

不同 pH 提取液对羔羊皱胃酶提取活性的影响^{*}

张富新¹, 安森亚², 崔 馨³

(1 陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062;

2 郑州牧业高等专科学校 食品系, 河南 郑州 450008;

3 北京科技大学 应用科学学院, 北京 100083)

[摘 要] 以关中奶山羊羔羊皱胃为原料, 分别用 pH 4.5、5.4 和 6.0 提取液提取羔羊皱胃酶, 并用 L₉(3⁴) 正交试验研究了不同 pH 提取液对皱胃酶提取效果的影响。结果表明, pH 5.4 提取液的提取活性最高, pH 6.0 提取液次之, pH 4.5 提取液最低; 其最佳技术参数为: 提取液 pH 5.4, NaCl 质量浓度 80 g/L, 提取温度 30 °C, 皱胃质量与提取液体积之比为 1:20; 提取时间 48 h。

[关键词] pH 提取液; 羔羊皱胃酶; 酶活性

[中图分类号] S872; TS201.2⁺5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)06-0053-04

羔羊皱胃酶(Kid rennet)是从哺乳羔羊第四胃(皱胃)中提取的一种凝乳酶(Milk-clotting enzyme), 是干酪生产中起凝乳作用的关键性酶, 其作用是水解 κ -酪蛋白的 phe105-met106 肽键, 产生副- κ -酪蛋白和糖巨肽, 在 Ca²⁺ 参与下使乳凝固, 从而形成凝乳^[1,2]。近年来, 随着世界干酪产量逐年上升, 凝乳酶的需求量不断增大, 导致世界范围内出现凝乳酶短缺, 价格上涨, 供不应求。世界各国都在寻找凝乳酶的代用品, 一些植物凝乳酶、微生物凝乳酶在干酪生产中得到应用, 但干酪出品率较低, 质地、风味不够理想, 使其应用受到限制, 许多生产厂家还是喜欢使用皱胃酶^[3]。人们在不断研究开发新型凝乳酶代用品的同时, 也对传统提取方法进行了提高和改进^[4]。传统皱胃酶提取方法是将皱胃在 NaCl 溶液中进行浸提, 但随着皱胃成分的溶出, 提取液 pH 发生变化, 使酶的稳定性和溶解性受到影响, 导致皱胃酶提取效率降低。为此, 本研究以关中奶山羊皱胃为原料, 研究不同 pH 提取液对羔羊皱胃酶提取活性的影响, 以期获得较为理想的提取效果, 为皱胃酶的实际生产提供支持。

1 材料与方法

1.1 材 料

选用 2~4 周龄关中奶山羊, 屠宰后立即取出皱胃, 上部从第三胃末端切取, 下部从十二指肠上部切

取, 用流水冲洗除去皱胃中的内容物(冲洗时间不宜过长)。然后剥除皱胃外部的脂肪及结缔组织, 装入塑料袋中, 在 -24 °C 下保存备用。

1.2 缓冲液的配制

试验所用的不同 pH 缓冲液均用 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 和 0.1 mol/L 柠檬酸配制, 并用 pH 计调整。其中, pH 4.5 缓冲液为 9.35 份 Na₂HPO₄ 溶液与 10.68 份柠檬酸溶液混合; pH 5.4 缓冲液为 11.15 份 Na₂HPO₄ 溶液与 8.85 份柠檬酸溶液混合; pH 6.0 缓冲液为 12.63 份 Na₂HPO₄ 溶液与 7.37 份柠檬酸溶液混合。

1.3 皱胃酶的提取

羔羊皱胃解冻后, 手术刀刮取胃粘膜, 以 NaCl 为提取剂, 以提取时间、NaCl 质量浓度、提取温度及皱胃与提取液比例(W:V)为试验因素, 分别在 pH 4.5、5.4 和 6.0 缓冲液中进行提取。为防止腐败, 在提取液中添加 1 g/L 的苯甲酸钠。然后 3 000 r/min 下离心 15 min, 除去杂质, 取上清液, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 4.6, 在室温下激活 12 h, 测定其凝乳活性。

1.4 皱胃酶活性的测定

采用 Arima^[5] 的方法。取 5 mL 100 g/L 脱脂乳, 在 35 °C 下保温 10 min, 加入 0.5 mL 皱胃酶溶液, 迅速混合均匀, 准确记录酶液加入到乳中至乳凝固的时间。把 40 min 凝固 1 mL 100 g/L 脱脂乳的

* [收稿日期] 2004-09-06

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2003JC34)

[作者简介] 张富新(1962-), 男, 陕西武功人, 教授, 博士, 主要从事畜产品开发利用研究。

酶量定义为1个索氏单位(Soxhlet unit, SU)^[6],并以每g皱胃粘膜提取的酶活性单位为提取指标(SU/g)。

$$\text{Soxhlet unit (SU)} = \frac{2\,400}{T} \times \frac{50}{5} \times D$$

式中, T 为凝乳时间(s); D 为稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 不同因素对羔羊皱胃酶提取活性的影响

2.1.1 提取时间 由图1可以看出, pH 5.4 缓冲液提取活性最高, 也最稳定。pH 4.5 缓冲液提取活

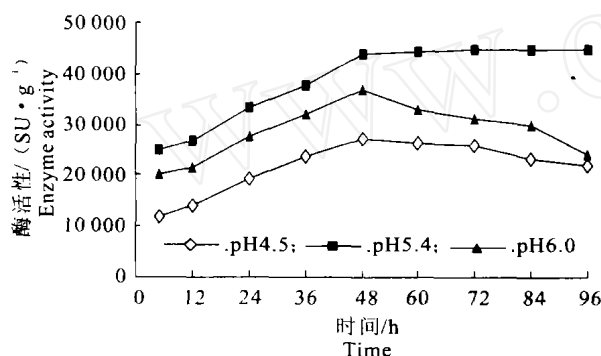


图1 提取时间对羔羊皱胃酶提取活性的影响

Fig 1 Influences of extracting time on the extracting activity of kid rennet

2.2.2 NaCl 质量浓度 由图2可见, 用pH 5.4 缓冲液提取时, 当NaCl 质量浓度小于60 g/L 时, 随着NaCl 质量浓度增大, 提取活性逐渐增加; 当NaCl 质量浓度为60 g/L 时, 提取活性达最大值50 800 SU/g; NaCl 质量浓度60~80 g/L 时, 提取活性基本稳定($P > 0.05$); 但当NaCl 质量浓度大于80 g/L 时, 提取活性明显下降($P < 0.05$)。用pH 4.5 和pH 6.0 缓冲液提取时, 变化趋势与pH 5.4 缓冲液相类似。对pH 6.0 缓冲液, NaCl 质量浓度为80 g/L 时提取活性达到最大值, 而pH 4.5 缓冲液在NaCl 质量浓度为60 g/L 时, 提取活性最高。

2.2.3 提取温度 由图3可知, 在较低温度下提取时, 提取活性较低。与5℃相比, 在20℃时, 3种缓冲液的提取活性明显提高($P < 0.01$), 在20~30℃, 提取活性基本稳定($P > 0.05$)。对pH 4.5 和pH 5.4 缓冲液, 当温度大于35℃时, 提取活性逐渐下降($P < 0.01$), 而对pH 6.0 缓冲液, 当提取温度大于30℃时, 提取活性明显下降($P < 0.01$)。温度对酶提取活性的影响主要取决于两个方面: 一方面, 提

性较低, 且稳定性也较差。3种pH 缓冲液提取48 h 时, 酶活性达最大值, 分别为21 700 (pH 4.5), 43 715 (pH 5.4) 和36 900 (pH 6.0) SU/g。用pH 5.4 缓冲液提取时, 在提取的0~48 h, 随着提取时间延长, 提取活性逐渐提高($P < 0.01$), 提取时间大于48 h 后, 提取活性无显著变化($P > 0.05$)。pH 4.5 和pH 6.0 缓冲液在提取的前48 h 也有相似的趋势, 但pH 6.0 缓冲液在提取48 h 后, 活性明显下降($P < 0.01$), 而pH 4.5 缓冲液在提取72 h 后, 活性逐渐降低($P < 0.01$), 这与酶在不同pH 中的稳定性有关。

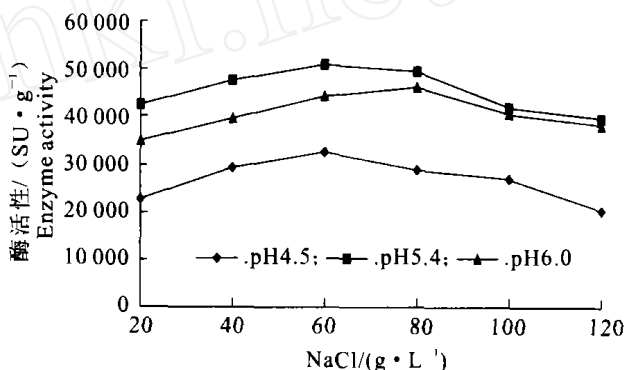


图2 NaCl 质量浓度对羔羊皱胃酶提取活性的影响

Fig 2 Influences of NaCl concentration on the extracting activity of kid rennet

高温可加快酶液和提取液之间的扩散速度, 提取速度随之加快; 另一方面, 酶是一种具有活性的蛋白质, 温度过高, 会引起酶失活, 使提取活性降低。因此, 选择适宜的提取温度对获得较高酶活性至关重要。

2.2.4 皱胃质量与提取液体积混合比 由图4可以看出, 对于pH 6.0 缓冲液, 当皱胃质量与提取液体积之比较小时, 随着提取比例增加, 提取活性随之提高; 当皱胃质量与提取液体积之比为1:15 时, 提取活性最高达60 116 SU/g, 之后随着提取比例继续增大, 提取活性开始下降($P < 0.05$), 这主要与酶在pH 6.0 时的稳定性有关。用pH 5.4 缓冲液提取时, 当皱胃质量与提取液体积之比大于1:20 时, 提取活性变化不大($P < 0.01$); 而对pH 4.5 缓冲液, 随着皱胃质量与提取液体积之比的增大, 提取活性一直呈上升趋势。在实际应用中, 皱胃质量与提取液体积之比也不宜过大, 否则会导致提取酶液容积较大, 酶浓度较低, 不利于浓缩及干燥。

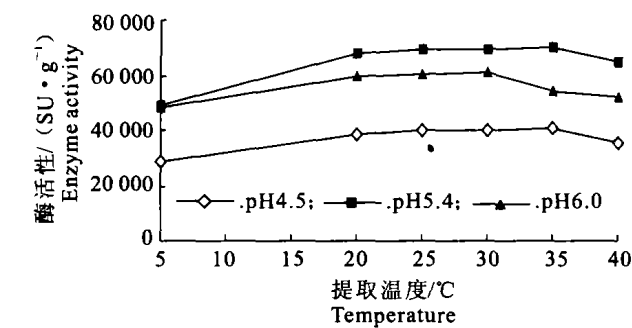


图 3 提取温度对羔羊凝乳酶活性的影响

Fig 3 Influences of temperature on the extracting activity of kid rennet

2 2 最优提取技术参数的确定

在前面单因素试验的基础上, 为了考察多因素对羔羊皱胃酶的提取效果, 3 种缓冲液分别采用 $L_9(3^4)$ 正交试验。NaCl 质量浓度取 40, 60, 80 g/L;

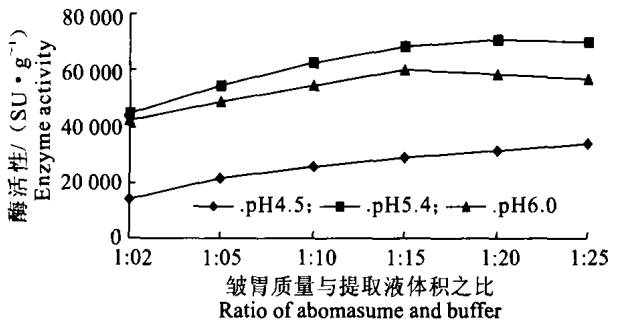


图 4 皱胃与提取液比例对羔羊皱胃酶活性的影响

Fig 4 Influences of the ratio of abomasum and beffer on the extracting activity of kid rennet

皱胃质量与提取液体积之比取 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20; 提取温度取 25, 30, 35 °C; 提取时间取 36, 48, 60 h。正交结果见表 1。

表 1 羔羊皱胃酶提取正交试验($L_9(3^4)$)结果分析

Table 1 Extraction experiment of kid rennet

处理 Treatment		因素水平 Factor level			酶活性/(SU · g ⁻¹) Enzyme activity			
		NaCl 质量 浓度/(g · L ⁻¹) NaCl concentration	提取比例 A bom asum buffer	提取温度/°C Temperature	提取时间/h Time	pH 4 5	pH 5 4	pH 6 0
pH 4 5	1	1(40)	1(1 : 10)	1(25)	1(36)	39 090	54 860	54 418
	2	1(40)	2(1 : 15)	2(30)	2(48)	44 285	72 191	57 922
	3	1(40)	3(1 : 20)	3(35)	3(60)	56 451	62 000	52 000
	4	2(60)	1(1 : 10)	2(30)	3(60)	58 181	63 846	54 418
	5	2(60)	2(1 : 15)	3(35)	1(36)	44 285	58 571	49 769
	6	2(60)	3(1 : 20)	1(25)	2(48)	41 823	66 595	62 285
	7	3(80)	1(1 : 10)	3(35)	2(48)	40 000	71 355	63 478
	8	3(80)	2(1 : 15)	1(25)	3(60)	43 333	67 922	60 000
	9	3(80)	3(1 : 20)	2(30)	1(36)	46 923	71 818	51 641
pH 5 4	K ₁	46 609	45 757	41 415	43 433			
	K ₂	48 096	43 968	49 796	42 036			
	K ₃	43 418	48 399	46 912	52 655			
	R	4 678	4 431	8 381	10 619			
pH 6 0	K ₁	63 018	63 355	63 127	61 751			
	K ₂	63 004	66 228	69 285	70 047			
	K ₃	70 365	66 804	63 975	64 589			
	R	7 360	3 448	6 157	8 296			
pH 6 0	K ₁	54 780	57 738	58 901	51 942			
	K ₂	55 490	55 896	54 660	61 228			
	K ₃	58 373	55 309	55 081	55 472			
	R	3 593	2 129	4 240	9 286			

由表 1 可知, 不同 pH 缓冲液提取时, 提取时间的极差 R 均最大, 说明提取时间是影响提取活性的主要因素。3 种缓冲液各影响因素顺序为: (1) pH 4 5 缓冲液: 提取时间> 提取温度> NaCl 质量浓度> 提取比例; (2) pH 5 4 缓冲液: 提取时间> NaCl 质量浓度> 提取温度> 提取比例; (3) pH 6 0 缓冲液: 提取时间> 提取温度> NaCl 质量浓度> 提取比

例。方差分析表明, 3 种缓冲液提取时, 各处理间均达到显著水平 ($P < 0.05$), 表明在试验取值范围内, 不同因素对羔羊皱胃酶提取都有一定的影响。从 3 种缓冲液提取效果来看, pH 5 4 缓冲液提取活性明显高于 pH 4 5 和 pH 6 0 缓冲液, 且 pH 4 5 缓冲液提取活性最低。统计分析表明, pH 5 4 缓冲液在各处理点的平均活性与 pH 5 4 和 pH 6 0 缓冲液

相比均达到极显著水平($P < 0.01$),说明用 pH 5.4 缓冲液提取羔羊皱胃酶,可获得较高的酶活性,提取最优组合为:NaCl 质量浓度 80 g/L,皱胃质量与提取液体积之比 1:20,提取温度 30 °C,提取时间 48 h,最大提取活性为 72 300 SU/g。

3 讨 论

酶是一种蛋白质,蛋白质在溶液中的溶解性主要与蛋白质分子所带电荷多少有关,蛋白质分子带电荷越多,其溶解性越大,当蛋白质所带净电荷为零时,溶解性最低。溶液的 pH 是影响蛋白质带电性的主要因素,蛋白质在不同 pH 环境中所带电荷也不相同。皱胃酶是一种复合酶,含有 90% 的凝乳酶

(chymosin)和 10% 的胃蛋白酶(pepsin)^[7],凝乳酶的等电点为 pH 4.6^[8],在此 pH 时酶溶解性最低,易沉淀析出。同时,凝乳酶在不同 pH 环境中具有不同的稳定性,在 pH 5.3~6.3 时稳定性最高,pH 为 3.0~4.9 和 pH 6.5 以上稳定性较差^[8~10],特别是在有 NaCl 存在的较低 pH 下,易发生自溶^[11]。本研究结果表明,用 pH 5.4 缓冲液提取时酶活性最高,pH 6.0 缓冲液提取活性次之,而用 pH 4.5 缓冲液提取时,酶活性较低。这是因为用 pH 4.5 缓冲液提取时,由于提取 pH 接近凝乳酶的等电点,酶的溶解性下降,同时在该 pH 下,酶的稳定性也较低,提取过程中容易失活。因此,提取皱胃酶时,在考虑远离酶等电点的同时,也要注意不同 pH 下酶的稳定性。

[参考文献]

- [1] Bingham E.W. Action of rennet on κ -casein[J]. J Dairy Sci, 1979, 58: 13- 18
- [2] Braum. Investigation on biochemical properties of milk-clotting enzymes[J]. Die Nahrung, 1998, 32: 357- 381
- [3] 顾瑞霞. 凝乳酶及其代用品[J]. 中国乳品工业, 1991, 19(1): 20- 23
- [4] Kim S.M., Zayas J.F. Comparative quality characteristics of chymosin extracts obtained by ultrasound treatment[J]. J Food Sci, 1991, 56(2): 406- 410
- [5] Arima K. Milk-clotting enzyme from microorganism, part I, screening test and identification of the potent fungus[J]. Agric Biol Chem, 1967, 31: 540- 545
- [6] Hideyuki K. Rapid and large scale isolation of chymosin by pepstatin-amino hexylagarose[J]. Agric Biol Chem, 1987, 42: 2227- 2231
- [7] Staff A. Rennet containing 100% chymosin increases cheese quality and yield[J]. Food Technology, 1989, 43: 88- 89
- [8] Foltmann B. A review on prorennin and rennin[J]. Compt Rend Trav Lab Carlsberg, 1966, 35: 143- 167
- [9] Rand A.G., Ernstrom C.A. Effect of pH and sodium chloride on activation of prorennin[J]. J Dairy Sci, 1964, 47: 1181- 1187
- [10] Mickelson R., Eanstrom C.A. Factors affecting the stability of rennin[J]. J Dairy Sci, 1963, 46: 613
- [11] Fridenthal M.K., Visser S. Enzyme adsorption and loss of activity in dilute solutions of chymosin and pepsin. Prevention with polyethylene glycol[J]. Neth Milk Dairy J, 1985, 39: 63- 70

Influences of different pH buffers on the extracting activity of kid rennet

ZHANG Fu-xin¹, AN Seng-ya², CUI XIN³

(1 Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Shaanxi, Xi'an 710062, China;

2 Food Department, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Henan, Zhengzhou 450008, China;

3 College of Applied Science, University of Science and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract Using goat kid abomasum of Guanzhong dairy goats as material, kid rennet was extracted with pH 4.5, pH 5.4 and pH 6.0 buffers respectively, and effect of different factors on the extracting activity of kid rennet in different pH buffers was studied by $L_9(3^4)$ orthogonal experiment. The results showed that the extracting activity of kid rennet in pH 5.4 buffer ranked the highest, pH 6.0 buffer the second, pH 4.5 buffer the last, and the best technological parameters were extracting solution pH 5.4, NaCl concentration 80 g/L, extracting temperature 30 °C, ratio of abomasum and buffer 1:20, and extracting time 48 hours.

Key words: pH buffer; kid rennet; enzyme activity