

菠萝果蛋白酶生产工艺的改进

黄卓烈 林韶湘 李明启

(华南农业大学农业生物系, 广州 510642)

摘要 本试验研究了菠萝果蛋白酶生产工艺中的各个重要环节。结果表明:用 0.08~0.1% 的丹宁作沉淀剂较适宜,既可保持产品质量,又可兼顾产品产量;酶膏在 -12℃ 以下低温冻结和真空干燥两个因素能显著提高产品酶活性;1000 μg/g 硫代硫酸钠加 62.5 μg/g 半胱氨酸是菠萝果蛋白酶活性的有效保护剂,可使酶活性比对照提高 32.57%;提取过程中用抗坏血酸、乙二胺四乙酸二钠、氯化钠和醋酸锌溶液对酶复合物进行洗涤可有效地提高产品的活性和质量。

关键词 菠萝果蛋白酶;提取工艺;酶活性保护剂

An improvement to the producing technology of fruit bromelain Huang Zhou-Lie, Lin Shao-Xiang and Li Ming-Qi (Department of Agricultural Biology, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642) *J. Plant Resour. & Environ.* 1993, 2(1): 25~30

The producing technology of fruit bromelain was presented in this paper. The results indicated that the suitable concentration of tannic acid to precipitate the bromelain was 0.08~0.1%, such concentration could take account of both yield and quality of fruit bromelain. To freeze the enzyme cake below -12℃ and to dry the enzyme cake through vacuum desiccation could raise the enzyme activities greatly. It was discovered that 1000 μg/g of sodium hyposulfite plus 62.5 μg/g of cysteine was an effective protector for enzyme activities and raised the activities by 32.57% of control. The activities and the quality of the enzyme complex could be improved effectively by cleansing with a solution containing ascorbic acid, disodium edetate, sodium chloride, and zinc acetate. The important steps of technological method were discussed.

Key words fruit bromelain; preparation technology; protector of enzyme activity

菠萝蛋白酶是广泛存在于菠萝茎叶和果实中的蛋白水解酶。其中,存在于果中的菠萝蛋白酶称为菠萝果蛋白酶(EC 3.4.22.5)。据研究,菠萝果蛋白酶至少有两个组分,分别称为 FBA 和 FBB。FBA 的分子量约为 23 000,其肽链的氨基末端是丙氨酸,羧基末端是甘氨酸,FBB 的分子量约 27 000,氨基末端是丙氨酸,羧基末端是丝氨酸^[3]。用等电聚焦技术测定,菠萝果蛋白酶的等电点为 pI 4.6^[2]。

菠萝果蛋白酶能作用的底物包括常用的蛋白质,如明胶、酪蛋白、谷蛋白、弹性蛋白、球蛋白和肌纤蛋白等。在以酪蛋白为底物时,FBA 的作用活性约为 FBB 的两倍^[3]。因此,菠萝果蛋白酶广泛应用于肉类软化,啤酒澄清,明胶制造,蚕茧脱胶,皮革脱毛等工业,在医疗卫生方面

用途更广。

国内生产菠萝果蛋白酶一般采用菠萝果皮为原料。各厂家多用丹宁沉淀法。这个常规方法成本低,操作简便,容易掌握,沿用多年。但按原有流程生产,产品质量差异较大。多数产品质量达不到要求。因此,将原有方法进行改进,提高产品活性指标,是当前的重要课题。生产过程的重要环节是酶的沉淀、酶膏处理、干燥方法、酶活性保护和提高等。针对这一情况,本试验围绕提高产品活性指标,对这些环节进行研究,发现了一个保护酶活性的新方法,可为生产提供重要参考。

材料与方 法

1. 材料的选择 不同品种的菠萝果内酶含量不同,酶活性也相差很大。同一品种中,不同成熟度的果,酶含量也不同。一般青果含酶量较高,随着成熟度提高,含酶量相对下降^[5]。同一个果中,果皮的酶含量比果肉少。本试验采用“无刺卡因”和“巴厘”两品种的约70%成熟度的全果为材料。前者粗酶活性较低,后者则较高。

2. 菠萝果蛋白酶提取

方法1:将鲜果洗净、切碎,每500 g材料加水500 ml用匀浆机匀浆。所得果浆用4层纱布过滤。滤液加0.1%苯甲酸钠,3000 r/min离心20 min。上清液中徐徐加入已溶解的丹宁溶液,边加边搅拌,使液中丹宁浓度最终达到0.1%或所需浓度(见下文)。加毕静置,使丹宁-酶复合物沉淀,除去上清液。将余下的酶复合物用盐酸调至pH 3.4,3500 r/min离心20 min得酶膏。将酶膏置-12℃以下冻结,5~10 h后真空干燥法干燥,真空度为-700~-730 mm汞柱。部分试验据此法相应改变,见下文。

方法2:此法前面工艺与方法1相同,丹宁浓度0.1%或根据需要改变。除去上清液后,在酶浓缩液中每kg加入乙二胺四乙酸二钠0.1 g,醋酸锌0.1 g,氯化钠0.3 g,抗坏血酸0.06 g。充分搅拌后,每kg再加入0.1 g乙二胺四乙酸和0.3 g氯化钠,再搅拌均匀。离心、酶膏处理及干燥与方法1相同。

3. 酶活性测定 酶活性测定按陶宙镨等^[1]的方法进行,以酪蛋白为底物。酶活性以“万单位/g”表示^[1]。

结果与分析

1. 酶浓缩液 pH 调节, 酶膏冻结及干燥方式对酶活性的影响 为了揭示 pH 值调节, 酶膏冻结和酶膏干燥方式对酶活性是否有影响, 我们用方法1进行了此项3因素综合试验。A(pH 调节):分为用1N 盐酸将酶浓缩液调至 pH 3.4和不调节两个水平;B(冻结因素):分为将酶膏置-12℃以下冻结5~10 h 与不冻结两个水平;C(干燥因素):分为将酶膏用40℃鼓风机烘干及真空干燥两个水平。这样共3因素8水平,各水平分别用数字为代号,见图1。试验结果见表1。由表1可见,对于A因素来说,酶浓缩液调至 pH3.4(1,2,3,4),酶活性分别比相应不调节的(5,6,7,8)高(4与8接近)。对于B因素来说,酶膏经-12℃以下冻结的(1,2,5,6),酶活性分别比不冻结的(3,4,7,8)高。对于C因素来说,真空干燥(1,3,5,7)的酶活性分别比40℃烘干的(2,4,6,8)

高。再将试验结果进行方差分析,分析情况见表2。由表2可见,对产品酶活性有显著影响的因素是 C 因素(干燥方式)和 B 因素(酶膏冻结),而 A 因素(pH 调节)虽有影响,但未达到显著水平。两因素互作和3因素互作也没有显著影响。所以我们可以认为,这3个因素影响酶活性由大至小的顺序为 C>B>A。

表1 3因素处理对菠萝果蛋白酶活性影响

Tab 1 Effect of three-factor treatment on the activity of fruit bromelain

代号 Code	蛋白酶活性(万单位/g) Activity of bromelain (ten thousand units /g)	比最高的减少百分率 Lower than the highest(%)	代号 Code	蛋白酶活性(万单位/g) Activity of bromelain (ten thousand units /g)	比最高的减少百分率 Lower than the highest(%)
1	28.09		5	26.17	- 6.84
2	22.82	-18.76	6	21.25	-24.35
3	25.23	-10.11	7	20.70	-26.31
4	19.14	-31.86	8	19.68	-29.94

注:品种:为无刺卡因,提取法:方法 1

Note: cultivar: Wucikayin. Preparation method: Method 1

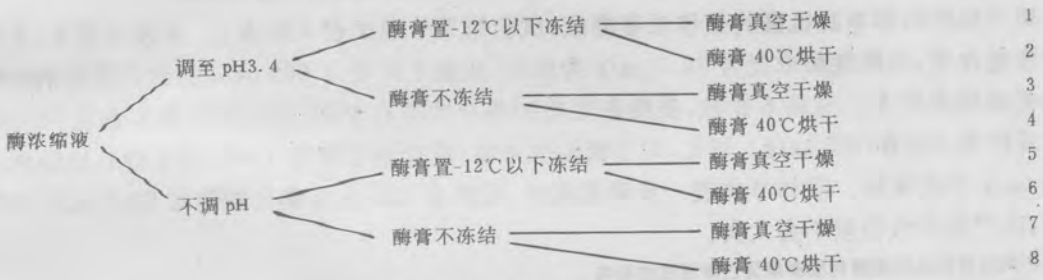


图 1 3因素试验方案

Fig 1 The scheme of three-factor test

表2 3因素试验的方差分析表

Tab 2 Variance analysis of three-factor test

变异来源 Source of variance	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
区组	2	256.83	128.41	9.742		
处理	7	225.56	32.22	2.445		
A	1	21.02	21.02	1.595	4.60	
B	1	69.22	69.22	5.252*	4.60	8.86
C	1	112.32	112.32	8.521*	4.60	8.86
A×B	1	0.09	0.09	0.007		
A×C	1	11.02	11.02	0.836		
B×C	1	3.56	3.56	0.270		
A×B×C	1	8.33	8.33	0.632		
误差	14	184.54	13.182			
总变异	23	666.93				

2. 几种物质对菠萝果蛋白酶活性的影响 菠萝果蛋白酶是酸性蛋白质,其作用活性中心上含有巯基^[4]。在提取、分离和干燥过程中,酶活性降低或失活可能是因为巯基被氧化。因此提取过程添加一些还原剂以保护巯基免遭氧化,可能是保护酶活性的一个办法。本试验采用具有还原作用的抗坏血酸、硫代硫酸钠、半胱氨酸、保险粉(连二亚硫酸钠)试验,在方法 1 的酶浓缩

液离心前加入,其他步骤同方法 1。试验结果列于表 3 中。由表 3 可以看出,各组合均使酶活性有不同程度的提高。“保险粉+硫代硫酸钠”平均使酶活性增加 24.5%,而“硫代硫酸钠+半胱氨酸”则使酶活性平均增加 35.16%。

表 3 几种物质对菠萝果蛋白酶活性的影响

Tab 3 Effects of several substances on the activity of fruit bromelain.

物质组合 Substance combination	蛋白酶活性(万单位/g) Activity of bromelain (ten thousand units/g)	比对照增或减 Higher or lower than control (%)
抗坏血酸	29.94	+ 9.31
硫代硫酸钠	28.58	+ 4.33
硫代硫酸钠+抗坏血酸	28.65	+ 4.67
硫代硫酸钠+半胱氨酸	37.02	+35.16
保险粉	29.60	+ 8.07
保险粉+硫代硫酸钠	34.10	+24.50
对照	27.39	

注:各物质的浓度均为 1 000 $\mu\text{g/g}$,品种为无刺卡因,提取方法为方法 1

Note: The concentration of each substance was 1 000 $\mu\text{g/g}$ cultivar; Wucikayin. Method 1 was employed.

硫代硫酸钠和半胱氨酸的最佳浓度搭配,试验结果分别如表 4 和表 5。由表 4 可见,在各个浓度组合中,半胱氨酸浓度为 62.5 $\mu\text{g/g}$ 为最佳;从表 7 可见,1 000 $\mu\text{g/g}$ 的硫代硫酸钠对酶活性提高幅度较大。与表 5 比较,虽然各处理的酶活性稍有差别,但提高百分率都在 32% 左右。其次为 250 和 125 $\mu\text{g/g}$ 。可见,对于酶活性来说,最佳组合应是 1 000 $\mu\text{g/g}$ 硫代硫酸钠加 62.5 $\mu\text{g/g}$ 半胱氨酸。但如考虑进一步降低成本,应使用 125 $\mu\text{g/g}$ 硫代硫酸钠加 62.5 $\mu\text{g/g}$ 半胱氨酸,其产品活性相差不会太大。

表 4 不同浓度的半胱氨酸对菠萝果蛋白酶活性的影响

Tab 4 Effect of cysteine in different concentration on the activity of fruit bromelain.

硫代硫酸钠+半胱氨酸 Sodium hyposulfite+Cysteine ($\mu\text{g/g}$)	蛋白酶活性(万单位/g) Activity of bromelain (ten thousand units/g)	比对照增或减 Higher or lower than control (%)
1 000+1 000	33.61	+24.81
1 000+5 000	34.38	+27.66
1 000+250	34.27	+27.26
1 000+125	34.65	+28.67
1 000+62.5	35.70	+32.57
1 000+0	29.35	+8.99
0+0(对照)	26.93	

注:品种为无刺卡因;方法 1 Note: cultivar; Wucikayin. Method 1 was employed

表 5 不同浓度的硫代硫酸钠对菠萝果蛋白酶活性的影响

Tab 5 Effect of sodium hyposulfite in different concentration on the activity of fruit bromelain

半胱氨酸+硫代硫酸钠 Cysteine+Sodium hyposulfite ($\mu\text{g/g}$)	蛋白酶活性(万单位/g) Activity of bromelain (ten thousand units/g)	比对照增或减 Higher or lower than control (%)
62.5+1 000	37.91	+32.09
62.5+500	31.13	+8.45
62.5+250	34.26	+19.37
62.5+125	34.10	+18.82
62.5+62.5	31.90	+11.15
0+0(对照)	28.70	

3. 两种不同分离方法对无刺卡因菠萝果蛋白酶活性的影响 将方法 1 和方法 2 提得的无刺卡因品种的产品分别测定活性,结果如表 6。数据表明,方法 2 产品酶活性比方法 1 平均高 83.25%。经 t 测验,在 $\alpha=0.1$ 的水平下达到显著。这说明用方法 2 提取菠萝果蛋白酶要比用方法 1 好得多。

表 6 两种提取方法对菠萝果蛋白酶活性的影响比较

Tab 6 Comparison of the effect of two preparation methods on the activity of fruit bromelain

方法 Method	酶活性 (万单位/g) Enzyme activity (ten thousand units/g)	比方法 1 增减 Higher or lower than Method 1 (%)	t 测验			t test		
			DF	S^2	S_{X1-X2}	t	$t_{0.1}$	$t_{0.05}$
方法 1	30.00		4	110.218	8.57	2.364	2.132	2.766
方法 2	50.26	+83.25						

注:品种为无刺卡因 Note: cultivar: Wucikayin

4. 硫代硫酸钠和半胱氨酸在方法 2 中对酶活性的保护作用 为了探讨硫代硫酸钠和半胱氨酸在方法 2 中是否对酶活性也有保护作用,我们进行本项测试。结果(表 7)表明,在方法 2 中再加入硫代硫酸钠和半胱氨酸,对酶活性也有保护作用,可使酶活性比对照提高 9.35%,而添加硫代硫酸钠和保险粉则不起作用。

表 7 硫代硫酸钠和半胱氨酸在方法 2 中对酶活性的保护

Tab 7 The protection of sodium hyposulfite and cysteine to the activity of fruit bromelain in Method 2

方法 Method	蛋白酶活性(万单位/g) Activity of bromelain (ten thousand units/g)	比对照增减 Higher or lower than control (%)
方法 2(对照)	55.39	
方法 2+硫代硫酸钠(250 μ g/g)+半胱氨酸(62.5 μ g/g)	60.57	+9.35
方法 2+硫代硫酸钠(1 000 μ g/g)+保险粉(1 000 μ g/g)	54.40	-1.78

注:品种为无刺卡因 Note: cultivar: Wucikayin

5. “巴厘”和“无刺卡因”两品种蛋白酶活性和粗酶含量的比较 菠萝品种不同,果内蛋白酶含量不同,酶的活性也有差别。我们分别测定了“巴厘”和“无刺卡因”两个品种的粗酶含量和酶活性,结果分别示于表 8 和表 9 中。由表 8 可见,在丹宁浓度为 0.2% 的条件下,“巴厘”果的粗酶活性平均达 86.43 万单位/g,比“无刺卡因”的平均活性 51.40 万单位/g 高 68.15%。从表 9 中也清楚地看出,在丹宁浓度为 0.2% 的情况下,“巴厘”果平均产粗酶达 0.168%,比“无刺卡因”果酶产量平均高 32.3%。这些结果说明,菠萝品种不同,果内蛋白酶含量和酶的活性都有很大的差别。这在生产上是有参考价值的。

表 8 “巴厘”和“无刺卡因”两品种蛋白酶活性的比较

Tab 8 Comparison of bromelain activities of cultivars Bali and Wucikayin

品种 Cultivar	试验号 No. of experiment						平均 Mean	巴厘比无刺卡因高 % Bali higher than Wucikayin (%)
	1	2	3	4	5	6		
巴厘	91.71	86.87	90.04	91.99	85.15	72.86	86.43	+68.15
无刺卡因	41.04	48.03	59.35	44.41	46.76	68.84	51.40	

注:1. 提取用方法 2;丹宁浓度 0.2% 2. 酶活性单位:万单位/g
Note: 1. Method 2 was employed. Tannic concentration was 0.2%. 2. Enzyme activity: ten thousand units/g

2. Enzyme activity: ten thousand units/g

表9 “巴厘”和“无刺卡因”两品种粗酶含量的比较

Tab 9 Comparison of enzyme yields of cultivars Bali and Wucikayin.

品种 Cultivar	试验号 No. of experiment						平均 Mean	相对含量, Relative yield (%)
	1	2	3	4	5	6		
巴厘	0.15	0.16	0.18	0.18	0.18	0.16	0.168	132.3
无刺卡因	0.15	0.12	0.11	0.08	0.18	0.12	0.127	100

注:丹宁用量为 0.2% Note: Tannic concentration was 0.2%

表10 丹宁浓度对菠萝果蛋白酶的产量和活性的影响

Tab 10 Effect of tannic concentration on the yield and activity of fruit bromelain.

丹宁浓度 Tannic concentration (%)	酶产量(干酶/鲜重) Enzyme yield (%) dry enzyme/fresh weight	酶活性(万单位/g) Enzyme activity (ten thousand units/g)
0.2	0.16	81.68
0.1	0.12	88.57
0.08	0.11	89.30
0.06	0.10	81.37
0.04	0.08	78.03
0.02	0.07	54.57

注:品种:巴厘;方法:方法2; Cultivar: Bali. Method: Method 2

16%。另一方面,在丹宁浓度为 0.02~0.08% 范围内,随着丹宁浓度增加,酶产品的活性也呈上升趋势,在 0.08% 时酶活性最高。再增大丹宁浓度,酶活性又会下降。据此,生产上丹宁用量应选择在 0.08~0.1% 之间。这样既得到一定产量,又能保证产品的质量。

6. 丹宁浓度对酶产量和酶活性的影响

丹宁是蛋白质的沉淀剂,其用量多少势必影响蛋白质沉淀率。用量过少,酶产量不高;而用量过多,又会增加成本,同时,丹宁用量也会影响产品的活性。因此,生产上使用多少浓度才算适当,是急需解决的问题。本试验用“巴厘”的果为材料,结果示于表 10 中。在丹宁浓度为 0.02% 至 0.2% 的范围内,酶产量与丹宁用量成正相关。随着丹宁浓度增大,酶产量上升。在丹宁浓度为 0.2% 时,酶产量达 0.

讨 论

菠萝果蛋白酶是一种较不稳定的酶,工厂化生产往往达不到质量指标。本研究结果揭示:丹宁用量应在 0.08~0.1% 之间,这样既可保证产品质量,又兼顾到酶产量。经过洗涤步骤,酶复合物可释放出酶,使其活性恢复和提高。同时,由于乙二胺四乙酸及其钠盐的存在,可降低产品中某些金属离子的含量,有利于产品质量的提高。

硫代硫酸钠与半胱氨酸共同使用,浓度分别为 125 $\mu\text{g/g}$ 和 62.5 $\mu\text{g/g}$,对酶活性有较大的保护作用,这是一种新型保护剂,酶膏的冻结也是重要环节。冻结后,水结冰体积增大,使酶膏变得疏松,防止酶膏硬化板结而降低酶活性。酶膏干燥方式特别重要,不能用烘干方法,应采用真空干燥法进行。真空度在 -700~-730 mm 汞柱之间,干燥时间越短越好。

参 考 文 献

- 1 陶宙密,谭知敏,黄荣芳. 1982; 药物分析杂志 2:102~103.
- 2 Murachi T. 1976; *Methods Enzymol.* 45:475~485.
- 3 Ota S, E Muta, Y Katahira et al. 1985; *J. Biochem.* 98:219~228.
- 4 Ota S, H Umi, E Muta et al. 1975; *J. Biochem.* 78:627~635.
- 5 Tisseau R. 1976; *Fruits* 31:373~378.