

Fe²⁺和Fe³⁺对菠萝蛋白酶活性和稳定性的影响

罗梦¹, 余以刚¹, 王小玉², 余博西¹, 肖性龙¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东珠海 519015)

摘要: 本文研究不同浓度的Fe²⁺和Fe³⁺对菠萝蛋白酶活性和60℃下酶稳定性的影响, 以及通过圆二色谱检测Fe²⁺和Fe³⁺对酶构象的变化, 并初步探究EDTA-2Na结合超滤膜法在菠萝蛋白酶制备工艺中清除铁离子的应用效果。结果表明: Fe²⁺浓度在0~0.75 mmol/L范围内, 对菠萝蛋白酶活性有促进作用, 以0.5 mmol/L促进效果最佳, 但浓度大于0.75 mmol/L时, 抑制酶活, 且随浓度增加, 抑制程度增强。Fe³⁺对菠萝蛋白酶只有抑制作用, 抑制程度与Fe³⁺浓度成正比, 且Fe³⁺对酶的抑制作用强于Fe²⁺。60℃下, Fe²⁺在浓度为0.5 mmol/L对菠萝蛋白酶的稳定性表现出促进作用, 延长了酶的半衰期。Fe³⁺对酶的稳定性呈现抑制作用。Fe²⁺和Fe³⁺浓度大于0.5 mmol/L时, 随离子浓度的升高, 对酶稳定性的抑制作用增强。采用圆二色谱检测酶的二级结构表明: Fe²⁺和Fe³⁺对酶抑制作用表现为 α -螺旋含量下降, β -折叠和 β -转角含量稍下降, 无规卷曲含量明显提高。EDTA-2Na结合超滤膜法除铁的效果很明显, 铁含量(干重)从291.63 mg/kg降低到142.99 mg/kg, 铁离子去除率达50.97%, 其酶活也由597.27 U/mg上升到808.52 U/mg, 酶活提高了26.13%。

关键词: 菠萝蛋白酶; Fe²⁺和Fe³⁺; 酶活及稳定性; 半衰期; 圆二色谱

文章编号: 1673-9078(2017)8-176-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.026

Effects of Iron (II) (Fe²⁺) and Iron (III) (Fe³⁺) ions on the Activity and Stability Bromelain

LUO Meng¹, YU Yi-gang¹, WANG Xiao-yu², YU Bo-xi¹, XIAO Xing-long¹

(1. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. The Inspection Technical Center of Zhuhai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: The effects of different concentrations of iron (II) (Fe²⁺) and iron (III) (Fe³⁺) on the activity of bromelain and the thermostability of bromelain at 60℃ were studied, and circular dichroism (CD) spectra were used to determine conformational changes of bromelain caused by Fe²⁺ and Fe³⁺. In addition, the iron ion removal effect of a method combining ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt and ultrafiltration during the preparation of bromelain was preliminarily explored. The results showed that Fe²⁺ at a concentration range from 0 to 0.75 mmol/L improved the activity of bromelain, and the best Fe²⁺ concentration was found as 0.5 mmol/L. When the concentration of Fe²⁺ was higher than 0.75 mmol/L, the activity of the enzyme was inhibited, and the extent of inhibition was increased with increasing Fe²⁺ concentration. Fe³⁺ had an inhibitory effect on enzyme activity, and the extent of inhibition was proportional to the concentration of Fe³⁺. The inhibitory effect of Fe³⁺ on the enzyme was stronger than that of Fe²⁺. At 0.5 mmol/L, Fe²⁺ had a promoting effect on the thermostability of bromelain at 60℃ and extended the half-life of the enzyme. However, Fe³⁺ had an inhibitory effect on the thermostability of bromelain. When the concentrations of Fe²⁺ and Fe³⁺ were higher than 0.5 mmol/L, their inhibitory effects on the thermostability of bromelain increased with increasing ion concentration. According to CD spectra, the inhibitory effects of Fe²⁺ and Fe³⁺ on bromelain were reflected in a decrease in the contents of α -helices, a slight decrease in the contents of β -sheets and β -turns, and a significant increase in random coil contents. The method combining ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt and ultrafiltration was effective for iron ion removal, with a reduction of iron content from 291.63 mg/kg to 142.99 mg/kg (dry weight), and the elimination rate of iron ion was 50.97%. Moreover, the enzyme activity increased from 597.27 U/mg to 808.52 U/mg, and the growth rate of activity was increased by 26.13%.

Key words: bromelain; iron (II) (Fe²⁺) and iron (III) (Fe³⁺); the activity and thermostability of bromelain; half-life; circular dichroism spectra

收稿日期: 2017-02-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2016B090918103); 珠海进出口公共技术服务平台产学研协同创新计划(IETP201601006)

作者简介: 罗梦(1991-), 女, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 余以刚(1968-), 男, 教授, 研究方向: 食品质量与安全; 肖性龙(1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全

菠萝蛋白酶是从菠萝植株中提取的一种蛋白水解酶系^[1], 具有较高的生物活性, 在食品、生物医药、化妆品等行业中有广泛的用途^[2-5]。金属离子通过影响酶的解离及变性等对酶活性产生较大影响, 且酶活的大小和稳定性直接影响酶在各个生产领域中的使用效果^[6]。研究^[7-11]发现, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对菠萝蛋白酶主要以促进作用为主, Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对菠萝蛋白酶低浓度有促进作用, 高浓度有抑制作用。易元龙等人^[12]研究还发现, Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 使浸提液中菠萝蛋白酶稳定性下降, Fe^{3+} 的影响更大。铁含量超标是目前影响菠萝蛋白酶质量的最主要因素。铁元素一部分来自菠萝自身, 另外一部分来自工厂规模生产过程的接触材料和机械设备^[13]。叶剑芝等人^[13]通过微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定对菠萝蛋白酶无机元素的含量时, 测得 Mg、Mn、Ca、Zn、Fe 和 Cu 含量 (mg/kg) 分别为: 150、53、1700、4.1、1000、3.2, 其中 Zn 和 Cu 含量低于 5 mg/kg, Ca 含量高于 1000 mg/kg, 铁含量 (1000 mg/kg) 远高于医药标准 (20 mg/kg)。EDTA-2Na 是一种重要的金属离子螯合剂, 能够在一定程度上减轻金属离子对酶的抑制作用^[14]。超滤法作为一种无相变、低温、能耗少、操作简单的分离方法, 可以有效地除去小分子蛋白质、盐离子等, 该方法在蛋白质纯化中已得到广泛应用^[15]。本文重点研究不同浓度的 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶活性的影响, 60 °C 下 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对酶的稳定性的影响, 以及通过圆二色谱探究菠萝蛋白酶构象的变化, 并初步探究了 EDTA-2Na 结合超滤膜法在菠萝蛋白酶制备工艺中清除铁离子的应用效果, 为菠萝蛋白酶的制备和使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料: 菠萝蛋白酶 (10 万 U/g), 广州蓝泽生物科技有限公司; 酪蛋白, 美国 Sigma 公司; 菠萝皮渣, 工厂提供; 中空纤维超滤膜 (截留分子质量为 10 ku); 铁元素标准使用液 (浓度均为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 中国标准物质研究所; 硝酸, 优级纯; 三氯乙酸、无水醋酸钠、冰醋酸、磷酸氢二钠、L-酪氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、乙二胺四乙酸二钠、氢氧化钠、36% 盐酸、氯化钙、氯化镁、氯化铜、硫酸亚铁、氯化铁和过氧化氢等试剂均为分析纯; 测定和分析用水, 均为去离子水。

仪器: DK-S24 型电热恒温水浴锅, 广东环凯微生物科技有限公司; FA2204B 型电子天平, 三爱思化学试剂有限公司; 722S 型紫外-可见分光光度计, 上

海棱光技术有限公司; Jasco 500c 型圆二色谱仪, 日本 Jasco 公司; 中空纤维超滤器 (型号: JW30522W); Z-2000 原子吸收分光光度计, 日本日立公司; 微波消解仪, 意大利 Milestone 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菠萝蛋白酶活测定

菠萝蛋白酶活测定方法参考中华人民共和国药典二部^[16]: 以酪蛋白为底物, 在 37 °C、pH 7.0 条件下酶与酪蛋白准确反应 10 min, 在 275 nm 波长下测定吸光度值。菠萝蛋白酶活定义: 每 1 min 水解酪蛋白生成 1 μg 酪氨酸所需的菠萝蛋白酶的量为 1 个酶活单位, 以 U/mg 表示。菠萝蛋白酶活按式(1)计算

$$\text{菠萝蛋白酶活单位} = \frac{A - A_0}{A_n} \times \frac{W_3}{W} \times \frac{11}{10} \times n \quad (1)$$

式中: W_3 为对照品溶液每 1 mL 中含酪氨酸的量, μg ; W 为样品的取样量, mg; 11 为测定总体积, mL; 10 为反应时间, min; n 为供试品的稀释倍数。

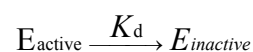
酶活残留率计算公式见式 (2):

$$\text{酶活残留率} (\%) = \frac{U}{U_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: U 为添加金属离子后的酶活, U_0 为纯酶的酶活。

1.2.2 菠萝蛋白酶半衰期的测定

菠萝蛋白酶热失活遵循动力学一级反应规律^[9]; 温度恒定时, 酶热失活是动力学一级反应, 即:



根据动力学理论, 则:

$$\frac{d[E]}{dt} = -K_d[E] \quad (3)$$

式中 $[E]$ 为活性酶浓度, K_d 为热失活常数。

将公式 (3) 转化为积分形式:

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -K_d t \quad (4)$$

式中 $[E_0]$ 为酶的初始浓度。

以 $\ln([E]/[E_0])$ 对 t 作图得一过原点直线, 斜率为 $-K_d$, 由公式 (4) 求出酶热失活半衰期:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (5)$$

1.2.3 圆二色谱测定菠萝蛋白酶二级结构

采用 Chirascan 圆二色谱仪对酶液进行扫描, 在 25 °C 恒温 and 连续充氮条件下, 进行远紫外扫描, 扫描范围: 190~260 nm, 扫描速度: 50 nm/min, 数据采集间隔 1 nm, 累加 3 次测量求平均值消除仪器噪音, 并用 CDPro 软件中的 continll 算法对其二级结构进行计

算。

1.2.4 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定铁含量

微波消解条件^[17]: 参照 GB/T 5009.90-2003《食品中铁、镁、锰的测定》, 并加以改进。

表 1 微波消解条件

Table 1 Microwave digestion procedure

步骤	功率/W	温度/℃	保持时间/min
1	1000	130	10
2	1000	180	5
3	1000	180	25
4	0	45	40

Z-2000 原子吸收分光光度计工作条件: 参考成娟等人^[18]的方法, 并加以改进。波长: 248.3 nm; 灯电流: 12.5 mA; 狭缝: 0.2 nm; 乙炔流量: 1.8 L/min; 空气流量: 15.0 L/min。

1.2.5 EDTA-2Na 结合超滤膜法清除铁离子工艺^[19]

粗酶液→8000 r/min、4℃离心 10 min→收集上清液→超滤处理→在浓缩液中加入 0.05%(m/V) EDTA-2Na, 搅拌使其充分溶解→收集浓缩液→盐析(缓慢加入饱和度 40%(NH₄)₂SO₄)→4℃静置过夜→8500 r/min、4℃离心 15 min→收集沉淀→酶初品。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度下 Fe²⁺和 Fe³⁺对菠萝蛋白酶活性的影响

在酶液中分别加入不同浓度的 Fe²⁺和 Fe³⁺溶液, 摇匀后, 测定酶活并计算酶活残留率, 结果如图 1 所示。

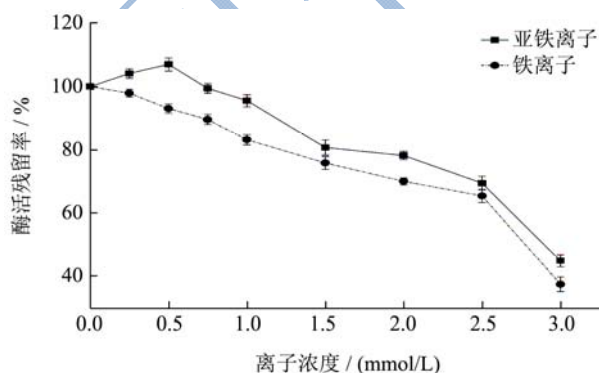


图 1 Fe²⁺和 Fe³⁺对菠萝蛋白酶活性的影响

Fig.1 Effects of Fe²⁺ and Fe³⁺ on the activity of bromelain

从图 1 知: 在 0~0.75 mmol/L 浓度范围内, Fe²⁺对菠萝蛋白酶活性具有明显的促进作用, 且在 0.5

mmol/L 时, Fe²⁺对菠萝蛋白酶活性促进作用最强, 相比于纯酶, Fe²⁺使酶活提高了 6.95%。但 Fe²⁺浓度高于 0.75 mmol/L 时, 对菠萝蛋白酶活性具有显著的抑制作用, 并随着离子浓度的增大, 对酶活的抑制作用增强。在 0~3 mmol/L 浓度范围内, Fe³⁺对菠萝蛋白酶活性具有明显的抑制作用, 离子浓度越大抑制作用越强, Fe³⁺对酶活的抑制作用始终比 Fe²⁺更强。由于菠萝蛋白酶是巯基蛋白酶^[20], 低浓度 (0.5 mmol/L) 的 Fe²⁺对酶活性有促进作用, 可能有以下两个原因: 其一是 Fe²⁺的还原能力比游离巯基强, 能够优于游离巯基被氧化, 对游离巯基起到了保护作用; 其二是已被氧化的巯基能够被 Fe²⁺还原, 进而将失活的酶重新激活^[21]。Fe³⁺降低酶活性的原因可能是 Fe³⁺的加入后, 与酶蛋白结合, 致使酶的构象发生改变, 酶分子的二级结构从有序变成无规卷曲, 从而降低酶活^[12], 后文将结合酶的结构变化进行进一步论述。由于 Fe²⁺极易被氧化为 Fe³⁺, 因此在生产和使用菠萝蛋白酶时, 应该严格控制 Fe²⁺和 Fe³⁺含量。

2.2 不同浓度下 Fe²⁺和 Fe³⁺对菠萝蛋白酶稳定性的影响

将酶液按体积比为 1:1 分别与不同浓度的 Fe²⁺和 Fe³⁺溶液混合, 在 60℃处理不同时间 (0、10、20、40、60、120、180 min) 后, 测定酶活并计算酶活残留率, 结果如图 2 和图 3 所示。

从图 2 和 3 知, 60℃下, 随着热处理时间的延长, 酶液的活性逐渐降低。其中纯酶热处理 60 min 后, 酶活残留率为 50.31%, 当热处理时间超过 120 min, 酶活残留率低于 26%, 酶活损失较高, 说明菠萝蛋白酶是热不稳定的酶。除热处理时间对酶活性的影响外, Fe²⁺和 Fe³⁺的浓度对酶的稳定性也会产生影响。从图 2 知, Fe²⁺对菠萝蛋白酶的稳定性主要表现出抑制作用, 只有在低浓度 (0.5 mmol/L) 时对酶的稳定性表现出轻微的促进作用, 浓度大于 0.5 mmol/L 时, 随着离子浓度的增加, 这种抑制程度越显著。值得注意的是, 当 Fe²⁺浓度为 1 mmol/L 时, 对酶稳定性的抑制作用并不显著。从图 3 知, Fe³⁺对酶的稳定性表现出强抑制作用, 抑制作用随浓度增加而增强。Fe³⁺对酶的抑制作用比 Fe²⁺强。Fe²⁺和 Fe³⁺与菠萝蛋白酶在 60℃处理 60 min 后, 当 Fe²⁺和 Fe³⁺离子浓度均为 0.5 mmol/L 时, 酶活残留率分别为 55.87%和 47.21%, 相比于纯酶液, Fe²⁺使酶活提高了 5.56%, Fe³⁺使酶活降低了 2.73%。但浓度在 2~3 mmol/L 范围内的 Fe²⁺、Fe³⁺与酶在 60℃下处理 120 min 后, 酶活残留率均低于 9%, 尤其是处

理了 180 min 后, 酶活残留率均低于 5%, 酶几乎无活性。说明酶的稳定性与 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 浓度密切相关, 且 Fe^{3+} 对酶稳定性的影响更大。

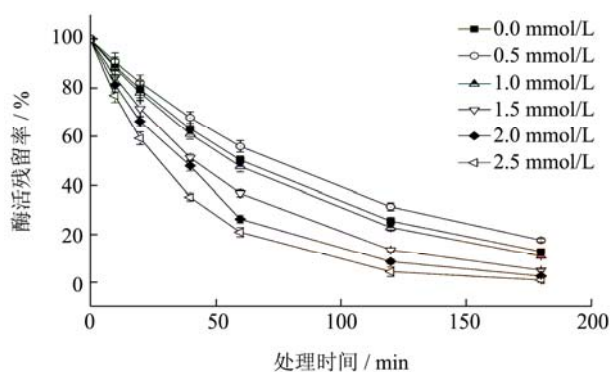


图 2 60 °C 下 Fe^{2+} 对菠萝蛋白酶稳定性的影响

Fig.2 Effect of Fe^{2+} on the thermostability of bromelain at 60 °C

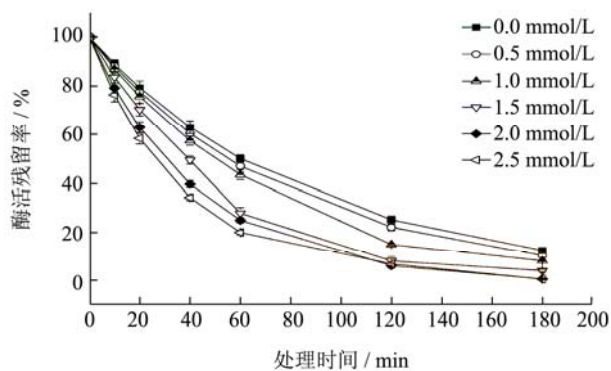


图 3 60 °C 下 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶稳定性的影响

Fig.3 Effect of Fe^{3+} on the thermostability of bromelain at 60 °C

2.3 60 °C 下 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶半衰期的影响

60 °C 下不同浓度的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶半衰期的影响, 如图 4 和图 5 所示。

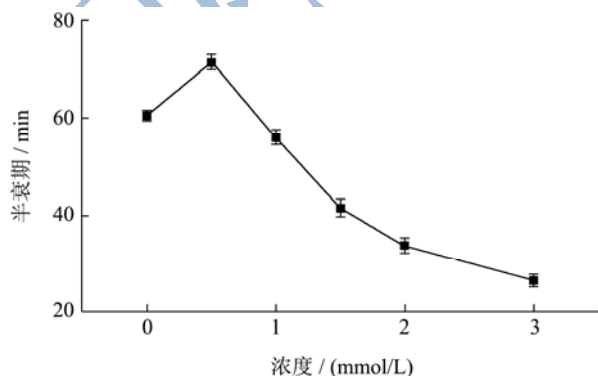


图 4 Fe^{2+} 对菠萝蛋白酶在 60 °C 半衰期的影响

Fig.4 Effect of Fe^{2+} on the half-life of bromelain at 60 °C

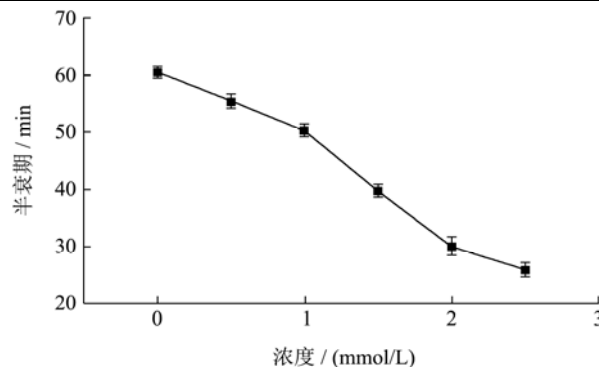


图 5 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶在 60 °C 半衰期的影响

Fig.5 Effect of Fe^{3+} on the half-life of bromelain at 60 °C

从图 4 知: 60 °C 下纯酶的半衰期为 60.54 min, 当 Fe^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时, 此时酶的半衰期为 71.43 min, 比纯酶延长了 10.93 min。除浓度为 0.5 mmol/L 外, 浓度大于 0.5 mmol/L 时, 均显著缩短了菠萝的半衰期, 且随着浓度的增加, 酶的半衰期也越来越短。从图 5 知: 60 °C 下纯酶的半衰期为 60.54 min, Fe^{3+} 加入酶液后, 极大地缩短了酶的半衰期, 半衰期与酶液中 Fe^{3+} 含量成反比。由 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶半衰期的影响可知, Fe^{3+} 对酶的热稳定性作用效果更差。

2.4 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶二级结构影响

由上述实验结果可知, 浓度大于 1 mmol/L 的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶活和热稳定性均具有抑制作用, 且离子浓度越大, 抑制作用越强。为探究 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶活和热稳定性的抑制机理, 实验取浓度均为 2 mmol/L 的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 加入酶液后, 在 60 °C 下处理 40 min 后, 采用圆二色谱测定酶的二级结构, 并用 CDPro 软件中的 continll 算法对其二级结构进行计算。对照组为纯酶液, 其他条件一致, 实验结果如表 2 所示。

表 2 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶作用后二级结构含量的变化

Table 2 Percentage of secondary structures in bromelain

treated with Fe^{2+} and Fe^{3+}

组别	A-Helix/%	B-Sheet/%	B-Tum/%	Random/%
对照组	3.90	44.20	22.00	29.80
Fe^{2+}	3.70	44.10	21.70	30.60
Fe^{3+}	3.30	43.00	21.00	32.60

从表 2 知, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶二级结构的影响, 与对照组相比, 主要表现在 α -螺旋含量下降, β -折叠和 β -转角含量稍下降, 无规卷曲含量明显提高。且对酶抑制作用更强的 Fe^{3+} 处理酶液后, α -螺旋、 β -折叠和 β -转角下降幅度比 Fe^{2+} 更快, 无规卷曲含量升高的幅度比 Fe^{2+} 更快。由此进行初步推断, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶抑制作用主要是通过改变酶的构象, α -螺旋含量下降, 肽链变的松散, 酶分子由有序结构变成无规卷

曲, 从而降低酶活力, 酶活力降低程度与酶二级构象的变化程度相关。赵力超等人^[8]通过 CD 图谱发现, 对菠萝蛋白酶产生抑制作用的 Cu^{2+} 和 SDS, 主要是降低 α -螺旋度, 不同程度提高 β -折叠、 β -转角以及无规卷曲含量, 改变酶的二级构象, 使其二级结构变得松散, 从而降低酶的活性, 与本文结果一致。若要进一步探究 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶抑制作用的机理, 需进行傅里叶红外光谱、荧光光谱以及紫外吸收表征分析。

2.5 EDTA-2Na 结合超滤膜法除铁离子结果

经 EDTA-2Na 结合超滤膜法除铁离子的结果如表

表 3 EDTA-2Na 结合超滤膜法除铁离子结果

Table 3 Results of iron ion removal with a method combining EDTA disodium salt and ultrafiltration

	铁含/(mg/kg, 湿重)	水分含量/%	铁含量/(mg/kg, 干重)	酶活/(U/mg, 湿重)	酶活/(U/mg, 干重)
盐析酶沉淀	80.17±0.21	72.51	291.63±0.77	164.19±6.32	597.27±23.00
EDTA-2Na 结合超滤膜法处理的盐析酶沉淀	37.95±0.45	73.46	142.99±1.71	214.58±5.91	808.52±22.27

3 结论

3.1 研究表明: Fe^{2+} 在离子浓度为 0~0.75 mmol/L 范围内, 对菠萝蛋白酶活性有促进作用, 以 0.5 mmol/L 促进效果最佳, 但离子浓度大于 0.75 mmol/L 时, 抑制酶活, 且随离子浓度增加, 抑制程度增强。 Fe^{3+} 对菠萝蛋白酶只有抑制作用, 抑制程度与 Fe^{3+} 浓度成正比, 且 Fe^{3+} 对酶的抑制作用强于 Fe^{2+} 。60 °C 下, Fe^{2+} 在离子浓度为 0.5 mmol/L 对菠萝蛋白酶的稳定性表现出促进作用, 延长了酶的半衰期, 延长 10.93 min。当 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 离子浓度大于 0.5 mmol/L 时, 2 种离子对酶稳定性均是抑制作用, 离子浓度越高, 抑制作用越强。采用圆二色谱检测酶的二级结构表明: Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对酶抑制作用主要是通过改变酶的构象, α -螺旋含量下降, 肽链变的松散, 酶分子由有序结构变成无规卷曲, 从而降低酶活力。低浓度 (0.5 mmol/L) 的 Fe^{2+} 对酶活性有促进作用, 可能与其还原性有关, 但 Fe^{2+} 极其不稳定, 易被氧化成 Fe^{3+} , 因此在酶的制备和使用中, 要密切注意这两种离子的浓度。

3.2 EDTA-2Na 结合超滤膜法除铁的效果很明显, 与单独使盐析法相比铁含量 (干重) 从 291.63 mg/kg 降低到 142.99 mg/kg, 铁离子去除率达 50.97%, 酶活由 597.27 U/mg 上升到 808.52 U/mg, 酶活提高了 26.13%。此方法虽可以有效降低铁离子含量, 提高酶活, 但是要达到医药用酶的标准, 需进一步对酶进行 4~5 次精制处理。

参考文献

3 所示。

酶液超滤后, 在浓缩液中加入 EDTA-2Na, 可络合酶液中金属离子, 降低金属离子的含量。盐析, 进一步对酶进行了纯化。从表 3 可知, 经 EDTA-2Na 结合超滤膜法除铁的效果很明显, 铁离子含量 (干重) 从 291.63 mg/kg 降低到 142.99 mg/kg, 铁离子去除率达 50.97%, 其酶活也由 597.27 U/mg 上升到 808.52 U/mg, 酶活提高了 26.13%。要使酶中的离子含量达到医药用酶的标准还需要将酶溶解后按上述实验方法进行 4~5 次精制处理。

- [1] 杨筱静. 菠萝蛋白酶活力研究与应用[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(9): 40-4
YANG Xiao-jing. Study on bromelain and its application [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2009, 15(9): 40-42
- [2] Nadzirah K Z, S Zainal, A Noriham, et al. Application of bromelain powder produced from pineapple crowns in tenderising beef round cuts [J]. International Food Research Journal, 2016, 23(4): 1590-1599
- [3] Ram Saran Chaurasiya H Umesh Hebber, P Z Sakhare, N Bhaskar, et al. Efficacy of reverse micellar extracted fruit bromelain in meat tenderization [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(6): 3870-3880
- [4] Z I M Arshad, A Amid, I Jaswir, et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(17): 7283-97
- [5] Marcia Maria dos Anjos, Angela Aparecida da Silva, Isabela Carolini de Pascoli, et al. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 216: 121-126
- [6] Kaur T, Kaur A, Grewal R K. Kinetics studies with fruit bromelain (*Ananas comosus*) in the presence of cysteine and divalent ions [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(9): 5954-5960
- [7] 王晓敏, 刘智均, 胡秀沂, 等. Ca^{2+} 和聚乙二醇对菠萝蛋白酶活性和热稳定性的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(9): 870-872
WANG Xiao-min, LIU Zhi-jun, HU Xiu-yi, et al. Effects of

- Ca²⁺ and polyethylene glycol on the activity and thermostability of bromelain [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(9): 870-872
- [8] 赵力超,陈洁兰,王燕,等.不同抑制剂和激活剂对菠萝茎蛋白酶酶学特性的影响[J].*食品工业科技*,2013,34(15):71-79
ZHAO Li-chao, CHEN Jie-lan, WANG Yan, et al. Study on the structure-activity relationship of stem bromelain in different inhibitors and activators [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(15): 71-79
- [9] 王晓敏,刘智均,胡秀沂,等.Ca²⁺对菠萝蛋白酶热稳定性和二级结构的影响[J].*食品工业科技*,2009, 30(1):153-56
WANG Xiao-min, LIU Zhi-jun, HU Xiu-yi, et al. Effects of Ca²⁺ on thermostability and secondary structure of bromelain [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(1): 153-56
- [10] 曾霖霖,黄惠华.不同金属离子对菠萝蛋白酶活性及热稳定性的影响[J].*食品工业*,2009,29(5):4-6
ZENG Lin-lin, HUANG Hui-hua. Effects of different metal ions on bromelain in activity and thermostability [J]. *The Food Industry*, 2009, 29(5): 4-6
- [11] 黄志坚,董瑞兰,罗刚,等.菠萝蛋白酶部分酶学性质的研究[J].*福建农业学报*,2014,29(1):62-66
HUANG Zhi-jian, DONG Rui-lan, LUO Gang, et al. Study of enzymatic properties of bromelain [J]. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2014, 29(1): 62-66
- [12] 易元龙,李媚,谢涛,等.菠萝果浸提液中菠萝蛋白酶的稳定性研究[J].*广西民族大学学报(自然科学版)*,2008,14(4):76-78
YI Yuan-long, LI Mei, XIE Tao, et al. Study on the stability of bromelain in pineapple fruit extract [J]. *Journal of Guangxi University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2008, 14(4): 76-78
- [13] 叶剑芝,韩志萍,苏子鹏,等.微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定菠萝蛋白酶中无机元素的含量[J].*食品工业科技*,2014,35(1):295-298
YE Jian-zhi, HAN Zhi-ping, SU Zi-peng, et al. Determination of the contents of inorganic elements in bromelain by microwave digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(1): 295-298
- [14] 赵力超,王燕,何凤林,等.多糖和添加剂对菠萝茎蛋白酶活性的影响[J].*食品科学*,2011,32(15):225-229
ZHAO Li-chao, WANG Yan, HE Feng-lin, et al. Effects of additives on bromelain activity [J]. *Food Science*, 2011, 32(15): 225-229
- [15] 任增超,左伟,周春霞,等.超滤对罗非鱼下脚料蛋白酶解物功能特性的影响[J].*现代食品科技*,2012,9:1133-1135
REN Zeng-chao, ZUO Wei, ZHOU Chun-xia, et al. Effect of ultrafiltration on functional properties of protein hydrolysate from tilapia by-products [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 9: 1133-1135
- [16] 中华人民共和国国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2000
National pharmacopoeia Committee of the people's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000
- [17] 余以刚,肖性龙.食品质量与安全检验实验[M].北京:中国质检出版社,2014
YU Yi-gang, XIAO Xing-long. *Food quality and safety inspection experiment* [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2014
- [18] 成娟,胡久梅,李婧,等.火焰原子吸收光谱法测定山药中微量元素含量[J].*中国实验方剂学杂志*,2012,18(24):154-156
CHENG Juan, HU Jiu-mei, LI Jing, et al. Determination of trace elements content in dioscoreae rhizoma by flame atomic absorption spectrometric [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2012, 18(24): 154-156
- [19] 韩志萍,黄茂芳,静玮,等.超滤分离纯化菠萝蛋白酶的研究[J].*食品工业科技*,2013,37(8):282-286
HAN Zhi-ping, HUANG Mao-fang, JING Wei, et al. Study on the isolation and purification of bromelain using ultra-filtration [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 37(8): 282-286
- [20] López-García B, Hernández M, Segundo B S. Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(55): 62-67
- [21] 孔繁东,谭奇敏,王晓虎.影响生姜蛋白酶稳定性因素的探讨[J].*中国调味品*,2012,37(1):22-24
KONG Fan-dong, TAN Qi-min, WANG Xiao-hu. Discussion on the factors effect the stability of ginger protease [J]. *China Condiment*, 2012, 37(1): 22-24