

# 三相法制备木瓜蛋白酶的过程研究

魏胜华<sup>1,2\*</sup>, 周清华<sup>1</sup>, 钱伟<sup>1</sup>, 张驰<sup>1</sup>

(1.安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000;

2.微生物发酵安徽省工程研究中心, 安徽 芜湖 241000)

**摘要:**为了高效制备木瓜蛋白酶,利用三相分离法对番木瓜乳粉进行分离纯化。对影响分离纯化的主要因素有机溶剂种类及浓度、硫酸铵质量分数、三相成相时间及pH等进行了研究。实验结果表明,该酶的最佳分离条件为:粗酶液与叔丁醇的体积比为1:1.5,硫酸铵质量分数为50%,成相时间为60 min,体系pH为7.0。在此条件下使用三相法分离出的木瓜蛋白酶纯化倍数为2.98倍,酶活回收率为76%。

**关键词:**木瓜蛋白酶;三相分离;分离纯化

中图分类号:Q814.1

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)10-0114-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.10.027

## Preparation of papain by three-phase partitioning method

WEI Sheng-hua<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Qing-hua<sup>1</sup>, QIAN Wei<sup>1</sup>, ZHANG Chi<sup>1</sup>

(1.College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China;

2.Anhui Engineering Technology Research Center of Microbial Fermentation, Wuhu 241000, China)

**Abstract:** In order to prepare papain efficiently, the three-phase partitioning technique is used to separate and purify papaya milk powder. The main factors affecting the separation and purification such as varieties of organic solvents and their concentration, concentration of ammonium sulfate, time of three-phase formation and the pH of system are investigated. The results show that the optimum separation conditions for papain are as follows: the volume ratio of crude papain solution to tert-butanol is 1.0:1.5, the mass fraction of ammonium sulfate is 50%, the phase formation time is 60 min, and the pH is 7.0. Under these conditions, the purification efficiency of papain is 2.98 times and the activity recovery is 76%.

**Key words:** papain; three-phase partitioning; separation and purification

蛋白酶是一类水解蛋白质的酶类,其来源比较广泛,不仅许多种微生物可以产生,而且从动物的胰脏等器官也可以获得<sup>[1]</sup>。近年来,从植物中获取酶越来越受到人们的关注。其中,从木瓜果中提取蛋白酶和凝乳蛋白酶就是获取该酶的一条简捷高效的途径。木瓜蛋白酶 Papain 具有催化活性强、稳定性好、耐高温等优点,广泛应用于食品、纺织等领域,主要用于啤酒发酵、肉类嫩化、纺织原料处理等方面<sup>[2]</sup>;此外,在洗涤行业也有着较好的应用效果<sup>[3]</sup>。

Rathnasamy 等<sup>[4]</sup>利用双水相结合凝胶过滤层析得到纯度 96% 的木瓜蛋白酶;王丽彬等<sup>[5]</sup>采用硫酸铵分级沉淀与柱层析结合的方法得到纯度为 99.31% 的高纯度木瓜蛋白酶,但层析法的操作复杂,成本极高,酶活损失较大,因此,该法并不适合大规模生产应用。

三相分离是一种新型蛋白质分离纯化技术,具有盐析、共溶剂沉淀及等电点沉淀等特点<sup>[6]</sup>,三相分离技术可选择性地将目的蛋白分配到一相中,而

杂蛋白和杂质被分配到其他相中,从而达到蛋白纯化和浓缩的作用<sup>[7]</sup>。与硫酸铵分级沉淀相比,三相法无需分步多级沉淀和脱盐处理,也无需柱层析的繁琐操作,一步即可分离,收率也较其他多步分离方法较高。不仅如此,在三相法提取酶的过程中,由于相转变的过程中涉及到蛋白的空间结构的微调,有些情况下会发生酶活提高的现象<sup>[8]</sup>。目前,国内三相法分离蛋白的相关研究报道较少,王琼等<sup>[9]</sup>利用三相分离对胆固醇氧化酶进行纯化,纯化倍数为 4.5 倍;本课题组对来源于苦杏仁中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶进行纯化,纯化倍数为 5.97 倍<sup>[10]</sup>。国外对三相法分离蛋白的研究已有不少的研究报道,包括柚苷酶<sup>[11]</sup>、纤溶酶<sup>[12]</sup>、脂肪酶<sup>[13]</sup>、 $\beta$ -淀粉酶<sup>[14]</sup>等的分离纯化,但是还没有关于三相法分离制备木瓜蛋白酶的相关报道,在课题组前期三相法分离  $\beta$ -葡萄糖苷酶的基础上,笔者研究了用该方法从番木瓜乳粉中提纯木瓜蛋白酶的过程,为木瓜蛋白酶的高效提取提供新的方法。

收稿日期:2017-04-20

基金项目:安徽工程大学微生物制药产业共性研究院开放课题(ZYYJY201503)

作者简介:魏胜华(1972-),男,博士,副教授,主要研究方向为酶催化,通讯联系人,shenghuawei@sina.com。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

番木瓜乳粉购自江苏锐阳生物科技有限公司;其他试剂购自国药集团上海试剂公司,均分析纯。

### 1.2 木瓜蛋白酶的三相法分离

准确称取 1.00 g 番木瓜乳粉,量取 50 mL 50 mmol/L pH 6.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液充分溶解,配置成 20 g/L 的酶液,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为所需木瓜蛋白酶粗酶液,置于 4℃ 冰箱保存。取一定粗酶液加入适量硫酸铵,用快速混匀器高速震荡溶解 2 min;加入一定体积的有机溶剂,摇匀,室温静置 1 h,形成三相体系,再以 4 000 r/min 离心 10 min,使中间相形成相对致密的薄层状蛋白;移除上层有机相与下层水相,取中间相蛋白沉淀于干燥皿中干燥 2 d,即可得到纯化后的木瓜蛋白酶粉末。

### 1.3 酶活及蛋白质的测定

以干酪素为底物测定木瓜蛋白酶酶活<sup>[15]</sup>。酶活定义:在一定条件下,每分钟内蛋白酶水解底物产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸所需的酶量为一个酶活力单位(U);以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三相分离条件的优化

#### 2.1.1 有机溶剂的种类对三相分离的影响

有机溶剂作为共溶剂在三相分离中不仅影响体系的极性和介电常数,对三相的形成和纯化效果也有重要的影响<sup>[7]</sup>,因此,有机溶剂的选择对三相分离的纯化过程至关重要。选取硫酸铵作为无机盐加入到粗酶液中,使  $\omega(\text{硫酸铵}) = 40\%$ ,加入相同体积的有机溶剂混匀,30℃,静置 60 min,离心。取正丁

醇、叔丁醇、异丙醇、正丙醇、1,4-二氧六环,考察有机溶剂对三相分离的影响,结果如图 1 所示。

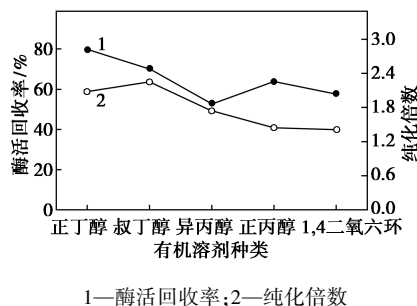


图 1 有机溶剂的种类对三相分离效果的影响

由图 1 可以看出,用叔丁醇作有机溶剂时的纯化倍数最高,为 2.25 倍。一方面,相对其他具有 3、4 个碳原子的有机溶剂,由于叔丁醇具有叔丁基,结构呈分枝状,空间位阻较大,不易破坏酶的内部空间结构<sup>[17]</sup>,因而其酶活性未被破坏,保留较高酶活;另一方面,叔丁醇使整个体系的介电常数降低,增强了蛋白上带电基团间的静电作用力,使酶蛋白发生聚集沉淀。因此,选择叔丁醇作三相分离木瓜蛋白酶的有机相。

#### 2.1.2 成相时间对三相分离的影响

取硫酸铵为无机盐加入到粗提取液中,与叔丁醇等体积混匀,30℃,研究三相成相时间对三相分离的影响,结果如图 2 所示。

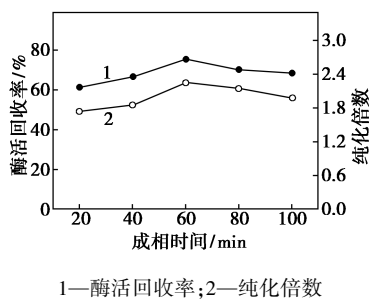


图 2 成相时间对三相分离效果的影响

(上接第 113 页)

[2] 郭明媛.新型改性骨胶的合成与性能研究[D].西安:陕西科技大学,2015.

[3] 李蕊岑.苹果渣制备膳食纤维脱色工艺的研究[D].西安:陕西科技大学,2014.

[4] 张向前,邱自力.工业骨胶脱色改善色泽工艺条件的实验研究[J].安徽农业科学,2008,36(6):2203-2204,2208.

[5] 瞿应良,王孝英,刘汉灵.明胶酶解液脱色工艺研究[J].粮油食品科技,2007,15(4):33-35.

[6] 张建平,赵井泉,刘宜亚.明胶脱色以提高透明度的方法[J].明胶科学与技术,1997,17(2):74-75.

[7] 赵进英,张耀斌,全燮,等.加热和亚铁离子活化过硫酸钠氧化

降解 4-CP 的研究[J].环境科学,2010,31(5):1233-1238.

[8] 赵进英.零价铁/过硫酸钠体系产生硫酸根自由基氧化降解靛酚的研究[D].大连:大连理工大学,2010.

[9] 王璨,张海荣,郭海军,等.酸化对凹凸棒土脱色性能的影响研究[J].广州化工,2014,42(12):4-5.

[10] 孔泳,王志良,倪珺华,等.凹凸棒土应用于重金属离子吸附剂的研究[J].分析测试学报,2010,29(12):1224-1227.

[11] 谢晶晶.热处理凹凸棒石结构、物性演化及其对磷的吸附作用[D].合肥:合肥工业大学,2013.

[12] 李志洲.超声波条件下胰蛋白酶提取鳕鱼皮中胶原蛋白的工艺研究[J].精细化工,2010,27(6):553-557.

[13] 张佳宁,孙贺,胡立志,等.大豆油凹凸棒脱色及其返色的研究[J].食品科学,2013,34(10):1-5. ■

三相分离过程是一个平衡的过程,当反应时间较短时,酶液中的蛋白没有足够的时间进行传质过程,目标蛋白和杂蛋白没有达到分配平衡,从而影响木瓜蛋白酶的分离纯化;当反应时间过长时,木瓜蛋白酶与叔丁醇接触时间过长,破坏了部分酶蛋白的空间结构,影响酶分离效果。由图 2 可以看出,成相时间在 60 min 时,分离效果最佳。

### 2.1.3 叔丁醇的用量对三相分离的影响

叔丁醇作为有机溶剂能够同硫酸铵共同作用将酶蛋白从粗提取液中分离纯化出来,但体系中叔丁醇的用量也影响着三相分离纯化的效果。为此,保持其他条件不变,考察粗酶液与叔丁醇的体积比(1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5)对三相分离的影响,结果如图 3 所示。

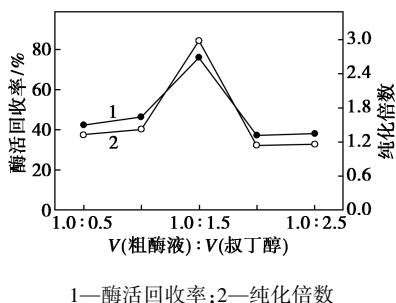


图 3 叔丁醇的用量对三相分离效果的影响

由图 3 可以看出,当粗酶液与叔丁醇的体积比为 1:1.5 时,木瓜蛋白酶的纯化倍数最高。叔丁醇用量较低时,改变溶液介电常数和破坏蛋白质水合层的能力有限,沉淀效果不明显;当叔丁醇用量过高时,明显降低酶液的介电常数,杂蛋白也发生沉淀,大大降低其纯化倍数;同时,过量的叔丁醇破坏了酶蛋白表面的水化层结构,使部分酶失活,从而降低酶活回收率。因此,三相分离时选择粗酶液与有机溶剂体积比为 1:1.5。

### 2.1.4 硫酸铵的质量分数对三相分离的影响

蛋白质的盐析效率首先取决于盐的作用,即离子强度,其次才取决于蛋白质净电荷的作用。因此,硫酸铵质量分数在三相分离中是一个关键因素,分离时必须优化硫酸铵的质量分数。保持其他条件最优,考察硫酸铵质量分数对三相法分离木瓜蛋白酶效果的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出,当硫酸铵的质量分数较低时,由于盐析作用不显著,大量酶蛋白依然溶解在水相,酶活回收率和纯化倍数较低;当硫酸铵质量分数为 50% 时,纯化倍数最高;而硫酸铵质量分数大于 50%

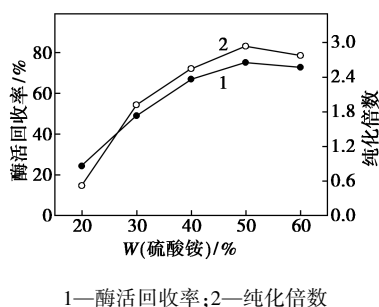


图 4 硫酸铵的质量分数对三相分离效果的影响

时,盐析作用过于突出,三相体系选择能力降低,使酶蛋白和杂蛋白都集中于中间沉淀相中,造成纯化倍数降低,因此,木瓜蛋白酶三相分离纯化时,选择硫酸铵质量分数为 50%。

### 2.1.5 体系的 pH 对分离的影响

在最优叔丁醇用量和硫酸铵质量分数下,考察体系 pH 对三相分离木瓜蛋白酶收率及纯化倍数的影响,结果如图 5 所示。

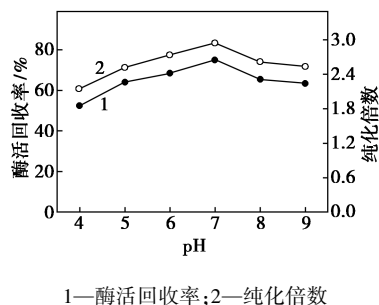


图 5 体系 pH 对三相分离效果的影响

酶蛋白的表面电荷浓度在很大程度上影响了盐析的效率,由于蛋白质的两性解离,酶蛋白所带电荷又高度依赖于体系的 pH,因此盐析法的最佳 pH 往往集中在目的蛋白的等电点附近。与传统盐析法不同,三相体系 pH 在目的蛋白等电点附近时,由于受到盐析与有机溶剂的双重作用,盐离子与目的蛋白间的静电作用急剧下降,影响分离效果<sup>[18]</sup>。由图 5 可以看出,分离效果在 pH 为 7.0 时最佳;而木瓜蛋白酶的等电点(pI)一般在 8.5 左右。这是由于 pH 为 7.0 时酶蛋白表面含有大量的 H<sup>+</sup>,更有利于蛋白在中间相中沉积<sup>[19]</sup>,从而提高了酶活回收率,故分离前应将 pH 调节至 7.0 左右。

### 2.2 纯化结果分析

三相法分离纯化番木瓜乳粉效果图如图 6 所示。

从图 6 中可以看出,最终分离体系形成明显的 3 个部分:第 1 层为以叔丁醇为主的有机相层;中间

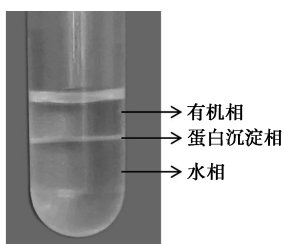


图6 木瓜蛋白酶的三相分离

层则为以酶蛋白为主的固态沉淀相薄层;最下面为含有硫酸铵的水相层。分别以三相法、硫酸铵分级沉淀法对 1.0 g 番木瓜乳粉进行分离纯化,结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,三相法与硫酸铵分级沉淀纯化木瓜蛋白酶的纯化倍数分别为 2.98 和 1.83,酶活回收率分别为 76.0% 和 67.2%,由此可见,三相法对木瓜蛋白酶的分离纯化效果较硫酸铵分级沉淀法更为明显,且三相法处理后的木瓜蛋白酶无需脱盐处理,更加简便。

表 1 木瓜蛋白酶纯化结果

纯化方法	总酶活/ U	总蛋白/ mg	比活力/ (U·mg <sup>-1</sup> )	纯化 倍数	酶活 回收率/%
三相法	484.95	29.77	16.29	2.98	76.0
硫酸铵分级沉淀法	468.60	42.72	10.03	1.83	67.2

### 3 结论

利用三相分离技术对木瓜蛋白酶进行分离,实验证明,三相法可有效分离纯化木瓜蛋白酶,通过对有机溶剂种类及浓度、硫酸铵质量分数、成相时间等分离条件的优化,可使木瓜蛋白酶的纯化倍数达到 2.98,酶活回收率达 76%,经三相法分离后的木瓜蛋白酶纯度得到显著提高。利用三相法分离纯化可获得高纯度的木瓜蛋白酶,操作简单,且有机溶剂易回收,可重复利用,降低分离纯化成本。

### 参考文献

[1] 曹雅,周敏,饶春,等.胰蛋白酶生产中的固液分离工艺研究[J].现代化工,2014,(4):66-69.

[2] 赵电波,陈茜,张丽尧.木瓜蛋白酶的提取及应用研究进展[J].肉类研究,2010,(11):19-23.

[3] 鹿桂乾,张利萍.蛋白酶在液体洗涤剂中的应用研究[J].现代化工,2010,(S2):124-127.

[4] Rathnasamy S, Kumaresan R. Design and development of single stage purification of papain using ionic liquid based aqueous two phase extraction system and its partition coefficient studies[J].In-

ternational Journal of Engineering and Technology, 2013, 5(2): 1934-1941.

[5] 王丽彬,张弢,王旻.高纯度木瓜蛋白酶的分离纯化和性质研究[J].中国生化药物杂志,2006,(3):159-162.

[6] Vetal M D, Rathod V K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (Citrus sinenses)[J]. Food and Bioproducts Processing, 2015, 94:284-289.

[7] Kulkarni V M, Rathod V K. A novel method to augment extraction of mangiferin by application of microwave on three phase partitioning[J]. Biotechnology Reports, 2015, 6:8-12.

[8] Şen A, Eryılmaz, Bayraktar H, et al. Purification of α-galactosidase from pepino (Solanum muricatum) by three-phase partitioning[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 83:130-136.

[9] 王琼,霍影,汪静,等.胆固醇氧化酶的三相分离及其血清总胆固醇的测定[J].西南师范大学学报(自然科学版),2014,(2):47-55.

[10] 魏胜华,钱伟,孟娜,等.三相法从苦杏仁中分离制备β-葡萄糖苷酶[J].精细化工,2016,(5):530-535.

[11] Shanmugapriya M, Vinothkumar V, Ragupathy J, et al. Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80:418-423.

[12] Avhad D N, Niphadkar S S, Rathod V K. Ultrasound assisted three phase partitioning of a fibrinolytic enzyme[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(2):628-633.

[13] Kumar M, Mukherjee J, Sinha M, et al. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): Structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*[J]. Sustainable Chemical Processes, 2015, 3(1):14.

[14] Sagu S T, Nso E J, Homann T, et al. Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning[J]. Food Chemistry, 2015, 183:144-153.

[15] 梁晓亮.嗜热蛋白酶 WF146 的抗自降解研究及其应用[D].武汉:武汉大学,2010.

[16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2):248-254.

[17] Wang S, Wu P, Han Z. Random conjugated polybenzazole copolymers: Synthesis, characterization, and exciton confinement effects in photophysical properties[J]. Journal of Materials Science, 2004, 39(8):2717-2726.

[18] 王龙刚,梁爽,王武.三相分离菌株胆固醇氧化酶及其性质[J].华东理工大学学报(自然科学版),2007,(2):190-194.

[19] Gagaoua M, Boucherba N, Bouanane-Darenfed A, et al. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex[J]. Separation and Purification Technology, 2014, 132:461-467. ■