

离子液体双水相提取木瓜蛋白酶及条件优化

王伟涛, 张海德, 蒋志国, 许英豪, 董安华, 彭健, 杨雪芳

(海南大学食品学院, 海南海口 570228)

摘要: 采用[C₄mim]Br/K₂HPO₄ 双水相体系提取木瓜蛋白酶。首先考察各成相试剂对木瓜蛋白酶活性的影响, 其次考察了离子液体侧烷基链长度、离子液体浓度、酶添加量、pH、温度对木瓜蛋白酶分配行为的影响; 并采用响应面法 (CCD) 优化 [C₄mim]Br/K₂HPO₄ 双水相萃取木瓜蛋白酶的条件。结果表明: 离子液体对木瓜蛋白酶的活性影响较小, 低浓度时还能促进酶活性, 而无机盐对木瓜蛋白酶活性的影响较大; 高温不利于离子液体双水相萃取木瓜蛋白酶; 各因素对木瓜蛋白酶萃取的影响从大到小依次为 K₂HPO₄ 的浓度、[C₄mim]Br 的浓度、酶添加量、pH。响应面优化得到的最佳萃取条件: 0.30 g/mL 的 [C₄mim]Br, 0.30 g/mL 的 K₂HPO₄, pH 6.0, 酶添加量 3.0 mg/mL, 温度 30 °C。在此条件下木瓜蛋白酶的酶活性回收率达到 91.20%, 纯化因子可以达到 1.73。为该体系的放大实验或规模化生产提供理论指导。

关键词: 离子液体; 双水相; 木瓜蛋白酶; 酶活性回收率; 纯化因子; 萃取

文章编号: 1673-9078(2014)9-210-216

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.035

Extraction of Papain by Ionic Liquid/Aqueous Two-phase System and Optimization of Process Conditions

WANG Wei-tao, ZHANG Hai-de, JIANG Zhi-guo, XU Ying-hao, DONG An-hua, PENG Jian, YANG Xue-fang
(College of Food Science and Technology, Haikou 570228, China)

Abstract: Papain was extracted by a [C₄mim] Br/K₂HPO₄ ionic liquid/aqueous two-phase system. First, the influence of reagents on the activity of papain was investigated. Second, the effects of alkyl chain length and concentration of the ionic liquid, dosage of papain, pH, and temperature on the partitioning behavior of papain were discussed concretely, and the extraction conditions were optimized using the central composite design (CCD). The results showed that ionic liquids had little impact on the activity of papain and could promote the activity at low concentrations, while the inorganic salt had a larger influence on the activity of papain. There was a negative influence on the extraction of papain in the ionic liquid/aqueous two-phase system at high temperature. The influence of the various parameters was in the following order: concentration of K₂HPO₄ > concentration of [C₄mim]Br > dosage of papain > pH. The optimized extraction conditions were as follows: [C₄mim] Br content, 0.30 g/mL; K₂HPO₄ content, 0.30 g/mL; pH, 6.0; dosage of papain, 3.0 mg/mL; reaction temperature, 30.0 °C. Under the optimum conditions, the activity recovery of the enzyme and purification factor reached 91.20% and 1.73, respectively. The result provided the experimental basis for further research and large-scale production.

Key words: ionic liquid; aqueous two-phase system; papain; activity recovery of enzyme; purification factor; extraction

木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2) 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、蛋白水解能力强等特征, 在食品、医药等领域有广泛的应用^[1]。因此对木瓜蛋白酶的分离纯化技术进行深入研究, 提取高品质的木瓜蛋白酶具有重要的应用价值。而传统提取木瓜蛋白酶的方法存在酶活性不稳定, 纯度不高, 工艺繁琐且很难大规模生产, 达不到现代工

收稿日期: 2014-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260401)

作者简介: 王伟涛 (1988-), 男, 硕士, 研究方向: 天然产物的提取

通讯作者: 张海德 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物的提取

业的需求^[2], 因此有必要寻找制备高品质、高活性木瓜蛋白酶的新方法。

双水相萃取技术 (ATPS) 具有条件温和、操作简便和分离效率高等特点^[3]。与传统的有机溶剂萃取相比, 双水相体系能够为生物活性物质提供一种温和的环境, 而使其不易失活。因此双水相萃取技术已广泛应用于生物活性物质的分离和纯化^[4]。

离子液体, 又称室温熔盐, 是由特定的有机阳离子和无机或有机阴离子构成的在室温或近室温下呈液态的熔盐体系。作为一类新型的绿色溶剂, 离子液体具有其它常规溶剂无可比拟的优点^[5], 如蒸气压极低, 热稳定性和化学稳定性高, 液程宽, 溶解性强和

可设计性等。作为新型绿色溶剂的离子液体也可以形成双水相体系。离子液体双水相体系 (Ionic liquids aqueous two-phase system, ILATPS) 通常由一种有机盐 (亲水性离子液体)、一种无机盐 (如磷酸盐、碳酸盐、氢氧化物等) 和水形成, 该双水相体系综合了离子液体和双水相体系的优点^[6], 开辟了新的萃取分离体系。作为一种高效而温和的新型绿色分离体系, 与传统的双水相体系相比, 离子液体双水相体系具有分相时间短、粘度低、萃取过程不易乳化且离子液体可以回收利用 (采用反萃取、离子交换法、透析、超滤等方法使成相物质和目标产物分离)^[5]等优点^[7], 这些优点刚好克服了传统双水相体系的缺点。目前, 利用离子液体双水相萃取的蛋白质、氨基酸、酶等活性物质已达数十种^[5]。因此, 离子液体双水相体系在生物分离工程中具有广阔的应用前景。

目前, 双水相萃取木瓜蛋白酶的研究国内外已有报道, 但主要集中在 PEG/盐双水相系统^[2], 而聚乙二醇双水相相对离子液体双水相, 存在黏度大, 后续酶的分相较困难; 分相慢, 有些需要离心才能彻底分相; 易乳化, 单位酶处理量不多; 以及萃取率不高等现象。实验拟把 ILATPS 应用于木瓜蛋白酶的提取, 取得了理想的萃取效果, 为该体系的放大实验和工业化大规模生产提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

木瓜蛋白酶 (生化酶), 生工生物 (上海) 股份有限公司; [C₂mim]Br、[C₄mim]Br、[C₆mim]Br, 上海成捷化学有限公司; K₂HPO₄ (分析纯), 广州化学试剂厂; 其他都为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

TU1901 紫外可见分光光度计, 北京普析通用有限责任公司; DK-98-1 型恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 木瓜蛋白酶活性的测定

以酪蛋白为底物, 测定木瓜蛋白酶的活性^[1]。

1.3.2 蛋白含量的测定

采用 Bradford 方法测蛋白质的含量^[8]。

1.3.3 离子液体双水相萃取木瓜蛋白酶

取 5mL 刻度冷冻管, 加入 0.30 g/mL (离子液体质量/体系体积, 以下同) 的离子液体、0.35 g/mL 的

K₂HPO₄、1.0 mg/mL (木瓜蛋白酶的质量/体系体积, 以下同) 木瓜蛋白酶溶液, 体系 pH 7.0, 30 °C。研究酸度影响时加入不同 pH 值的 B.R 缓冲溶液 1.0 mL, 加去离子水至 5.0 mL, 空白加与酶溶液相同 pH 和等体积的酶稀释液, 30.0 °C 振荡 30.0 min, 静置至分相。读取上下相的体积 V, 测定上相的蛋白浓度 (mg/mL) 和酶活性浓度 (U/mL), 计算公式如下:

$$Y_e (\%) = E_{top} \times V_{top} / M_e \times 100$$

注: Y_e (%) - 酶活性回收率; E_{top} - 上相酶活性浓度 (U/mL); V_{top} - 上相体积 (mL); M_e - 加入体系的总酶活性 (U)。

$$Y_p (\%) = P_{top} \times V_{top} / M_p \times 100$$

注: Y_p (%) - 蛋白回收率; P_{top} - 上相蛋白浓度 (U/mL); V_{top} - 上相体积 (mL); M_p - 加入体系的总蛋白 (mg)。

$$SA = E/P$$

注: SA - 木瓜蛋白酶比活力 (U/mg); E - 酶活性浓度 (U/mL); P - 可溶性蛋白浓度 (mg/mL)。

$$PF = \frac{SA_{top}}{SA_i}$$

注: PF - 纯化因子; SA_{top} - 上相酶的比活力; SA_i - 初始酶的比活力。

1.3.4 响应面实验设计

在上述单因素实验基础上, 采用 CCD 实验设计, 选择 X₁ (pH), X₂ ([C₄mim]Br 质量浓度), X₃ (K₂HPO₄ 质量浓度), X₄ (酶添加量) 4 个因素进行优化 (为操作方便, 实验在 30.0 °C 下进行), 以获得最佳的双水相萃取条件, 以酶活性回收率 (Y_e%) 和纯化因子 (PF) 两个响应值为考察对象, 实验因素及水平编码表见表 1。

表 1 响应面实验因素及水平编码表

Table 1 List of coded factors and levels for RSM

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
X ₁	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
X ₂ (g/mL)	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
X ₃ (g/mL)	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45
X ₄ (mg/mL)	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00

1.3.5 数据处理及分析

采用 Origin8.0 和 SAS9.3 对数据进行处理和分析, 每组均重复 3 次, 数据表示为平均值±标准偏差。

2 结果与分析

2.1 各成相试剂对酶活性的影响

配制质量分数为 5.0%、15.0%、25.0%、35.0%、45.0% 的各成相试剂，各取 2.0 mL 加 1.0 mL 稀释一定倍数的酶溶液，放置 10.0 min 后测其酶活性。空白取 2.0 mL 去离子水加 1.0 mL 稀释一定倍数的酶溶液，放置 10.0 min 后测其酶活性。以酶活性比 Y 为指标，考察成相试剂对酶活性的影响。

$X\% = \text{成相试剂存在时的酶活性} / \text{空白的酶活性} \times 100\%$

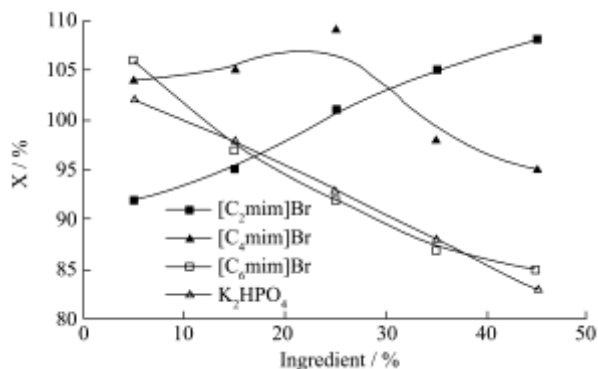


图 1 各成相剂对酶活性的影响

Fig.1 Effect of concentration of ingredients on the activity of enzyme

由图 1 可知，在较低浓度，35.0% 以下，成相物质的存在对酶活性没有明显的抑制作用，即使成相物浓度达到 35.0%，酶活性回收率仍在 85.0% 以上，其中离子液体 [C₂mim]Br 对酶活性反而还有促进作用；随着成相剂浓度的进一步增加，对酶活性的抑制作用加强，故成相时离子液体浓度以及盐的浓度不宜太大，控制在 35.0% (m/m) 以下。

2.2 离子液体侧烷基链长度对分配行为的影响

考察不同侧烷基链长度的离子液体 ([C₄mim]Br, n = 2, 4, 6) 对分配行为的影响，结果见图 2。结果表明，在所选取的 K₂HPO₄ 浓度范围内，[C₆mim]Br 体系的酶活性回收率明显低于 [C₂mim]Br 和 [C₄mim]Br 体系。随着离子液体侧烷基链的增长，疏水性增强，其形成的双水相临界点越靠近原点，越有利于蛋白质选择性分离，即易于分配于富含离子液体相中，分配系数增大^[9]，但离子液体侧烷基链越长，反而对酶活性影响较大，不利于酶活性的保持，故舍去 [C₆mim]Br 体系。[C₂mim]Br 和 [C₄mim]Br 体系的酶活性回收率和纯化因子先增大后减小，在盐浓度为 0.35 g/mL 时，酶活性回收率达到最大，分别为 87.74% 和 88.27%；在盐浓度为 0.40 g/mL 时，[C₂mim]Br 体系的纯化因子达到最大为 1.41，在盐浓度为 0.35 g/mL

时，[C₄mim]Br 体系的纯化因子达到最大为 1.61。原因是无机盐的盐析作用是双水相成相的主要原因之一^[10]，增大 K₂HPO₄ 的浓度，无机盐的盐析作用加强，木瓜蛋白酶更趋向分配于上相，但过多的盐对木瓜蛋白酶的活性影响又较大。相比而言，[C₂mim]Br 和 [C₄mim]Br 体系的酶活性回收率在盐浓度较高时相差不多，但 [C₄mim]Br 体系的纯化因子比 [C₂mim]Br 体系整体偏高，纯化因子越高表明体系对木瓜蛋白酶的的选择性越强。综上所述，选取 [C₄mim]Br 体系，K₂HPO₄ 浓度 0.35 g/mL 为进一步优化。

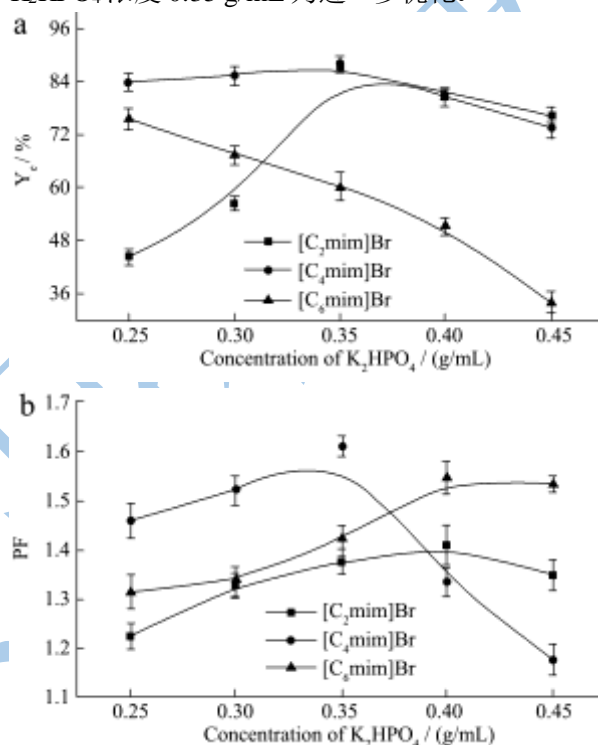


图 2 不同侧烷基链长度的离子液体对分配行为的影响

Fig.2 Effect of the alkyl chain length and concentration of the ionic liquid on partitioning behavior

2.3 离子液体浓度对分配行为的影响

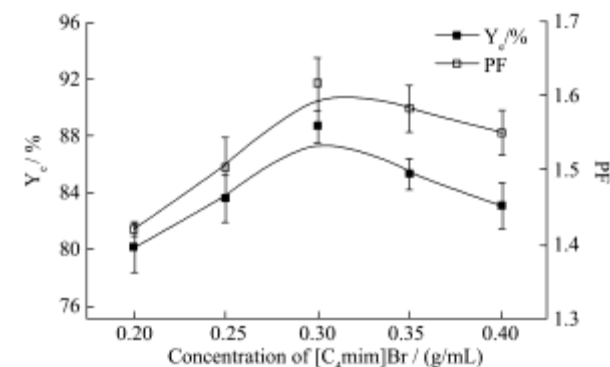


图 3 离子液体浓度对分配行为的影响

Fig.3 Effect of the ionic liquid concentration on partitioning behavior

在上述最佳条件下,考察 [C₄mim]Br 浓度对分配行为的影响,结果如图 3。结果表明,随着 [C₄mim]Br 浓度的增大,木瓜蛋白酶的酶活性回收率和纯化因子先增大后减小,为 [C₄mim]Br 浓度 0.30 g/mL 时达到最大,酶活性回收率 88.59%,纯化因子 1.62。原因是随着离子液体的浓度增大,体积排阻效应增大导致木瓜蛋白酶在相间的传递和在相中的扩散阻力大大增大,不利于蛋白质进入离子液体相,回收率明显下降。综合考虑,试验中 [C₄mim]Br 质量浓度选取 0.30 g/mL 为最佳。

2.4 酶添加量对分配行为的影响

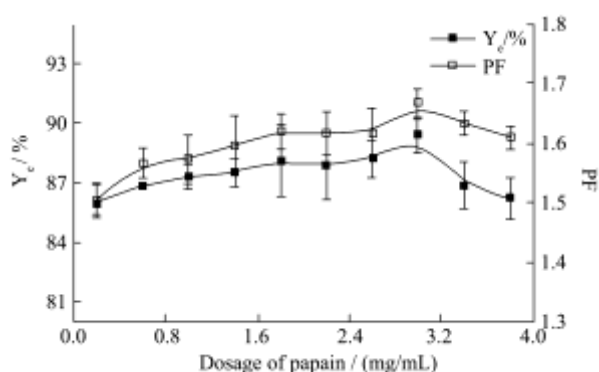


图 4 酶添加量对分配行为的影响

Fig.4 Effect of the papain dosage on the partition behavior

在上述最佳条件下,考察酶添加量对木瓜蛋白酶分配行为的影响,结果如图 4。随着酶添加量的增大,木瓜蛋白酶的酶活性回收率和纯化因子先增大后减小,在酶添加量在 3.0 mg/mL 时,酶活性回收率和纯化因子达到最大,为 89.42%和 1.67。原因是酶添加量的增加使相比增大,回收率随之增大,但过多的酶不仅使上相发生微乳化现象,增大后续分离酶的工作量,也使上相的酶容量达到饱和,从而导致过多的酶分配于两相中间,使回收率下降,造成酶的浪费,故实验中酶添加量为 3.0 mg/mL 比较合适。

2.5 pH 对分配行为的影响

在上述最佳条件下,由于木瓜蛋白酶是中性蛋白,在 pH 7.0 左右酶活性最大,为保持木瓜蛋白酶的活性,选取 pH 5.0~9.0 考察 pH 对分配行为的影响,结果如图 5 所示。在所选 pH 范围内,随着 pH 的增大,木瓜蛋白酶的酶活性回收率和纯化因子先增大后减小,在 pH 7.0 时达到最大,分别为 89.38%和 1.69。蛋白质是两性电解质,离子液体双水相体系 pH 的变化必然会改变蛋白质的电荷性质^[11],从而影响到离子液体咪唑类阳离子与蛋白质之间的静电相互作用。因此,静电相互作用在蛋白质选择性分离中起

着重要的作用。

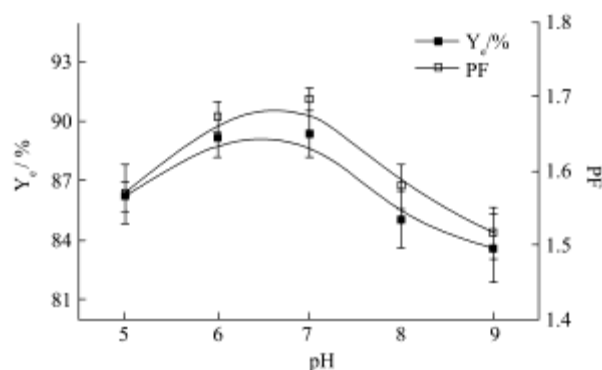


图 5 pH 值对分配行为的影响

Fig.5 Effect of pH on partition behavior

2.6 温度对分配行为的影响

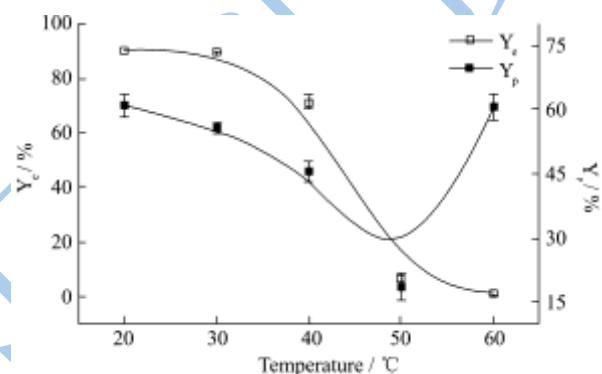


图 6 温度对分配行为的影响

Fig.6 Effect of temperature on partition behavior

在上述最佳条件下,考察温度对分配行为的影响,结果如图 6 所示。温度的变化一方面影响相物理性质的变化,例如粘度和密度等,从而影响蛋白质的分配,另一方面温度对体系的疏水相互作用和氢键作用也有影响,而疏水相互作用是蛋白质在离子液体双水相中分配的主要驱动力,氢键相互作用对蛋白质的分配也有重要影响^[6]。在 20.0~30.0 °C 时酶活性回收率变化不大,在 30.0 °C 时达到 90.42%,随着温度的继续增大,酶活性回收率急剧下降。蛋白回收率先减小后增大,在 50.0 °C 时最小,只有 18.78%。原因是,一方面在此温度下成相物质的密度、黏度等性质发生变化,从而影响蛋白质在离子液体双水相中的分配,另一方面,随着温度的升高,疏水相互作用逐渐增强,氢键作用逐渐减弱,在 50.0 °C 时,蛋白质氨基酸残基和水分子间的氢键作用遭到破坏。此时氢键(其它分子间)的形成受疏水相互作用的影响较少,导致疏水相互作用的效果减弱^[12]。一般来说,适当提高温度有利于蛋白质分配于富离子液体相,但在 60.0 °C 时,蛋白回收率达到 60.52%,而酶活性回收率只有 1.27%。根据文献可知,木瓜蛋白酶具有耐高

温的特性, 60.0 °C对活性有一定影响, 但影响不是很大, 而离子液体的热稳定性非常好, 咪唑类离子液体在 400.0 °C左右才开始分解^[3], 说明高温(≥60 °C)条件下, 离子液体和木瓜蛋白酶之间发生反应(需进一步研究), 影响了木瓜蛋白酶的活性。故提取木瓜蛋白酶的离子液体双水相体系的温度不宜太高, 30.0 °C左右为宜。

2.7 响应面实验设计及分析

2.7.1 响应面实验设计方案及结果

表2 响应面试验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and result of RSM (Uncode)

试验号	X ₁	X ₂ (g/mL)	X ₃ (g/mL)	X ₄ (mg/mL)	Y _e %	PF
1	6.0	0.25	0.30	2.50	89.46	1.65
2	6.0	0.25	0.30	3.50	88.35	1.66
3	6.0	0.25	0.40	2.50	82.17	1.36
4	6.0	0.25	0.40	3.50	81.57	1.39
5	6.0	0.35	0.30	2.50	86.29	1.52
6	6.0	0.35	0.30	3.5	85.10	1.54
7	6.0	0.35	0.4	2.50	79.23	1.27
8	6.0	0.35	0.40	3.50	78.10	1.29
9	8.0	0.25	0.30	2.50	83.21	1.42
10	8.0	0.25	0.30	3.5	83.63	1.46
11	8.0	0.25	0.40	2.50	77.51	1.24
12	8.0	0.25	0.40	3.50	80.01	1.30
13	8.0	0.35	0.3	2.50	85.03	1.46
14	8.0	0.35	0.30	3.50	84.53	1.49
15	8.0	0.35	0.40	2.50	78.50	1.26
16	8.0	0.35	0.40	3.50	78.47	1.29
17	5.0	0.30	0.35	3.00	88.39	1.64
18	9.0	0.30	0.35	3.00	84.36	1.48
19	7.0	0.20	0.35	3.00	82.63	1.41
20	7.0	0.40	0.35	3.00	84.32	1.45
21	7.0	0.30	0.25	3.00	84.35	1.47
22	7.0	0.30	0.45	3.00	71.36	1.13
23	7.0	0.30	0.35	2.00	87.82	1.61
24	7.0	0.30	0.35	4.00	89.22	1.68
25	7.0	0.30	0.35	3.00	89.49	1.67
26	7.0	0.30	0.35	3.00	89.87	1.71
27	7.0	0.30	0.35	3.00	89.45	1.68
28	7.0	0.30	0.35	3.00	91.74	1.73
29	7.0	0.30	0.35	3.00	90.36	1.72
30	7.0	0.30	0.35	3.00	90.36	1.71
31	7.0	0.30	0.35	3.00	91.47	1.74

2.7.2 响应面方差分析

采用 SAS9.3 软件进行方差分析, 结果见表 3 和 4。

表3 响应值 Y_e%的方差分析

Table 3 Variance analysis of Y_e%

响应值	来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
Y _e %	X ₁	1	31.37307	31.37307	19.17435	0.0005
	X ₂	1	2.208267	2.208267	1.349632	0.2624
	X ₃	1	240.7934	240.7934	147.1662	<.0001
	X ₄	1	0.056067	0.056067	0.034266	0.8555
	X ₁ ²	1	44.78091	44.78091	27.36885	<.0001
	X ₁ X ₂	1	14.0625	14.0625	8.594611	0.0098
	X ₁ X ₃	1	2.418025	2.418025	1.47783	0.2417
	X ₁ X ₄	1	2.576025	2.576025	1.574395	0.2276
	X ₂ ²	1	111.6993	111.6993	68.26755	<.0001
	X ₂ X ₃	1	0.664225	0.664225	0.405956	0.533
	X ₂ X ₄	1	1.030225	1.030225	0.629645	0.4391
	X ₃ ²	1	326.9597	326.9597	199.8287	<.0001
	X ₃ X ₄	1	0.6084	0.6084	0.371837	0.5506
	X ₄ ²	1	14.62495	14.62495	8.938362	0.0087
	模型	14	714.7071	51.05051	31.20066	<.0001
	残差	16	26.17919	1.6362		
失拟项	10	21.22451	2.122451	2.570235	0.1301	
净误差	6	4.954686	0.825781			
总离差	30	740.8863				

表4 响应值 PF 的方差分析

Table 4 Variance analysis of PF

响应值	来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	P 值
PF	X ₁	1	0.0486	0.0486	18.48756	0.0006
	X ₂	1	0.003267	0.003267	1.242648	0.2814
	X ₃	1	0.256267	0.256267	97.48448	<.0001
	X ₄	1	0.006017	0.006017	2.288755	0.1498
	X ₁₂	1	0.068708	0.068708	26.13686	0.0001
	X ₁ X ₂	1	0.0169	0.0169	6.428802	0.022
	X ₁ X ₃	1	0.0064	0.0064	2.434576	0.1382
	X ₁ X ₄	1	0.0004	0.0004	0.152161	0.7016
	X ₂₂	1	0.190023	0.190023	72.28535	<.0001
	X ₂ X ₃	1	2.77E-32	2.77E-32	1.05E-29	1
	X ₂ X ₄	1	0.0001	0.0001	0.03804	0.8478
	X ₃₂	1	0.371747	0.371747	141.4134	<.0001
	X ₃ X ₄	1	0.0001	0.0001	0.03804	0.8478
	X ₄₂	1	0.022049	0.022049	8.387441	0.0105
	模型	14	0.876881	0.062634	23.82627	<.0001
	残差	16	0.042061	0.002629		
失拟项	10	0.038175	0.003817	5.894669	0.0208	
净误差	6	0.003886	0.000648			
总离差	30	0.918942				

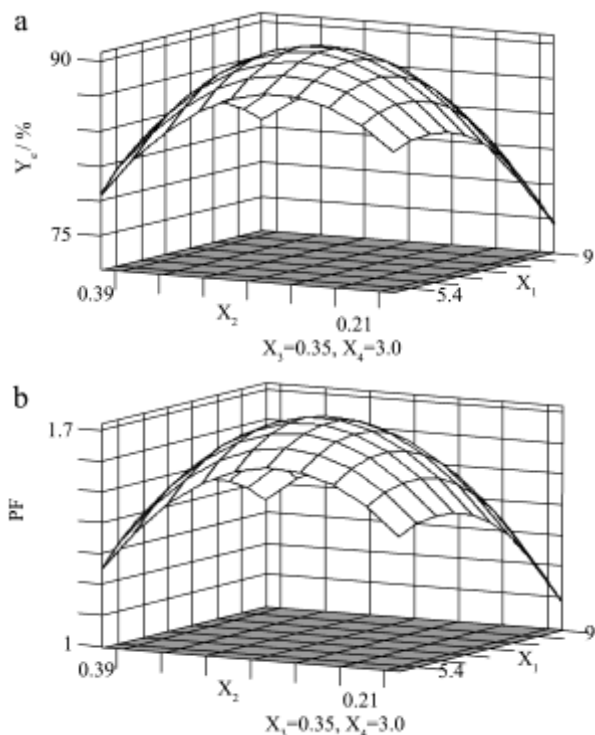


图 7 Y_c%和 PF 的相应曲面图

Fig.7 Responsive surface and contours of Y_c% and PF

对表 2 数据进行二次多项回归拟合, 得到两个响应值的二次多项回归模型:

$$Y_c\% = -180.917 + 5.23375X_1 + 400.069X_2 + 965.3226X_3 + 11.56774X_4 - 1.251399X_1^2 + 18.75X_1X_2 + 7.775X_1X_3 + 0.8025X_1X_4 - 790.5595X_2^2 - 81.5X_2X_3 - 10.15X_2X_4 - 1352.56X_3^2 + 7.8X_3X_4 - 2.860595X_4^2$$

$$R^2 = 96.47\%, R_{Adj}^2 = 93.37\% \quad (1)$$

$$PF = -8.08307 + 0.25625X_1 + 15.08095X_2 + 31.31905X_3 + 0.618095X_4 - 0.049018X_1^2 + 0.65X_1X_2 + 0.4X_1X_3 + 0.01X_1X_4 - 32.60714X_2^2 - 6.54E-10X_2X_3 - 0.1X_2X_4 - 45.60714X_3^2 + 0.1X_3X_4 - 0.111071X_4^2$$

$$R^2 = 95.42\%, R_{Adj}^2 = 91.42\% \quad (2)$$

方程 (1) 和 (2) 的决定系数 R² 分别为 96.47% 和 95.42%, 说明拟合性良好。两个模型的校正 R² (K:93.37, Y:91.42), 表明 90% 以上的实验数据的变异性可用此回归模型来解释。

对表 2 实验数据进行方差分析, 结果见表 3 和 4。由表 3 和 4 可知, 两个模型的 p 值 < 0.01, 这表明回归方程的 F 检验极显著, 说明所拟合的二次回归方程合适。对回归方程中一次项系数的绝对值进行比较, 可判断因子影响的主次性^[4]。对于木瓜蛋白酶的萃取, 各因素对木瓜蛋白酶萃取的影响从大到小依次为: K₂HPO₄ 的浓度、[C₄mim]Br 的浓度、酶添加量、pH。表 3 和 4 的分析结果表明, 在所选的各因素水平范围内, X₁、X₃、X₁²、X₁X₂、X₂²、X₃²、X₄²、

X₁X₃ 对 Y_c% 和 PF 的影响显著, X₂、X₄、X₁X₃、X₁X₄、X₂X₃、X₂X₄、X₃X₄ 对 Y_c% 和 PF 的影响不显著。

从表 3 和 4 以及 Y_c% 和 PF 的响应面图 (图 7) 可以看出, X₁ 和 X₂ 交互效应显著。在已建立的模型基础上, 设定优化目标响应值 Y_c% 和 PF 达到最大, 通过 SAS 软件来预测模型的最优条件: 0.30 g/mL 的 [C₄mim]Br, 0.30 g/mL 的 K₂HPO₄, pH 6.0, 酶添加量 3.0 mg/mL, 温度 30.0 °C。为检验响应面法所得结果的可靠性, 以上述条件进行实验结果的验证。预测值 Y_c% (90.46) 和 PF (1.71), 相应的实验值为 Y_c% (91.20) 和 PF (1.73)。预测值和实验值的一致性非常好, 表明对双水相萃取木瓜蛋白酶的条件优化是有效的。

3 结论

3.1 通过考察各成相试剂对酶活性的影响可知, 离子液体对木瓜蛋白酶的活性影响较小, 低浓度时还能促进酶活性, 而无机盐对酶活性的影响较大, 故无机盐的添加量不宜太大。

3.2 对温度的考察可知, 高温对离子液体双水相体系萃取木瓜蛋白酶不利。

3.3 响应面实验结果表明: pH 和 [C₄mim]Br 的浓度对木瓜蛋白酶的酶活性回收率和纯化因子的交互影响显著; 各因素对木瓜蛋白酶萃取的影响从大到小依次为: K₂HPO₄ 的浓度、[C₄mim]Br 的浓度、酶添加量、pH。CCD 试验优化得到 [C₄mim]Br / K₂HPO₄ 双水相萃取木瓜蛋白酶的最佳条件为: 0.30 g/mL 的 [C₄mim]Br, 0.30 g/mL 的 K₂HPO₄, pH 6.0, 酶添加量 3.0 mg/mL, 温度 30.0 °C。此条件下木瓜蛋白酶的酶活性回收率为 91.20%, 纯化因子 1.73。为该体系的放大试验或规模化生产奠定了相应的试验基础。

3.4 实验中存在的不足在于离子液体的成本太高, 对工业化大规模生产不利。实验室对廉价离子液体的合成进行研究, 具有实际应用价值。

参考文献

[1] Su S N, Nie H L, Zhu L M, et al. Optimization of adsorption conditions of papain on dye affinity membrane using response surface methodology [J]. Bioresource technology, 2009, 100(8): 2336-2340

[2] 张海德, 王伟涛, 蒋欣欣. 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 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 2: 4

ZHANG Hai-de, WANG Wei-tao, JIANG Xin-xin. Progress on

- the study of mechanism and partition behavior of papain in affinity aqueous two-phase systems [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2013, 2: 4
- [3] 苏艳玲.PEG/(NH₄)₂SO₄双水相体系萃取杏鲍菇多糖[J].现代食品科技,2013,29(6):1333-1336
- SU Yan-ling. Extraction of pleurotus eryngii polysaccharides with PEG/(NH₄)₂SO₄two-phase aqueous system [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(6): 1333-1336
- [4] Gai Q, Qu F, Zhang T, et al. Integration of carboxyl modified magnetic particles and aqueous two-phase extraction for selective separation of proteins [J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 304-309
- [5] Li Z, Pei Y, Wang H, et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29(11): 1336-1346
- [6] 刘晓庚,高梅,陈梅梅.离子液体双水相体系及其在蛋白分离中的应用[J].中国粮油学报,2013,28(4):118-123
- LIU Xiao-geng, GAO Mei, CHEN Mei-mei. Ionic liquids aqueous two-phase system and its research in proteins' extraction [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(4): 118-123
- [7] Li Z, Liu X, Pei Y, et al. Design of environmentally friendly ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient and high activity extraction of proteins [J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(10): 2941-2950
- [8] Pierce J, Suelter C H. An evaluation of the coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination [J]. *Analytical Biochemistry*, 1977, 81(2): 478-480
- [9] 夏寒松,余江,胡雪生,等.离子液体相行为(II)双水相的成相规律[J].化工学报,2006,57(9):2149-2151
- XIA Han-song, YU Jiang, HU Xue-sheng, et al. Phase behavior of ionic liquids (II) aqueous two-phase [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2006, 57(9): 2149-2151
- [10] Mehrnoush A, Sarker M Z I, Mustafa S, et al. Direct purification of pectinase from mango (*Mangifera Indica* cv. Chokanan) peel using a PEG/salt-based aqueous two phase system [J]. *Molecules*, 2011, 16(10): 8419-8427
- [11] Lu Y, Lu W, Wang W, et al. Thermodynamic studies of partitioning behavior of cytochrome c in ionic liquid-based aqueous two-phase system [J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1621-1626
- [12] Zeng Q, Wang Y, Li N, et al. Extraction of proteins with ionic liquid aqueous two-phase system based on guanidine ionic liquid [J]. *Talanta*, 2013, 116: 409-416
- [13] 顾彦龙,彭家建,乔琨,等.室温离子液体及其在催化和有机合成中的应用[J].化学进展,2003,15(3):222-241
- GU Yan-long, PENG Jia-jian, QIAO Kun, et al. Room temperature ionic liquids and their applications in catalysis and organic reactions [J]. *Progress in Chemistry*, 2003, 15(3): 222-241
- [14] 彭芳刚,李绮丽,吴卫国.响应面法优化红莲外皮原花青素的提取工艺研究[J].现代食品科技,2013,29(6):1349-1354
- PENG Fang-gang, LI Qi-li, WU Wei-guo. Optimization of extraction of proanthocyanidins from skin of red locus seed using response surface methodology [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(6): 1349-1354