

菠萝各器官蛋白酶的提取与保活

林韶湘 黄卓烈 李明启 陈永泉

(华南农业大学生物系, 广州 510642)

摘要 研究了菠萝各器官的蛋白酶含量、活性和提取过程中酶活性的保护作用, 结果表明, “无刺卡因”品种的青果、70%成熟果肉、70%成熟果皮、茎、果柄、叶的粗酶含量分别为0.359、0.194、0.132、0.994、0.303和0.195%。各器官酶活性以青果酶活性最高。在提取过程中使用乙二胺四乙酸二钠、醋酸锌、氯化钠、抗坏血酸可使果肉蛋白酶、茎蛋白酶和叶蛋白酶活性分别提高69.37%、93.88%和139.69%。1 000 ppm 硫代硫酸钠+1 000 ppm 半胱氨酸是菠萝蛋白酶活性的有效保护剂, 可使果蛋白酶和茎蛋白酶活性分别提高35.51%和69.06%。

关键词 菠萝蛋白酶; 提取; 活性保护剂; 硫代硫酸钠; 半胱氨酸

The extraction and protection of enzyme activity of bromelin from organs of pineapple Lin Shao-Xiang, Huang Zhuo-Lie, Li Ming-Qi and Chen Yong-Quan (Department of Biology, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642), *J. Plant Resour. & Environ.* 1994, 3(2): 22~26

The contents and the activities of bromelin in organs of pineapple, and the protection of enzyme activities during extracting process were investigated. It was indicated that the contents of bromelin in green fruit, fruit pulp and skin of 70% ripeness, stem, stalk and leaf of “Wucikayin” cultivar were 0.359, 0.194, 0.132, 0.994, 0.303, and 0.195% respectively. The activity of bromelin in green fruit was the highest among all those of organs. The use of disodium EDTA, zinc acetate, sodium chloride and ascorbic acid in the extracting process could raise the activities of bromelin in fruit pulp, stem and leaf by 69.37%, 93.88% and 139.69% respectively. It was discovered that 1 000 ppm of sodium hyposulfate plus 1 000 ppm of cysteine was an effective protector of enzyme activity and raised the activities of fruit bromelin and stem bromelin by 35.51% and 69.06%.

Key words bromelin; extraction; activity protector; sodium hyposulfate; cysteine

菠萝蛋白酶是存在于菠萝植株中的蛋白质水解酶, 不但菠萝果含有, 茎、果柄和叶片也都含有⁽⁷⁾。这些蛋白酶不是单一成分, 而是由多种不同分子量及分子结构的酶分子组成的蛋白酶体系。菠萝果中的蛋白酶称为菠萝果蛋白酶(EC3. 4. 22. 5)。实际上, 菠萝果蛋白酶有两种分子, Ota 等分别称之为 FBA 和 FBB⁽⁸⁾。而菠萝茎中的蛋白酶称为菠萝茎蛋白酶(EC3. 4. 22. 4 或 EC3. 4. 4. 24)。菠萝茎蛋白酶更含有多个成分, Ota 等⁽⁸⁾曾发现茎中有6种蛋白酶成分, 分别称之为 SBA、SBB₁、SBB₂、SBB₃、SBB₄、SBB₅。这些成分分子结构和氨基酸组成都有差异。Rowan 等从菠萝茎提取物中分离出两种与原报道的菠萝茎蛋白酶特性不同的巯基蛋白酶, 分别命名为 ananain^(13,15)和 comosain⁽¹⁵⁾, 并获得专利⁽¹⁴⁾。而果柄和叶片中的蛋白酶则尚未作详细研究。

菠萝蛋白酶有广泛用途, 在医药、食品、轻工、化妆品和生物科学研究等方面应用极多。例

如医药方面,用菠萝蛋白酶制成消炎类药物用于治疗感冒、关节炎、乳腺炎、腮腺炎、肝炎、鼻炎等^(4,10,21);用此酶与其他药物一起,可治创伤、促进伤口愈合的有效药物⁽²⁾;在提取血液蛋白时,用它作为抗凝固剂⁽¹⁸⁾;特别是此酶在体外试验可抑制肿瘤生长^(17,20),体内及体外都可诱导抗癌因子的形成⁽¹¹⁾。目前也用此酶抗击人类免疫缺乏病毒(HIV)的感染⁽¹²⁾和医治艾滋病⁽¹⁰⁾等等。在食品方面应用更多,例如用于肉类嫩化⁽⁵⁾、蛋白水解⁽²³⁾、透明蛋白胶冻的制造⁽¹⁶⁾、可口虾酱鱼酱制造⁽⁶⁾、人造水果食品、牛奶取代物等其他食品⁽³⁾的生产,可见其用途十分广泛。但是,我国只有少量应用此酶于制造消炎药物及啤酒工业,所以必须深入研究推广应用。

国内生产菠萝蛋白酶仅用罐头厂的下脚料菠萝皮提取,提取方法多用丹宁沉淀法,此法成本低,工艺简单,容易操作,但产品酶活性一般不高,甚至不能达到药检标准,因此有必要对菠萝各器官蛋白酶提取作进一步探索,以便为改善生产工艺和扩大原料来源提供依据。

1. 材料与方 法

1.1 试验材料 供试菠萝品种为“无刺卡因”。

1.2 蛋白酶提取方法

方法1:将茎、果皮、果肉、青果、果柄分别洗净(茎削去根和皮)后,切碎,每1 kg材料加蒸馏水1 kg,在高速匀浆机中匀浆,匀浆液用4层纱布过滤,得滤液。菠萝叶用榨汁机榨汁,汁液用4层纱布过滤,得滤液。在各种器官的滤液中分别加入0.05%的苯甲酸钠防腐;将滤液离心(4 000 r/min) 20 min,取上清液备用。在上清液中缓缓加入预先溶解的丹宁溶液,边加边搅拌,使丹宁的最终浓度为0.2%,加完丹宁后,让其静置,使所形成的丹宁-酶复合物沉淀后,用虹吸法小心去除上清液,得下层复合物浓缩液,以4 000 r/min离心20 min,沉淀即得酶膏。将酶膏置-12℃以下低温冻5~10 h,然后用真空干燥法干燥,真空度为-700~-730 mm汞柱。干燥后再粉碎即得粗酶制品。

方法2:前面步骤与方法1相同。在加入丹宁并除去上清液后,在余下的复合物中,每1 kg加入醋酸锌0.1 g、抗坏血酸0.06 g、氯化钠0.3 g和乙二胺四乙酸二钠0.1 g,充分搅拌后,每1 kg再加入乙二胺四乙酸0.1 g和氯化钠0.3 g,再搅拌均匀。然后以4 000 r/min离心20 min。所得酶膏用方法1制成干酶。

1.3 蛋白酶活性测定

各种菠萝蛋白酶活性测定采用陶宙镛等人⁽¹⁾的方法。酶活性用“万单位/g”表示。

2. 试验结果与分析

2.1 菠萝各器官的蛋白酶粗酶含量

为了解菠萝植株各器官蛋白酶分布情况,分别提取了各器官中的粗酶含量,结果见表1。由表1可见,在果中,蛋白酶粗酶含量以70%成熟的果皮为最低,而70%成熟果肉粗酶含量是果皮含量的1.47倍,未成熟的青果含酶量是成熟果皮的2.72倍。可见,随着果实成熟,果内的蛋白酶含量下降。这与 Tisseau 报道的结果⁽²²⁾是相似的。含酶量最高的是茎,是成熟果皮含酶量的7~8倍。因此,菠萝茎是提取菠萝蛋白酶的极好原料,应十分重视利用这种农业副产品。

叶片中也测到0.195%的粗酶含量。果柄的粗酶含量是果皮的2.3倍。

表1 无刺卡因菠萝各器官蛋白酶粗酶含量*

Tab 1 The crude bromelin contents of organs of Wucikayin pineapple plants

器官 Organs	平均鲜重含酶量 Average bromelin content of fresh weight (%)	标准差 Standard deviation (%)	相对含量 Relative content (%)
青果 Green fruit	0.359	0.060	272.0
70%成熟果肉 Pulp of 70% ripeness	0.194	0.013	146.97
70%成熟果皮 Skin of 70% ripeness	0.132	0.019	100
茎 Stem	0.994	0.118	753.0
果柄 Stalk	0.303	0.028	229.5
叶 Leaf	0.195	0.027	147.7

*丹宁浓度为0.2%；果皮是指果外围约1cm厚部分，其余部分是果肉。

The concentration of tannic acid was 0.2%. The part of about 1 cm in thickness of outer ring of the fruit was skin, and the other part was pulp.

2.2 菠萝各器官蛋白酶的活性

菠萝各器官中，不但蛋白酶含量有差别，而且酶的活性差别也较大。从表2可见，各器官的蛋白酶中，以青果的酶活性最高；果实成熟后，体内酶活性相对下降，如70%成熟果肉的酶活性比青果酶活性下降13.01%；在70%成熟的果皮中，酶活性也比果肉的酶活性低29.72%；茎蛋白酶活性仅次于青果，与70%成熟果肉的酶活性接近，而明显高于成熟果皮酶的活性；果柄和叶的蛋白酶活性较低，分别只达青果酶活性的24.33%和21.86%。可见，尽管果柄和叶粗酶含量不少(见表1)，但其活性较低，可能是其粗酶含杂蛋白较多所致。

表2 菠萝各器官蛋白酶活性*

Tab 2 The activities of bromelin from pineapple organs

器官 Organs	蛋白酶活性(万单位/g) Activities of bromelin (ten thousand units/g)	器官 Organs	蛋白酶活性(万单位/g) Activities of bromelin (ten thousand units/g)
青果 Green fruit	36.74 ± 4.35	茎 Stem	32.54 ± 7.80
70%成熟果肉 Pulp of 70% ripeness	31.96 ± 5.74	果柄 Stalk	8.94 ± 1.68
70%成熟果皮 Skin of 70% ripeness	22.46 ± 1.33	叶 Leaf	8.03 ± 1.67

*提取方法为方法1 The extracting method was Method 1.

2.3 硫代硫酸钠、半胱氨酸和抗坏血酸对菠萝茎蛋白酶和果蛋白酶活性的影响

采用方法1提取蛋白酶，一般活性较低，原因可能是提取分离和干燥过程中酶活性中心受到氧化所致，因为菠萝蛋白酶是巯基蛋白酶，其活性部位含半胱氨酸巯基^[9]，若在提取过程中适当加入某些抗氧化剂，可能对阻止酶被氧化失活有良好作用。本研究采用在方法1的酶浓缩液离心前加入具有还原能力的硫代硫酸钠、半胱氨酸和抗坏血酸，搅拌均匀后再进行离心、冰冻和干燥处理。酶活性测定结果见表3。可以看出，几种还原物质组合对菠萝茎蛋白酶和果蛋白酶的活性都有保护作用，尤其对菠萝茎蛋白酶效果较好。在茎酶中，半胱氨酸+抗坏血酸组合使酶活性比对照提高29.54%，而硫代硫酸钠+半胱氨酸组合效果更佳，酶活性比对照提高69.06%。在70%成熟度的全果酶中，硫代硫酸钠处理的酶活性比对照提高11.73%，而硫代硫酸钠+半胱氨酸组合的则比对照提高35.51%，效果也相当明显。说明作为菠萝蛋白酶活性保护剂，硫代硫酸钠与半胱氨酸混合使用，可获较好的效果。

表3 几种还原物质对菠萝蛋白酶活性的影响*
Tab 3 Effects of several reducing agents on the activities of bromelin

还原物质 Reducing agents	菠萝茎蛋白酶 Stem bromelin		菠萝果蛋白酶 Fruit bromelin**	
	活性(万单位/g) Activity (ten thousand units/g)	比对照增减(%) Higher or lower than control (%)	活性(万单位/g) Activity (ten thousand units/g)	比对照增减(%) Higher or lower than control (%)
对照 Control	32.26		28.81	
硫代硫酸钠+抗坏血酸 Sodium hyposulfate+ascorbic acid	38.33	+18.82	31.04	+7.74
硫代硫酸钠 Sodium hyposulfate	37.79	+17.14	32.19	+11.73
半胱氨酸+抗坏血酸 Cysteine+ascorbic acid	41.79	+29.54	31.65	+9.86
硫代硫酸钠+半胱氨酸 Sodium hyposulfate+cysteine	54.54	+69.06	39.04	+35.51

*各还原物质的浓度均为1 000 ppm。提取方法是方法1。

The concentrations of reducing agents were 1 000 ppm. The extracting method was Method 1.

**70%成熟的全果。Fruit of 70% ripeness.

2.4 两种抽提方法对菠萝各器官蛋白酶活性的影响

比较方法1和方法2两种提取方法对产品酶活性的影响,结果(见表4)表明方法2比方法1优越得多。这在三种器官酶提取中都有满意的效果。

表4 两种抽提方法对菠萝蛋白酶活性的影响
Tab 4 Effects of two extracting methods on the activities of bromelin

器官 Organs	酶平均活性(万单位/g) Average activity of enzyme (ten thousand units/g)			t 测验值 Value of t test
	方法1 Method 1	方法2 Method 2	方法2比方法1增加 Method 2 is higher than method 1 (%)	
果肉 Pulp	31.18	52.81	69.37	2.747**
茎 Stem	31.58	61.23	93.88	4.970**
叶 Leaf	9.80	23.49	139.69	4.879

3. 讨 论

菠萝各器官除根未作测定外,已知都含有蛋白酶。而且菠萝茎蛋白酶在成分、性质、分子一级结构等都与果蛋白酶有差别。菠萝果蛋白酶的两种成分中, FBA 的分子量约23 000, 肽链氨基末端是丙氨酸, 羧基末端是甘氨酸; 而 FBB 分子量约27 000, 氨基末端是丙氨酸, 羧基末端是丝氨酸。菠萝茎蛋白酶中, 六个组分的氨基末端都是缬氨酸, 而其羧基末端则有所不同, 其中 SBA、SBB₁₋₃ 为甘氨酸, SBB₄₋₅ 为丝氨酸^[8]。可见, 茎中六组分分子结构都不同于果中的蛋白酶成分。新近发现茎中的 ananain 和 comosain 在免疫学上既不同于其他茎蛋白酶, 也不同于菠萝果蛋白酶。在底物专一性和抑制特性方面也有明显区别^[14, 15]。果柄是连接茎和果的器官, 其中包含的蛋白酶与茎蛋白酶和果蛋白酶比较有何区别? 叶是生长在茎上的器官, 叶中的蛋白酶是否与茎蛋白酶相同? 这些问题尚待研究。

尽管菠萝各器官蛋白酶有差异, 但在实际生产和生活中都很有应用价值, 因而大量开发这些资源是相当有意义的。我国广东、海南、广西、云南、福建菠萝栽培面积相当大, 每年废弃的菠萝茎、叶、果柄、果皮不计其数, 都是提取菠萝蛋白酶的良好原料。

菠萝蛋白酶是一类较不稳定的酶。提取过程中的每一个工艺步骤都对其产品活性有较大

的影响。尤其是酶复合物浓缩以后活性的保护、酶膏冻结、酶膏干燥方式等更是重要环节。酶膏经-12℃以下冻结后,体积增大,使其干燥时不致于板结,这对酶活性的保持有利。酶膏干燥只能用真空干燥法,绝不应用烘干法。因为酶是蛋白质,对高温敏感。

本研究所采用的方法2是提取菠萝蛋白酶的较好办法,不仅适用于菠萝果蛋白酶的提取,也适用菠萝其他器官蛋白酶的提取。其中所使用的锌离子对酶有激活作用;乙二胺四乙酸根是一种螯合物,可有效地螯合原料中某些重金属离子,以避免其与酶结合而使酶失去活性;抗坏血酸则具有还原性质,分子上的活泼羟基氢可使酶活性中心保持还原状态,从而有效地保护酶活性。虽然方法2要比方法1多加这些化学物质,但这些物质价格不高,用量也不多。加入后活性有较大幅度的提高。这对产品质量有较好的改善,使产品价值增加,从而有较好的经济效益。本研究还发现,硫代硫酸钠、半胱氨酸对酶活性均有保护作用。尤其是硫代硫酸钠+半胱氨酸组合,有极显著的保活效果,在生产上有重要的使用价值。从本试验的结果看,用方法2提取对酶活性的效果比用方法1加还原保护剂的效果好。但若采用方法2再加使用硫代硫酸钠和半胱氨酸保护剂,将会有更好的效果。

参 考 文 献

- 1 陶宙信,谭知敏,黄荣芳. 1982: 药物分析杂志 2(2): 102~103.
- 2 Bilton G L. 1984: *PCT Int. Appl. WO 84 02, 846, 2 Aug.*
- 3 Caygill J C, D T Etherington. 1982: In: *Util. Enzymes Technol. Aliment., Symp. Int. 1982, 419~421. Ed. by Dupuy, Pierre. Tech. Doc. Lavoisier, Paris, Fr.*
- 4 Cooreman W M, S Scharpe, K Demeester, et al. 1976: *Pharm. Acta Helv.* 51(4): 73~97.
- 5 Fogle O R, R F Plimpton, H W Ockerman, et al. 1982: *J. Food Sci.* 47(4): 1113~1118.
- 6 Kim B S, S M Park, S I Choi, et al. 1986: *Han'guk susan Hakhoechi* 19(1): 10~19.
- 7 Omar S, A Z Idrus, O Abdul Razak. 1978: *MARDI Res. Bull.* 6(2): 172~179.
- 8 Ota S, E Muta, Y Katahira et al. 1985: *J. Biochem.* 98: 219~228.
- 9 Ota S, H Umi, E Muta et al. 1975: *J. Biochem.* 78: 627~635.
- 10 Ransberger K, G Stauder. 1989: *Eur. Pat. Appl. EP 309602, 5 Apr.*
- 11 Ransberger K, G Stauder. 1991: *Eur. Pat. Appl. EP 421023, 10 Apr.*
- 12 Ransberger K, G Stauder. 1991: *Eur. Pat. Appl. EP 421022, 10 Apr.*
- 13 Rowan A D, D J Buttle, A J Barrett. 1988: *Arch. Biochem. Biophys.* 267(1): 262~270.
- 14 Rowan A D, D J Buttle. 1989: *Eur. Pat. Appl. EP 313346, 26 Apr.*
- 15 Rowan A D, D J Buttle. 1990: *Biochem. J.* 266(3): 869~875.
- 16 Sugisawa A, M Yamamoto, M Yasuda et al. 1986: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 86, 166, 381, 28 Jul.*
- 17 Taussig S J. 1982: *Erfahrungsheilkunde* 31(8): 646~652.
- 18 Taussig S J. 1984: *Erfahrungsheilkunde* 33(6): 342~348.
- 19 Taussig S J, S Batkin. 1988: *J. Ethnopharmacol.* 22(2): 191~203.
- 20 Taussig S J, J Szekerczes, S Batkin. 1985: *Planta Med.* (6): 538~539.
- 21 Taussig S J, M M Yokoyama, A Chinen et al. 1975: *Hiroshima J. Med. Sci.* 24(2~3): 185~193.
- 22 Tisseau R. 1976: *Fruits* 31(6): 373~378.
- 23 Vallejo-Cordoba B, S Nakai, W D Powrie et al. 1986: *J. Food Sci.* 51(5): 1156~1161.