

文章编号: 1673-1689(2011)05-0657-06

应用酶膜反应器制备酪蛋白生物活性肽

徐桂敏¹, 杨瑞金^{* 2}, 赵伟², 张文斌², 华霄²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室(江南大学), 江苏 无锡, 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 研究酶膜反应器中超滤压力及循环流速对分离酪蛋白生物活性肽的影响。在截留相对分子质量为 10 000 切向流超滤酶膜反应器(EMRs)中, 采用 Alcalase 2.4FG 在 pH 8.5、温度为 50 ℃条件下对酪蛋白进行连续水解。通过单因素实验研究了操作压力及循环流速对膜通量 J 、酪蛋白水解度 DH、蛋白质回收率 S 、残余酶活 A_R 、泄漏酶活 A_F 及酶活损失 A_L 等因素的影响, 确定最佳的超滤工艺。研究结果表明: 增大超滤压力会导致蛋白质回收率的大幅度提高, 但会促使酶大量泄漏并对膜造成严重的污染; 提高循环流量为 140 mL/min 时, 酶泄漏较少, 膜污染程度相对降低, 并可获得较高的蛋白质回收率。

关键词: 酶膜反应器; 酪蛋白生物活性肽; 蛋白质回收率; 膜通量; 酶活力

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Research of Preparation of Casein Bioactive Peptides Using Enzymatic Membrane Reactor

XU Gui-min¹, YANG Rui-jin^{* 2}, ZHAO Wei², ZHANG Wen-bin², HUA Xiao²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The influence of operating conditions including pressure and recirculation flow rate on the isolation of casein bioactive peptides was investigated in this study. Alcalase 2.4 FG was used to continuously hydrolyse an initial concentration of 6% (w/w) casein at pH 8.5 and 50 ℃ in an enzymatic membrane reactor. The degree of hydrolysis (DH), permeate flux (J), product recovered in permeate (S), enzyme leakage (A_F), residual enzyme activity (A_R) and enzyme loss (A_L) were determined to value the effect of operating conditions of pressure and recirculation flow rate on isolation of casein bioactive peptides by single factor experimental. It showed that a high increased in S with increasing operating pressure, but leading to a serious enzyme leakage and membrane fouling. However, it could reduce enzyme leakage and membrane fouling with a suitable recirculation flow rate of 140 mL/min, meanwhile it could gain a relatively high protein recovery.

Key words: enzymatic membrane reactor, casein bioactive peptides, protein recovery, permeate flux, enzyme activity

收稿日期: 2010-09-14

基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA10Z313)。

* 通信作者: 杨瑞金(1964-), 男, 江西瑞金人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。Email: yrj@jiangnan.edu.cn

酪蛋白经酶解、胃肠消化以及食品加工过程会产生多种生物活性肽^[1], 如: 酪蛋白磷酸肽、抗氧化活性肽、免疫活性肽和血管紧张素转化酶抑制剂等多种功能肽, 这些肽具有非常重要和广泛的生物学功能和调节功能^[2], 在人体营养系统中起着极其重要的作用^[3]。

酪蛋白生物活性肽的生产工艺多采用酶水解法, 但是基于传统的间歇酶解工艺酶损耗大, 底物抑制作用严重, 工艺成本高而不利于工业化生产等弊端, 其应用发展受到限制。酶膜反应器(EMR)是将超滤设备和水解反应器连接起来, 可以实现小相对分子质量水解产物从酶解产物中连续分离^[4], 截留大分子底物及酶, 减少底物抑制作用, 减少游离氨基酸质量分数^[5], 具有降低酶损耗、提高蛋白质转化率、降低生产成本等优势, 彻底解决了间歇酶解工艺存在的弊端。因此, 大量的研究工作开始采用酶膜反应器来分离蛋白质水解产物^[6-11]。但随之而来的大量问题如膜污染、膜通量下降、酶泄漏及蛋白质转化率低等也强烈限制了酶膜反应器的扩大发展及工业化应用, 成为广大研究者深入研究的新热点。

目前对于膜污染的影响因素研究已经较为成熟, 如剪切应力^[12]、渗透压力^[13]、酶解工艺^[5, 14]等都是影响膜污染导致膜通量降低的重要因素, 但对酶膜反应器中酶泄漏的研究较少。酶是贯穿于反应始终的重要催化剂, 酶的泄漏及损失意味着酶耗的进一步增大且不利于反应终产物的稳定性, 过多的酶的泄漏会导致终产物的进一步酶解产生较多的游离氨基酸。因此, 酶泄漏是影响酶膜反应器应用发展的重要问题。作者重点考察了超滤条件对酶泄漏及酶失活的影响, 并揭示了反应过程中酪蛋白水解度、初始水分通量、膜通量、蛋白质转化率与酶活力变化之间复杂的相互关系, 寻求解决或降低膜污染及酶泄漏的方法。

1 材料与方法

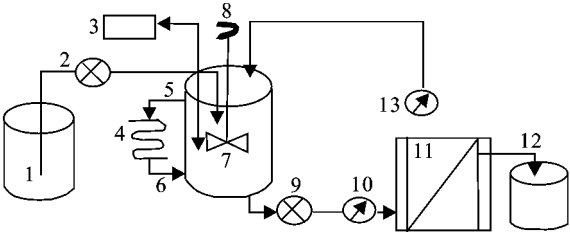
1.1 材料与试剂

酪蛋白(食品级): 甘肃华羚有限公司; Alcalase FG 2.4L: Sigma 公司(酶活力单位, 2×10^5 U/g); Pellicon 2 超滤系统和超滤膜: Millipore 公司, 膜材料再生纤维素, 截留相对分子质量10 000; 其他试剂均为分析纯或优级纯。

1.2 方法

1.2.1 连续酶解分离纯化酪蛋白磷酸肽工艺及流程图 连续分离酪蛋白生物活性肽工艺流程见图

1. 初始水分通量的测定参考文献[5]。



1: 贮料罐 2: 酶反应器进料泵 3: pH 计 4: 恒温水浴 5: 水浴出水管 6: 水浴进水管 7: 酶反应器 8: 强力搅拌器 9: 超滤设备配套真空泵 10: 进口压力计 11: 切向流超滤膜堆(其中9 真空泵、10 进口压力计、11 切向流超滤膜堆组成超滤设备) 12: 渗滤液收集装置

图 1 连续分离酪蛋白生物活性肽工艺流程图

Fig. 1 A process flow diagram of continuous isolation of casein bioactive peptides

酪蛋白生物活性肽的制备参考文献[15-16], 制备浓度为 6% 的酪蛋白溶液 300 mL 和 3% 的酪蛋白溶液 1 500 mL, 并调节 pH 值为 8.5。采用 Alcalase 2.4FG 在 50 °C、pH 8.5 条件下通过酶膜反应器连续酶解制备酪蛋白生物活性肽。将 300 mL 6% 的酪蛋白溶液加入酶反应器中, 开启恒温水浴并升温至 50 °C, 在搅拌状态下加入 Alcalase ($E/S = 0.06$ mL/g) 开始连续酶解反应并计时, 酶解过程采用 pH-stat 法维持酶解液 pH 值恒定, 酶解 5 min 后, 开启超滤装置。超滤过程中, 大分子底物及酶被膜截留返回到酶反应器内继续循环降解, 而小于超滤膜平均截留相对分子质量的多肽透过膜组件形成渗透液(酪蛋白生物活性肽), 每当渗透液体积达到 50 mL 时, 补加 50 mL 浓度为 3% 的酪蛋白底物, 以维持反应液体积近似恒定, 待 1 500 mL 料液全部补加完后, 以去离子水代替补加料液, 完成规定时间内的连续酶解反应, 最大化蛋白质转化率。反应结束后, 记录渗透液总体积。

1.2.2 超滤压力对分离酪蛋白生物活性肽的影响

循环流速规定为 105 mL/min, 调节回流管路阀门使回流管路压力计读数(超滤压力)分别为: 0、14、28、42 kPa。分别测定连续酶解 2 h 后, 各个压力条件下 J_i 、 J 、 S 、 DH 、残余酶活 A_R 、酶泄漏 A_F 和酶活损失 A_L 的数值, 探讨操作压力对分离酪蛋白生物活性肽的影响。

1.2.3 循环流速对分离酪蛋白生物活性肽的影响

控制回流管路压力为 0 kPa, 调节循环流速分别达到: 70、105、140、188 mL/min。分别测定连续酶解 2 h 时后和连续酶解至 1 500 mL 浓度为 3% 的酪蛋白溶液全部补加完后, 各个循环流速下 J_i 、 J 、 S 、 DH 、 A_R 、 A_F 、 A_L 的数值, 探讨操作压力对分离酪

蛋白生物活性肽的影响。

1.2.4 水解度 DH 的测定 采用 pH-stat 法^[17]。

1.2.5 膜通量的测定方法 参考文献[5], 计算公式见式(1)。

$$J(\%) = \left[\frac{V_p}{J_i \times t} \right] \times 100 \tag{1}$$

式中 J 为膜通量(%); V_p 为 t 时间内的透过液体积(mL); J_i 为初始水分通量(mL/min); t 为反应时间(120 min)。

1.2.6 酶活力测定 采用 casein-TCA-Lowry 法^[18], 计算公式见式(2)~(4):

$$A_R(\%) = \frac{U_R}{U_T} \times 100 \tag{2}$$

$$A_F(\%) = \frac{U_F}{U_T} \times 100 \tag{3}$$

$$A_L(\%) = \frac{U_T - U_R - U_F}{U_T} \times 100 \tag{4}$$

式中 A_R 为残余酶活力(%); A_F 为渗透酶活力(%); A_L 为反应过程中损失的酶活力(U); U_T 为加入反应器中的总酶活力(U); U_R 为酶反应器中残余液总酶活力(U); U_L 为透过液中总酶活力(U)。

1.2.7 蛋白质含量的测定 采用双缩脲法^[19], 蛋白质回收率计算公式:

$$S(\%) = \frac{P_p}{P_T} \times 100 \tag{5}$$

式中 S 为蛋白质透过率(%); P_p 为渗透液中蛋白质质量(g); P_T 为加入反应器中总蛋白质质量(g)。

2 结果与讨论

2.1 超滤条件对酪蛋白水解度的影响

酪蛋白水解度是指酪蛋白在水解过程中打开的肽键数占蛋白质肽键总数的百分比, 直接影响多肽链的长短, 终产品的相对分子质量大小以及酪蛋白生物活性肽的功能特性, 是衡量酪蛋白水解程度的指标。因此作者研究了不同超滤条件下酪蛋白水解度随反应时间的变化, 结果见图 2。酪蛋白 DH 值分别随着超滤压力和循环流速的增大而逐渐降低。在连续酶解-超滤过程中, 超滤压力和循环流速的变化直接引起初始水分通量的变化。有研究指出初始水分通量是影响蛋白质转化率的重要因素^[14], 增大初始水分通量的同时水解液的过膜速度也随之增大, 使相对分子质量适宜的多肽可以在较高的过膜速度下迅速透过膜组件, 避免被继续循环降解而产生低相对分子质量小肽, 甚至是更多的游离氨基酸。因此增大超滤压力和循环流速会导致 DH 值降低, 并减少底物抑制作用, 使终产物相对分

子质量均一。增大超滤压力可以大幅度提高初始水分通量和水解液过膜速度, 因此它对酪蛋白 DH 影响较大, 导致 DH 值更低。

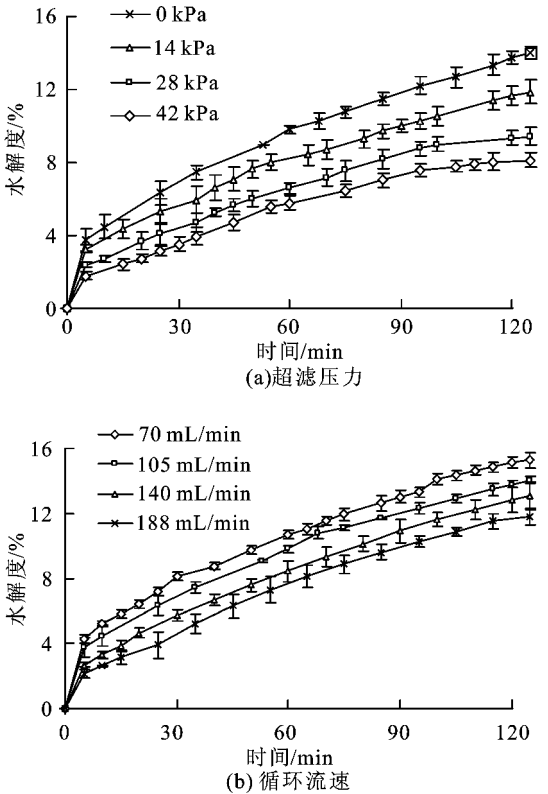


图 2 不同的超滤压力和循环流速对酪蛋白水解度的影响

Fig. 2 Curves of DH changing with time in different pressure and recirculation flow rate

2.2 超滤条件对膜通量的影响

膜通量的下降是影响酶膜反应器应用发展的重要因素。作者研究了在酶解-超滤过程中, 超滤压力和循环流速的变化对 J 的影响, 结果见图 3。 J 在操作开始后的短时间内迅速下降到一个稳定的状态, 并长期保持稳定状态缓慢下降。有研究指出, 当溶液与膜相互接触瞬间即会产生渗透压力, 导致浓差极化层的形成, 促使膜通量迅速下降^[20]。并且在短时间内, 溶质迅速吸附到膜表面及膜孔中, 堵塞膜孔导致通量在短时间内明显下降, 而长期稳定缓慢下降状态是由于蛋白质在膜表面聚合形成沉积层, 阻碍了溶液的渗透速度^[20]。另外, 操作过程中, 酶的损失影响了底物的转化率, 造成系统中未水解底物和大分子中间产物的累积, 也会导致透膜阻力增大, 造成 J 缓慢降低。

膜通量 J 随着超滤压力或循环流速的增大呈现逐渐降低趋势, 并可以明显观察到增大操作压力会导致膜通量快速下降, 对 J 影响较显著, 结果见图 3。

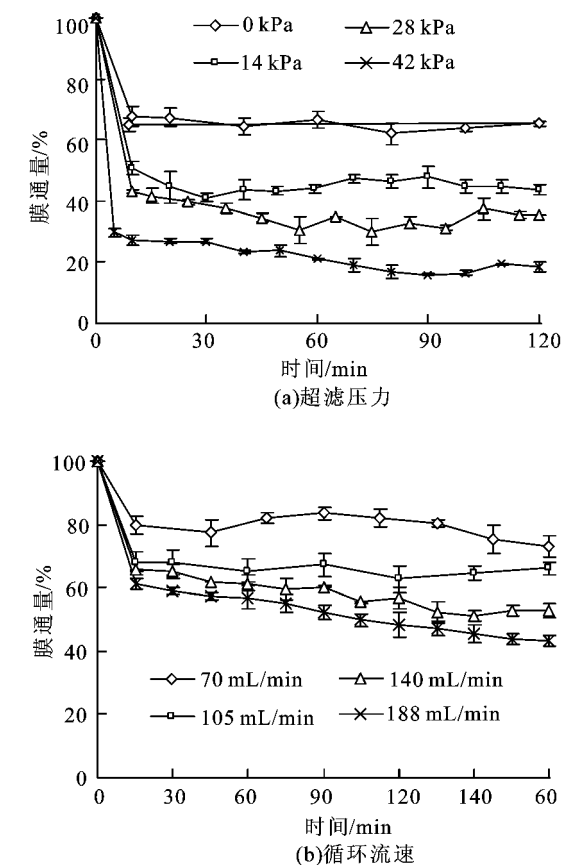


图 3 不同的超滤压力和循环流速对膜通量的影响
Fig. 3 Curves of J changing with operating time in different pressure and recirculation flow rate

首先膜通量的普遍降低是由于溶液受粘度、相对分子质量大小、蛋白质的疏水性及肽或膜的带电性影响,极易堵塞膜孔并在膜表面形成大量沉积,限制了溶液的过膜速度,因此当初始水分通量随着超滤条件的增大而大幅度提升时,溶液的过膜速度增幅较小,远没有水分渗透速度增大的幅度大,因此 J 随超滤条件的增大而逐渐降低。增大超滤压力会导致膜通量大幅度降低,表明增大超滤压力易于在膜表面形成厚厚的沉积层,加重膜的污染,阻碍了溶液的透过速度,导致 J 值较低。从图 3(b)

可以看出,不同的循环流速下,膜通量虽呈逐渐降低趋势,但 J 值相对较高,这说明提高循环流速会产生较大的驱动力可以减少膜表面沉积层^[14]的形成,有利于溶液快速透过膜组件,因此不同流速下的 J 值相对较高。

2.3 超滤条件对酶活力及蛋白质转化率的影响

连续酶解超滤过程中,酶的泄漏是降低蛋白质转化率及终产物稳定性的重要因素。作者重点研究超滤压力及循环流速的变化对酶活力及蛋白质转化率的影响。随着操作压力的逐渐升高,可见初始水分通量大幅度提高,而酶反应器中残余酶活 A_R 大幅度下降,结果见表 1。这是由于增大超滤压力可以促进溶液过膜速度的增大,并导致大量酶泄漏,酶活力损失(A_L)也因热力学作用、机械剪切作用、底物和产物抑制作用以及膜材料吸附作用而增大。当压力较低时,溶液的初始水分通量和过膜速度都是较慢的,此时溶质极易堵塞膜孔并使得大量蛋白质和酶凝聚在膜表面形成沉积层,加剧了对膜的污染,使大部分酶和蛋白质都被膜截留,因此 A_L 值相对较高,而酶的泄漏和蛋白质转化率相对较低。当压力达到 28 kPa 时, S 和 A_F 达到最大值, A_L 最小。这说明压力达到一定值时,溶液的透过速度增大有利于减少膜孔内的沉积物^[21],降低膜孔的堵塞,使大量的水解产物和酶透过膜组件,从而使 A_F 和 S 达到最大值。而由于大量酶的泄漏,减少了酶因热力学作用及剪切应力作用而导致的部分酶活力损失,而使 A_L 降到最低值。随压力的进一步升高,水解液的过膜速度增大,水解产物不能被及时降解为低相对分子质量多肽阻碍了水解液透过膜组件,但由于压力较大,溶质极易堵塞膜孔并在膜表面形成厚厚的沉积层,使得 A_F 与 A_L 相对增加,残留在酶反应器中的酶活力降到最低值,影响了底物的转化率。因此增大超滤压力,可获得较高的 S ,但会加剧酶的泄漏和膜污染。

表 1 超滤压力对酶活力及蛋白质转化率的影响
Tab. 1 Influence of different operating pressure on enzyme activity and S

压 力/ kPa	反应时间/ min	初始水分通量/ (mL/min)	残余酶活/ %	泄漏酶活/ %	酶活损失/ %	蛋白质 回收率/ %
0	120	9.90±0.14	58.62±1.38	19.11±1.22	22.28±0.16	28.52±1.31
14	120	24.65±0.35	46.51±3.00	23.21±2.40	30.28±0.59	50.28±1.12
28	120	50.90±0.28	26.59±0.45	57.01±0.89	16.41±0.45	82.20±1.53
42	120	74.80±0.57	12.14±0.31	43.44±1.56	44.42±1.24	67.90±1.41

循环流速对酶活力及蛋白质转化率的影响见 表 2。当连续酶解超滤 2 h 时, S 和 A_F 随着流速的

增大逐步升高, A_R 略微有所降低, 没有超滤压力对 A_R 的影响那么显著。这表明在超滤过程中, 低流速易使膜孔堵塞并在膜表面形成厚厚的沉积层, 所以低流速条件下 A_L 值较高, 蛋白质转化率及酶的泄漏相对较小。而提高流速有利于减少浓差极化层和膜表面沉积层^[5, 22], 有效降低膜污染, 有利于水解液透过膜组件, 提高蛋白质转化率, 使 A_L 值降低。但是过大的流速也会加剧酶泄漏和酶活力的损失, 提高 S 的同时大幅度降低了酶反应器中残留酶活力。另外延长低流速条件下的反应时间, 控制所有流速下的蛋白质转化率都达到较高范围时, 发现低流速长期操作并没有减少酶的泄漏, 反而由于长期热失活作用、剪切应力作用以及膜表面吸附作用等导致酶大量失活, 使得生产工艺中酶耗和能耗均增大, 并对膜造成了严重的污染。而当流速为 140

mL/min 时, 获得蛋白质转化率相对较高, 并使酶的损耗和膜污染程度相对降低。

3 结 语

在连续酶解超滤过程中, 超滤条件对膜污染和酶泄漏有直接影响。增大超滤压力会加剧膜污染和酶泄漏, 但可以在短时间内获得较高的蛋白质回收率。提高循环流速, 有利于降低膜污染, 减少酶泄漏, 但流速过大也会加剧酶的泄漏和增大剪切作用力而导致酶失活。因此只有当循环流速达到一定临界值时, 可以最大限度降低酶的损耗和膜污染, 提高蛋白质回收率。另外基于酶的泄漏问题仍然存在, 我们将进一步通过采用酶的改性及固定化酶技术等来深入研究并解决酶的泄漏问题。

表 2 循环流速对酶活力及蛋白质转化率的影响
Tab. 2 Influence of different recirculation flow rate on enzyme activity and S

流 速/ (mL/ min)	反应时间/ min	初始水分通量/ (mL/ min)	残余酶活/ %	泄漏酶活/ %	酶活损失/ %	蛋白质 回收率/ %
70	120	5. 85±0. 21	60. 08±0. 43	16. 13±0. 36	23. 80±0. 07	26. 23±1. 26
	360		24. 92±0. 64	46. 19±2. 66	28. 90±2. 02	64. 47±1. 89
105	120	9. 90±0. 14	58. 62±1. 38	19. 11±1. 22	22. 28±0. 16	28. 52±1. 31
	300		27. 22±1. 28	47. 52±0. 92	25. 27±0. 36	66. 05±1. 32
140	120	21. 25±0. 35	51. 97±1. 10	29. 04±1. 03	19. 00±0. 08	57. 95±0. 98
	150		46. 61±3. 08	35. 84±1. 02	17. 56±2. 06	69. 14±1. 25
188	120	36. 90±0. 28	37. 21±0. 38	35. 53±0. 14	27. 26±0. 24	65. 78±1. 54

参考文献 (References):

[1] Reeves R E, Latour N G. Calcium phosphate sequestering phosphopeptide from casein[J]. **Science**, 1958, 128: 472.

[2] 王秋韞, 庞广昌, 陈庆森. 牛乳酪蛋白来源的生物活性肽[J]. 天津商学院学报, 2001, 21(3): 6- 9.
WANG Qiu-yun, PANG Guang-chang, CHEN Qing-sen. Bioactive peptides from milk casein[J]. **Journal of Tianjin University of Commerce**, 2001, 21(3): 6- 9. (in Chinese)

[3] Kitts D D. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides [J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2005, 16: 549- 554.

[4] Rios G M, Belleville M P, Paolucci D, et al. Progress in enzymatic membrane reactors- a review[J]. **Journal of Membrane Science**, 2004, 242: 189- 196.

[5] Cheison S C, Wang Z, Xu S Y. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor [J]. **Journal of Food Enzyneering**, 2007, 80: 1134- 1145.

[6] Haque Z U, M ozaaffar Z. Casein hydrolysate I. Continuous production using enzyme bioreactors [J]. **Food Hydrocolloids**, 1992, 6 (5): 549- 557.

[7] Prat & Vidal M, Bouhallab S, Henry G, et al. An experimental study of caseinomacropeptide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2001, 8: 195- 202.

[8] Tolkach A, Kulozik U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques[J]. **Journal of Food Engineering**, 2005, 67: 13- 20.

[9] Belhocine D, Mokrane H, Grib H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- bioreactor[J]. **Chemical Engineering Journal**, 2000, 76: 189– 196.
- [10] Prieto C A, Guadix A, Gonzalez-Tello P, et al. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein[J]. **Journal of Food Engineering**, 2007, 78: 257– 265.
- [11] 张亚辉, 杨严俊. 纤维素金属螯合亲和膜用于蛋清中功能性蛋白质的分离纯化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 25(2): 42– 47.
- ZHANG Ya-hui, YANG Yan-jun. Study on the purification of functional proteins from egg white by cellulose metal-chelated affinity membrane[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 25(2): 42– 47.
- [12] Sayed Razavi S K, Harris J L. Shear controlled model of the ultrafiltration of soy suspensions [J]. **Journal of Membrane Science**, 1996, 118: 279– 288.
- [13] Herzberg M, Elimelech M. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure[J]. **Journal of Membrane Science**, 2007, 295: 11– 20.
- [14] Cheison S C, Wang Z, Xu S Y. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis [J]. **Journal of Membrane Science**, 2006, 283: 45– 56.
- [15] Cheison S C, Wang Z, Xu S Y. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor II. Characterisation for the fate of the enzyme by multivariate data analysis[J]. **Journal of Membrane Science**, 2006, 286: 322– 332.
- [16] 王文杰, 王璋. 酶膜反应器中水解大豆分离蛋白的研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(1): 16– 19.
- WANG Wen-jie, WANG Zhang. Study on the hydrolysis of soy protein isolate in an enzymatic membrane reactor[J]. **Food & Machinery**, 2008, 24(1): 16– 19.
- [17] Alder-Nissen J. Controlled hydrolysis and the empirical characterization of various substrates and enzymes[J]. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**, 1986, 23: 113– 169.
- [18] An H, Seymour T A, Wu J, et al. A assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) protease[J]. **Journal of Food Science**, 1994, 59: 1013– 1017.
- [19] Gornall A G, Bardawill C J, David M N. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1949, 177: 751– 766.
- [20] Satyanaryana S V, Bhattacharya P K, De S. Flux decline during ultrafiltration of kraft black liquor using different flow modules: a comparative study[J]. **Separation and Purification Technology**, 2000, 20: 155– 167.
- [21] 韩少卿, 赵芹, 彭奇均. 膜分离技术提取海藻糖的工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 93– 96.
- HAN Shao-qing, ZHAO Qin, PENG Qi-jun. Trehalose extraction by the technology of membrane separation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(2): 93– 96.
- [22] Guadix A, Camacho F, Guadix E M. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor[J]. **Journal of Food Engineering**, 2006, 72: 398– 405.