared by sequential hydrolysis with protamex followed by flavourzyme and separated by gel filtration chromatography on Sephadex G-15 and G-50 columns to obtain salty peptide fractions II and III, respectively. As analyzed by RP-HPLC and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), fraction II consisted mainly of two components with relative molecular weight between 800 and 1000, fraction III consisted mainly of three components with relative molecular weight between 800 and 2000. Both peptide fractions showed strong polarity and contained a polypeptide of which the relative molecular weight was 849.38.

Key words: enzymatic hydrolysate of bovine bones; separation; salty peptides; composition analysis

中图分类号: TS251.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)06-0029-04

饮食高钠盐是国际公认的高血压发病的主要危险因素之一, 钠盐作为重要的环境因素与高血压的发生发展密切相关^[1]。且饮食钠盐摄入量与血压高低呈正相关性, 长期摄入高盐会导致血压的升高^[2]。Kirsten 等^[3-4]的研究已表明, 高盐的摄入除影响血压外, 也对心、脑、肾等器官的损害产生作用。膳食限盐对高血压的防治有重要意义, 国外有学者集中于用其他金属盐代替钠盐的研究, 但钾盐、镁盐代替钠盐均产生金属苦味, 无法达到氯化钠较好的咸味口感^[5]。

避免口味上的不足, 开发新型咸味剂, 是国内外学者长期关注的难题。当发现肽的呈味功能的时候, 国外一些学者在肽的呈味上进行了一系列的研究^[6-8]。Tada

等^[9]在 1984 年发现了新的咸味肽 *L*-Orn-Tau, 其他学者也转向了咸味肽的研发。1990 年, Seki 等^[10]研究了咸味二肽 Orn- β -Ala 的理化性质, 同时发现一些碱性肽的盐如 Orn-Tau·HCl、Lys-Tau·HCl、Orn-Gly·HCl 和 Lys-Gly·HCl 等具有咸味和鲜味的双重效果。咸味肽的发现, 在高血压患者等需要低钠食品的特殊人群的食品开发上具有重要意义。

我国是一个畜禽养殖大国, 2010 年我国肉类总产量达到 7925 万吨, 畜禽骨产量大约能达到 2000 万吨, 但从目前的消费市场上来看, 我国仍有大量畜禽骨没有得到有效利用, 这不仅造成了资源的巨大的浪费, 而且还会因骨头富含的营养物质易于腐败而造成严重的环境

收稿日期: 2011-12-01

基金项目: 国家自然科学基金专项项目(31040064)

作者简介: 张顺亮(1985—), 男, 助理工程师, 硕士, 研究方向为畜产品加工与屠宰综合利用技术。

E-mail: feodour@yahoo.cn

* 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

污染^[11-12]。利用食品级生物酶试剂对蛋白质进行有限的水解可以获得咸味肽,本研究利用凝胶色谱对酶解产物进行分离,得到纯度较高的咸味肽组分,同时利用液相色谱和质谱,对其成分进行分析。若能将咸味肽添加于食品中,可达到减盐的目的,将更好地保障人体健康。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

牛棒骨 市购;复合动物蛋白酶(Protamex,食品级,酶活力 $8.9 \times 10^4 \text{U/g}$)、风味蛋白酶(Flavourzyme 500MG,食品级,酶活力 $4.2 \times 10^4 \text{U/g}$) 诺维信(中国)投资有限公司;透析袋(100D) 上海源叶生物科技有限公司;葡聚糖凝胶 G-15 和 G-50 美国 Pharmacia 公司;乙腈(色谱纯)、三氟乙酸 美国 Fisher 公司。

1.2 仪器与设备

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;1200 高效液相色谱仪、ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250mm \times 4.6mm, 5 μm) 美国安捷伦科技有限公司;Autoflex III 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪 美国布鲁克·道尔顿公司。

1.3 方 法

1.3.1 牛骨酶解物的制备

按照文献[13]中 1.6 节的操作方法进行酶解,酶解条件为:酶解温度 55°C ,酶解过程中 pH 值不作调整(防止引入盐离子干扰咸味的鉴定),骨水比 1:1(m/m)。依次采用复合动物蛋白酶和风味蛋白酶进行分步酶解,复合动物蛋白酶与牛骨粉质量比为 1.5%,风味蛋白酶与牛骨粉质量比为 1.0%,复合动物蛋白酶酶解 2h 后风味蛋白酶酶解 4h。

1.3.2 牛骨酶解液的透析除盐

将牛骨酶解液真空冷冻干燥,然后用少量水将其溶解,用超纯水透析 12h,每 4h 换水 1 次。

1.3.3 咸味肽的凝胶柱色谱分离纯化

牛骨酶解物用 Sephadex G-15 和 Sephadex G-50 进行分离,洗脱液为超纯水,灵敏度(以吸光度 A 表示)为 0.1, $\lambda = 220\text{nm}$ 。

Sephadex G-15 分离条件为:玻璃柱(1.6cm \times 40cm),上样量 2mL,上样液质量浓度 100mg/mL,流速 0.6mL/min。

Sephadex G-50 分离条件为:玻璃柱(2.6cm \times 70cm),上样量 5mL,上样液质量浓度 100mg/mL,流速 0.6mL/min。

1.3.4 咸味肽组分的反向高效液相色谱(reverse high performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析

将凝胶层析分离得到的咸味肽溶液经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,然后进样到液相色谱仪器中分析。分析条件:

进样体积 20 μL ;流速 0.6mL/min;洗脱液:A 液(超纯水)-B 液(乙腈);梯度洗脱:0~10min, 2%~10% B; 10~30min, 10%~100% B;柱温 30°C ;检测波长 220nm。

1.3.5 咸味肽组分的基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(matrix auxiliary laser analytical ionization-time-of-flight mass spectrometer, MALDI-TOFMS)分析

MALDI-TOFMS 操作条件:脉冲氮激光(337nm)离子解析电离源;离子加速电压 20kV;平均每次测定的激光脉冲次数为 500 次/s,质谱信号为多次累加扫描;质谱扫描范围: m/z 600~4000;采用正离子反射模式检测^[14-16]。

基质制备:根据所测多肽的相对分子质量大小选择 α -氨基-4-羟基肉桂酸(CHCA)作为基质,用 V (体积分数 0.1% 的三氟乙酸超纯水溶液): V (乙腈)为 1:1 的溶液将 CHCA 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:取 1 μL 样品点靶,自然风干后取 1 μL CHCA 基质溶液点靶,自然风干。质谱分析前仪器的质量数利用外标法使用标准蛋白混合物进行校正。

1.3.6 感官评定

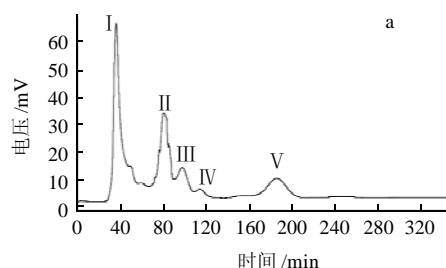
凝胶分离各峰组分的滋味描述:将多次收集得到的不同峰组分进行冻干,配制成 1mg/mL 的溶液,然后进行感官实验,描述不同峰组分是否有咸味。

咸味组分咸味程度的感官评价:取凝胶分离的具有咸味的组分 1.0g,分别配制质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5g/100mL 的溶液,然后再依次配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8g/100mL 的食盐溶液,将不同质量浓度的咸味肽溶液与不同质量浓度的食盐溶液进行对比,选出两者咸味程度最相近的组分。

2 结果与分析

2.1 凝胶柱 Sephadex G-15 和 G-50 分离牛骨酶解物中的咸味肽

由于上样量少且在洗脱过程中又得到稀释,为得到牛骨酶解液凝胶层析的洗脱峰,必须在一定的波长条件下测其吸光度,本研究最终选定 220nm 作为吸收峰测定波长。按照 1.3.3 节的分离方法将酶解后的冻干样品进行凝胶层析,得到的色谱图如图 1 所示。



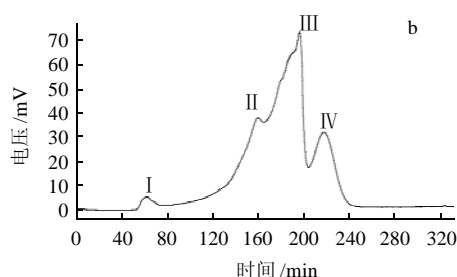


图1 凝胶柱Sephadex G-15 (a)和Sephadex G-50 (b)分离牛骨酶解物的色谱图

Fig.1 Chromatographic profiles of enzymatic hydrolysate of bovine bones on Sephadex G-15 (a) and G-50 (b) columns

由图1可知,牛骨酶解物经Sephadex G-15分离出峰较多且距离适中,得到5个组分,经Sephadex G-50分离出4个组分,可见1.3.3节凝胶分离条件对酶解物的分离效果较好。将分离得到的各峰组分收集,并进行脱盐,然后再冷冻干燥制成干品。

2.2 凝胶柱Sephadex G-15和G-50分离得到的牛骨酶解物组分的咸味判定

对凝胶柱Sephadex G-15和G-50分离的牛骨酶解物组分分别进行多次收集、脱盐和冻干,将其干品配成1mg/mL溶液进行咸味的感官评价。结果见表1。

表1 凝胶柱Sephadex G-15和G-50分离组分的滋味描述

Table 1 Taste descriptions of peptide fractions resulting from chromatographic separation on Sephadex G-15 and G-50 columns

组分编号	滋味描述	
	Sephadex G-15	Sephadex G-50
I	无咸味	无咸味
II	有咸味	无咸味
III	无咸味	有咸味
IV	无咸味	无咸味
V	无咸味	—

注:组分编号与图1中的峰序号相对应;“—”表示无此编号组分。

由表1可知,经过Sephadex G-15凝胶柱分离的组分中,组分II有咸味;经过Sephadex G-50凝胶柱分离的组分中,组分III有咸味,其他组分均无咸味。凝胶色谱是按照相对分子质量的大小来进行分离的,若牛骨酶解后的产物的相对分子质量大小相近,则利用凝胶分离得到的单个峰中可能不止有一种物质,因此,有咸味的G-15峰II和G-50峰III中的多肽就有可能不止1种。

2.3 凝胶分离得到的咸味组分的咸味程度的感官评价

按1.3.6.2节方法对凝胶柱Sephadex G-15和G-50分离得到的咸味肽组分的咸味程度进行感官评价,结果见表2。

由表2可知,在0.1~0.5g/100mL范围内,凝胶柱Sephadex G-15和G-50分离得到的咸味肽组分比同质量浓度的食盐咸味程度强。凝胶柱Sephadex G-15得到的咸味肽组分的咸味程度等于或大于Sephadex G-50得到的咸

味肽组分,这可能是因为Sephadex G-15分离得到了咸味更好的咸味肽或者G-15分离得到的咸味肽的比例较高。

表2 凝胶柱Sephadex G-15和G-50分离得到的咸味肽组分的感官评价

Table 2 Sensory evaluations of peptide fractions resulting from chromatographic separation on Sephadex G-15 and G-50 columns

咸味肽质量浓度 / (g/100mL)	与之对应的食用盐质量浓度 / (g/100mL)	
	Sephadex G-15	Sephadex G-50
0.1	0.2	0.1
0.2	0.3	0.3
0.3	0.5	0.4
0.4	0.5	0.4
0.5	0.6	0.5

2.4 凝胶分离得到的咸味肽组分的RP-HPLC分析

将凝胶柱Sephadex G-15和G-50层析分离得到的咸味肽配制合适浓度的溶液,经0.45 μm的滤膜过滤,然后进样到液相色谱仪器中分析,结果如图2所示。

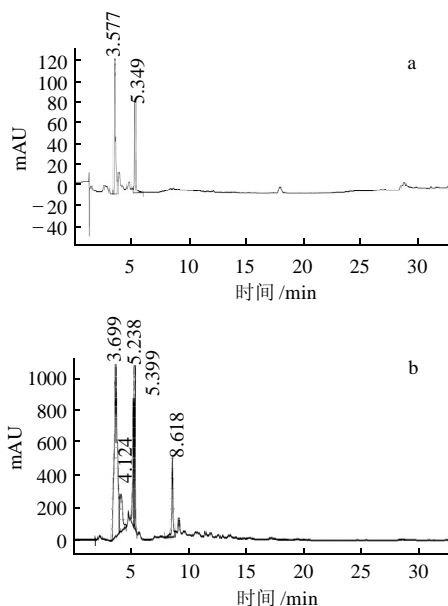


图2 凝胶柱Sephadex G-15(a)和G-50(b)分离得到的咸味组分的RP-HPLC图

Fig.2 RP-HPLC profiles of salty peptide fractions resulting from chromatographic separation on Sephadex G-15 (a) and G-50 (b) columns

由图2a可知,经凝胶柱Sephadex G-15分离的牛骨酶解产物组分II在保留时间10min内,梯度洗脱得到了两个在波长220nm处有明显吸收的峰,保留时间为3.577min和5.349min,此时流动相乙腈的体积分数约为5%和8%,说明实验得到的咸味肽的极性较强;从图2b可以看出,经G-50凝胶分离的牛骨酶解产物组分III在保留时间10min内有明显吸收的4个峰,保留时间分别为3.699、5.239、5.359、8.618min,这几个时间点的乙腈比例也较低,因此经G-50分离得到的咸味肽也具有较好的极性。

通过两者的液相色谱图对比可以看出, 凝胶柱 Sephadex G-15 的 3.577min 的峰与 G-50 的 3.699min 的峰保留时间相近, G-15 的 5.349min 和 G-50 的 5.359min 的峰保留时间也相近, 可以推断, 经两种凝胶色谱分离得到的咸味肽中可能有两种相同的成分。

2.5 牛骨酶解物中咸味肽的质谱分析

采用 MALDI-TOFMS 测定凝胶柱 Sephadex G-15 和 G-50 分离得到的咸味组分, 两个组分的一级质谱结果见图 3。

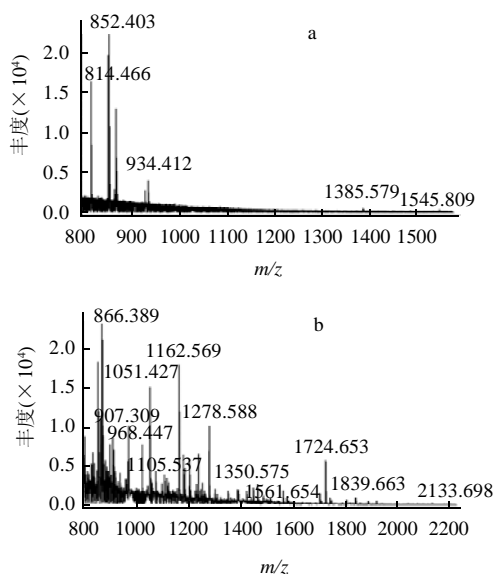


图3 凝胶柱 Sephadex G-15(a)和 G-50(b)分离得到的咸味肽的质谱图

Fig.3 MS spectra of salty peptide fractions resulting from chromatographic separation on Sephadex G-15 (a) and G-50 (b) columns

由图 3a 可知, 凝胶柱 Sephadex G-15 分离得到的主要咸味肽的组分是相对分子质量小于 1000 的短肽, 其中信号较强的母离子为 m/z 814.466、850.386、852.403、934.412; 由图 3b 可以看出, 凝胶柱 Sephadex G-50 分离得到的咸味肽组分的成分较多, 这与凝胶柱 Sephadex G-50 分离的相对分子质量范围有关, 当混合物的相对分子质量小于 2000 时, 凝胶柱 Sephadex G-50 的分离能力较弱。G-50 得到的咸味肽组分的相对分子质量主要分布在 800~2000 之间, 信号较强的母离子为 m/z 850.384、865.389、906.309、967.447、1050.427、1161.569、1235.525、1277.588、1723.653。

MALDI-TOFMS 产生的通常是单电荷的离子, 一般为 $[M+H]^+$ 峰, 结合实验所用的凝胶色谱分离的相对分子质量范围, 因此推测凝胶柱 Sephadex G-15 分离所得到的咸味肽的主要组分相对分子质量为 813.466、849.386、851.403、933.412, 凝胶柱 Sephadex G-50 分离所得到的咸味肽的主要组分相对分子质量为 849.384、865.389、906.309、967.447、1050.427、1161.569、1235.525、1277.588、1723.653。

凝胶柱 Sephadex G-15 分离得到的咸味肽组分的质谱图中与凝胶柱 Sephadex G-50 分离得到的咸味肽组分的质谱图中有相同的信号较强的母离子 m/z 850.38, 且液相色谱图中存在保留时间相近的峰, 因此可以推断相对分子质量 849.38 的峰可能为咸味肽组分, 但不排除其他相对分子质量的多肽有咸味的可能。

3 结 论

3.1 采用凝胶柱 Sephadex G-15 和 G-50 凝胶色谱分离分别得到了两种咸味肽组分——凝胶柱 Sephadex G-15 的组分 II 和 G-50 的组分 III, 经过感官鉴评, 在 0.1~0.5g/100mL 范围内, 两种咸味肽组分比同质量浓度的食盐咸味程度强。

3.2 经 RP-HPLC 分析, 两种咸味肽组分在保留时间 10min 内均有明显吸收的峰, 其极性较强。

3.3 凝胶柱 Sephadex G-15 分离得到的主要咸味肽的组分是相对分子质量小于 1000 的短肽, 凝胶柱 Sephadex G-50 得到的咸味肽组分的相对分子质量主要分布在 800~2000 之间。凝胶柱 Sephadex G-15 和 G-50 分离得到的咸味肽组分中, 均有相对分子质量为 849.38 的多肽。

参考文献:

- [1] De WARDENER H E, MAC G G A. Sodium and blood pressure[J]. Curr Op in Cardiol, 2002, 17(4): 360-367.
- [2] 石蕊, 李玉明. 盐与高血压研究进展[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(3): 219-222.
- [3] KIRSTEN B, GLENN M C, PAMELA G C, et al. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease[J]. Engl J Med, 2010, 362(7): 590-599.
- [4] 张燕, 张新军, 张俊琦, 等. 老年高血压病糖代谢异常及合并心血管病危险分析[J]. 四川大学学报: 医学版, 2010, 41(2): 307-311.
- [5] FRANK R L, MICKELSEN O. Sodium—potassium chloride mixtures as table salt[J]. Amer J Clin Nutr, 1969, 22(4): 467-470.
- [6] SALLES C, SOMMERER N, SEPTIER C, et al. Goat cheese flavor: Sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides[J]. J Food Sci, 2006, 67(2): 835-841.
- [7] MASASHI O, TADAYOSHI K, MAKOTO E. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 600-604.
- [8] 崔春, 赵谋明, 曾晓房, 等. 酸法和酶法水解海蛰蛋白的呈味作用研究[J]. 中国调味品, 2007(10): 34-36; 43.
- [9] TADA M, SHINODA I, OKAI H. L-ornithyltaurine, a new salty peptide [J]. J Agric Food Chem, 1984, 32(5): 992-997.
- [10] SEKI T, KAWASAKI Y, TAMURA M, et al. Further study on the salty peptide ornithyl- β -alanine. Some effects of pH and additive ions on the saltiness[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38(1): 25-29.
- [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] 史智佳, 成晓瑜, 陈文华, 等. 牛骨蛋白酶解制备呈味肽工艺优化[J]. 肉类研究, 2010, 24(2): 37-41.
- [14] 袁湘林, 邹汉法, 张玉奎. 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱及其在高相对分子质量物质测定中的应用[J]. 分析化学, 1998, 26(2): 234-238.
- [15] HAO Chunyan, MARCH R E. A survey of recent research activity in quadrupole ion trap mass spectrometry[J]. Int J Mass Spectrom, 2001, 212(1/3): 337-357.
- [16] 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图谱[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(6): 34-37.