

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.03.027

鸡蛋清卵白蛋白与溶菌酶的两步超滤法分离^{*}

黄群^{1,2} 马美湖¹ 黄茜¹ 耿放¹ 贺梦丽¹

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070; 2. 吉首大学食品科学研究所, 吉首 416000)

【摘要】 研究了两步超滤法分离鸡蛋清中卵白蛋白与溶菌酶的可行性。基于超滤机理分析了超滤过程中初始料液体积分数、pH值和跨膜压力等参数对膜通量、透过液蛋白质质量浓度的影响。在考察膜通量变化确定超滤时间的基础上,通过超滤试验获得最佳工艺条件:初始料液体积分数6.0%,pH值2.5,跨膜压力0.12 MPa。超滤产物纯度、回收率较高,卵白蛋白、溶菌酶的纯度分别为85.72%、87.21%,回收率分别为51.36%、62.58%。试验结果表明,两步超滤法可用于鸡蛋清卵白蛋白与溶菌酶的规模化、高效分离。

关键词: 鸡蛋清 卵白蛋白 溶菌酶 两步超滤法 分离

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)03-0146-06

Separation of Ovalbumin and Lysozyme from Chicken Egg White Using Two-stage Ultrafiltration Technique

Huang Qun^{1,2} Ma Meihu¹ Huang Xi¹ Geng Fang¹ He Mengli¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract

The possibility of using two-stage ultrafiltration technique to separate ovalbumin and lysozyme from chicken egg white was investigated. Based on the mechanism of ultrafiltration, main factors that affecting the permeate flux and total proteins concentration in permeating liquor, such as initial feed concentration, pH value and trans-membrane pressure (TMP) were studied. After ascertaining the ultrafiltration time by examining the change of permeate flux, the optimum ultrafiltration conditions were supposed to be as the follows: initial feed concentration, 6.0%; pH value, 2.5; TMP, 0.12 MPa. In these optimum conditions, purity and yield of ovalbumin was 85.72% and 51.36% respectively, and that of lysozyme was 87.21% and 62.58% respectively, implying that separation efficiency was satisfied. The experimental results show that it is feasible for two-stage ultrafiltration technique to separate ovalbumin and lysozyme from chicken egg white in bulk and high efficiently.

Key words Chicken egg white, Ovalbumin, Lysozyme, Two-stage ultrafiltration technique, Separation

引言

卵白蛋白(又称卵清蛋白)为鸡蛋清中含量最高的蛋白质,占54%~63%,为单体、球状磷酸糖蛋白,相对分子质量45.0 kDa,等电点4.5^[1-2],具有

较高营养价值、良好加工与生物学性能,在免疫学研究和动物细胞培养及抗体制备中有重要作用^[3-4]。溶菌酶相对分子质量14.3 kDa,等电点11.0^[5],能水解细胞壁肽聚糖结构中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4糖苷键,可溶解大多数革

收稿日期:2011-06-07 修回日期:2011-06-29

^{*} 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-41-g22)

作者简介: 黄群,博士生,吉首大学讲师,主要从事食品生物技术与农产品加工研究,E-mail: huangqunlaoshi@126.com

通讯作者: 马美湖,教授,博士生导师,主要从事动物性食品科学与综合利用研究,E-mail: mameihuhn@yahoo.com.cn

兰氏阳性菌的细胞壁而具有溶菌作用^[6~7]。

硫酸铵或硫酸钠沉淀是分离卵白蛋白、溶菌酶的常规方法,可大量分离蛋白,但产品含盐量高,需多次盐析盐溶才能获得高纯度产品。有研究者采用 CMC 阳离子交换树脂以及 DE92-cellulose 或 Q-Sepharose FF 阴离子交换树脂等进行层析,产品纯度高、目标蛋白及副产物的活性都能较好保留,但分离规模有限^[8~12]。Guerin C 等报道,在卵粘蛋白、溶菌酶和卵转铁蛋白的分离过程中,可增加一个步骤同步分离其他蛋白^[13~14]。

超滤技术被认为是鸡蛋清蛋白分离最具潜力的方法之一^[15~18]。本文基于鸡蛋清中主要蛋白质的分子量与等电点的不同,采用两步超滤法联合分离卵白蛋白与溶菌酶。以膜通量、透过液蛋白质质量浓度为评价指标,通过考察初始料液体积分数、pH 值和跨膜压力等参数,优化两步超滤法分离鸡蛋清卵白蛋白与溶菌酶的工艺参数,为鸡蛋清蛋白的高效分离提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜鸡蛋,武汉九峰山养鸡场;卵白蛋白(≥95%),溶菌酶(≥95%),Sigma 公司;Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、NaCl、HCl、NaOH 等均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

SCM300 型超滤杯、聚醚砜超滤膜(PES-50、PES-30),中国科学院应用物理研究所;AR2140 型分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;pHS-3C 型 pH 计,上海精科雷磁有限公司;DU 700 型紫外/可见分光光度计,美国贝克曼库尔特有限公司;ALPHAL 1-4LD 型真空冷冻干燥机,德国 CHRIST 公司;Waters 2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

1.3 分离方法

1.3.1 蛋清制备与预处理

水洗去蛋壳表面污物,手工打蛋后利用分蛋器分离蛋清、蛋黄。收集鸡蛋清时用纱布过滤去除脐带块和碎蛋壳。用 0.2 mol/L NaCl 缓冲液对鸡蛋清进行稀释,缓慢磁力搅拌 30 min;然后用 1.0 mol/L NaOH 或 1.0 mol/L HCl 调节至特定 pH 值,于 4℃、12 000 r/min 冷冻离心 10 min 去除沉淀,取上清液备用超滤。

1.3.2 超滤操作

第 1 阶段,料液经 50 kDa PES 膜超滤。主要截留除去抗生物素蛋白、卵粘蛋白、卵转铁蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂、G₃ 卵球蛋白等(平均分子量为 50~900 kDa);而绝大多数的卵白蛋白、溶菌酶进入

透过液中,成为第 2 步超滤的原料。

第 2 阶段,用 30 kDa PES 膜超滤,主要是将透过液中低分子量(12.7~28 kDa)的蛋白质(如溶菌酶)与高分子量蛋白质分开,卵白蛋白被截留,而溶菌酶透过超滤膜存在于透过液中,冷冻干燥后得卵白蛋白、溶菌酶产物。

超滤装置如图 1 所示。

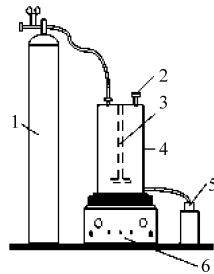


图 1 超滤装置图

Fig. 1 Setup diagram for ultrafiltration apparatus

1. 氮气罐 2. 进料口 3. 搅拌杆 4. 超滤杯 5. 出料口 6. 磁力搅拌器

1.4 测定方法

1.4.1 膜通量

膜通量常用单位时间内通过单位膜面积的透过液体积来表示。试验时改变操作参数,待运行稳定后取样,记录一定时间内的透过液体积,膜通量计算公式^[15]为

$$J_w = \frac{V}{S_m t}$$

式中 J_w ——膜通量, L/(m²·h)

V ——透过液总体积, L

S_m ——膜有效面积, m² t ——过滤时间, h

1.4.2 蛋白质质量浓度

采用考马斯亮蓝法测定透过液蛋白质质量浓度^[17]。

1.4.3 pH 值

利用精密 pH 计测定初始料液 pH 值。

1.4.4 产物纯度

卵白蛋白纯度:色谱柱为赛分 SRT SEC-300 型排阻色谱柱(4.6 mm×300 mm, 5 μm),柱温为 25℃,280 nm 紫外检测器检测,进样量 10 μL,流动相为 0.15 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄(pH 值 7.0)缓冲液,流速 0.4 mL/min。

溶菌酶纯度:色谱柱为 Grace Vydac C4 反相色谱柱(214TP, 5 μm, 250 mm×4.6 mm),柱温 25℃,280 nm 紫外检测器检测,进样量 10 μL,5%~80% 乙腈(含 0.1% 三氟乙酸)进行梯度洗脱。

1.5 试验设计

考察初始料液体积分数、pH 值及跨膜压力等参

数对膜通量、透过液蛋白质质量浓度的影响。设定搅拌速度为 200 r/min,试验在变化的参数条件下进行:初始料液体积分数分别为 7.2%、6.0% 和 4.8%,pH 值分别为 2.5、4.5 和 5.5,跨膜压力分别为 0.08、0.10 和 0.12 MPa。

2 结果与讨论

2.1 膜通量

在初始料液体积分数 6.0%、pH 值 4.5、跨膜压力 0.10 MPa 条件下,料液先进行 50 kDa PES 膜超滤,收集透过液后再进行 30 kDa PES 膜超滤,每隔 10 min 测定膜通量,以确定超滤时间。由膜通量(图 2、3)的变化趋势分析可知,超滤开始时膜通量下降较为平缓,60 min 后快速下降。这主要由于随着超滤的进行,导致膜孔堵塞及形成蛋白浓度极差等^[19-20],因此后继试验的超滤时间选择 60 min。

2.2 初始料液体积分数

在初始料液 pH 值 4.5,跨膜压力 0.10 MPa 条件下,对初始体积分数为 7.2%、6.0% 和 4.8% 的料

液分别进行两步超滤,每隔 10 min 测定透过液体积、计算膜通量,并测定透过液蛋白质质量浓度,试验结果如图 4、5 所示。

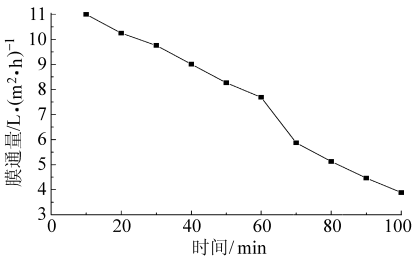


图 2 50 kDa 膜膜通量变化曲线

Fig. 2 Change in the permeate flux of 50 kDa membrane

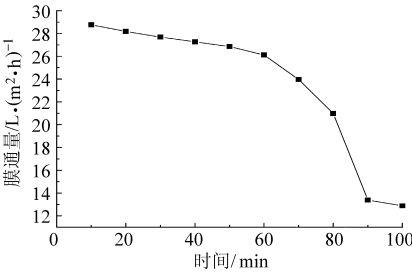


图 3 30 kDa 膜膜通量变化曲线

Fig. 3 Change in the permeate flux of 30 kDa membrane

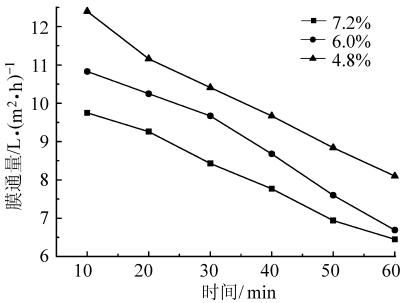


图 4 初始料液体积分数对 50 kDa 膜超滤效果的影响

Fig. 4 Effect of initial feed concentration on ultrafiltration efficiency of 50 kDa membrane

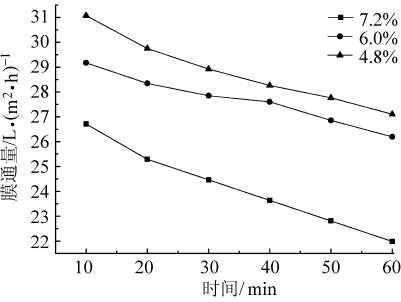
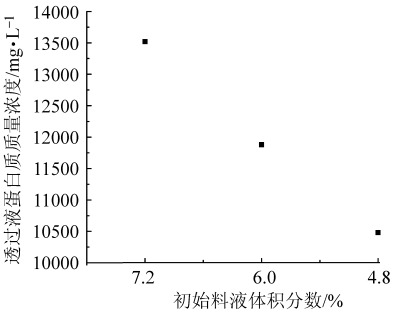


图 5 初始料液体积分数对 30 kDa 膜超滤效果的影响

Fig. 5 Effect of initial feed concentration on ultrafiltration efficiency of 30 kDa membrane

由图 4、5 可知,50 kDa 膜超滤时初始料液体积分数越大所对应的膜通量越小,膜通量下降较为剧烈,不同体积分数料液的膜通量存在明显差异,30 kDa 膜超滤时仍是体积分数最大的料液的膜通量最小。这可能是由于初始料液体积分数越大,黏度也就越大,扩散系数越小,更易在超滤膜表面形成

浓差极化层和凝胶层,使膜表面的渗透压升高,从而导致膜通量下降。另外,随着超滤进行,料液中会有部分蛋白质析出,这些不溶物沉积在膜表面造成膜孔堵塞,从而引起膜通量下降^[15]。同时初始料液体积分数增高使蛋白质分子之间的相互作用力加强,从而削弱蛋白质分子与膜之间的相互作用力,因此

透过阻力增加,膜通量下降^[21]。初始料液体积分数越小其膜通量越大,但透过液蛋白质质量浓度越小。过高的料液稀释倍数也会使透过液中含水率上升,从而使蛋白质浓度下降,给后续干燥带来困难^[22]。综合考虑膜通量和透过液蛋白质质量浓度,初始料液体积分数选择 6.0% 为宜。

2.3 pH 值

在设定初始料液体积分数 6.0%, 跨膜压力 0.10 MPa 条件下,调整料液 pH 值为 2.5、4.5、5.5 后分别进行两步超滤,每隔 10 min 测定透过液体积、计算膜通量,并测定透过液蛋白质质量浓度,试验结果如图 6、7 所示。由图 6、7 可知,在 pH 值 4.5 和 pH 值 5.5 时膜通量均偏低,且透过液蛋白质质量浓度也远低于 pH 值 2.5 时的相应值。在 pH 值 2.5 条件下,偏离卵白蛋白的等电点,卵白蛋白带正电

荷,且鸡蛋清中大部分蛋白质都带正电,蛋白质之间的静电斥力可以弱化膜上的浓差极化现象,使渗透阻力下降,从而增加膜通量和透过液蛋白质质量浓度^[17]。在 pH 值 4.5 条件下,鸡蛋清中主要蛋白质卵白蛋白处于等电点,为离散分子状态,溶液中蛋白质分子间的静电斥力接近于零,处于离散状态的蛋白质分子容易析出、易于在膜表面形成吸附层和凝胶层,导致透过阻力增加,从而使在此 pH 值条件下的膜通量较小,透过液蛋白质质量浓度偏低^[23]。大多数蛋清蛋白的等电点在 4~6 之间,故在 pH 值 5.5 的环境中,蛋白质的总电荷可忽略不计,在膜表面沉积的蛋白质分子之间缺少静电斥力,沉积层变得越来越厚,而浓差极化现象导致阻力加大,进而造成膜通量减少^[24]。综合考虑膜通量和透过液蛋白质质量浓度,pH 值以 2.5 为宜。

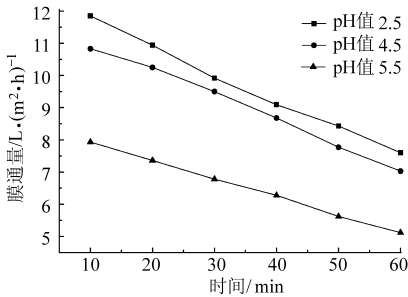


图 6 pH 值对 50 kDa 膜超滤效果的影响

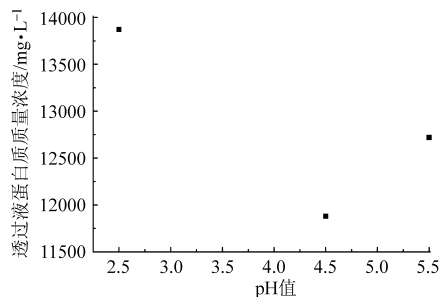


Fig. 6 Effect of pH value on ultrafiltration efficiency of 50 kDa membrane

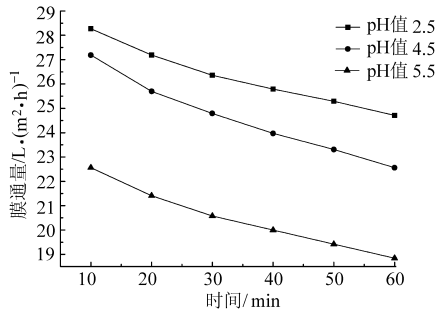


图 7 pH 值对 30 kDa 膜超滤效果的影响

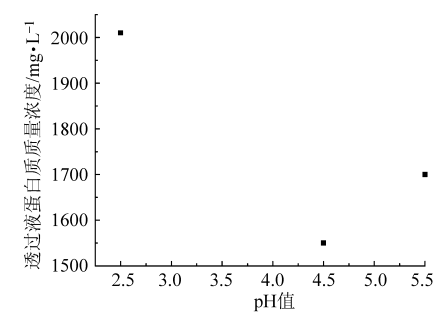


Fig. 7 Effect of pH value on ultrafiltration efficiency of 30 kDa membrane

2.4 跨膜压力

在初始料液体积分数 6.0%、pH 值 2.5 条件下,料液分别在跨膜压力为 0.08、0.10 和 0.12 MPa 下进行两步超滤,每隔 10 min 测定透过液体积、计算膜通量,并测定透过液蛋白质质量浓度,试验结果如图 8、9 所示。

由图 8、9 分析可知,膜通量随压力的增加而上升,这是由于压力增大,膜表面的剪切力增大,使料液流速增加,呈湍流状,从而膜表面的浓差极化程度降低,膜通量上升^[25]。压力是影响膜通量的重要因素,通常在一定压力范围内,膜通量随操作压力的提

高而增加。但超过一定压力范围,会因压力太大而加剧浓差极化现象,从而使蛋白质积聚在膜表面并逐渐形成凝胶层;压力过大同时会加速某些组分在膜孔中的沉积,造成膜孔减小甚至堵塞,最终导致膜有效面积减小,膜通量、蛋白质得率降低^[26]。由压力与透过液蛋白质质量浓度的关系可知,增大压力可同时提高蛋白含量,进而提高蛋白质的分离效果。增大压力可提高膜通量及透过液蛋白质质量浓度,但压力过大会导致超滤后期膜的污染,且带来不必要的能耗损失,故跨膜压力以 0.12 MPa 为宜。

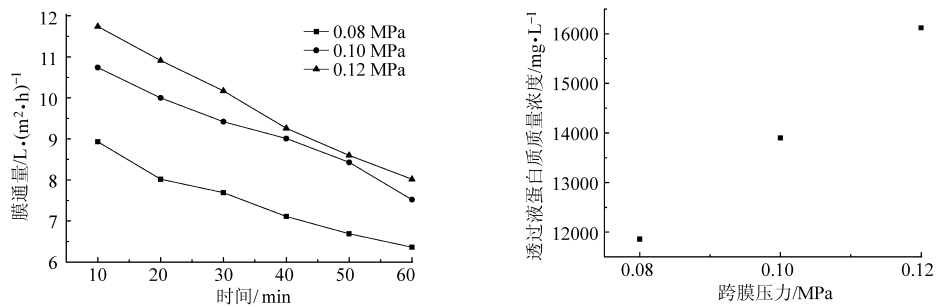


图 8 跨膜压力对 50 kDa 膜超滤效果的影响
Fig. 8 Effect of TMP on ultrafiltration efficiency of 50 kDa membrane

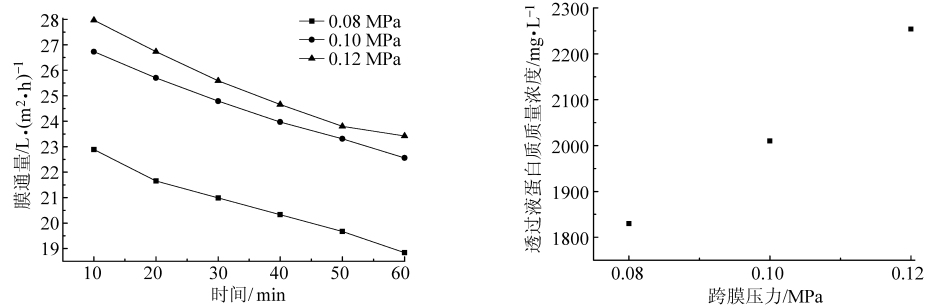


图 9 跨膜压力对 30 kDa 膜超滤效果的影响
Fig. 9 Effect of TMP on ultrafiltration efficiency of 30 kDa membrane

2.5 产物纯度测定

根据以上试验结果,确定两步超滤分离卵白蛋白与溶菌酶的最佳工艺条件为:初始料液体积分数 6.0%, pH 值 2.5,跨膜压力 0.12 MPa。在此条件下超滤分离蛋白,采用高效液相色谱法测定产物纯度。试验结果显示,第 1 步 50 kDa PES 膜超滤后目标蛋白的透过率约为 64.41%。由图 10 可知,第 2 步超滤中截留液的主要组分为卵白蛋白,透过液的主要组分为溶菌酶,卵白蛋白产物纯度为 85.72%,溶菌酶产物纯度为 87.21%;经计算卵白蛋白回收率达 51.36%,溶菌酶回收率达 62.58%,分离效果理想。

3 结束语

采用 50 kDa 和 30 kDa PES 膜两步超滤联合分离鸡蛋清卵白蛋白与溶菌酶,考察初始料液体积分数、pH 值和跨膜压力等操作条件对分离效果的影响。获得最佳超滤工艺条件为:初始料液体积分数 6.0%, pH 值 2.5,跨膜压力 0.12 MPa。在此条件下超滤产物经高效液相色谱法测定,卵白蛋白纯度为 85.72%、回收率达 51.36%,溶菌酶纯度为 87.21%、回收率达 62.58%。试验表明两步超滤法

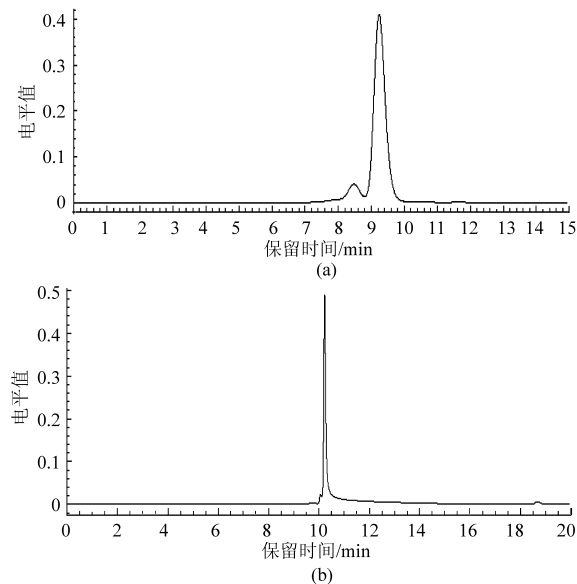


图 10 超滤产物高效液相色谱图
Fig. 10 HPLC profile of ovalbumin and lysozyme
(a) 卵白蛋白 (b) 溶菌酶

分离鸡蛋清卵白蛋白与溶菌酶的效果理想,可用于规模化、联合分离卵白蛋白与溶菌酶,可为鸡蛋清生物活性成分的多级联产提取、高效开发利用提供理论基础与技术依据。

参 考 文 献

1 邱宁,马美湖. 鸡蛋蛋白质组学研究现状与展望[J]. 中国家禽,2011,33(2):4~10.
2 于滨,迟玉杰. 基于 Box-Behnken 模型的卵清蛋白糖基化制备技术[J]. 农业机械学报,2009,40(11):138~143.
Yu Bin, Chi Yujie. Optimization of the preparation of glycosylated egg white protein by box-Behnken model [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(11): 138~143. (in Chinese)

- 3 Masayuki Y, Nobuyuki T, Masaaki H. Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(37): 35 524 ~ 35 530.
- 4 Mine Y, Noutomi T, Haga N. Emulsifying and structural properties of ovalbumin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39 (3): 443 ~ 446.
- 5 Cai Zhaoxia, Yu Haifen, Ma Meihu. Determination of lysozyme at the nanogram level in food sample using resonance rayleigh-scattering method with aunanoparticles as probe [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2011, 78(4): 1 266 ~ 1 271.
- 6 Kyung H Y, Kyu N K, Joon H L, et al. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteron larvae *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26(8): 707 ~ 713.
- 7 Bachali S, Bailly X. The lysozyme of the starfish *Asteria rubens*. A paradygmatic type I lysozyme [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(2): 237 ~ 241.
- 8 Levison P R, Badger S E, Toome D W, et al. Economic consideration important in the scale-up of an ovalbumin separation from hen egg-white on the anionexchange cellulose DE92 [J]. *Journal of Chromatography A*, 1992, 590(1): 49 ~ 58.
- 9 余海芬, 马美湖, 刘岩. 阳离子交换法分离蛋清溶菌酶的研究[J]. *中国家禽*, 2008, 30(24): 22 ~ 25.
- 10 Awade A C, Moreau S, Molle D, et al. Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified protein [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 677 (2): 279 ~ 288.
- 11 Vachier M C, Piot M, Awade A C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix [J]. *Journal of Chromatography B*, 1995, 664(1): 201 ~ 210.
- 12 Awade A C. On hen egg fractionation; applications of liquid chromatography to the isolation and the purification of hen egg white and egg yolk proteins [J]. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-untersuchung Und-forschung A-Food Research and Technology*, 1996, 202(1): 1 ~ 14.
- 13 Guerin C, Brule G. Separation of three proteins from egg white [J]. *Sciences Des Aliments*, 1992, 12(4): 705 ~ 720.
- 14 Ming F, Howell J A, Acosta F, et al. Study on separation of conalbumin and lysozyme from high concentration fresh egg-white at high flow rates by a novel ion-exchanger [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42(9): 1 086 ~ 1 091.
- 15 袁小军, 马美湖, 黄群, 等. 两步超滤法分离鸡蛋清中卵转铁蛋白的研究[J]. *食品与机械*, 2011, 27(2): 125 ~ 128.
- 16 Chiang B H, Su C K, Tsai G J, et al. Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography [J]. *Journal of Food Science*, 1993, 58(2): 303 ~ 306.
- 17 Wan Yinhua, Lu Junren, Cui Zhanfeng. Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration [J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 48(2): 133 ~ 142.
- 18 Lu Junren, Wan Yinhua, Cui Zhanfeng. Strategy to separate lysozyme and ovalbumin from CEW using UF [J]. *Desalination*, 2006, 200(1 ~ 3): 477 ~ 479.
- 19 Guerin-Dubiard C, Pasco M, Hietanen A, et al. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1090(10): 58 ~ 67.
- 20 陈全胜, 赵杰文, 岳鹏翔. 中空纤维超滤膜分离菜籽饼粕中蛋白质的试验[J]. *农业机械学报*, 2006, 37(8): 1 ~ 4.
Chen Quansheng, Zhao Jiewen, Yue Pengxiang. Study on application of hollow fiber ultrafilter in separating protein from rapeseed meal [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2006, 37(8): 1 ~ 4. (in Chinese)
- 21 Datta D, Bhattacharjee S, Nath A, et al. Separation of ovalbumin from chicken egg white using two-stage ultrafiltration technique [J]. *Separation and Purification Technology*, 2009, 66(2): 353 ~ 361.
- 22 Myung S W, Choi I H, Lee S M, et al. Separation of silk proteins and silk oligopeptides by thin film composite ultrafiltration membrane [J]. *Desalination*, 2008, 234(1 ~ 3): 158 ~ 165.
- 23 Molek J, Ruanjaikaen K, Zydney A L. Effect of electrostatic interactions on transmission of PEGylated proteins through charged ultrafiltration membranes [J]. *Journal of Membrane Science*, 2010, 353(1 ~ 2): 60 ~ 69.
- 24 Carmen M, Ruben I, Guadix A, et al. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane [J]. *Journal of Membrane Science*, 2007, 288(1 ~ 2): 28 ~ 35.
- 25 Lin S H, Hung C L, Jiang R S. Effect of operating parameters on the separation of proteins in aqueous solutions by dead-end ultrafiltration [J]. *Desalination*, 2008, 234(1 ~ 3): 116 ~ 125.
- 26 Li Y, Shahbazi A, Charles T, et al. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration [J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 75(4): 574 ~ 580.