



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104962531 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201510367541. 2

(22) 申请日 2015. 06. 29

(71) 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街 59 号

(72) 发明人 姜瞻梅 许晓曦 刘丽丽 辛岩

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139

代理人 孙皓晨

(51) Int. Cl.

C12N 9/08(2006. 01)

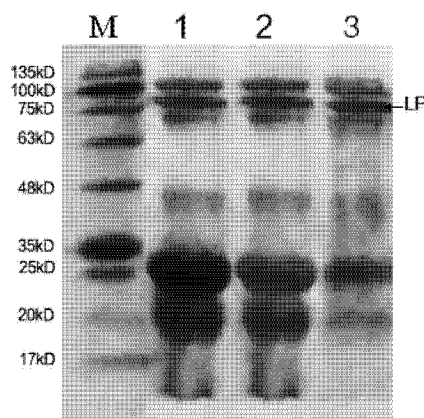
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,以牛乳清为原料,采用硫酸铵盐析方法分离牛乳清中乳过氧化物酶,具体方法为向乳清中添加一定饱和度的硫酸铵,经过一段时间使乳过氧化物酶沉淀,离心使乳过氧化物酶完全沉淀,收集沉淀即获得乳过氧化物酶,将沉淀复溶,经超滤膜去除小的杂蛋白,进一步纯化乳过氧化物酶,通过透析袋脱盐处理,然后冷冻干燥,从而制备出高活性的可用于天然食品添加剂的乳过氧化物酶产品。采用本发明可以直接制得天然的抗菌介质乳过氧化物酶制品,也可以将其作为天然防腐剂直接加入到食品或牙膏等日常用品中。



1. 一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 硫酸铵盐析法分级提取乳过氧化物酶:

除去新鲜的牛乳中的脂肪和酪蛋白后得到乳清,在室温条件下,向乳清中添加 25-85% 饱和度的硫酸铵,离心,去除沉淀,置于搅拌器上不断搅拌使硫酸铵充分溶解,调节体系 pH 到 5.5-8.5,放置 2-10h 使乳过氧化物酶完全沉淀,4℃ 5000-10000r/min 离心 20min 到沉淀即为乳过氧化物酶制品;

(2) 超滤:

将步骤 (1) 中得到的沉淀使用适量去离子水复溶用超滤膜进行超滤分离,以除去杂蛋白,收集截留溶液;

(3) 脱盐处理:

将步骤 (2) 收集的截留溶液装入透析袋内进行脱盐;

(4) 干燥:

将步骤 (3) 脱盐溶液冷冻干燥即制得乳过氧化物酶粗制品。

2. 根据权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中使用硫酸铵饱和度为 65%。

3. 根据权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中使用硫酸铵分级沉淀盐析,具体为使用先用饱和度 25-35% 的硫酸铵盐析,离心,去除沉淀,上清液中继续加硫酸铵至终饱和度为 55-70%。

4. 如权利要求 3 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中使用先用饱和度 30% 的硫酸铵盐析,离心,去除沉淀,上清液中继续加硫酸铵至终饱和度为 65%。

5. 如权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中离心转速使用 7000r/min。

6. 如权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中硫酸铵盐析时间为 8h。

7. 如权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (1) 盐析体系 pH 为 6.5。

8. 如权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中使用分子量 30-50kDa 的超滤膜进行超滤分离,以除去部分分子量小于 30-50kDa 的杂蛋白,收集截留溶液,进而达到浓缩纯化乳过氧化物酶的目的。

9. 如权利要求 8 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中超滤所使用的超滤膜的分子量为 30kDa。

10. 如权利要求 1 所述的采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,其特征在于:所述步骤 (3) 中将步骤 (2) 收集的截留溶液装入分子量 2-14kDa 透析袋内进行脱盐,每隔 1-2h 更换一次去离子水,透析 3-4h 即可。

一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提取乳过氧化物酶的方法,特别涉及一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,本发明属于乳过氧化物酶的提取制备技术领域。

背景技术

[0002] 乳过氧化物酶(lactoperoxidase,以下简称LP)是动物乳中分泌的一种氧化还原酶,并在保护哺乳期乳腺和预防新生婴儿的肠道病原微生物扮演着一个重要的角色,LP能够催化内源的硫氰酸盐(SCN⁻)氧化成具有抗菌性的硫氰酸盐(OSCN⁻)。牛乳中存在的乳过氧化物酶,它能够使卤化物氧化或在过氧化氢存在下氧化硫氰酸盐而形成抗菌介质。乳过氧化物酶携带Fe³⁺- 血红素蛋白,它存在于哺乳动物生物液体,如牛奶,唾液和眼泪中。LP分子量为85kDa,等电点为8.0-8.5,在pH值为6.5时LP带正点,其在乳清中的含量为10-30mg/L。

[0003] 乳过氧化物酶体系在食品行业中应用最广泛的是乳制品,在过去几十年里国内外有大量从乳中提取LP的方法有色谱技术、膜色谱等,色谱技术应用有离子交换,分子筛,免疫亲和色谱,膜色谱应用较多的是离子交换吸附膜。虽然传统这些色谱法提取LP纯度较高,但是仍有很多缺点例如耗时较长,回收率较低及成本昂贵,并不适宜大量生产乳过氧化物酶。想要高效率的从牛乳清中提取LP并不是一个简单的任务,因为乳清中存在大量的杂蛋白给分离带来了困难,因此从乳清中分离LP迫切的需要一个效率高、成本低、开发潜力大的方法。

[0004] 盐析沉淀法是酶分离纯化过程中最常用的方法,其原理是在高浓度的盐溶液中,大量盐离子使水浓度相对降低,蛋白质水化作用减弱,相互凝聚沉淀出来,由于蛋白质水化作用与蛋白质本身的分子量、等电点等物化常数有关,所以不同蛋白质在不同盐析条件下的析出程度也不同,从而达到分离目的。盐析法具有成本低、不需要昂贵设备、操作简单安全等特点,适用范围十分广泛。国内有关于用硫酸盐析法分离大豆酸沉蛋白和羔羊皱胃酶的报道,但是还没有报道用其分离乳过氧化物酶的。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服上述现有技术缺陷,提供一种可以用于工业化生产高回收率和纯化倍数可用于食品工业的乳过氧化物酶提取方法。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0007] 以牛乳清为原料,以硫酸铵盐析法为提取手段,确定硫酸铵盐析法中最佳盐析条件下饱和度、盐析时间、最佳转速、体系pH的工艺条件,并比较了硫酸铵盐分级沉淀与直接一次用65%硫酸铵饱和度对LP酶活回收率和纯化倍数的影响。采用超滤技术进行进一步纯化,最后透析脱盐和冷冻干燥制得成品,即原料乳清→硫酸铵盐析法分级沉淀提取乳过氧化物酶→沉淀溶解→溶液使用超滤分离→收集截留溶液→透析脱盐→冷冻干燥→乳过氧化物酶粗产品。

[0008] 具体的,本发明的一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法,包含以下步骤:

[0009] (1) 硫酸铵盐析法分级提取乳过氧化物酶:

[0010] 除去新鲜的牛乳中的脂肪和酪蛋白后得到乳清,在室温条件下,向乳清中添加25-85%饱和度的硫酸铵,离心,去除沉淀,置于搅拌器上不断搅拌使硫酸铵充分溶解,调节体系pH到5.5-8.5,放置2-10h使乳过氧化物酶完全沉淀,4℃ 5000-10000r/min离心20min到沉淀即为乳过氧化物酶制品;

[0011] (2) 超滤:

[0012] 将步骤(1)中得到的沉淀使用适量去离子水复溶用超滤膜进行超滤分离,以除去杂蛋白,收集截留溶液;

[0013] (3) 脱盐处理:

[0014] 将步骤(2)收集的截留溶液装入透析袋内进行脱盐;

[0015] (4) 干燥:

[0016] 将步骤(3)脱盐溶液冷冻干燥即制得乳过氧化物酶粗制品。

[0017] 在本发明中,优选的,所述步骤(1)中使用硫酸铵饱和度为65%。

[0018] 在本发明中,优选的,所述步骤(1)中使用硫酸铵分级沉淀盐析,具体为使用先用饱和度25-35%的硫酸铵盐析,离心,去除沉淀,上清液中继续加硫酸铵至终饱和度为55-70%。

[0019] 在本发明中,优选的,所述步骤(1)中使用先用饱和度30%的硫酸铵盐析,离心,去除沉淀,上清液中继续加硫酸铵至终饱和度为65%。

[0020] 在本发明中,优选的,所述步骤(1)中离心转速使用7000r/min。

[0021] 在本发明中,优选的,所述步骤(1)中硫酸铵盐析时间为8h。

[0022] 在本发明中,优选的,所述步骤(1)盐析体系pH为6.5。

[0023] 在本发明中,优选的,所述步骤(2)中使用分子量30-50kDa的超滤膜进行超滤分离,以除去部分分子量小于30-50kDa的杂蛋白,收集截留溶液,进而达到浓缩纯化乳过氧化物酶的目的。

[0024] 在本发明中,优选的,所述步骤(2)中超滤所使用的超滤膜的分子量为30kDa。

[0025] 在本发明中,优选的,所述步骤(3)中将步骤(2)收集的截留溶液装入分子量2-14kDa透析袋内进行脱盐,每隔1-2h更换一次去离子水,透析3-4h即可。

[0026] 本发明与现有技术不同之处在于本发明取得了如下技术效果:

[0027] 采用本发明提取的乳过氧化物酶粗产品为淡黄色粉状物,乳过氧化物酶的酶活回收率和纯化倍数分别达到79.25-85.21%和4.08-4.58倍。

[0028] 通过上述提取工艺可以直接获得回收率较高的乳过氧化物酶,可以直接制得天然的抗菌介质乳过氧化物酶制品,也可以将其制品作为天然防腐剂直接加入到食品中。

[0029] 通过上述提取方法可以直接获得回收率较高的乳过氧化物酶,可以直接制得天然的抗菌介质乳过氧化物酶制品,也可以将其制品作为天然防腐剂直接加入到食品和牙膏等日用品中。

[0030] 下面结合附图对本发明作进一步说明。

附图说明

[0031] 图 1 为 SDS-PAGE 电泳图谱分析；

[0032] 注：泳道 M 为标准物质 Marker 图谱，泳道 1 为乳清样品，泳道 2 为二步盐析后所得的乳过氧化物酶，泳道 3 为二步盐析并经过 30kDa 分子量超滤膜后的乳过氧化物酶；图谱左侧的一系列数字代表 Marker 的分子量（单位：kD）；

[0033] 图 2 为不同饱和度硫酸铵对 LP 分离效果的影响；

[0034] 注：同一曲线标注无相同字母者差异显著 ($p < 0.05$)；

[0035] 图 3 为转速对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响；

[0036] 注：同一曲线标注无相同字母者差异显著 ($p < 0.05$)；

[0037] 图 4 为盐析时间对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响；

[0038] 注：同一曲线标注无相同字母者差异显著 ($p < 0.05$)；

[0039] 图 5 为盐析体系 pH 对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响；

[0040] 注：同一曲线标注无相同字母者差异显著 ($p < 0.05$)；

[0041] 图 6 硫酸铵盐分级沉淀 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响；

[0042] 注：同一曲线标注无相同字母者差异显著 ($p < 0.05$)。

具体实施方式

[0043] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0044] 实施例 1 乳过氧化物酶的提取

[0045] (1) 硫酸铵盐析法提取乳过氧化物酶：

[0046] 除去新鲜的牛乳中的脂肪和酪蛋白后得到乳清，在室温条件下，向乳清中先添加 30% 饱和度硫酸铵，离心，去除沉淀，上清液中继续加硫酸铵至终饱和度为 65%，置于搅拌器上不断搅拌使硫酸铵充分溶解，调节体系 pH 到 6.5，放置 8h 使乳过氧化物酶完全沉淀，4℃ 7000r/min 离心 20min 到沉淀即为乳过氧化物酶制品，并计算其酶活回收率和纯化倍数；

[0047] (2) 超滤：将步骤 (1) 中得到的沉淀进行溶解，溶解后得到的溶液置于分子量 30kDa 的超滤膜，进行超滤分离，除去部分分子量小于 30kDa 的杂蛋白，收集超滤膜所得的截留溶液，进而达到浓缩纯化乳过氧化物酶的目的；

[0048] (3) 脱盐处理：将上述截留溶液装入分子量 10kDa 透析袋内进行脱盐，每隔 1-2h 更换一次去离子水，透析 3-4h；

[0049] (4) 干燥：

[0050] 将脱盐溶液冷冻干燥即制得乳过氧化物酶粗制品。

[0051] 结果验证：

[0052] 1、SDS-PAGE 电泳图谱分析：

[0053] 蛋白标准品、牛乳清、二步盐析后所得的乳过氧化物酶和二步盐析并超滤后所得的乳过氧化物酶的 SDS-PAGE 图谱见图 1，由图 1 可以看出牛乳清所在泳道处有很多条带，即

含有多种蛋白质成分；硫酸铵盐析结合超滤分离后的电泳条带明显减少，所获得的条带接近报道的 LP 分子量为 85kDa 左右，这表明本发明的一种采用超滤法辅助硫酸铵盐析提取乳过氧化物酶的方法是分离乳过氧化物酶的有效方法。

[0054] 2、乳过氧化物酶的酶活测定

[0055] 取 3mL 浓度为 1mmol/L 的 ABTS (溶于 0.1mol/L pH 6.0 的磷酸盐缓冲溶液) 至反应试管中，然后加入 0.1mL 的浓度为 3.2mmol/L 的 H_2O_2 ，再加入适当稀释的反应酶液 0.1mL (用 0.1mol/L pH 6.0 的磷酸盐缓冲溶液稀释)，充分混合后，开始计时，反应 2min 后立即测定吸光度值，在波长为 412nm 处，以 ABTS 和适当稀释酶液的混合液为空白对照组 (在室温条件下)。LP 的酶活力单位是 U/mL，公式为：

$$[0056] \quad \text{酶活力} = \Delta A_{412} \times V \times S / \epsilon \times V_1 \times D \times 2$$

[0057] 式中 ΔA_{412} 为 2min 吸光度的变化，V 为反应液的总体积，S 为样品酶液的稀释倍数， V_1 是样品酶液的添加体积，D 是光路径为 1cm，2 代表时间是 2min， $\epsilon = 32.4 \text{mmol/L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[0058] 3、乳过氧化物酶的酶活性回收率和纯化倍数的计算

$$[0059] \quad \text{AR} = \frac{(L_s)V_s}{(L_i)V_i} \times 100$$

[0060] 式中 AR 为 LP 的酶活回收率， L_s 和 L_i 分别代表盐相溶液和乳清中 LP 酶活， V_s 和 V_i 分别代表盐相溶液体积和乳清体积。

[0061] 结果表明采用本发明方法提取得到的乳过氧化物酶粗产品为乳白色粉状物，乳过氧化物酶的酶活回收率达到 85.21%。

$$[0062] \quad \text{PF} = \frac{(L_s)P_i}{(L_i)P_s}$$

[0063] 式中 PF 为纯化倍数， L_s 和 L_i 分别代表盐相溶液和乳清中 LP 酶活， P_s 和 P_i 分别代表盐相溶液和乳清中蛋白浓度。

[0064] 结果表明采用本发明方法提取得到的乳过氧化物酶粗产品为乳白色粉状物，乳过氧化物酶的纯化倍数达到 4.08 倍。

[0065] 实施例 2 乳过氧化物酶的提取

[0066] (1) 硫酸铵盐析法提取乳过氧化物酶：

[0067] 除去新鲜的牛乳中的脂肪和酪蛋白后得到乳清，在室温条件下，向乳清中先添加 25% 饱和度硫酸铵，离心，去除沉淀，上清液中继续加硫酸铵至终饱和度为 60%，置于搅拌器上不断搅拌使硫酸铵充分溶解，调节体系 pH 到 6.0，放置 6h 使乳过氧化物酶完全沉淀，4℃ 8000r/min 离心 20min 到沉淀即为乳过氧化物酶制品，并测定其酶活回收率和纯化倍数；

[0068] (2) 超滤：将步骤 (1) 中得到的沉淀进行溶解，溶解后得到的溶液置于分子量 50kDa 的超滤膜，进行超滤分离，除去部分分子量小于 30kDa 的杂蛋白，收集超滤膜所得的截留溶液，进而达到浓缩纯化乳过氧化物酶的目的；

[0069] (3) 脱盐处理：将上述截留溶液装入分子量 5kDa 透析袋内进行脱盐，每隔 1-2h 更换一次去离子水；

[0070] (4) 干燥：

[0071] 将脱盐溶液冷冻干燥即制得乳过氧化物酶粗制品。

[0072] 试验例 1 硫酸铵饱和度对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响

[0073] 添加硫酸铵饱和度在 25-85% 之间, 研究不同饱和度硫酸铵对 LP 分离效果, 具体结果见图 2, 其余步骤同实施例 1, 酶活回收率和纯化倍数的具体计算公式如实施例 1 所述。

[0074] 由图 2 可以看出硫酸铵饱和度在 25% -30% 时, 其沉淀中几乎不含 LP, 随着其饱和度的逐渐增加, LP 酶活回收率和纯化倍数也逐渐增加, 当硫酸铵饱和度在 35% -50% 之间时, LP 盐析沉淀很少, 当硫酸铵饱和度为 60% -65% 时其酶活回收率最大, 达到 81.84% -84.15%, 与其他饱和度条件差异显著 ($P < 0.05$), 当硫酸铵饱和度为 65% 时, LP 的纯化倍数达到最大, 与其他饱和度条件差异显著 ($P < 0.05$), 但当其饱和度超过 65% 时, LP 酶活回收率和纯化倍数开始下降, 尤其是 LP 的纯化倍数下降趋势很明显, 这是因为随着硫酸铵饱和度的进一步增加, 乳清中的大部分杂蛋白均被盐析沉淀, 从而使 LP 的纯化倍数下降明显。结合 LP 酶活回收率和纯化倍数的综合影响, 当硫酸铵饱和度 65% 时对 LP 纯化效果最佳。

[0075] 试验例 2 转速对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响

[0076] 在不同转速大小的情况下, 盐析沉淀乳清中杂蛋白的情况不同, 研究不同转速大小对 LP 分离纯化的影响, 结果见图 3 所示, 其余步骤同实施例 1, 酶活回收率和纯化倍数的具体计算公式如实施例 1 所述。

[0077] 由图 3 可以看出在转速 5000r/min 时 LP 明显没被完全离心沉淀下来, 随着转速的增加, LP 的酶活回收率和纯化倍数增加, 其中当转速达到 7000r/min 时, LP 酶活回收率和纯化倍数都达到最高, 当转速进一步增加, 酶活回收率基本保持不变 ($P < 0.05$), 但 LP 纯化倍数随着转速增加而减小, 这可能因为在大的离心力条件下大部分乳清中的杂蛋白均沉淀下来, 进而减小了 LP 的纯化倍数, 而小的离心力条件下 LP 又未能完全沉淀, 所以纯化倍数也相对较低, 转速 7000r/min 时 LP 刚好全部沉淀下来, 当转速 7000r/min 时 LP 酶活回收率和纯化倍数条件最优, 故离心时转速选择 7000r/min。

[0078] 试验例 3 盐析时间对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响

[0079] 盐析时间是影响 LP 盐析效果的一个重要因素, 通常一种酶的盐析是需要一定的盐析时间才能完成的, 研究不同盐析时间对 LP 分离纯化的影响, 结果见图 4 所示, 酶活回收率和纯化倍数的具体计算公式如实施例 1 所述。

[0080] 由图 4 可知, 盐析时间由 2h 增加到 10h, LP 的酶活回收率在 8h 时最高, 低于 8h 或高于 8h 回收率均有所降低, 这是因为当低于 8h 时, LP 不能够完全的盐析, 而盐析时间过长, 达到 10h 时将影响 LP 酶活, 使回收率有所降低。随着盐析时间的增加, LP 的纯化倍数也有所下降, 这可能因为随着盐析时间的增加乳清中的杂蛋白也逐渐沉淀析出, 但盐析时间 8h 时, 这个时间点 LP 大量沉淀, 故盐析在 8h 时 LP 纯化倍数也较高。

[0081] 试验例 4 体系 pH 对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响

[0082] pH 是对 LP 活性具有一定的重要影响, 因此也将是影响盐析效果的一个重要的条件, 结果见图 5 所示, 酶活回收率和纯化倍数的具体计算公式如实施例 1 所述。

[0083] 由图 5 可以看出, 当 pH 为 6.5 时 LP 酶活回收率和纯化倍数达到最高, 分别为 88.69% 和 2.56 倍, 与其他 pH 值盐析效果差异显著 ($P < 0.05$), pH 低于或高于 6.5 时 LP 的

回收率和纯化倍数均下降,这可能是因为 pH 6.5 最有利于 LP 的酶活,当 pH 过高或过低时 LP 的酶活受到影响,所以当 pH 为 6.5 时盐析效果最佳。

[0084] 试验例 5 硫酸铵盐分级沉淀 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响

[0085] 硫酸铵盐分级沉淀是先用 30% 饱和度硫酸铵盐盐析,离心去除沉淀,上清液再用 65% 饱和度硫酸铵盐盐析,结果如图 6 所示,酶活回收率和纯化倍数的具体计算公式如实施例 1 所述。

[0086] 由图 6 可以看出,二步盐析法与一步盐析法效果相比,LP 酶活回收率差异不显著 ($P>0.05$),即 LP 在此过程中损失较小,这也与图 2 中 30% 饱和度硫酸铵盐不能盐析出 LP 结果一致,故损失可忽略不计,二步盐析在处理过程中去除了一些杂蛋白,纯化倍数增加显著 ($P<0.05$),纯化倍数由 2.56 倍增加到 3.13,从而得到二步盐析法效果较佳。

[0087] 试验例 6 超滤法对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响

[0088] 使用超滤膜对硫酸铵盐析提取出的 LP 进一步纯化处理,研究超滤对 LP 酶活回收率和纯化倍数的影响,其余步骤同实施例 1,酶活回收率和纯化倍数的具体计算公式如实施例 1 所述。

[0089] 试验结果如下表 1 所示:

[0090]

	乳清	两步盐析所得 LP	超滤膜分子量 30kDa 的 截留液	超滤膜分子量 50kDa 的 截留液
体积 (mL)	50.00	10.00	5.50	5.10
酶活 (U/mL)	5.50 ± 0.21	23.58 ± 2.13 ^a	42.62 ± 4.04 ^b	42.74 ± 2.49 ^b
总酶活	275.05	235.82	234.38	217.99
LP 酶活回收率 (%)	--	85.74 ± 7.75 ^a	85.21 ± 8.08 ^b	79.25 ± 4.62 ^a
蛋白浓度 (g/L)	1.95	2.67	3.71	3.31
比活力 (U/mg)	2.82	8.82	11.48	12.90
纯化倍数	--	3.13 ± 0.28 ^a	4.08 ± 0.39 ^b	4.58 ± 0.27 ^b

[0091] 注:表中同行字母相同代表差异不显著 ($P>0.05$),不相同代表差异显著 ($P<0.05$)。

[0092] 由表 1 所示,使用分子量 30kDa 和 50kDa 的超滤膜使盐析沉淀所得 LP 的纯化倍数由 3.13 分别增加至 4.08 和 4.58 倍 ($P<0.05$),这说明了使用超滤膜分离起到了过滤一些小的杂蛋白的作用,从而使纯化倍数有了显著的提高;而分子量 50kDa 的超滤膜虽然在纯化倍数上高于分子量 30kDa 的超滤膜,但在超滤时造成 LP 少量的损失使得其酶活回收率造成损失较大,分子量 30kDa 的超滤膜在超滤时保证了 LP 都保留在截留液中,并过滤了较多的杂蛋白,得到了较高的纯化倍数,在首要考虑回收率的情况下,故使用 30kDa 分子量的超滤膜较合适。

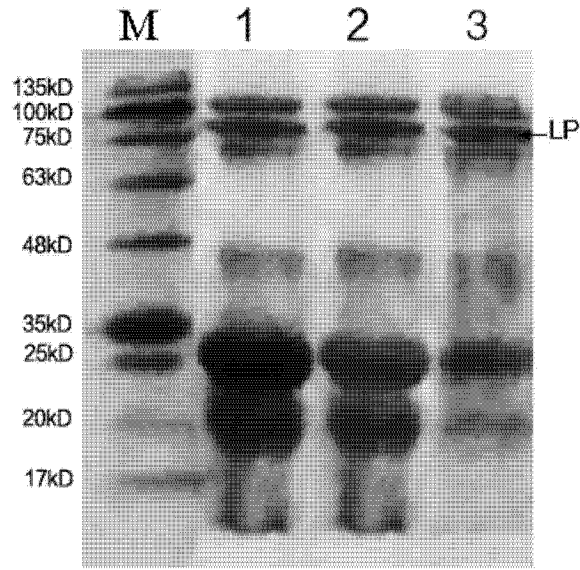


图 1

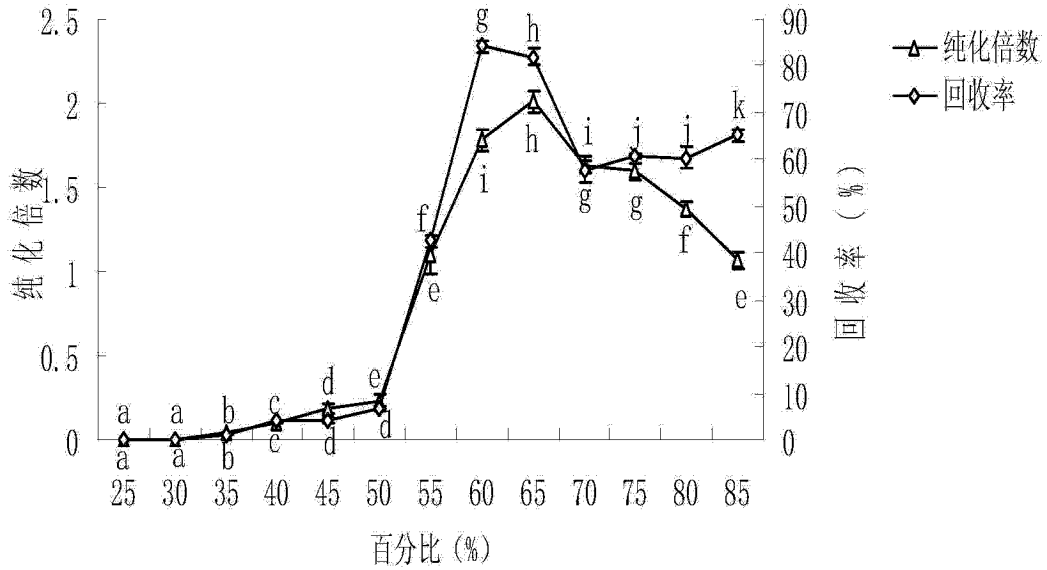


图 2

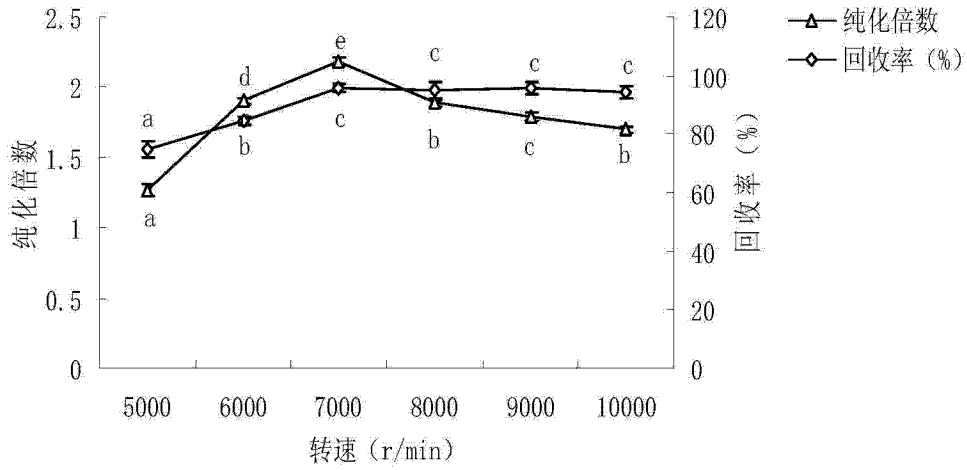


图 3

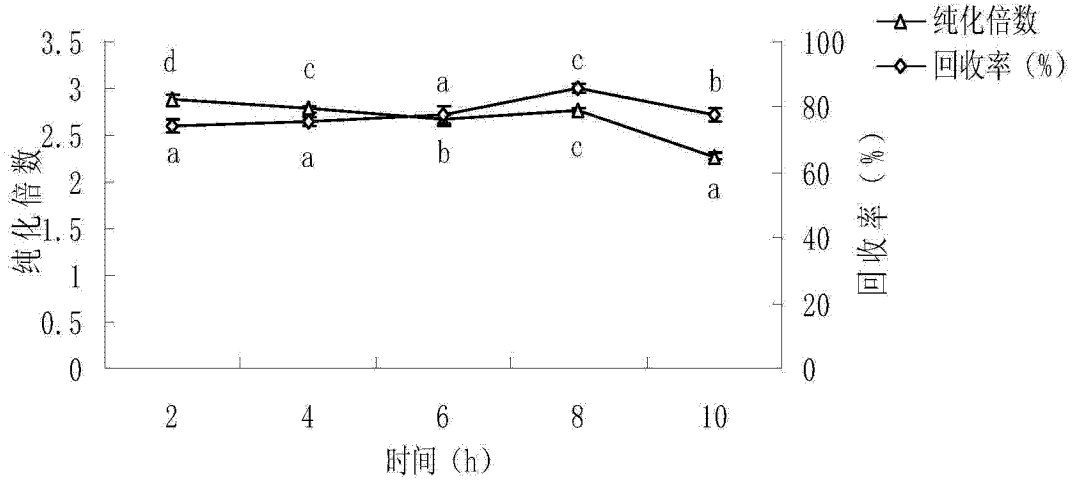


图 4

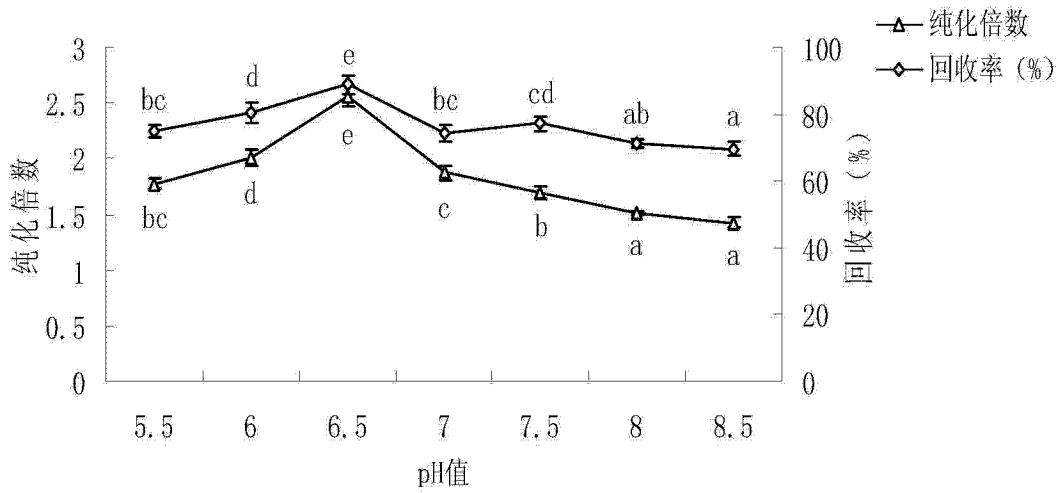


图 5

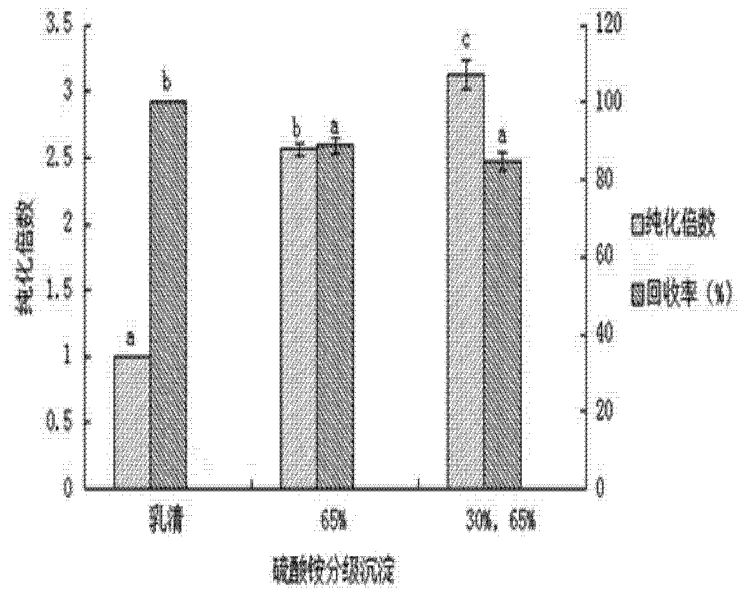


图 6