

木瓜蛋白酶在亲和双水相系统中的 分配行为及机制研究进展

张海德*, 王伟涛, 蒋欣欣

(海南大学食品学院, 海口 570228)

摘要: 本文查阅相关文献, 对木瓜蛋白酶传统提取方法(超滤法、盐析法、有机溶剂法、亲和层析法)及一些新兴的提取方法如双水相萃取法、亲和双水相法作了简要综述。利用金属螯合亲和双水相分配系统, 能有效获得高纯度木瓜蛋白酶, 但木瓜蛋白酶与亲和成相剂的相互作用及其分配行为与机制尚不清楚。研究木瓜蛋白酶与不同金属离子亲和成相剂之间的相互作用和吸附动力学模型; 对酶的亲和结合物进行物理表征和分子模拟。阐明木瓜蛋白酶与不同金属离子亲和成相剂之间的亲和作用原理。将双水相萃取技术和亲和分配技术相融合, 提出基于木瓜蛋白酶的金属螯合亲和双水相分配技术, 该技术有望大力推动木瓜蛋白酶工业化高效制备的发展。

关键词: 木瓜蛋白酶; 亲和双水相分配系统; 分配行为

Progress on the study of mechanism and partition behavior of papain in affinity aqueous two-phase systems

ZHANG Hai-De*, WANG Wei-Tao, JIANG Xin-Xin

(College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

ABSTRACT: The separation methods of papain such as ultrafiltration, salt deposition, solvent extraction, affinity chromatography, aqueous two - phase extraction, affinity aqueous two-phase extraction and so on are evaluated. High purity papain can be expected to obtain by metal chelating affinity aqueous two-phase system (ATPS) technology, but the mechanism and partition behavior of papain in this system are not clear. It is important to study the interactions between papain and different metal ion affinity phase-separating agent, the adsorption kinetics model of papain in ATPS and the physical structure characterization and molecular simulation of the enzyme affinity adsorbent. Metal chelating affinity ATPS technology based on papain separation, will vigorously promote the development of papain industrialization and it has stimulative effect on the development of aqueous two-phase extraction technology.

KEY WORDS: papain; affinity aqueous two-phase systems; partition behavior

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260401)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260401)

*通讯作者: 张海德, 教授, 主要研究方向为农产品加工。E-mail: zhanghaide@163.com

*Corresponding author: ZHANG Hai-De, Professor, College of Food Science, Hainan University, No.38, Renming Road, Meinan District, Haikou 570228, China. E-mail: zhanghaide@163.com

1 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、云南和台湾等省区,近年来,随着人们对番木瓜的需求量增大,种植番木瓜经济效益的提高,其种植面积也在逐步扩大。从番木瓜中提取木瓜酶是番木瓜种植户的主要经济来源之一。木瓜蛋白酶(EC3.4.22.2)存在于番木瓜未成熟果实的乳液中,乳液是通过切割果实的颈部进行收集,风干后制得粗木瓜酶制品。番木瓜收割乳汁后,并不影响果实的食用及商品价值,粗木瓜酶的生产是番木瓜产业中主要的副产业,效益显著。木瓜蛋白酶是由212个氨基酸残基组成的蛋白质单链,具有耐高温、稳定性好、蛋白质水解能力强等特征^[1],在食品、医药等领域有广泛的应用^[2]。由于木瓜蛋白酶与木瓜粗酶中的其他蛋白酶的理化性质十分相似,分离纯化较为困难,使得高纯度的木瓜蛋白酶价格昂贵。又由于在粗酶中各酶的催化性质有异,不利于其在一些要求较高的精细化学反应中应用,在医药、食品添加剂等领域,高品质的木瓜蛋白酶基本上靠进口。现有工业化制备木瓜蛋白酶技术存在工艺繁琐,产品纯度不高,产品酶活性不稳定,很难规模化生产等不足,不能达到现代工业的需求^[2],因此,人们有必要进行高纯度木瓜蛋白酶制备新方法的研究,特别是对木瓜蛋白酶新型分离方法的分离行为及机制的研究非常紧迫。

2 国内外研究现状及发展动态分析

2.1 木瓜蛋白酶传统提取方法进展

提取木瓜蛋白酶的传统方法主要有:超滤法、盐析法、有机溶剂法、亲和层析法等。

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,如果要分离的两种产品的分子量相差不大则无法用超滤进行分离,而木瓜粗酶中存在的几种蛋白酶分子量相差并不大。

盐析沉淀法在许多蛋白酶初步纯化阶段常用的方法。王丽彬等^[3]采用硫酸铵分级沉淀、Sephadex C-50 色谱柱分离,从番木瓜乳汁中分离纯化得到木瓜蛋白酶。结果获得比活为1184 U/mg的纯酶,活力回收率为55.79%。乙引等^[4]对番木瓜未成熟果实乳

汁进行真空干燥、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀和 Sephadex 50 柱层析,分别得到木瓜蛋白酶的粗酶、精酶和纯化酶,可用于不同的工业用途。但这些方法制备的酶比活力并不高,而且制品含有硫酸铵恶臭气味,不脱盐无法符合食品级酶的要求。

有机溶剂沉淀法具有分辨率高的特点,也是蛋白酶初步纯化的常用方法。任国梅等^[5]用四种不同的有机溶剂提取法进行试验,摸索出木瓜蛋白酶纯化工序。但工艺步骤较多,且有机溶剂会破坏蛋白质的氢键易引起酶变性失活。万婧等^[6]采用乙醇作为提取剂对番木瓜中木瓜蛋白酶进行提取,并通过紫外法测定其酶活性。旨在对有机溶剂沉淀法制备木瓜蛋白酶的影响因素做较全面的研究,但得到的酶活回收率并没有显著的提高,且工艺过程较复杂。

亲和层析是20世纪60年代发展起来的一种高效快速分离纯化蛋白质的技术。Fatima等^[7]利用偶联于固相载体上的亲和配基对木瓜蛋白酶的亲和作用来分离和纯化木瓜蛋白酶,该法提取的木瓜蛋白酶虽纯度较高,但是操作复杂,不易工业放大生产,且用于亲和层析的前处理液需是经过初步纯化的酶液。何智妍等^[8]以包裹壳聚糖的尼龙膜为基质,通过环氧氯丙烷交联活化、亚氨基二乙酸偶联、金属镍离子螯合制备亲和层析膜,对其色谱性能和再生性进行探讨,优化出木瓜蛋白酶最佳吸附条件。此法为亲和双水相法成相剂的制备提供了思路,制备金属螯合双水相成相剂是可行的。Su等^[9]用活性蓝染料作为配体的亲和膜技术吸附分离木瓜蛋白酶,使用响应面分析法对操作参数进行优化,确定了最佳吸附条件。此方法能够从水溶液中快速分离木瓜蛋白酶,纯化倍数较高,但需要用1.0 mol/L NaCl溶液在碱性条件下进行解吸附,对酶活性会有一定的抑制影响。

因此,现有的纯化木瓜蛋白酶的方法都存在一些问题,有必要寻找制备高纯度高活性木瓜蛋白酶的新方法。

2.2 双水相萃取技术在木瓜蛋白酶提取中的应用进展

双水相萃取技术是近年出现的、极有应用前途的新型生物化工分离技术,特别适用于生物物质的分离和提纯。近年来,双水相法萃取木瓜蛋白酶已经引起了人们的注意,国内外都有相关的报道。

涂绍勇等^[10]对 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相系统提取木瓜蛋白酶进行了研究。得到双水相体系最佳条件为 PEG600 27%, (NH₄)₂SO₄ 21%, pH 7.0 和温度 60 °C。曹对喜等^[11]建立 PEG/(NH₄)₂SO₄ 体系提取木瓜蛋白酶。探讨了 PEG 分子量、PEG 质量分数、(NH₄)₂SO₄ 质量分数、pH 值以及粗酶添加量对木瓜蛋白酶萃取效果的影响, 酶活回收率为 89.30%, 纯化倍数 2.02。李明亮^[12]采用双水相体系从木瓜粗酶中分离纯化木瓜蛋白酶, 确定了最佳的双水相萃取条件, 还利用氨基载体和壳聚糖小球对富集到 PEG 相中的木瓜蛋白酶进行“原位固定化”以回收酶蛋白, 获得了高的固定化率(>90%)和酶活回收率(>40%)。Kubni 等^[13]初步探索了双水相体系对木瓜蛋白酶的萃取效果, 指出其构建的双水相体系分离得到的木瓜蛋白酶中仍然有木瓜凝乳蛋白酶的污染。Nitsawang 等^[14]对比研究了双水相萃取法与两步盐析法对木瓜蛋白酶的纯化效果, 采用 8% PEG/15% (NH₄)₂SO₄ 双水相体系分离纯化木瓜蛋白酶的纯度较两步盐析法高, 并减少了提取时间, 但未对双水相体系进行系统的优化。Ling 等^[15]将活性染料 Reactive Red 120 添加到 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相系统中, 对木瓜蛋白酶分配的成相条件进行了优化, 木瓜蛋白酶的分配比为 1.92, 得率为 50.09%。但是, 体系中加入的游离亲和染料 Reactive Red 120 对木瓜蛋白酶的分配没什么影响。Azarkan 等^[16]对番木瓜中存在的木瓜酶种类、含量及分离技术进行了综述, 还介绍了离子交换、共价亲和和层析等方法在木瓜酶分离纯化中的应用。

以上研究表明, 双水相法制备的木瓜蛋白酶活力较高, 但产品中仍然存在木瓜凝乳蛋白酶等的污染, 纯度达不到某些领域应用的要求, 并且研究多集中在纯化工艺方面, 即使是相同的双水相系统(例如: PEG/(NH₄)₂SO₄), 不同的学者优化的工艺结果也不一致, 对木瓜蛋白酶的分配行为及规律缺乏理论解释, 无法计算和指导纯化木瓜蛋白酶的过程设计和工程放大。因此, 寻找一种新型、高效的高纯度木瓜蛋白酶制备的双水相分离方法, 是目前亟待解决的问题, 而亲和双水相萃取技术正是在这一背景下提出的。

2.3 亲和双水相法分离木瓜酶的相关研究进展

本实验室进行了亲和双水相法分离木瓜蛋白酶的相关研究, 万婧等^[17]通过双水相法、乙醇法、超滤

法三种提取方法的比较研究, 确定各提取工艺的最佳参数以期获得具有理想酶活的木瓜蛋白粗酶, 并研究亲和双水相法较传统工艺提取木瓜蛋白酶的优劣性, 发现亲和双水相法较传统工艺提取木瓜蛋白酶具有高分配比和回收率。何继芹等^[18]对亲和层析法、超滤膜分离法、沉淀分离法、溶剂萃取法、双水相萃取法等分离提取木瓜蛋白酶的方法进行了评述, 木瓜蛋白酶的产率、活性及应用性与其分离方法相关, 指出今后需深入进行木瓜蛋白酶的亲和双水相萃取等新型分离方法的理论研究。

亲和双水相法在其他蛋白酶的分离领域已经有一些研究, 主要集中在相系统操作条件的优化和亲和配体的选择方面。Teotia 等^[19]用丙烯酸树脂、海藻酸钠聚合物作为生物配体, 在聚乙二醇/盐双水相体系中分离木聚糖酶、支链淀粉酶。Xu 等^[20]用三嗪染料作为亲和配体, 在聚乙二醇/羟丙基淀粉(聚醚砜)和聚乙二醇/磷酸盐双水相系统中进行 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和己糖激酶的分离, 对影响的各种参数进行了优化。Ekblad 等^[21]用抗生物素蛋白作为亲和配体, 在水溶液聚乙二醇/葡聚糖两相系统中分离生物素(酰)化的脂质体。这些方法显示使用大分子固定化或者非固定化的亲和配体可用于双水相萃取系统中, 而金属离子螯合固定化后作为亲和配体, 研究很少, 关于木瓜酶亲和分配的理论研究方面也很少。

2.4 双水相系统中蛋白酶的分配行为研究进展

国内外学者对于双水相系统中其他蛋白酶的分配行为的研究, 有一些报道, 对本项目的研究有一定的启发。Mirjana 等^[22]研究了果胶酶在 PEG/Na₂SO₄ 双水相系统中的分配行为, 采用响应面设计方法建立了统计学模型, 来预测果胶酶分配比与双水相成相剂的关系, 证实响应面设计分析方法可用于双水相系统这样的复杂体系的实验统计模型建立。Selber 等^[23]探讨了数学模型的建立, 对双水相系统中相系统的选择和分离过程的优化是有效的。陆瑾等^[24]利用简洁的亲和分配模型对纳豆激酶在双聚合物亲和分配体系中(PEG/PES 以及 EOPO/PES)的实验数据进行了关联, 计算值与实验值符合较好。然而, 与不断涌现的双水相分配实验数据形成鲜明对比, 双水相分配的理论探讨工作显得十分薄弱。

关于蛋白质与亲和配基间相互作用的关系, 目前主要有两类模型来表达: ①基于非均质晶格理论

(heterogeneous lattice theory)的表达^[25], ②基于多元平衡形式(multiple-equilibria formalism)的表达^[26]。亲和分配行为受多种因素的影响,甚为复杂,目前还没有一套完整的理论和方法来解释和预测物质在双水相体系中的分配行为,而最佳的操作条件必须经过实验来确定,所以,对于很多物质在双水相体系的分配现象还难以从理论上解释。纵观已有的亲和分配模型,并没有合适的便于推导木瓜蛋白酶在亲和双水相系统中的分配行为。由于缺乏必要的理论指导,对很多组分在双水相体系中的分配还不能进行有效的计算和预测,有关双水相体系及物质分配的基础数据非常缺乏,严重阻碍了使该技术的实际应用。

3 展望

通过国内外的研究表明,双水相萃取木瓜蛋白酶已经引起了人们的注意,但在亲和双水相萃取木瓜蛋白酶方面研究较少,本课题组通过多年的研究,以番木瓜果中木瓜蛋白酶为研究对象,通过对其进行亲和双水相萃取的分离研究,发现亲和双水相萃取木瓜蛋白酶有较好的实验预期,有可能是解决高纯度、高活力木瓜蛋白酶制备的有效方法,并取得了一些成果^[27]。但如何解释和预测木瓜蛋白酶在亲和双水相体系中的分配行为,特别是木瓜蛋白酶的分配与亲和成相剂的相互作用,目前还不清楚。

所以,制备一种新型的木瓜蛋白酶分离材料-以金属离子为配基的亲和成相剂,探讨木瓜蛋白酶在固定金属离子亲和成相剂上的吸附行为,建立亲和分配模型,对亲和双水相体系中木瓜蛋白酶的亲和分配数据进行关联。明确亲和成相剂与木瓜蛋白酶结合物的物理结构,阐述木瓜蛋白酶与不同金属离子亲和成相剂之间的亲和作用,阐明木瓜蛋白酶在此双水相体系中的分配行为及机制,将对高纯度、高活力木瓜蛋白酶的制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,具有明显的应用前景。

参考文献

- [1] 江国兴. 番木瓜的综合利用概况[J]. 资源开发与保护, 1991, 6(3): 162.
Jiang GX. Research progresses in the comprehensive utilization of *Carica Papaya* [J]. Resour Develop Conserv, 1991,6(3):162.
- [2] 凌兴汉, 吴显荣. 木瓜蛋白酶与番木瓜栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] Ling XH, Wu XY. Papain and *Carica papaya* cultivation[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [3] 王丽彬, 张戎, 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, 2006,31 (3): 25-27.
Wang LB, Zhang T, Wang M. Purification and characterization of high purity papain from *Carica papaya* [J]. Chin J Biochem Pharm, 2006, 31(3): 25-27.
- [4] 乙引, 张显强, 唐金刚, 等. 木瓜蛋白酶的纯化和性质[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2002, 43(1): 45-48.
Yi Y, Zhang XQ, Tang JG, *et al.* Purification and characterization of papain [J]. J Guizhou Normal Univ (Natur Sci), 2002, 43(1): 45-48.
- [5] 任国梅, 陈孜, 黎婉玲, 等. 高质量木瓜蛋白酶纯化工艺研制探讨[J]. 药物生物技术, 1997, 4(4): 23-25.
Ren GM, Chen Z, Li WL, *et al.* Study of purification methods for high quality papain[J]. Pharm Biotechnol, 1997, 4(4): 23-25.
- [6] 万婧, 张海德, 韩林. 乙醇提取海南番木瓜中木瓜蛋白酶的工艺研究[J]. 食品科技, 2010,35 (3): 222-226.
Wan J, Zhang HD, Han L. Technical study of extract of protease in Hainan papaya with ethanol [J]. Food Sci Technol, 2010, 35(3): 222-226.
- [7] Fatima D, Arvind L. Purification of papain by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) on chelating carboxymethyl cellulose [J]. Biotechnol Tech, 1999, 13 (1) :38-41.
- [8] 何智妍, 聂华丽, 周毓婷, 等. 金属螯合膜的制备及其对木瓜蛋白酶的分离纯化[J]. 膜科学与技术, 2009, 29(5): 74-78.
He ZY, Nie HL, Zhou YT, *et al.* Preparation of metal ion affinity membranes and their applications on isolation and purification of papain [J]. Membr Sci Technol, 2009, 29(5): 74-78.
- [9] Su SN, Nie HL, Zhu LM, *et al.* Optimization of adsorption conditions of papain on dye affinity membrane using response surface methodology [J]. Bioresour Technol, 2009, 100: 2336-2340.
- [10] 涂绍勇, 李路, 杨爱华, 等. 双水相萃取法提取木瓜蛋白酶的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 22(9): 18-23.
Tu SY, Li L, Yang AH, *et al.* Study on the extraction of papain with aqueous two-phase system[J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 22(9): 18-23.
- [11] 曹对喜, 杜征, 韩玉婷, 等. 双水相萃取法提取木瓜蛋白酶的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2010, (10) : 21-23.
Cao DX, Du Z, Han YT, *et al.* Purification of papain by aqueous two-phase extraction[J]. Acad Period Farm Prod Proces, 2010, (10) : 21-23.
- [12] 李明亮. 木瓜蛋白酶的双水相分离纯化、原位固定化及其应用研究[D]. 华东理工大学, 2011.
Li ML. Aqueous two-phase purification, in situ immobilization and application of papain[D]. East China Univ Sci Technol,

- 2011.
- [13] Kuboi R, Wang WH, Komasa I. Effect of contaminating Proteins on the separation and Purification of Papain from Papaya latex using aqueous two Phase extraction [J]. Kagaku Kogaku Ronbunshu, 1990, 16(9): 772.
- [14] Nitsawang S, HattiKaul R, Kanasawud P. Purification of papain from Carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation [J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 39(5): 1103-1107.
- [15] Ling YQ, Nie HL, Su SN. *et al.* Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology [J]. Sep Purif Technol, 2010, 73(3): 343-348.
- [16] Azarkan M, Moussaoui AEI, Wuytswinkel Van D, *et al.* Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of Carica papaya [J]. J Chromatogr B, 2003, 790 :229-238.
- [17] 万婧. 番木瓜中木瓜蛋白酶的提取工艺研究[D]. 海南大学, 2010 .
Wan J. The technical study of extract of protease in papaya [D]. Hainan University, 2010.
- [18] 何继芹, 张海德. 木瓜蛋白酶的分离方法及其应用进展[J]. 食品科技, 2006, 15(10): 66-69.
He JQ, Zhang HD. Development of separation methods and applications of papain [J]. Food Sci Technol, 2006, 31(10): 66-69.
- [19] Teotia S, Lata R, Gupta MN. Free Polymeric bioligands in aqueous two-phase affinity extractions of microbial xylanases and pullulanase [J]. Protein Expres Purif, 2001, 22(3): 484-488.
- [20] Xu Y, Vitolo M, Northfleet AC, *et al.* Affinity partitioning of glucose-6-phosphate Dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase systems with free triazine dye ligands [J]. J Chromatogr B, 2002, 780(1): 53-60.
- [21] Ekblad L, Kernbichler J, Jergil B. Aqueous two-phase affinity partitioning of biotinylated liposomes using neutral avidin as affinity ligand [J]. J Chromatogr A, 1998, 815(2): 189-195.
- [22] Mirjana A, Radovan O. Pectinase partitioning in polyethylene glycol 1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system: statistical modeling of the experimental results [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2009, 32: 235-240.
- [23] Selber K, Nellen F, Steffen B, *et al.* Investigation of mathematical methods for efficient optimization of aqueous two-phase extraction [J]. J Chromatogr B, 2000, 743: 21-30.
- [24] 陆瑾. 温度诱导双水相金属螯合亲和分配技术的研究[D]. 浙江大学, 2004.
Lu J. Study on a novel separation technology combining metal chelating affinity partitioning and temperature-induced phase separation with aqueous two-phase partitioning [D]. Zhejiang University, 2004.
- [25] Carlsson M, Linse P, Tjerneld F. Partitioning in aqueous polymer two-Phase systems: modeling of affinity partition [J]. Bioseparation, 1995, 5: 155-166,
- [26] Suh SS, Arnold FH. A mathematical model for metal affinity protein partitioning [J]. Biotechnol Bioeng, 1990, 35: 682-690,
- [27] 张海德, 李从发, 廖宇兰, 等. 亲和双水相萃取番木瓜中木瓜蛋白酶的研究[Z]. 国家科技成果, 2009-4-7.
Zhang HD, Li CF, Liao YL, *et al.* Study of aqueous two-phase affinity extract of protease in papaya [Z]. National Sci Technol Achieve, 2009-4-7.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张海德, 教授, 主要研究方向为农产品加工。

E-mail: zhanghaide@163.com