

陶瓷膜微滤对马氏珠母贝肉酶解液理化特性的影响

张晓瑜, 杨萍*, 洪鹏志, 周春霞

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室,
水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要:以马氏珠母贝肉蛋白酶解液为原料, 考察200 nm陶瓷膜微滤处理对酶解液色值、澄清度、蛋白质含量和分子量分布的影响。结果表明, 200 nm陶瓷膜微滤处理可以改善酶解液的颜色和澄清度, 可以完全截留分子量15000 u以上的蛋白, 能够截留绝大部分分子量10000 u以上的多肽, 而分子量小于5000 u的多肽在透过液中得到了有效的富集。

关键词:马氏珠母贝肉, 酶解, 陶瓷膜, 微滤

Effects of micro-filtration by ceramic membrane on physicochemical properties of enzymatic hydrolysates of *Pinctada martensii* meat

ZHANG Xiao-yu, YANG Ping*, HONG Peng-zhi, ZHOU Chun-xia

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The effects of micro-filtration by ceramic membrane with pore size of 200 nm on enzymatic hydrolysates of *Pinctada martensii* meat were studied. The results showed that the color value and clarify of the enzymatic hydrolysates were ameliorated and all proteins with the molecular mass of more than 15000 u and most peptides with the molecular mass of more than 10000 u could be cut off and peptides with the molecular mass of less than 5000 u were enriched effectively in the permeation fraction.

Key words: *Pinctada martensii* meat; enzymatic hydrolysis; ceramic membrane; micro-filtration

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)22-0097-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.22.011

陶瓷膜是以氧化铝、氧化钛、氧化锆等材料经过特殊的工艺制备而成的多孔非对称性膜, 陶瓷膜过滤是一种“错流过滤”形式的流体分离过程, 由于陶瓷膜机械强度大、耐磨性好、耐高温、耐酸、耐碱、耐有机溶剂、浓缩倍数高、流速大、易清洗等优点在食品领域的应用日益广泛。目前, 有研究陶瓷膜对果汁的澄清^[1]、蛋白浓缩^[2]、酪蛋白与乳清蛋白的分离^[3]、酱油除杂^[4]的结果报道, 也有研究认为陶瓷膜可以去除大分子物质^[5-6], 使物料稳定性增强, 防止沉淀。但是, 对于陶瓷膜对大分子蛋白或肽的截留情况未见报道。

马氏珠母贝肉蛋白质含量高, 蛋白质营养价值也高, 是优质的蛋白质源, 牛磺酸、多糖等含量高^[7], 已有许多关于利用马氏珠母贝制备海洋调味料^[8-9]、

活性物质^[10-11]的研究报道, 其中大多采用可控酶解法。然而, 马氏珠母贝肉酶解液浑浊情况严重, 颜色深暗, 有腥苦味, 这给开发利用带来极大阻碍, 为此, 研究者对马氏珠母贝肉酶解液澄清、分级与脱腥苦味进行了探讨^[12-13], 并取得了一定的成果。本文采用陶瓷膜微滤处理马氏珠母贝肉酶解液, 考察其对澄清、脱色与分子量分布的影响, 旨在为马氏珠母贝肉酶解液的开发利用前处理提供新途径, 为陶瓷膜在水产蛋白酶解液中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

马氏珠母贝肉 解冻后洗净沥干, 备用; 中性蛋白酶 (20万U/g) 购于广西南宁庞博生物工程有限

收稿日期: 2014-12-26

作者简介: 张晓瑜 (1989-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 水产品高值化加工与利用, E-mail: 799401053@qq.com。

* 通讯作者: 杨萍 (1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 水产品高值化加工与利用, E-mail: 50299052@163.com。

基金项目: 863计划项目 (2013AA102201); 创新强校工程项目 (GDOU2014050203, GDOU2013050313)。

公司; 肽标准品: 磷酸丙糖异构酶 (Triosephosphate isomerase, 26625 u)、肌红蛋白 (Myoglobin, 16950 u)、 α -乳清蛋白 (α -Lactalbumin, 14437 u)、抑肽酶 (Aprotinin, 6512 u)、氧化胰岛素b链 (Oxidized Insulin b chain, 3496 u)、杆菌肽 (Bacitracin, 1423 u) 购于 BIO BAD公司。

WTM-CM-01无机陶瓷膜分离设备 杭州沃腾膜工程有限公司; 陶瓷膜(管) 膜过滤有效面积为 0.12 m²; AKTA purifier100蛋白质快速纯化系统 美国GE公司; UV-8000紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司; 凯氏定氮仪 上海纤检仪器有限公司; 三足式离心机 上海地元离心机有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解工艺流程 取洗净沥干后的马氏珠母贝肉9.52 kg, 根据本实验优化的酶解条件: 按料水比为 1:1.5的比例加入14.28 kg的水, 搅拌均匀后倒入酶解罐中, 升温至55 °C, 按照0.3%比例加入中性蛋白酶28.56 g, 于55 °C酶解3 h。然后升温至85 °C, 灭酶10 min, 冷却后用三足式离心机离心过滤去渣, 所得滤液为酶解液。

1.2.2 陶瓷膜微滤 采用膜孔径为200 nm的无机管式陶瓷膜, 开启泵, 调节频率为50 Hz, 进口压力0.2 MPa左右, 对酶解液进行循环式微滤。当微滤截留液体积约为酶解液体积的10%时, 停止操作, 得到透过液与截留液。

1.2.3 可溶性固形物含量的测定 采用折光法, 手持折光仪进行测定^[14]。

1.2.4 蛋白质含量的测定 采用微量凯氏定氮法^[14]。

1.2.5 色值的测定 以蒸馏水为参照液, 用分光光度计在420 nm波长测定吸光度, 用 $A_{420\text{ nm}}$ 表示^[15]。

1.2.6 澄清度的测定 以蒸馏水为参照液, 用分光光度计在680 nm波长测定透光率, 用澄清度T(%)表示^[16]。

1.2.7 分子量分布分析 采用凝胶色谱法, 检测条件: AKTA purifier 100蛋白分析纯化系统, Superdex peptide 10/300 GL分析柱; 洗脱液: Tris-HCl缓冲液 (pH7.5, 0.02 mol/L); 流速: 0.7 mL/min; 检测波长: 214 nm; 进样量: 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 分子量测定标准曲线

标准品及洗脱体积如表1所示, 以分子量的对数值 (lgMw) 对洗脱体积作线性回归得到分子量曲线方程为: $y = -0.0783x + 4.9232$ ($R^2 = 0.9615$)。

表1 标准物质的分子量和洗脱体积

Table 1 Chromatographic data for preparing standard curve for molecular weight determination

标准品	相对分子质量(u)	lgMw	洗脱体积 (mL)
磷酸丙糖异构酶	26625	4.4253	6.75
α -乳清蛋白	14437	4.1595	9.43
抑肽酶	6512	3.8137	15.23
氧化胰岛素b链	3496	3.5436	19.05
杆菌肽	1423	3.1532	20.85

2.2 微滤前后酶解液理化指标的变化

表2 微滤处理前后酶解液的理化指标

Table 2 Physicochemical index of the hydrolysates before and after micro-filtration

	酶解液	透过液	截留液
可溶性固形物 (%)	4.1	3	7.65
蛋白质含量 (%)	2.85	1.76	3.73
色值	1.395	0.271	1.701
澄清度 (%)	3.7	68.7	2

由表2可知, 酶解液经过陶瓷膜微滤后, 透过液中可溶性固形物含量明显减少, 而截留液中固形物含量较高, 说明酶解液中一些大分子可溶性物质如糖类等不能透过陶瓷膜而被截留。

透过液的蛋白质含量相比酶解液减少, 表明陶瓷膜微滤对于大分子蛋白质有截留作用; 还有可能是在微滤结束时, 有一部分酶解液滞留在管道中, 致使一部分蛋白质留在截留液中造成损失。截留液相较于酶解液有一定程度的浓缩, 蛋白质浓度增加, 含量增加。

马氏珠母贝肉的酶解液呈灰绿色、浑浊、有沉淀, 透过液为淡黄色、澄清透亮、无杂质和沉淀。酶解液经过微滤后, 色值明显减少而澄清度明显增加, 说明陶瓷膜微滤对于酶解液的色值和澄清度均有明显的改善作用。

2.3 酶解液及其透过液和截留液的液相色谱分析

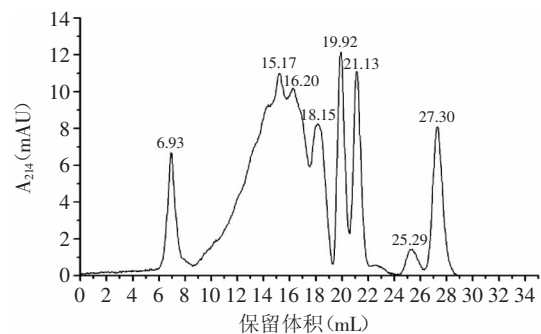


图1 酶解液的液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram of enzymatic hydrolysates

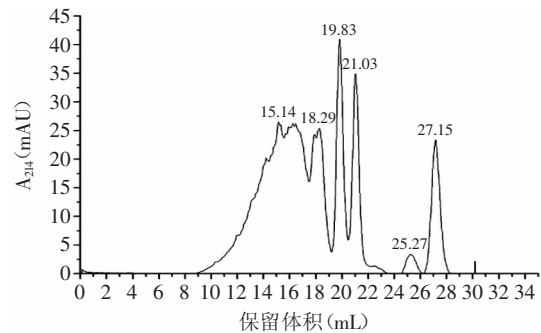


图2 微滤透过液的液相色谱图

Fig.2 Liquid chromatogram of permeate liquid

由图1和图2对比可以看出, 原本出现在酶解液

的色谱图中,保留体积在6.93 mL左右的吸收峰在透过液的色谱图(图2)中消失,而图3截留液的色谱图中,出现了保留体积在6.96 mL左右的吸收峰,可见酶解液经过微滤后,这些大分子的蛋白质被截留。由图2可以看出,透过液吸收峰的保留体积出现在9.69 mL,从标准曲线找到对应的lgMw=4.1893,求得相对分子质量为15463 u,表明酶解液经过微滤后,分子量大于15000 u的蛋白质被全部除去。

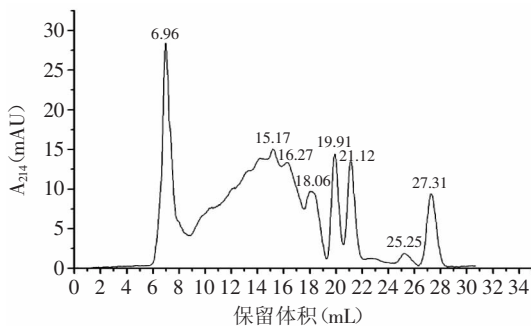


图3 微滤截留液的液相色谱图

Fig.3 Liquid chromatograms of rejected fluid

由图1和图3的对比可知,截留液中保留体积在6.9 mL左右的吸收峰远远高于其他保留体积的吸收峰,而酶解液中,保留体积在6.9 mL左右的吸收峰略低于其他保留体积的吸收峰,说明酶解液经过微滤后,未被分解的大分子蛋白质和一些肽等在截留液中的含量升高,表明微滤对大分子蛋白质和肽具有截留作用。

为了进一步分析陶瓷膜微滤前后酶解液中各肽段的变化,对酶解液、透过液和截留液的色谱图进行积分,利用标准曲线得到肽的相对分子质量分布并计算不同分子量肽段的百分比,结果如表3所示。

表3 酶解液中不同分子量肽段的百分比

Table 3 The percentage of different molecular mass peptide in hydrolysates

不同分子量肽段	酶解液(%)	透过液(%)	截留液(%)
<1000 u	10.23	10.08	4.97
1000~2000 u	8.84	10.55	6.29
2000~2500 u	9.31	12.32	6.24
小计	28.38	32.95	17.5
2500~3500 u	10.27	14.36	8.23
3500~5000 u	17.36	21.94	11.59
小计	27.63	36.3	19.82
5000~6000 u	13.55	12.6	10.11
6000~10000 u	19.79	16.95	24.18
小计	33.34	29.55	34.29
>10000 u	10.64	1.18	28.39

由表3可以看出,与酶解液相比,透过液中肽的相对分子质量分布总体表现为5000 u以下的肽含量增加,5000 u以上的肽含量减少,尤其以10000 u以上的肽含量明显减少。

透过液中主要包括2500~5000 u和小于2500 u这两个区段的肽,分别占36.3%和32.95%。其中2500~5000 u这个区段的肽在透过液中得到了较好的富集,微滤后含量增加较明显,由27.63%增加到36.3%;小于2500 u的小分子肽在微滤后含量也有一定的增加,由28.38%增加到32.95%,表明陶瓷膜微滤对小于2500 u的肽也有一定的富集作用。对比酶解液和透过液可以看出,微滤后,分子量为5000 u以下的肽的含量由56.01%增加到69.25%,表明微滤对5000 u以下的肽有富集作用;而5000~10000 u这个区段的多肽在微滤后含量由33.34%减少到29.55%,说明这个区段的肽段在微滤后有一小部分被陶瓷膜截留,微滤对分子量在5000~10000 u的多肽有一定的截留作用。

截留液中小于2500 u和2500~5000 u这两个区段的肽的含量明显下降,分别由28.38%下降到17.5%、由27.63%下降到19.82%,说明5000 u以下的小分子肽更多的穿过陶瓷膜进入到透过液中,同样说明微滤对5000 u以下的肽具有很好的富集作用。

相比酶解液,截留液中分子量为10000 u以上的肽段的含量明显增加,而透过液中10000 u以上的多肽基本被除去,只有1.18%,表明酶解液经过陶瓷膜微滤后,10000 u以上的大分子肽段基本上能够被陶瓷膜截留。李雨哲等^[2]在研究马氏珍珠贝酶解液澄清工艺中指出,酶解液中的浑浊物质主要是分子量大于10000 u的肽段,壳聚糖能够与分子量大于10000 u的肽段发生静电吸附而使酶解液澄清,由此推测陶瓷膜微滤和壳聚糖处理酶解液有相似的澄清效果。

由表3中酶解液、透过液和截留液的分子量分布可以看出,陶瓷膜微滤并不能严格的按照分子量大小对多肽进行分离。事实上,透过液中也含有大分子肽,而截留液中也含有一些小分子肽。这可能是由于一方面酶解液中肽的分子结构大部分呈线性结构,在膜附近由于肽自身的可变范围较大,再加上跨膜压力的驱动作用,从而使部分相对分子质量较大的多肽通过陶瓷膜进入透过液^[7];另一方面在全回流的微滤方式下,处理一段时间后,大分子蛋白质在膜上不断累积,形成凝胶层,而凝胶层的形成可能会阻止一些相对分子质量较小的肽通过膜^[8],从而使其被截留在微滤截留液中。

3 结论

本研究结果表明,200 nm陶瓷膜微滤处理可以使酶解液中5000 u以上的大分子肽含量减少,5000 u以下的小分子肽含量增加,能完全截留15000 u以上的蛋白质分子,而对于绝大部分10000 u以上的多肽和部分5000~10000 u的肽能有效的截留;对于5000 u以下的小分子肽具有有效的富集作用,其中小于2500 u和2500~5000 u的多肽都得到了很好富集。同时,200 nm陶瓷膜微滤还可以明显改善酶解液的值和澄清度。因此,陶瓷膜微滤技术可以作为一种分离和富集马氏珍珠母贝肉酶解液中活性肽的手段,本

(下转第104页)