

# 纳米 TiO<sub>2</sub> 吸附及超滤法 纯化茎菠萝蛋白酶的研究

马超<sup>1,2</sup>, 吴茂玉<sup>2\*</sup>, 乔旭光<sup>1</sup>, 宋焯<sup>2</sup>, 赵岩<sup>2</sup>

(1.山东农业大学食品学院, 泰安 271018; 2.中华全国供销合作总社济南果品研究院, 济南 250014)

**摘要:** 15 ℃下, 利用茎汁质量 3.5% 的纳米 TiO<sub>2</sub> 吸附茎菠萝蛋白酶, 酶吸附率达 98.2%, 用 0.4 mol/L、pH 6.0 的柠檬酸缓冲液洗脱, 酶回收率达 79.3%, 洗脱液先用截留值 50 ku 的超滤膜超滤, 流出液再用截留值 10 ku 的超滤膜超滤, 最后得截留液中茎菠萝蛋白酶的比活力 2393 U/mg 蛋白, 酶回收率为 64.7%, 纯化 5.3 倍, 酶液浓缩 10 倍。

**关键词:** 纳米 TiO<sub>2</sub>; 纯化; 超滤; 菠萝蛋白酶

中图分类号: TS 201.2\*5

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2009)04-0167-04

## Study on purification of stem bromelain by nano-TiO<sub>2</sub> and ultrafiltration

MA Chao<sup>1,2</sup>, WU Mao-yu<sup>2\*</sup>, QIAO Xu-guang<sup>1</sup>, SONG Ye<sup>2</sup>, ZHAO Yan<sup>2</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018;

2. Jinan Fruit Research Institute All China Federation of Supply & Marketing Co-operatives, Jinan 250014)

**Abstract:** At the temperature 15 ℃, 98.2% of stem bromelain activity is absorbed by 3.5% of nano-TiO<sub>2</sub>(by weight). 79.3% of stem bromelain activity is eluted by 0.4 mol/L citrate buffer solution(pH6.0). Ultrafiltration is applied to the elution with a membrane of 50 ku, and the outlet is collected and re-filtrated by a membrane of 10 ku. The specific activity of the remaining solution is 2393 U/mg protein, the activity recovery ratio is 64.7%, purification rate is 5.3. The solution is condensed 10 times in the meantime.

**Key words:** nano-TiO<sub>2</sub>; purification; ultrafiltration; bromelain

菠萝蛋白酶(Bromelain)是从菠萝植株中提取的一类蛋白水解酶的总称, 主要存在于菠萝茎和果实中, 根据提取部位的不同, 分为茎菠萝蛋白酶和果菠萝蛋白酶。茎菠萝蛋白酶主要成分的分子量约为 33000, pI=9.55<sup>[1]</sup>。菠萝蛋白酶广泛用于食品领域、医药工业及化妆品等领域, 有澄清啤

酒、水解蛋白、烧伤脱痂、抗肿瘤消炎等<sup>[2]</sup>功效。长期以来, 人们对菠萝蛋白酶进行了一系列研究, 为菠萝蛋白酶工业的发展奠定了基础。1957年, Heineche 等<sup>[3]</sup>从菠萝茎中提取得到蛋白质水解酶, 从而使菠萝蛋白酶实现商品化生产。

目前, 国内企业生产菠萝蛋白酶的方法主要

收稿日期: 2008-08-07 \* 通讯作者

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金(2006C40038)。

作者简介: 马超(1982—), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品。

有3种<sup>[4]</sup>：高岭土吸附法、有机溶剂沉淀法和超滤法。这3种方法都存在生产工艺复杂，生产周期长，酶液易失活等问题。2000年，李兴等<sup>[5]</sup>用二氧化钛粉末对果菠萝蛋白酶的吸附进行了研究。结果表明，二氧化钛对果菠萝蛋白酶有较理想的吸附效果。二氧化钛用于食品加工过程安全性好，对人体无害，并能耐受0.1 mol/L的NaOH和2 mol/L的HCl的处理<sup>[6]</sup>，有良好的化学惰性。本文采用纳米二氧化钛作为吸附剂纯化菠萝蛋白酶取得了良好效果，并结合超滤技术进一步纯化。超滤过程采用10 ku和50 ku的两级截留方式。先用50 ku的超滤膜超滤，除去较大分子量的杂蛋白。流出液再用10 ku的超滤膜超滤，除去较小分子量的杂质。得到含有较高活性的菠萝蛋白酶。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

菠萝茎：海南果蔬食品配送有限公司。纳米TiO<sub>2</sub>(d≤50 nm)：上海上惠纳米科技有限公司。

### 1.2 主要试剂与仪器

酪蛋白、三氯乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、L-半胱氨酸盐酸盐、考马斯亮蓝G-250、牛血清白蛋白等：分析纯试剂。

KS500型摇床：德国IKA公司；LabofugeA型离心机：德国Heraeus公司；HH-501型恒温水浴锅：德国FLUKO公司；pH422型酸度计：德国赛多利斯公司；752型紫外分光光度计：上海精密科学仪器有限公司；杯式超滤器(300 mL)：北京北方伟业发展公司；聚醚砜超滤膜(10、50 ku，Φ80 mm)：上海摩速科学器材有限公司。

### 1.3 测定方法

1.3.1 酶的提取 菠萝茎在4℃冷室中预冷→组织捣碎机捣碎→粗过滤→离心(4000 r/min、15 min)→上清液中加入纳米TiO<sub>2</sub>搅拌均匀(25 min)→离心(4000 r/min、15 min)→取沉淀用柠檬酸缓冲液洗脱→搅拌(30 min)→离心(4000 r/min、15 min)→取上清液。

1.3.2 酶活测定方法 采用酪蛋白法<sup>[7]</sup>测定酶的活性，在测定条件(pH 7.0，37℃)下，每min水解酪蛋白释出物在275 nm的吸光度与1 μg酪氨酸的吸光度相当时，所需的酶量为一个活力单位。

1.3.3 蛋白含量测定方法 采用考马斯亮蓝G-250法<sup>[8]</sup>测定蛋白含量标准曲线的绘制，方程为： $y=0.0028x+0.0743$ ； $R^2=0.9996$ 。

式中：y为吸光度；

x为蛋白质浓度，μg/mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 纳米TiO<sub>2</sub>吸附菠萝蛋白酶单因素实验

2.1.1 纳米TiO<sub>2</sub>用量对菠萝蛋白酶吸附效果的影响 纳米TiO<sub>2</sub>的用量直接影响吸附效果。用量不足，对酶的吸附不完全；用量过多，增加处理和洗脱难度，浪费资源。

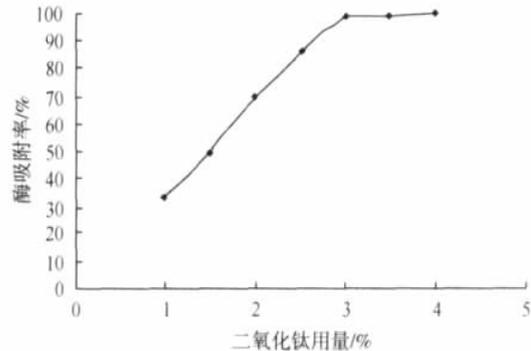


图1 TiO<sub>2</sub>用量对吸附的影响

由图1(温度15℃，pH4.7，吸附20 min)可见，酶吸附率随着纳米TiO<sub>2</sub>用量的增加而提高，当纳米TiO<sub>2</sub>用量为吸附液质量3%以上时，吸附效果趋于稳定，所以其用量应控制在吸附液质量的2.5%~3.5%。

2.1.2 pH对吸附效果的影响 菠萝蛋白酶作为有活性的蛋白质，易受到pH的影响。酶较稳定的pH范围在3.5~4.5<sup>[1]</sup>。

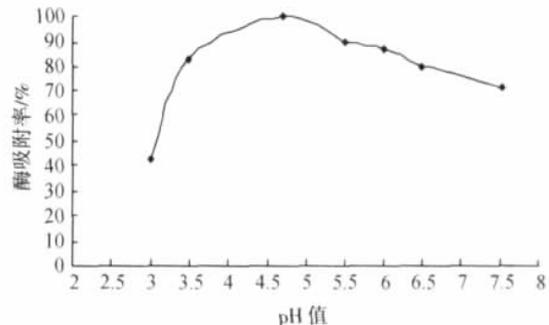


图2 pH值对吸附的影响

由图2(二氧化钛用量为吸附液质量的3%，温度15℃，吸附20 min)可见，随着pH值的增加，酶的吸附率先呈曲线上升趋势，在pH4.7时达到最大，然后开始下降。所以pH应控制在3.5~5.5之间。

2.1.3 温度对吸附效果的影响 菠萝蛋白酶对温度敏感性较大，随着温度的升高，酶活性逐渐降低。当温度高于55℃时，酶的热失活性增强<sup>[9]</sup>，所以吸附过程应在低温下进行。

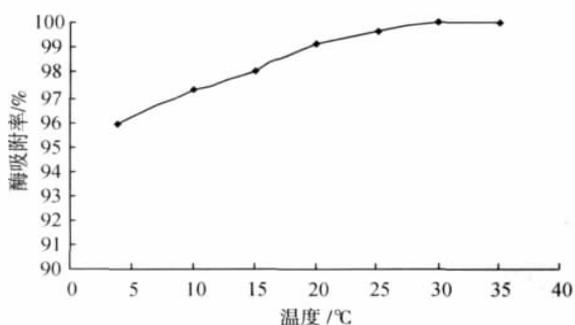


图3 温度对吸附效果影响

由图3(二氧化钛用量为吸附液质量3%, pH 4.7, 吸附20 min)可见, 随着温度的升高, 吸附率逐渐增加, 考虑到酶活性随着温度升高而逐渐下降和温度对吸附率的影响, 吸附温度控制在15~25 °C之间较合适。

2.1.4 吸附时间对吸附效果的影响

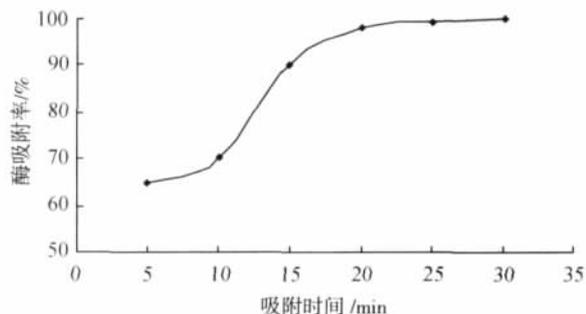


图4 吸附时间的影响

由图4(二氧化钛用量为吸附液质量的3%, pH 4.7, 温度15 °C)可见, 随着吸附时间的延长, 酶吸附率不断增加, 在20 min后, 吸附效果趋于稳定。所以吸附时间控制在15~25 min比较合适。

2.2 纳米 TiO<sub>2</sub> 吸附正交实验

综合纳米 TiO<sub>2</sub> 吸附单因素实验结果, 以纳米 TiO<sub>2</sub> 用量、pH 值、温度、吸附时间为因素, 设计4因素3水平正交实验, 因素水平如表1所示。

表1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	纳米 TiO <sub>2</sub> 用量/%	pH 值	温度/°C	吸附时间/min
	A	B	C	D
1	2.5	3.5	15	15
2	3.0	4.7	20	20
3	3.5	5.5	25	25

由表2可以看出, 4个因素对实验的影响顺序是 A>B>D>C, 即纳米 TiO<sub>2</sub> 用量>吸附液 pH>吸附时间>吸附温度, 理论最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>, 即纳米 TiO<sub>2</sub> 用量为吸附液质量的3.5%, 吸附液 pH 为4.7, 吸附温度15 °C, 吸附时间25 min。据酶吸附率的结果, 直观上看, 8号实验的吸附率最高, 其

表2 实验结果

实验号	因素				活力吸附率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	70.2
2	1	2	2	2	84.2
3	1	3	3	3	75.3
4	2	1	2	3	85.4
5	2	2	3	1	91.0
6	2	3	1	2	88.9
7	3	1	3	2	85.4
8	3	2	1	3	98.2
9	3	3	2	1	87.1
K <sub>1</sub>	76.567	80.333	85.767	82.767	
K <sub>2</sub>	88.433	91.133	85.567	86.167	
K <sub>3</sub>	90.233	83.767	83.900	86.300	
R	13.666	10.800	1.867	3.533	
优方案	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	

实验组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>, 即理论最优组合和实际最优结果相吻合, 所以选组合 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>, 即纳米 TiO<sub>2</sub> 用量为吸附液的3.5%, 吸附液 pH 为4.7, 吸附温度15 °C, 吸附时间25 min。酶吸附率达98.2%。

2.3 洗脱液条件实验

以柠檬酸缓冲液为洗脱液<sup>[5]</sup>, 比较不同的浓度、pH 及洗脱体积对洗脱效果的影响。

2.3.1 柠檬酸洗脱液的不同 pH 值对洗脱效果的影响

图5为0.4 mol/L的柠檬酸缓冲液, 在不同 pH 值条件下洗脱20 min的洗脱效果。

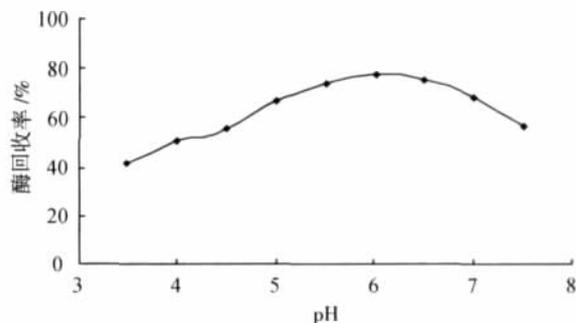


图5 洗脱液 pH 对酶回收率的影响

由图5可见, 酶回收率随着 pH 的增大呈先增大后减小的趋势, 在 pH 6.0 时, 回收率最高, 即当 pH 6.0 时洗脱效果最好。

2.3.2 柠檬酸洗脱液的不同浓度及洗脱时间对洗脱效果的影响

图6为不同浓度柠檬酸洗脱液在不同洗脱时间对洗脱效果的影响。从图6中可以看出, 0.4 mol/L 和 0.5 mol/L 的洗脱效果在洗脱10 min后, 洗脱效果几乎相同。同时, 二者在相同时间内的

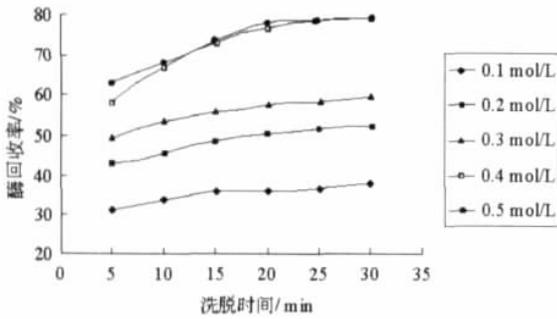


图6 不同浓度洗脱液对酶回收率影响

洗脱效果比 0.1~0.3 mol/L 之间浓度的效果要好, 所以选择 0.4 mol/L 的柠檬酸缓冲液洗脱。

2.3.3 柠檬酸洗脱液的洗脱体积对吸附效果的影响 图7为不同体积柠檬酸洗脱液, 在不同洗脱时间内对洗脱效果的影响。

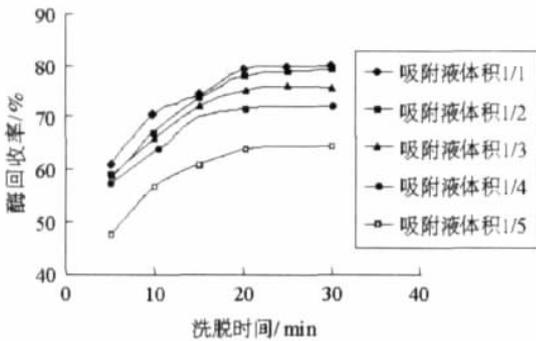


图7 不同洗脱液体积对洗脱效果影响

从图7中可见洗脱液体积为吸附液体积的 1/2 时的洗脱效果与 1 倍体积的很接近, 从进一步纯化的角度考虑, 选择洗脱液体积为吸附液体积的 1/2 进行洗脱。

综合上述洗脱效果, 选择 pH 6.0、0.4 mol/L 的柠檬酸缓冲液作为洗脱液, 洗脱液体积为吸附液的 1/2, 洗脱 30 min, 酶回收率达 79.3%。

### 2.4 超滤结果

表3 纳米 TiO<sub>2</sub> 吸附及超滤纯化茎菠萝蛋白酶的结果

步骤	结果					
	酶液体积/mL	酶活力/(U/mL)	蛋白含量/(mg/mL)	比活力/(U/mg)	纯化倍数	酶回收率/%
菠萝茎榨汁	80	1470	3.25	452		
纳米 TiO <sub>2</sub> 吸附, pH6.0、0.4 mol/L 柠檬酸缓冲液洗脱	40	2332	1.38	1690	3.74	79.3
截留值 50 ku 超滤膜超滤, 收集流出液	35	2246	1.07	2099	4.64	66.8
截留值 10 ku 超滤膜超滤, 收集截留液	8	9511	3.97	2395	5.29	64.7

吸附洗脱后的酶液以超滤法进一步纯化, 在超滤压力 0.06 MPa, 15 °C 下, 先用截留值 50 ku 的超滤膜除去较大分子量的杂蛋白, 再用截留值 10 ku 的超滤膜除去较小分子量的杂蛋白及其他小分子杂质。得到比活较高的菠萝蛋白酶酶液。结果如表3所示。

### 3 结论

采用纳米 TiO<sub>2</sub> 提取茎菠萝蛋白酶, 考察了 TiO<sub>2</sub> 用量、吸附液 pH、吸附温度、吸附时间等因素对活力吸附率的影响, 并采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验对结果进行优化, 获得最佳吸附提取工艺条件为: 纳米 TiO<sub>2</sub> 用量为吸附液的 3.5%, 吸附液 pH 为 4.7, 吸附温度 15 °C, 吸附时间 25 min。此条件下酶吸附率达 98.2%。对吸附后 TiO<sub>2</sub> 用 0.4 mol/L, pH6.0 柠檬酸缓冲液洗脱, 酶回收率达 79.3%。洗脱液经过 50 ku 和 10 ku 两级超滤膜超滤, 浓缩后酶回收率 64.7%, 纯化 5.3 倍, 酶液体积浓缩 10 倍。

实验表明, 纳米 TiO<sub>2</sub> 对菠萝茎榨汁有很好的吸附效果, 并易于洗脱, 洗脱液用超滤方法进一步纯化, 纯化效果比较理想。此方法提取菠萝蛋白酶较单宁提取法、高岭土沉淀法等传统方法有工艺简单、易于操作, 所得酶活力高等优点。

#### 参考文献:

- [1] Murachi T, Yasui M, Yasuda Y. Purification and physicochemical characterization of stem bromelain[J]. Biochemistry, 1964, (3):48-55
- [2] H R Maurer. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001, 58:1234-1245
- [3] Heineche R M, Gortner W A. Stem bromelain: a new protease preparation from pineapple plants[J]. Econ Bot, 1957, 11: 225-234
- [4] 王平诸, 孙君社, 李魁. 菠萝蛋白酶三种生产工艺的比较[J]. 河南化工, 2002, (7):1-3
- [5] 李兴, 林哲甫. 果菠萝蛋白酶用 TiO<sub>2</sub> 多孔陶瓷柱层析结合超滤法纯化的研究. 中国医药工业杂志, 2002, 33(3):121-123
- [6] Miles B J, et al. Process Biochemistry, May 1974:11-13
- [7] 施特尔马赫, 钱嘉渊. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992
- [8] George R, Schaeferle, et al. Analytical Biochemistry, 1973, 51:654-655
- [9] 章佩芬, 陈敏华, 郭利平. 菠萝蛋白酶应用的性质研究. 广州食品工业科技, 2003, 18(2):16-17