

预处理猪血清 IgG 料液的超滤浓缩研究

罗磊¹, 樊金铃¹, 孙红姣²

(1.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003

2.南阳市土壤肥料工作站, 河南 南阳 473000)

摘要: 本实验对预处理猪血清 IgG 料液超滤浓缩进行了研究。选择螺旋卷式超滤设备, 以截留液全循环错流方式对预处理 IgG 料液进行超滤浓缩。其最佳工艺参数为: 样品 pH 值为 7、温度 50℃、超滤压力 0.1MPa、浓缩倍数为 10 倍。浓缩后得到的样品中蛋白质含量为 2.08%(W/V), IgG 含量为 1.42%(W/V), 具有活性的 IgG 所占比例比超滤前略有下降, 从 91.3% 降低到 87.6%。

关键词: 猪血清; G 型免疫球蛋白; 超滤浓缩

Study on Concentration of Porcine Serum IgG Solution by Ultrafiltration

LUO Lei¹, FAN Jin-ling¹, SUN Hong-jiao²

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Soil and Fertilizer Workstation of Nanyang, Nanyang 473000, China)

Abstract: This research aimed to concentrate the porcine serum IgG solution by spire roll ultrafiltration membrane module, with all retention circulates crosscurrent flow mode. The optimal technological parameters of ultrafiltration concentration are determined as follows: sample solution pH 7, temperature 50 °C, ultrafiltration pressure 0.1 MPa and concentration multiple 10. Total protein content in concentrated sample 2.08% (W/V). IgG content in concentrated sample is 1.42% (W/V), and the proportion of active IgG reduces from 91.3% (W/V) to 87.6% (W/V).

Key words: porcine serum; immunoglobulin G (IgG); ultrafiltration concentration

中图分类号: TS201.2; Q592.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0159-05

免疫球蛋白能够有效地预防和治疗婴幼儿及成人由大肠杆菌和轮状病毒引发的腹泻, 还可以预防龋齿和治疗类风湿关节炎。猪血中免疫球蛋白含量很高, 其中以 G 型免疫球蛋白(immunoglobulin G, 简称 IgG)为主, 其含量为血清蛋白的 17%, 免疫球蛋白总量的 80%。根据国家统计局的数据, 2004 年我国有 140 万吨猪血产量, 而这些猪血并没有得到有效的利用, 因此从猪血中提取免疫球蛋白具有“变废为宝”的作用^[1-2]。

通过复合沉淀分离技术的预处理, 大部分血清蛋白被沉淀除去, 得到的溶液中 IgG 纯度约为 60%~70%, 能够满足常规保健食品的需要, 但料液中 IgG 含量很低, 只有 0.14%~0.15%(W/V), 因此在干燥之前必须进行浓缩, 除去部分水分, 提高干燥效率, 降低成本。

本实验在在蛋白质截留率达到 100% 的情况下, 以超滤通量为衡量指标, 采用截留液全循环错流方

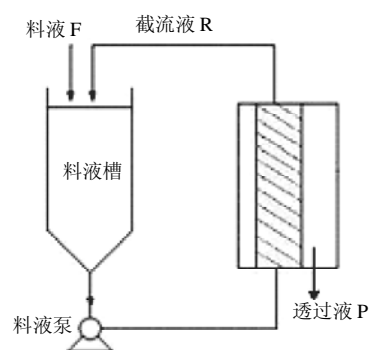


图1 截留液全循环错流方式示意图

Fig.1 Sketch map of all retention circulate crosscurrent flow mode

式(图1), 对预处理的猪血清 IgG 料液的超滤浓缩进行研究^[3-4]。

收稿日期: 2007-07-27

基金项目: 河南科技大学青年科学研究基金项目(2007QN026)

作者简介: 罗磊(1976-), 男, 副教授, 博士, 主要从事生物保健食品、药食同源食品的应用与开发、天然活性物质的研究。E-mail: luolei_cn@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 设备与材料

UF-101 型超滤装置 上海弗立特公司; DL302 调温调湿培养箱 上海吴淞五金厂; MK3 酶标仪 上海雷勃仪器厂; TGL16 台式高速冷冻离心机 中科院武汉科学仪器厂; DY-501 型电泳仪 上海万科科技器材服务部; UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计 尤尼柯仪器有限公司。

超滤料液为复合沉淀分离技术处理后, 3000r/min 离心 15min 得到的猪血上清液。

1.2 超滤装置操作

将经预处理的料液用 $0.45\mu\text{m}$ 的微滤膜抽滤, 除去胶体和其它不溶物后放入滤液桶, 开启泵进行超滤, 未滤过液回流至滤液桶, 滤过液从滤液口流出, 收集测定(等浓度实验时滤过液测定后重新倒入滤液桶, 连续浓缩时另行收集、存放)。

每次过滤结束后按照水洗-碱洗-酸洗的过程进行清洗。

1.3 渗透通量的测定^[3]

超滤运行稳定后, 取样, 记录一定时间的透过液体积, 由式(1)计算渗透通量 J_v :

$$J_v = \frac{V}{TA} \quad (1)$$

式中, J_v 为渗透通量($\text{L}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$); T 为取样时间; V 为透过液体积; A 为膜面积。

1.4 蛋白质浓度的测定^[5]

将样品稀释到一定浓度, 分别在 280nm 和 260nm 比色, 根据公式(2)计算蛋白质的浓度 $C(\text{mg}/\text{ml})$ 。

$$C = 1.45A_{280} - 0.74A_{260} \quad (2)$$

1.5 超滤截留率的测定^[3]

$$\text{截留率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{透过液中蛋白浓度}}{\text{超滤料液中蛋白浓度}}\right) \times 100 \quad (3)$$

1.6 浓缩液蛋白组成^[6]

对样品进行 PAGE 电泳检测。

1.7 IgG 活性测定^[7]

用 ELISA 法测定样品中 IgG 活性。

2 结果与分析

2.1 超滤料液的组成和截留分子量的选择

从电泳条带扫描图可以清楚地看到(图2), 通过预处理得到的料液主要由 IgG 和部分其它 γ -球蛋白组成^[6]。血清蛋白的分子量范围为 65000~900000。预实验发现截留分子量 10000 的 PES 膜能够有效地将血清蛋白截留下来, 同时具有较高的超滤通量(超滤压力为 0.1MPa

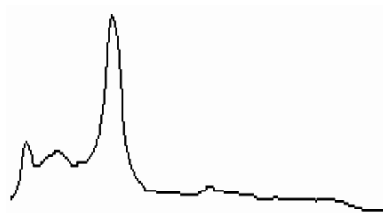


图2 超滤料液 PAGE 电泳条带扫描图

Fig.2 PAGE scanning picture of ultrafiltration liquid

时, 纯水的超滤通量约为 $80\text{L}/\text{m}^2\text{h}$), 足以满足浓缩的需要, 因此选择截留分子量 10000 的 PES 膜进行超滤浓缩。

2.2 样品超滤通量与操作时间的关系

在 0.1MPa 压力、样品 pH 值 7、环境温度 25°C , 保持样品浓度基本不变的条件下, 40min 超滤过程中通量变化如图3所示。通量随超滤时间的延长可分为两个阶段: 超滤开始后的 10~20min 为第一阶段, 渗透通量迅速降低, 最初 10min 内通量下降到原来的 65% 左右; 超滤 10~20min 后, 通量下降趋于平缓, 进入第二阶段, 20~40min 内通量降低了不到原始通量的 5%。

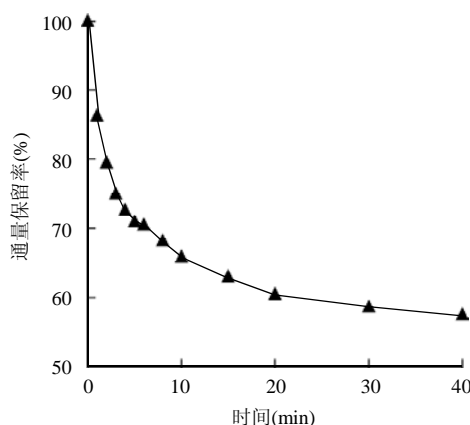


图3 超滤通量和操作时间关系

Fig.3 Relationship between ultrafiltration flux and time

2.3 样品 pH 与超滤通量的关系

聚醚砜(PES)膜带负电, 因此选择合适的 pH 值将减少膜与蛋白质的吸附, 减缓通量的衰减。血清蛋白等电点范围为 4.5~7.4, 其中白蛋白等电点为 4.5, IgG 等电点为 7.4, 因此超滤时将料液调至偏碱性, 使样品中的蛋白质带负电, 同种电荷相斥能够减少蛋白质的吸附^[4]。

在 0.1MPa 压力、环境温度 25°C 、保持样品浓度基本不变的条件下, 对 pH 值分别为 5、7、9 的料液进行超滤浓缩, 其通量变化如图4所示。pH 为 5 时超滤通量下降最快, 其次为 pH 为 9 的样品, 而 pH 为 7 时通量降低的最少。由此可见, 低 pH 值时, 大量蛋白质吸附在超滤膜上, 超滤通量下降最多, 随着 pH 值的

上升, 蛋白质吸附逐渐减少。而 pH 达到 9 时通量损失变大, 可能是样品中金属盐离子与 OH^- 形成的不溶物造成的。超滤结束后膜清洗时超滤通量的恢复情况也证实了这一点(表 1)。水洗以后, 随着料液 pH 的升高, 碱洗时恢复的通量逐渐减少, 这说明在超滤膜上吸附的蛋白质的量随 pH 的升高而逐渐减少, 碱洗后酸洗时超滤通量的恢复却随料液 pH 的升高而增加, 这说明在高 pH 值时, 超滤膜上吸附了较多的金属盐离子与 OH^- 形成的不溶物, 造成了通量的损失。

为了尽可能地减少超滤时通量的损失, 进一步研究

表 1 不同 pH 样品超滤后清洗方式与超滤通量恢复情况的关系

Table 1 Relationship between flux recovery and cleaning method of different pH samples after ultrafiltration

pH	水洗通量恢复		碱洗通量恢复		酸洗通量恢复	
	通量 ($\text{L}/\text{m}^2\text{h}$)	占原始通量 比例(%)	通量 ($\text{L}/\text{m}^2\text{h}$)	占原始通量 比例(%)	通量 ($\text{L}/\text{m}^2\text{h}$)	占原始通量 比例(%)
5	28.3	40.7	18.1	26	0	0
7	22	31.8	7.5	10.8	0.4	0.6
9	27.5	39.6	5.8	8.4	2.2	3.1

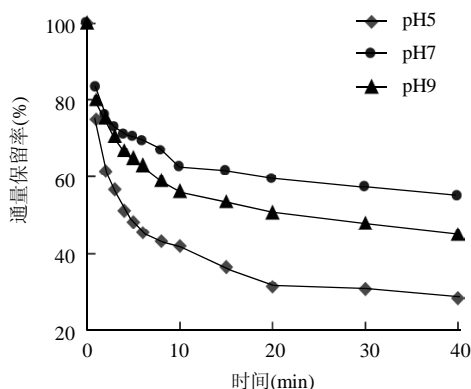


图 4 样品 pH 与超滤通量的关系(I)

Fig.4 Relationship between ultrafiltration flux and sample pH (I)

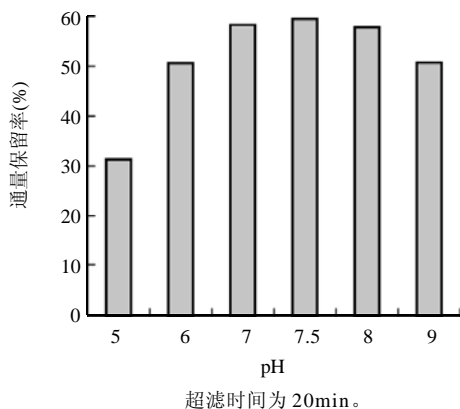


图 5 样品 pH 与超滤通量的关系(II)

Fig.5 Relationship between ultrafiltration flux and sample pH (II)

了超滤通量与样品 pH 的关系。由图 5 可知, 超滤浓缩的最佳 pH 值为 7.5。

2.4 超滤压力与通量的关系

在样品 pH 为 7、环境温度 25°C 、保持样品浓度基本不变的条件下, 选取 0.05、0.1、0.15、0.2MPa 压力分别超滤 40min, 其通量变化如图 6 所示。操作压力越大通量的衰减速率就越快。由超滤 20min 时通量可知(图 7), 随着操作压力的增大, 样品超滤通量逐渐增加, 在 0.15MPa 时达到最大, 而 0.2MPa 时的超滤通量反而略微下降。这说明样品超滤时, 压力的提高可以使起始通量增加, 但同时也加重了浓差极化和膜表面蛋白质的吸附, 造成了通量的迅速衰减。

较高的操作压力虽然可以提高渗透通量, 但也会增加超滤时的能源消耗, 减少超滤膜的使用寿命。综合考虑以上因素, 确定超滤浓缩的最佳操作压力为 0.1MPa。

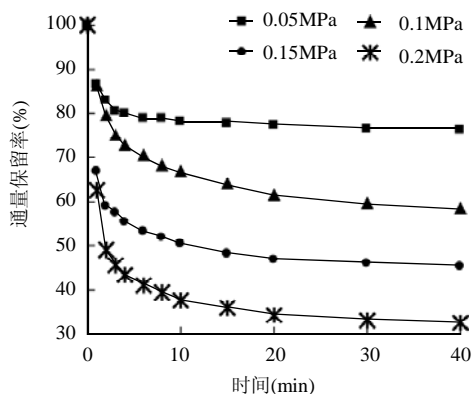


图 6 样品超滤通量与压力关系(I)

Fig.6 Relationship between ultrafiltration flux and pressure (I)

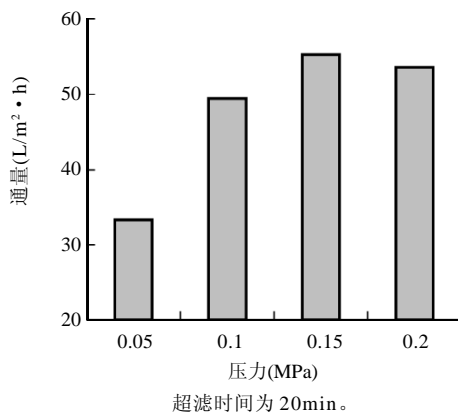


图 7 样品超滤通量与压力关系(II)

Fig.7 Relationship between ultrafiltration flux and pressure (II)

2.5 超滤温度的选择

在 0.1MPa 压力、样品 pH 为 7、保持样品浓度基本不变的条件下, 于 $20\sim 50^\circ\text{C}$ 下进行超滤, 实验结果

如图 8 所示。随着温度的提高, 超滤通量逐渐升高, 但较高的温度会增加能耗。同时考虑到 IgG 的热稳定性和膜的耐热性, 料液超滤浓缩时的最佳温度选择 50℃。

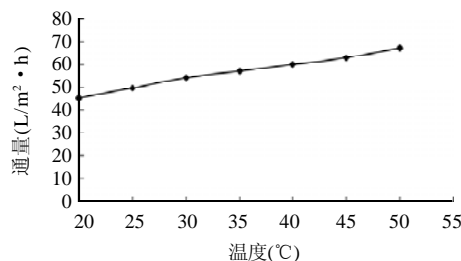


图 8 样品超滤通量与温度关系

Fig.8 Relationship between ultrafiltration flux and temperature

2.6 浓度与超滤通量的关系

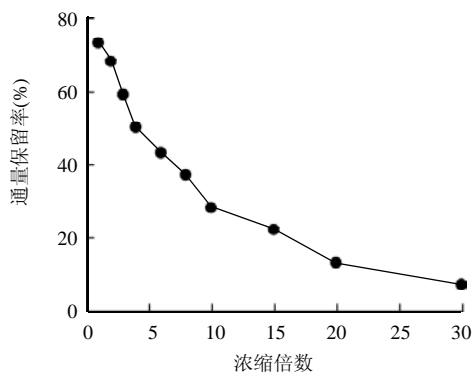


图 9 超滤通量与浓缩倍数的关系

Fig.9 Relationship between ultrafiltration flux and concentration times

将不同浓缩倍数的料液微滤后, 调样品 pH 为 7, 在 0.1MPa 压力、25℃条件下进行实验, 以超滤 20min 时的通量作为不同浓度样品的渗透通量。从实验结果可知(图 9), 随着浓缩倍数的增加, 达到超滤稳定状态(第二阶段)时的通量保留率逐渐降低, 浓缩倍数小于 10 倍时, 通量下降速度较快, 10 倍以后逐渐变慢。

在浓缩过程中发现, 随着浓度的提高, 料液由澄清变为混浊, 当浓缩倍数达到 10 倍时, 浓缩液的混浊现象就很明显了, 浓缩倍数达到 20 倍时, 放置一段时间后, 浓缩液的底部甚至有白色沉淀出现。这可能是由于料液中蛋白质浓度提高以后, 部分蛋白质析出导致料液混浊和沉淀出现。超滤浓缩后, 对较高浓度的料液(浓缩倍数超过 10 倍)进行清洗时, 通量的恢复越来越困难, 清洗所需时间和清洗液用量都大为增加。

考虑到浓缩时间、浓度升高后料液自身的变化、膜的污染以及随后的清洗和超滤通量恢复等问题, 适宜的浓缩倍数为 10 倍。

2.7 连续超滤浓缩实验

在对各影响因素研究的基础上, 选取最佳参数进行了连续超滤浓缩实验: 样品 pH 值为 7.5, 温度 50℃, 压力 0.1MPa。浓缩料液体积 2000ml, 超滤最终体积为 200ml, 浓缩倍数 10。

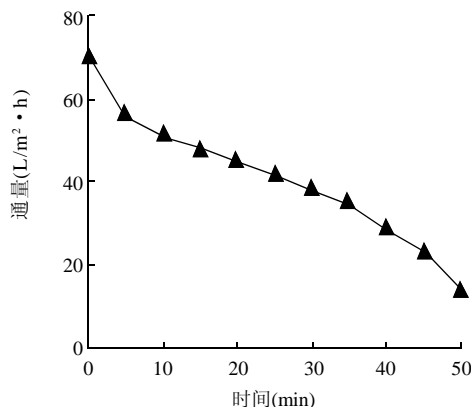


图 10 连续超滤浓缩

Fig.10 Continuous ultrafiltration concentration

从实验结果可以看出(图 10), 随着超滤时间的延长, 渗透通量随着降低。对于 2000ml 的料液, 浓缩一倍(滤过液体积达到 1000ml)的时间约为 23min, 在这一过程中, 通量变化规律与等浓度超滤浓缩时相似(图 3), 但随后通量下降速度逐渐加快, 这是由于截留液中蛋白质的浓度升高造成的。

随着超滤的进行, 提高浓缩倍数所需滤出的滤过液体积逐渐减少, 浓缩一倍的滤过液体积为 1000ml; 而继续浓缩, 将料液中蛋白质浓度提高到 4 倍只须再滤出 500ml 滤过液; 进一步浓缩, 滤出 300ml 滤过液后料液蛋白浓度提高到超滤开始时的 10 倍。因此, 随着超滤时间的延长, 提高样品中蛋白质浓度所需除去的溶剂(水)的量越来越少。因此, 在连续超滤浓缩过程中, 虽然超滤通量不断下降, 但是蛋白质浓度提高的速度却越来越快, 而蛋白质浓度的提高又促使超滤通量进一步下降。

超滤 50min 后料液的体积减少到原来的 10%, 由于对蛋白质的截留率达到 100%, 料液中蛋白质浓度提高了近 10 倍(部分蛋白质吸附在超滤膜上)。检测得知, 此时样品中蛋白质总量为 2.08%(W/V), IgG 为 1.42%(W/V), 具有活性的 IgG 所占比例比超滤前略有下降, 从 91.3% 降低到 87.6%。

超滤后对膜进行清洗, 通量可以恢复到原来的 95%~97%。多次超滤浓缩后, 渗透通量损失较大, 此时可以将滤芯从滤芯中取出, 用大量碱液、酸液长时间浸泡清洗, 可以基本恢复损失的通量。

3 结 论

3.1 选择螺旋卷式超滤设备, 以截留液全循环错流方式进行超滤浓缩, 超滤膜为截留分子量 10000 的 PES 膜, 对于样品中的蛋白质, 截留率可达 100%。

3.2 超滤浓缩的最佳工艺条件为: 样品 pH 值为 7, 温度 50℃, 超滤压力 0.1MPa, 浓缩倍数为 10 倍。浓缩后得到的样品中蛋白质含量为 2.08%(W/V), IgG 含量为 1.42%(W/V), 具有活性的 IgG 所占比例比超滤前略有下降, 从 91.3% 降低到 87.6%。

参考文献:

[1] BUTLER T E. Passive immunity and immunoglobulin diversity in

indigenous, antimicrobial agents of milk-recent development[J]. International Dairy Federation, 1994, 41: 14-50.

[2] 郭本恒, 骆承痒. 免疫球蛋白在食品中应用的趋势[J]. 食品科学, 1993, 14(10): 20-21.

[3] 王湛. 膜分离技术基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

[4] HUISMAN H, PRADANOS P. The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration[J]. J Membr Sci, 2000, 179: 79-91.

[5] 李建武, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.

[6] 罗磊, 朱雅东, 丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 218-222.

[7] 罗磊, 丁霄霖. 直接酶联免疫吸附法检测猪血清 IgG 时某些影响因素的考察与优化[J]. 食品与生物技术, 2006, 25(2): 97-101.