

蛋清中溶菌酶的提取

郇延军

(无锡轻工大学食品学院, 无锡, 214036)

摘要 研究了从新鲜蛋清中提取溶菌酶的方法。通过控制温度, 调酸和加盐, 可以使溶菌酶得到分离和纯化。采用超滤的方法将溶菌酶提取液浓缩及脱盐并进一步纯化。最后采用喷雾干燥的方法制成产品。产品活力可达11000u/mg。

关键词 溶菌酶; 蛋清; 超滤

中图分类号 TS201.25

0 前言

溶菌酶在临床上是有效的消炎剂, 在食品中也有广泛的应用。可以将溶菌酶加在鲜牛奶或奶粉中, 以增强食用牛奶和奶粉的婴儿的免疫力。也可以加入到饮料、糕点、肉类制品中, 作为防腐剂以延长产品货架期。还可以作为包装膜的防腐剂, 用于新鲜原料的保鲜等。在蛋清中, 溶菌酶的含量约为2%~4%^[1], 其等电点在pH10.8左右, 分子量为14000^[2]。本工艺中充分利用溶菌酶耐温、耐酸及在盐溶液中稳定性好、溶解性强的特点, 确定采用加酸、加盐、提高温度的提取方法。同时采用超滤和喷雾干燥进行提取液的脱盐、浓缩和干制。工艺流程简单易行, 适合于工业化生产。

1 原料与仪器

1.1 原料

鸡蛋 市售新鲜鸡蛋

溶壁微球菌 购自中国科学院微生物研究所
实验中所用试剂均为分析纯

1.2 主要仪器

751分光光度计 上海第三分析仪器厂产品

平板超滤器 无锡化工研究院

喷雾干燥器 美国制

差示扫描量热仪 美国制

2 实 验

2.1 工艺流程

蛋清 搅打均匀 酶提取 冷却 离心 $\left\{ \begin{array}{l} \text{蛋白沉淀物} \quad \text{蛋白片} \\ \text{上清液} \quad \text{调 pH 至中性} \quad \text{超滤} \quad \text{喷雾干燥} \\ \text{产品} \end{array} \right.$

2.2 实验步骤及方法

2.2.1 蛋清液的制备 蛋清搅打以均匀且不发泡为度。

2.2.2 酶提取参数的确定 将一定量的柠檬酸、氯化钠溶于与蛋清相等体积的去离子水中,然后在一定温度下与蛋清混合均匀。整个混合过程控制在5min内完成。混合时的温度(因素A)、酸的加入量(因素B)及氯化钠的加入量(因素C)的确定采用正交实验法。以酶活力作为优化的考察指标,选用L9(3⁴)正交表,各因素水平见表1。

表1 各因素水平

水平	因 素		
	A ()	B (%)	C (%)
1	70	3	1
2	80	4	3
3	90	5	5

2.2.3 冷却及离心 上述混合液混匀后保温5min,再迅速冷却至30℃以下。3000r/min离心。上清液用碱调pH至中性。

2.2.4 超滤 采用截留量为10000的超滤膜,控制氮气压力为0.15MPa,进行超滤脱盐及浓缩。

2.2.5 喷雾干燥 以不同的进风温度进行喷雾干燥,之后测定产品的水分含量及活力。

2.2.6 酶活力测定方法^[3] 以一定浓度的溶壁微球菌悬浮液作为底物,加入一定量的酶液,用pH6.24的磷酸盐缓冲液调控pH值,于25~450nm的波长下测吸光度变化。以每毫克溶菌酶每分钟使吸光度降低0.001个单位为一个酶活力单位。

$$\text{溶菌酶活力} = \frac{\Delta E_{450}}{0.001 \times W} \quad (\text{u/mg})$$

式中: ΔE_{450} 为450nm处每分钟吸光度的变化, W 为加入的酶量(mg)。

3 结果与讨论

3.1 酶提取参数的确定

根据表1进行正交实验,结果见表2。

表2 正交实验结果

实验号	因 素			酶活 (u/mg)	实验号	因 素			酶活 (u/mg)
	A	B	C			A	B	C	
1	70	3	1	9921	9	90	5	3	8696
2	70	4	3	9615	K_1	27643	28164	27480	
3	70	5	5	8107	K_2	28531	29696	28141	
4	80	3	3	9830	K_3	26579	24892	27132	
5	80	4	5	10612	k_1	9214.3	9388	9160	
6	80	5	1	8089	k_2	9510.3	9898.7	9380.3	
7	90	3	5	8413	k_3	8859.7	8297.3	9044	
8	90	4	1	9470	R	650.6	1601.4	336.3	

电点在 pH10.8 左右, 在偏酸性和偏碱性的溶液中, 其稳定性都较好^[5]。蛋清中其它蛋白质等电点约在 pH4.6 ~ 5.0^[1]。加酸适量既不会破坏溶菌酶, 又便于杂蛋白的沉淀, 使溶菌酶得到分离纯化。根据正交实验结果, 选取加酸量为 4%。

酶活力的高低, 除了与酶蛋白活性中心的结构变化有关外, 与所得酶的纯度也有很大关系。70 时, 杂蛋白变性不彻底, 脱除率低, 产品的纯度低, 得率虽高, 而产品的活力却低。这一点可由不同温度下产品的得率与酶活力的关系实验确认。实验结果见表 3。

表3 不同温度下产品得率与酶活力的关系

温度()	得率(%)	酶活(u/mg)
50	4.5	7600
60	3.87	8910
70	2.41	10080
80	1.92	11000

注: 氯化钠加入量为 3%, 酸加入量为 4%。

温度太高时, 杂蛋白的脱除率高, 但由于温度的升高会导致酶蛋白活性中心结构变化, 同样会造成酶活力下降。图 1 为该酶的 DSC 曲线。

从 DSC 曲线可见, 该酶对热较稳定, 在 80 以上时, 变性才较为明显。综观以上实验结果, 选取 80 为提取温度是可行的。

溶菌酶在较高离子强度的溶液中, 溶解度较大^[4], 而在相同离子强度的溶液中, 蛋清中的其它蛋白的稳定性却大大降低^[1]。另外, 钠离子对溶菌酶还有一定的激活作用^[2]。根据正交实验结果选取加盐量为 3%。

3.2 超滤脱盐及浓缩

超滤速度及脱盐率随浓缩液的体积变化的情况见表 4。

表4 超滤速度及脱盐率随浓缩液体积的变化

浓缩液体积 (ml)	超滤速度 (L/min·m ²)	脱盐率 (%)
400	18.9	20.8
300	17.6	45.2
200	16.1	71.3
100	15.2	83.7
80	13.0	91.2
50	11.9	93.1

注: 原始体积为 500ml

根据表 4 所示实验结果, 浓缩至原始体积的 1/7 ~ 1/8 左右时, 尚

能保持 13.0 L/min·m² 的超滤速度和 91% 的脱盐率。浓缩至如此程度, 既能保证工业化生产的可行性, 又便于后序工艺的进行。

3.3 喷雾干燥条件对产品的影响

不同的进风温度对产品的水分含量及酶活的影响见表 5。

溶菌酶的耐热性较强, 喷雾干燥又能使产品受热时间短, 因此, 不同进风温度对酶活力的影响较小, 但对水分含量有较大影响。较

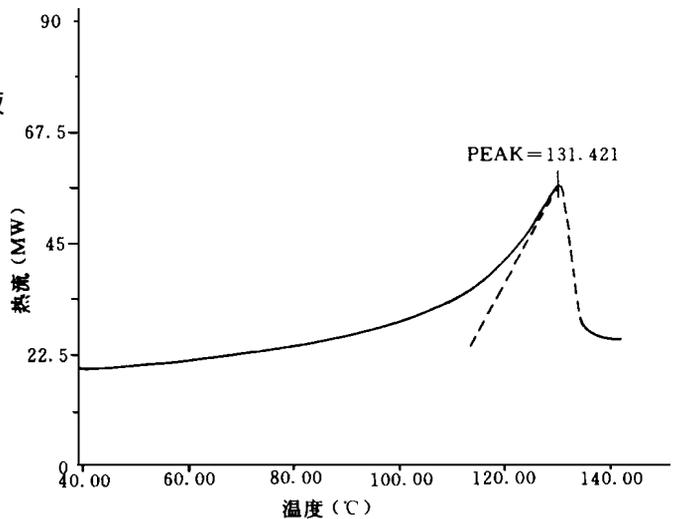


图1 溶菌酶 DSC 曲线

表5 进风温度对产品水分含量及酶活力的影响

进风温度 ()	酶活力 (u/mg)	水分含量 (%)
100	11300	3.8
90	11370	3.9
80	11409	4.7
70	11400	6.1
60	11430	7.3

高的水分含量不利于产品保存。故选取进风温度 $80 \sim 90$, 排风温度控制在 $65 \sim 70$.

4 结 语

充分利用溶菌酶的特点,采用控制温度、调酸和加盐的分离纯化工艺将溶菌酶分离,之后利用超滤和喷雾干燥方法得到干制品。该工艺简单可行,操作方便,适合于工业化生产,既能保证产品质量,又能降低生产成本。

参 考 文 献

- 1 高 真. 蛋与蛋制品工艺学. 中国商业出版社, 1991
- 2 船津等编, 李兴福译. 溶菌酶. 山东科学技术出版社, 1982
- 3 B. 施特马赫著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 中国轻工出版社, 1992
- 4 陆九芳等. 分离过程化学. 清华大学出版社, 1993
- 5 Lichan E, et al. Journal of food science 1986. 51
- 6 张金城等. 超滤技术在酶制剂工业中的应用. 食品与发酵工业, 1989, (5): 62 ~ 69

Extraction of lysozyme from Egg White

Huan Yanjun

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract In this paper, the method of separating lysozyme from egg white is described. Under the controlled conditions of temperature, acid and salt, the lysozyme could be separated and purified. Using ultrafiltration method, lysozyme extract could be concentrated, desalted and further purified. Then the lysozyme product could be produced by using spray-drying technique. The activity of lysozyme product was found to be about 11000u/mg.

Key-words lysozyme; egg white; ultrafiltration

(责任编辑: 秦和平)