

超滤在大豆多肽分离纯化中应用

邓成萍¹, 薛文通¹, 孙晓琳², 全明海¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 保定味群食品工业有限公司, 河北 保定 071000)

摘要: 本试验应用超滤技术对大豆多肽进行分离, 研究了超滤系统几个主要参数对膜通量的影响。研究结果表明: 截留分子量 30000Da 的超滤膜应在压力 0.12MPa、温度 40℃、pH 值 7.0 下运行 40min 为一个周期, 膜通量为 19L/m²·h 左右; 截留分子量 10000Da 的超滤膜应在压力 0.10MPa、温度 < 45℃、自然 pH 值下运行 60min 为一个周期, 膜通量为 25L/m²·h 左右; 截留分子量 5000Da 的超滤膜应在压力 0.10MPa、温度 < 45℃、自然 pH 值下运行 80min 为一个周期, 膜通量为 22L/m²·h 左右; 经分离得到分子量 > 30000Da 的大豆多肽约占 13.21%, 分子量 10000~30000Da 的大豆多肽约占 4.05%, 分子量 5000~10000Da 的大豆多肽约占 6.41%, 分子量 < 5000Da 的大豆多肽约占 76.11%。

关键词: 大豆多肽; 超滤; 分离; 纯化

Application of Ultrafiltration on Separation and Purification of Soybean Peptides

DENG Cheng-ping¹, XUE Wen-tong¹, SUN Xiao-lin², QUAN Ming-hai¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Baoding Way Chain Food Industrial Co. Ltd., Baoding 071000, China)

Abstract: In this experiment, soybean peptides were separated by ultrafiltration. How those major ultrafiltration-system parameters affecting the membrane flux were studied. It has showed that the ultrafiltration membrane with 30000 MWCO

收稿日期: 2005-04-26

作者简介: 邓成萍(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

× 10⁴, 得率为 18.7%。

3.7 总体来说, 最终的壳聚糖产品脱乙酰度的大小受电解条件影响不大, 主要受脱乙酰方法的影响, 但电解时各因素对壳聚糖粘均分子质量的影响都较大, 尤其是电压影响显著, 各因素对最终产品的得率也都有影响。

4 讨论

在本实验条件下所制备的壳聚糖再溶解性不太好, 而测定脱乙酰度、特性粘度及粘均分子质量时都需要将壳聚糖溶解, 因此对这些指标的测定都有影响(但进行横向比较还是可以的)。初步分析认为, 再溶性不好的原因与黑曲霉菌丝体的预处理有关, 不过还需通过进一步的试验来解决。

参考文献:

[1] 代养勇. 真菌几丁质和壳聚糖研究进展[J]. 郑州工程学院学报, 2004,

25(3): 88-90.

- [2] Knorr D, Klein JK. Production and conversion of chitosan with cultures *Mucor rouxii* and *Phycomyces blakesleeanae*[J]. Biotechnol Lett, 1986, (8): 1-9.
- [3] Stephen A White, Peter R Farina, Inge Fulton. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*[J]. Appl Envir Microbiol, 1979, 38(2): 323-328.
- [4] Jozef Synowiecki, Nadia Ali, Abdul Quawi, et al. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan[J]. Food Chemistry, 1997, 60(4): 605-610.
- [5] 代养勇. 从黑曲霉中制备甲壳素和壳聚糖的研究[D]. 河南工业大学, 2005.
- [6] 曹健, 殷蔚申. 黑曲霉几丁质和壳聚糖的研究[J]. 微生物学报, 1995, 22(4): 200-203.
- [7] 贺淹才, 许庆清, 许嫣红, 等. 从黑曲霉提取甲壳素和壳聚糖[J]. 生物技术, 2000, 10(2): 20-23.
- [8] Krepets, Guennadi I, Mikhailine, et al. US Patent, 5053113, 1991.
- [9] 王伟, 簿淑琴, 秦汶. 不同脱乙酰度壳聚糖方程的订定[J]. 中国科学(B辑), 1990, (11): 1126-1131.
- [10] Pearson FG, Marchessault RH, Liang CY. Infrared spectra of crystalline polysaccharides V Chitin[J]. J Polym Sci, 1960, 43: 101-116.

(Molecular Weight Cutoff) should run 40min for a cycle at 0.12MPa, 40°C and pH7.0 and under this condition, the membrane flux would be about 19L/m²·h; when the ultrafiltration membrane with 10000 MWCO should run 60min for a cycle at 0.10MPa, <45°C and natural pH and under this condition, the membrane flux would be about 25L/m²·h; when the ultrafiltration membrane with 5000 MWCO should run 80min for a cycle, at 0.10MPa, <45°C and natural pH and under this condition, the membrane flux would be about 22L/m²·h. In the end, soybean peptides were separated according to its molecular weight: 13.21% with molecular weight >30000Da; 4.05% with molecular weight 10000~30000Da; 6.41% with molecular weight 5000~10000Da; and 76.11% with molecular weight <5000Da.

key words soybean peptides; ultrafiltration; separation; purification

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0192-04

大豆多肽是以豆粕或大豆分离蛋白为原料经蛋白酶水解、分离并精制而成的蛋白质水解产物,它由许多种小分子肽组成,产品中还含有少量游离氨基酸、糖类、无机盐等成分。大豆多肽的氨基酸与大豆蛋白完全一样,组成齐全,比例合理,必需氨基酸平衡且含量丰富,具有较高的营养价值,是一种比较理想的新型大豆深加工产品^[1]。

超滤是膜分离技术的一种,早在200年前,人类就已经发现膜分离现象,到了60年代才被应用到工业上来,其发展非常之迅速,已被广泛应用于化工、电子、轻工、食品、冶金、石油、国防等工业中^[2]。实践证明膜技术具有能耗低、设备小、操作管理方便和质量好等优点,可以预测在21世纪膜技术将代替传统的分离、浓缩和纯化工艺成为工业上的主要分离手段。近年来,超滤技术已经被应用于大豆多肽的分离纯化,大大提高了大豆多肽的品质。但是超滤膜在使用过程中的一个主要问题是由于浓差极化、膜孔堵塞及凝胶层出现等因素的影响,导致膜通量随运行时间的延长而降低,因此正确掌握和执行操作参数对超滤系统的长期、安全、稳定运行以及提高产物得率是极为重要的。

本文将应用超滤技术对大豆多肽进行分离,并研究超滤系统的操作压力、料液温度、料液pH值和操作时间对膜通量的影响,确定其最佳工艺参数。

1 材料与方 法

1.1 材 料

低温脱脂豆粕 黑龙江金海粮油提供(蛋白质含量≥48.78%); Alcalase 碱性蛋白酶 丹麦 Novo Nodisk 公司; 活力 2.4AU/g; Neutrase 中性蛋白酶 丹麦 Novo Nodisk 公司; 活力 0.5AU/g; 氢氧化钠、盐酸等 北京化学试剂公司。

1.2 仪 器

超滤装置 (超滤膜截留分子量分别为 30000Da、10000Da、5000Da; 型号分别为 CLS-K-I-A30000、CLS-K-I-A10000、CLS-K-I-A5000 北京中科膜技术有限公司。

恒温水浴锅、精密 pH 计、搅拌器、均质机、紫外可见分光光度计、分析天平等。

1.3 方 法

1.3.1 大豆多肽液的制备

将脱脂豆粕与去离子水以固液比 1:15 混合,调节 pH7.5,放入 50°C 水浴中浸泡 1h; 90°C 下加热预处理 15min 后,用 Alcalase 碱性蛋白酶与 Neutrase 中性蛋白酶双酶分步水解,酶解过程中不断用 0.5mol/L NaOH 维持酶解所需 pH 不变; 酶解完毕后将水解液加热至 90°C,保温 10min 进行灭酶处理; 过滤除去滤渣,将滤液在 10000r/min 下离心 10min,取上清液备用。

1.3.2 大豆多肽的分级膜分离研究

将上述制得的大豆多肽液过截留分子量为 30000Da 的超滤膜,将其透过液过截留分子量为 10000Da 的超滤膜,再将其透过液过截留分子量为 5000Da 的超滤膜,收集各个分子量段的大豆多肽液。超滤过程中考察不同操作压力(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18MPa),不同料液温度(20、25、30、35、40、45°C)不同料液 pH 值(pH4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0),不同操作时间对各种超滤膜膜通量的影响,确定最佳操作参数。

1.3.3 蛋白质浓度的测定 双缩脲法^[3]。

1.3.4 多肽浓度的测定

取水解液 10ml,加入 10% 的三氯乙酸溶液 10ml 与之混合反应,放置 30min,在 4000r/min 下离心 15min,用双缩脲法测定上清液中可溶性蛋白质浓度,即可计算出多肽的浓度。

2 结果与讨论

2.1 不同操作压力对三种超滤膜膜通量的影响

由图 1 可以看出,三种超滤膜膜通量与操作压力的关系均大致分为直线上升段、曲线上升段和平缓段三个阶段。在直线上升阶段,随着压力的增大,膜两侧压差增加,膜通量呈直线迅速上升,此时膜通量较小,

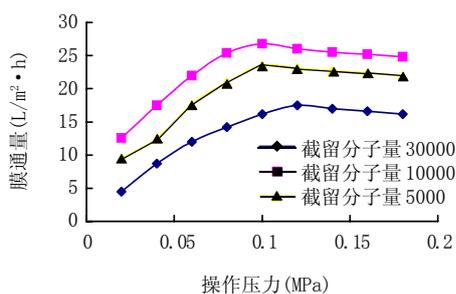


图1 不同操作压力对膜通量的影响

Fig.1 Effect of pressure on the membrane flux

超滤处于压力控制区,膜表面浓差极化现象可忽略,水解液通过膜孔的流动可看作毛细血管的层流,其流动可近似地看作与膜两侧压差成正比;在曲线上升阶段,随着压力的继续增大,膜的压密和浓差极化现象产生,超滤开始进入传质控制区,膜通量主要受界面浓度差的影响,而受压差影响变小,所以此时随操作压力的增大,膜通量虽继续增加,但增加幅度变小;在平缓阶段,膜表面开始形成凝胶层,随着带到膜面的大分子溶质的增加,凝胶层厚度增大,增加的压力差会很快被凝胶层的阻力抵消,此外,高压加速了某些组分在膜孔中的沉积,造成膜孔减小甚至堵塞,实际上相当于减小了膜的有效面积,所以此时膜通量随操作压力的上升而基本不变甚至呈下降趋势。

为了使超滤系统能在较高的通量下运行,提高膜分离效率,减少膜污染,在今后的操作中,截留分子量为30000Da的超滤膜的压力应设定在0.1~0.12MPa范围内,其中最佳操作压力为0.12MPa;截留分子量为10000Da和5000Da的超滤膜的压力应设定在0.08~0.10MPa范围内,其中最佳操作压力为0.10MPa。

2.2 不同料液温度对超滤膜膜通量的影响

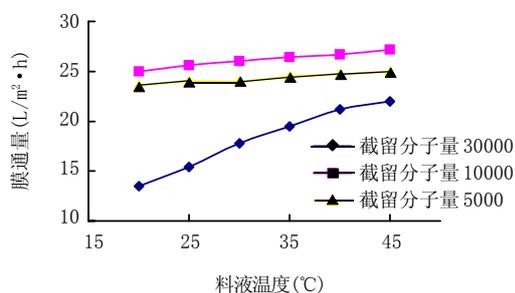


图2 不同料液温度对膜通量的影响

Fig.2 Effect of temperature on the membrane flux

根据超滤膜产品说明书显示,这三种膜能耐受的最高温度为45℃,因此选择20~45℃为考察范围。由图2表明,对于截留分子量为30000Da的超滤膜,由于原液中高分子蛋白质含量较多,其溶解性随温度升高而升高,因此膜通量也随着料液温度的升高而呈上升趋势,

且在超滤过程中,温度高的料液的通量始终大于低温料液,但温度过高不但会导致蛋白质变性,易形成凝胶层,且水解液中的一些热敏成分和风味成分会有所损失;也会导致超滤膜的老化,影响膜的寿命,还要消耗过多的能量。因此,为了加快超滤速度,结合料液与膜材料的特性和要求,截留分子量为30000Da的超滤膜的最佳料液温度应设定在40℃。然而对于截留分子量为10000Da和5000Da的超滤膜来说,随着料液温度的升高,膜通量呈上升趋势不明显,这是由于过这两种膜的原液是经过了上一级膜的透过液,其中的蛋白分子量已经较小,其溶解性很好,受温度影响不大,所以在过截留分子量为10000Da和5000Da的超滤膜时无需刻意调节料液温度,只要保证其温度不超过膜的最高耐受温度45℃即可。

2.3 不同料液 pH 值对三种超滤膜膜通量的影响

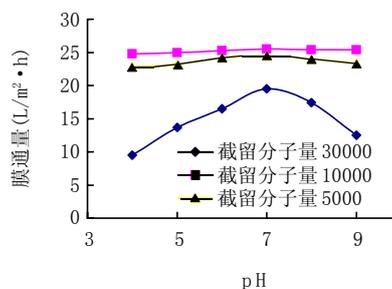


图3 不同料液 pH 值对膜通量的影响

Fig.3 Effect of pH on the membrane flux

如图3所示,对于截留分子量为30000Da的超滤膜,由于原液中高分子蛋白质含量较多,其溶解性受pH值影响较大,pH值在4~5之间时,水解液的膜通量较低,说明其等电点在此范围内,由于处于等电点时,蛋白质分子很容易被沉积在膜表面,使透过阻力增加,膜通量显著下降,反之当蛋白类溶质的溶解度与水的亲和力作用变强,被膜吸附在表面的量就会减少;当pH值调到偏离等电点时,膜通量升高;但当pH值过高,大于8.0时,通量又显著下降,可能是因为在较强的碱性介质中蛋白质发生变性,从而沉积在膜表面,降低了膜通量,因此过截留分子量为30000Da的超滤膜的料液pH值应控制在7.0左右较适宜。而对于截留分子量为10000Da和5000Da的超滤膜来说,膜通量随pH值变化而变化的趋势不明显,这同样是由于过这两种膜的原液是经过了上一级膜的透过液,其中的蛋白分子量已经较小,其溶解性很好,受pH值影响不大,所以在过截留分子量为10000Da和5000Da的超滤膜时无需刻意调节料液pH值。实际操作中,水解液的pH值为7.3左右,再考虑到最终产品的风味问题,在用这三种膜进行超滤处理时,均无需用酸碱来调节,直接采用水解液本身

的 pH 即可。

2.4 不同操作时间对三种超滤膜膜通量的影响

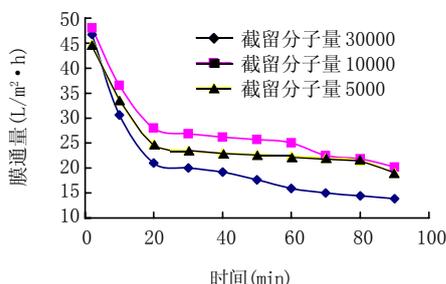
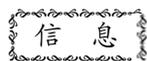


图4 不同操作时间周期对膜通量的影响
Fig.4 Effect of cycle on the membrane flux

如图4所示,对于这三种超滤膜来说,在超滤进行的前20min内膜通量随时间的延长呈快速下降趋势;20min以后,膜通量开始趋于稳定,曲线变化平缓;当系统运行一段时间后,由于膜表面的浓差极化现象加剧,膜面凝胶层增厚以及水解液中某些组分的沉积,导致膜通量开始下降。为防止低效率运行系统及减少后续清洗工作的麻烦,认为截留分子量为30000Da的超滤膜应该以40min为一个运行周期,截留分子量为10000Da的超滤膜应该以60min为一个运行周期,截留分子量为5000Da的超滤膜应该以80min为一个运行周期,停机进行膜组件的清洗和再生。

3 结论



ÅÄÛ;ÆÑ§¼ÒÆÆ/æ¶¼/øÈè
°Đİ,°ûµÄ»úÀí

美国西北大学的研究人员破解了一些病毒具有的一种叉状蛋白的结构,这些病毒正是通过这种结构进入细胞,继而诱发感染。这种蛋白被称为融合蛋白,即F蛋白,首先发现于副流感病毒5的外表面,在感染细胞前通过F蛋白可以将病毒的细胞膜与宿主细胞膜融合。随后,病毒细胞核内的遗传基因便可以进入宿主细胞,进行自身的复制增殖。研究人员通过X线结晶技术发现了F蛋白的三维结构,其疏水端的叉状结构紧密地粘附在细胞膜表面,并通过结构上的变化逐步进入细胞。在不发挥功能时,F蛋白的结构为蘑菇状,其叉状杆端折叠隐藏在蘑菇帽下。当病毒与靶细胞接触后,表面帽打开,叉状端进入靶细胞膜,随后F蛋白便可以将靶细胞膜和病毒细胞膜融合。

在人类发生的诸如腮腺炎、麻疹、艾滋病、非典型性肺炎等多种疾病中,这种融合蛋白均发挥了一定作用。这一发现可以帮助科研人员研制阻止病毒进入细胞的新药物。

本文研究了截留分子量分别为30000Da、10000Da、5000Da三种超滤膜的最佳操作参数。

截留分子量为30000Da的超滤膜的最佳操作参数为:操作压力0.12MPa、料液温度40℃、料液pH值7.0、操作时间周期40min;膜通量可达到19L/m²·h左右;

截留分子量为10000Da的超滤膜的最佳操作参数为:操作压力0.10MPa、料液温度<45℃、料液pH为自然值、操作时间周期60min;膜通量可达到25L/m²·h左右。

截留分子量为5000Da的超滤膜的最佳操作参数为:操作压力0.10MPa、料液温度<45℃、料液pH为自然值、操作时间周期80min;膜通量可达到22L/m²·h左右。

实际操作中,水解液的pH值为7.3左右,再考虑到最终产品的风味问题,在用这三种膜进行超滤处理时,均无需用酸碱来调节,直接采用水解液本身的pH即可。

在最佳操作条件下分离可得到分子量>30000Da的大豆多肽约占13.21%,分子量10000~30000Da的大豆多肽约占4.05%,分子量5000~10000Da的大豆多肽约占6.41%,分子量<5000Da的大豆多肽约占76.11%。

参考文献:

[1] 刘传富,董海洲,刘晓婷.大豆多肽及其在食品工业中应用[J].粮食与油脂,2002,(10):31-32.
[2] 梁世中.生物工程设备[M].北京:中国轻工业出版社,2002.227-230.
[3] Levin P, Brauer R W. The biuret reaction for the determination of proteins[J]. Biochem J, 1943, 37: 354-359.