

# 微 / 超滤技术浓缩猪血红蛋白水解液

杨万根<sup>1</sup>, 马美湖<sup>2,\*</sup>

(1. 徐州工程学院食品工程学院, 江苏 徐州 221008; 2. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 猪血红蛋白水解液中多肽、血红素等营养成分浓度较低, 有必要对猪血红蛋白水解液进行浓缩。用 0.2 μm 的陶瓷微滤膜和截留相对分子质量  $3.5 \times 10^3$  的超滤膜对猪血红蛋白水解液进行微滤澄清和超滤浓缩, 考察膜滤前后水解液中粗多肽、血红素等成分的含量变化及膜的各项性能表征。结果表明, 0.2 μm 陶瓷膜对猪血红蛋白水解液有明显的澄清效果, 粗多肽得率为 76.150%, 血红素得率为 80.154%, 膜再生效果好, 膜通量恢复率达到 97.42%。超滤对粗多肽和血红素的浓缩倍数分别达到 3.5 倍和 3 倍。因此, 微 / 超滤技术适用于浓缩猪血红蛋白水解液, 能获得富含多肽和血红素的浓缩物。

**关键词:** 微 / 超滤技术; 浓缩; 血红蛋白; 血红素; 多肽

## Condensation of Porcine Hemoglobin Hydrolysates by Microfiltration-ultrafiltration Technology

YANG Wan-gen<sup>1</sup>, MA Mei-hu<sup>2,\*</sup>

(1. College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China;  
2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** It was necessary to condensate porcine hemoglobin hydrolysates due to lower concentration of nutritional peptides and heme in hydrolysates. The ceramic microfiltration membrane with 0.2 μm pores and ultrafiltration membrane with  $3.5 \times 10^3$  cut-off were used for clarification and condensation of hemoglobin hydrolysates, respectively. Contents and characterizations of peptides and heme in hydrolysates after microfiltration and ultrafiltration were investigated. Results showed that the ceramic microfiltration membrane with 0.2 μm pores revealed a significant clarification effect on porcine hemoglobin hydrolysates and provided 76.150% recovery rate for peptides and 80.154% recovery rate for heme. In addition, an excellent regeneration for membrane was observed and the recovered membrane flux was achieved up to 97.42%. Compared to the original hydrolysates, the concentration of peptides and heme in treated hydrolysates by microfiltration and ultrafiltration was increased by 3.5 and 3 folds, respectively. Therefore, microfiltration and ultrafiltration technology could be used for the condensation of porcine hemoglobin hydrolysates to gain peptides- and heme-enriched hydrolysates.

**Key words:** microfiltration/ultrafiltration technology; condensation; hemoglobin; heme; peptides

中图分类号: TS205.4; TQ936.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)24-0026-04

我国是世界第一生猪生产大国, 每年有大量的猪血被当作废弃物丢弃, 造成了严重的环境污染。猪血含有 18.9% 的蛋白质, 其中, 血红蛋白占到全血蛋白质的一半以上。血红蛋白由珠蛋白和血红素组成。生物酶解技术能在降解猪血红蛋白成多肽的同时, 释放出血红素或血红素肽<sup>[1]</sup>。已有研究证明猪血红蛋白多肽具有多种生物活性, 包括降血压活性<sup>[2]</sup>、抗氧化活性<sup>[3]</sup>、抗菌活性<sup>[4]</sup>和增强免疫活性<sup>[5]</sup>等, 而血红素或血红素肽则是一

种优良的补铁营养成分<sup>[6]</sup>。最近模拟人体肠胃消化研究表明, 猪血红蛋白酶解上清液中的血红素生物利用率能达到 91%<sup>[7]</sup>。因此, 开发猪血红蛋白酶法水解产物有着重要的环保意义和巨大的应用前景。但由于水解液中的多肽和血红素等有效成分浓度低, 因此必须在酶解血红蛋白后对水解液进行浓缩处理。本实验对微滤技术澄清和超滤技术浓缩猪血红蛋白水解液进行研究, 考察澄清及浓缩前后水解液中粗多肽和血红素等有效成分的浓度

收稿日期: 2009-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270976)

作者简介: 杨万根(1974—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术与畜禽水产深加工。

E-mail: yangwangen08@163.com

\* 通讯作者: 马美湖(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: mameihuhn@yahoo.com.cn

变化以及膜的各项性能表征,为工业化开发富含多肽和血红素的猪血红蛋白水解物提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

猪血红蛋白提取方法:新鲜猪血抗凝处理,纱布过滤除纤维蛋白,4000r/min离心15min,用生理盐水清洗沉淀物,同样转速离心15min,重复两次,沉淀物冷冻备用。

AS1398中性蛋白酶 北京房山酶制剂厂;血红素标准品(相对分子质量651.96) Sigma公司;次氯酸钠、浓硫酸、甲醛、氢氧化钠和硫酸铜等(分析纯) 国药集团(上海)化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

HH-4数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司;微滤装置(0.2μm陶瓷微滤管) 江苏久吾高科技股份有限公司;超滤装置(截留相对分子质量 $3.5 \times 10^3$ 超滤膜) 湖南农业大学天然产物研究中心;754型分光光度计 上海分析仪器厂;JB300-D型强力电动搅拌机、DS-1型组织捣碎机 上海标本模型厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 猪血红蛋白水解液制备

用适量水稀释猪血红蛋白解冻液,85℃恒温30min变性,捣碎,加水调至8%蛋白浓度,加热至45℃并调节至pH7.5,加入4000U/g的AS1398中性蛋白酶水解,水解过程中滴加碱液保持pH值不变。水解10h后,调pH4.5,90℃加热30min灭酶。4000r/min离心20min得猪血红蛋白水解液。

#### 1.3.2 微滤澄清

80L水解液用微滤装置过滤至9L。测定操作前后粗多肽和血红素含量的变化,记录膜通量的变化。

#### 1.3.3 超滤浓缩

取10L微滤液经超滤装置在0.20MPa压强条件下过滤,直至6.5h。测定操作前后粗多肽和血红素含量的变化,记录膜通量的变化。

#### 1.3.4 粗多肽含量测定

猪血红蛋白水解液主要成分是多肽,另外还含有少量的游离氨基酸和未降解的蛋白质,因此测定的是粗多肽的含量,以改良凯氏定氮法<sup>[8]</sup>测定总氮含量。

粗多肽含量 = 总氮含量  $\times$  6.25

#### 1.3.5 血红素含量测定

采用分光光度法<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.6 膜通量测定

采用秒表计时,用量筒收集滤液,然后换算为L/h。

## 2 结果与分析

### 2.1 微滤前后水解液中有效成分含量的变化

表1 微滤前后猪血红蛋白水解液中有效成分含量的变化

Table 1 Content change of active ingredients in porcine hemoglobin hydrolysates pre- and post-microfiltration

样品	体积(L)	粗多肽			血红素		
		质量浓度 (g/L)	含量 (g)	截留/得率 (%)	质量浓度 (mg/L)	含量 (mg)	截留/得率 (%)
水解原液	78.943	26.355	2080.542		0.849	67.022	
截留液	9.012	51.798	466.803	22.437	1.381	12.446	18.570
过滤液	68.261	23.210	1584.338	76.150	0.787	53.721	80.154

微滤前后水解液成分的含量变化见表1。微滤后,水解液的粗多肽得率为76.150%,血红素得率为80.154%。造成这两种物质损失的主要原因是微滤结束时,留在管道中的水解液必须达到8.5L以上的体积,致使一部分粗多肽和血红素留在截留液中,造成粗多肽和血红素的损失。

### 2.2 超滤前后水解液中有效成分含量的变化

表2 超滤前后猪血红蛋白水解液中有效成分含量的变化

Table 2 Content change of active ingredients in porcine hemoglobin hydrolysates pre- and post-ultrafiltration

样品	体积(L)	粗多肽			血红素		
		质量浓度 (g/L)	含量 (g)	得/滤过率 (%)	质量浓度 (mg/L)	含量 (mg)	得/滤过率 (%)
微滤液	10.000	23.210	232.154		0.787	7.870	
截留液	1.823	81.187	148.004	63.753	2.328	4.244	53.962
过滤液	8.137	10.142	82.525	35.548	0.435	3.539	44.968

超滤前后水解液成分含量变化见表2。浓缩前水解液中粗多肽和血红素的质量浓度分别是23.21g/L和0.787mg/L,浓缩后为81.187g/L和2.328mg/L,质量浓度分别提高了3.5倍和3倍。由于使用的是截留相对分子质量 $3.5 \times 10^3$ 的超滤膜,所以相对分子质量大于 $3.5 \times 10^3$ 的肽分子被超滤膜截留。虽然血红素单体的相对分子质量很小,但是如果血红蛋白在水解时没有完全水解,会形成血红素与肽片段的结合体,致使分子量较大<sup>[10]</sup>;另外,血红素之间或血红素与多肽之间能通过疏水作用聚合,形成相对分子质量比较大的聚合物而被膜截留。膜污染后,膜孔被小分子物料堵塞,有效孔径变小,也会使多肽和血红素通过减少。粗多肽和血红素的得率分别是63.753%和53.962%,可以看出这两种成分有一定的损失,因此需选择合适的超滤膜做进一步的研究。

### 2.3 膜的性能表征

#### 2.3.1 膜通量随时间的变化

膜通量是单位时间内通过膜的料液量。微滤膜的通量变化过程见图1。在开始的0.5h内,微滤的膜通量下降很快,而后下降速度减慢,逐渐趋于平缓。这是因

为微滤时膜受到了水解液中颗粒的污染所致。膜受到污染有两种情形, 分别是料液颗粒在膜表面和膜孔中沉积, 在膜表面沉积形成的污染层为浓差极化层。当微滤开始时, 浓差极化层迅速增厚, 膜孔很快堵塞, 导致其阻力迅速增大, 使膜通量迅速下降。又由于微滤装置采用错流过滤, 使水解液以切线方向流过膜表面, 其产生的高剪切力可使浓差极化层中的颗粒扩散返回主体流, 从而被带出微滤组件。当浓差极化层形成的速度与颗粒返回主体流的速度达到平衡时, 膜表面的浓差极化层不再无限增厚而保持在一个较薄的稳定水平。因此, 一旦浓差极化层达到稳定, 膜通量就将在较长一段时间内趋于稳定。

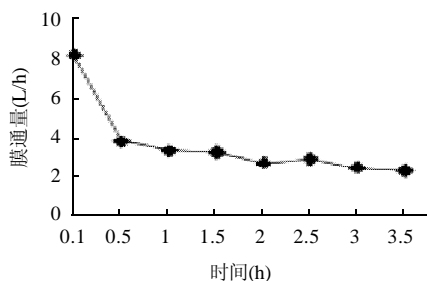


图1 微滤膜通量随时间的变化

Fig.1 Effect of time on microfiltration membrane flux

超滤时的膜通量随时间的变化见图2。随着时间的延长, 超滤膜的通量呈线性下降, 这是因为在膜表面形成了浓差极化层, 且在膜孔内堆积了大量料液颗粒, 随时间的增加, 浓差极化层逐渐增厚, 有效膜孔数逐渐减少, 膜通量呈线性减少。

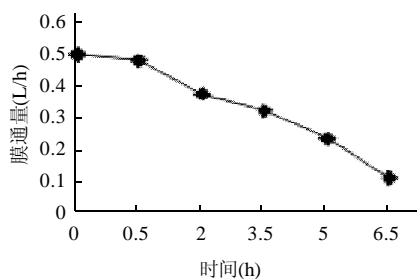


图2 超滤膜通量随时间的变化

Fig.2 Effect of time on ultrafiltration membrane flux

### 2.3.2 膜通量随压力的变化

微滤膜通量随压力变化的过程见图3。对蒸馏水, 膜通量随着压力的增加而增加, 但是对水解液, 开始的时候膜通量缓慢增加, 当压力达到0.2MPa后膜通量又逐渐的下降。超滤的膜通量随压力变化的情况见图4。对蒸馏水和水解液两种溶液, 膜通量都是增加的, 但随着压力的提高, 蒸馏水的膜通量变化幅度比较大,

而水解液的膜通量变化相当平缓。这一现象由膜受污染所致。膜受污染时, 将产生额外的阻力, 该阻力可能达到远大于膜本身的阻力而使渗透流速与膜本身的渗透性无关。

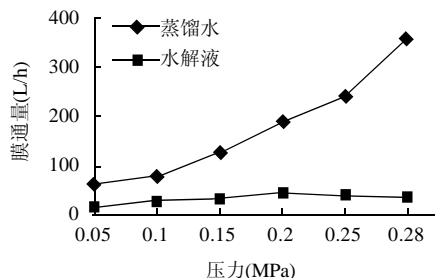


图3 微滤膜通量随压力的变化

Fig.3 Effect of pressure on microfiltration membrane flux

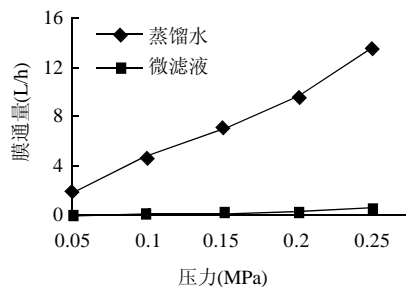


图4 超滤膜通量随压力的变化

Fig.4 Effect of pressure on ultrafiltration membrane flux

### 2.4 膜的再生

微滤开始前陶瓷膜的表征通量为931L/h, 微滤后用pH14的氢氧化钠溶液洗膜0.5h, 用蒸馏水洗净后再用500ml次氯酸钠溶液洗膜0.5h, 蒸馏水洗净, 此时表征膜通量恢复到907L/h, 恢复率达97.42%, 说明膜的再生效果很好。超滤开始前膜的表征通量为153L/h, 超滤后用pH10的氢氧化钠溶液清洗15min, 然后用蒸馏水洗净, 表征膜通量为128L/h, 膜通量恢复率为83.66%, 性能恢复较好。有文献报道, 膜面浓差极化层和吸附层通过碱液和去离子水的冲洗基本可以除去, 对膜孔内部的污染可用SDS溶液, 除去吸附或沉淀在膜材料上的无机盐需用酸性溶液<sup>[11]</sup>。由本实验的清洗效果可以看出, 造成微滤陶瓷膜污染的原因主要是浓差极化层和吸附层的形成, 微滤膜经碱液和次氯酸钠溶液清洗后, 其膜通量恢复率能达到97.42%。而对超滤膜的碱液清洗效果没有达到满意的程度, 说明除了浓差极化层和吸附层之外, 膜孔内部还被小分子的多肽分子或血红素与小肽分子的聚合物堵塞, 因此需要用SDS溶液做进一步的清洗实验。

### 3 结 论

本实验进行了微/超滤技术浓缩猪血红蛋白水解液的研究。研究表明微滤的澄清效果明显,水解液中粗多肽和血红素等有效成分的得率高,膜的再生效果好。黄文凯在比较微滤和板框过滤两种处理方式对大豆粗肽液的澄清处理时,同样发现微滤处理具有蛋白得率较高的优点<sup>[12]</sup>。使用截留相对分子质量  $3.5 \times 10^3$  超滤膜浓缩微滤液,结果发现粗多肽和血红素的浓缩倍数较高,但有一定量的损失。浓差极化是造成膜通量下降的主要原因。虽然,浓差极化作为压力驱动膜过滤中的固有现象难以完全消除,但是浓差极化会大大影响分离或浓缩效率,因此,长期以来人们一直致力于消除浓差极化的研究,并已经取得了一定成效<sup>[13-15]</sup>。如何提高粗多肽和血红素的得率及减轻浓差极化现象有待以后进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 于美娟, 马美湖, 单杨, 等. 生物酶法酶解猪血红蛋白(Hb)的研究[J]. 食品科技, 2006, 31(9): 287-291.
- [2] YU Y, HU J, MIYAGUCHI Y, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin[J]. Peptides, 2006, 27(11): 2950-2956.
- [3] CHANG C Y, WU K C, CHIANG S H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates[J]. Food Chem, 2007, 100(4): 1537-1543.
- [4] 李宝臻, 李兴民, 刘毅, 等. 猪血红蛋白酶解液的抑菌性研究[J]. 食品工业科技, 2006, 26(12): 61-63.
- [5] 李艳伟, 江波, 佟祥山. 酶解猪血红蛋白中活性肽的纯化和功能研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(1): 61-63.
- [6] VAGHEFI N, NEDJAOU M F, GUILLOCHON D, et al. Iron absorption from concentrated hemoglobin hydrolysate by rat[J]. J Nutr Biochem, 2005, 16(6): 347-352.
- [7] 李华, 刘通讯. 富血红素多肽吸收的模拟消化评价[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 207-209.
- [8] 张意静. 食品分析技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [9] 王光亚. 保健食品功效成分检测方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [10] 张亚娟, 杨严俊. 酶解血红蛋白制备血红素的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(4): 252-255.
- [11] RAZAVI S K S, HARRIS J L, SHERKAT F. Fouling and cleaning of membranes in the ultrafiltration of the aqueous extract of soy flour[J]. J Membr Sci, 1996, 114(1): 93-104.
- [12] 黄文凯. 膜分离方法制备免疫活性大豆肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [13] CZEKAJ P, MORES W, DAVIS R H, et al. Infrasonic pulsing for foulant removal in crossflow microfiltration[J]. J Membr Sci, 2000, 180(1): 157-169.
- [14] HWANG K J, WU Y J. Flux enhancement and cake formation in air-sparged cross-flow microfiltration[J]. Chem Eng J, 2008, 139(2): 296-303.
- [15] 邢卫红, 童金忠, 徐南平, 等. 微滤和超滤过程中浓差极化和膜污染控制方法研究[J]. 化工进展, 2000, 19(1): 44-49.