

# 动物源活性蛋白多肽的分离纯化方法研究进展

付文鹏<sup>1</sup>, 杨永寿<sup>2</sup>, 肖培云<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>大理大学药学与化学学院; <sup>2</sup>云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 大理 671000

**摘要:**动物类中药的有效成分以蛋白多肽为主,因此活性蛋白多肽具有重要的医疗保健价值。文章分析了沉淀法、色谱法、膜分离法以及电泳法的基本原理和主要适用范围,综述了这些方法在动物源活性蛋白多肽的分离纯化中的应用,为动物源蛋白多肽的分离纯化与进一步研究提供参考,以期开发出高效、经济和环保的蛋白多肽分离纯化新技术。

**关键词:**蛋白质;多肽;分离;纯化;研究进展

中图分类号:R915

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0916-06

DOI:10. 16333/j. 1001-6880. 2019. 5. 027

## Research progress on isolation and purification methods of animal-derived active proteins and polypeptides

FU Wen-peng<sup>1</sup>, YANG Yong-shou<sup>2</sup>, XIAO Pei-yun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy and Chemistry, Dali University;

<sup>2</sup>Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali 671000, China

**Abstract:** The active ingredients of animal traditional Chinese medicines are mainly proteins and polypeptides, so active proteins and polypeptides have important medical and health value. In this paper, the basic principles and main application scopes of precipitation method, chromatography, membrane separation method and electrophoresis method are analyzed. The application of these methods in the separation and purification of animal-derived active proteins and polypeptides is reviewed. This provides a reference for the separation, purification and further research of animal-derived proteins and polypeptides, in order to develop a new technology for the separation and purification of proteins and polypeptides with high efficiency, economy and environmental protection.

**Key words:** proteins; polypeptides; separation; purification; research progress

蛋白质是生命活动的物质基础,在生物体内发挥着重要作用。多肽是一类具有蛋白质特性、分子量比蛋白质小、由2~16个氨基酸通过肽键连接的化合物<sup>[1]</sup>。它涉及生物体内各种细胞功能的调节,是蛋白质水解产物,人体摄入的蛋白质经酶水解后,主要以肽的形式被消化吸收。科研工作者研究发现,多肽具有抗凝血、抗肿瘤、抗菌、抗氧化、增强免疫力、降血压等作用<sup>[1]</sup>。蛋白多肽类药物在预防和治疗疾病中具有用药剂量小、疗效好、毒副作用低等突出优点<sup>[2]</sup>,因此具有较大的研究开发价值。目前研究比较热门的美洲大蠊、地龙、蜈蚣、鹿茸等动物

类中药的有效成分均以蛋白多肽为主。研究发现,美洲大蠊中环二肽类化合物是发挥创面愈合的重要成分之一<sup>[3]</sup>,我国重要的中药动物药地龙和鹿茸的主要有效成分都是蛋白质和多肽<sup>[4,5]</sup>,蜈蚣毒素有大量分子量在3~10 KDa的多肽分子<sup>[6]</sup>。而蛋白多肽的分离纯化是其研究与开发过程中的重要环节。蛋白多肽属于大分子物质,在分离纯化过程中既要保持其组成成分、结构性质和生物活性均不变,还要保证其安全性和高回收率,以达到经济环保的目的。因此,诸多因素限制了传统的植化分离方法在动物源蛋白多肽分离纯化中的应用,严重阻碍了对其的研究与开发。本文对近年来动物源活性蛋白多肽分离纯化方法的研究进展进行综述,以期为动物药的研究开发提供思路和参考。

收稿日期:2018-07-16 接受日期:2019-04-09

基金项目:国家自然科学基金(81360634, 81560634); 云南省科技厅应用基础研究重点项目(2015FA025)

\*通信作者 Tel:86-013887219065; E-mail:xpy990120@126.com

## 1 沉淀法

### 1.1 盐析沉淀

中性盐对蛋白多肽的溶解度有显著影响,一般随着盐浓度的升高,蛋白多肽的溶解度也会增加,当盐浓度继续升高时,其溶解度不同程度下降并先后析出的过程称为盐析。分子大小、亲水程度不同的蛋白多肽,盐析时所需的盐浓度不同,因此调节混合蛋白多肽溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白多肽分段沉淀,再通过透析除去盐,达到分离的目的。

蛋白多肽盐析常用的中性盐,主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠等。因为硫酸铵具有温度系数小而溶解度大以及不易引起蛋白质变性的优点<sup>[7]</sup>,其在蛋白多肽的盐析中应用最多。洗永权等<sup>[8]</sup>在黑蚂蚁纤溶活性蛋白的分离纯化中,用硫酸铵逐级盐析黑蚂蚁浸提液,确定其最佳硫酸铵盐析浓度为30%~90%。周爱梅等<sup>[9]</sup>用盐析-柱层析结合法分离纯化重组人源胶原蛋白,通过40%饱和度的硫酸铵沉淀与 Sephadex G100 凝胶柱纯化后获得二聚体,其达到了电泳纯。Mariam 等<sup>[10]</sup>用硫酸铵沉淀法纯化兔多克隆免疫球蛋白G(IgG),用40%饱和度的硫酸铵沉淀时,回收的多克隆 IgG 浓度最高(7.8mg/mL),除白蛋白效果最好(除去72%的白蛋白)。

### 1.2 等电点沉淀

等电点沉淀是利用蛋白多肽在等电点时溶解度最小,而各种蛋白多肽的等电点有差别,通过调节溶液的pH达到某一蛋白多肽的等电点使之沉淀的方法。梁姗姗等<sup>[11]</sup>采用等电点絮凝法对虾夷扇贝外套膜蛋白质进行分离回收,不仅分离的蛋白质纯度高,还有明显的脱脂及脱色效果。Geng 等<sup>[12]</sup>用聚乙二醇(PEG)沉淀法将鸡蛋清中的卵清蛋白(OVA)与卵粘蛋白、卵转铁蛋白和卵类粘蛋白分离,富含OVA的上清液再用等电点沉淀(pI为4.5和温度为4℃)进一步纯化,HPLC检测OVA的纯度为95.1%,产率为46.4%。

### 1.3 低温有机溶剂沉淀

低温有机溶剂沉淀是通过加入与水可混溶的甲醇、乙醇或丙酮等中性有机溶剂,降低电解质的介电常数和破坏了蛋白多肽的胶体性,使多数蛋白多肽的溶解度降低并析出的方法。用不同浓度的有机溶剂并结合调节pH和离子强度可以分段沉淀不同的蛋白质<sup>[13]</sup>。马建<sup>[14]</sup>采用有机溶剂沉淀法对还原型谷胱甘肽抽提液进行了初步分离提纯,确定了最佳工艺为:有机溶剂选用乙醇,乙醇与样品的体积比为5,pH的适宜范围为3.0~3.4,温度为5℃。

## 2 色谱法

### 2.1 反相高效液相色谱

反相色谱(Reversed phase chromatography, RPC)是用极性大于固定相的有机溶剂(如甲醇、异丙醇、乙腈等)水溶液为流动相,进行物质分离和分析的一种色谱方法。用于分离蛋白多肽的反相色谱固定相使用最广是C<sub>8</sub>或C<sub>4</sub>配基的填料;应用最广的流动相是水-甲醇、水-乙腈和水-异丙醇。为使样品组分有较好的溶解性,通常流动相pH在2~4之间,并且低pH抑制了样品组分中酸性基团及硅胶上硅羟基的解离及非特异性吸附作用<sup>[15]</sup>。此外,有研究发现,向流动相中添加10%~16%三氟乙醇(TFE)能显着改善肽的色谱分离<sup>[16]</sup>。Ghassem等<sup>[17]</sup>应用反相高效液相色谱将鲤鱼肌原纤维蛋白具有ACE抑制活性最高的组分F2分成五个组分(A~E),并结合ESI-TOF MS / MS 进行氨基酸序列分析,得知这些肽具有高ACE抑制活性的原因是在C-末端序列处存在两个脯氨酸残基。Basseri等<sup>[18]</sup>用高效液相色谱从美洲大蠊免疫诱导的血淋巴中分离到分子量62 KDa的抗菌肽。Ennaas等<sup>[19]</sup>用反相高效液相色谱从大鲭鱼的副产物protamex水解产物中分离得到四种抗菌肽。

### 2.2 凝胶排阻色谱

凝胶排阻色谱(gel exclusion chromatography)又叫凝胶色谱、分子筛色谱、凝胶过滤等,其分离机理是根据溶质分子大小进行过筛,溶液中所有组分按分子尺寸由大到小的顺序流出,达到分离的目的。它既适用于分子量较低的多肽、聚核苷酸等生物分子的分离,也适用于蛋白质、多糖等大分子物质的纯化。凝胶色谱主要有 Sephadex G 系列、Superose 系列、硅胶系列、Bio-Gel Px 系列等。Wang 等<sup>[20]</sup>将鲨鱼皮水解产物通过 SP-Sephadex C-25 柱,Sephadex G-50 柱和 C<sub>18</sub>反相高效液相色谱分离,得到一个分子量为906Da的亲水性三肽,氨基酸序列是GAIG-PAGPLGP。宋雪梅<sup>[21]</sup>通过 Sephadex G-25 凝胶色谱对牛乳硬质干酪中的苦味肽进行分离,得到3个组分,经鉴定组分Ⅱ中存在14种苦味肽。Jiang 等<sup>[22]</sup>通过 Sephadex G-50 凝胶色谱,用75%乙醇洗脱,从乳清蛋白的胰蛋白酶水解物中分离出分子量范围为1.9 KDa~3.1 KDa 降胆固醇肽。

### 2.3 离子交换色谱

离子交换色谱(ion exchange chromatography, IEC)是利用离子交换树脂对各种离子的亲和力不同,从而使能离子化的化合物得到分离的方法。目前在蛋白质或多肽的分离纯化中,离子交换色谱是

应用最广泛的方法之一,占 75%<sup>[15]</sup>。离子交换色谱主要分为阳离子交换柱和阴离子交换柱两大类型,根据蛋白或多肽所带电荷的差异并尽量保持其活性选择柱型。影响离子交换的因素有 pH 值、温度、洗脱剂、离子强度等。在离子交换色谱纯化多肽的试验中,柱填料的选择对于分离效果影响很大,查恩辉<sup>[23]</sup>比较了不同柱填料对梅花鹿茸多肽的分离效果,其中 CM-Sepharose Fast Flow 离子交换柱与 Q-Sepharose Fast Flow 离子交换柱,分离速度较快,柱料再生较为简单,只需用 3 个柱床体积的高浓度盐溶液冲洗即可。Geng 等<sup>[24]</sup>用聚乙二醇沉淀鸡蛋清,将其分成四个组分(A~D),除卵霉素(沉淀物 A)外,其他三个组分都通过 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析进一步纯化。分别从沉淀物 B、沉淀物 C 和上清液 D 中纯化得到溶菌酶、卵转铁蛋白、卵清蛋白和卵黄蛋白,HPLC 测定纯度分别为 91.84%、94.55%、96.45% 和 88.16%。Wang 等<sup>[25]</sup>通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱纯化兔和豚鼠血清中的免疫球蛋白 G,用 Tris-HCl 缓冲液作为洗脱剂,考察了 pH7.0 和 pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液对免疫球蛋白 G 回收率和纯度的影响,发现 pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液较好。

## 2.4 亲和色谱

亲和色谱(affinity chromatography)是利用生物分子间专一的亲和力进行分离的一种色谱技术。蛋白多肽等生物大分子能和某些相对应的分子专一而可逆地结合,可以用于对生物分子的分离纯化。由于亲和力具有高度的专一性,使得亲和色谱分辨率很高,是分离生物大分子的一种理想色谱方法。按照特异亲和作用分为抗原-抗体、酶-底物、凝集素-多糖、寡核苷酸与其互补链等<sup>[26]</sup>,对多肽类物质分离目前主要应用其单抗或生物模拟配基与其亲和。Xin 等<sup>[27]</sup>用亲和色谱分离牛肺抑肽酶,通过 SDS-PAGE 电泳分析和凝胶过滤层析表明该蛋白为单一多肽,纯度分别约为 97% 和 100%。Lan 等<sup>[28]</sup>利用磁性亲和分离法快速纯化和表征蜥蜴鱼蛋白水解物中的血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽,并通过反相高效液相色谱进一步纯化,得到活性最高的 ACE 抑制肽,其氨基酸序列为 Gly-Met-Lys-Cys-Ala-Phe。

## 3 膜分离

膜分离技术(membrane separation technique)是借助一定孔径的高分子薄膜,通过在膜两侧施加一个推动力,将不同大小、性状和特性的物质分离的技术。根据驱动方式和分离原理,膜分离可分为微滤、超滤、反渗透、电渗析等。微滤能截留直径 0.2~2

$\mu\text{m}$  的颗粒,可除去淀粉、细菌、霉菌、乳化油等杂质;超滤截留直径 0.02~0.22  $\mu\text{m}$  的颗粒,相当于分子量 1000~ $5 \times 10^5 \text{ Da}$ ,可滤出蛋白质、脂肪、色素等物质;反渗透膜孔径小至纳米级,在一定压力下,水分子可以通过反渗透膜,而水中的无机盐、重金属离子、有机物、胶体、细菌、病毒等无法通过反渗透膜;电渗析主要用于水溶液中除去电解质、电解质与非电解质的分离和膜电解等<sup>[7]</sup>。

李水清等<sup>[29]</sup>在鳖甲多肽的膜分离工艺的研究中,先采用 0.3  $\mu\text{m}$  微滤膜预处理鳖甲多肽提取液,再依次通过截留相对分子质量 20 KDa 和 8 KDa 的超滤膜,经过多级超滤,鳖甲多肽的分离效果较为理想。Lin 等<sup>[30]</sup>采用截留相对分子质量为 5 KDa 和 1 KDa 的超滤膜对蛤蜊肌肉水解产物进行分离,得到两种氨基酸序列为 Val-Lys-Pro 和 Val-Lys-Lys 的降胆固醇肽。Zhang 等<sup>[31]</sup>用截留相对分子质量为 10 KDa、5 KDa 和 3 KDa 的超滤膜对大黄鱼蛋白水解产物进行分级处理,获得抗氧化活性最高的组分后再用其他分离手段进一步纯化,得到两种抗氧化肽,其氨基酸序列为 Ser-Arg-Cys-His-Val 和 Pro-Glu-His-Trp。

## 4 电泳法

电泳(phoresis)是带电颗粒在电场作用下,向着与其电性相反的电极移动的现象。1809 年俄国的物理学家 Pence 首先发现了电泳现象,直到 1937 年瑞典科学家 Tiselius 设计出世界上第一台自由电泳仪,才作为一种分析方法不断发展和应用。根据电泳的分离特点,电泳法分为自由界面电泳、区带电泳、高效毛细管电泳。其中,区带电泳是目前应用最广泛的电泳技术。在蛋白多肽的分析研究中,应用最广泛的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)就是属于区带电泳。用 SDS-PAGE 既能测定蛋白多肽的分子质量,又可以用于蛋白多肽混合组分的分离和亚组分的分析。

目前,电泳法主要应用在测定蛋白多肽的分子质量。苏翔等<sup>[32]</sup>用 SDS-PAGE 对蚂蚁抗菌肽进行相对分子质量测定,SDS-PAGE 电泳结果为单一一条带,其分子质量为 3.746 KDa。Cheema 等<sup>[33]</sup>用琼脂糖凝胶亲和层析从杂交公牛的精浆中纯化得到肝素结合蛋白,通过 SDS-PAGE 分析鉴定出 14 个条带,分子量范围为 14~150 KDa。但是 SDS-PAGE 对于小分子量尤其是 10 KDa 以下的蛋白质分辨率较低,在分离胶中添加甘油或尿素的 Tricine-SDS-PAGE 能检测小分子多肽的分子量,该方法能够消除由于多肽分子与标准蛋白质空间构象的不同带来的误

差<sup>[34]</sup>。高世杰等<sup>[35]</sup>用 SDS-PAGE 对全蝎蛋白进行分离,所得的结果不理想,仅可获得 7 条谱带,且条带分辨率低。采用 Tricine-SDS-PAGE,利用三层不连续凝胶系统,可以得到 11 条分辨率较高的电泳谱带,而利用两层不连续系统时则分离效果稍差,只能

得到 9 条较清晰谱带,因此对于小分子量蛋白的分离应尽量使用三层胶系统。SDS-PAGE 测定许多高分子量蛋白质(MW > 100 KDa)时分辨率差,故测定高分子量蛋白质应采用能提高分辨率的脉冲 SDS-PAGE 电泳<sup>[36]</sup>。

表 1 动物源活性蛋白多肽分离纯化方法总结

Table 1 Summary of the isolation and purification methods for animal-derived active proteins and polypeptides

分离纯化方法 Isolation and purification methods	特点 Feature	主要适用范围 Main scope of application
盐析沉淀 Salting out precipitation	成本低,操作简单,不易使蛋白多肽变性,但需要除盐	初级分离,调节中性盐浓度可使各种蛋白多肽分段沉淀
等电点沉淀 Isoelectric precipitation	对疏水性较强的蛋白分离效果较好,对亲水性较强的蛋白效果较差 <sup>[37]</sup>	初级分离,常与盐析法及低温有机溶剂沉淀联合使用 <sup>[7]</sup>
低温有机溶剂沉淀 Low temperature organic solvent precipitation	分辨率比盐析高,且不需脱盐,有机溶剂易除去,需在低温下进行 <sup>[7]</sup>	初级分离
反相高效液相色谱法 RP-HPLC	分辨率高,速度快,重复性好,适用面广,灵敏度高	高效分离,主要用于分子量小于 5 KDa,尤其是 1 KDa 以下非极性多肽的分离纯化 <sup>[38]</sup>
凝胶排阻色谱法 Gel exclusion chromatography	实验操作简单,分离条件温和,溶质收率高,分离过程中蛋白多肽不易变性,能根据样品分子体积大小选择填料	高效分离,通常应用在纯化工艺的后面几步
离子交换色谱法 Ion exchange chromatography	分辨率高,交换容量高,色谱可选择的条件多,蛋白多肽的回收率高	高效分离,应用广泛,只要样品在溶液中能形成离子就能使用
亲和色谱法 Affinity chromatography	分辨率高,分离速度快,但寻找特异性配体较困难	高效分离,多用于从大量的复杂溶液中分离少量的特定蛋白多肽
膜分离技术 membrane separation technique	效率高,选择性好,处理过程中样品不易失活且回收率高	初级分离,主要用于不同分子量蛋白多肽的划段
电泳法 Phoresis	高分辨率,高灵敏度,分析速度快,样品用量少	主要用于蛋白多肽分子量测定以及蛋白多肽混合组分的分离和亚组分的分析

## 5 多方法联用

由表 1 可看出不同方法各有优缺点和所适用的范围,对于动物蛋白多肽的分离纯化,要根据样品的性质来选择合适的方法,而且只用一种方法是很难实现的,大多数都要采用两种或两种以上方法联用。王心龙等<sup>[3]</sup>采用 MCI gel CHP 20P 柱、Sephadex LH-20 凝胶柱、制备型 HPLC 和半制备型 HPLC 等色谱手段,从美洲大蠊中分离出 14 个环二肽类化合物。Nimalaratne 等<sup>[39]</sup>采用超滤、阳离子交换色谱和反相高效液相色谱从蛋清水解产物中分离纯化到 16 种抗氧化肽,并用 LC-MS/MS 测定其氨基酸序列。胡春玲等<sup>[40]</sup>通过超滤、葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 及高效液相色谱法对鳖甲水解产物进行分离,得到一个纯化的寡肽(CTEPH-1: Asn-Pro-Asn-Pro-Thr)。Matsumoto 等<sup>[41]</sup>对牡蛎消化性水解产物 A-3 中血管紧张素转换酶抑制肽的分离纯化时,先用 SP-Sephadex C-25 和 Toyopearl HW-40 凝胶色谱分离,然后再通过三步高效液相色谱法,分离出血管紧张素转换酶抑制肽。Huang 等<sup>[42]</sup>通过 DEAE 阴离子交换色谱, Sephadex G-25 凝胶过滤和反相高效液相色谱从

乳清蛋白水解物中分离钙结合肽,在色谱/电喷雾电离(LC/ESI)串联质谱上鉴定出该纯化肽的分子量为 20 402 Da。

## 6 总结与展望

动物源蛋白多肽类物质,分子量较大,极性较强且容易变解,采用传统的植化分离方法很难得到目标物质,故需结合物质组分的特殊性质来选择合适的分离手段。对于动物蛋白多肽的分离纯化,目前为止没有一种万能的方法,只能根据物质的性质和具体的实验条件来选择适合的分离方法。沉淀分级和膜分离主要用于动物蛋白多肽的初级分离,但是蛋白多肽沉淀分级的条件较难控制;而膜分离技术在分离过程中无相变或化学变化,并且具有高选择性、低能耗、适应性强、操作条件要求不高、环保等优点,对性质相似组分可以达到很好的分离效果<sup>[43,44]</sup>。色谱法是蛋白多肽分离纯化中的高效分离方法,也是目前动物蛋白多肽分离纯化的主要技术手段,但是不同动物蛋白多肽分离时所需的条件又各不相同,寻找分离条件耗时长,导致效率低;高效液相色谱法具有分离度高、分离能力强及分离速

度快等优点,因此在分离动物蛋白多肽时得到广泛应用。电泳主要作为一种分析方法用于测定蛋白多肽的分子质量,而作为制备电泳来分离蛋白多肽混合组分还应用较少。因此,对于大多数动物源活性蛋白多肽的分离纯化,高效、经济、适应性强的多方法联用将会得到更加广泛的应用和发展。

随着科学技术的发展以及国家对中医药发展的重视,动物源活性蛋白多肽的医疗保健价值将会不断被发掘。对于动物源活性蛋白多肽的分离纯化方法也会趋向于更加安全、高效、经济、环保的方向发展。

## 参考文献

- 1 Mei SJ, et al. Advances in research on the function and structure of peptides [J]. Chin Food Saf Mag(食品安全导刊), 2016, 24:143-146.
- 2 Wang J, et al. Research advances on protein and polypeptide drug liposomes [J]. Tech & Devel Chem Ind(化工技术与开发), 2017, 46(8):32-36.
- 3 Wang XL, et al. Water soluble sompounds from Periplaneta americana and their angiogenesis activity [J]. Natl Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:2004-2009.
- 4 Du H, et al. The chemical composition and pharmacological action of Earthworms [J]. Jilin J Chin Med(吉林中医药), 2014, 34:707-709.
- 5 Zong Y, et al. Study on peptide composition and its pharmacological action of Velvet antler [J]. Jilin J Chin Med(吉林中医药), 2013, 33:1135-1137.
- 6 Liu Y, et al. Biochemical and pharmacological study of the venom from the centipede Scorpisandra subspinipes mutilans koch [J]. J Hunan Inst Sci Tec: Nat Sci(湖南理工学院学报:自然科学版), 2013, 26(2):53-56.
- 7 Zhang JS, et al. Protein separation and purification technology (蛋白质分离与纯化技术) [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2009.
- 8 Xian YQ, et al. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic protein from Black ants [J]. Genom Appl Biol(基因组学与应用生物学), 2015, 34:284-289.
- 9 Zhou AM, et al. Purification and characterization of recombinant human-source collagen [J]. Food Fermen Ind(食品与发酵工业), 2015, 41(3):46-52.
- 10 Mariam SHS, et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography [J]. Sep Puri Tech, 2015, 144: 133-138.
- 11 Liang SS, et al. Isolation and functional properties of proteins from Patinopecten yessoensis mantle [J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(7):12-13.
- 12 Geng F, et al. Large-scale purification of ovalbumin using polyethylene glycol precipitation and isoelectric precipitation [J]. Poult Sci, 2019, 98:1545-1550.
- 13 Xu Q. Isolation and purification of proteins in bioengineering [J]. Shenyang Pharm(沈阳医药), 1994, 4:24-27.
- 14 Ma J, et al. Preliminary purification of GSH fermentation broth by organicsolvent precipitation method [J]. Mod Chem Ind(现代化工), 2013, 33(9):52-55.
- 15 Guo LA, et al. Protein chromatography separation technology (蛋白质色谱分离技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011.
- 16 Hara T, et al. Trifluoroethanol-containing RP-HPLC mobile phases for the separation of transmembrane peptides human glycophorin-A, integrin alpha-1, and p24: analysis and prevention of potential side reactions due to formic acid [J]. J Pept Sci, 2015, 21(2):61-70.
- 17 Ghassem M, et al. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan(Channa striatus) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS [J]. Food Chem, 2011, 129:1770-1777.
- 18 Basseri HR, et al. Isolation and purification of an antibacterial protein from immune induced haemolymph of American cockroach, Periplaneta americana [J]. J Arthropod-Borne Dis, 2016, 10:519-527.
- 19 Ennaas N, et al. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel(Scomber scombrus) by-products. [J]. Biochem & Biophys Res Commun, 2015, 462: 195-200.
- 20 Wang S, et al. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen [J]. LWT-Food Sci Tech, 2014, 55:210-217.
- 21 Song SM, et al. Separation and characterization of biaer peptides from hard cheese made from yak milk [J]. Food Sci(食品科学), 2016, 37:160-164.
- 22 Jiang C, et al. Separation and purification of hypocholesterolaemic peptides from whey protein and their stability under simulated gastrointestinal digestion [J]. Intl J Dry Tech, 2018, 71:460-468.
- 23 Zha EH. Preparation of the recombinant sika velvet antler polypeptide and study on its bioactivity [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University(沈阳农业大学), 2012.
- 24 Geng F, et al. Co-purification of chicken egg white proteins using polyethylene glycol precipitation and anion-exchange chromatography [J]. Sep Puri Tech, 2012, 96(33):75-80.
- 25 Wang Y, et al. Purification of IgG from sera of rabbit and guinea pig by flow-through mode ion-exchange chromatography using DEAE sepharose fast flow column [J]. Chromatographia, 2011, 74:209-214.
- 26 Sistiabudi R, et al. Patterning of polypeptides on a collagen-terminated tissue surface [J]. J Phys Chem C, 2007, 111: 11676-11681.

- 27 Xin Y, et al. Affinity purification of aprotinin from *Bovine lung* [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38: 1441-1448.
- 28 Lan X, et al. Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation [J]. *Food Chem*, 2015, 182: 136-142.
- 29 Li SQ, et al. Optimization of extraction and membrane separation technology for active polypeptides in *Trionyces carapax* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2014, 20(2): 11-14.
- 30 Lin Y, et al. Purification and identification of hypocholesterolemic peptides from freshwater clam hydrolysate with *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. *J Food Biochem*, 2017, 41: 12385.
- 31 Zhang N, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides of *Pseudosciaena crocea* Protein Hydrolysates [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 57.
- 32 Su X, et al. Isolation and activity of antimicrobial peptide from *Ants* [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2013, 34(9): 70-73.
- 33 Cheema RS, et al. Purification and characterization of heparin binding proteins from seminal plasma of cross-bred cattle bulls by affinity chromatography, SDS-PAGE and mass spectrometry [J]. *J Proteomics Enzymol*. 2016, 5: 1.
- 34 Sun B, et al. Study on Tricine-SDS-PAGE method detecting albumen polypeptides molecular weight [J]. *Food Sci*, 2008, 5: 385-388.
- 35 Gao SJ, et al. Separation of soluble protein from *Buthus matensii karsch* by TRICINE-SDS-PAGE Electrophoresis [J]. *Shandong J Tradit Chin Med(山东中医杂志)*, 2013, 32: 196-197.
- 36 Masamichi OI, et al. Separation techniques for high-molecu-
- lar-mass proteins [J]. *J Chrom B*, 2002, 771(1): 49-67.
- 37 Wang L. Recovery proteins from *Surimi* wash by fractional isoelectric precipitation and flocculation [D]. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), 2015.
- 38 Kong FF. Preparation of active peptides in *Trionyces carapax* and its pharmacodynamics study on anti-hepatic fibrosis [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine(湖北中医药大学), 2014.
- 39 Nimalaratne C, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white [J]. *Food Chem*, 2015, 188: 467-472.
- 40 Hu CL, et al. Purification, characterization, *in vitro* anti-hepatic fibrosis activity of bioactive peptides derived from Carapax *Trionyces* hydrolysates [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2017, 26: 605-610.
- 41 Matsumoto K, et al. Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide in peptic hydrolysate of *Oyster* [J]. *J Jpn Soc Food Sci & Tech*, 2011, 41: 589-594.
- 42 Huang SL, et al. Purification and characterisation of a glutamic acid-containing peptide with calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate [J]. *J Dry Res*, 2015, 82(1): 29-35.
- 43 Chen Y. Application of membrane separation technology in extraction and separation of traditional Chinese medicine [J]. *Chem Engin & Equip(化学工程与装备)*, 2013, 2: 126-128.
- 44 Wang H, et al. The development of membrane separation technology and its application prospect [J]. *Appl Chem Ind(应用化工)*, 2013, 42: 532-534.

(上接第 915 页)

- 37 Talukdar M, et al. Structure elucidation and biological activity of antibacterial compound from *Micromonospora auratinigra*, a soil Actinomycetes [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121: 973-987.
- 38 Dashti Y, et al. Actinomycete metabolome induction/suppression with N-acetylglucosamine [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80: 828-836.
- 39 Sarmiento-Vizcaino A, et al. Paulomycin G, a new natural product with cytotoxic activity against tumor Cell lines produced by deep-sea sediment derived *Micromonospora matsuamotoense* M-412 from the aviles canyon in the cantabrian sea [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15: 2719.
- 40 Zhang W, et al. Pyrazolofluostatins A-C, pyrazole-fused Benzo[ $\alpha$ ] fluorenes from south china sea-derived *Micromonospora rosaria* SCSIO N160 [J]. *Org Lett*, 2017, 19: 592-595.
- 41 Li ZK, et al. Review on activity of terpenoids from mushroom [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2017, 29: 357-369.
- 42 Zhang Y, et al. Micromonohalimanes A and B: Antibacterial halimane-type diterpenoids from a marine *Micromonospora* Species [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 2968-2972.
- 43 Gao M, et al. A new naphthalene-propanoic acid analog from the marine-derived actinomycetes *Micromonospora* sp. HS-HM-036 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19: 930-934.
- 44 Iniyan AM, et al. Anti-MRSA potential of phenolic compound isolated from a marine derived actinomycete *Micromonospora* sp. ICN36 [J]. *Indian J Geo-Mar Sci*, 2016, 45: 1279-1287.
- 45 Montes Vidal D, et al. Long-chain alkyl cyanides: unprecedented volatile compounds released by *Pseudomonas* and *Micromonospora* bacteria [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2017, 56: 4342-4346.
- 46 Igarashi Y, et al. Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74: 670-674.