

超滤法分离免疫牛初乳中的 IgG

范丽娟, 潘道东*

(南京师范大学金陵女子学院食品科学与营养系, 江苏 南京

210097)

摘 要: 本实验选用截留分子量为 100kD 的中孔纤维超滤膜从免疫牛初乳乳清中分离提取 IgG, 研究了操作压力和温度在超滤过程中对膜透过速率的影响, 确立了最适操作压力为 0.15MPa, 最适操作温度为 25℃; 并采用分段超滤法对免疫牛初乳乳清中的 IgG 进行分离, 从而使浓缩液中 IgG 纯度得到进一步提高。

关键词: 免疫牛初乳; IgG; 超滤分离

Seperation of IgG from Immune Bovine Colostrum by Ultrafiltration

FAN Li-juan, PAN Dao-dong*

(Department of Food Science and Nutrition, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing

210097, China)

Abstract: IgG was separated and extracted from immune bovine colostrums whey by hollow-fiber membrane ultrafiltration (100 kD, molecular, cut-off). The factors affecting separation such as pressure and temperature were studied. The results showed that optimum operating pressure and temperature were 0.15 MPa and 25 °C respectively, and the purity of IgG in concentrated liquid could be further improved by subsection ultrafiltration.

Key words immune bovine colostrums IgG ultrafiltration sepration

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0242-03

免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)作为免疫系统最为关键的组成物质之一, 自 1890 年发现后, 在医学领域中发挥了巨大的作用, 但其在食品工业中的应用研究还是近十几年的事情。由于免疫球蛋白具有特殊的免疫生理功能, 因此从富含免疫球蛋白的免疫牛初乳中, 分离出 Ig 并将其添加到功能食品中, 将对改善婴幼儿、中老年人及免疫力低下人群的健康具有重要意义。

超滤(ultrafiltration, UF)是在压差推动力作用下进行的筛孔分离过程^[1], 随着生物技术和工业化大规模生产的需要, 超滤已逐步应用于生物产物的分离。应用超滤对蛋白质样品进行浓缩与分离时, 最主要是根据样品分子量、分子形态及溶液的性质选择膜的类型、规格、截留分子量和透过速率。如果选择条件合适, 操作正确, 蛋白质的超滤回收率可达 90%, 稀蛋白质经超滤浓缩可使其浓度达到 50%^[2]。超滤是集蛋白质浓缩和分离为一身的纯化方法, 在大规模蛋白质纯化工艺中是许多纯化方法不可取代的技术。

本实验研究了操作压力和温度在操作过程中对膜透过速率的影响, 确定了最适工艺参数, 从而使免疫牛初乳乳清中的 IgG 达到浓缩分离的效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

免疫牛初乳: 采用主要针对婴幼儿胃肠道细菌性腹泻中常见的大肠杆菌、沙门氏菌属、志贺氏菌属为代表的 17 种致病菌株作为免疫原, 制成联合多效价疫苗, 对妊娠乳牛进行免疫, 产后收集前 3 d 的初乳, 离心脱脂, 于 -80℃ 冷藏备用; 标准牛 IgG Rockland 公司; 兔抗牛 IgG 抗血清 自制; 考马斯亮蓝试剂盒 南京建成生物工程研究所。

实验用膜分离装置 上海摩速科学仪器有限公司; PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; Eppendorf 5415R 台式冷冻高速离心机 北京六一仪器厂; JB-2 型恒温磁力搅拌器 上海雷磁新泾仪器有限公司; 722 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; LGJ1.5 冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; DYY-12 型电泳仪和电泳槽 北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 免疫牛初乳乳清的制备

将冷冻的脱脂免疫牛初乳室温解冻后, 保温于 38℃

收稿日期: 2007-06-12

*通讯作者

基金项目: 江苏省普通高校高新技术产业发展项目(JHB06-11); 江苏省科技厅“十一五”攻关项目(BE2006325)

作者简介: 范丽娟(1980-), 硕士研究生, 主要从事乳品科学研究。

水浴锅中,滴加0.1mol/L HCl调其pH至4.8。静置30min后,经7000r/min,4℃下离心15min,收集乳清。

1.2.2 超滤条件的选择

将免疫牛初乳乳清用截留分子量为100kD的平板膜超滤器进行超滤分离。在实验中,分别改变操作压力和温度,测定膜的透过速率。

1.2.3 免疫初乳乳清超滤浓缩

在上述实验确定的最适条件下,将2000ml免疫初乳乳清用截留分子量为100kD的滤膜进行超滤,当免疫初乳乳清浓缩到400ml时(此时的浓缩液称为A液),向料缸加入1000ml蒸馏水,混匀后再进行第二阶段超滤。当浓缩液再次至400ml时收集浓缩液B,并将其进行冷冻干燥制备免疫牛初乳IgG浓缩物。

1.2.4 IgG含量的测定

IgG含量的测定采用火箭免疫电泳法^[3]。用pH8.6 0.05mol/L巴比妥-巴比妥钠缓冲液配制1%的琼脂糖溶液,沸水煮沸溶解后保温于56℃水浴箱中。取适量兔抗牛IgG抗血清,用pH8.6 0.05mol/L巴比妥-巴比妥钠缓冲液稀释后,迅速与保温于56℃的琼脂糖溶液混匀,倒平板(平板厚度为2mm左右),水平静置。待冷却凝固后,打孔上样,每孔10μl样品液。以pH8.6 0.05mol/L巴比妥-巴比妥钠缓冲液为电极缓冲液,端电压为30V,泳动时间5h左右。电泳结束后,用0.25%考马斯亮蓝染色15min,后用洗脱液脱色两次,时间为10~20min。量取火箭峰高度,根据标准曲线计算样品中IgG的含量。

1.2.5 总蛋白含量的测定

采用考马斯亮蓝测试盒(附有蛋白标准品),根据试剂盒要求,用722可见分光光度计在595nm处检测。

1.2.6 乳糖含量测定

采用3,5-硝基水杨酸比色法^[4],以乳糖为标样。

1.2.7 水分测定

采用105℃常压烘箱干燥(恒重)法^[5]。

1.2.8 灰分测定

采用550℃马弗炉灰化法^[5]。

2 结果与分析

2.1 超滤过程中操作条件的优化选择

2.1.1 操作压力对膜透过速率的影响

在室温条件下,对免疫牛初乳乳清进行超滤,分别测定在0.05、0.10、0.15、0.20、0.25MPa五种不同压力下膜的透过速率。结果如图1所示。

由图1可以看出,在超滤过程中,当压力由0.05MPa至0.15MPa时透过速率随着压力的增大而增加,当压力大于0.15MPa时,透过速率不再随压力增大而增加。因

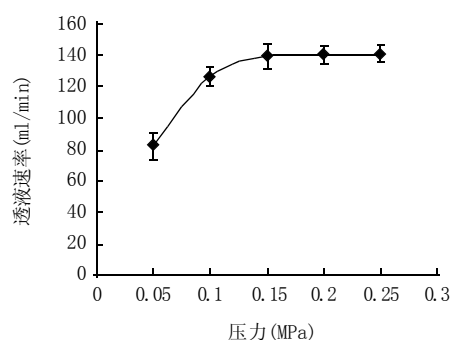


图1 不同压力下透过速率的变化

Fig.1 Variation of transmission rate under different pressures

为超滤是在静压差为推动力作用下进行的液相分离过程,在较低压力下膜透过速率会随压力上升而迅速增大,但在随后的压力增加中,浓差极化现象加剧,膜表面的蛋白质吸附层也被压密,透过速率的增长趋缓,当压力达到某一临界压力后,膜面凝胶层逐渐形成并增厚,透过速率不再增大。

2.1.2 操作温度对膜透过速率的影响

在操作压力为0.15MPa下,对免疫牛初乳乳清进行超滤,分别测定在5、15、25、35、45℃温度下膜的透过速率。结果如图2所示。

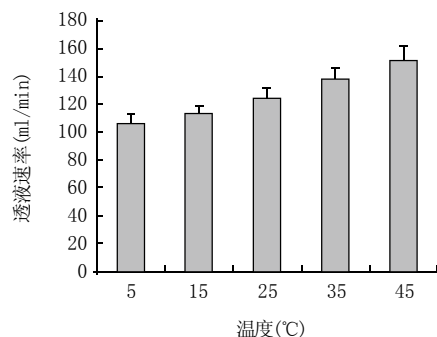


图2 不同温度下透过速率的变化

Fig.2 Variation of transmission rate under different temperatures

由图2可以看出,随着温度的升高,透过速率增加。原因在于随着温度的升高,料液的黏度降低,传质系数提高,有利于减轻浓差极化,提高透过速率。但温度的升高也带来免疫球蛋白变性程度的加剧,故选择了一个合适的温度,一方面透过速率较快,另一方面免疫球蛋白的活性又没有受到损失,所以选择25℃(室温)为最适温度。

2.2 免疫牛初乳乳清中IgG的分离

在室温、操作压力为0.15MPa条件下,对免疫牛初乳乳清进行超滤,浓缩液中总蛋白和IgG的含量如表1所示。

由表1可以看出,免疫牛初乳乳清经第一阶段(由初

表2 IgG 浓缩物的化学组成(%)
Table 2 Composition of IgG concentrates(%)

水分	IgG	总蛋白	乳糖	灰分	IgG/总蛋白
5.94±0.47	48.44±0.68	67.72±0.82	20.49±0.64	5.85±0.53	71.53±1.06

表1 浓缩液中 IgG 及总蛋白含量
Table 1 Contents of IgG and total protein in concentrated liquid

名称	IgG(mg/ml)	总蛋白(mg/ml)	IgG/总蛋白(%)
免疫牛初乳乳清	10.34±0.51	35.70±1.37	28.96±1.52
浓缩液 A	33.42±0.74	51.31±0.85	65.13±0.67
浓缩液 B	33.36±0.68	44.79±0.59	74.48±0.83

始免疫牛初乳乳清到浓缩液 A) 超滤后, 浓缩液中 IgG 和总蛋白含量明显增大, 但两者增加的比例不同, 这是由于一部分分子量低于 100kD 的乳清蛋白分子随超滤的进行通过超滤膜进入超滤液中。经第二阶段超滤后, 浓缩液中 IgG/ 总蛋白的比例得到进一步提高, 达到 70% 以上。但浓缩液 B 中的总蛋白含量与浓缩液 A 相比有所下降, 这是由于浓缩液 A 被稀释后, 其中未被滤除的低分子量的乳清蛋白得到进一步过滤, 使蛋白质减少了, 而浓缩液的最终体积未变(仍为 400ml)。浓缩液中 IgG 收率为 87.6%。

将浓缩液冷冻干燥后制成的免疫牛初乳 IgG 浓缩物的化学组成如表 2 所示。浓缩物中 IgG/ 总蛋白的比例达 71%, 浓缩物中 IgG 含量的大小及 IgG/ 总蛋白的比例一方面取决于原料乳清的组成, 另一方面取决于浓缩倍数, 原料乳清中 IgG 含量越高, 浓缩倍数越大, 则制成的冷冻干燥浓缩物中 IgG 含量及 IgG/ 总蛋白也就越高。

3 讨论与结论

采用超滤技术分离免疫牛初乳乳清中的 IgG 时, 最关键的问题是因为浓差极化和膜污染引起膜透过速率下降。浓差极化是指在超滤膜分离过程中, 随着膜的透过流速到达膜表面的溶质, 由于受到膜的截留而积累, 使得膜表面溶质浓度高于料液主体浓度。由于膜表面与料液浓度之差, 产生了从膜表面向料液主体的溶质扩散。浓差极化的形成会减少透过蛋白质的透过率。严重的浓差极化将会增加蛋白质之间的相互作用和蛋白质在膜表面的吸附甚至导致凝胶层的形成。有效控制浓差极化的形成是维持膜本身具有选择性的重要因素^[6-8]。膜阻塞是超滤中出现的一个主要问题, 随超滤的进行, 污染物积聚在膜的表面(甚至在膜内), 导致流量逐渐减小, 污染还降低了膜的使用寿命。据报道, 膜污染严

重时能使膜透过速率下降 80% 以上^[9]。因此, 超滤时要选择最佳参数, 减少浓差极化以及膜污染。本实验确定最适操作压力为 0.15MPa, 最适操作温度为 25℃。

在最适操作条件下对免疫牛初乳乳清 IgG 进行超滤分离时, 采用了分段超滤法。由于蛋白质是一种两性化合物, 有很强的表面活性, 极容易吸附在聚合物表面上, 当乳清浓缩到一定倍数后, 主体溶液浓度较高, 蛋白质的吸附增强, 浓差极化、凝胶极化加剧, 造成膜的膜透过速率降低。此外, 浓度高, 料液的黏度高, 溶质的相互作用增大, 溶质的反相扩散加强, 透过阻力增加, 造成膜透过速率下降。此时对浓缩液进行稀释, 就可以缓解浓差极化现象, 使膜透过速率增加, 从而使浓缩液中 IgG 纯度得到进一步提高。

本研究选用截留分子量为 100kD 的中孔纤维超滤膜从免疫牛初乳乳清中分离提取 IgG, 确立了最适操作压力为 0.15MPa, 最适操作温度为 25℃; 并采用分段超滤法对免疫牛初乳乳清中的 IgG 进行分离, 从而使浓缩液中 IgG 纯度得到进一步提高。总的来说, 超滤可以很好的分离浓缩免疫牛初乳乳清中的 IgG, 可以用来大规模化生产使用。

参考文献:

- [1] 汪锰, 王湛, 李正雄. 膜材料以其制备[J]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 175.
- [2] 张晓楠, 郭立安. 超滤在蛋白质纯化中的应用[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(2): 97-98.
- [3] 余骥. 临床免疫技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化试验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1985(3): 9-11.
- [5] 张意静. 食品分析技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 94-98: 109-103.
- [6] SLATER C S, HUGGINS T G J, BROOKS C A, et al. Purification of alkaline phosphatase by ultrafiltration in a stirred batch cell[J]. Separation Sci and Technol, 1986, 21: 575.
- [7] BALAKRISHNAN M, AGARWAL G P. Protein fractionation in a vortex flow filter I: Effect of system hydrodynamics and solution environment on single protein transmission[J]. J of Membrane Sci, 1996, 112: 47.
- [8] BALAKRISHNAN M, AGARWAL G P. Protein fractionation in a vortex flow filter II: Separation of simulated mixtures[J]. J of Membrane Sci, 1996, 112: 75.
- [9] 刘昌胜, 郭行彦, 潘德维, 等. 膜的污染及其清洗[J]. 膜科学与技术, 1996(2): 25-30.