

羔羊皱胃酶盐析条件的研究^{*}

张富新¹, 王毕妮²

(1 陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062;

2 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069)

[摘要] 以羔羊皱胃为原料, 研究了硫酸铵和食盐盐析法纯化羔羊皱胃酶的工艺条件, 系统分析了食盐饱和度和pH、盐析温度以及盐析时间对羔羊皱胃酶纯化效果的影响。结果表明, 硫酸铵不适宜用于盐析羔羊皱胃酶, 而食盐是羔羊皱胃酶适宜的盐析剂。食盐盐析羔羊皱胃酶的适宜盐析条件为: 食盐饱和度 55%~65%, pH 4.00~4.60, 盐析温度 4℃, 盐析时间 16 h。

[关键词] 羔羊皱胃酶; 盐析条件; 酶纯化

[中图分类号] TS201.2⁺5; S872

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0101-05

Study on the condition for salting-out of goat kid rennet

ZHANG Fu-xin¹, WANG Bi-ni²

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

2 College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract Using goat kid abomasums as material, the purification conditions of goat kid rennet by salting out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NaCl were investigated. The effects of salt saturation, salting-out pH, temperature, and salting-out time on the purification efficiency were systematically analyzed. The results showed that ammonium sulfate was proved not to be suitable to precipitate rennet. But NaCl could be an optimum salting-out agent in the salting-out of goat kid rennet. The optimal condition for salting-out by NaCl was 55%-65% NaCl saturation, salting-out pH 4.00-4.60, temperature 4℃ and salting-out time 16 h.

Key words: goat kid rennet; salting-out method; purification

凝乳酶是干酪生产中主要的凝结剂。传统干酪生产中使用的凝乳酶是从小牛皱胃中提取的小牛皱胃酶, 因其具有较高的牛乳凝结能力, 能获得无苦味、组织状态适宜的干酪, 且产品得率较高, 至今仍是干酪生产中使用最多、质量最好的凝乳酶^[1]。随着干酪产量的增加, 小牛皱胃酶供应短缺, 价格上涨, 因此, 寻求小牛皱胃酶代用品已成为目前需要解决的主要问题^[2]。羔羊与小牛同属反刍动物, 其皱胃具有相似的功能和特点, 因此利用羔羊皱胃提取羔羊皱胃酶可能是最适宜的小牛皱胃酶代用品。近年来, 随着羔羊肉消费量的增加, 羔羊屠宰数量大幅度提

高, 而其下脚料——羔羊皱胃绝大部分被作为垃圾废弃, 不但造成资源浪费, 而且也污染环境。据报道^[3-4], 羔羊皱胃中含有大量的羔羊皱胃酶, 具有很高的凝乳活性。若采用现代技术手段提取羔羊皱胃中的皱胃酶并制成产品, 不但可以缓解小牛皱胃酶的供应紧张状态, 避免我国因进口小牛皱胃酶造成干酪成本的增加, 而且还可以提高奶山羊业深加工产品的附加值, 变废为宝, 同时解决环境污染问题。

盐析法是根据酶和杂蛋白在高浓度溶液中溶解度的差别而建立的一种酶粗提纯方法, 此法简便、安全。目前, 有关用盐析法纯化羔羊皱胃酶的系统研究

* [收稿日期] 2005-11-21

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(2003JC134)

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

尚未见报道。本文采用盐析法系统研究了食盐饱和度和 pH、盐析温度以及盐析时间等因素对羔羊皱胃酶纯化效果的影响,以为羔羊皱胃酶的深入研究和粗酶的工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用出生后 2~3 周龄的哺乳羔羊,屠宰后取出皱胃,清除内容物,剥去皱胃外脂肪及结缔组织,在 -20℃ 下冷冻保存。

脱脂乳:俄罗斯生产。

1.2 羔羊皱胃酶的提取

将冷冻的羔羊皱胃在 0~5℃ 下解冻后,用手术刀刮下皱胃黏膜,混合均匀,然后与 8% NaCl 溶液以 1:15 混合。用超声波发生器(陕西翔达超声技术工程部生产)在 20 kHz、30 W/cm² 超声强度下提取 20 min,然后在 3 000 r/min 下离心 15 min,除去杂质。取上清液,即得羔羊皱胃酶原溶液。

1.3 硫酸铵盐析羔羊皱胃酶的研究

用 0.1 mol/L HCl 溶液将羔羊皱胃酶原溶液 pH 调整至 4.60,室温下激活 12 h 后,分别取 7 份 20 mL 酶液,各添加已研碎的硫酸铵至 10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 100% 饱和度,再校正酶液 pH 至 4.60,0~5℃ 下放置过夜,冷冻离心后,用与上清液等量的 8% NaCl 溶液溶解沉淀,分别测定上清液和沉淀中羔羊皱胃酶的凝乳活性。

1.4 食盐盐析羔羊皱胃酶的研究

1.4.1 pH 对羔羊皱胃酶纯化效果的影响 用 0.1 mol/L HCl 溶液将羔羊皱胃酶原溶液 pH 调至 4.60,在室温下激活 12 h 后,加入体积分数 4% Al₂(SO₄)₃ 溶液,沉淀后立即离心,取上清液,添加食盐至 80% 饱和度。取 6 份 20 mL 酶液,用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 分别为 4.00、4.60、5.00、5.50、6.00 和 6.50,0~5℃ 下放置过夜,冷冻离心后,分别测定沉淀中羔羊皱胃酶的凝乳活性和蛋白质含量。

1.4.2 盐析温度对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

已激活的酶液经 Al₂(SO₄)₃ 溶液处理后,向上清液中添加食盐至 80% 饱和度,调 pH 至 4.60。取 4 份 20 mL 酶液,分别在 4、10、20、30℃ 下放置过夜,冷冻离心后,分别测定沉淀中羔羊皱胃酶的凝乳活性和蛋白质含量。

1.4.3 食盐饱和度对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

已激活的酶液经 Al₂(SO₄)₃ 溶液处理后,取 7 份 20 mL 上清液,分别添加食盐至 25%、35%、45%、55%、65%、75% 和 85% 饱和度,调 pH 至 4.60,0~5℃ 下放置过夜,冷冻离心后,分别测定沉淀中羔羊皱胃酶的凝乳活性和蛋白质含量。

1.4.4 盐析时间对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

已激活的酶液经 Al₂(SO₄)₃ 溶液处理后,取 6 份 20 mL 上清液,分别添加食盐至 65% 饱和度,调 pH 至 4.60,0~5℃ 下分别放置 10、12、16、21、24、34 h,冷冻离心后,分别测定沉淀中羔羊皱胃酶的凝乳活性和蛋白质含量。

1.5 测定方法

1.5.1 羔羊皱胃酶凝乳活性的测定 采用 Arima 等^[5]的方法。取 10 mL 100 g/L 脱脂乳,在 35℃ 下保温 10 min,然后加入 0.5 mL 羔羊皱胃酶原溶液,迅速混合均匀,准确记录从酶液加入到脱脂乳凝固时间(s),以 40 min 凝结 1 mL 100 g/L 脱脂乳的酶量为 1 个索氏单位(Soxhlet Unit, SU)^[6]。每个样品重复 3 次。

$$SU = \frac{2400}{T} \times \frac{10}{0.5} \times D,$$

式中: T 为凝乳时间(s); D 为酶液稀释倍数。

1.5.2 蛋白质含量的测定 采用 Folin-酚试剂法^[7](Lowry 法)。以蛋白质含量为横坐标,760 nm 处测定的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。回归得方程 $y = 0.002x + 0.0459$ ($r = 0.9993$)。将羔羊皱胃酶原溶液稀释 10 倍后测定其吸光度值,查标准曲线得到的蛋白质含量乘以 10 即为原酶液的蛋白质含量。每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵盐析羔羊皱胃酶的研究

由表 1 可见,随着硫酸铵饱和度的增加,上清液中羔羊皱胃酶的活性回收率逐渐降低。硫酸铵饱和度为 10%~40% 时,沉淀中羔羊皱胃酶的活性回收率差异显著 ($P < 0.05$),且随硫酸铵饱和度的增加,活性回收率逐渐提高;当硫酸铵饱和度大于 40% 时,沉淀中活性回收率逐渐趋于稳定。硫酸铵饱和度为 40%~100% 时,沉淀中羔羊皱胃酶的活性回收率相对较高,但最高只有 58.59%。可见,硫酸铵用于盐析羔羊皱胃酶可能具有其局限性。

表 1 硫酸铵对羔羊皱胃酶盐析效果的影响

Table 1 Results of salting-out with (NH₄)₂SO₄ %

硫酸铵饱和度/% (NH ₄) ₂ SO ₄ saturation	活性回收率 Recovered milk-clotting activity	
	上清液 Supernatant	沉淀 Precipitate
10	79.909 ± 1.237 b	18.267 ± 0.737 e
20	48.561 ± 1.981 c	46.878 ± 1.643 d
30	41.529 ± 1.805 d	51.684 ± 1.193 c
40	35.781 ± 1.121 e	56.242 ± 1.431 b
50	34.550 ± 0.854 ef	56.074 ± 1.035 b
60	31.825 ± 0.505 fg	58.590 ± 0.900 b
100	29.498 ± 0.749 g	56.121 ± 0.767 b
皱胃酶原溶液 Crude rennet solution	100 ± 1.804 a	100 ± 1.804 a

注: 表中数据为 3 次测定的平均值 ± 标准差, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。
Note: Values were means ± SD for three replicates. The same column with different small letters and capital letters were different ($P < 0.05$) and significantly different ($P < 0.01$), respectively. The following tables were the same.

表 2 pH 对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

Table 2 Effect of pH on the purification efficiency of goat kid rennet

pH	总蛋白质含量/mg Total protein	酶比活/(SU · mg ⁻¹) Specific milk-clotting activity	活性回收率/% Recovered milk-clotting activity	纯化倍数 Factor purification
4.00	25.782 ± 0.726 b	160.238 ± 3.141 ab	57.530 ± 1.128 bc	1.120 ± 0.022 ab
4.60	25.727 ± 0.819 b	171.708 ± 3.752 a	62.240 ± 1.360 b	1.201 ± 0.026 a
5.00	25.442 ± 0.910 b	159.422 ± 2.353 ab	57.147 ± 0.844 bc	1.115 ± 0.017 ab
5.50	25.381 ± 0.853 b	156.843 ± 2.588 bc	56.087 ± 0.926 cd	1.097 ± 0.018 bc
6.00	25.429 ± 0.867 b	147.387 ± 4.709 bcd	52.806 ± 1.687 cd	1.031 ± 0.033 bcd
6.50	25.373 ± 0.924 b	143.941 ± 3.982 cd	51.457 ± 1.423 d	1.006 ± 0.028 cd
皱胃酶原溶液 Crude rennet solution	48.624 ± 1.654 a	143.026 ± 2.393 d	100.000 ± 1.673 a	1.000 ± 0.017 d

表 3 盐析温度对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

Table 3 Effect of temperature on the purification efficiency of goat kid rennet

盐析温度/ Temperature	总蛋白质含量/mg Total protein	酶比活/(SU · mg ⁻¹) Specific milk-clotting activity	活性回收率/% Recovered milk-clotting activity	纯化倍数 Factor purification
4	26.812 ± 0.975 B	361.247 ± 12.798 a	74.343 ± 2.634 b	1.277 ± 0.045 a
10	26.973 ± 0.897 B	308.863 ± 14.535 b	63.332 ± 2.980 c	1.092 ± 0.052 b
20	26.832 ± 0.917 B	279.566 ± 9.801 b	57.408 ± 2.013 cd	0.988 ± 0.035 b
30	26.891 ± 1.307 B	232.080 ± 7.632 c	47.622 ± 1.566 d	0.821 ± 0.029 c
皱胃酶原溶液 Crude rennet solution	47.380 ± 1.760 A	282.856 ± 8.164 b	100.000 ± 2.886 a	1.000 ± 0.029 b

2.2.3 食盐饱和度对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

由表 4 可见, 随着食盐饱和度的增加, 沉淀中总蛋白质含量逐渐增大, 羔羊皱胃酶的活性回收率、纯化倍数和比活在 55%~65% 食盐饱和度时均较高, 再增加食盐饱和度时, 活性回收率趋于稳定, 而酶比活

2.2 食盐盐析羔羊皱胃酶的研究

2.2.1 pH 对羔羊皱胃酶纯化效果的影响 由表 2 可以看出, 各处理沉淀的总蛋白质含量均无显著差异; 在 pH 4.00 和 4.60 时, 羔羊皱胃酶的比活、活性回收率和纯化倍数均无显著差异, 且高于其他处理组。pH 大于 4.60 时, 其活性回收率和纯化倍数均随 pH 的增加而降低。因此, 羔羊皱胃酶的盐析 pH 以 4.00~4.60 为宜。

2.2.2 盐析温度对羔羊皱胃酶纯化效果的影响 由表 3 可见, 温度对羔羊皱胃酶的纯化效果有一定影响。随着盐析温度的升高, 沉淀中羔羊皱胃酶的比活、活性回收率和纯化倍数逐渐下降, 而总蛋白质含量变化不大。因此, 要取得较好的盐析效果, 羔羊皱胃酶的盐析温度以 4℃ 为宜, 温度过高会使羔羊皱胃酶活性损失而影响纯化效果。

和纯化倍数显著下降, 这可能是由于蛋白质含量增加较凝乳活性快, 使得单位质量中羔羊皱胃酶的活性降低, 从而影响其纯化效果。由此可知, 羔羊皱胃酶适宜的盐析范围为食盐饱和度 55%~65%。

表 4 食盐饱和度对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

Table 4 Effect of NaCl saturation on the purification efficiency of goat kid rennet

食盐饱和度/% NaCl saturation	总蛋白质含量/mg Total protein	酶比活/(SU · mg ⁻¹) Specific m ilk-clotting activity	活性回收率/% Recovered m ilk-clotting activity	纯化倍数 Factor purification
25	16 086 ± 0 609 E	261 951 ± 9 200 ab	61 327 ± 2 154 e	1 403 ± 0 049 ab
35	17 450 ± 0 305 DE	270 568 ± 5 244 ab	68 715 ± 1 332 d	1 449 ± 0 028 ab
45	18 616 ± 0 343 CDE	273 240 ± 4 791 ab	74 028 ± 1 298 cd	1 464 ± 0 026 ab
55	19 555 ± 0 331 CD	276 649 ± 5 274 a	78 733 ± 1 501 bc	1 482 ± 0 028 a
65	20 591 ± 0 567 CD	276 393 ± 4 034 a	82 827 ± 1 209 b	1 480 ± 0 022 a
75	21 571 ± 0 277 BC	253 872 ± 4 454 b	79 700 ± 1 398 bc	1 360 ± 0 024 b
85	23 883 ± 0 273 B	223 767 ± 5 815 c	77 777 ± 2 021 bc	1 199 ± 0 031 c
皱胃酶原溶液 Crude rennet solution	36 802 ± 1 313 A	186 705 ± 3 023 d	100 000 ± 1 619 a	1 000 ± 0 016 d

2 2 4 盐析时间对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

由表 5 可见,当盐析时间由 10 h 延长至 16 h 时,沉淀中总蛋白质含量、活性回收率、比活和纯化倍数均无显著性变化。盐析 16 h 后,虽然沉淀中总蛋白质

含量逐渐增加,但羔羊皱胃酶的比活、活性回收率和纯化倍数均随盐析时间的延长而显著降低,这表明盐析时间过长时,沉淀中的蛋白质主要是无酶活性的杂蛋白。因此,食盐盐析羔羊皱胃酶以 16 h 为宜。

表 5 盐析时间对羔羊皱胃酶纯化效果的影响

Table 5 Effect of salting-out time on the purification efficiency of goat kid rennet

盐析时间/h Time	总蛋白质含量/mg Total protein	酶比活/(SU · mg ⁻¹) Specific m ilk-clotting activity	活性回收率/% Recovered m ilk-clotting activity	纯化倍数 Factor purification
34	30 814 ± 0 466 C	216 592 ± 9 639 d	47 252 ± 2 103 E	0 751 ± 0 033 d
24	29 309 ± 0 466 C	258 035 ± 3 026 c	53 544 ± 0 628 DE	0 895 ± 0 011 c
21	22 302 ± 0 798 D	397 283 ± 14 183 b	62 729 ± 2 239 C	1 377 ± 0 049 b
16	21 784 ± 0 732 D	472 811 ± 16 603 a	72 923 ± 2 561 B	1 639 ± 0 058 a
12	20 326 ± 0 399 D	456 290 ± 14 497 a	65 664 ± 2 086 BC	1 582 ± 0 050 a
10	19 245 ± 0 333 D	445 400 ± 2 368 a	60 687 ± 0 323 CD	1 544 ± 0 008 a
皱胃酶原溶液 Crude rennet solution	51 545 ± 0 210 A	288 443 ± 8 840 c	100 000 ± 3 065 A	1 000 ± 0 031 c

3 讨 论

3 1 硫酸铵对羔羊皱胃酶盐析效果的影响

硫酸铵是盐析中应用最广泛的中性盐,但是硫酸铵沉淀的蛋白质中含有大量的NH₄⁺离子,影响蛋白质的定量分析,因此盐析沉淀物须进行脱盐处理。本研究采用硫酸铵盐析羔羊皱胃酶时,沉淀中的酶最多只能回收 58% 的凝乳活性,且透析结束后,凝乳活性损失很大。一些具有凝乳活性的小分子物质在透析过程中流失,从而导致透析后酶活性的损失^[4]。因此,采用透析法脱盐不利于羔羊皱胃酶的纯化,硫酸铵不适宜作为羔羊皱胃酶的盐析剂。

3 2 食盐对羔羊皱胃酶盐析效果的影响

酶的本质是蛋白质,在不同的 pH 下有不同的溶解度,当溶液 pH 远离酶蛋白等电点时,酶蛋白所带的静电荷增多,溶解度增大,不易析出。当溶液的 pH 在酶的等电点时,酶蛋白静电荷为零,最易沉淀析出。因此,盐析时常选择溶液的 pH 在酶的等电点附近,以有利于提高盐析效果。羔羊皱胃酶的等电点

为 4.6^[4],在此 pH 下酶的溶解度最低,有利于盐析沉淀。

温度是影响酶活性和溶解度的重要因素。在高离子强度溶液中,温度升高,酶的溶解度提高。然而酶是具活性的蛋白质,当温度较高时,酶蛋白质会发生变性而损失活性。盐析羔羊皱胃酶时,温度显著影响酶的活性,在较高的温度下盐析时酶会发生热变性而失活。因此,选择适应的盐析温度对酶的纯化至关重要。

食盐饱和度对酶的溶解度有重要影响。通常盐浓度越高,蛋白质的溶解度越低,越有利于酶的盐析沉淀。本研究中,当食盐饱和度大于 55% 时,羔羊皱胃酶的活性回收率不再提高,在此饱和度下具有活性的酶几乎完全沉淀析出。然而当食盐饱和度大于 75% 时,酶的纯化倍数显著下降,这时在沉淀酶的同时也有一部分杂质同时沉淀析出。

酶的盐析沉淀需要一定的时间才能形成,盐析时间较短,酶不能完全析出。但盐析时间过长,可能沉淀出更多的杂蛋白,引起纯化倍数减小。本研究中

盐析沉淀羔羊皱胃酶 16 h 即可达到理想的效果。

4 结 论

对超声提取羔羊皱胃酶的盐析条件研究表明, 采用硫酸铵盐析羔羊皱胃酶, 沉淀中最多只能回收 58% 的凝乳活性, 且在透析过程中酶活性有损失。因此, 硫酸铵不适宜用于盐析羔羊皱胃酶; 而食盐在皱胃酶制品中大量存在, 利用食盐盐析可最大限度地回收酶活性, 且形成的沉淀无需脱盐。其适宜的盐析条件为: 食盐饱和度 55%~65%, 盐析 pH 4.00~4.60, 盐析温度 4℃, 盐析时间 16 h。

[参考文献]

[1] 韩绍玫. 用于干酪生产的凝乳酶与小牛皱胃酶的制备[J]. 中国

乳品工业, 1987(6): 262-264

[2] Lopes A, Teixeira G, Liberato M C, et al. New vegetal sources for milk-clotting enzymes[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1998, 5: 63-68

[3] 赵胜娟, 陈树兴, 张富新. 羔羊皱胃酶提取工艺研究[J]. 河南农业科学, 2005(5): 75-77.

[4] 张富新, 李林强. 超声处理对羔羊皱胃酶提取活性的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1555-1559

[5] Arina K, Shinier I, Gakuzo T. Milk-clotting enzymes from microorganism, part I. Screening test and identification of potent fungus[J]. Agric Biol Chem, 1967, 31(5): 540-545

[6] Folmann B. Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin) [J]. J Biochem, 1969, 115(3): 39-49

[7] 王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 108

(上接第 100 页)

[8] Kyoizuka J, McElroy D, Hayakawa T, et al. Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice[J]. Plant Physiol, 2001, 102(3): 991-1000

[9] Liu Q Q, Yu H X, Zhang W J, et al. Specific expression of the foreign gene regulated by the rice *rbcS* promoter in transgenic rice[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(3): 247-253

[10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[11] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant, 1994, 6: 271-282

[12] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 205-218

[13] Bradford H M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle

of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254

[14] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387-405

[15] Breathnach R, Chambon P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins [J]. Annu Rev Biochem, 1981, 50: 349-384

[16] Donald R G K, Cashmore A R. Mutation of either G-box or T-box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter[J]. EMBO J, 1990, 9: 1717-1726

[17] Schindler U, Cashmore A R. Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins[J]. EMBO J, 1990, 9: 3415-3427.

[18] Nomura M, Katayama K, Nishimura A, et al. The promoter of *rbcS* in a C3 plant (rice) directs organ-specific, light-dependent expression in a C4 plant (maize), but does not confer bundle sheath cell-specific expression [J]. Plant Mol Biol, 2000, 44(1): 99-106