

# 木瓜蛋白酶的开发与应用

吴显荣

(中国农业大学生物学院,北京 100094)

**摘要** 本文总结了近年来我校木瓜蛋白酶的研究及应用进展。1)对国产木瓜乳汁粗酶进行了分离与纯化,得到了重结晶的木瓜蛋白酶和木瓜凝乳酶,结晶分别为柱状和针状;2)为了提高木瓜蛋白酶活性检测的准确性,增强国际市场的竞争能力,采用紫外分光光度法,茚三酮显色法及BAEE法对国内外不同来源的木瓜蛋白酶进行了比较,找出以上3种方法的最适反应条件,提出了在工农业生产中的应用途径;3)在研制木瓜蛋白酶的基础上,利用酶工程方法,制备了纤维素固定化木瓜蛋白酶和琼脂固定化木瓜蛋白酶,增强了酶的热稳定性及保存性,用于啤酒生产可以提高防浊效果、增进氨基酸营养;4)与广州园艺公司、广州酶制剂厂及前进食品厂等合作,进行了木瓜蛋白酶的系列产品开发,陆续研制出国产嫩肉粉、啤酒澄清剂、饼干松化剂、饲料添加剂等新产品,在食品工业和饲料工业中获得了较好的效益。

**关键词** 木瓜蛋白酶;木瓜凝乳酶;固定化酶;嫩肉粉

**中图分类号** Q 841.1; Q 841.9; S 667.9; TS 201.25; TS 262.5 **文章编号** 1007-4333(2005)06-0011-05 **文献标识码** A

## Research and application of papain

Wu Xianrong

(College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Papaya (*Carica papaya* L.) is a herbaceous dicotyledon species of Caricaceae. There are many resources of papaya in China south provinces, but they are not well developed. In some areas, papaya is just used as feed of pig. For a better utilization of Chinese papaya resources, research on papain extraction and application began in 1984, and developed following for the need of papain on the market. 1) In 1984, the papain was isolated and purified. Guangzhou Horticulture Company prepared the crude extract powder of papain, which was purified in our laboratory. Ten elution peaks were identified through CM-cellulose column chromatography. Peaks No. 1 to No 4 did not induce protease activities. Peaks No. 5 to 9 possessed chymopapain A and B, containing 65% of total protein amount and 54% of total enzyme activity. The M. W. of chymopapain A was 28.8 kD and contained 0.5% of total protein, which mainly existed in peak 5. Chymopapain B, having a M. W. of 24 kD in peaks 6 to 9. Peak 10 was papain. It contained 17% of total protein amount and approximately 46% of total enzyme activity. Thus, it is obvious that at least 82% of total proteins in crude extract powder of papaya are protein hydrolase. After fractionation, recrystallized papain and chymopapain could be identified. Crystal forms are columnar and acicular. 2) The bioassay of papain activity was conducted using three different methods: UV spectrometry, ninhydrin reaction and BAEE (N-benzoyl-L-arginine ethyl ether) detection. These methods were used to compare the quantity of papain activity from different sources. The results showed that the utilization of UV spectrometry method was simpler, cheaper and more suitable than the purification procedures of enzyme activity, papain quantification and industrial production and food enzymes. The Ninhydrin reaction method was relatively complicated, but required simple equipment, affordable in non-developed areas. BAEE detection had a good stability and reproducibility, which corroborated with theoretically research on enzymatic characteristics and determined the activity of reagent enzymes. 3) The immobilization of papain: Cellulose immobilized papain —Car

收稿日期: 2005-10-12

作者简介: 吴显荣,教授,博士生导师,主要从事生物化学和酶学研究。

boxylmethyl cellulose immobilized papain (CMCP) was produced by the azide method. The results showed that the optimum pH scale of CMCP moved 0.5 unit towards basic range compared to free enzyme. CMCP has higher thermostability. Being processed at 60 °C for three hours, the activity of CMCP almost retained and revealed good reproducibility. After 127 days at 4 °C, CMCP activity still remained 60%, whereas, the enzyme-free group (control) lost its whole activity. Concerning CMCP Filling into column, at 40 °C, eluted solution collection for turbidimetry and amino acid amount analysis, the results showed that CMCP had a special effect on beer anti-turbidity, which could hydrolyze beer proteins and increase amino acid concentration in beer. Agar immobilized papain —The thermostability of agar-immobilized papain increased notably with ABSE-cross-linking agar as carriers. Its  $K_m$  value was  $2.13 \times 10^{-3} M^{-1}$  and optimal pH range was 8.3—8.5 that moved 0.3—0.5 unit towards the base. Stored in 60 °C for 2 hours, its activity remained over 98%. After 90 days conservation, its activity lost was no more than 15%. Agar-immobilized papain was effective on beer anti-turbidity. Using batch-tank reactor to process beer is simple and cheap. Consecutive enzymatic column has continuous reaction and higher automation, its reaction degrees can be controlled by flux rate at all times. But, the half-life of enzymatic column is short and needs to be activated frequently. After ten-hour continuous reaction, the activity decreased to 60.72%. Cleaning and activation resulted in 90% activity recovery. In large-scale beer production, immobilized enzyme can be directly added into fermentive fluid in or after saccharifying, or combined to fluidized bed reactor to control the reactive progression by time and flux rate when fermentive fluid pass through. 4) The application of papain was entreprised in 1984. Our laboratory co-operated with Guangzhou Horticulture Plant Protein Food Manufactures and developed a series of techniques in papain application. In 1985, this research work was awarded the national technical appraise organized by Guangzhou Scientific Committee. The project, entitled Comprehensive Utilization of Papain, was brought into line with the state plan, and continued in products developing. In December 1988, this work won the First National Award for Application and Dissemination. The former production of papain in our country only diversified in small workshops with backward techniques and bad quality. In recent years, with the application of self-made far infra-red desiccator and advanced vaccum freezing-dryer, five kinds of papain powders and reagents of international standard quality are nowadays produced in large-scale. Upon the above mentioned, we developed papain series products including meat tendering powder, beer clarifier, cake loosing powder, feed additives, etc., which were widely applied in food and feed processing industries and gained good profit.

Key words papain; chymopapain; immobilized papain; meat tenderizer

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 为番木瓜科草本植物。其鲜果可以做果酱、果脯、饮料和罐头食品; 从其青果乳汁中提取的木瓜蛋白酶粗制品, 内含多种蛋白酶, 有很强的分解蛋白质能力, 并且有水解酰胺键和酯键的特性, 广泛应用于医药、食品、纺织、制革、饲料及染料等工业<sup>[1-2]</sup>, 目前国际市场对木瓜蛋白酶的需要量很大, 每年约需 650 t, 但世界生产量现只有 450 t, 不能满足需要, 因此价格日渐上升。

根据本课题组多年的调查研究, 我国南方广东、广西、海南、云南、福建、四川、贵州及台湾等省有广泛的番木瓜资源, 但尚未加以充分利用, 有的只用作喂猪, 是极大的浪费。木瓜蛋白酶是 100% 的天然物质, 因此, 在食品及饮料工业上有独特的广阔发展前途。为了充分利用我国丰富的番木瓜资源, 开发我国西南部山区的经济, 在国家科委、农业部、广东省及广州市科委的领导下, 我们从 1984 年开始, 与广州市园艺公司合作, 进行了木瓜蛋白酶的提取和

应用研究, 开发了国产木瓜蛋白酶的多项应用途径。本文综合叙述了这一时期工作的结果。

## 1 木瓜蛋白酶的分离与纯化

1984 年起, 广州园艺公司投资, 建立了广州园艺植物蛋白食品厂和酶制品厂, 用冷冻干燥等方法制备了木瓜蛋白酶粗粉, 然后由我校实验室进行分离纯化。

经过 CM-纤维素层析分离, 可得到 10 个洗脱峰 (图 1)。经分析鉴定, 前 4 个峰没有蛋白酶活性, 约占总蛋白含量的 17.6%; 峰 5~9 含有木瓜凝乳酶 A 和 B 等<sup>[3]</sup>, 其蛋白含量占总蛋白的 65%, 活性占 54%。其中木瓜凝乳酶 A 分子量为 28.8 kD, 约占总蛋白的 0.5%, 主要存在于峰 5 中; 木瓜凝乳酶 B 分子量为 24.0 kD, 存在于峰 6~9 中; 峰 10 为木瓜蛋白酶, 占总蛋白的 17%, 酶活性约占 46%。说明, 在木瓜蛋白酶粗粉中至少有 82% 的蛋白质是蛋

白质水解酶。

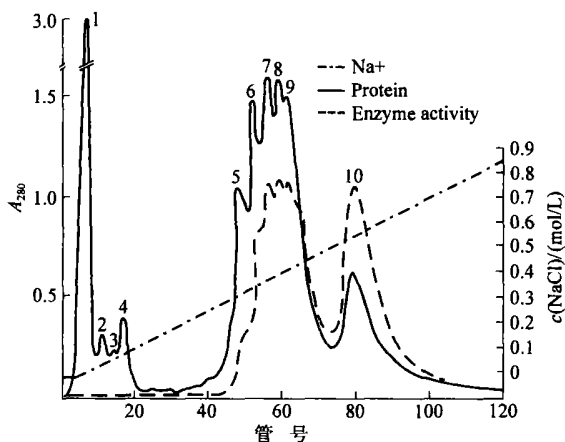


图 1 木瓜乳汁提取物 CM-纤维素分离图

Fig. 1 Chromatography of crude papaya latex on CM-cellulose (column 1.8 cm ×28 cm)

木瓜蛋白酶粗粉通过分级分离,可以分别得到重结晶的木瓜蛋白酶和木瓜凝乳酶,结晶为柱状和针状(图 2、3)。

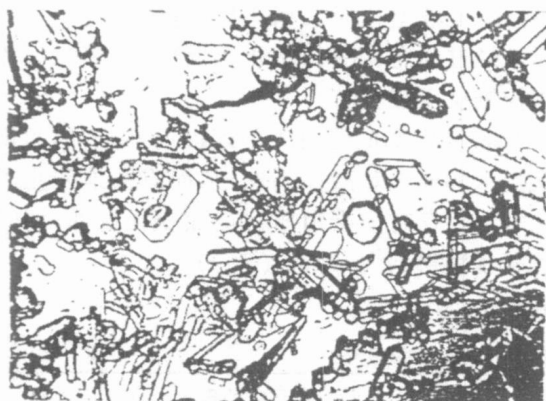


图 2 重结晶木瓜蛋白酶的显微照片 (3.2 ×2.5)

Fig. 2 Photomicrograph of recrystallized papain (3.2 ×2.5)

## 2 木瓜蛋白酶活性测试方法

目前我国南方已有一些植物蛋白酶工厂,但在生产中,木瓜蛋白酶的质量检测,特别是酶活性检测的方法、条件和标准还比较混乱,使产品保存、销售受到严重影响。为了提高木瓜蛋白酶活性检测的准确性、增强国际市场的竞争能力,我们分别采用以酪蛋白为底物的紫外分光光度法<sup>[4]</sup>、茚三酮显色法及 BAEE(苯甲酰-L-精氨酸-乙酯)法,测定不同来源(美国 Sigma 公司,德国 Merck 公司和广州产品)的木瓜蛋白酶活性,找出了不同测试方法的最适反应条件,改进完善了测试方法。

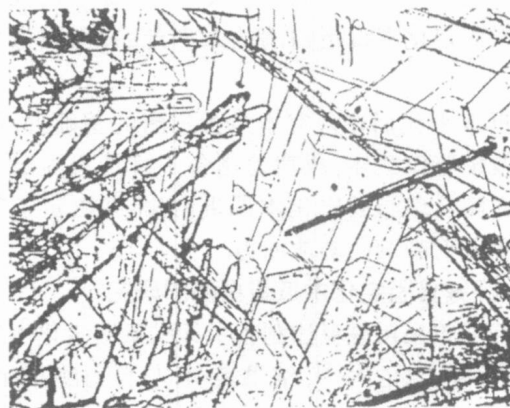


图 3 重结晶木瓜凝乳酶的显微照片 (3.2 ×2.5)

Fig. 3 Photomicrograph of recrystallized chymopapain (3.2 ×2.5)

结果显示,以酪蛋白为底物的活性温度为(37 ± 0.1),酶反应时间为 10 min;以 BAEE 为底物的活性测试温度为(25 ±0.1),酶反应时间为 32 min (表 1)。

表 1 不同测定方法木瓜(干粉)蛋白酶活性比较

Table 1 Comparison of papain activity by different methods

样品号	木瓜蛋白酶来源	酪蛋白为底物		BAEE 为底物
		紫外分光光度法	茚三酮显色法	紫外分光光度法
1	美国 Sigma 3250	760 ±4	815 ±7	1.17
2	Sigma 3375	971 ±3	1 056 ±5	2.54
3	Sigma 4762	3 841 ±7	3 982 ±8	12.70
4	德国 Merck	926 ±5	974 ±4	2.20
5	广州 1 号	309 ±5	345 ±2	0.55
6	广州 2 号	772 ±6	973 ±4	1.21

以上测定木瓜蛋白酶活性 3 种方法各有特点:以酪蛋白为底物的紫外分光光度法操作简便,成本低,适于酶纯化过程中的活性比较、系列产品的酶活性测定;茚三酮显色法虽操作烦琐,但所需仪器简单,在条件简陋的地区也可以用;BAEE 法反应稳定、重复性好,适于酶学性质的理论研究和试剂酶的活性测定。

## 3 木瓜蛋白酶的固定化研究

固定化酶是近代生物技术的重要手段,利用不同载体制备固定化木瓜蛋白酶,可以大大节约用酶,并能反复利用。

目前国外已开始酿造、牛奶加工等多种领域

中广泛应用。我国在这一领域尚处于试验阶段。大力开发固定化木瓜蛋白酶的系列产品,已成为当务之急。

近年来我们在研究木瓜蛋白酶的基础上,用纤维素及琼脂作载体,成功地制备了纤维素固定化木瓜蛋白酶及琼脂固定化木瓜蛋白酶,并测定了其营养价值及对啤酒的防浊能力。

### 3.1 纤维素固定化木瓜蛋白酶的研究

我们曾采用叠氮法制备了纤维素固定化木瓜蛋白酶(简称CMCP)<sup>[5]</sup>,结果表明,与自由酶相比较,CMCP的最适pH向碱性范围移动0.5个单位。CMCP具有高度的热稳定性,60℃处理3h,活性几乎未下降,而且表现了良好的保存性,在4℃条件下,保存127d,酶活性仍高达原来的60%左右,而相应的酶液在相同条件下活性全失。

将CMCP装柱,啤酒在40℃条件下过柱,对收集液进行比浊分析和氨基酸含量分析。表明CMCP用于啤酒防浊有独特的效果,CMCP能水解啤酒中的蛋白质,使氨基酸含量增加(表2)。

### 3.2 琼脂固定化木瓜蛋白酶的研究

以ABSE-交联琼脂为载体,制备固定化木瓜蛋白酶,热稳定性也大为提高,其 $K_m$ 值为 $2.13 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ ,最适pH单位为8.3~8.5,60℃条件下保存2h仍得到98%以上的活性,固定化酶经贮存90d,仍保持85%以上的活性。

表2 CMCP柱处理前后啤酒的氨基酸含量

Table 2 The amino acid concentrations of beer before and after CMCP treatment

ng/ (25 $\mu\text{L}$ )					
氨基 酸	未经 柱处理	经 CMCP 柱处理	氨基 酸	未经 柱处理	经 CMCP 柱处理
Asp	59.58	135.48	Cys	452.20	2 609.97
Thr	23.22	115.21	Val	144.36	296.43
Ser	18.61	116.84	Lys	47.71	184.54
Clu	395.81	427.92	Met	20.98	324.59

琼脂固定化木瓜蛋白酶应用于啤酒防浊,也有良好的效果,用批量罐式反应器处理啤酒,操作简单,成本低,用连续式酶柱处理啤酒,可进行连续反应,自动化程度高,反应程度可通过流速来随时控制。但其酶柱活性半衰期较短,需经常激活。酶柱连续反应10h,活性降到60.72%,经清洗激活,活性可恢复到90%以上。在大规模啤酒生产中,可在啤酒发酵原液糖化时或糖化后,将固定化酶加入或将原液经过固定化酶的流化床反应器,用时间和流速来控制反应程度。

经固定化木瓜蛋白酶处理以后,啤酒内的蛋白质大量水解成氨基酸和小肽,从而有效地防止了啤酒在低温贮存时因蛋白质沉淀而变得混浊,同时使游离氨基酸得到大量增加(表3)。

表3 玉泉山啤酒游离氨基酸含量

Table 3 The free amino acid contents in Yuquanshan beer

ng/ 50 $\mu\text{L}$			
氨基酸	CK	罐反应处理	柱反应处理
Asp	31.14	130.09	722.60
Thr	75.73	166.21	140.76
Gu	104.50	216.32	1 833.77
Gly	270.75	280.69	446.13
Val	548.92	586.07	1 296.89
Met	44.09	48.03	174.22

注:反应条件为20℃,20d。

木瓜蛋白酶的固定化方法很多,最近国内也有用尼龙<sup>[6]</sup>、壳聚糖<sup>[7]</sup>及甘蔗渣等作载体材料,可以大大降低成本。

## 4 木瓜蛋白酶的应用

1984年,我们与广州园艺公司合作,筹建成立

广州园艺植物蛋白食品厂,在木瓜蛋白酶的开发应用方面获得成功,1985年通过了广州市科委组织有关部门的技术鉴定。对木瓜蛋白酶的综合利用项目,于1986年纳入国家星火计划;其后继续开发了多种新产品,1988年12月,获首届国家星火奖。

以往,国内并无大规模木瓜蛋白酶的生产,只有

少量作坊式的分散经营,生产技术落后、产品质量低劣。近5年来我们参考国外先进生产技术,设计和生产了远红外线干燥设备;最近又采用先进的真空冷冻干燥设备,大量生产优质的木瓜蛋白酶。目前我们已投产5种规格的木瓜蛋白酶原粉及试剂级产品,质量达到国外同类水平。

在上述基础上,我们又进行了木瓜蛋白酶的系列产品开发,先后研制了嫩肉粉、啤酒澄清剂、饼干松化剂和饲料添加剂等产品,在食品工业及饲料工业方面得到较大成功,获得了较好的经济效益。

#### 4.1 嫩肉粉

它是100%的天然物质,无化学合成物,无防腐剂,能使老牛肉、老鸡肉、猪肉、羊肉、猪肚、鱿鱼及鲍鱼等较坚韧肉类迅速嫩化,有利消化并提高营养价值,并可节省烹调时间与能源,适合饭店、宾馆及家庭使用。

我们生产的园艺牌嫩肉粉是农业部首批授予“绿色食品”标志的无公害、安全营养食品,曾是第11届亚运会特选食品添加剂;1992年获中国农业博览会金质奖。

#### 4.2 啤酒澄清剂

啤酒澄清剂俗称啤清,是液体木瓜蛋白酶的新剂型,用于提高啤酒、果酒等的品质及稳定性,防止在贮运时混浊沉淀,延长啤酒、果酒的贮运时间和货架期。

#### 4.3 饼干松化剂

它能降低面团筋度、提高饼干疏松度、成形性好,能使饼色油润,减少次品率、提高成品率。适合各种风味的高、中、低档饼干、糕点及面包的制造。

#### 4.4 饲料添加剂

是新开发的系列产品,是饲料业的新型添加剂。其适用性广,可帮助饲料消化、提高饲料的效价,同时对奶牛的增乳、提高奶质以及预防乳房炎等有显著功效。

目前,以上产品已畅销国内,并远销国外。

### 5 展 望

木瓜蛋白酶在医药、食品、饮料、化学试剂、饲料、纺织化妆品等方面都有广泛的用途,开发前景广阔。木瓜蛋白酶粗粉除含木瓜蛋白酶外,还含有木瓜凝乳酶、木瓜肽酶和溶菌酶等。木瓜凝乳酶可制造乳酪及治疗椎间盘脱出症,是很有价值的成分;溶菌酶及木瓜肽酶也有重要的用途。将以上各种酶分别提取加以利用,是今后亟待研究和开发的课题。

#### 参 考 文 献

- [1] 吴显荣,朱利泉. 木瓜蛋白酶[J]. 北京农业大学学报, 1988,14(1):13-17
- [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,1998.1-3
- [3] 吴显荣,张耕耘. 木瓜凝乳酶[J]. 热带作物科技, 1992,(4):5-7
- [4] AOAC. Official Methods of Analysis. 1990, 1165
- [5] 吴显荣,朱利泉. 纤维素固相化木瓜蛋白酶[J]. 生物化学杂志,1991,7(5):535-537
- [6] 徐凤彩,李明启. 尼龙固定化木瓜蛋白酶及其应用研究[J]. 生物化学杂志,1992,8(3):302-306
- [7] 徐凤彩,李雪萍,程京燕,等. 壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 生物化学杂志,1992,8(5):608-610