

酪氨酸酶解液的分级膜分离的研究

徐鑫 赵谋明 杨晓泉

(华南理工大学轻工食品学院, 广州, 510640)

摘 要 利用截留不同分子质量(10 ku、5 ku、3 ku 和 1 ku)的超滤膜将水解度为 11.5% 的酪氨酸酶解液按分子质量大小分为 5 级, 利用 SDS-PAGE 研究了酪氨酸酶解液的分子质量分布及分级膜的分离效果。结果表明, 分级膜分离方法对酪氨酸酶解液中的混和肽类能按照分子量大小进行有效的分离。

关键词 酪氨酸酶, 分级, 超滤, 膜分离

酪氨酸钠(sodium caseinate), 又称干酪素、酪蛋白酸钠, 它的前体是从牛乳中分离制得的酪蛋白, 酪蛋白(casein)是一种富含生物活性肽的蛋白质, 在特异性蛋白酶(如胰蛋白酶等)作用下能够将生物活性肽释放出来得到具有生物活性的酪蛋白生物活性肽。酶解酪蛋白后所释放的活性肽包括: 阿片样肽^[1]、免疫调节活性肽^[2]、促进钙吸收的酪蛋白磷酸肽(CPP)^[3]、ACE 活性抑制肽^[4]、促进乳酸菌生长的肽类^[5]等。

由于具有生物活性的乳源肽类多为寡肽, 分子质量分布在 500~1 500 u 之间, 但是蛋白质酶解液中各种肽类的分子质量分布范围较宽, 不利于有效成分的分离, 而制约了其应用。因此, 寻找简便有效的分离方法成为酶解制备生物活性肽的关键技术。超滤分离法由于在操作过程中不发生相变, 又可在较低的温度下进行, 能耗低, 在众多的分离方法中具有明显的优势。采用不同截留分子质量的超滤膜, 对蛋白质酶解液进行分级分离, 可以对目标活性肽进行分子量范围的定位纯化, 建立低成本高效率的分离方法。

研究中利用不同截留分子质量的超滤膜对酪氨酸酶解液进行分级分离, 根据特定生物活性的分子量的分布实现对其的有效分离, 为生物活性肽的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

酪氨酸酶: 新西兰, 蛋白质含量 85.35%; 胰蛋白酶: Novozymes 公司; 低分子量肽标准物: 英国 Bio-Rad 公司。

1.2 主要仪器及操作条件

第一作者: 博士研究生(赵谋明教授为通讯作者)。

* 广州市攻关项目(No. 2003C12E0041)资助

收稿时间: 2004-10-08, 改回时间: 2004-12-01

VIVAFLOW 50 型板式超滤膜包, 德国 Sartorius 公司, MWCO 分别为 10 ku 和 5 ku; 中空纤维超滤膜。美国 Pharmacia 公司, MWCO 分别为 3 ku 和 1 ku。采用截留液全回流操作方式, 工作压力为 0.12 MPa, 工作温度为 45℃。BT00-300M 型蠕动泵, 保定兰格恒流泵有限公司; BUCHI 全自动凯氏定氮仪, 瑞士 Buchi 公司; Mini-PROTEAN 3 Cell 电泳系统, 英国 Bio-Rad 公司; PHS-3C 精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂; JB-3 定时恒温磁力搅拌器, 上海智光仪器仪表公司; Himac CR-22G 高速离心机, HITACHI 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酪氨酸酶解液的制备

酪氨酸酶水解条件: 胰蛋白酶(酶活力 1.078 IU/mg), 底物浓度 100 g/L, 温度 50℃, 酶用量 E:S = 1:1 000, 水解反应进行 10 h 后, 在沸水中加热 15 min, 灭酶活, 冷却, 然后在转速为 8 000 r/min 的条件下 4℃ 离心 20 min, 取上清液。

1.3.2 分级膜分离方法

取上述水解液的上清液粗滤后, 首先采用 10 000 u 的超滤膜进行全回流超滤分离, 控制出入口的压力在膜的最适值, 操作温度为 45℃, 待膜通量降低到一定程度后终止操作, 取透过液利用截留分子质量逐级减小的超滤膜(5 ku、3 ku 和 1 ku)进行上述操作, 最终使酪氨酸酶的水解上清液按分子质量依次分离为 >10 ku、10~5 ku、5~3 ku、3~1 ku 和 <1 ku 五个部分, 分别收集各分离组分, 冷冻干燥, 测定各级组分的蛋白含量。

1.3.3 水解度(DH)的测定^[6]

甲醛滴定法

$$DH = \frac{h_{\text{tot}}}{h - h_0} \times 100\%$$

式中 h : 水解液中 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{COOH}$ 的含量 (mmol/g); h_0 : 酶解前原料中 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{COOH}$ 的

含量(mmol/g); h_{tot} : 每克原料蛋白的肽键毫摩尔数(mmol/g)。

1.3.4 SDS-PAGE 测定水解物相对分子质量分布^[7]

分离条件:分离胶浓度为 16.5%、浓缩胶浓度为 4%;电泳电压:200 V,电泳时间:45 min。

1.3.5 水解物游离氨基酸的测定^[8]

分别取各水解物原液样品 1.0 mL,加入 0.2 g/mL 的 5-磺基水杨酸 1.0 mL,摇匀,再加 8.0 mL 蒸馏水,摇匀,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液用于游离氨基酸含量测定。

检测条件: PICO-TAG 氨基酸专用柱,柱温:38℃,流动相流速:1 mL/min,检测波长:254 nm,采用梯度洗脱对氨基酸进行分离。

2 结果与讨论

2.1 膜通量的变化

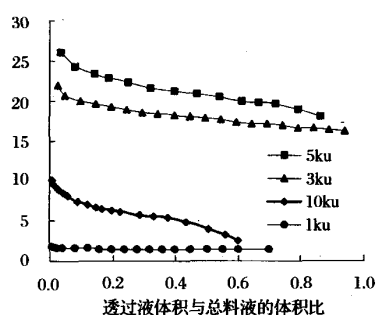


图1 各级超滤膜的膜通量变化

注:图中各级待超滤液的蛋白浓度分别为 10 ku,6.83%; 5 ku,2.78%; 3 ku,2.41%; 1 ku,2.01%。

从图1可看出各级超滤膜的膜通量变化,膜通量按照由大到小依次为 5、3、10、1 ku。虽然 3 ku 较 5 ku 的膜通量略小,但二者均远大于 10 ku 的膜通量,一方面是由于 10 ku 的待超滤液的浓度较高,另一方面是由于所选用的胰蛋白酶对底物水解作用位点的专一性使得酪氨酸钠水解液的上清液中含有未能水解的大分子量肽段,这些肽段经过 10 ku 的超滤膜后都存在于截留液中而不能进入下一级超滤过程,这样 10 ku 的待超滤液的分子量相对于膜的截留分子量的差别会远大于 5 ku 和 3 ku 的值,直接导致膜通量的差别较大。而 1 ku 膜自身的特点决定了其膜通量远小于截留分子量较大的膜的膜通量。

从图1中的4条膜通量衰减曲线中可以看出,1、3、5 ku 的膜通量整体上都是呈现持续平稳的降低过程,其模拟的曲线方程依次为 $y = -0.0816 \ln(x)$

+ 1.3925, $R^2 = 0.9528$; $y = -1.5078 \ln(x) + 16.502$, $R^2 = 0.9764$; $y = -2.3246 \ln(x) + 18.721$, $R^2 = 0.9657$ 。而 10 ku 在透过液与待超滤液的总体积比例为 0.3 左右出现了明显的拐点,其膜通量由突然下降后衰减过程又符合另一种数学模型,在超滤膜分离操作过程中,特别是对压力驱动膜的过程,膜的通量随时间延长不断减小。造成这种现象的主要原因是浓差极化和膜污染,其中膜污染的原因很多,而以凝胶层的形成及膜孔的堵塞最为严重。所以在超滤的起始阶段,10 ku 的膜通量下降主要由浓差极化造成,衰减速率不是很快,当浓差极化呈稳定状态后,大分子溶质在膜上不断累积,在压力的作用下形成凝胶层,使得在超滤后期膜通量急剧下降。

2.2 膜的截留率

超滤过程中,由于存在浓差极化现象,超滤膜对溶质的截留率通常定义为^[9]: $R = (C_m - C_p) / C_m$,但是由于膜面上溶质浓度不易测量,所以膜对溶质截留特征通常由表观截留率 R 表示,它定义为: $R = (C_b - C_p) / C_b$,式中: C_m 、 C_b 、 C_p 分别表示膜面上、截留液中、透过液中溶质的质量浓度, g/L。影响截留率的因素有:分子形状、膜的吸附作用、温度、浓度、pH、离子强度、流动形式、流速、压力以及过滤介质的分子量分布等。

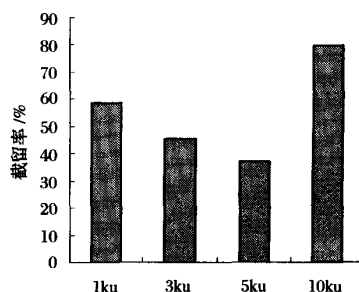
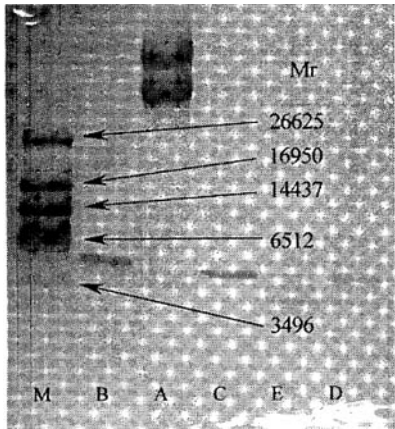


图2 各级超滤膜的截留率

在上述试验中反应体系是相同的,大部分影响截留率的因素是一样的,差别较大的是各级待超滤液的浓度和分子形状及膜的截留分子量,反映在图2中,可以看到 10 ku 的截留率是最大的,余下依次为 1 ku、3 ku、5 ku。适当的截留率是选择膜的指标之一,过低的截留率达不到分离的目的,降低分离效率。所以,对于所选用的膜中 3 ku 和 5 ku 的截留率偏小,1 ku 和 10 ku 的截留率适中,可以考虑在 3 ku 和 5 ku 中减少一级操作,简化分离过程,提高分离效率。

2.3 膜的分离效果的分析

利用 SDS - PAGE 比较了原料以及各级超滤膜截留液的分子量分布,结果见图 3。



M:标准样品;A:酪氨酸钠(未水解);B:10ku 截留液; C:5ku 截留液;D:3ku 截留液;E:1ku 截留液

图 3 酪氨酸钠各级水解物样品的 SDS-PAGE 图片

由图 3 可以看出样品 B(10 ku 截留液)、C(5 ku 截留液)、D(3 ku 截留液)的分子量分布大致在 6 000、4 000、3 000 a,而 E(1 ku 截留液)由于分子量太小未能与染料显色,将 B、C、D 与 A(未水解的酪氨酸钠)比较可以看出原料用胰蛋白酶水解后经过超滤,大分子消失,各级超滤膜基本上是可以按照给出的理

论截留分子量将水解液分为各级产品,达到了预期的目的。表 1 中给出了各个分级组分中不同分子量肽段的分布情况,其中 10 ku 的分离效果较其他 3 级作用明显,同时说明水解的程度相对来说比较低,酶解液中的大分子含量较高,这也是导致此级膜通量较低的原因,而 3 ku 和 5 ku 的分离效果不明显,结合截留率,在实际操作中应予以省略,降低生产成本。

表 1 各级组分的含量(按蛋白质%计)

	M<1ku	1~3ku	3~5ku	5~10ku	>10ku
3 ku 滤液	46.85	51.07	—	—	—
5 ku 滤液	43.27	47.17	5.53	—	—
10 ku 滤液	35.70	38.92	4.56	18.10	—
上清液	6.82	7.44	0.87	3.46	79.49

2.4 分级分离产物的游离氨基酸分析

表 2 结果表明,在各个分级膜分离的产品中,游离氨基酸含量总量随着超滤膜截留分子量的降低而升高,很明显由于游离氨基酸的分子量很小,在逐级分离的过程中得到了浓缩。各级产品中以 Try、Phe、Lys、Ile、Tyr 含量较高,而酪氨酸钠完全水解后的氨基酸含量由多到少依次为:Glu、Leu、Pro、Lys、Asp、Ser、Val、Tyr,这主要是由于所选用的胰蛋白酶相对来说具有很强的水解专一性,酪氨酸钠中的部分肽键不能被水解。

表 2 酪氨酸钠各级分离产品的游离氨基酸含量 mg/100g

氨基酸	1ku 透 过液	1ku 截 留液	3ku 截 留液	5 ku 截 留液	10ku 截 留液	酪氨 酸钠	氨基酸	1ku 透 过液	1ku 截 留液	3ku 截 留液	5 ku 截 留液	10ku 截 留液	酪氨 酸钠
Asp	6.09	13.33	11.54	12.13	8.96	1.02	Val *	86.37	103.82	79.69	83.07	114.95	59.29
Glu	93.79	79.16	78.64	72.61	76.63	14.20	Met *	117.78	32.29	30.29	25.87	24.10	—
Ser	53.24	13.96	15.26	19.68	26.07	—	Cys	124.77	60.43	53.51	49.29	40.08	—
Gly	86.80	7.32	8.79	15.92	48.01	—	Ile	374.72	162.72	140.38	103.62	—	—
His *	131.81	80.31	82.56	90.54	128.12	45.80	Leu *	203.82	148.22	130.76	119.63	133.51	35.09
Arg *	76.99	97.90	85.16	70.13	103.34	11.17	Try	747.81	376.14	385.37	360.94	402.24	248.43
Thr *	25.41	—	—	—	—	—	Phe *	540.95	442.53	397.29	389.65	210.90	194.76
Ala	15.38	49.05	38.34	30.52	40.59	—	Lys *	249.16	292.56	270.28	280.78	244.23	123.46
Pro	68.55	77.53	42.17	34.20	28.81	5.81	总量	3229.44	2098.56	1904.12	1806.77	1711.11	775.16
Tyr	226.01	61.31	54.09	48.19	80.56	36.13							

* 必需氨基酸。

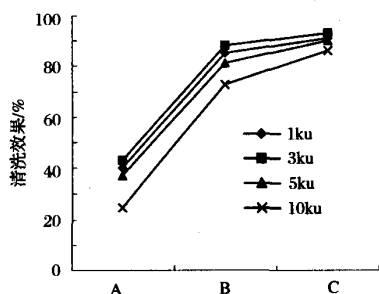
2.5 膜的清洗

及时有效的清洗是解决超滤过程中造成的膜污染的方法,根据酪氨酸钠水解液的性质选择了 3 种清洗剂,图 4 给出了这 3 种清洗剂对各级分离膜的清洗效果。其中碱溶液的清洗效果最为显著,经过清洗后膜的通量可以恢复到原来的 90% 左右,一些吸附能力强的物质和堵塞于膜孔中的物质不能完全洗出。由于 10 ku 的污染较为严重所以相对于另外 3 个膜

它的通量恢复为最低。比较 5 ku 和 1 ku、3 ku 可以看出,由于自身结构特点中空纤维膜要较板框式超滤膜的污染程度低而且易于清洗。

3 结 论

采用分级膜(10、5、3 和 1 ku)分离技术对酪氨酸钠水解液进行超滤分离,通过 SDS-PAGE 验证了该方法可以对酪氨酸钠酶解液中的混和肽类按照分子



A:去离子水; B:NaOH 溶液; C:SDS 溶液

图 4 各种清洗剂的清洗效果

注:清洗温度为室温,清洗时间为 30 min,清洗压力为 0.04 MPa

量不同进行有效的分离,所得到的各级产品的蛋白含量(干基)均大于 90%,由于不同分子质量的肽类具有不同的功能特性,因此,该技术对特定生物活性肽的工业化生产具有指导意义。

考察所选用 4 级超滤膜的膜通量和截留率,兼顾多数生物活性肽的分子量分布范围,可以考虑省却其中 5 ku 这一步骤,简化分离过程,提高分离效率。

参 考 文 献

- 1 Brantl Vetal. Novel opioid peptides derived from casein(β -

casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone[J]. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie, 1979, 360:1 211~1 216

- 2 Meise Hans. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nut-raceuticals for food and pharmaceutical applications[J]. Livestock Production Science 1997(50):125~138
- 3 Meisel, Hans. Overview on milk protein-derived peptides [J]. International Dairy Journal, 1998(8): 363~373
- 4 Pihlanto-Leppälä Anne. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides[J]. Trends in Food Science and Technology, 2000(11):347~356
- 5 St-gelais D, Roy D, Haches et al. Growth of nonproteolytic Lactococcus lactis in culture medium supplemented with different casein hydrolyzates[J]. Dairy Science, 1993, 76:3 327~3 337
- 6 赵新淮. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 179(11):65~67
- 7 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- 8 王 静, 向文胜. 现代农业仪器分析应用技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2000
- 9 Filnn J. Membrane Science and Technology [M]. New York: Plenum Press, 1970

Fractional Ultrafiltration Separation of Sodium Caseinate Peptides

Xu Xin Zhao Mouming Yang Xiaoquan

(Light Industry and Food Engineering Institute, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

ABSTRACT The fractionation of sodium caseinate peptide by ultrafiltration separation was studied. Sodium caseinate peptide products (hydrolysis degree of 11.5%) can be separated into five components (>10 ku, $10\sim5$ ku, $5\sim3$ ku, $3\sim1$ ku, <1 ku) in terms of molecular weight. The molecular weight distribution of each retentate was determined by SDS-PAGE. The result showed that fractional ultrafiltration separation can effectively separate sodium caseinate peptides.

Key words sodium caseinate peptides, fractionation, ultrafiltration, membrane separation

·广 告·

中国(山东)泰安神源企业

神源牌系列酿酒器械产品,有冷酒器、甑锅、夹层锅、盘盖、酒尾分酒器,中、小酒精塔、酒精糟潜热回收装置、酒篓、酒桶、1~100 立方的酒容器、运行罐。承揽酒容器防腐,多种粉碎机,小麦优质大曲块,生料酒曲,灌装机全套流水线,通风机白酒净化器等系列产品。

五岳之首是泰山,酿造美酒用神源

电 话:0538-8311091 8312009

传 真:0538-8312009

手 机:13012749891 13395489269

联系人:肖立长

通信地址:山东省泰安神源开发酿科器械厂

邮 编:271023

网 址: <http://www.zgsyqy.com>