铬 革 渣 资 源 化 处 理 研 究 Ⅲ ──胶原蛋白分子量及分子量分布

蒋挺大 张春萍 甘友新 甘纯玑 (中国科学院生态环境研究中心,北京 100085) (福建农学院分析测试中心)

从铬革渣中提取蛋白质(主要是胶原蛋 白),加工成饲料蛋白粉,用作禽畜配合饲料的动 物蛋白质添加剂,已引起了广泛的兴趣,各种提 取方法及营养学研究屡见报道^[1-3],但对提取过 程中蛋白质发生的变化却未引起足够的重视,而 这些变化对于深入进行营养学和毒理学研究是 极为重要的。在我们的系列报道中,前文^[4]着重 提供了在碱性介质中从铬革渣中提取胶原蛋白 过程中出现氨基酸的条件,本文则报道采用水相 凝胶色谱法测定在不同提取条件下蛋白质分子 量及分子量分布的变化。

1 材料与方法

1.1 仪器

经改装的水相凝胶色谱仪,由贮液槽、蠕动 泵、有机玻璃色谱柱、示差折光检测器、记录仪组 成。

1.2 测定条件

色谱柱:琼脂糖凝胶 4% (Sepharose 4B, Pharmacia 公司出品),12×460mm。

> 流动相:含 0.02%叠氮钠的蒸馏水 流速:0.7ml/min 温度:室温 进样形式:流体动力注入 进样量:0.1ml

浓度检测器:示差折光仪

1.3 标样

DextranT₁₀和 T₇₀(Pharmacia 公司出品)。配 制成 2%浓度。

1.4 样品

(1)反应时间 6份20g铬革渣(干基)、 200ml水和1.0gCaO于500ml三角瓶中,在1.4 kg/cm²压力下分别反应4、8、12、16、20和24h, 乘热过滤,滤液用2mol/LHCl中和后减压蒸发 浓缩至干,6个样品分别编号为1-1、1-2、1-3、1-4、1-5和1-6。

(2) CaO 用量 6 份 20g 铬革渣(干基),
200ml 水,各加 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0g
CaO,于 500ml 三角瓶中,在 1.4kg/cm² 压力下反应 8h,同上处理后,6个样品分别编号为 2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 和 2-6(其中 2-1 与 1-2 同)。

以上样品,均配制成2%浓度。

1.5 谱图处理及计算

将测定得到的凝胶色谱图以 1.0ml 保留体 积为间隔,分别用游标卡尺测定其峰高值,然后 用 BASIC 语言编写的程序在 SHARP.PC-1500 型可编程序计算器上进行谱图面积归一化处理, 并按标定后各保留体积上对应的分子量计算 Mn 和 Mw 及分布系数 d,再利用计算器的作图功 能,画出归一化谱图积分曲线。

2 结果与讨论

2.1 分子量的标定^[5]

依据葡聚糖 T₁₀和 T₇₀生产厂家提供的分子 量分布曲线,标定色谱柱的分子量分离范围。

在归一化处理后的葡聚糖标样凝胶色谱图 中,由每一级浓度积分值,分别从葡聚糖分子量 分布曲线上得到相应的分子量值,并将其绘成 1gM-Ve图(图1)。如图所示,分子量大于20,000 时,T₇₀的各测定点呈线性关系,而分子 量 在

2,500—20,000 范围内,T₁₀的各点也呈线性关系,分子量在 2,500 以下的部分,可由 T₁₀的 lgM-[´]Ve 曲线的相应测定点及其连线的延长线标 定。



图 1 Tro和 TiolgM-Ve 图

分子链上的侧羧基交联^[6]。在热的碱性介质中的 反应相当复杂,一方面是交联键的断裂和三价铬 从胶原蛋白分子链上解离(称之为脱鞣),并形成 Cr(OH)。沉淀,另一方面是胶原蛋白分子的变性 和链的降解。胶原蛋白是由3条肽链结合形成的 分子链^[7],受热或碱性作用均会打开次级键。发 生变性,变性后的胶原肽链更易于降解。表1的 数据表明,铬革渣在热碱性介质中反应4h,所得 蛋白质的数均分子量就降到4000以下。皮胶原 蛋白的分子量一般在10—30万之间^[7],而铬革 渣在热碱性介质中反应4h,所得蛋白的分子量

表 1 反应时间与分子量的关系

样品号	反应时间(h)	Мп	М w	đ
1-1	4	2052	16576	8.35
1-2	8	2601	13912	5.35
1-3	12	2529	9294	4.60
1-4	16	2628	8372	3.19
1-5	20	2689	11624	3.46
1-6	24	3121	17146	5.31

如此之低,一方面是生皮在浸碱脱毛时已发生了 蛋白质分子的部分降解,在铬鞣时,又遭受酸的 作用,会继续发生部分降解;另一方面,就脱鞣反



 $\overline{M}n = 2052$ $\overline{M}w = 16576$ d = 8.35

2.2 反应时间与分子量的关系

铬革渣是含有蛋白质(主要是胶原蛋白)、脂 肪、碳水化合物、三价铬及其它杂质的复杂体系。 三价铬以双核、三核或多核铬络离子将胶原蛋白 应而言,肽链上结合 Cr(Ⅱ)的部位,即是反应介 质中的 OH⁻进攻点,当 Cr(Ⅱ)从肽链上脱落,这 个部位的肽键也就容易断开,发生了肽链的降 解,此外,脱落的 Cr(Ⅱ)或其络离子,或许对肽 链的水解有催化作用。

表1数据表明,数均分子量(Mn)随反应时 间延长而逐渐增大,而重均分子量(Mw)则先是 减小,后又增大。从图2的峰形来看,可以发现一 个呈双峰状态的主峰和一个呈拖尾肩峰状态的 小峰。随反应时间的延长,主峰的双峰由前一个 峰高于后一个峰,转化为后一个峰超过前一个峰 (图3),表明分子量呈逐步降低趋势。拖尾肩峰 则随反应时间的延长而逐渐变小、消失(图3), 然后又再度出现、增大(图4),而此时主峰已变 矮,说明由主峰部分的蛋白质继续水解成小肽的 肩峰。



2.3 反应时间与分子量分布的关系

由于在蛋白质提取过程中发生了分子的降 解,所以分子量的分布度 d 表现出比较宽的范 围。表 1 中列出的 d 值,先呈降低趋势,然后再增 大。1-1 样品的 d 达到了 8.35,从图 2 可见,谱峰 从 Ve26ml 一直延续到 82ml,而图 3 的样品谱峰 则从 Ve28ml 到 66ml,这与 d 值的变化趋势是相 吻合的。可见,1-1 样品除了分子量较大部分(主 峰)的分布较宽外,还有相当数量的较低分子量 部分,因此总的分子量分布很宽。这种情况,也正 好说明了在 1-1 的反应时间还仅出现较小的降 解分子,没有达到降解成氨基酸的程度,当延长 反应时间,则这些较小的分子便开始逐步水解为 游离氨基酸。



2.4 CaO 用量与分子量的关系

CaO 是提取反应中的碱化剂,既起脱鞣作 用,使脱落的 Cr(II)形成 Cr(OH)。沉淀,从而与 溶解在介质中的蛋白质易于分离,同时又促使蛋 白质降解,若反应时间长或碱性强,使小肽水解 为游离氨基酸。

CaO 在水中的溶解度只有 0.18%,而且颗 粒大小也直接影响到溶解度,因此,使用 CaO 作 碱化剂,在反应体系中总是过量的。在铬革渣的 反应过程中,体系起始 pH 值是恒定的,即 CaO 溶解达到饱和,随着反应的进行,体系中 OH-浓 度降低,又有少量 CaO 继续溶解,因此反应结束 时,体系的 pH 值随 CaO 用量增加而升高(表 2)。

表 2 CaO 用量与分子量的关系

样品号	CaO(g)	反应前 pH	反应后 pH	Mīn	Мw	d
2-1	1.0	13	9. 3	2601	13912	5.35
2-2	1.2	13	9.3	3790	17020	4.49
2-3	1.4	13	9.7	2733	15548	5.69
2-4	1.6	13	10	1817	10951	6.03
2-5	1.8	13	11	3282	11954	3.64
2-6	2.0	13	12	2521	9408	3.73
•						

反应介质的 pH 值是决定提取蛋白质的分

子量的一个重要因素,从表 2 中列出的重均分子 量(Mw)数据来看,除了 2-1 样品外,其余大体上 是随着反应 pH 值的升高分子量逐渐降低,2-6 样品的 Mw 几乎比 2-2 样品的 Mw 低一半。各样 品的 Mn 均在 4000 以下。当 CaO 用量超过 1.2g (为干铬 革渣 6%),样品 中就出现游离氨基 酸^[4],因此,在此反应温度下,只要 CaO 用量不高 于干铬革渣的 6%,所得产品既不会含有游离氨 基酸,分子量也没有出现太大的波动。

2.5 CaO 用量与分子量分布的关系

从表 2 的 d 值来看,CaO 用量增加,即反应 介质的 pH 值升高,对分子量分布呈无规律性变 化,只是由于反应体系的碱性变大(样品 2-5 和 2-6),使小肽更多地被水解成游离氨基酸。从图 5(样品 2-1)和图 6(样品 2-5)的对比可见,2-1 样 品谱图的拖尾峰较高较宽,而 2-5 样品图谱的拖 尾峰较矮较窄。单从分散度 d 的数据来看,前者 为 5.35,后者为 3.64,似乎后者的分子量分布比 前者窄得多,实际上,由图可见,大肽部分(主峰) 的峰宽无明显差别,即分子量分布变化不大,造 成 2-5 样品 d 值变小的是小肽部分大量水解成 游离氨基酸造成的。



图 5 2-1 样品的 WPGC 图 Mn=2601 Mw=13912 d=5.35



图 6 2-5 样品的 WPGC 图 **Mn=3282 Mw**=11954 *d*=3.64

综上所述,从所研究的样品来看,具有2个 共同点,①分子量低;②分子量分布相当宽。这2 个特点,是饲料胶原蛋白粉产品的蛋白质消化率 (猪)高达84%以上^[8]的一个重要因素。

众所周知,用凝胶色谱法来测定高分子化合物的分子量是不太准确的,从表1和表2的数据 也可看出缺乏规律性,但由于该方法快捷,在对 比试验中还不失为一种有用的方法,尤其是有色 谱图帮助对数据进行深入的分析,所以是蛋白质 分子量研究中的一种常用方法。

参考文献

- 1 Francis H D. US Patent. 4 100 154,1978
- 2 Guardini G. France Patent. 2 520 641,1983
- 3 李士英,冯伟宏.沈阳化工.1990,1:24
- 4 蒋挺大,甘友新,张春萍.环境科学.1993,14(5):9
- 5 甘纯玑,廖金坤,蔡乐挣.日用化学工业.1990,4:41
- 6 王远亮. 明胶科学与技术. 1989, 4:169
- 7 成都科技术大学,西北轻工业学院编.制革化学及工艺学.北 京:轻工业出版社.1986:77
- 8 Jiang Tingda, Mo Dihua, Chen Yiwan and Zhang Chunping. Animal Feed Science and Technology. 1992, 37:175

Abstracts

Chinese Journal of Environmental Science

Analysis of the Effects of Biofilm Thickness on Fluidised Bed Bio-Reactor (FBBR) Performance. Zhou Ping et al. (Dept. of Environmental Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084); Chin. J. Environ. Sci., 15(2), 1994, pp. 1 -5

A mathematical model of fluidised bed bio-reactor has been established and a large amount of experiment has been carried out to verify the validity of the model. The analysis of organic matter concentration profile in biofilm and the effects of biofilm thickness ($\delta = 30 - 400 \mu m$) on biomass concentration, effectiveness factor, effluent quality and the degradation rate of organic matter have been conducted in detail. The results show that the maximum organic degradation rate per unit volume of biofilm is 0. 52kg COD/(L • d) when influent COD is 530mg/L and the optimal biofilm thickness is about 180 μm in the experiment.

Key words: fluidised bed bio-reactor, effectiveness factor, biomass concentration, biofilm thickness.

Study on the Treatment of Monosodium Glutamate Processing Wastewater in an External Air Lift Reactor. Cheng Shupei, Cui Yibing et al. (Dept. of Environmental Science & Engineering, Nanjing University, Nanjing 210008): Chin. J. Environ. Sci., 15(2), 1994, pp. 6-10

The biotechnique of external air lift reactor (EALR) was used for the treatment of monosodium glutamate processing wastewater to produce a single cell protein (SCP) with *Rhodopseudomonas sphaeroides*. The removal of BOD₅ was 92% under the following conditions:BOD₅, 2750mg/L in the influent; K_{La}, $242h^{-1}$;HRT, 12h; and the concentration of charcoal particle as a carrier, 10g/ L. The species of microorganism, *R. sphaeroides*, has a protein content of up to 67. 2% and a coefficient of SCP yield of 0. $59kg(cell)/(kgBOD_5 \cdot d)$. The process has a biological load of 1. $68kg BOD_5/(kg MLSS \cdot d)$, which is higher than that either in an activated sludge process or in a PSB 4-stage system.

Key words: external air lift reactor, Rhodopseudomonas sphaeroides, monosodium glutamate processing wastewater, BOD_5 , biological load, oxygen transfer coefficient, single cell protein.

Reclamation Treatment of Chrome Leather Scraps IX. The Molecular Weight and molecular Weight Distribution of Collagen Protein. Jiang Tingda et al. (Research Center For Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Scienses, Beijing 100085): Chin. J. Environ. Sci., 15(2), 1994, pp. 11-14 The molecular weight and its distribution of the

÷.

collagen protein were determined with a water-phase gel chromatography (WPGC). The collagen protein was seperated from chrome leather scraps under different reaction conditions. In WPGC, distilled water was used as solvent, containing 0. 02%NaN₂, and dextran with a broad molecular weight distribution as standard. In the designed reaction time and pH value range, the number average molecular weight (Mn) of collagen protein was below 4000, and the molecular weight distribution proves to be wide ($d = \overline{M}w/\overline{Mn} = 3.19 - 8.35$).

Key words: chrome leather scrap, molecular weight, gel chromatography.

Assessment on the Biodegradability of Organics in Municipal Wastewater and the Measures for Controlling Its Refractory Organics. Huang Xia, Zhang Xiaojian et al. (Dept. of Environmental Engineering, Tsinghua University, Beijing

100084): Chin. J. Environ. Sci., 15(2), 1994, pp. 15-19

The organic compounds in a municipal wastewater were analysed by using GC-MS method and the biodegradability of the organics was discussed by calculating the first order reaction rate constant K_b (20°C) for each of the organic compounds present in an aerobic biological treatment process. The results showed that 38 and 16 kinds of main organics exsisted in the influent and in the effluent, respectively, of the aeration tank in a municipal sewage treatment plant. The main refractory organics were found to be dibutyl phthalate and diisooctyl phthalate. Their effective control should be made by strengthening the pollution management at source or carrying out a pretreatment of wastewater before discharge into the public sewerage system.

Key words: GC- MS, biodegradability, municipal wastewater, refractory organics.

Inhibitory Effect of Zinc on Anaerobic System and a Comparison with Other Four Heavy Metal Ions. Wang Jusi, Zhao Lihui et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085): Chin. J. Environ. Sci., 15(2), 1994, pp. 20-23

The inhibition of zinc on an anaerobic biological system was studied. The results indicated that no effect was observed when a daily addition of zinc was less than 40 mg/L, and a significant or serious inhibition was found when a daily addition of zinc was 70 mg/L and over 109 mg/L, respectively. In a comparison, the inhibition of five heavy metals to an anaerobic digestion can be ranked in a decreasing order of Pb>Cu>Ni>Cr(VI)>Cr(II)>Zn, in