

PEG/盐双水相体系萃取小麦酯酶的研究

姜彬¹,冯志彪^{1,*},陈一^{1,2}

(1.东北农业大学理学院,黑龙江哈尔滨 150030;

2.河北省石家庄兄弟伊兰食品配料有限公司,河北石家庄 050062)

摘要:采用 PEG/NaH₂PO₄ 双水相体系分离提取小麦中的植物酯酶,对构成双水相体系中的 PEG 分子量、浓度、pH、无机盐类型及浓度对萃取效果的影响进行了分析。确定了双水相组成体系为:23% PEG1000(质量比)和 16% NaH₂PO₄(质量比),pH=4,在此体系中小麦的植物酯酶主要分布在上相,分配系数 K=4.33,纯化倍数达到 2.85,回收率 95%。

关键词:双水相,萃取,植物酯酶

Extraction of esterase with PEG/NaH₂PO₄ two-phase aqueous systemJIANG Bin¹, FENG Zhi-biao^{1,*}, CHEN Yi^{1,2}

(1.College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin150030, China;

2.Shijiazhuang Brother Ilong Food Ingredients & Additive Co.,Ltd., Shijiazhuang 050062, China)

Abstract: The extraction of esterase in two-phase aqueous system was investigated. The effects of the molecular weight and concentration of polyethyleneglycol, pH, the concentrations of NaCl and extract temperature on the extraction coefficient K were studied. The results showed that the optimum conditions were as follows: the mass composition in two-phase aqueous system 23% PEG1000 (w/w), 16% NaH₂PO₄ (w/w), pH = 4, the highest extraction coefficient K could reach 4.33, the purification fold was 2.85 and the yield of plant esterase could reach 95%.

Key words: two-phase aqueous system; extraction; esterase

中图分类号:TS201.2⁺5

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2008)09-0200-04

双水相萃取是利用双水相体系,如聚乙二醇/葡聚糖体系、无机盐等体系的水溶液形成互不相溶的两相,通过选择合适的成相与分配条件,使酶、蛋白质及菌体等生物大分子在两相中有不同比例的分配,从而实现其纯化。双水相萃取技术易于操作,设备简单,而且可直接与后续提纯工序相连接,无需特殊处理,因此近年来受到研究者的重视,尤其是它对生物活性物质的纯化分离能力更为研究者所关注。专家预测,双水相萃取技术是目前为止对生物活性物质纯化分离最有希望应用于大规模工业化生产的技术^[1]。近年来,酶抑制法被广泛用于有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的快速检测中^[2,3]。但目前的报道多集中在有机磷水解酶和动物酯酶,尤其是胆碱酯酶方面。研究表明,农药对植物酯酶也产生抑制作用,利用植物酶的抑制技术,可测定果蔬中有机磷农药和氨基甲酸酯农药^[4,5]。植物酶源丰富、取材方便、制备简单,尤其是小麦酯酶测定效果与动物酯酶接近^[6],因而受到了广泛关注。但目前关于植物酯酶的报道都是用水简单提取后,将粗酶液直接应用于农

药测定,对植物酯酶的提取研究并不多见,而酶的提取方法对酶的活力和纯度以及对农药的敏感程度有着重要影响。本文拟采用双水相萃取技术从小麦中提取植物酯酶,通过对成相物质的组成、浓度、pH、无机盐的影响等方面的考察,优化萃取条件,建立一种简单可行的分离提取小麦中植物酯酶的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

聚乙二醇(PEG) 分子量 600、1000、2000、4000、6000,中国医药集团上海化学试剂公司;考马斯亮蓝 G250、 α -乙酸萘酯、 α -萘酚、固兰 B fluka;牛血清白蛋白、十二烷基硫酸钠(SDS) sigma;其余试剂均为分析纯;实验用水 超纯水。

TU1901 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;超纯水器 北京厉元有限公司;TDL80-2 型台式离心机 上海安亭科学仪器厂;微量移液器 上海热电仪器有限公司;DK-98-1 型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;梅特勒-托利多电子天平 上海梅特勒-托利多公司;nHS-25 型酸度计 上海精科雷磁。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的制备 取一定量的小麦样品,粉碎

收稿日期:2008-01-08 * 通讯联系人

作者简介:姜彬(1977-),男,讲师,硕士,研究方向:食品科学。

后,过筛。准确称取后加水至 1:5,磁力搅拌 30min 后,3000r/min 离心 30min,取上清液,依次用 0.65、0.45 μ m 的滤膜过滤后备用。

1.2.2 双水相体系的操作 准确称取一定量的 PEG 和无机盐于带刻度的离心管中,加适量水溶解后,加入 0.5mL 粗酶液,用蒸馏水调至 10g,混匀后 2000r/min 离心 5min。分别测定上下相体积、酶活和蛋白含量,同时测定未经双水相处理的原酶液酶活和蛋白含量,按以下公式进行计算。

相比 R = 上相体积/下相体积

分配系数 K = 上相酶活/下相酶活

回收率 Y = RK/(1 + RK)

比酶活 = 酶活/蛋白含量

纯化倍数 = 上相比酶活/原酶比酶活

1.2.3 酶活测定方法 在 4mL pH6.0 的缓冲液中加入 0.5mL 酶液,在一定温度的恒温水浴中预热一段时间,加入 250 μ L α -乙酸萘酯的丙酮溶液并混合均匀,计时反应 5min,然后立即与 250 μ L 显色剂固兰 B 盐及一定体积的 3.6% SDS 溶液混合均匀,终止反应,再于该条件下保温 5min。以不加底物(α -乙酸萘酯)的溶液作空白,在最大吸收波长处读取以上反应液的吸光度。酶活性单位定义为:在规定条件下,每分钟催化得到 1 μ mol α -萘酚所需的酶量为 1U。

1.2.4 蛋白质含量测定方法 采用 Bradford 法测定,以牛血清白蛋白为标准。

2 结果与讨论

2.1 成相物质对酶活的影响

2.1.1 PEG 相对分子量对酶活性的影响 取 10mL 20% 的不同分子量 PEG 的水溶液,各加入 1mL 酶溶液,混匀后静置 10min,测定其酶活并与空白比较,计算酶活活性比,结果如图 1。

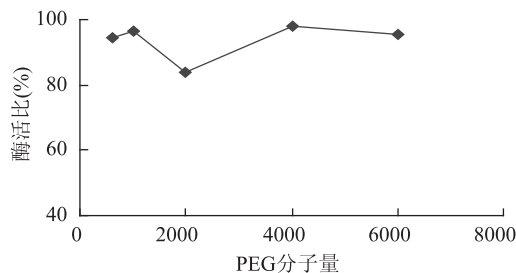


图 1 不同分子量 PEG 对酶活性的影响

由图 1 可以看出,除 PEG2000 外,其余分子量的 PEG 对酶活的影响并不显著,这也说明该体系性质较温和,适于分离纯化小麦酯酶。

2.1.2 PEG 浓度对酶活的影响 将不同分子量的 PEG 配成不同浓度的溶液,每种溶液取 10mL,加入 1mL 酶液,混匀后静置 30min,测定其酶活并与空白比较,计算酶活活性比,结果如图 2。

由图 2 可知,除 PEG2000 外,其余几种分子量的 PEG 在考察浓度范围内对酶活的影响均不显著,所以都可以作为成相物质对植物酯酶进行萃取。

2.1.3 无机盐浓度对酶活的影响 取不同种类的无机盐,准确配制成 10%、13%、15%、18%、20% (w/w) 的溶液,每种溶液取 10mL,各加入 1mL 酶液,

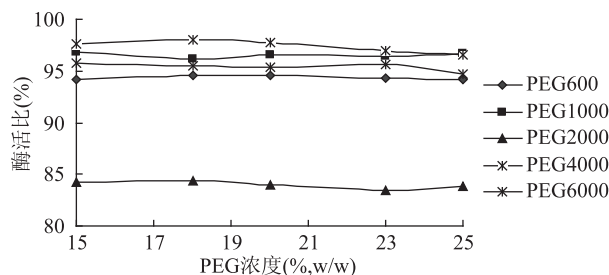


图 2 PEG 浓度对酶活的影响

混匀后静置 30min,测定其酶活并与空白比较,计算酶活活性比,结果如图 3。

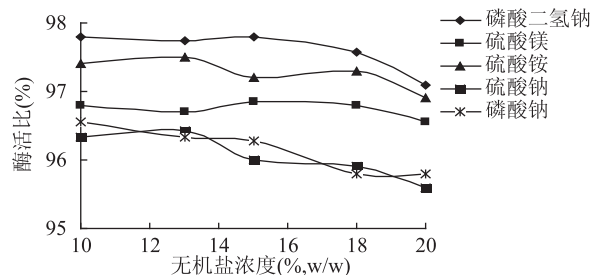


图 3 无机盐浓度对酶活的影响

由图 3 可知,植物酯酶在 5 种无机盐溶液中静置 30min 后,其酶活比均在 95%~98% 之间,说明在考察浓度范围内,5 种无机盐对植物酯酶活性的影响均不显著,可以用来作为成相物质对植物酯酶进行萃取。

2.2 双水相体系的选择

由于核酸与多糖多分配于盐相,并且高盐浓度易造成酶失活,因此目标酶分配系数高的体系更有利于蛋白酶的分离^[7]。本实验的目的是对小麦酯酶进行分离纯化,因此对小麦酯酶纯度要求高,在选择分离体系时应优先考虑比酶活与纯化倍数;同时,适当的回收率也是后续实验的保障。

2.2.1 PEG 相对分子量对萃取的影响 图 4 显示了不同分子量的 PEG 对萃取效果的影响。

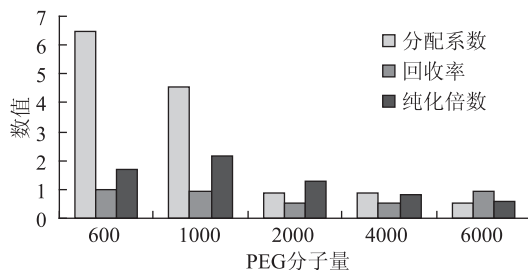


图 4 不同分子量 PEG 对萃取效果的影响

由图 4 可以看出,随着 PEG 分子量的增大,体系的分配系数不断减小,这与大多数蛋白质在双水相系统中的分配规律相一致,降低上相聚物的分子量可以增大分配系数。PEG1000 体系对小麦酯酶萃取的纯化倍数最大,虽然回收率较 PEG600 略低,但是差异并不显著,说明分子量过低时,双水相体系对目标蛋白质的选择性较差。与 PEG1000 相比,分子量为 2000、4000、6000 的 PEG/无机盐体系的萃取效果显著下降,且随着分子量的增大,各项指标均呈下降趋势。这可能是由于分子量增大,相粘度不断增大,且相界面张力增大,不利于小麦酯酶进入 PEG 相。综合考虑,PEG1000 与无机盐构成的双水

相体系更适合用来提取和纯化小麦酯酶。

2.2.2 无机盐种类及浓度对萃取效果的影响 将不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 Na_2SO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_3PO_4 与 20% (w/w) 的 PEG1000 组成双水相体系, 考察其对小麦酯酶的萃取效果。表 1 中列出了每种盐与 PEG1000 组成的双水相体系萃取效果最好的组成比例。

表 1 不同双水相体系的萃取效果

双水相体系	分配系数	回收率	纯化倍数
10% MgSO_4 + 20% PEG1000	1.3	0.51	0.76
15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 20% PEG1000	1.2	0.58	1.30
16% NaH_2PO_4 + 20% PEG1000	5.0	0.87	2.68
15% Na_2SO_4 + 20% PEG1000	3.5	0.92	1.42

由表 1 可知, PEG/ NaH_2PO_4 组成的双水相体系的分配系数和纯化倍数均显著高于其他体系, 虽然回收率略低于 PEG/ Na_2SO_4 体系, 但差异并不显著; 且 Na_2SO_4 在水中溶解速度较慢, 成相时间相对较长, 而 NaH_2PO_4 易溶于水, 分相速度快, 对小麦酯酶的萃取效果最好, 故选择该体系进行双水相萃取。

图 5 显示了 NaH_2PO_4 浓度对萃取效果的影响, 从图 5 中可以看出, 体系中 NaH_2PO_4 浓度对于小麦酯酶的回收率并没有显著影响。在盐浓度较低的情况下, 随着盐浓度的增大, 纯化倍数呈升高的趋势, 此时双水相体系对目标酶的选择性逐渐增强; 但是当盐浓度超过 16% (w/w) 后, 纯化倍数显著降低, 这可能是因为体系中盐的浓度过大, 上相中含盐量增加, 抑制了酶的活性。

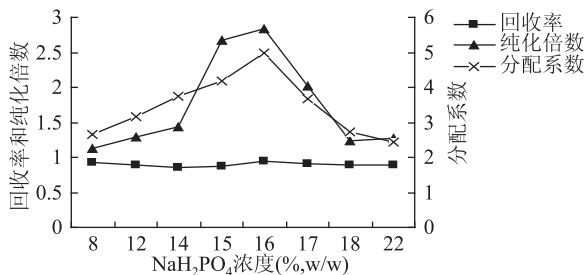


图 5 NaH_2PO_4 浓度对萃取效果的影响

2.2.3 PEG1000 浓度对萃取效果的影响 由图 6 可知, PEG 浓度对双水相萃取的纯化倍数影响较大, 当 PEG 浓度较低时, 纯化倍数随着 PEG 浓度的增大而增大; 但当 PEG 浓度超过 23% 时, 纯化倍数反而下降, 这可能是因为浓度过大, 导致相界面张力增大且相粘度变大, 不利于酶进入 PEG 相。但由于 PEG 浓度越大, 上相体积也显著增大, 虽然单位体积的酶活降低, 但酶活回收率变化不大, 甚至略有增加。

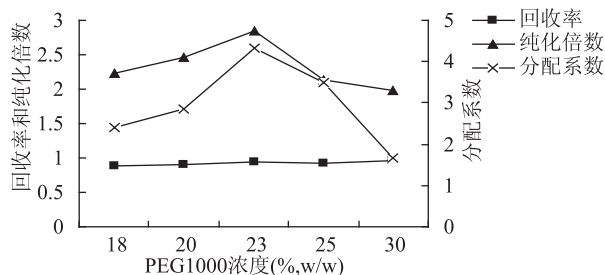


图 6 PEG1000 浓度对萃取效果的影响

2.2.4 pH 对萃取效果的影响 由于 pH 影响蛋白质

的解离度, 调节 pH 可以改变蛋白质的表面电荷数, 从而改变分配系数^[8]。采用 23% (w/w) PEG1000 和 16% (w/w) NaH_2PO_4 构成双水相体系, 考察了 pH 对萃取效果的影响, 结果如图 7。

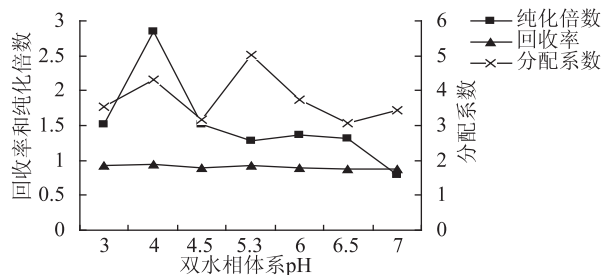


图 7 pH 对萃取效果的影响

由图 7 可以看出, 分配系数随 pH 变化并无明显规律, 但始终在一定范围内波动, 在 pH5.3 时达到最大, 此时分离效果最好。pH 对纯化倍数的影响表现出明显的规律性, 当 pH4 时纯化倍数最大, 达到 2.85; 随着 pH 的增大, 纯化倍数降低。综合考虑应选择 pH4 作为萃取的最佳酸度条件, 由于体系自然 pH 为 3.8~4.1, 因此萃取时不必调节 pH。

2.2.5 外加无机盐对萃取效果的影响 在双水相体系中加入电解质, 由阴、阳离子在两相中的分配差异, 形成穿过相界面的电位, 从而影响带电大分子物质在两相中的分配, 强化分配效率^[9]。其中, 最常加入的电解质是中性盐 NaCl。实验表明, 植物酯酶的分配系数 K 和上相酶活回收率均随着外加盐 NaCl 浓度的增大而降低。可能是由于在该双水相体系中, Na^+ 易分配在 PEG 相, 增加了 PEG 相的正电性, 植物酯酶在 pH7.0 时呈正电性, 因此不利于植物酯酶进入 PEG 相。外加 NaCl 对植物酯酶在该双水相体系中的影响作用是复杂的, 有待进一步研究。在本实验的条件下, 外加盐 NaCl 对植物酯酶的分配是不利的。

3 结论

低分子量 PEG 更利于小麦酯酶分配到上相, 但低分子量 PEG 成相浓度较高且对小麦酯酶的选择性较差, 因此本文选择 PEG1000 作为成相物质。通过对不同组成、不同浓度的双水相体系萃取效果的考察, 发现当 PEG1000 浓度较低时, 萃取效果随浓度增加而提高, 但浓度过大会阻碍小麦酯酶进入 PEG 相, 同时由于 PEG 分子对酶的缠绕、包埋, 会降低酶的活性, 进而导致纯化倍数降低。同时, NaH_2PO_4 浓度对小麦酯酶的分离也有很大影响, 浓度过低时, 分配效果较差, 浓度过高会使酶失活。因此本文选择 23% PEG1000 与 16% NaH_2PO_4 分离纯化小麦酯酶。该体系自然 pH3.8~4.1, 在此条件下对小麦酯酶的分离纯化效果最好, 体系的分配系数 $K = 4.33$, 纯化倍数达到 2.85, 回收率 95%。

参考文献:

- [1] 郭黎平, 傅冬梅, 张卓勇, 等. 双水相萃取技术的研究进展[J]. 东北师大学报自然科学版, 2000(9): 34~40.
- [2] 王加多, 胡祥娜, 周向阳, 等. 蔬菜农药残留快速检测技

卤制牛肉粒的加工技术研究

蔡健¹, 牛芳冰²

(1. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008; 2. 苏州唯葑食品有限公司, 江苏苏州 215001)

摘要: 对卤制牛肉粒的工艺流程、技术操作要点、生产中质量控制方法及产品质量指标进行了研究, 成功地制作了卤制牛肉粒。

关键词: 卤制牛肉粒, 加工技术, 研究

Study on processing technology of gravy beef granule

CAI Jian¹, NIU Fang-bing²

(1. Suzhou Polytechnical Institute of Agriculture, Suzhou 215008, China;
2. Suzhou Weifeng Food Co. Ltd., Suzhou 215001, China)

Abstract: The processing flow, technology operating essential, quality controlling ways in producing process and product quality standard were studied, and gravy beef granule was made successfully.

Key words: gravy beef granule; processing technology; study

中图分类号: TS251.5⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2008)09-0203-02

随着现代社会生活形态的改变, 现代人的饮食生活习惯也发生了变化。饮食精致化、西化、食品加工业发达化等, 给人们带来了诸多的营养问题, 如饮食不均衡、油脂摄入量过高、肉类食品摄取过多、纤维素不足等^[1], 给人们的身心健康带来了危害。牛肉蛋白质含量很高、热量低、脂肪和糖含量较低、营养价值较高, 肉质鲜美, 风味独特, 而且含有尼克酸、钙、镁、钠、锌、锰、蛋白质、铁等多种营养元素^[2], 深受广大消费者的喜爱。本文通过对卤制牛肉粒加工工艺的研究, 制成了高品质低价位的牛肉产品, 能够丰富人们的饮食, 同时使养殖业者增加收益, 扩大养殖规模, 通过吸收农村剩余劳动力建立“公司加农户”模式, 带动一批农户共同致富。

1 材料与方 法

收稿日期: 2008-02-25

作者简介: 蔡健(1962-), 男, 教授, 研究方向: 食品及农产品加工技术。

基金项目: 江苏省“青蓝工程”资助(苏教师[2007]2号)。

术——胆碱酯酶速测卡法[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 109~113.

[3] 魏福祥, 王振川, 王金梅. 乙酰胆碱酯酶生物传感器法测定蔬菜水果中有机磷农药残留[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 229~231.

[4] 钟树明, 袁东星, 金晓英, 等. 植物酯酶抑制技术用于检测蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留[J]. 环境化学, 2002, 21(2): 189~193.

[5] 栾崇林, 马文石, 汪军. 植物酯酶法检测有机磷农药残留

1.1 材料与设备

牛后腿肉, 食盐, 酱油, 白糖, 味精, 生姜, 天然香辛调味料。

可倾式夹层锅、夹层锅 诸城市强大机械厂; 烘箱 吴江永联机械设备厂; 周转箱, 不锈钢盆, 冷库等。

1.2 工艺流程

领料→解冻→分割→预煮→冲冷→成型→拌料→冷却→腌制→炒制→贴扁→烘制→杀菌→预冷→称重→包装→金属探测→装箱→入库

1.3 操作要点

1.3.1 领料 由剔肉组长开具“领料单”领料, 放置在车间指定的地方, 卸掉外包装箱, 用自来水冲去表面冰块, 然后自然解冻, 解冻至内部少软即可, 解冻后由品管抽样检验。

1.3.2 分割 按照肉纤维方向分割, 分成 2~2.5cm 厚, 5~6cm 宽的竖条, 放置于蓝色塑料筐内。

1.3.3 预煮 将肉粒倒入可倾式夹层锅内预煮, 时间 45min, 压力 0.1MPa。水沸后, 翻动上下肉块, 除去

量研究[J]. 分析实验室, 2006, 25(9): 103~106.

[6] 王仲海, 徐斐. 农药生物传感器所用酶的比较研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 21~23.

[7] 吕斌, 陈有容, 陈舜胜. 双水相萃取技术及其在生物、食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(6): 70~74.

[8] 邓静, 吴华昌, 赵树进. 双水相在酶分离纯化中的运用[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 72~75.

[9] 李世贵, 陈明杰. 草菇蛋白酶的分离、纯化及等电点的测定[J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 335~338.