

膜分离技术制备蛋清卵转铁蛋白的 工艺技术研究

张铁华^{1,2}, 殷涌光¹, 张 亭², 刘静波^{2,*}

(1. 吉林大学生物与农业工程学院, 吉林 长春 130001; 2. 吉林大学军需科技学院, 吉林 长春 130062)

摘 要: 利用微滤、超滤和纳滤技术, 并结合冷冻干燥处理从蛋清中分离制备卵转铁蛋白(OVT)。结果表明, 经 5 倍生理盐水稀释, 20℃和 40MPa 均质处理后的蛋清液黏度适宜, 微滤除杂质后, 通过 10kD 超滤膜除去大分子蛋白, 再经 5kD 超滤膜连续处理, 回收浓液经纳滤脱盐浓缩, 冷冻干燥即为卵转铁蛋白混合物。混合物经 SDS-PAGE 电泳分析, OVT 的相对分子质量为 80kD, OVT 纯度为 28.46%。

关键词: 蛋清; 膜分离技术; 卵转铁蛋白; 分离; 制备

Study on Membrane Separation Technology of Ovotransferrin from Egg White

ZHANG Tie-hua^{1,2}, YIN Yong-guang¹, ZHANG Ting², LIU Jing-bo^{2,*}

(1. College of Biology and Agriculture Engineering, Jilin University, Changchun 130001, China;

2. College of Quartermaster Technology, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: By microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration technology, and combining freeze-drying technology ovotransferrin (OVT) was extracted from egg white. Results showed that there is suitable liquid viscosity of egg white by 5 times normal sodium deliquation, 20℃ and 40 MPa homogen handling. After microfiltration removing impurity, the big member proteins are removed through 10kD ultrafiltration membrane, and then continuously through 5kD ultrafiltration membrane. Freeze-drying thick liquid obtained is OVT after nanofiltration desalination concentrate. The relative member quality of OVT is 80 kDa by SDS-PAGE, and OVT purity is 28.46%.

Key words egg white; membrane separation technology; ovotransferrin (OVT); separation; extraction

中图分类号: TS253

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0207-04

蛋清蛋白中主要含有卵黏蛋白、卵转铁蛋白、类卵黏蛋白、卵白蛋白、溶菌酶和卵球蛋白等蛋白质成分, 其中的卵转铁蛋白(OVT)是一种易溶的非结晶白蛋白, 又称为副卵白蛋白或卵伴白蛋白, 约占蛋清蛋白的 12% 左右, 分子质量为 78~80kD, 是一条含 686 个氨基酸残基的单肽链, 分子中含有 15 个二硫化物交联在一起, 没有自由的巯基, pI 为 6.0^[1]。卵转铁蛋白同血清转铁蛋白和乳转铁蛋白属于同一性质蛋白, 在结构和生物活性上相似, 对于提高机体免疫功能、增强抗病防病的能力、防治贫血、阻断 OH 自由基形成等都具有非常重要的意义^[2]。Schade 和 Caroline 首次报道了 OVT 对大肠杆菌等的抑制作用与血清中的转铁蛋白相同。Valenti 等人的实验证实卵转铁蛋白的抗菌性在数量和质

量上与人类的乳铁蛋白(LF)相似, 而抗病毒的性能甚至优于乳铁蛋白和血清转铁蛋白。含卵转铁蛋白的食品喂养的新生儿对补铁和对肠道细菌的抵抗能力比用非母乳喂养的新生儿强, 并且临床实验证明, 婴儿服用后, 并无异源蛋白常有的过敏等不良反应^[3]。因此 OVT 作为一种良好的免疫功能因子或生物医药产品, 其应用前景十分广阔。

蛋清中虽含有大量的卵转铁蛋白, 但 OVT 分离的研究进展却相对较慢, 以往有关 OVT 的分离提取都是采用盐析沉淀法或离子交换法^[4-5], 也有采用固定化金属螯合亲和色谱(IMAC)法^[3], 但这些方法制得的产品或者活性低或者得率低或者操作复杂, 实现产业化生产都存在种种缺陷。本实验采用膜分离技术^[7-8]分离制备 OVT, 冷

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 吉林省科技厅农业重点项目(20050202-3)

作者简介: 张铁华(1970-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为营养与功能食品。E-mail: zth197010@sohu.com

* 通讯作者: 刘静波(1962-), 女, 教授, 博士, 研究方向为功能食品。E-mail: ljbl68@sohu.com

冻干燥制得产品, 为工业化生产提供可行途径。

1 材料与设备

1.1 材料、试剂与设备

从附近鸡场购买得三天内生产的新鲜蛋, 分离蛋黄得蛋清; OVT 标样 Sigma 公司。

均质机 上海东华高压匀浆泵厂; NDJ-1 型旋转黏度计 上海天平; CR20B2 型离心机 日本日立公司; 膜分离装置 浙江中控教学仪器有限公司; 膜材料(聚砜树脂生物膜) 上海医药工业研究院; 纳滤膜为美国卷式组件 HDS-11; UL80BC 型牛奶成份分析仪 杭州浙大优创科技有限公司; QSY-11 凯氏定氮仪 北京强盛分析仪器制造中心; FD-1 冷冻干燥机 北京博医康技术公司; DYY-6C 型电泳仪 北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程

新鲜蛋清→均质→稀释→微滤→超滤→纳滤→冷冻干燥→产品→分析检验

1.2.2 操作要点

新鲜的蛋清, 稀释(0.9% 生理盐水)后经 10~40MPa 二次均质以降低黏度, 再进行膜分离处理。首先, 微滤除去 0.1~100 μm 范围的大的颗粒和杂质(包括脂肪分子); 然后采用超滤技术, 先采用截流分子量 10 万的聚砜树脂生物膜, 去除 10 万以上的大分子蛋白(卵粘蛋白), 再使用 5 万的聚砜树脂生物膜, 截流大于 5 万的蛋白质(OVT), 得浓缩液。之后将得到的浓缩液进行纳滤脱盐浓缩处理, 并冷冻干燥, 进行分析处理。小于 5 万分子量的蛋白质(主要是卵白蛋白和卵类粘蛋白)收集, 和大于 10 万以上的大分子蛋白(卵粘蛋白)溶液混合, 脱盐, 浓缩, 喷雾干燥, 进行酶解制备高 F 寡肽。

1.2.3 脱盐率测定

采用牛奶成份分析仪测定电导率, 通过电导率的变化来测定脱盐率, 计算公式为:

$$\text{脱盐率}(\%) = \frac{\text{纳滤前样品电导率} - \text{纳滤处理后样品电导率}}{\text{纳滤前样品电导率}} \times 100$$

1.2.4 流通量测定

流通量常用一定时间内通过膜的透过液体积来表示。设备稳定运行后, 控制操作参数如超滤压力、物料流速、温度等, 记录一定时间内的透过液体积。由下式计算流通量:

$$\text{流通量} = \text{物料流速}(\text{l/h}) \times \text{处理时间}(\text{h})$$

1.2.5 OVT 分子量的确定

利用 SDS-PAGE 凝胶电泳法, 将超滤后冻干的产品, 采用 SDS-PAGE 电泳法分析样品, 电泳分离胶质

量分数为 10%, 采用考马斯亮蓝 R250 染色。根据电泳结果判断样品的物质组成和分子量大小。

1.2.6 OVT 质量浓度测定

建立 OVT 浓度标准曲线^[6], 如图 1。

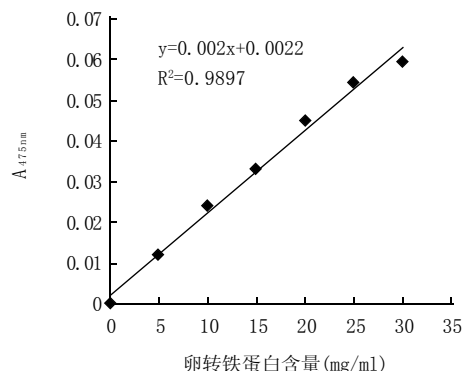


图 1 OVT 浓度标准曲线

Fig.1 OVT density standard curve

1.2.7 OVT 纯度的计算^[7]

OVT 的质量浓度利用标准曲线计算; 蛋白质质量浓度采用凯氏定氮法按 GB/T 5009.5 — 2003 标准测定。

OVT 的纯度可用 OVT 的质量浓度与蛋白质总量的质量浓度之比来计算, 计算公式为:

$$\text{OVT 的纯度} = \frac{\text{OVT 的质量浓度}}{\text{蛋白质的质量浓度}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 料液前处理条件的确定

蛋清中含有大量的浓厚蛋白, 而它又主要是由卵黏蛋白和类黏蛋白构成的一种呈纤维状的胶状物质, 黏度很大。其中卵黏蛋白因为不溶于水且黏度较大, 因此在膜分离时会造成堵塞及污染。所以, 必须首先对蛋清进行必要的预处理以消除卵黏蛋白对 OVT 分离提取造成的影响。本实验采用先稀释后均质的方法, 既降低了料液黏度, 又可解决 OVT 与其他蛋白相互作用结合的问题。因为蛋清经过稀释均质后, 破坏了其复合结构, 降低了蛋清液的黏度, 从而提高了转铁蛋白的得率及纯度。另外由于均质处理使蛋清液过滤更为流畅, 膜清洗也较为彻底, 大大降低了膜的污染程度, 延长了膜的使用寿命。实验结果见图 2~4。综合稀释倍数、均质压力和均质温度对黏度的影响, 确定 5 倍稀释、40MPa 和 20℃作为蛋清液前处理的条件。

2.2 超滤条件的确定

由图 5 可知, 随着膜两侧压力差的增加, 流通量越来越大, 在压差小于 0.09MPa 之前, 流通量基本与压差成线性关系, 压差超过 0.09MPa 以后, 通量的增

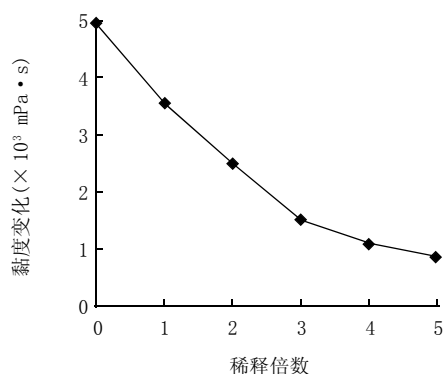


图2 稀释倍数对黏度的影响

Fig.2 Effects of dilute multiple on viscosity

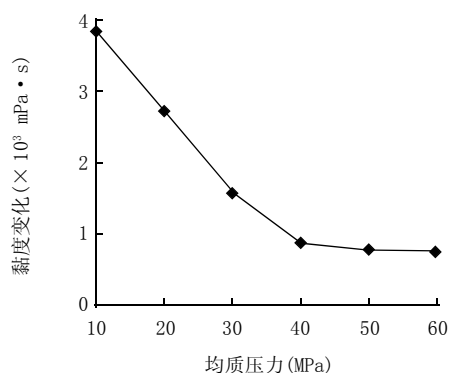


图3 均质压力对黏度的影响

Fig.3 Effects of homogen pressure on viscosity

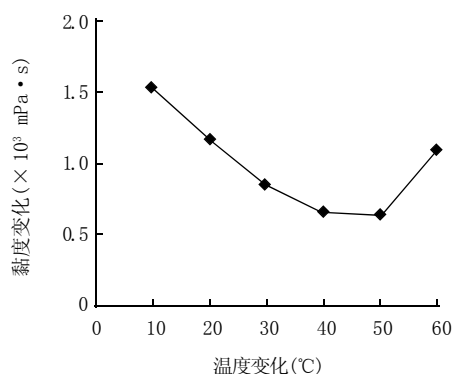


图4 均质温度对黏度的影响(40MPa)

Fig.4 Effects of homogen temperature (40MPa) on viscosity

加变得缓慢,这主要是浓差极化形成凝胶层而使膜的透过阻力增加的结果。在超滤操作压力确定为0.09MPa,条件下测定流通量与温度关系。从图中可以看出基本上成直线关系,这是由于温度升高使溶液黏度下降,粒子扩散加速使浓差极化现象减弱,从而使通量增加。所以在膜和卵清蛋白耐热性允许的情况下,可适当提高操作温度,但考虑到微生物腐败等因素选用20~30℃为宜。

2.3 纳滤条件的确定

室温条件下,改变压力时流通量的变化和固定压力

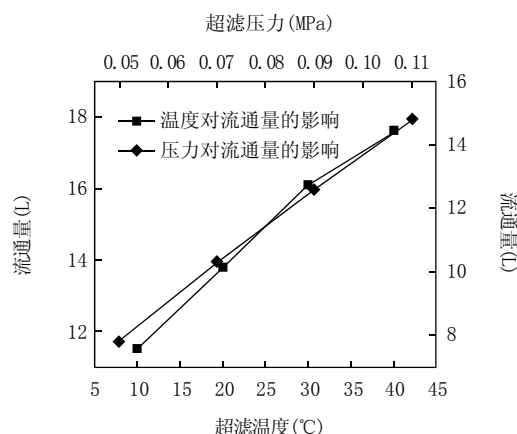


图5 压力、温度对流通量的影响

Fig.5 Effects of pressure and temperature conditions on flow flux

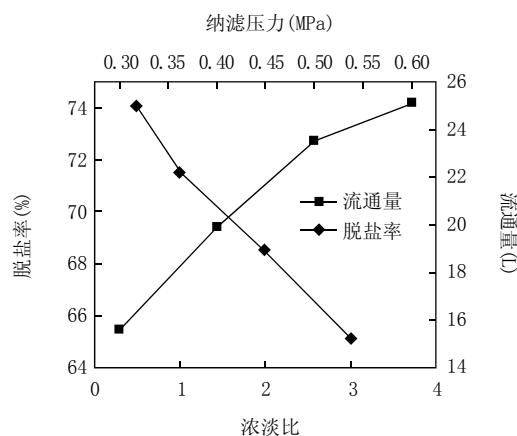


图6 压力对流通量变化和浓淡比对脱盐率的影响

Fig.6 Effects of flow flux on pressure and desalting ratio on thick and clear ratio

时,改变浓淡比(浓缩液与透过液的体积流量比称浓淡比)时脱盐率的变化实验结果如图6。可以看出,随着膜两侧压力差的增加,流通量越来越大,在压差小于0.5MPa之前,流通量基本与压差成线性关系,压差超过0.5MPa以后,通量的增加变得缓慢,这主要是浓差极化形成凝胶层而使膜的透过阻力增加的结果。固定压力为0.5MPa,随着浓淡比的改变测得的脱盐率逐渐增加,当浓淡比为1:2(0.5)时,脱盐率最高,达到74%。之后由于浓差极化作用,使纳滤操作变得困难。

2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

从凝胶电泳谱带分析看,样品中的主要成分为分子量为43kD的卵清白蛋白和分子量为80kD的卵转铁蛋白,此外还含有少量的其他杂蛋白,结果见图7。

2.5 OVT 的纯度

采用以上膜过滤操作条件,对获得的浓缩液和OVT冻干粗品进行蛋白质质量浓度分析,结果见表1。浓缩液的卵铁蛋白纯度为28.14%,OVT冻干粗品的纯度为28.46%。

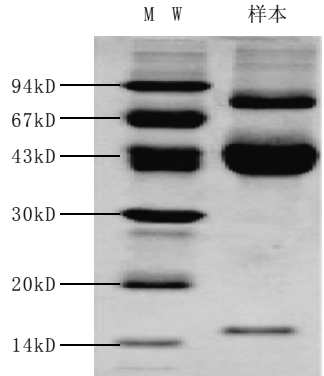


图7 超滤后冻干样品的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.7 SDS-PAGE results of freeze-drying sample after ultrafiltration

表1 纳滤后浓缩液及 OVT 冻干粗品分析结果

Table 1 Analysis results of concentrated solution and freeze-drying OVT sample

处理样品	质量 (g)	蛋白质质量 浓度 (%)	卵铁蛋白 质量浓度 (%)	卵铁蛋白 纯度 (%)
浓缩液	1100	3.12	0.878	28.14
卵铁蛋白冻干粗品	22.45	90.04	25.63	28.46

3 结 论

3.1 综合稀释倍数、均质压力和均质温度对黏度的影响，确定 5 倍稀释、40MPa 和 20℃作为蛋清液前处理的条件。

3.2 综合压差和温度对流通量的影响，确定超滤条件压差为 0.09MPa，温度为 20~30℃。

3.3 综合压差对流通量和改变浓淡比对脱盐率的影响，确定压差为 0.5MPa，浓淡比为 1:2，脱盐率最高为 74%。

3.4 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析和 OVT 纯度分析，确定经膜处理后的蛋白样品含有 80kD 的 OVT，纯度为 28.46%。

采用膜分离技术分离生物活性成分，是食品加工中最具工业化潜力的技术方法之一。操作简单，费用相对较低。但也有一些缺点，制备产品的纯度较低，膜材需要经常处理。如何提高膜分离后的样品纯度，采用哪种膜材能减少膜污染和处理的繁杂程度，是今后开展这方面研究的方向。

参考文献：

[1] CUERIN-DUBIARD C, PASCO M, HIETANEN A, et al. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography, 2005, 1090: 58-67.

[2] HISHAM R I, EIKO I, YASUSHI S, et al. Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin [J], Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1401: 289-303.

[3] 杨严俊, 张亚辉. 鸡蛋清中卵转铁蛋白的分离提取[J]. 无锡轻工大学学报, 2003(7): 37-40.

[4] PHILLIPS J L, AZARI P. On the structure of ovotransferrin, isolation and characterization of the cynogen bromide fragment and evidence for a duplicate structure[J]. Biochemistry, 1971(7): 1160-1165.

[5] ANTONINI E. 美国专利: 4029711[P]. 1977.

[6] 卢蓉蓉, 许时婴, 王漳. 乳铁蛋白测定方法的比较[J]. 中国乳品工业, 2002(5): 123-125.

[7] 卢蓉蓉, 许时婴, 王漳, 等. 预分离初乳中乳铁蛋白的超滤工艺[J]. 食品与生物技术, 2002(1): 67-70.

[8] CHID C K, ETZEL M R. Fraction of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane[J]. Food Sci, 1997, 62(5): 996-1000.