

牦牛胰酶的制备 及其在水解乳蛋白中的应用研究

靳冬武^{1,2},李明生^{1,3},龙仕和^{1,2},崔梦楠²,马素娟⁴,张健²,张磊²,李倬^{1,2},冯玉萍^{1,2},马忠仁^{1,*}

(1.西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室,甘肃兰州 730030;

2.西北民族大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730030;

3.甘肃省动物细胞工程技术研究中心,甘肃兰州 730030;

4.兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730050)

摘要:基于牦牛胰脏提取胰酶,以酶活力和收率作为衡量指标,在单因素实验的基础上通过正交实验,确定牦牛胰酶制备的最佳工艺,最后探讨胰酶水解酪蛋白制备水解乳蛋白的效果。结果表明,牦牛胰酶最佳制备工艺为牦牛胰脏:25%乙醇(提取剂)=1:1,提取激活时间为5h,激活pH=6.8,75%乙醇沉淀8h。所得胰酶中胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶的酶活力分别为1867、16298和5683 U/g,收率达9.7%;用其在温度40℃,pH7.5,酶与底物比例为1:5的条件下水解酪蛋白4h后所得的水解乳蛋白与Hyclone的水解乳蛋白相比较,有19种相同的氨基酸,且氨基酸总含量高于Hyclone的水解乳蛋白,分别为36.111%和27.725%。综上所述,该工艺简单,耗时短,易于产业化,在水解蛋白质领域中具有良好的应用前景。

关键词:牦牛胰脏,胰酶,酶活力,收率,水解乳蛋白

Preparation of yak pancreatin and its application in lactoalbumin hydrolysate

JIN Dong-wu^{1,2}, LI Ming-sheng^{1,3}, LONG Shi-he^{1,2}, CUI Meng-nan², MA Su-juan⁴, ZHANG Jian²,
ZHANG Lei², LI Zhuo^{1,2}, FENG Yu-ping^{1,2}, MA Zhong-ren^{1,*}

(1.The Key Bio-engineering and Technology Laboratory of Nationality Commission,
Northwest University For Nationalities, Lanzhou 730030, China;

2.Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;

3.Engineering Technology Research Center for Animal Cell GanSu, Lanzhou 730030, China;

4.Life Science and Engineering College of Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Pancreatin was extracted from yak pancreas, enzyme activity and yield was used as the measurement index. On the basis of single factor experiment, the orthogonal test was used to determine the optimization of technological parameters of yak pancreatin preparation, at the same time, the effects of hydrolyzing casein was investigated using pancreatin to prepare lactoalbumin hydrolysate. The results showed that the optimum technological condition for preparation of yak pancreatin was as follows: yak pancreas:25% ethanol (extracting agent) = 1:1, extraction and activation time was 5 h, pH = 6.8, 75% ethanol precipitated for 8 h. Under these conditions, enzyme activity of trypsin, amylase and lipase were 1867, 16298 U/g and 5683 U/g respectively, the yield reached 9.7%. Then the pancreatin add to casein with ratio of 1:5 to prepare lactoalbumin hydrolysate under 40℃, pH7.5 for 4 h. Consistant with Hyclone, there were 19 kinds of amino acids in hydrolysis product, but the contents of total amino acids were higher than Hyclone: the percentage was 36.111% and 27.725% respectively. In conclusion, this technique is simple, time saving, feasibility to be industrialized, and will be a good application prospect in the field of protein hydrolysate.

Key words: yak pancreas; pancreatin; enzymatic activity; yield; lactoalbumin hydrolysate

中图分类号: TS251.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)15-0202-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.15.034

收稿日期: 2014-11-13

作者简介: 靳冬武(1985-),男,在读硕士研究生,主要从事生物材料的开发与应用, E-mail: jindongwu2007@163.com。

*通讯作者: 马忠仁(1962-),男,博士,教授,从事生物材料的开发与应用, E-mail: mzh@xbmu.edu.cn。

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT13091);兰州市科技计划项目(2014-1-158);国家民委创新团队计划资助([2013]231号);国家外传项目(GDW20146200235)。

胰酶(Pancreatin)是从猪、牛、羊等哺乳动物胰腺中提取的一种混合酶制剂,呈白色或淡黄色粉末,有特殊的肉臭味,具有吸湿性^[1],广泛应用于食品工业、精细化工、生物医药和蛋白质水解等领域中^[2-3]。胰酶中含有多种活性成分,可作为原料药从中提取所需生化物质^[4],目前国内外对胰酶的需求量较大,尤其在东南亚国家对清真产品需求较大。国内其原料主要源于猪胰脏,我国是畜牧业大国,尤其西北地区牦牛资源丰富。另外,牦牛胰脏含有多种酶,易自溶,不可食用,是废弃物中重要的可利用资源。同时由于国内外穆斯林群众宗教信仰的关系,猪源胰酶的开发利用受到了限制,无疑牦牛胰酶的研究开发利用可作为猪源胰酶的替代品。近年来,酶解蛋白质有了较快的发展,是蛋白质在酶的作用下降解成氨基酸或多肽的过程^[5]。目前水解蛋白的酶制剂主要有胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胃蛋白酶等^[6-8]。而胰酶是一种复合酶,主要成分是胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶,还有羧肽酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、激肽释放酶和核糖核酸酶等^[1,9]。目前,尚未见从牦牛胰脏提取胰酶并将其用于水解乳蛋白的相关文献报道。本文以乙醇为提取剂和沉淀剂,采用单因素实验和正交实验筛选出牦牛胰酶制备最佳工艺参数,并用牦牛胰酶水解酪蛋白,旨在为牦牛胰酶产业化和水解乳蛋白研究提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜牦牛胰脏 甘南高原生物工程有限公司;猪源胰酶 胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶活力分别为 3051、92328、31000 U/g Sigma 公司;猪胰脏 采集青海省乐都县屠宰厂;凝乳酶干酪素 甘肃省动物细胞工程技术研究中心;水解乳蛋白 Hyclone;可溶性淀粉 北京红星化工厂;阿拉伯树胶粉 上海化学试剂采购供应站试剂厂,英国进口分装;橄榄油 化学纯,上海中泰化学试剂有限公司;其它试剂均为分析纯。

SG2 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器有限公司;biomate5 型紫外/可见光分光光度计 美国 Thermo;HJ-6A 多头磁力加热搅拌器 上海国华;DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;L8900 型全自动氨基酸分析仪 日本 HITACHI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 制备工艺路线 新鲜牦牛胰脏→胰浆→提取激活→沉淀→脱脂→干燥→胰酶粉

1.2.2 单因素实验 根据制备工艺路线,取胰脏 200 g,用 200 mL 25% 乙醇作提取剂,0.2% CaCl₂ 作激活剂,0.5% NaCl 和 0.5% 可溶性淀粉作保护剂。以提取激活时间、pH、沉淀剂浓度、沉淀时间 4 个因素进行单因素实验,做平行实验 3 次,确定影响牦牛胰酶活力(胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶)和收率的最佳单因素条件。

1.2.2.1 提取激活时间对酶活力和收率的影响 胰

酶提取过程中,控制体系的 pH6.8,沉淀剂浓度为 75%,沉淀时间为 10 h,提取激活时间分别设置为 3、4、5、6 和 7 h。

1.2.2.2 提取激活 pH 对酶活力和收率的影响 胰酶提取过程中,控制体系的提取激活时间为 5 h,沉淀剂浓度为 75%,沉淀时间为 10 h,pH 分别设置为 4.8、5.8、6.8、7.8 和 8.8。

1.2.2.3 沉淀剂的浓度对酶活力和收率的影响 胰酶提取过程中,控制体系的提取激活时间为 5 h,pH6.8,沉淀时间为 10 h,沉淀剂浓度分别设置为 60%、65%、70%、75% 和 80%。

1.2.2.4 沉淀时间对酶活力和收率的影响 胰酶提取过程中,控制体系的提取激活时间为 5 h,pH6.8,沉淀剂浓度 75%,沉淀时间分别设置为 6、8、10、12 和 14 h。

1.2.3 正交实验设计 选择提取激活时间、pH、沉淀剂浓度和沉淀时间 4 个因素,根据单因素实验得出的结果,选择合适的水平采用 L₉(3⁴) 正交实验确定胰酶提取的最佳工艺参数,正交实验 L₉(3⁴) 因素水平设计见表 1。

表 1 正交实验 L₉(3⁴) 因素水平

Table 1 Factors and levels for L₉(3⁴) orthogonal test

| 水平 | 因素 | | | |
|----|---------------------|---------------|--------------------|-------------------|
| | A 提取 激活时间 (h) | B 提取 激活 pH | C 沉淀剂 浓度 (%) | D 沉淀 时间 (h) |
| 1 | 4 | 5.8 | 65 | 8 |
| 2 | 5 | 6.8 | 70 | 10 |
| 3 | 6 | 7.8 | 75 | 12 |

1.2.4 工艺验证 取牦牛胰脏和猪胰脏按照以上正交实验所得的最佳工艺参数制备胰酶。

1.2.5 酶活力测定和收率计算^[1] 胰蛋白酶、胰脂肪酶、胰淀粉酶的酶活力测定均按 2010 版中国药典方法进行。收率计算公式为:收率(%) = 干燥胰酶粉重量/所用猪胰脏重量 × 100。

1.2.6 牦牛胰酶水解酪蛋白制备水解乳蛋白 牦牛胰酶水解酪蛋白的方法参照田伟等^[10]、Xie NN 等^[11]和 Jrad Z 等^[12]的方法并适当改进。具体工艺为:酶与底物比例(E/S)为 1:5,温度 40 ℃,pH7.5,水解 4 h,然后 85 ℃ 水浴灭活 15 min,迅速冷却后于 3800 r/min 条件下离心 20 min,取上清液喷雾干燥即为水解乳蛋白。

1.2.7 水解乳蛋白游离氨基酸测定 取牦牛胰酶水解乳蛋白 100 mg 溶解至 100 mL 纯化水中,用 5% 的三氯乙酸溶液将原液浓度稀释 2 倍后,8000 r/min 离心 15 min 后,采用 L-8900 型全自动氨基酸分析仪检测上清液中的游离氨基酸,同时以 Hyclone 水解乳蛋白为对照。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 提取激活时间对酶活力和收率的影响 由图 1 可以看出,随着提取激活时间的增加,酶活力和收

率均呈先升高后降低的趋势。胰蛋白酶和胰脂肪酶的酶活力在3~5 h明显上升($p < 0.05$), 5 h达到最大值, 分别为2279 U/g和6450 U/g; 胰淀粉酶活力在3~4 h略有下降, 但在4~5 h急剧增加($p < 0.05$), 5 h达到最大值, 为22088 U/g。胰酶收率在3~5 h范围内明显上升($p < 0.05$), 5 h达到最大值, 为9.84%。在5 h后, 随着提取激活时间的增加, 三酶活力和收率急剧下降($p < 0.05$)。因此, 提取激活时间以5 h最佳。综上可知, 提取激活时间对酶活力和收率具有显著性的影响, 选择最佳提取激活时间, 既可使酶充分激活, 又能避免激活后的蛋白酶自身降解, 是把握激活时间的关键。

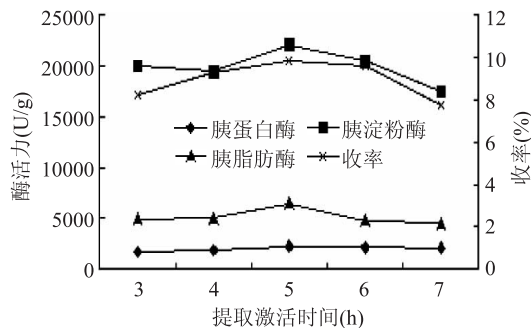


图1 提取激活时间对酶活力和收率的影响
Fig.1 Effect of extraction and activation time on enzyme activity and yield

2.1.2 提取激活 pH 对酶活力和收率的影响 由图2可以看出, 随着提取激活 pH 的变化, 三酶活力和收率均呈先升高后降低的趋势。在 pH4.8~6.8 范围内, 胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶的酶活力急剧增加($p < 0.05$), 在 pH6.8 条件下三酶活力达到最大值, 分别为2279、22088和6450 U/g; 此后, 随着 pH 的升高三酶活力均有所下降($p < 0.05$)。胰酶收率在 pH4.8~5.8 范围内明显上升($p < 0.05$), 在 pH5.8 达到最高, 为10.47%, 此后随着 pH 的升高胰酶收率明显下降($p < 0.05$), 而在 pH7.8~8.8 胰酶收率略有上升。鉴于酶活力在生产应用中至关重要, 提取激活 pH 选择6.8为宜。

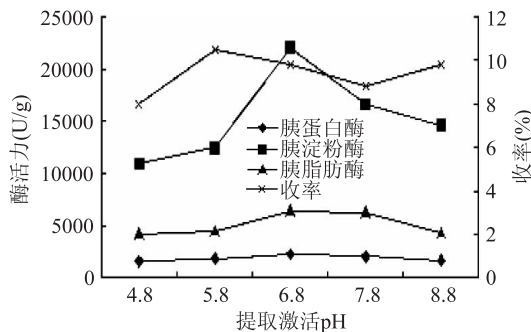


图2 提取激活 pH 对酶活力和收率的影响
Fig.2 Effect of extraction and activation pH on enzyme activity and yield

2.1.3 沉淀剂的浓度对酶活力和收率的影响 由图3可以看出, 随着沉淀剂浓度的增加, 三酶活力和收率均呈先升高后降低的趋势。沉淀剂的浓度在60%~75%范围内, 胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂

肪酶的酶活力和收率明显上升($p < 0.05$), 在75%三酶活力和收率均达到最高, 分别为2216、23220、6300 U/g和9.92%; 在75%~80%范围内, 三酶活力和收率明显下降($p < 0.05$)。因此, 沉淀剂的浓度以75%最佳。

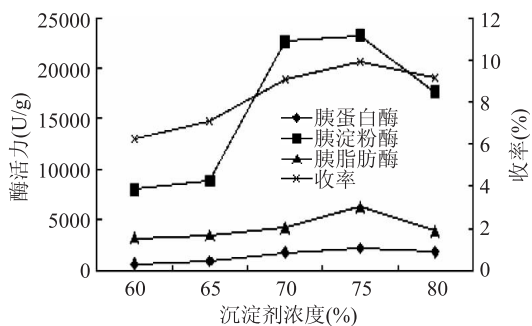


图3 沉淀剂浓度对酶活力和收率的影响
Fig.3 Effect of precipitant concentration on enzyme activity and yield

2.1.4 沉淀时间对酶活力和收率的影响 由图4可以看出, 随着沉淀时间的增加三酶活力均有所变化。在沉淀时间为6~8 h 胰蛋白酶和胰淀粉酶的酶活力无明显的变化($p > 0.05$), 8~10 h 三酶活力均有所升高($p < 0.05$), 10 h 达到最大值, 分别为2279和22446 U/g, 10~12 h 略有降低($p > 0.05$); 胰脂肪酶的活力在6 h 时最高, 为6450 U/g, 随后略有降低($p > 0.05$), 而在10~12 h 胰脂肪酶的活力急剧下降($p < 0.05$)。沉淀时间对收率的影响不是很明显($p > 0.05$), 均在9.31%~9.85%。因此, 沉淀时间以10 h 最佳。此结果同 Balasubramaniam V, Mustar S 等^[13]发现乙醇浓度的大小和作用时间的长短对脂肪酶和淀粉酶的活力影响结果一致, 作用时间过长会对酶活力有抑制。因此, 沉淀时间对酶活力尤为重要。

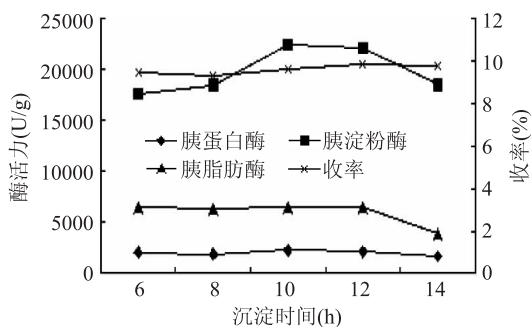


图4 沉淀时间对酶活力和收率的影响

Fig.4 Effect of precipitation time on enzyme activity and yield

2.2 正交实验结果

根据单因素实验结果, 确定影响酶活力和收率的四个因素(提取激活时间、pH、沉淀剂的浓度和沉淀时间)的主要水平。通过 $L_9(3^4)$ 正交实验确定胰酶提取的最佳工艺。其结果见表2。

如表2所示, 最佳的实验组合为 $A_2B_2C_3D_1$, 胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶的酶活力分别达到1996、16670、5550 U/g, 收率达到9.6%。由极差 R 可以看出, 影响胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶和收率的

表2 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal test

| 实验号 | 因素 | | | | 酶活力(U/g) | | | 收率(%) | |
|---|------|------|------|------|---|-------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D | 胰蛋白酶 | 胰淀粉酶 | 胰脂肪酶 | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1452 | 15837 | 4500 | 9.2 | |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1330 | 14169 | 4250 | 9.1 | |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1471 | 16670 | 4500 | 9.1 | |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1813 | 15170 | 5450 | 9.8 | |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1996 | 16670 | 5550 | 9.6 | |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1848 | 16087 | 4800 | 9.3 | |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1728 | 13336 | 4650 | 8.2 | |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1869 | 12502 | 4500 | 9.2 | |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1940 | 13336 | 4800 | 9.8 | |
| 以胰蛋白酶活力为指标 | | | | | 以胰淀粉酶活力为指标 | | | | |
| K ₁ | 1417 | 1664 | 1723 | 1796 | K ₁ | 15559 | 14781 | 15003 | 15281 |
| K ₂ | 1886 | 1732 | 1694 | 1635 | K ₂ | 15976 | 14447 | 14225 | 14530 |
| K ₃ | 1845 | 1753 | 1732 | 1718 | K ₃ | 13058 | 15364 | 15281 | 14781 |
| 极差 R | 469 | 89 | 38 | 161 | 极差 R | 2918 | 917 | 1056 | 751 |
| 主次顺序: A > D > B > C | | | | | 主次顺序: A > C > B > D | | | | |
| 最优组合: A ₂ B ₃ C ₃ D ₁ | | | | | 最优组合: A ₂ B ₃ C ₃ D ₁ | | | | |
| 以胰脂肪酶活力为指标 | | | | | 以收率为指标 | | | | |
| K ₁ | 4417 | 4867 | 4600 | 4950 | K ₁ | 9.1 | 9.1 | 9.2 | 9.5 |
| K ₂ | 5266 | 4767 | 4833 | 4567 | K ₂ | 9.6 | 9.3 | 9.6 | 8.9 |
| K ₃ | 4650 | 4700 | 4900 | 4817 | K ₃ | 9.1 | 9.4 | 9.0 | 9.4 |
| 极差 R | 849 | 167 | 200 | 383 | 极差 R | 0.5 | 0.3 | 0.6 | 0.6 |
| 主次顺序: A > D > C > B | | | | | 主次顺序: C = D > A > B | | | | |
| 最优组合: A ₂ B ₁ C ₃ D ₁ | | | | | 最优组合: A ₂ B ₃ C ₂ D ₁ | | | | |

表3 组合验证结果
Table 3 Verification results of combination

| 组合 | 酶活力(U/g) | | | 收率(%) |
|---|--------------|----------------|--------------|-------------|
| | 胰蛋白酶 | 胰淀粉酶 | 胰脂肪酶 | |
| A ₂ B ₃ C ₃ D ₁ | 1753 ± 37.05 | 16223 ± 109.19 | 5515 ± 63.06 | 9.33 ± 0.06 |
| A ₂ B ₂ C ₃ D ₁ | 1867 ± 34.79 | 16529 ± 53.33 | 5567 ± 44.10 | 9.66 ± 0.06 |
| A ₂ B ₃ C ₂ D ₁ | 1723 ± 48.17 | 16006 ± 123.47 | 5217 ± 65.86 | 9.13 ± 0.09 |
| A ₂ B ₁ C ₃ D ₁ | 1807 ± 45.12 | 16017 ± 106.89 | 5250 ± 86.60 | 9.37 ± 0.14 |

四因素的主次顺序不同,分别为 A(激活时间) > D(沉淀时间) > C(沉淀剂的浓度) > B(pH), A > C > B > D, A > D > C > B, C = D > A > B。同时根据 K_i 看出以胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶和收率为指标的最优组合不同,分别为 A₂B₃C₃D₁、A₂B₃C₃D₁、A₂B₁C₃D₁ 和 A₂B₃C₂D₁。经验证, A₂B₂C₃D₁ 的酶活力和收率最高且标准差最低,重现性最好,结果见表3。因此,牦牛胰酶制备的最优工艺为激活提取时间为5 h, pH = 6.8, 沉淀剂的浓度为75%和沉淀时间为8 h。

2.3 工艺验证结果

本实验酶活力检测时对照组胰酶源于猪源,而其酶活力均高于牛源胰酶的活力,因此本实验分别采用牦牛胰脏和猪胰脏为原料按照正交实验所得的工艺参数路线制备胰酶,结果见表4。

从表4可以看出,按照单因素实验和正交实验

所得出最佳工艺参数所制备牦牛胰酶的胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶三酶活力的平均值分别为1867、16298、5683 U/g,与对照组差异较大;猪胰酶的胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶三酶活力的平均值分别为3055、82788、32667 U/g,其活力与对照组没有明显差异。说明该工艺参数是胰酶制备的最佳工艺参数。通过单因素方差分析对牦牛胰酶和猪胰酶的酶活力和收率进行了比较,结果表明牛胰脏和猪胰脏来源的胰蛋白酶、胰淀粉酶、胰脂肪酶三酶活力和收率相应所得的 $p < 0.05$, 差异显著。说明这与胰脏的来源有关^[14]。

2.4 牦牛胰酶水解酪蛋白产物中游离氨基酸测定结果

根据图5和表5可以看出,牦牛胰酶水解乳蛋白与 Hyclone 水解乳蛋白均有19种相同的氨基酸,氨基酸含量有明显的差异,分别为36.111%和

表5 Hyclone 对照品与样品氨基酸组成

Table 5 Amino acids composition of Hyclone standard(A) and sample(B)

| 序号 | 氨基酸名称 | 自制品(%) | 对照品(%) | 序号 | 氨基酸名称 | 自制品(%) | 对照品(%) |
|----|---------------------------|--------|--------|----|---------------------|--------|--------|
| 1 | 磷酸丝氨酸(P-Ser) | 0.352 | 0.225 | 11 | 胱氨酸(Cys) | 0.245 | 0.089 |
| 2 | 天冬氨酸(Asp) | 10.838 | 6.238 | 12 | 蛋氨酸(Met) | 0.738 | 0.780 |
| 3 | 苏氨酸(Thr) | 0.643 | 0.716 | 13 | 异亮氨酸(Ile) | 1.015 | 2.169 |
| 4 | 丝氨酸(Ser) | 0.564 | 0.707 | 14 | 亮氨酸(Leu) | 3.927 | 5.685 |
| 5 | 天冬酰胺(AspNH ₂) | 0.569 | 0.600 | 15 | 酪氨酸(Tyr) | 2.817 | 0.779 |
| 6 | 谷氨酸(Glu) | 2.157 | 0.527 | 16 | 苯丙氨酸(Phe) | 2.233 | 1.719 |
| 7 | 谷氨酰胺(GluNH ₂) | 1.907 | 0.253 | 17 | 氨(NH ₃) | 0.248 | 0.249 |
| 8 | 甘氨酸(Gly) | 0.096 | 0.094 | 18 | 赖氨酸(Lys) | 3.655 | 1.755 |
| 9 | 丙氨酸(Ala) | 0.579 | 1.012 | 19 | 组氨酸(His) | 0.217 | 0.571 |
| 10 | 缬氨酸(Val) | 1.256 | 2.494 | 20 | 精氨酸(Arg) | 2.055 | 1.063 |

27.725%, 牦牛胰酶水解乳蛋白中 P-Ser、Asp、Glu、GluNH₂、Cys、Tyr、Phe、Lys 和 Arg 9 种氨基酸的含量高于 Hyclone 水解乳蛋白, Thr、Ser、Ala、Val、Ile、Leu 和 His 7 种氨基酸的含量低于 Hyclone 水解乳蛋白, AspNH₂、Gly 和 Met 氨基酸含量基本保持一致。这与底物的种类及酶的专一性有关, 胰酶是一种多酶复合物, 其与氨基酸的结合位点具有专一性。例如, 胰蛋白酶水解阳离子氨基酸结合位点(Arg、Lys), 糜蛋白酶能够水解芳香族和支链氨基酸的结合位点(Tyr、Phe、Trp、Leu), 羧肽酶 A 除了不能水解 Asp、Glu、Arg、Lys 四种氨基酸的结合位点以外, 其余各种氨基酸的结合位点都能被水解, 弹性蛋白酶能够水解 Ala 的结合位点^[9]。

表4 工艺验证实验结果

Table 4 Results of validation experiment

| 批次 | 酶活力(U/g) | | | 收率(%) |
|-----|----------|-------|-------|-------|
| | 胰蛋白酶 | 胰淀粉酶 | 胰脂肪酶 | |
| 对照组 | 3051 | 92328 | 31000 | - |
| 1 | 1856 | 16503 | 5500 | 9.6 |
| 2 | 1813 | 15835 | 5900 | 9.8 |
| 3 | 1932 | 16503 | 5650 | 9.6 |
| 4 | 3123 | 81683 | 31000 | 12.5 |
| 5 | 3051 | 83350 | 34000 | 12.2 |
| 6 | 2992 | 83350 | 33000 | 11.0 |

注:表中对照组为 sigma 猪源胰酶, 1、2、3 以牦牛胰脏为原料, 4、5、6 以猪胰脏为原料。

3 结论

牦牛胰酶制备的最佳工艺为: 牦牛胰脏:25% 乙醇(提取剂) = 1:1, 提取激活时间为 5 h, 激活 pH = 6.8, 75% 乙醇沉淀 8 h。所得胰酶中胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶的酶活力分别为 1867、16298、5683 U/g, 收率达 9.7%。

用牦牛胰酶在温度 40 °C, pH7.5, 酶与底物比例为 1:5 的条件下水解酪蛋白 4 h 后所得的水解乳蛋白与 Hyclone 的水解乳蛋白相比较, 有 19 种相同的氨基酸, 且氨基酸总含量高于 Hyclone 的水解乳蛋白, 分别为 36.111% 和 27.725%。该工艺简单, 耗时短, 易于产业化, 在水解蛋白质领域中具有良好的应用前景。

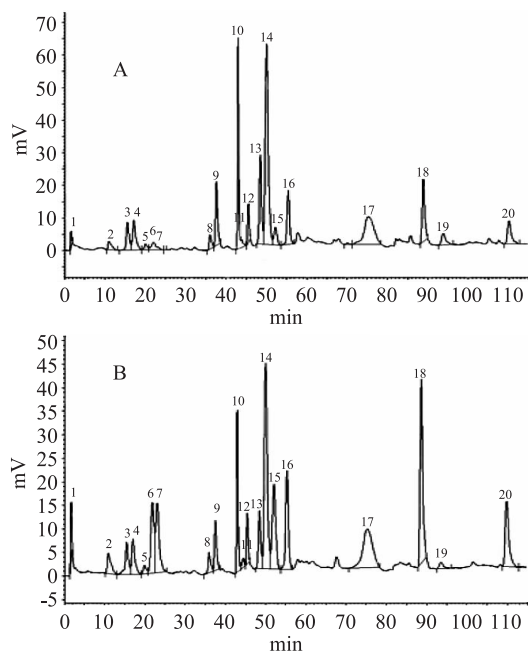


图5 Hyclone 对照品(A)与样品(B)氨基酸分析色谱图
Fig.5 Chromatograms of Hyclone standard(A) and sample(B)
注:1.磷酸丝氨酸(P-Ser);2.天冬氨酸(Asp);3.苏氨酸(Thr);4.丝氨酸(Ser);5.天冬酰胺(AspNH₂);6.谷氨酸(Glu);7.谷氨酰胺(GluNH₂);8.甘氨酸(Gly);9.丙氨酸(Ala);10.缬氨酸(Val);11.胱氨酸(Cys);12.蛋氨酸(Met);13.异亮氨酸(Ile);14.亮氨酸(Leu);15.酪氨酸(Tyr);16.苯丙氨酸(Phe);17.氨(NH₃);18.赖氨酸(Lys);19.组氨酸(His);20.精氨酸(Arg)。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010, 848-849.
- [2] Wu Y, Wang Y J, Luo GS, et al. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(14): 3459-3464.
- [3] Sikkens E C M, Cahen D L, Kuipers E J, et al. Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis [J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2010, 24(3):

337-347.

[4] 魏文毅, 张丽萍, 王琴, 等. 猪胰脏中胰酶的制备新工艺技术研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(1): 72-78.

[5] Segura-Campos M R, Tovar-Benítez T, Chel-Guerrero L, et al. Functional and bioactive properties of Velvet bean (*Mucuna pruriens*) protein hydrolysates produced by enzymatic treatments [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2014, 8(2): 61-69.

[6] Demirhan E, Apar D K, Özbek B. Sesame cake protein hydrolysis by alcalase: Effects of process parameters on hydrolysis, solubilisation, and enzyme inactivation [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2011, 28(1): 195-202.

[7] Yarnpakdee S, Benjakul S, Kristinsson H G, et al. Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014: 1-14.

[8] Montoya-Rodríguez A, Milán-Carrillo J, Díaz V P, et al. Pepsin-pancreatin protein hydrolysates from extruded amaranth inhibit markers of atherosclerosis in LPS-induced THP-1 macrophages-like human cells by reducing expression of proteins in LOX-1 signaling pathway [J]. *Proteome Science*, 2014, 12(1): 1-13.

[9] Andriamihaja M, Guillot A, Svendsen A, et al. Comparative

efficiency of microbial enzyme preparations versus pancreatin for *in vitro* alimentary protein digestion [J]. *Amino acids*, 2013, 44(2): 563-572.

[10] 田伟, 冯玉萍, 李明生, 等. 水解乳蛋白的制备及在细胞培养中的初步应用[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(1): 100-104.

[11] Xie NN, Liu SS, Wang C, et al. Stability of casein antioxidant peptide fractions during *in vitro* digestion/Caco-2 cell model: characteristics of the resistant peptides [J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239: 577-586.

[12] Jrad Z, El Hatmi H, Adt I, et al. Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins Dairy [J]. *Sci & Technol*, 2014, 94: 205-224.

[13] Balasubramaniam V, Mustar S, Khalid N M, et al. Inhibitory activities of three Malaysian edible seaweeds on lipase and α -amylase [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(5): 1405-1412.

[14] Gestin M, Le Huërou-Luron I, Peiniau J, et al. Method of measurement of pancreatic elastase II activity and postnatal development of proteases in human duodenal juice and bovine and porcine pancreatic tissue [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1997, 42(6): 1302-1311.

(上接第 201 页)

参考文献

[1] 张香美, 郝秋娟, 赵凤存, 等. 三种保鲜剂对荠菜保鲜效果的影响[J]. 食品工业科技, 2009(3): 295-297.

[2] 郭华, 侯冬岩, 回瑞华, 等. 荠菜挥发性化学成分的分析[J]. 食品科学, 2008(1): 254-256.

[3] 高义霞, 周向军. 荠菜叶挥发性成分分析[J]. 资源开发与市场, 2009(12): 1070-1071.

[4] 薛妍君, 张丽, 冯莉, 等. 荠菜芳香成分的固相微萃取条件优化与分析[J]. 食品工业科技, 2014, DOI: 11.1759.TS.20140618.1321.005.

[5] 陈丰, 陈晓波, 王瑞鸿. 脱水蔬菜加工技术及其研究进展[J]. 农产品加工, 2013(9): 6-7.

[6] 谭斯元, 李学琼, 陈厚荣. 紫薯热风干燥工艺参数优化[J]. 食品工业科技, 2013(7): 265-268, 272.

[7] 毕金峰, 于静静, 丁媛媛, 等. 固相微萃取 GC-MS 法测定不同干燥方式下枣产品的芳香成分[J]. 现代食品科技, 2011(3): 354-360, 365.

[8] Zude-Sasse M, Truppel I, Herold B. An approach to non-destructive apple fruit chlorophyll determination [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 25(2): 123-133.

[9] Dai X, Luo H, Jiang L, et al. Efficacy of Different Sanitizing Agents and Their Combination on Microbe Population and Quality of Fresh-cut Chinese Chives [J]. *Journal of Food Science*, 2012,

77(7): M348-M353.

[10] 徐晓飞, 向莹, 张小爽, 等. 不同干燥方式对香菇品质的影响[J]. 食品工业科技, 2012(17): 259-262.

[11] 徐明亮, 周祥, 蔡金龙, 等. 不同干燥方法对海笋干品质影响[J]. 食品科学, 2010(11): 64-68.

[12] 郭红艳, 葛超, 李秀锦, 等. 荠菜不同贮藏条件几项营养指标的研究[J]. 食品工业科技, 2003(3): 74-75.

[13] 杨国峰, 和珊, 丁超, 等. 热风干燥对油菜籽挥发性成分的影响[J]. 食品科学, 2013(4): 28-31.

[14] 李佳. 酶法浸泡及干燥方法对方便米饭复水时间影响的研究[J]. 粮食加工, 2012(5): 52-55.

[15] Capone S, Tufariello M, Siciliano P. Analytical characterisation of Negroamaro red wines by "Aroma Wheels" [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2906-2915.

[16] Genovese A, Lamorte SA, Gambuti A, et al. Aroma of Aglianico and Uva di Troia grapes by aromatic series [J]. *Food Research International*, 2013, 53(1): 15-23.

[17] 张文成, 刘玲, 王瑞侠, 等. 热风干燥与冻干对葱蒜挥发性成分影响研究[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2011, (12): 1865-1868.

[18] 李大婧, 卓成龙, 刘霞, 等. 不同干燥方法对黑毛豆仁挥发性风味成分和结构的影响[J]. 江苏农业学报, 2011(5): 1104-1110.