

鸡蛋清溶菌酶提取工艺的改进

杨景芝¹ 孙衍华² 白吉刚¹ 张杰道¹ 杨国栋¹ 李 茵¹

1(山东农业大学生命科学学院 泰安 271018)

2(山东农业大学应用化学与材料科学学院 泰安 271018)

摘 要 创新改革了鸡蛋清溶菌酶的纯化、浓缩和干燥工艺。通过调整透析液的 pH 值 ,加入磷酸盐、再调整其 pH 值 ,然后离心去除杂质得到纯化液。将纯化液在 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下真空旋转蒸发 ,变油时倒出、冷冻 25°C 以下真空干燥。产品呈淡黄色 ,活性范围 $13\,539 \sim 15\,741\text{ U/mg}$ 、平均为 $14\,021\text{ U/mg}$ 与超滤浓缩、冷冻干燥产品的活性 $(14\,610\text{ U/mg})$ 基本一致。产率 (0.7248 g/kg 蛋清) 比报道的工艺高 19.75 倍。

关键词 溶菌酶 ,鸡蛋清 ,提取 ,溶壁微球菌

溶菌酶具有专一水解微生物细胞壁的作用 ,能杀菌和破壁 ,用途广泛。产品颜色一般为淡黄色 ,蛋清中含量较高。鸡蛋清溶菌酶的提取方法早有报道^[1-2] ,主要有树脂吸附、盐析与结晶^[3] 及超滤法^[4]。文中优化了蛋清溶菌酶的纯化、浓缩和干燥的工艺 ,得到了活性较高的产品 ,降低了生产成本 ,使回收的蛋清和废油都可直接再利用。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 原 料

新鲜冷藏的鸡蛋清。

1.1.2 试 剂

标准溶菌酶 $(20\,000\text{ U/mg})$:上海丽珠东风生物技术有限公司 ;溶壁微球菌 :山东农业大学动物科学院微生物菌种保存中心 ;营养肉汤、胰蛋白胨 10 g/L 、牛肉膏 3 g/L , $\text{NaCl } 5\text{ g/L}$;724 树脂、 HCl 、 NaOH 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、甘氨酸、十二烷基硫酸钠、三羧甲基氨基甲烷、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、甘油、巯基乙醇、考马斯亮蓝 R-250、考马斯亮蓝 G-250、溴酚蓝、冰醋酸、琼脂糖。以上试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器与设备

离心机、电动变速搅拌机、pH 试纸、冰箱、旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂)、循环水式多用真空泵 SHB-III(郑州长城科工贸有限公司)、透析袋、真空干燥器、真空泵、垂直板电泳系统、消毒锅、恒温水浴锅、722 分光光度计。

1.2 方 法

1.2.1 鸡蛋清溶菌酶提取新工艺

1.2.1.1 材料的处理

(1) 将新鲜鸡蛋洗净、控干水、敲破小头、收集蛋清 4°C 放置 1 h 以上。

(2) 724 树脂的处理 :用 1 mol/L HCl 浸泡树脂 2 h ,用去离子水洗至近中性 ,再用 1 mol/L NaOH 浸泡 2 h ,去离子水洗至近中性 (用过的树脂直接用 1 mol/L NaOH 浸泡 ,用去离子水洗至近中性) ,再用 $0.15\text{ mol/L pH}6.5$ 的磷酸盐缓冲液浸泡过夜 ,滤后备用。

1.2.1.2 吸 附

将冷蛋清加入处理好的 724 树脂 (每千克蛋清需要未处理树脂 160 g) ,大力搅拌 (冰浴中) 吸附 6 h 4°C 静置 ,次日离心 $(3\,000\text{ r/min } ,15\text{ min})$,收集树脂 ,回收蛋清。

1.2.1.3 洗去杂蛋白

树脂先用去离子水洗至洗液无浑浊 ,再用等体积的 $0.15\text{ mol/L pH}6.5$ 的磷酸盐缓冲液

第一作者 :大学本科 ,副教授。
收稿时间 2003-10-17 ,改回时间 2003-12-22

搅拌洗涤 20 min(冰浴下),搅拌洗涤应重复 2 次,最后 1 次滤除树脂水分。

1.2.1.4 洗脱溶菌酶

树脂用等体积 10% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浸泡, 4°C 下过夜,次日搅拌 30 min,洗脱液经尼龙布过滤,准确量取体积。再加入体积 10% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重复洗脱 2 次,合并洗脱液。

1.2.1.5 盐析溶菌酶

每 83 mL 洗脱液加 32 g 磨细的固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,在搅拌下缓慢加入,待 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 完全溶解后, 4°C 放置过夜。次日,离心(3000 r/min, 15 min),收集沉淀。

1.2.1.6 透析除盐

将盐析沉淀装入透析袋,用蒸馏水透析 24 h 以上,其间换 2 次蒸馏水。

1.2.1.7 去杂质

取出透析袋中的透析液,用 2 mol/L HCl 调整 pH4.6,离心,收集上清液。其沉淀加少量蒸馏水(约为沉淀的 5 倍)搅匀,再重复处理 2 次。合并上清液、调整 pH5.5,再加入 1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 5.5),达终浓度为 10 mmol/L,静置 10 min、离心、弃沉淀,收集纯化液。

1.2.1.8 浓缩与干燥

纯化液在 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 真空旋转蒸发,变浊时倒出、冷冻,室温真空干燥。

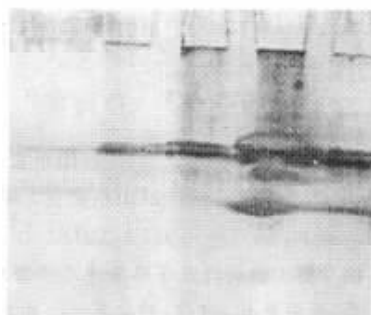
1.2.2 溶菌酶产品的纯度鉴定

用聚丙烯酰胺凝胶 SDS 凝胶电泳法^[5],凝胶度为 10%,考马斯亮蓝 G-250 染色,对蛋白质的电泳图谱进行拍照,见图 1 和图 2。

1.2.3 溶菌酶产品的活性测定

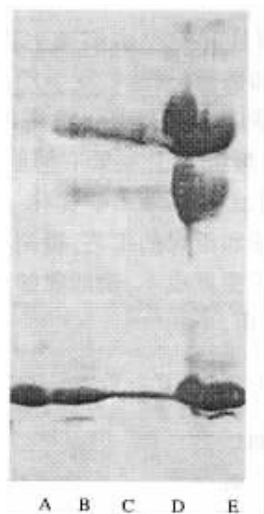
1.2.3.1 溶菌酶底物的制备

将溶壁黄微球菌种先接种于灭菌的固体培养基中活化扩培,再接种于蒸汽灭菌的液体 LB 培养基或营养肉汤培养基中, 37°C 摇床培养至菌体增殖到最大密度(培养 10 h 左右,以培养液的透光度最小为标准),马上将培养液离心,收集沉淀的菌体。该菌体用灭菌的生理盐水悬浮后离心,反复洗至无蛋白(以考马斯亮蓝 R-250 蛋白质显色法^[5]检测,洗 3~4 次),再用



A—溶菌酶标准样品 B—第 1 批样品 C—第 2 批样品 D—第 3 批样品 E—第 4 批样品

图 1 溶菌酶产品的 PAGE-SDS(T=22%) 电泳图谱



A—溶菌酶标准样品 B—第 1 批样品 C—第 2 批样品; D—第 3 批样品 E—第 4 批样品

图 2 溶菌酶产品的 PAGE-SDS(T=10%) 电泳图谱

20% 灭菌甘油将无蛋白菌体调成糊状,置于 -60°C 低温保存备用。

1.2.3.2 溶菌酶活力的测定

见参考文献[1],样品稀释液为 0.1 mol/L pH 6.2 的磷酸盐缓冲液,内含 0.1% 的 NaCl 作为激活剂。

活力单位定义为:pH 6.2 条件下,每分钟 OD_{450} 值降低 0.001 为 1 个酶活力单位。以标准溶菌酶的检测条件为固定的标准测定条件。计算公式:

$$\text{酶活力单位 (U/mg)} = (\text{OD}_{t=0} -$$

$OD_{t=60s}) \div \text{样品质量}(\text{mg}) \times 1000$

测定结果见表 1。

表 1 鸡蛋清溶菌酶新旧方法提取的结果

产 次	方 法	蛋清质量/g	干产品质量/g	颜 色	产率/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (蛋清)
第 1 批	旧(结晶纯化)	545	0.02	褐 色	0.036 7
第 2 批	旧(结晶纯化)	1 137	0.04	褐 色	0.035 2
第 3 批	旧(非结晶纯化)	1 220	0.207	棕黄色	0.169 7
第 4 批	新(非结晶纯化)	1 179	0.854 5	淡黄色	0.724 8

表 2 溶菌酶活力的测定结果

测 样	测样浓度 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	测样体积 $/\mu\text{L}$	活力 $/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (干产品)
标准溶菌酶	1	5	20 171
标准溶菌酶	1	5.6	20 566
第 1 批	14.3	7	1 169
第 3 批	2.06	8	5 158
第 4 批	2.16	4	15 393.5
	2.16	3	14 033.2
	2.16	4	14 583.0
	2.16	4	13 657.0
	2.16	4	15 740.7
	2.6	5	13 538.5

2 结果与分析

2.1 溶菌酶的提取结果

由表 2 可知,新法(第 4 批)提取的溶菌酶产品的产率比旧的非结晶纯化法^[2](第 3 批)高 4.27 倍,比旧的结晶纯化法^[2]高 19.75 倍。

2.2 产品酶活力的鉴定结果

由表 1 可知,新法第 4 批的产品溶菌酶活力平均为 14 021.0 U/mg。比第 3 批旧法高 2.72 倍,比第 1 批旧法高 12 倍。

2.3 溶菌酶产品的纯度鉴定结果

从图 1 2 的电泳结果可知,标准溶菌酶 A 为 1 条带,产品区带中与标准溶菌酶的区带位置相同者是溶菌酶带。新法 E 的杂蛋白明显少于第 3 批旧法 D 的,溶菌酶浓度也相对提高,如图 2。新旧方法所得产品的杂蛋白区带基本相同,但新法产品 E 中残留的杂蛋白比旧的结晶纯化法 B、C 还要少,如图 1。

新法第 4 批的生产工艺与旧法第 3 批比较,仅仅对透析物调节 pH 值,再加入极少量磷酸盐调节 pH 值,就能去除杂质,使产率提高,产品颜色变白,酶活力提高到 14 021 U/mg 左右,与超滤法基本一致^[4]。

透析液去杂后的浓缩方法,也可采用葡聚糖 G-50 包埋法或者特制的聚丙烯酰胺凝胶粒吸水法。葡聚糖和聚丙烯酰胺凝胶粒经简单处理可反复使用,以降低成本。浓缩液干燥的方法,也可采用不抽真空的其他干燥剂,以不影响酶活性为原则。本法的产率较低(0.7248 g/kg 蛋清),可能是 724 树脂对溶菌酶吸附率低的缘故。若选用对溶菌酶吸附率高的树脂便能提高产量。

3 结 论

(1)本工艺对透析物采用调节 pH 值、加入少量磷酸盐,再调节 pH 值去除杂质的新方法,使产率提高,产品呈淡黄色,酶活力提高到 14021 U/mg 左右,与超滤法基本一致^[4]。

(2)提取液在(40±2)℃真空旋转蒸发,浓缩液于室温干燥不影响酶的活性,比冷冻干燥耗电少;提取溶菌酶后的蛋清回收液能正常食用,磷酸盐、蛋白质洗脱液和盐析后的(NH₄)₂SO₄等废液可回收造肥料,所有这些都大大降低生产成本。

参 考 文 献

1 商业部脏器生化制药情报中心站编著. 动物生化制药学[M]. 北京:人民卫生出版社,1981.173
2 谭竹钧,韩雅莉编著. 动物药物提取制备实用技术[M]. 北京:中国农业出版社,2000.188~189
3 高焕春,吕晓玲,李文英. 鸡蛋清溶菌酶提取工艺及其应用初探[J]. 天津轻工业学院学报,1996(1): 37~40
4 赵玉萍. 蛋清溶菌酶分离工艺的研究[D]. 江南大学硕士学位论文,2002
5 王宪泽著. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京:中国农业出版社,2002.113~117