

文章编号:1009-038X(2003)02-0018-04

生姜蛋白酶的工业提取方法比较

唐晓珍, 黄雪松*, 乔聚林, 孙玉顺, 王博

(山东农业大学食品学院, 山东泰安 271018)

摘 要:以莱芜黄姜为原料,对生姜蛋白酶的提取方法乙醇法、单宁法、超滤法进行了比较.结果表明,超滤法所获得的生姜蛋白酶的活力、得率最高,其最适条件为:操作压力 0.06 MPa,此时蛋白酶的得率为 2.3%.

关键词:生姜蛋白酶;乙醇法;单宁法;超滤法

中图分类号:Q 503

文献标识码:A

Comparison of Extraction Methods of Ginger Rhizome Protease

TANG Xiao-zhen, HUANG Xue-song, QIAO Ju-lin, SUN Yu-shun, WANG Bo

(College of Food Science and Engineering, Shan dong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: This paper compared the methods of zingibain extracting by alcohol, tannin, and ultra filtration (UF). It showed that the zingibain extracted by UF had the highest proteolytic activity and the maximum permeate flux when operating pressure was kept at 0.06 MPa. The yield by UF method is 2.3%.

Key words: ginger rhizome protease (zingibain); acetone; tannin; ultra filtration (UF)

目前在食品中开发利用的植物蛋白酶主要有木瓜蛋白酶(Papain)、菠萝蛋白酶(Bromelain)、无花果蛋白酶(Ficin)等^[1],生姜蛋白酶(Ginger rhizome protease)是有待开发利用的新的植物蛋白酶.菠萝蛋白酶质量分数为 0.08%~0.12%,其中茎中为 0.54%~1.16%^[2].无花果鲜果蛋白酶为 1.5 g/kg^[3],木瓜蛋白酶质量分数为 7.3%~7.4%^[4],而本实验中生姜蛋白酶质量分数最高可提取 2.3%,具有明显的开发价值.开展生姜蛋白酶的研究将会为其在食品领域的应用提供理论依据,改变我国植物蛋白酶资源长期以来主要依赖于木瓜、菠萝等少数热带水果资源的现状,对于稳定生姜种植

面积,保证生姜产业持续高效发展,扩大生姜资源的利用途径,调节农业产业结构均具有重要意义,对于进一步丰富生姜蛋白酶的酶学性质和以生姜为原料开发新型的营养、保健制品也具有积极的作用和指导意义.

生姜蛋白酶的提取方法很多,制取蛋白酶的方法都可以用于生姜蛋白酶的提取,人们也已经试验利用硫酸铵、丙酮、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶、DEAE-纤维素、DEAE-琼脂糖、电泳等层析、分离技术对生姜蛋白酶进行了分离纯化研究^[5-9].但这些提取方法成本高、产量低、操作繁琐,不适于工业化大规模生产生姜蛋白酶.正是由于缺少工业化提

收稿日期:2002-07-15; 修回日期:2002-12-23.

基金项目:山东省教育厅资助项目(No. J99D51);出国留学人员科研启动资金资助项目;国家 863 计划子课题资助项目(No. 2001AA248021).

作者简介:唐晓珍(1969-),女,山东莱阳人,讲师,硕士;*为通讯作者,E-mail: Xshuang@sdaa.edu.cn.

取生姜蛋白酶的方法,才严重阻碍了生姜蛋白酶在实际生产中的应用.因此,研究适合于工业化生产的生姜蛋白酶提取、分离方法,也就成了一个亟待解决的课题.

本实验选择了工艺较简单的乙醇法、已被用于木瓜蛋白酶工业化生产中的单宁法、先进科技超滤法进行研究和比较,以便选择出最适合工业化生产的生姜蛋白酶提取方法.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

生姜:优质莱芜大黄姜;单宁(AR):浙江省温州市海化工厂试剂厂生产;酪蛋白(CP):上海化学试剂供应站(氮质量分数:14.5%~15.5%);考马斯亮蓝 G-250(AR):上海化学试剂采购供应站进口分装.

1.2 主要仪器

控温多用高速组织捣碎机:江苏江阴周庄科研器械所制造;SHB-Ⅲ型循环水多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司制造;pHs-3 型酸度计:上海第二分析仪器厂制造;离心机:上海医疗器械厂制造;752-C 型紫外可见分光光度计:上海第三分析仪器厂制造;电热恒温水浴锅:龙口先科仪器公司制造;LS1 型科研型超滤机:海口立升饮料设备有限公司制造;真空冷冻干燥机:上海华连理化器材厂制造.

1.3 测定方法

1)蛋白质含量的测定:采用考马斯亮蓝 G-250 法^[10].标准曲线的制作见参考文献^[10],该标准曲线回归方程为

$$y = 0.00366 + 1.326 \times 10^{-3}x \quad (r = 0.9998, n = 5)$$

(1)

式中: y ——吸光度;

x ——蛋白质质量浓度($\mu\text{g/mL}$).

2)生姜蛋白酶活力测定:考马斯亮蓝 G-250 法^[11].

生姜蛋白酶活力的计算:

$$\text{生姜蛋白酶活力}(U) = (A/t) \times F \quad (2)$$

式中: A ——根据 E 从标准曲线中查得酪蛋白的质量(μg); F ——酶液的最终稀释倍数; t ——反应时间(本实验中为 30 min).

蛋白酶比活力($U/\mu\text{g}$) = 蛋白酶活力/蛋白质质量

3)膜通量 J 的测定^[12]:用烧杯接滤过液,同时用秒表计时,用滤过液体积除以相应时间表示(mL/min).

4)生姜蛋白酶得率的测定:各种方法在最佳条

件下所制取的生姜蛋白酶粉与所用鲜姜的质量分数比即为得率.

1.4 生姜蛋白酶的提取方法

1)乙醇法提取生姜蛋白酶的方法:用无水乙醇($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)与姜汁配成体积分数为 10%, 20%, ..., 80% 的乙醇姜汁溶液,混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 然后进行离心(3 000 r/min, 20 min), 收集沉淀, 真空中除去乙醇并冷冻干燥后, 称重, 计算得率(见表 1). 酶粉置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用.

表 1 乙醇对提取生姜蛋白酶的影响

Tab. 1 Effect of different alcohol concentration on extraction of zingibain

乙醇 体积分数/%	酶活力/ U	酶比活力/ ($U/\mu\text{g}$)	得率/ %
10	—	—	—
20	—	—	—
30	—	—	—
40	451.4	4088.9	0.209
50	546.4	2044.5	0.439
60	742.4	1788.9	1.200
70	712.7	613.3	1.310
80	593.9	613.3	1.370

2)单宁法提取生姜蛋白酶的方法^[2,13,14]:将黄姜洗净、切碎,加上体积分数为 5 倍的 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预冷的丙酮,用组织捣碎机捣碎,放入布氏漏斗抽滤,再用适量的冷丙酮抽滤并洗涤 3 次,将丙酮粉放入通风橱中干燥,至无丙酮气味,然后用筛子筛去粗纤维等,装入塑料袋中真空密封,放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冰箱中存放备用^[3].本实验中丙酮粉得率(丙酮粉/鲜姜)为 8.6%.用缓冲液浸提丙酮粉,然后过滤,取滤液加单宁溶液沉淀一定时间,离心(3 000 r/min, 20 min),收集沉淀,真空冷冻干燥($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏)得生姜蛋白酶粉,得率为 1.1%.

3)超滤法提取生姜蛋白酶的方法:黄姜→洗净→压榨→汁液离心(3 000 r/min, 20 min)→滤液→离心→超滤→滤后酶浆→真空冷冻干燥($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏)→生姜蛋白酶粉^[15],得率为 2.3%.

2 结果与讨论

2.1 乙醇提取生姜蛋白酶

从表 1 可以看出,当乙醇体积分数高于 50% 时,所得生姜蛋白酶的活力与产量均较高,但酶比活较低,如体积分数为 70% 的乙醇提取的酶比活

60%提取的低65.7%。因此,乙醇提取生姜蛋白酶时,不仅耗用大量的乙醇,而且酶活力损失严重。其中,含体积分数为60%的乙醇的姜汁溶液提取生姜蛋白酶的各项指标综合效果较好。

2.2 单宁法提取生姜蛋白酶

由表2,3,4可以看出,以丙酮粉为酶源,用单宁法提取生姜蛋白酶的最适条件:pH值为6.0,浸提时间为35 min,单宁质量分数为0.12%。

表 2 提取生姜蛋白酶的最佳 pH 值

Tab.2 Optimal pH value for extraction of zingibain

pH 值	酶活力吸光度值
4	0.117
5	0.124
6	0.344
7	0.257
8	0.138

表 3 提取生姜蛋白酶的适宜时间

Tab.3 Suitable time of extracting zingibain by tannin

时间/min	酶活力吸光度值
5	0.328
15	0.330
25	0.339
35	0.413
45	0.325

表 4 单宁用量对生姜蛋白酶的影响

Tab.4 Effect of tannin concentration on activity of zingibain

单宁质量分数/%	酶活力吸光度值
0.04	0.150
0.08	0.240
0.12	0.369
0.16	0.348
0.20	0.212
0.24	0.201

2.3 超滤法提取生姜蛋白酶

从表5可以看出:在不同压力下超滤所获得的清汁,用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量时,其吸光度为0.012~0.028。据式(1)计算可知,清汁中几乎无蛋白质存在。酶也是一种蛋白质,从而可以肯定清汁中几乎不含生姜蛋白酶,生姜蛋白酶应该存在

于浓汁中。
操作压力在0.04~0.06 MPa时,浓汁中生姜蛋白酶的酶活力和膜通量较大,通常用超滤机的工作压力0.05 MPa。

表 5 操作压力的影响

Tab.5 Effect of operation pressure on activity of zingibain and permeate flux

操作压力/ MPa	清汁中蛋白质 吸光度值	浓汁中蛋白酶 活力吸光度值	膜通量/ (mL/min)
0.02	0.021	0.212	40.0
0.04	0.012	0.226	65.8
0.06	0.016	0.227	83.5
0.08	0.028	0.208	60.2

由表6可以看出,在操作压力为0.05 MPa时,酶活力和膜通量随操作温度的升高而增大。温度的升高,一方面减少了姜汁的粘度,使溶剂的渗透更为容易;另一方面,由于姜汁粘度的降低,膜面上的大分子物质向膜两侧溶液中的扩散速度也有所增加,从而减少了浓差极化现象;同时,温度的升高也使膜的渗透性能有所改变。但在实际实验过程中,因受到生姜蛋白酶的热敏性等因素的限制,温度不宜过高。

在60℃温度时,生姜蛋白酶短时间不至于被破坏,但其主体结构可能是比较大的,因此,在60℃时超滤,所获产物酶活力最高。

表 6 操作温度的影响

Tab.6 Effect of operation temperature on activity of zingibain and permeate flux

操作温度/℃	酶活力吸光度值	膜通量/(mL/min)
30	0.205	90
40	0.217	102
50	0.231	111
60	0.301	120
70	0.274	124

注:操作压力为0.05 MPa。

2.4 乙醇、单宁、超滤法提取生姜蛋白酶的比较

由表7可以看出,超滤法提取的生姜蛋白酶的酶活力较单宁法高1.118倍(999.4/894.1),比乙醇法高1.346倍(999.4/742.4),比活力较单宁法高1.348倍(4.383/3.546),比乙醇法高1.826倍(4.383/2.393)。

表 7 3 种提取方法的比较

Tab.7 Comparison of three methods of extracting zingibain

提取方法	得率/%	蛋白质质量浓度/ (μg/mL)	酶活力/ U	酶比活力/ (U/g)
乙醇法	1.2	310.2	742.4	2.393
单宁法	1.1	252.1	894.1	3.546
超滤法	2.3	228.0	999.4	4.383

注:1. 3 种方法所得酶粉分别配制成体积分数 1% 的酶液,各取 0.5 mL 测试;2. 以体积分数 60% 的乙醇沉淀提取为例。

乙醇法提取生姜蛋白酶设备简单,产品无有毒

化学试剂污染,但干燥困难(因含乙醇不适于冷冻干燥),而非干燥状态的蛋白酶产品,难以在贮存中保持其原有活力,因此乙醇法提取生姜蛋白酶在生产中事实上是不可取的.单宁法工艺类似于乙醇法,并且使用化学试剂多,所获得产品酶活力比较低.超滤法清洗机器时用时较多,约 0.5 h 时间,但提取时不加任何化学试剂,安全性高,所得产品酶活力和得率高.所以,综合考虑,采用超滤法比单宁法、乙醇法提取生姜蛋白酶更经济,产品质量更好,更具工业化生产价值。

参考文献

[1] [日]向决孝亮,小野正之,手塚隆久,等.酶应用手册[M].黄文涛,胡学智译.上海:上海科技出版社,1989.113-121.

[2] 黄卓烈,林韶湘,李明启.菠萝茎蛋白酶的提取及其活性保护研究[J].华南农业大学学报,1993,14(1):139-143.

[3] 邱业先,刘勇,周群,等.无花果蛋白酶的分离纯化及其理化性质研究[J].江西农业大学学报,1996,18(1):46-50.

[4] 乙引,谭爱娟,刘宁,等.木瓜蛋白酶的生产工艺研究[J].贵州农业科学,2000,28(5):24-25.

[5] 赵帆平,周恩志,张部昌.生姜蛋白酶的分离纯化及其糖肽键型的初步研究[J].安徽大学学报,1995,(2):93-97.

[6] Thompson E H, Wolf L D. *Ginger rhizome*: A new source of proteolytic enzyme[J]. *J Food Scie*, 1973, 38:652-655.

[7] Kozo Ohtsuki, Kauabation Makoto, Taguchik. Purification and stabilization of ginger protease[J]. *Sci Rep KyotoPref Univ*, 1978, (29):33-40.

[8] Kozo Ohtsuki, Taguchi Kiniko, Sato Kenji, *et al*. Purification of ginger protease by DEAE-sepharose and isoelectric focusing [J]. *Biophys Acta*, 1995, (2):181-184.

[9] Haruo Kawamoto. Stoichiometric studies of tannin-protein coprecipitation[J]. *Phytocham*, 1996, 4(5):1427-1431.

[10] 韩雅珊.食品化学实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,1992.

[11] 周惠,鲁治斌,齐杰,等.蛋白水解酶活力测定新方法[J].生物化学杂志,1994,10(5):630-632.

[12] 杨春哲,冉艳红.超滤在苹果酒澄清中的应用[J].食品工业,2000,(5):46-47.

[13] 林韶湘,黄卓烈,李明启,等.菠萝各器官蛋白酶的提取与保活[J].植物资源与环境,1994,3(2):22-26.

[14] 黄卓烈,林韶湘,李明启.菠萝果蛋白酶生产工艺的改进[J].植物资源与环境,1993,2(1):25-30.

[15] 郭静成,涂赛平.超滤法分离果实菠萝蛋白酶及回收果汁的初步研究[J].北京农业大学学报,1989,4(15):370,382.

(责任编辑:杨勇)