

## 超滤分离具有壳聚糖酶活力的木瓜蛋白酶 Separation of papain with the chitosanase activity by ultra-filtration

谭晶 陈季旺 夏文水 舒静

TAN Jing CHEN Ji-wang XIA Wen-shui SHU Jing

(武汉工业学院食品科学与工程院,湖北武汉 430023)

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

**摘要:**目的:研究超滤法分离具有壳聚糖酶活性的木瓜蛋白酶,操作时间、压力、浓缩倍数对膜通量及酶活力和收率的影响,并对超滤浓缩的工艺条件进行优化;结果:室温下,超滤分离浓度为0.5%的木瓜蛋白酶溶液,压力为0.1 MPa,浓缩倍数为8倍时,超滤后木瓜蛋白酶的蛋白酶和壳聚糖酶比活力分别从435.10 U/mg和2.17 U/mg提高到531.39 U/mg和2.65 U/mg,纯化倍数为1.22倍;超滤前后木瓜蛋白酶的蛋白质含量由29.56%提高到79.96%,还原糖含量由57.46%降低到6.27%。

**关键词:**木瓜蛋白酶;壳聚糖酶活力;超滤;凝胶电泳

**Abstract:** Objective: In this paper, papain with the chitosanase activity was separated by ultra-filtration, the technical conditions of ultra-filtration were studied and the effects of pressure and concentration times on ultra-filtration permeate flux, activity and the yield rate were investigated. Conclusion: The results showed when papain was separated in the room temperature, 0.5% of concentration, 0.1 MPa of pressure and eight times concentrated liquid, the specific activity of protease and chitosanase on papain increased to 531.39 U/mg and 2.65 U/mg from 435.10 U/mg and 2.17 U/mg respectively after ultra-filtration, and the degree of purification was 1.22-fold. Protein content of papain increased to 79.96% from 29.56% and reducing sugar content of papain decreased to 11.27% from 57.46% after ultra-filtration.

**Keywords:** Papain; Chitosanase activity; Ultrafiltration(UF); SDS-PAGE

木瓜蛋白酶(Papain)简称木瓜酶,又称木瓜酵素,是一种含巯基(-SH)肽链内切酶。许多研究报道,木瓜蛋白酶对壳聚糖有较高的水解活力,能成功地制备聚合度在10以下的甲壳低聚糖<sup>[1-3]</sup>。

目前国内外生产木瓜蛋白酶制剂的生产工艺主要是将番木瓜乳汁采集后经除杂预处理,通过远红外真空干燥、热

风干燥、喷雾干燥或冷冻真空干燥等方法制得粗酶<sup>[4]</sup>,将粗酶分级盐析沉淀,再将沉淀多次结晶<sup>[5]</sup>或通过超滤除杂酶以制得纯度较高的木瓜蛋白酶制剂。一般工业生产中,从番木瓜果实中提取出来的白色乳汁经加工而成的木瓜蛋白酶制剂不是纯酶。这些粗酶中的主要酶成分是木瓜蛋白酶、木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶(也称木瓜肽酶),此外还含有少量的杂酶和大量的还原糖等<sup>[6,7]</sup>。为进一步了解木瓜蛋白酶中对壳聚糖具有降解作用的酶组分,有必要对木瓜蛋白酶制剂进行分离纯化。

超滤是一种加压膜分离技术,即在一定的压力下,小分子溶质和溶剂能穿过一定孔径特制的薄膜,大分子溶质不能透过,留在膜的一边,从而使大分子物质得到部分的纯化。超滤自20世纪20年代问世后,已成为一种重要的生化试验技术,广泛用于含有小分子溶质的各种生物大分子(如蛋白质、酶、核酸等)的浓缩、分离和纯化。此技术的优点是操作简便,成本低廉,不需增加任何化学试剂。尤其是超滤技术的试验条件温和,不需加热,与蒸发、冰冻干燥相比没有相的变化,而且不易引起温度、pH的变化,因而可以防止生物活性物质如酶的变性、失活和自溶<sup>[8,9]</sup>。

本试验采用截留相对分子质量为10 000的中空纤维膜对木瓜蛋白酶进行超滤浓缩分离,主要研究超滤操作压力和超滤浓缩倍数对膜通量、酶活力及收率的影响,并对超滤前后的木瓜蛋白酶进行蛋白酶和壳聚糖酶比活力的比较,用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析木瓜蛋白酶组分以及对其主要成分进行分析。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

木瓜蛋白酶:广西南宁庞博生物工程有限公司,活力 $5.196 \times 10^4$  U/g(自测);

壳聚糖:浙江玉环海洋生物化学有限公司,来源于蟹壳,

基金项目:国家自然科学基金项目(项目编号:20576104)

作者简介:谭晶(1984-),女,武汉工业学院食品学院在读研究生。

E-mail: oorange2004@163.com

通讯作者:夏文水

收稿日期:2007-09-11

脱乙酰度 85.7%,水分 8.68%,灰分 0.42% (实验室自测);  
干酪素、N-乙酰氨基葡萄糖:上海国药集团药剂有限公司;

L-酪氨酸:北京奥博星生物技术责任有限公司;

丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris 碱、SDS、TEMED、Ap- $\alpha$ -巯基乙醇、甘氨酸、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、考马斯亮蓝 G-250:武汉凌飞科技生物有限公司;

SDS-PAGE 低分子量蛋白 Marker:中科院上海生化研究所;

其余试剂:均为分析纯;

UV-2100 紫外可见分光光度计:上海尤尼柯仪器有限公司;

TGL-16C 高速离心机:上海安亭仪器有限公司;

Delta320 精密 pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

HH-S 型恒温水浴锅:巩义市英峪予华仪器厂;

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:巩义市英峪予华仪器厂;

MP-200A 电子天平:上海仪器厂;

DYY-8C 型电泳仪:北京六一仪器厂;

DY CZ-24D 双垂直电泳槽:北京六一仪器厂;

超滤装置:试验采用上海亚东核级树脂有限公司生产的内压式聚砜中空纤维超滤膜,截留相对分子质量为 10 000,膜面积为 0.1 m<sup>2</sup>,尺寸为  $\phi 40 \times 300$  mm。试验装置流程见图 1。

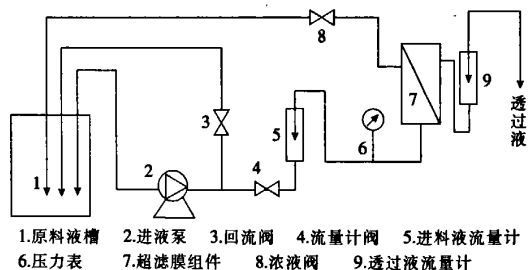


图 1 试验装置示意图

## 1.2 试验方法

1.2.1 超滤方法 试验操作时将一定浓度的木瓜蛋白酶溶液注入储槽中,在泵提供的动力下,调节至固定流速,在一定的操作压力下,溶液经微滤后进入超滤膜中。一方面溶液中的小分子物质经中空纤维膜的内壁渗透出来成为超滤液而排出,另一方面溶液中的酶蛋白等大分子物质得以保留并得到浓缩,返回到储槽中。如此反复循环,直到达到规定的浓缩要求为止,并分别在浓缩液、透过液中取样,测定各指标。

原料液为 0.5% 的木瓜蛋白酶溶液。木瓜蛋白酶为水溶性的中性蛋白酶,其中的蛋白相对分子质量不大,溶解性很

好,受温度影响不大,为操作方便,可直接在室温下进行超滤。

1.2.2 洗膜方法 采用化学清洗法,配制 0.1% ~ 0.2% 的 NaOH 溶液于贮液中,启动泵,让清洗液进入超滤膜中,循环清洗 30 min,关机浸泡 1 h,再循环清洗 30 min;将浑浊的清洗液放出,再用清水清洗,至透过液的 pH 为中性。

### 1.2.3 测定方法

(1) 蛋白质含量的测定:考马斯亮蓝 G-250 法<sup>[10]</sup>。标准曲线的制作见参考文献[10],该标准曲线回归方程为:

$$y = 0.0005x + 0.0082 \quad (R^2 = 0.9981, n = 5)$$

(2) 木瓜蛋白酶活力测定:福林酚法<sup>[11]</sup>。试验中采用的酶活力是 1 g 酶粉或 1 mL 酶液,在 40 °C, pH 7.0 的条件下,1 min 水解酪素产生 1  $\mu$ g 酪氨酸为 1 个酶活力单位,以 U/g 或 U/mL 表示。

(3) 壳聚糖酶活力测定:称取一定量的壳聚糖溶液于 0.1 mol/L, pH 4.5 的醋酸缓冲液中,配制成 0.5% 的壳聚糖液。吸取 1 mL 底物于试管中,40 °C 水浴中保温 2 min 后,加入适当稀释的酶液 1 mL,摇匀,40 °C 反应 30 min 后,稀释至一定倍数;取 2 mL 反应液立即加入 3 mL 铁氰化钾试剂,中止反应。用 Imote 改良法<sup>[12]</sup>测定其中还原糖含量,以 N-乙酰氨基葡萄糖做标准曲线,同时做灭活酶空白。酶活力单位定义:在 40 °C, pH 4.5,反应 30 min,每分钟释放 1  $\mu$ g 还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。

(4) 超滤膜通量 J<sub>v</sub> 的测定:酶溶液加入超滤装置,控制操作参数,运行稳定后,用烧杯接透过液,同时用秒表计时,记录一定时间内透过液的体积。J<sub>v</sub> (mL/m<sup>2</sup>) 以单位时间内通过透过液的体积来表示。

收率、透过率的计算:

$$\text{收率} = \frac{\text{浓缩液酶活性} \times V_{\text{浓缩液}}}{\text{原液酶活} \times V_{\text{原液}}} \times 100\%$$

$$\text{透过率} = \frac{\text{透过液酶活性} \times V_{\text{透过液}}}{\text{原液酶活} \times V_{\text{原液}}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 中空纤维膜的超滤分离效果

据报道,木瓜蛋白酶干粉中含有的主要酶成分如木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶和木瓜蛋白酶<sup>[13,14]</sup>的相对分子质量均在 20 000 以上。本试验采用截留相对分子质量为 10 000 的中空纤维膜进行分离,结果见表 1。

表 1 中数据显示:超滤倍数为 10 倍时,透过液的蛋白质浓度极低,蛋白酶活力为 0.31 U/mL,壳聚糖酶活力为 0.06 U/mL;浓缩液蛋白质浓度由 1 596  $\mu$ g/mL 增加到 6 560  $\mu$ g/mL,壳聚糖酶活力由 3.46 U/mL 提高到 9.00 U/mL,蛋白酶活力由 694.42 U/mL 提高到 4 323.28 U/mL。说明截留相对分子质量为 10 000 的中空纤维膜对木瓜蛋白酶进行超滤效果较好。

表1 超滤对木瓜蛋白酶的分离效果

倍	浓缩液壳聚糖酶活 力/(U·mL <sup>-1</sup> )	浓缩液蛋白质浓 度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	浓缩液蛋白酶活 力/(U·mL <sup>-1</sup> )	透过液壳聚糖酶活 力/(U·mL <sup>-1</sup> )	透过液蛋白质浓 度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	透过液蛋白酶活 力/(U·mL <sup>-1</sup> )	壳聚糖酶活 力收率/%	壳聚糖酶活 力透过率/%
0	3.46	1 596	694.42	0	0	0	100	0
10	9.00	6 560	4 323.28	0.06	9.6	0.31	26	0.61

2.2 操作时间对超滤的影响

室温下,操作压力0.1 MPa,固定流速进行超滤,于不同的操作时间下测定膜通量。结果见图2。

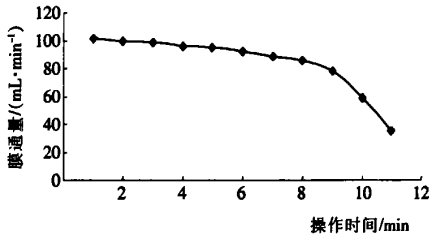


图2 操作时间对膜通量的影响

随着超滤的进行,由于浓差极化现象加剧,酶液中某些组分沉积在膜表面上,形成浓缩的凝胶层,使膜通量逐渐降低。试验中对木瓜蛋白酶的膜通量随时间的变化进行研究发现:在超滤8 min以内,膜通量下降缓慢,曲线变化平缓;8 min以后,膜通量下降趋势开始加快。

2.3 操作压力对超滤的影响

按前述方法,室温下,固定进料流量进行超滤,于不同的操作压力下取样测定膜通量和壳聚糖酶活力,结果见图3。

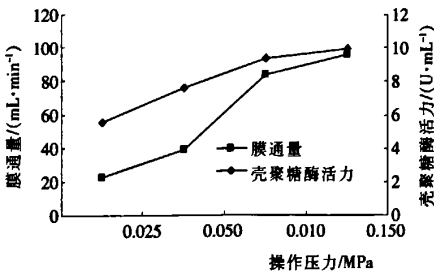


图3 操作压力对膜通量和酶活力的影响

超滤分离蛋白质或其他大分子溶质时,压力与流速对于膜通量的影响通常是相联系的。在溶质浓度和流速一定时,选择合适的操作压力,避免膜表面“凝胶层”的形成,以得到最佳的膜渗透通量<sup>[9]</sup>。总的来说,膜通量和壳聚糖酶活力随着操作压力的提高而上升,在0.025~0.1 MPa的低压力范围内,膜通量随操作压力升高而近似线性增加,壳聚糖酶活力增加;在0.1~0.15 MPa的压力范围内,渗透通量随压力的上升趋于平缓,壳聚糖酶活力增加趋势减缓;考虑到能源的节省和超滤装置的较佳操作压力范围,本试验选择操作压力为0.1 MPa。

2.4 超滤浓缩倍数对壳聚糖酶活力的影响

采用截留相对分子质量为10 000的中空纤维膜进行浓

缩,木瓜蛋白酶在超滤过程中的壳聚糖酶活力及收率随浓缩倍数的变化情况见图4。

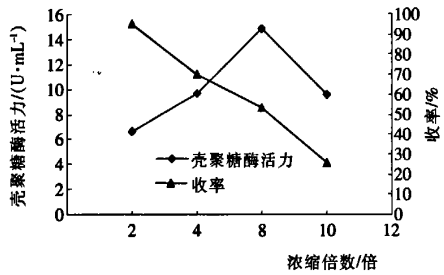


图4 浓缩倍数对壳聚糖酶活力与收率的影响

由图4可知,木瓜蛋白酶的收率随浓缩倍数的提高而下降。壳聚糖酶活力开始随浓缩倍数的提高不断增加,浓缩倍数为8时,浓缩液的壳聚糖酶活力达到最大。当超滤浓缩倍数继续增大时,壳聚糖酶活力而有所下降。可能是超滤过程中采取全循环,浓差极化严重并使温度升高,而使得酶活力成分部分失活。本试验为得到高壳聚糖酶活力的木瓜蛋白酶,所以选择浓缩倍数为8倍。

2.5 超滤中木瓜蛋白酶的蛋白酶活力变化分析

木瓜蛋白酶本身具有蛋白酶活力,本试验同时考虑了其蛋白酶活力在超滤过程中的变化,结果见图5。从图5可知,木瓜蛋白酶的蛋白酶活力会随浓缩倍数的增加而不断增加;蛋白酶活力收率随浓缩倍数的增加而不断下降,可能由于浓缩倍数的增加,产生浓差极化现象,使得蛋白酶活力收率下降。浓缩倍数8倍后蛋白酶活力增加趋势和收率下降趋势均有所减缓,结合壳聚糖酶活力情况,选择浓缩倍数为8倍。

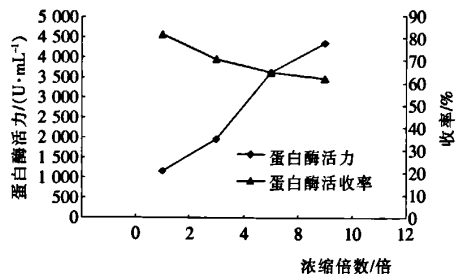


图5 浓缩倍数对蛋白酶活力收率的影响

2.6 超滤前后酶活力比较

分别测定超滤前后的木瓜蛋白酶的蛋白酶活力和壳聚糖酶活力,结果见表2。从表2可知,两种酶活力均有所增加,其纯化倍数有一定的提高,均为1.22倍,说明截留相对分子质量为10 000的超滤膜对木瓜蛋白酶有一定的纯化效

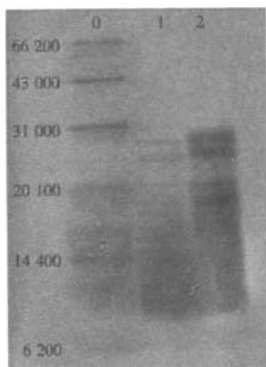
果。纯化倍数不是很高,可能由于超滤只是对木瓜蛋白酶的初分离,是为后面进一步分离木瓜蛋白酶做准备的,且超滤过程中部分酶有效成分可能失活。

表 2 超滤前后酶活力比较

酶类	蛋白酶 比活力 /(U·mg <sup>-1</sup> )	壳聚糖酶 比活力 /(U·mg <sup>-1</sup> )	纯化倍数	
			蛋白酶 活力	壳聚糖 酶活力
原酶	435.10	2.17	1	1
超滤后	531.39	2.65	1.22	1.22

2.7 超滤前后的木瓜蛋白酶 SDS-PAGE 分析

采用 12.5% 分离胶,4% 的浓缩胶对超滤前后的木瓜蛋白酶进行 SDS-PAGE 电泳分析,所得的电泳图谱见图 6。由图 6 可知,木瓜蛋白酶亚基的相对分子质量集中在 31 000 和 14 400 之间,与文献[6]报道相符,主要有 4 条条带,超滤后的蛋白质条带更明显,一定程度上说明了超滤后的木瓜蛋白酶的有效成分得以提高;超滤前木瓜蛋白酶的 SDS-PAGE 图在相对分子质量 14 400 以下隐约有些杂带,而超滤后没有,说明超滤去除了相对分子质量小于 10 000 的杂蛋白,木瓜蛋白酶的纯度有所提高。



染色采用考马斯亮蓝 R-25;0,1,2 分别为超滤前后的木瓜蛋白酶,0 为蛋白 Marker 标准相对分子质量蛋白质:牛血清白蛋白 66 200;兔肌动蛋白 43 000;牛碳酸酐酶 31 000;鸡蛋清溶菌酶 14 400;多肽 6 200

图 6 超滤前后木瓜蛋白酶的 SDS-PAGE 谱图

2.8 超滤前后木瓜蛋白酶的成分分析

超滤得到的木瓜蛋白酶浓缩液经真空冷冻干燥后,得到木瓜蛋白酶粉,对其进行成分分析,并和原酶作比较,结果见表 3。从表 3 可知,超滤前后蛋白酶的蛋白质含量有较大的提高,还原糖含量有较大的降低。说明超滤后木瓜蛋白酶的纯度有所增加。

表 3 木瓜蛋白酶成分分析 /%

酶类	蛋白质	还原糖	水分	灰分
原酶	29.56	57.46	2.25	7.73
超滤后	79.96	6.27	4.00	7.04

3 结论

(1) 经过对超滤过程的操作参数进行优化,通过比较不同的超滤操作压力、浓缩倍数和操作时间对超滤分离效果的影响,确定采用截留相对分子质量为 10 000 的中空纤维膜。当最佳操作压力为 0.1 MPa,超滤浓缩倍数为 8 倍时,可以得到最高的壳聚糖酶活力。

(2) 超滤后木瓜蛋白酶的蛋白酶和壳聚糖酶比活力分别从 435.10 U/mg 和 2.17 U/mg 提高到 531.39 U/mg 和 2.65 U/mg,纯化倍数均提高了 1.22 倍。

(3) SDS-PAGE 图谱显示,超滤前后木瓜蛋白酶的蛋白条带集中在相对分子质量 31 000 和 14 400 之间,超滤后去除了相对分子质量小于 10 000 的杂蛋白,其纯度得以提高。

(4) 超滤后木瓜蛋白酶的蛋白质含量由 29.56% 提高到 79.96%,还原糖含量由 57.46% 降低到 6.27%,表明超滤去除了原木瓜蛋白酶制剂中的大部分小分子还原糖,使得木瓜蛋白酶的纯度有所提高。

参考文献

- Pantaleone D, Yalpani M, Scollar M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis[J]. Carbohydr Res., 1992(237):325~332.
- Muzzarelli R A A, Tomasetti M, Ilari R. Depolymerization of chitosan with the aid of papain[J]. Enzyme Microb Technol., 1994, 16(2):110~113.
- Manssur Yalpani, David Pantaleone. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis[J]. Carbohydr. Res., 1994(256):159~175.
- 凌兴汉,吴显荣.木瓜蛋白酶与番木瓜栽培[M].北京:中国农业出版社,1998,12,102.
- Kimmei J R, Smith E L. Crystalline papain: I. preparation, specificity and activation[J]. Biol. Chem., 1954, 207(2):515~531.
- 苏畅.木瓜蛋白酶降解壳聚糖机理的研究[D].无锡:江南大学,2003.
- 苏畅,夏文水,姚惠源,等.木瓜蛋白酶中具有壳聚糖水解酶活性成分的分离[J].食品工业科技,2003,24(5):80~82.
- 王湛.膜分离技术基础[M].北京:化学工业出版社,2001,207~213.
- 邓成萍,薛文通,孙晓琳,等.超滤在大豆多肽分离纯化中应用[J].食品科学,2006,27(2):192~195.
- 李建武.生物化学实验原理与方法[M].北京:北京大学出版社,2004,174.
- 姜锡瑞.酶制剂应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,1999,412~417.
- Imote T, Yagishita K. A simple activity measurement of lysozyme[J]. Agr Biol Chem, 1971, 35(7):1154~1156.
- Bernard P O H, Andrew M H, David J B, et al. Crystal structure of glycol endopeptidase from Carica papaya cysteine endopeptidase of unusual substrate specificity[J]. Biochemistry, 1995(34):13 190~13 195.
- Keith Rocklehurst, Erdjan Salih. Fresh non-fruit latex of Carica papaya contains papain, multiple forms of chymopapain A and papaya proteinase[J]. Biochem. J. Letters, 1985(228):525~527.