

利用猪新鲜胰脏降解猪血蛋白的条件研究

陈力力, 马美湖, 周 熠, 谭周进, 陈冬纯
(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 研究了猪新鲜胰脏提取胰酶以及胰酶粗提液降解猪血蛋白获取蛋白水解液的条件。结果表明: 加入提取溶剂乙醇和激活和稳定剂 CaCl_2 能提高胰蛋白酶的得率。在 $E/S=6000\text{U/ml}$ 加入胰酶、底物浓度 8%、 $\text{pH}8.0$ 条件下, 45°C 水解时间 12h, 猪血蛋白的水解率较高。

关键词: 猪血; 胰酶; 水解; 蛋白水解液

Study on Preparation Conditions of Pancrease-hydrolyzed Protein with Porcine Blood

CHEN Li-li, MA Mei-hu, ZHOU Yi, TAN Zhou-jin, CHEN Dong-chun
(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In this study, the optimum conditions of the pancreas extracted pancreatin from porcine blood and utilization of the pancreatin to hydrolyze the porcine blood protein were studied. The results showed that ethanol and CaCl_2 are propitious to extract pancreatin. The optimum enzymolysis conditions are: $\text{pH}8.0$, 45°C , hydrolysis time 12 h, enzyme/substrate ratio 6000 U/ml, and concentration of substrates 8%.

Key words porcine blood pancreatin hydrolysis protein hydrolyzed

中图分类号: Q93.331

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0240-04

猪血液中各种成分含量稳定, 含有微量元素、矿物质、维生素、激素、酶系等, 尤其富含蛋白质, 干物质中粗蛋白含量达 88% 以上, 是一种可以大量获得的营养价值很高的宝贵的动物性蛋白资源^[1]。近年来人们采用酸水解法、发酵法和酶解法将猪血蛋白肽链切断水解成氨基酸、低肽等小分子物质应用于在食品、饲料、医药等行业取得了很大进展^[2-7], 然而探求简单易行、高效率、低费用的猪血降解方法, 仍然是猪血蛋白深加工综合利用的关键。研究以猪新鲜胰脏提取胰酶的方法以及胰酶粗提液降解猪血蛋白获取蛋白水解液的条件。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

新鲜猪血及胰脏购自市郊区东湖个体屠宰户, 所用试剂均为实验室常用的分析纯试剂和生化试剂。

1.2 主要仪器

精密增力电动搅拌器、MM12 型绞肉机、数显式电热恒温水浴锅、LD5-2A 型低速离心机、78-2 型双向磁力搅拌器、E02140 电子分析天平、722S 分光光度计、

PHS-3C 型 pH 计、玻璃器皿、回流装置、消化装置、微量凯氏定氮仪等。

1.3 方法

1.3.1 胰蛋白酶的制备

新鲜胰脏剥除脂肪后, 分为 3 组进行以下处理: ①加入 1.5 倍的水、匀浆、调节 pH 至 5.5 后静置 2h, 随后加入 0.2% CaCl_2 室温下搅拌 2h, 获得粗酶液; ②加入 1.5 倍预冷的 20% 乙醇、匀浆、调节 pH 至 5.5, 室温下搅拌 4h 获得粗酶液; ③加入 1.5 倍预冷的 20% 乙醇、匀浆、调节 pH 至 5.5 后静置 2h, 随后按匀浆液体积加入 0.02% CaCl_2 室温下搅拌 2h 获得粗酶液。测定 3 种处理的粗酶液的蛋白酶活力。

1.3.2 猪血蛋白的降解

猪血从屠宰场收集后, 纱布过滤除去杂质, 迅速添加 0.6% 柠檬酸三钠抗凝, 另取少量血液测定蛋白质含量, 抗凝血充分搅打 10min 后, 加 1.2~1.5 倍蒸馏水稀释, 通过不断地搅打和在低渗情况下使红细胞破胞溶血, 直接煮沸或加变性剂处理后, 纯水配制蛋白质浓度 7%~8% 的溶血液, 采用自制粗酶液进行猪血蛋白降解, 酶解过程中, 控制不同的温度和时间, 通过滴加

收稿日期: 2006-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270976)

作者简介: 陈力力(1962-), 女, 副教授, 在职博士研究生, 研究方向为食品生物技术、应用微生物学。

4mol/L 氢氧化钠来维持其 pH 值恒定在 8.0 ± 0.2 ^[13], 最后用 6mol/L HCl 调 pH 至 4.0, 使酶失活, 终止反应, 测定氨基酸态氮并计算蛋白水解率。

1.3.2.1 温度对猪血蛋白降解的影响

在胰蛋白酶添加量、反应时间、底物浓度等固定的条件下, 测定不同反应温度(°C): 20、30、40、50、60、70 时, 采用自制粗酶液进行猪血蛋白降解的水解率, 确定最佳反应温度。

1.3.2.2 时间对猪血蛋白降解的影响

在胰蛋白酶添加量、反应温度、底物浓度等固定的条件下, 测定反应时间(h): 1、2、4、6、8、10、12、15 后, 采用自制粗酶液进行猪血蛋白降解的水解率, 获得最佳反应时间。

1.3.2.3 原料变性处理对猪血蛋白降解的影响

在破胞溶血的猪血液中, 分别加入 0.5% MgSO₄、0.5% MnSO₄、0.25% ZnSO₄ 85°C 保温 20min, 沸水浴 15min 进行变性处理。冷却后根据蛋白质含量测定指标, 用纯水配制蛋白质浓度 7%~8% 的溶血液, 采用自制粗酶液进行猪血蛋白降解, 测定氨基酸态氮并计算蛋白水解率。

1.4 测定分析方法

蛋白酶活测定: Folin-酚法, 按 SB/T 10317-1999 中福林法测定^[8]; 总氮测定: 微量凯氏定氮法^[9-10]按 GB/T 5009.5-2003 中第一法测定; 氨基酸态氮: 甲醛电位滴定法^[10]按 GB/T 5009.39-2003 中甲醛值法操作; 水解率计算: 水解率(%)=(氨基酸态氮/样品中总氮)×100。

三氯乙酸可溶性氮指数(trichloroacetic acid nitrogen solution index, TCA-NSI)的测定: 取各种酶水解液 10ml 加入质量分数为 10% 三氯乙酸(TCA)溶液 10ml 与之混合, 放置 30min 后 3500r/min 下离心 5min, 用凯氏定氮法测定上清液中的可溶性氮的含量。则水解蛋白三氯乙酸可溶性氮指数为: $TCA-NSI = (TCA \text{ 可溶性氮} / \text{水解液总氮}) \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶的制备

3 种处理方法所获得的蛋白酶酶活见表 1, 分别为

表 1 胰蛋白酶活力的测定
Table 1 Protease activity of self-made pancreatin

胰组织处理方法	蛋白酶活力值(U/ml)
① 加入 1.5 倍的水匀浆、调节 pH 至 5.5 后静置 2h, 加入 0.02% CaCl ₂ 室温下搅拌 2h	1381.80
② 加入预冷的 20% 乙醇、匀浆、调节 pH 至 5.5, 室温下搅拌 4h	1966.80
③ 加入预冷的 20% 乙醇匀浆、pH 至 5.5 后静置 2h, 加入 0.02% CaCl ₂ 室温下搅拌 2h	2154.13

1381.80、1966.80 和 2154.13U/ml, 第 3 组酶活力明显高于第 1 组, 其结果说明, 加入提取溶剂乙醇和激活和稳定剂 CaCl₂ 能提高胰蛋白酶的得率。

2.2 温度对猪血蛋白的降解的影响

在猪血底物浓度为(S)8%、pH8.0、酶底物浓度比(E/S)6000U/ml 条件, 不同温度水解 15h, 水解率结果见图 1。

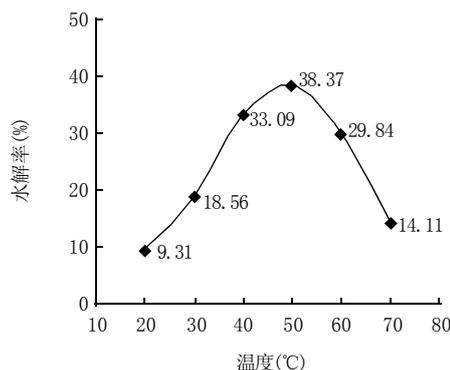


图 1 温度对水解效果的趋势曲线图
Fig.1 Effects of temperature on hydrolysis

由图 1 可见, 当温度 20°C 时, 水解率仅为 9.31%; 反应温度升高时水解率迅速提高, 温度 40~55°C 范围内得率最高, 但提高缓慢; 当温度高于 60°C 时, 水解率降低。因此最佳温度为 40~55°C。

2.3 时间对猪血蛋白的降解的影响

据楚杰^[11], 赖小玲^[12]等人报道, 胰酶水解猪血蛋白的时间都在 6~16h 不等, 时间与水解关系曲线因不同胰酶制品而稍微不同, 本实验结果见图 2, 12~15h 水解率较高, 并仍有上升趋势但平缓, 由于是敞开式条件下水解, 时间延长可能会导致料液腐败以及成本问题等原因, 本实验确定 12h 为最佳时间。

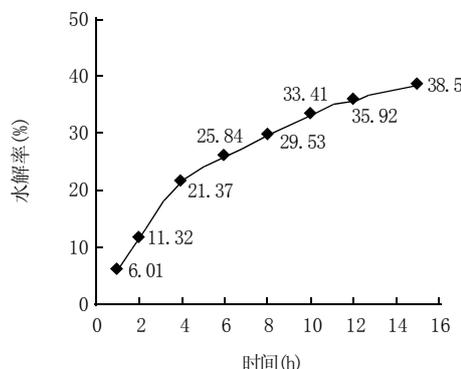


图 2 时间与水解率关系
Fig.2 Effects of time on hydrolysis

2.4 原料变性处理对猪血蛋白降解的影响

蛋白质充分变性可以提高酶作用的效果, 我们采用

0.5% MgSO₄、0.5% MnSO₄、0.25% ZnSO₄作为变性剂进行猪血红蛋白液的变性处理,能有效地提高水解液中氨基酸态氮含量,结果见表2。同时经变性处理的猪血红蛋白液呈暗褐色、颗粒细小,酶解后呈悬液状态;而对照经直接煮沸变性后,红褐色、颗粒大并有碎片,酶解液明显分层,说明变性处理的猪血红蛋白水解率、原料利用率高于对照。但实验中三种变性剂的作用效果没有明显差别。

表2 变性处理对猪血红蛋白降解的影响

Table 2 Effects of denaturants on denaturalization of pig blood protein

变性剂	总氮(mg/100ml)	氨基酸态氮(mg/100ml)	水解率(%)
0.5% MgSO ₄	1184	536	45.27
0.5% MnSO ₄	1184	561	47.38
0.25% ZnSO ₄	1184	534	45.10
对照	1184	454	38.34

2.5 水解过程TCA-NSI值分析

TCA-NSI值反映的是氨基态氮和小于4个氨基酸残基的小肽含氮量之和,三氯乙酸可溶性氮的多少能够很好地反映出蛋白酶分解蛋白质的能力。在猪血底物浓度为(S)8%,40℃,酶底物浓度比(E/S)6000U/ml条件下,不同时间三氯乙酸可溶性氮值见表3。

表3 水解效果TCA-NSI值

Table 3 Yields of hydrolysis in TCA-NSI

时间(h)	TCA可溶性氮(mg/100ml)	TCA-NSI值(%)
8	751	58.6
10	843	65.8
12	863	67.4

水解8、10、12h的TCA-NSI值分别为58.6%、65.8%和67.4%,本结果说明,猪血胰酶水解液中有一定量的小分子肽的存在,其小肽含氮量占总氮15%~20%。

3 讨论与结论

胰酶不溶于高浓度的乙醇、丙酮及乙醚等有机溶剂,但能部分地溶解于水和低浓度乙醇中。胰酶在酸性溶液中稳定,pH6~8时,胰蛋白酶自身催化反应速度最快,可缩短提取时间,但易引起自身降解、酶活损失。胰酶制备中加入钙离子可以加速酶原活化,抑制副反应发生,增加蛋白酶的稳定性^[13-17]。因此我们采用酸性条件下,添加20%乙醇、0.2% CaCl₂制备胰蛋白酶的方法,操作简便并有利于提高酶活,制备的胰酶粗提液直接用于屠宰场猪血红蛋白降解,其酶活力可以满足工艺的要求,而且费用低廉。另据报道^[18],猪胰脏中含有铁、钙、镁、铜、铅、锌、镉、锰、钴、镍等元素,尤以铁的含量较高,采用猪胰脏胰蛋白酶

粗提液降解猪血红蛋白,能使降解物中矿物质元素增加,适合于作为作物生长剂、饲料添加剂及食品生产原料。

血红蛋白分子是由四个折叠的亚基聚合而成的对称的球形分子,具有紧密的立体结构,其酶分解速度是与结构破坏程度相一致的,因此适当变性处理后再进行酶的水解,能使水解率提高^[19-21]。本研究分别采用MgSO₄、MnSO₄、ZnSO₄三种变性剂85℃保温20min,沸水浴15min变性处理,其水解率均高于对照,并且水解液沉淀少,但是三种处理之间无明显差别,由于镁离子可以增加胰酶的水解活力,确定用MgSO₄作为变性剂。

许学书、吴南^[22]等在研究胰酶水解干酪素的动力学行为时发现,不同温度对胰酶活性有影响,40℃时,0.2mg/ml浓度的胰酶可保持14h不失活,50℃下保持30min活力不变,而在60℃下30min,胰酶活力就只有原来的75%左右。40℃、0.2mg/ml、pH7.5条件下,100g干酪素(9.4g/ml)加胰酶0.02g,一次加酶反应7h,水解率几乎达100%,50℃和60℃的反应最终转化率大约为50%。黄素珍^[23]在应用胰酶粗提液水解淘汰鸡肉和猪腹肉时指出60℃为最佳温度,酶解10h水解率最高。因此说明水解率与反应温度和时间有关,也与底物结构、浓度不同有关,本实验利用胰酶粗提液降解猪血红蛋白,按E/S=6000U/ml加入胰酶,在底物浓度8%,pH8.0条件下,45℃水解时间12h,能制得较好的蛋白水解液。

胰酶是从猪胰脏中提取的多种酶的混合物,主要有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、胰淀粉酶和脂肪酶,只能水解以碱性氨基酸(Lys、Arg、Tyr、Trp、Phe)为残基的羧基所形成的肽键。因此经胰酶粗提液水解的猪血红蛋白为氨基酸、小分子肽的混合物。据有关资料报道^[24],三氯乙酸能够沉淀所有的蛋白质和长肽,而且Greeberg和Shipe研究指出,三氯乙酸可溶性部分的肽组成不超过4个氨基酸残基。本研究TCA-NSI分析结果显示,猪血胰酶水解后,水解液中除氨基酸和胰酶非彻底水解的大分子蛋白质等底物成分外,还有一定量的小分子肽的存在。李艳伟、江波^[25]等进行T淋巴细胞转化实验、E花环形成实验及NK细胞杀伤毒性试验等体外免疫学实验,小鼠不同给药方式和给药剂量的体内药理学实验,证明猪血红蛋白中的小分子肽能显著提高生物机体免疫防御功能。

综上所述,以20%乙醇作为提取溶剂、0.2% CaCl₂作为激活剂和稳定剂,室温下提取4h,制备猪胰蛋白酶粗提液,在S=8%、45℃、E/S=6000U/ml条件下,酶解猪血红蛋白12h,能获得较高的猪血红蛋白水解率,是综合利用屠宰厂废弃物简单而有效的方法。

参考文献:

- [1] 褚庆环. 动物性食品副产品加工技术[M]. 青岛: 青岛出版社, 2005: 17-25.
- [2] 谭兴贵, 刘北平, 张大顺, 等. 生血营养液治疗缺铁性贫血的临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(4): 58-60.
- [3] 张华山. 酶解猪血制取复合氨基酸营养液[J]. 中国商办工业, 2000(3): 54-55.
- [4] 卢寅泉. 酶技术开发动物血制取复合氨基酸营养液的研究[J]. 食品科学, 1995, 16(7): 13-17.
- [5] 刘音. 动物有机废弃物制备氨基酸螯合微肥工艺及其生物学效应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2002: 1-53.
- [6] 王远明, 王屹, 陆强. 猪血鸡粪混合饲料的制备[J]. 化学世界, 2003, 44(12): 641-643; 679.
- [7] POLUS-RATAJCZAK I, MAZELA B. The use of blood protein in wood preservatives[J]. Holz als Roh- und Werkstoff, 2004, 62(3): 181-183.
- [8] 中华人民共和国商业部. SB/T 10317-1999蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [9] 无锡轻工业学院, 天津轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1983: 216-219.
- [10] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 食品卫生理化检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [11] 楚杰. 酶法猪血食用蛋白粉的研究[J]. 食品工业科技, 1999, 20(3): 27-28.
- [12] 赖小玲, 刘文群. 血球蛋白的酶水解与脱色[J]. 食品工业科技, 1997(2): 12-16.
- [13] 刘军. 胰酶工艺研究[J]. 中国生化药物杂志, 1993, 64(2): 40-41.
- [14] 齐威, 何明霞, 何志敏, 等. 胰蛋白酶水解全酪蛋白反应过程中的色谱分析[J]. 中国色谱, 2002, 20(1): 1-5.
- [15] 孟祥晨, 杨同舟. 细胞水解产物特性的研究[J]. 食品科技, 2000(4): 11-13.
- [16] 吴晓英. 胰酶制备新工艺的研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(1): 64-67.
- [17] 吴晓英, 张聚宝, 林影, 等. 胰酶制备新工艺的研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(1): 64-67.
- [18] 邓秀清, 黄明伟, 廖胜球, 等. 猪胰脏中铁钙镁铜镉锰钴镍的测定[J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(2): 58-61.
- [19] 张建国, 周建勇. 血红蛋白酶法水解过程数学模型的建立[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 56-59.
- [20] 汤凤霞, 乔长晟. 猪血水解蛋白生产工艺的研究[J]. 宁夏农学院学报, 1996, 17(2): 42-43.
- [21] 马太湖. 动物性食品加工学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 376-378.
- [22] 许学书, 吴南, 翟汉迁, 等. 胰酶水解干酪素的动力学行为[J]. 华东理工大学学报, 2000, 26(4): 346-348.
- [23] 黄素珍. 应用胰酶提高肉品利用价值的研究[J]. 中国畜产与食品, 1999, 6(4): 148-150.
- [24] 何执中, 徐丽珊, 何执静, 等. 胰脏综合利用研究[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 18(6): 292-294.
- [25] 李艳伟, 江波, 佟祥山, 等. 酶解猪血蛋白中活性肽的纯化和功能研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(1): 61-63.

1981年~2007年
影响了中国近三代人
引领了中国数百万学子的成长与成功



少年文摘报
初中版系列

一报在手 中考不愁

欢迎订阅少年文摘报初中版系列

邮发代号	报纸名称	全年价	邮发代号	报纸名称	全年价
53-210	初一英语美语版	48.60	53-218	初二写作与阅读版	27.00
53-211	初一百科知识版	27.00	53-219	初三英语美语版	48.60
53-212	初一英语美语达标版	27.00	53-220	初三化学学习版	27.00
53-213	初一写作与阅读版	27.00	53-221	初三百科知识版	27.00
53-214	初二英语美语学习版	27.00	53-222	中考冲刺模拟版	48.60
53-215	初二数学物理学习版	27.00	53-223	初三写作与阅读版	27.00
53-216	初二百科知识版	27.00	53-207	教育数学研究中学版	92.40
53-217	初二英语美语达标版	27.00			

诚征发行代理 刊发优秀论文

报社地址: 兰州市白银路甘肃新闻大厦13楼 (730030)
咨询电话: 0931-4560670 13519663297
电子邮箱: LLL698698@yahoo.com.cn 联系人: 刘于林

一报在手 高考不愁



少年文摘报
高中系列版

邮发代号	报纸名称	全年价	邮发代号	报纸名称	全年价
53-224	高一英语美语学习版	48.60	53-232	高二理科达标版	48.60
53-225	高一文理综合学习版	48.60	53-233	高二写作与阅读版	27.00
53-226	高一理科达标版	48.60	53-234	高考英语美语版	48.60
53-227	高一写作与阅读版	27.00	53-235	高考文综学习版	48.60
53-228	高二英语美语学习版	48.60	53-236	高考理综学习版	48.60
53-229	高二文综学习版	48.60	53-237	高考文科模拟版	48.60
53-230	高二理综学习版	48.60	53-238	高考理科模拟版	48.60
53-231	高二理科达标版	48.60	53-239	高三写作与阅读版	27.00

诚征发行代理 刊发优秀论文

报社地址: 兰州市白银路甘肃新闻大厦13楼 (730030)
咨询电话: 0931-4560670 13519663297
电子邮箱: LLL698698@yahoo.com.cn 联系人: 刘于林