

文章编号 :1009-038X(2002)06-0607-06

超滤法提取蛋清溶菌酶

张 灏¹, 赵玉萍², 杨严俊¹, 徐榕榕¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 淮阴工学院 生物化学系, 江苏 淮安 223001)

摘 要:对蛋清料液进行前处理,采用磷酸盐缓冲液稀释 10 倍,在 24 MPa 压力下均质;对超滤工艺进行了研究,采用截留相对分子质量为 30 000 的聚醚砜(PES)膜进行超滤,溶菌酶制品活力为 14 610 U/mg.

关键词:溶菌酶;超滤;蛋清;膜通量;酶活

中图分类号:Q 814.1

文献标识码:A

Application of Ultrafiltration for Egg White Lysozyme

ZHANG Hao¹, ZHAO Yu-ping², YANG Yan-jun¹, XU Rong-rong¹

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The Department of Bioengineering and Chemical Engineering, HuaiYin Institute of Technology, HuaiYin 223001, China)

Abstract:Lysozyme was isolated from egg white by using ultrafiltration(UF) technique. The preparation procedures were as followings: egg white was diluted with phosphate buffer by 10 times, homogenized at 24 MPa; the ultrafiltration process was studied by using PES membrane with 30 000 MWCO. The enzyme activity of final preparation was 14 610 U/mg.

Key words:Lysozyme; Ultrafiltration; Egg White; Membrane Permeate Flux

溶菌酶在食品和医药领域的应用非常广泛^[1],需求量在不断增加.蛋清溶菌酶是溶菌酶的重要来源之一,蛋清溶菌酶是小分子物质^[2](相对分子质量为 14 300~17 000),并与蛋清中其它相对分子质量高的蛋白质存在着静电作用力,以结合态存在^[3~8],在传统生产工艺中主要使用色谱法进行分离^[9,10],由于存在成本高和操作时间长等缺点而不易大规模生产.作者采用了不同的前处理工艺^[3~6,11,12],降低了溶菌酶与其它蛋清蛋白之间的作用力,使溶菌酶处于解离状态后,采用超滤的方法对蛋清溶菌酶进行分离提取.

1 材料与方法

1.1 材料与设备

蛋清:市售;溶菌酶标样:Sigma 公司提供;溶壁微球菌:中国科学院微生物研究所提供;PS、PES 膜、超滤装置:无锡星达膜技术发展公司购得;DYY-Ⅲ4 型电泳仪:北京六一仪器厂生产;655A-12 型液相色谱:HITACHI 公司生产.

1.2 实验方法

1.2.1 溶菌酶测定方法 采用改进的舒加法,参见参考文献[13].

收稿日期 2002-06-20; 修订日期 2002-09-10.

作者简介:张灏(1962-),男,江苏苏州人,工学硕士,副教授.

万方数据

1.2.2 料液前处理工艺 蛋清→缓冲液稀释→微滤→均质→分析

1.2.3 前处理料液中溶菌酶存在状态分析 分别采用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱^[14],聚丙烯酰胺电泳技术^[15],液相色谱技术^[16],分析溶菌酶在前处理料液中的存在状态.

1.2.4 超滤所得溶菌酶纯度分析 将溶菌酶浓缩液冷冻干燥^[17],电泳分析溶菌酶的纯度.

2 结果与讨论

2.1 料液前处理工艺参数的确定

2.1.1 稀释倍数的确定 不同稀释倍数料液的粘度见图 1.粘度测定以一定体积量液体通过奥氏粘度计所需的时间(s)来反映.图 1 表明,料液稀释至 10 倍时粘度降低的速度趋于缓和,因此料液前处理时选用 10 倍稀释度.

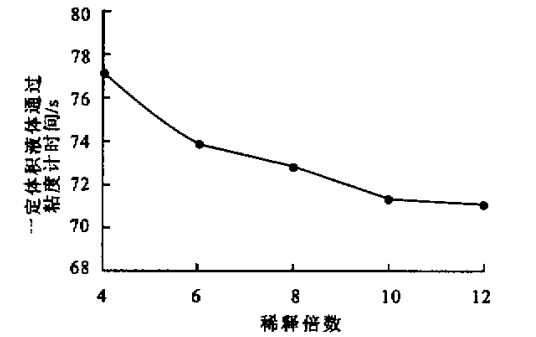


图 1 稀释倍数对料液粘度的影响

Fig.1 Effect of dilution ratio on feed viscosity

2.1.2 均质压力的确定 经不同均质压力处理后残存酶活力和料液粘度见图 2.图 2 表明均质压力在 24 MPa 时对酶活力的影响不大,为此料液的粘度明显降低,因此本试验中选用此压力对料液进行均质处理.

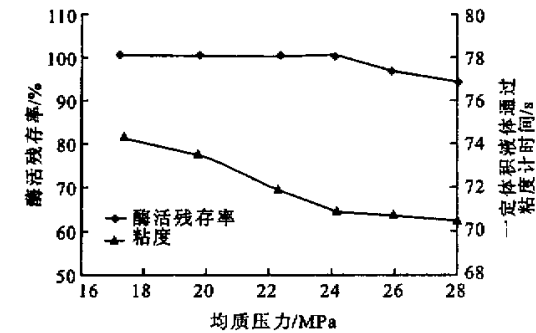


图 2 均质压力对酶活的影响

Fig.2 Effect of homogenisation pressure on enzyme activity data

2.1.3 缓冲体系的选择 使用以下不同缓冲液:磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液;磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液;磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液;磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液;柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液;柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;相同离子强度 I 和 pH 的氯化钠.分别进行处理,考察不同缓冲体系对微滤液和超滤液的残存酶活力的影响,结果见图 3.图 3 表明,磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液对料液中酶活力的影响最低.试验中蛋清料液作 10 倍稀释后溶菌酶活力在 1 000 U,考察因素对酶活力的影响以残留百分率评价(下同).

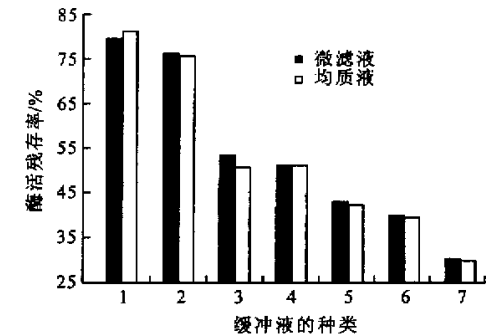


图 3 缓冲液种类对酶活的影响

Fig.3 Effect of different buffer systems on enzyme activity

2.1.4 料液 pH 值对酶活力的影响 使用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲体系,在不同 pH 下进行处理,微滤液和均质液中酶活残存率见图 4.图 4 表明,在 pH 6.0 时微滤液和均质液中残存酶活力最高.

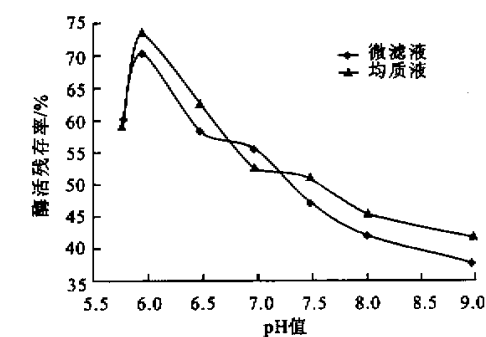


图 4 pH 值对酶活的影响

Fig.4 Effect of pH value on enzyme activity

2.1.5 离子强度对酶活力的影响 使用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲体系,pH 6.0,在不同离子强度下进行处理,微滤液和均质液中酶活残存率结果见

图 5. 图 5 表明 ,离子强度在 0.2 mol/kg 时酶活残存率最高.

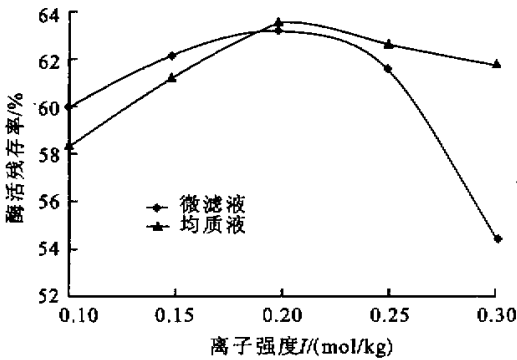


图 5 离子强度对酶活的影响

Fig.5 Effect of ionic strength on enzyme activity

2.1.6 不同处理温度对料液的酶活力的影响 分别在不同温度下进行处理 ,料液的残存酶活力见图 6. 图 6 表明 ,低于 60 ℃ 对酶活力的影响不大.

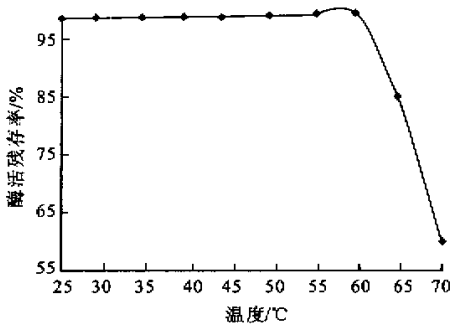


图 6 温度对酶活的影响

Fig.6 Effect of temperature on enzyme activity

以上实验结果表明 ,蛋清用 pH=6.0 , I=0.20 mol/kg 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液稀释 10 倍 ,均质压力为 24 MPa 下均质 ,操作温度控制在 60 ℃ 以下 ,是进行料液前处理的最适条件.

2.2 料液中溶菌酶存在状态分析

将前处理料液上 Sephadex G-100 柱分析 ,结果见图 7.

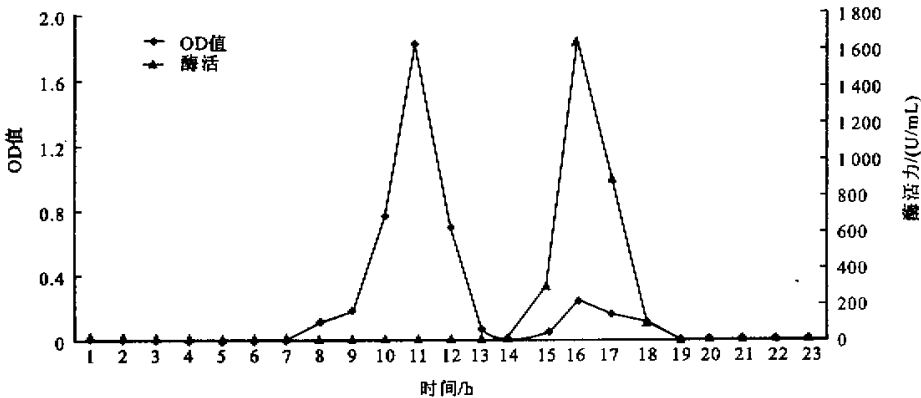


图 7 Sephadex G-100 柱洗脱曲线

Fig.7 Elution curve of Sephadex G-100

图 7 表明 ,前处理料液中存在两类蛋白质 ,相对分子质量大的蛋白质占较大比例 ,而酶活存在于相对分子质量小的蛋白质组分中 ,因此初步推测经上述处理后 ,蛋清中溶菌酶可能与杂蛋白质解离开来 ,以游离状态存在.

将上述保留时间分别为 12 ,15 ,17 ,18 h 的收集液和溶菌酶标样进行电泳及液相色谱分析 ,结果见图 8~10.

图 8~10 表明 ,LC 和电泳分析结果一致 ,保留时间短的蛋白峰相对分子质量较大 ,而保留时间长的蛋白峰相对分子质量较小 ,酶活峰中的蛋白质与

标准溶菌酶的保留时间相一致 ,以上结果证明料液经过前处理后溶菌酶以游离态存在.

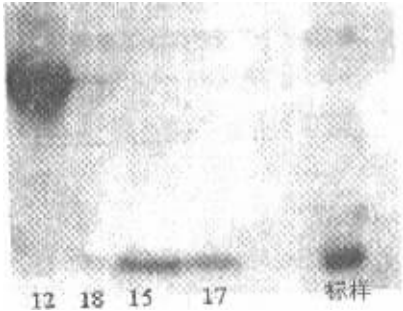


图 8 部分收集液电泳图

Fig.8 Electrophoresis of different elution samples

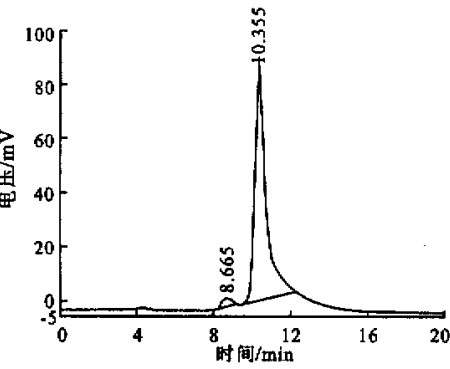


图 9 溶菌酶标样液相色谱图(保留时间 10.355 min)
Fig.9 HPLC graph of standard lysozyme(retain time 10.355 min)

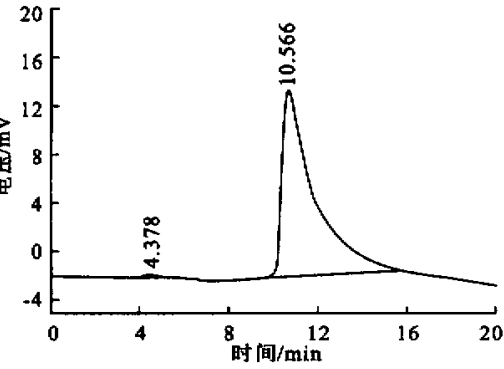


图 10 15 号试管液相色谱图(保留时间 10.568 min)
Fig.10 HPLC graph of No. 15 elution sample (retain time 10.568 min)

2.3 超滤条件的确定

2.3.1 相对分子质量为 3 万膜的超滤分离效果
蛋清中溶菌酶相对分子质量最小(14 300 ~ 17 000),而杂蛋白相对分子质量集中在 3 ~ 6 万^[12],因此以截留相对分子质量为 3 万 PES 膜进行了超滤的初步试验,结果见表 1.表 1 表明,溶菌酶透过率仅为 22.4%,大部分溶菌酶仍存在于截留液中,因此需要对其它超滤条件作进一步研究.

表 1 截留相对分子质量 3 万膜的超滤效果
Tab.1 The results of ultrafiltration through 30000 MWCO PES

参数	体积/L	酶活(U/mL)	总酶活(×10 ⁷ U)
超滤原液	8.0	900	7.20
透过液	5.0	322	1.61
截留液	2.9	1650	4.79

万方数据

2.3.2 超滤过程中稀释方式的影响
超滤过程中,使用 pH 值 6.0 ,I 为 0.2 mol/kg 的磷酸盐缓冲液,以间歇式和连续式的方式不断稀释截留液,以提高溶菌酶的透过率,结果见图 11.由图 11 可知,采用连续式比间歇式稀释的溶菌酶得率高.在连续稀释了 4 倍体积后,溶菌酶得率提高到 35%.

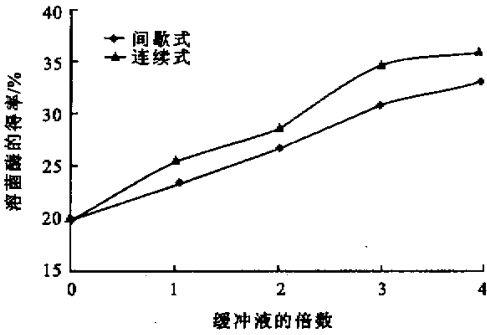


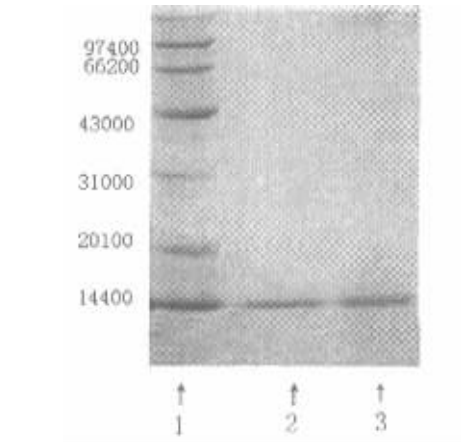
图 11 超滤方式对溶菌酶得率的影响
Fig. 11 Effect of ultrafiltration method on lysozyme recovery

2.3.3 料液 pH 值对超滤的影响
不同的 pH 条件下溶菌酶所带电荷性质和数量不同^[18],若 PES 膜本身所带电荷与酶蛋白所带电荷性质相同则不利于酶的透过,所以对料液 pH 值进行了调整,以改变酶的电荷性质,从而便于溶菌酶的透过.试验结果见表 2.超滤通量测定方法见参考文献[11 ,12].由表 2 可知,不同 pH 值料液的起始通量和浓缩 0.5 倍体积时的通量相差均不大,说明 pH 值对膜通量几乎无影响.当料液 pH 值为 8.5 时,溶菌酶透过率最大,截留率最小,而溶菌酶的失活率却相差不大,故选用 pH 值为 8.5 的料液进行超滤.综合以上条件,蛋清前处理液的 pH 值为 8.5,采用截留相对分子质量为 3 万 PES 膜,选择连续稀释的方式稀释 3 倍,蛋清溶菌酶的透过率提高到 70%.

2.3.4 溶菌酶酶活分析
采用截留相对分子质量为 3 000 的 PES 膜进行浓缩,然后冷冻干燥^[17],蛋清溶菌酶冻干粉的酶活为每毫克蛋白质 14 610 U 或 16 831 U.将此样品和标样进行电泳,结果如图 12 所示.可看出,实验中制备的蛋清溶菌酶仅有一条电泳带,表明杂蛋白质去除较完全,样品纯度较高.

表 2 不同 pH 值对料液超滤的影响
Tab.2 pH effect on egg white ultrafiltration

pH 值	起始通量/(L/m ² ·h) (稀释 3 倍)	浓缩 0.5 倍时通量/(L/m ² ·h) (稀释 3 倍)	透过率/ %	截留率/ %	失活率/ %
6.0	28.25	10.98	34.23	55.61	10.16
8.0	27.98	11.13	56.6	29.05	14.35
8.5	28.30	10.89	70.0	13.42	16.58
9.0	28.50	11.08	57.86	22.67	19.47



1. 标准相对分子质量蛋白质；2. 溶菌酶标样；3. 蛋清溶菌酶制品

图 12 溶菌酶标样及蛋清溶菌酶样品电泳图

Fig. 12 Electrophoresis of standard lysozyme and egg white lysozyme

3 结 论

初步确立了蛋清料液的前处理工艺,即蛋清料液采用 pH 为 6.0 ,I 为 0.2 mol/kg 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍 ,均质压力为 24 MPa 下均质 ,操作温度控制在60 ℃ 以下 ,使蛋清溶菌酶处于游离状态.

通过试验初步确立了蛋清溶菌酶的超滤工艺 :即料液的 pH 值 8.5 ,采用截留相对分子质量为 3 万的 PES 膜 ,连续方式稀释 3 倍进行超滤 ;透过液用截留相对分子质量为 3 000 的 PES 膜进行浓缩 ,冷冻干燥后得到蛋清溶菌酶样品 ,酶活力为每毫克蛋白质 14 610 U 或 16 831 U ,经电泳检测酶的纯度较高.

参考文献：

[1] 船津 胜鹤 ,大典 .溶菌酶 M]. 济南 :山东科学技术出版社 ,1982.

[2] 高真 .蛋制品工艺学 M]. 北京 :中国商业出版社 ,1992.

[3] AKIO KATO ,TAIJI IMOTO ,KAZUYOSHI YAGISHITA. The Binding Groups in Ovomucin-lysozyme Interaction[J]. **Agr Biol Chem** ,1975 ,39(2) 541 - 544.

[4] FANG MING ,JOHN HOWELL ,FERNANDO ACOSTA ,et al. Study on Separatin of Conalbumin and Lysozyme form High Concentration Fresh Egg White at High Flow Rates by a Novel Ion-Exchanger[J]. **Biotechnology and Bioengineering** ,1993 , 42 :1086 - 1090.

[5] AKIO KATO ,RYO NAKAMURA , YASUSHI SATO. Studies on Changes in Stored Shell Eggs ,Part VII. Changes in the Physicochemical Properties of Ovomucin Solubilized by Treatment with Mercaptoethanol during Storage[J]. **Agr Bio Chem** , 1971 ,35(3) 351 - 356.

[6] CHIANG B H ,SU C K , TSAI G J , et al. Egg White Lysozyme Purification by Ultrafitration and Affinity Chromatography [J]. **Jounal of Food Science** , 1997 , 58(2) 303 - 305.

[7] WEN Chi Hou , YAW-Huei Lin. Egg White Lysozyme Purification with Sweet Potato Leaf Preparation[J]. **American Chemical Society** , 1997 , 45 :4487 - 4489.

[8] AKIO KATO ,RYO NAKAMURA , YASUSHI SATO. Studies on changes in stored shell eggs. Part VI Changes in the chemical composition of ovomucin during storag[J]. **Agr Bio Chem** ,1970 ,34(7) :1009 - 1013.

[9] 张珍田 ,陈良惠 ,宋贤一等 .利用超滤法纯化鸡蛋白溶菌酶之研究 J]. 中国农业化学会志 ,1985 ,24(1) 86 - 93.

[10] 张大年 .化工产品目录 M]. 北京 :化学工业出版社 ,1986.

[11] 刘忠洲. 微滤超滤过程中的膜污染与清洗[J]. 水处理技术 ,1997 23(4):187.

[12] 杨严俊. 免疫活性蛋白—鸡蛋免疫球蛋白和乳铁蛋白的研究与开发[D]. 无锡 :无锡轻工大学 ,1997.

[13] 赵玉萍, 张灏, 杨严俊. 溶菌酶测定方法的改进[J]. 食品科技 ,2002 (1) :58 – 59.

[14] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京 :人民教育出版社 ,1978.

[15] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京 :科学出版社 ,1999.

[16] 史景江, 马熙中. 色谱分析法[M]. 重庆 :重庆大学出版社 ,1994.

[17] 潘永康, 王喜忠. 现代干燥技术[M]. 北京 :化学工业出版社 ,1998.

[18] GHOSH R , CUI Z F. Purification of Lysozyme Using Ultrafiltration[M]. New York :John Wiley & Sons Inc ,2000.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 601 页)

参考文献：

[1] BENNO Y , SAWA K , MITSUOKA T. The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast fed and bottle-fed infant[J]. **Microbiol Immunol** , 1984 28 : 975 – 986.

[2] FUJITA I , MAEDA A , TAKASHIK. Studies on the anti-diarrneal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi II 588[J]. **Jpn Pharmacol Ther** ,1986 ,14 :6073 – 6080.

[3] SATO R , TANAKA M. Intestinal Distribution and Intraluminal Localization of Orally Administered *Clostridium butyricum* in Rats[J]. **Microbiology and immunology** , 1997 , 41(9) :665 – 671.

[4] FUJITA I , TAKASHI K. Studies on the anti-diarrheal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi 588[J]. **Jpn Pharmacol Ther** , 1986 , 14 :137 – 141.

[5] KUROIWA T , KOBTI K , IWANGA M. Inhibition of enteropathogens by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588[J]. **J Jpn A Inf d** ,1990 , 64 :257 – 263.

[6] OKAMOTO T , SASKI M , ARAKI Y. Therapeutic efficiency of oral-administration of *Clostridium butyricum*[J]. **Digestion Absorp** ,1996 , 19 :65 – 68.

[7] KUROIWA T , IWANAGA M , KOBARI K. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy[J]. **J Jpn A Inf D** , 1990 , 64 :1425 – 1432.

[8] TAGUCHI N , ABE F , MIKAMI Y. Prevention of experimental antibiotic-associated diarrhea by *Clostridium butyricum*[J]. **Jpn J Bacterio** ,1988 43 :829 – 835.

[9] 张灏. 两歧双歧杆菌在酸乳中的应用和探讨[D]. 无锡 :无锡轻工业学院 ,1986.

[10] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验手册[M]. 北京 :中国轻工出版社 ,1994.

[11] [澳] V. B. D. 斯克尔曼. 细菌属的鉴定指导[M]. 蔡妙英译. 北京 :科学出版社 ,1978.

[12] GB15193. 3—94. 食品安全性毒理学评价程序和方法[S].

[13] 《食品卫生学》编写组编. 食品卫生学[M]. 北京 :中国轻工出版社 ,1991.

[14] 李建华. 中药类急性毒性技术法与 LD50 值的分级[J]. 中草药 , 1994 25(7) :388 – 389.

(责任编辑 杨 萌)