



木瓜蛋白酶的 双水相萃取研究

—— 张海德 李国胜/著



科学出版社

木瓜蛋白酶的双水相萃取研究

张海德 李国胜 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书主要介绍了双水相分离技术萃取木瓜蛋白酶,探讨了金属螯合亲和双水相和离子液体双水相等体系萃取木瓜蛋白酶的效果。选择适用于分离提纯木瓜蛋白酶的双水相体系和工艺条件,并探讨了利用双水相萃取技术分离木瓜蛋白酶的影响因素及其萃取机制。

本书适合从事木瓜蛋白酶萃取研究及食品科学、生物化工、制药等相关领域的研究人员、技术人员和高校师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

木瓜蛋白酶的双水相萃取研究/张海德,李国胜著. —北京:科学出版社, 2018.6

ISBN 978-7-03-057980-5

I. ①木… II. ①张… ②李… III. ①木瓜蛋白酶—萃取—研究
IV. ①O658.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第127957号

责任编辑:郭勇斌 彭婧煜/责任校对:李 影

责任印制:张 伟/封面设计:众轩企划

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年6月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2018年6月第一次印刷 印张:11 3/4

字数:227 000

定价:68.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

我国番木瓜的栽培历史已有 300 多年,产地主要分布在广东、广西、福建、海南、云南和台湾等,近年来,随着人们对番木瓜的需求量增加,种植番木瓜经济效益的提高,其种植面积在逐步扩大。木瓜蛋白酶[EC 3.4.22.2]存在于番木瓜未成熟果实的乳液中,乳液通过割果实的颈部进行收集,风干后得到粗木瓜酶制品。番木瓜被收割乳汁后,并不影响果实的食用及商品价值,粗木瓜酶制品的生产是番木瓜产业中主要的副产业,经济效益显著。粗木瓜酶制品中至少含有木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶 Ω 及木瓜凝乳蛋白酶 M 4 种酶,其中的木瓜蛋白酶活性不稳定、品质不均,难以在某些领域直接应用,一般要进行纯化后获得较纯的木瓜蛋白酶才有更高的应用价值。

随着木瓜蛋白酶被越来越多地应用到日常生产生活中,对其纯度的要求也越来越高,特别是在一些现代工业及医药领域的应用。目前,各种提纯木瓜蛋白酶的方法效果都不太理想,急需寻求一种新方法生产高品质、高活性的木瓜蛋白酶。双水相萃取技术是近年来发展起来的一种新型的生化分离技术,由于该技术具有生物相容性高、分离条件温和、分离步骤简单、易于放大及不存在有机溶剂残留等优点,已广泛用于各类酶、核酸、生长激素等有效成分的提纯。

本书系统地研究了双水相萃取木瓜蛋白酶的相关理论基础,并进行了相关工艺研究,得到较好的实验结果。希望本书的出版,对高纯度、高活性木瓜蛋白酶的提取具有理论指导意义,对目前制约我国高端木瓜蛋白酶生产技术的关键问题的解决有促进作用;同时,对双水相萃取技术理论的完善起促进作用。

本书主要内容是利用双水相分离技术萃取木瓜蛋白酶,并在此基础上探讨用金属螯合亲和双水相、离子液体双水相等体系萃取木瓜蛋白酶的效果。选择适合于分离提纯木瓜蛋白酶的双水相体系和工艺条件,并对利用双水相萃取技术分离木瓜蛋白酶的影响因素及其萃取机制进行探讨。

本书结构体系分为木瓜蛋白酶的传统萃取、双水相萃取和亲和双水相萃取三个部分,三个部分的内容既相互关联又有区别,主要围绕木瓜蛋白酶的分离技术,分章节进行编写。全书以作者主持的国家自然科学基金项目(项目批准号:31260401, 31660444)的研究内容为主,并融合了作者课题组的多年研究成果。

本书由海南大学张海德、李国胜合著,第一、二章由李国胜执笔,第三、四

章由张海德执笔。曾在作者实验室学习和工作过的研究生何继芹、万婧、王伟涛、董安华、彭健、蔡涛等为本书实验数据的获得做了大量工作，在此表示感谢。

作者在实验和写作过程中参阅了大量的相关文献，有了这些参考文献才得以对本书的论题有更深入的了解，在此感谢众多文献的作者。

本书的写作和出版，得到了科学出版社编辑的热情帮助，在此致以衷心的感谢！

由于作者水平有限，书中难免有疏漏之处，敬请同行专家、读者批评指正。

作 者

2018年2月

目 录

前言

第 1 章 木瓜蛋白酶酶学性质及提取方法研究进展	1
1.1 木瓜蛋白酶酶学性质及用途	1
1.2 木瓜蛋白酶活性研究方法	5
1.3 木瓜蛋白酶的传统提取方法	10
1.4 双水相体系及其萃取技术的研究进展	12
参考文献	34
第 2 章 番木瓜中木瓜蛋白酶的传统提取工艺研究	40
2.1 乙醇提取木瓜蛋白酶的工艺研究	40
2.2 超滤法提取木瓜蛋白酶的工艺研究	45
2.3 亲和层析法提取木瓜蛋白酶的研究	52
2.4 沉淀分离法提取木瓜蛋白酶的研究	53
2.5 木瓜蛋白酶的传统双水相萃取研究	54
参考文献	96
第 3 章 金属螯合亲和双水相体系中木瓜蛋白酶的萃取研究	99
3.1 金属螯合亲和双水相技术研究进展	99
3.2 聚乙二醇-金属螯合亲和成相剂制备	102
3.3 基于木瓜蛋白酶的金属螯合亲和双水相体系的建立	109
3.4 木瓜蛋白酶在金属螯合亲和双水相体系中的分配行为	114
3.5 木瓜蛋白酶分配模型的建立	123
3.6 讨论	129
参考文献	130

第 4 章 离子液体双水相体系中木瓜蛋白酶的萃取研究	132
4.1 离子液体双水相萃取技术研究进展	132
4.2 离子液体双水相体系液/液/固边界线的研究	133
4.3 离子液体相图及相平衡的研究方法	139
4.4 $[\text{C}_n\text{mim}]\text{BF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 双水相体系萃取木瓜蛋白酶的研究	162
4.5 讨论	175
参考文献	176

第 1 章 木瓜蛋白酶酶学性质 及提取方法研究进展

1.1 木瓜蛋白酶酶学性质及用途

1.1.1 木瓜蛋白酶酶学性质

1. 木瓜蛋白酶的来源

木瓜蛋白酶来源于未成熟番木瓜 (*Carica papaya*) 果实的新鲜乳汁, 番木瓜原产美洲热带地区, 我国广东、海南、广西、福建、台湾等均有栽培, 为热带名果之一。番木瓜中蛋白酶至少含有 4 种: 木瓜蛋白酶[EC 3.4.22.2] (papain)、木瓜凝乳蛋白酶[EC 3.4.22.6] (chymopapain)、木瓜蛋白酶 Ω [EC 3.4.22.30] (papaya proteinase Ω , 也称 caricin)、木瓜凝乳蛋白酶 M[EC 3.4.22.25] (chymopapain M, 也称 papaya proteinase IV) (O'Hara et al., 1995), 且已知这 4 种蛋白酶的一级结构具有高度同源性。其中, 木瓜蛋白酶属巯基蛋白酶, 可水解蛋白质和多肽中精氨酸和赖氨酸的羧基端, 并能优先水解那些在肽键的 N 端具有两个羧基的氨基酸或芳香族 L-氨基酸的肽键。

2. 木瓜蛋白酶的结构

木瓜蛋白酶是一条蛋白质单链, 由 212 个氨基酸残基组成, 活性部位由 25 位的半胱氨酸残基、158 位的天冬氨酸残基和 159 位的组氨酸残基组成, 而由 6 个半胱氨酸残基组成的 3 对二硫键并不在活性部位。

3. 木瓜蛋白酶的特性

精制的木瓜蛋白酶为白色至浅黄色粉末, 能够与水 and 甘油相溶, 其水溶液为无色或浅黄色, 也有的会呈现乳白色; 几乎不溶于极性小的有机溶剂。木瓜蛋白酶的最适 pH 为 6~7 (通常 3~9.5 也可), 在中性或偏酸性的环境下也不会完全失活; 最适温度为 55~60℃ (通常 10~85℃也可), 可以忍耐较高的温度, 即使在 90℃ 的环境条件下仍然有活性。

番木瓜乳汁的4种蛋白酶的活性中心都含有巯基,虽然巯基容易被氧化而失去活性,但它们对环境条件有很强的适应性。如在中性环境中,一般的酶溶液在60~70℃时活性急剧下降,木瓜蛋白酶在pH低于4且温度上升时会迅速不可逆地失活,但其他三种蛋白酶成分却十分稳定,甚至在pH为2的条件下仍有活性。由于上述较宽的温度和pH适应范围使粗木瓜酶制品仍在工业上得到了广泛的应用(沈家柏,1984)。

木瓜蛋白酶与其他酶的一个显著不同点在于它在8 mol/L 尿素中仍保持完整的活性。木瓜蛋白酶在有机溶剂中相对稳定,如在甲醇(0~50%)、乙二醇(0~40%)、二氧六环(0~30%)等溶液中结构基本不发生变化。木瓜蛋白酶分子上的许多基团都可以在一定条件下发生化学反应。活性巯基(—SH)可以与许多专一性试剂进行烷基化反应。两个木瓜蛋白酶分子中的活性巯基与汞试剂作用后形成—S—Hg—S—桥,它又可被巯基激活剂复原,这就是木瓜蛋白酶的可逆性抑制现象。如果活性巯基被激烈氧化成亚磺酸基,则酶活性不能被复原,这种抑制是不可逆的。木瓜蛋白酶的可逆性抑制在实践中得到了广泛的应用。丝氨酸蛋白酶的专一性抑制剂DFP试剂可与木瓜蛋白酶分子中第123位的酪氨酸残基发生反应,但这种修饰并不会使木瓜蛋白酶的活性发生变化。木瓜蛋白酶的 α -氨基和 ϵ -氨基都可经化学修饰而保持其活性,分子中多个酪氨酸残基也可经修饰而不降低活性。这样木瓜蛋白酶分子便可通过这些残基的氨基和酚基与许多水不溶性物质相结合形成具有活性的固定化木瓜蛋白酶,这是当前酶制剂工业发展的一个重要方向,从上述内容可以看到,木瓜蛋白酶所具有的性质是与其分子结构密切相关的(沈家柏,1984)。

木瓜蛋白酶具有比较广泛的专一性,在对底物的分解测定中其主要切点是精氨酸和赖氨酸残基的羧基端。

1.1.2 木瓜蛋白酶用途

木瓜蛋白酶具有耐高温、活性强、稳定性好、蛋白质水解能力强等特性,还具有凝乳、解脂和溶菌的功能,是能作用于各类蛋白质的纯天然产物。该酶还对pH变化和金属离子及去垢剂不敏感,用途广泛,目前已应用于食品、医药卫生、日用化学工业、轻纺工业等多个领域。

1. 木瓜蛋白酶在食品领域的应用

(1) 肉类加工

木瓜蛋白酶作为嫩肉粉的主要成分,能够使较坚韧的肉类迅速嫩化,节省烹饪时间与能源,提高肉制品的营养价值。木瓜蛋白酶添加在肉中可分解胶原蛋白(collagen)、弹性蛋白(elastin),特别是对弹性蛋白降解作用较强。木瓜蛋白

酶是半胱氨酸蛋白酶,能降解胶原纤维和结缔组织中的蛋白质,它将肌动球蛋白和胶原蛋白降解为小分子的多肽甚至氨基酸,令肌肉肌丝和筋腰丝断裂,使肉质变得嫩滑,并简化蛋白质结构使人体食用后易于消化吸收(沈悦,2008)。

在肉类加工中木瓜蛋白酶是最好的肉类嫩化剂,这是因为木瓜蛋白酶与其他蛋白酶相比其热稳定性较高。一般蛋白酶在较低温度时即失活,而肉类结缔组织中的胶原蛋白和弹性蛋白需在 60℃ 以上才开始变性并变得容易被木瓜蛋白酶降解,且在 70℃ 左右断裂最多(蔡晓雯等,2003)。40~70℃ 时木瓜蛋白酶嫩化肉类的活性最强,嫩化作用主要发生在当肉类加工温度逐渐升高而酶还没有完全失活这个阶段。所以在肉类嫩化中使用最多的是木瓜蛋白酶(张文学等,2000)。

(2) 啤酒澄清

木瓜蛋白酶应用于啤酒酿造行业时,可以作为澄清剂、稳定剂使用,可以使啤酒的营养价值得到一定的提升。将木瓜蛋白酶用于冷藏储存的啤酒,能水解啤酒内的蛋白质,部分水解一些已形成的复合物,产生更多的多肽或氨基酸,保证啤酒在冷藏过程中的高清澈度,同时改善啤酒的口感及原有多肽和氨基酸的组成和比例,有效地改良啤酒品质。据报道,对冷藏储存过程中的啤酒加入浓度为 0.08 mg/100 ml 的木瓜蛋白酶时澄清效果最佳,可使浑浊度降低 68.75%,可将游离氨基酸苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)和精氨酸(Arg)的含量分别增加 8.2 倍、0.2 倍和 1.1 倍(乙引等,2000)。

(3) 饲料添加

木瓜蛋白酶添加到饲料中能促进蛋白质的吸收和利用,据报道,木瓜蛋白酶添加到生长猪日粮中可增加生长猪的食欲,使其皮肤红润、被毛光滑、猪群生长整齐(宾石玉等,1996)。另外中国水产科学研究院南海水产研究所还将木瓜蛋白酶应用于虾饲料中,实验结果表明,在虾饲料中添加木瓜蛋白酶对虾的生长有促进效果,可使虾产量提高 5%(张庆等,1996),这说明在虾饲料中添加木瓜蛋白酶具有一定的经济效益。

(4) 分解各类蛋白质

木瓜蛋白酶在蛋白质的分解方面应用较多。Ye 等(2000)研究了木瓜蛋白酶对甲壳胺的分解作用,实验结果表明,当分子量为 $(5\sim 10)\times 10^5$ 的木瓜蛋白酶在 pH 4.0、温度 40℃、时间 8 h、酶含量 1.5 mg/ml 的条件下,可很容易地降解甲壳胺;张芝芬等(2002)研究了木瓜蛋白酶对蚌肉蛋白质的水解作用,以三角帆蚌为原料,利用木瓜蛋白酶对蚌肉蛋白质进行水解,正交实验结果表明,酶解最适条件为:温度 50℃、pH 6.5、时间 5 h、加酶量 0.6%,在该条件

下, 蚌肉蛋白质的水解度为 48.9%, 蛋白质回收率达 78.1%; 钟耀广 (2004) 对木瓜蛋白酶水解螺旋藻蛋白进行了研究, 确定木瓜蛋白酶水解螺旋藻蛋白的最佳工艺条件为: 温度 55℃、pH 6.0、酶底物比为 1:100、水解时间为 2 h。类似的报道还有很多, 说明木瓜蛋白酶是一种很重要的蛋白质水解酶。

2. 木瓜蛋白酶在医药卫生领域的应用

木瓜蛋白酶在医药卫生领域越来越受到人们的重视。木瓜蛋白酶在医药卫生领域除了可以帮助消化, 消除消化紊乱及作为驱虫剂外, 还可以清除挫伤、切断伤、烫伤等各种皮肤表面的溃疡等。华南农业大学与广西壮族自治区亚热带作物研究所合作, 用木瓜蛋白酶、抗生素和凡士林作膏剂, 对一百多例深层蹄部化脓性外伤的奶牛进行治疗, 木瓜蛋白酶可将严重阻隔药物渗入的疮痂分解, 令抗生素直接接触及创面细菌, 治愈了患病几个月的顽固蹄腐病牛, 开创了木瓜蛋白酶用作兽药的先河 (江国兴, 1991)。

仇凯等 (1995) 研究了用木瓜蛋白酶制备抗人肝癌单克隆抗体中的 $F(ab')_2$ 及 Fab 片段, 其方法是将抗体用激活的木瓜蛋白酶分别在偏酸性和偏碱性条件下消化不同时间, 得到 $F(ab')_2$ 和 Fab 片段, 经实验可知用木瓜蛋白酶制备 $F(ab')_2$ 及 Fab 片段操作简单, 实用性强且其产率及活性均优于胃蛋白酶。

此外, 木瓜蛋白酶还可以促进中药成分的有效煎出, 用于辅助 Rh 血型的鉴定, 关节炎实验模型的建立, 肿瘤的辅助治疗等。粗木瓜蛋白酶中分离纯化得到的木瓜凝乳蛋白酶还可以用于治疗腰椎间盘突出症 (邓静等, 2003)。

3. 木瓜蛋白酶在日用化学工业领域的应用

木瓜蛋白酶有溶解死细胞的能力, 且能有区别地消化分解老皮肤而不伤害新皮肤, 将其加入化妆品中可淡化黑斑、雀斑, 处理坏死组织和伤疤, 具有治疗粉刺、增加皮肤弹性和改善肌肤状况的功效。叶启腾等 (1999) 用木瓜蛋白酶配合多元醇作保护剂、保湿剂制成含酶牙膏和含酶护肤品。若在护肤品中加入木瓜蛋白酶水解过的明胶、皮胶等成分, 通过使这类富含脯氨酸、羟脯氨酸的蛋白质分解到平均分子量 2000 以下, 使小分子多肽营养能直接通过皮肤被吸收, 达到养颜的目的。特别是用木瓜蛋白酶制成的木瓜酶香皂是目前国内市场上非常畅销的一种香皂, 它能改善和增强皮肤表皮细胞的新陈代谢, 使皮肤具有良好的弹性。

4. 木瓜蛋白酶在轻纺工业领域的应用

(1) 在纺织工业中的应用

木瓜蛋白酶还可以应用于纺织工业中, 如羊毛制品的处理, 经过木瓜蛋白酶处理的羊毛制品收缩性好且抗张强度高, 这是因为木瓜蛋白酶只溶解丝胶, 而对

纤维蛋白全无作用,所以能令丝织物等滑爽柔软。为防止羊毛制品的收缩需对其进行表面处理以脱去胶质或减少胶质含量,一般需先用木瓜蛋白酶加活化剂并用有机溶剂处理,随后以聚亚安酯类作用。国外常用毛纤维含量 1200% 的 C_2Cl_2 , 0.5% 600 000U 的木瓜蛋白酶、单乙醇胺和焦亚硫酸盐, $60^{\circ}C$ 处理羊毛制品 10 min, 甩干后浸入 1200% C_2Cl_2 和合成浆料 LKF 中, 室温作用 6 min, 清洗干燥后, 羊毛制品的收缩率可从对照的 16% 降到 0~2.5% (叶启腾等, 1999)。

(2) 在制革软化中的应用

目前广泛应用于制革生产中的酶以中性蛋白酶为主, 其次是碱性蛋白酶, 酸性蛋白酶的应用并不多见。从理论上讲, 皮胶原经浸水、脱毛、浸灰和脱灰处理后, 等电点大约为 5.0, 因此, 在酸性条件下软化, 对皮胶原的损害较小, 可有效防止软化过度。木瓜蛋白酶属酸性植物蛋白酶, 由于其具有较强的水解黏蛋白和类黏蛋白的能力, 所以有可能作为软化剂或软化助剂应用于制革工业 (刘彦等, 1998)。

木瓜蛋白酶被广泛地应用在很多领域, 尤其在食品、医药卫生领域受到越来越多的重视。因此, 对木瓜蛋白酶分离纯化技术进行深入研究以提取高质量的木瓜蛋白酶具有重要的意义。

1.2 木瓜蛋白酶活性研究方法

酶活性通常又称为酶活力, 酶活性测定实际上指的就是酶的定量测定, 在研究酶的性质、酶的分离纯化及酶的实际应用工作中都需要测定酶的活性。酶活性测定的目的是了解组织提取液、体液或纯化的酶液中酶是否存在及其含量。

由于酶蛋白的含量甚微, 很难直接测定其含量。而且在生物组织中, 酶蛋白常常与其他各种蛋白质混合存在, 将其提纯耗时费力。因此, 与其他物质的定量测定不同, 在检测酶的存在与否及含量时, 不能直接用重量或体积等指标来衡量, 而通常采用该酶催化某一化学反应的能力, 即酶活力大小来表示。

酶活力单位即酶单位 (U) 是衡量酶活力大小即酶含量多少的指标。酶单位的定义是: 在一定条件下, 一定时间内将一定量的底物转化为产物所需的酶量。由此, 酶含量就可以用每克酶制剂或者每毫升酶制剂中含有多少酶单位 (U/g 或 U/ml) 来表示。

一般而言, 可以通过两种方式进行酶活性测定, 其一是测定完成一定量反应所需的时间, 其二是测定单位时间内酶催化的化学反应量。就本质来说, 测定酶活性就是测定产物增加量或底物减少量, 因此需要根据产物或底物的物理或化学特性来决定具体酶促反应的测定方法 (郑宝东, 2006)。现将最常用的测定酶活

性的方法介绍如下。

工业上木瓜蛋白酶活性测定方法一般有紫外分光光度法、酶反应法、茆三酮显色法和共振散射光谱法等几种。对不同来源的木瓜蛋白酶用上述前三种方法测定其活性,结果表明以酪蛋白为底物的紫外分光光度法操作简便、成本低廉,适于酶纯化过程中的活性比较和木瓜蛋白酶系列产品及国内商品酶的活性测定;酶反应法反应稳定,重复性好,适于酶学性质的理论研究和出口商品酶的活性测定;以酪蛋白为底物的茆三酮显色法,虽然操作烦琐,但所需仪器简单,测定结果误差较小,因此,在条件简陋的地区也可以用此法来测定木瓜蛋白酶的活性(方焕等,2000)。

1.2.1 紫外分光光度法测定木瓜蛋白酶活性

此法主要参考国际商务标准《植物提取物木瓜蛋白酶》(SW/T 5—2015)(中国医药保健品进出口商会,2015)。

1. 测定原理

蛋白酶可在一定温度、pH 条件下,水解酪蛋白底物产生氨基酸,一定时间后,加入三氯乙酸终止酶反应,未水解的底物沉淀出来,过滤去除沉淀,滤液能吸收紫外线,用分光光度法测其吸光度,以酪氨酸为标准品,绘制标准曲线,依据滤液吸光度值即可计算酶活力。

酶活力单位定义:1 g 固体酶(或 1 ml 液体酶),在温度 37℃、pH 7.0 条件下,1 min 水解酪蛋白底物产生相当于 1 μg 酪氨酸的酶量,为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/ml)表示。

2. 仪器和设备

分析天平:感量 0.01 mg;恒温水浴锅(37±0.2)℃;pH 计:准确至 0.01;紫外-可见分光光度计;超声波清洗仪;移液器;秒表;温度计:精度 0.1℃。

3. 试剂和溶液

①酶稀释液:称取 L-半胱氨酸盐酸盐($C_3N_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$) 5.27 g,氯化钠(NaCl) 23.4 g,加水 500 ml 溶解,另取二水合乙二胺四乙酸二钠($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) 2.23 g,加水 200 ml 完全溶解,将以上两种溶液混匀,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 0.1 mol/L 盐酸溶液调至 pH 5.5,加水稀释至 1000 ml。

②磷酸氢二钠溶液(0.05 mol/L):称取磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 17.89 g,加水溶解,并定容至 1000 ml。

③酪蛋白溶液:称取经硅胶干燥器中干燥至恒重的酪蛋白(又名干酪素) 0.6 g

(精确至 0.2 mg), 置烧杯中, 加入磷酸氢二钠溶液 80 ml。在沸水浴中边加热边搅拌, 直至完全溶解, 冷却后用 0.1 mol/L 盐酸调至 pH 7.0, 转移到 100 ml 容量瓶中, 加水至刻度。现用现配。

④酪氨酸标准溶液: 取 105℃干燥至恒重的酪氨酸 25 mg(精确至 0.01 mg)于 50 ml 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 的盐酸溶液适量使之溶解, 以 0.1 mol/L 的盐酸溶液定容。

⑤样品溶液: 称取适量试样 $[8 \times 10^5 \text{ U/g}]$ 酶活样品称取 $(40 \pm 5) \text{ mg}$, 精确至 0.01 mg]于 50 ml 容量瓶中, 加少量酶稀释液超声溶解, 加酶稀释液至刻度, 充分摇匀, 必要时过滤; 根据不同品种酶活性高低, 吸取适量试样溶液置于容量瓶中, 加酶稀释液稀释至适当浓度(稀释至试样溶液吸光度值为 0.2~0.6), 充分摇匀, 供测试用(60 min 内使用)。

4. 操作步骤

①酶样品吸光度: 吸取试样溶液 1 ml 置于 25 ml 具塞比色管中, 于 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中保温 10 min, 加入在 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5 ml, 摇匀, 置 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中, 精准反应 10 min, 加入三氯乙酸溶液 5 ml, 摇匀, 于 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中放置 40 min, 取出, 冷却至室温, 用干燥滤纸过滤, 取滤液, 2 h 内, 在波长 275 nm 处用蒸馏水作参比测出滤液的吸光度, 得样品吸光度 $A_{\text{样}}$ 。

②酶样品空白吸光度: 吸取试样溶液 1 ml 置于 25 ml 具塞比色管中, 于 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中保温 10 min, 加入三氯乙酸溶液 5 ml, 摇匀, 反应 10 min, 加入在 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中预热的酪蛋白溶液 5 ml, 摇匀, 于 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 水浴中放置 40 min, 用干燥滤纸过滤, 取滤液, 2 h 内, 在波长 275 nm 处用蒸馏水作参比测出滤液的吸光度, 即得样品空白吸光度 $A_{\text{空白}}$ 。

5. 酪氨酸标准溶液吸光度

吸取酪氨酸标准溶液 1 ml、2 ml、3 ml、5 ml、10 ml 于 50 ml 容量瓶中, 以 0.1 mol/L 的盐酸溶液定容, 配制成酪氨酸浓度分别为 10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 的标品溶液; 以 0.1 mol/L 的盐酸溶液作参比, 于 275 nm 处测定其吸光度, 以吸光度 $A_{\text{标品}}$ 为纵坐标, 浓度 $C_{\text{标品}}$ 为横坐标绘制标准曲线。

6. 结果计算

①样品的吸光度 A , 如式(1-1)所示:

$$A = A_{\text{样}} - A_{\text{空白}} \quad (1-1)$$

式中, A 为样品吸光度; $A_{\text{样}}$ 为酶样品吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为酶样品空白吸光度。

②酶活力单位, 如式 (1-2) 所示:

$$\text{酶活力单位 (U/g)} = C \times K \times 11 \times 1000 / (10 \times M) \quad (1-2)$$

式中, C 为由标准曲线求得的吸光度 A 所对应的酪氨酸的浓度 ($\mu\text{g/ml}$); K 为酶溶液稀释倍数; M 为酶样品称样量 (mg); 11 为测试管中溶液总体积 (ml); 10 为酶水解酪蛋白底物的时间 (min)。

1.2.2 酶反应法测定木瓜蛋白酶活性

用 50 mmol 半胱氨酸盐酸、35 mmol EDTA 二钠盐、50 mmol pH 6.0 的磷酸缓冲液配制酶液。酶液浓度 (Sigma) 为 0.1 mg/ml, 其余 5 个样品均为 1 mg/ml。酶反应时间分别为 5 min、10 min、30 min、50 min, 酶反应温度分别为 20℃、37℃、60℃、80℃、100℃。每个处理均有 3 次重复。具体操作如下: 在具塞比色管中分别加入 5 ml 1% 酪蛋白溶液。配制方法: 取 10 g 酪蛋白于 500 ml 50 mmol Na_2HPO_4 溶液中, 沸水浴 30 min, 不断搅拌, 冷却至室温后, 用 50 mmol 柠檬酸调 pH 至 6.0, 最后用蒸馏水定容至 1000 ml。测定温度下预热 10 min, 加入 1 ml 酶液, 摇匀, 立即准确计时。用 4 ml 20% 三氯乙酸溶液终止反应, 摇匀后继续在水浴中放置 30 min, 然后过滤, 对滤液作紫外分光光度法和茚三酮显色法测定。空白对照反应与上述过程不同之处是在酪蛋白溶液中先加入三氯乙酸, 摇匀后再加酶液, 其他过程相同 (何继芹, 2008)。

1.2.3 茚三酮显色法测定木瓜蛋白酶活性

精确配制 10 $\mu\text{g/ml}$ 酪氨酸的标准溶液和水合茚三酮溶液。水合茚三酮溶液配制方法: 0.5 g 茚三酮溶于 19 ml 乙二醇甲醚中, 再加入 6 ml 氯化亚锡 (SnCl_2) 溶液 (10 mg SnCl_2 溶于 6 ml 4 mol/L 的乙酸缓冲液, pH 5.5) 中。分别取 3 ml 酶反应后的上述滤液和酪氨酸标准溶液于具塞比色管中 (对照管中加入 3 ml 磷酸缓冲液), 然后各加入 2 ml 水合茚三酮溶液和 4 mol/L 的 pH 5.5 的乙酸缓冲液, 加盖摇匀, 在 100℃ 水浴中加热 10 min 后, 用自来水冲洗冷却至室温, 放置 10 min, 在 570 nm 处比色, 测得酶反应液的吸光度为 A , 酪氨酸标准溶液的吸光度为 A_T , 求出 1 $\mu\text{g/ml}$ 酪氨酸标准溶液的吸光度 A_0 ($A_0 = A_T / 10$) (方焕等, 2000)。

酶活力单位定义: 在测定条件下, 每分钟水解酪蛋白的三氯乙酸可溶物与茚三酮反应后在 570 nm 处的吸光度等于 1 $\mu\text{g/ml}$ 酪氨酸显色后测得的吸光度时, 所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{酶制剂的活性 (U/g 干粉)} = \frac{\bar{A}}{t} \cdot \frac{c}{10} \quad (1-3)$$

式中, $\bar{A}$ 为酶反应液经茚三酮显色后在 570 nm 处的吸光度, 如 1 $\mu\text{g/ml}$ 酪氨酸标准溶液经茚三酮显色后在 570 nm 处的吸光度; t 为酶反应时间 (min); c 为酶液浓度 (g/ml); 10 为酶反应液总体积 (ml)。

紫外分光光度法与茚三酮显色法比较, 测定值往往偏低, 但该方法所需测试仪器简单, 主要为恒温水浴锅和紫外分光光度计各一台, 步骤简单, 容易掌握, 且成本低廉。若以每个样品重复一次计算, 则每个样品的成本费为: 100 个样品以上是 0.5 元左右, 30 个样品以下为 1.5 元左右。由于上述优点, 该方法为工厂木瓜蛋白酶检测最常用的方法之一, 尤其适用于木瓜蛋白酶系列产品酶活性测定及纯化过程中的酶活性比较检测。只要准确控制测定条件, 是可以减少误差, 提高酶活性的。

1.2.4 共振散射光谱法测定木瓜蛋白酶活性

1. 仪器与试剂

RF-540 型荧光分光光度计; 电热恒温水浴锅; TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计。

木瓜蛋白酶液: 准确称取 0.5 g 木瓜蛋白酶 (6000 U/mg), 用缓冲液溶解, 定容至 50 ml, 配成 10 mg/ml 储备液, 使用时用缓冲液稀释至所需浓度。

10 mg/ml 酪蛋白溶液: 取 1.0 g 酪蛋白, 加 0.05 mol/L Na_2HPO_4 溶液 50 ml, 置沸水浴中加热 30 min, 搅拌, 取出冷却至室温, 用 0.05 mol/L 柠檬酸溶液调节 pH 至 6.5, 同时迅速搅拌, 以防止酪蛋白沉淀, 用水定容至 100 ml (临用新配)。

5.0×10^{-5} mol/L 十二烷基苯磺酸钠溶液 (SDBS); 2 mol/L L-盐酸半胱氨酸溶液。

缓冲液: 取 1.79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 加 50 ml 水溶解, 加二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.244 g、L-盐酸半胱氨酸 0.47 g, 溶解, 用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.5 ± 0.1 , 用水定容至 100 ml (新配)。所用试剂均为分析纯, 水均为二次蒸馏水。

2. 实验方法

在 10 ml 具塞比色管中, 加入 1 ml 5 mg/ml 酪蛋白, 置 55°C 水浴锅中预热 10 min, 加入适量 60 U/ml 木瓜蛋白酶, 用缓冲液稀释至 1.5 ml, 摇匀并开始计时, 放回 55°C 水浴锅中, 60 min 后取出, 加入 2 ml 5.0×10^{-5} mol/L SDBS, 用二次蒸馏

水定容至 5 ml, 摇匀, 放置 15 min。用荧光分光光度计同步扫描得到体系的共振散射光谱。在 470 nm 处测定体系的散射光强度 $I_{470\text{ nm}}$ 和试剂空白的散射光强度 I_0 , 计算 $\Delta I = I_{470\text{ nm}} - I_0$ 值。

3. 标准曲线

按照实验方法加入不同活力的木瓜蛋白酶对照品, 在 470 nm 处测得体系的 ΔI , 绘制标准曲线。

4. 样品测定

称取样品 0.5 g, 用缓冲液充分溶解, 定容至 50 ml, 过滤, 取滤液, 使用时用缓冲液稀释 20 倍至浓度为 0.5 mg/ml。按实验方法测定样品中木瓜蛋白酶的活性。

共振散射光谱法因操作简便、灵敏度高, 除应用于木瓜蛋白酶活性的测定外, 已广泛用于生物大分子、药物、无机离子等的痕量分析(黄国霞等, 2007)。

1.3 木瓜蛋白酶的传统提取方法

由于番木瓜乳汁中除了含有木瓜蛋白酶还含有其他蛋白酶, 这些酶的催化性质不同, 所以要对木瓜蛋白酶进行分离纯化后才能应用于工业生产。目前分离纯化木瓜蛋白酶的方法主要有超滤法、盐析法、有机溶剂提取法、絮凝法和亲和层析法等。

1.3.1 超滤法提取木瓜蛋白酶

超滤技术在操作过程中无相变化, 不会改变产品的性能和活性, 也不用添加任何化学药剂且无需热处理, 特别适用于热敏性物质, 对热不稳定性产品是安全的。超滤设备和工艺较其他分离方法简单且耗能低, 滤膜可以反复多次使用, 同时还具有处理量大、处理时间短、样品残留小、产品提收率高等优点。刘叶青等(1996)用超滤技术纯化木瓜蛋白酶。方法如下: 先将中空纤维超滤膜洗净, 然后, 取一定量进行絮凝处理后取上清液, 并控制一定压力和流量, 进行超滤。谭晶等(2007)探究了用超滤法分离提取木瓜蛋白酶。在超滤过程中像木瓜蛋白酶这样的大分子物质被截留, 水及小分子物质等可以穿过超滤膜, 达到分离和纯化的目的。超滤技术虽然广泛地应用于蛋白质的分离纯化, 但也有一定的局限性, 如要分离的两种产品的分子量相差不到 5 倍则无法用超滤法进行分