

响应面法优化超滤提取菠萝蛋白酶工艺条件

唐梅, 劳斌基, 林远敢, 杨燕, 李媚, 李日明, 廖安平*

(广西民族大学化学化工学院, 广西南宁 530006)

摘要: 采用超滤法从菠萝加工下脚料中提取菠萝蛋白酶。考察膜截留分子量、压力、超滤 pH 和超滤时间等因素对酶活截留率的影响。在单因素试验的基础上, 根据中心组合设计原理, 采用四因素三水平的响应面法对超滤条件进行优化, 依据回归方程对各影响因素进行分析, 获得最佳提取工艺条件为: 膜截留分子量 20 kD, 压力 0.14 MPa, 超滤 pH 3.98, 超滤时间 42 min, 在最优条件下, 菠萝蛋白酶的酶活截留率达 93.8%。

关键词: 超滤; 菠萝蛋白酶; 提取; 响应面法

Optimization the Process Conditions of Ultrafiltration Extraction Bromelain by Response Surface Methodology

TANG Mei, LAO Bin-ji, LIN Yuan-gan, YANG Yan, LI Mei, LI Ri-ming, LIAO An-ping*

(School of Chemistry and Chemical Engineering of Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, Guangxi, China)

Abstract: Ultrafiltration method was used to extract bromelain from pineapple process scraps. The influences of membrane intercept, molecular weight, pressure, ultrafiltration pH value and ultrafiltration time on the rate of enzyme activity intercept were investigated. 4 factors at 3 levels response surface methodology which follows by Box-Behnken principle was carried out to optimize process conditions on the base of single factor experiment. According to the analysis of regression equation, the optimum extraction conditions were found to be: membrane intercept molecular weight 20 kD, pressure 0.14 MPa, ultrafiltration pH 3.98, ultrafiltration time 42 min which resulted in activity recovery of 93.8%.

Key words: ultrafiltration; bromelain; extraction; response surface method

菠萝蛋白酶简称菠萝酶, 是一种纯天然的植物蛋白酶, 可以从菠萝茎、叶、果、皮渣等各个部位提取。菠萝是凤梨的俗称。广泛的分布于热带、亚热带地区, 是世界重要的水果之一, 我国是菠萝生产大国, 主要在广东、广西、海南、福建、云南等热区省种植^[1-5]。菠萝成熟之后由于保鲜期很短, 一般不超过半个月, 所以, 除少部分直接零售外, 其他大部分被加工成罐头、果脯

和菠萝汁。而罐头加工厂仅利用了果实部分, 产生大量的菠萝皮渣, 这些皮渣除了少部分用作肥料外, 大部分都被丢弃。本试验通过用菠萝皮渣生产菠萝蛋白酶, 不仅可以减少环境的污染, 还可以使企业利益最大化。

菠萝蛋白酶的活动中心为巯基(-SH), 属于巯基蛋白酶^[6-7], 能分解蛋白质、脂和酰胺等进行各种生化反应, 广泛应用于食品、医药和轻化工等行业上^[8-13]。近年来, 为找出既能保护酶的活性, 又能提高其产率的菠萝蛋白酶提取方法, 研究人员开展了大量研究^[14-15]。传统的提取方法是高岭土吸附法, 单宁沉淀法和超滤浓缩法^[16]。高岭土法和单宁法共同存在的问题是工艺操作复杂繁琐, 所用的原材料会对环境造成污染, 而且酶活回收率低, 超滤法利用分子截留的原理把大部分杂质以及大于或小于目标蛋白酶分子量的物质通

基金项目: 广西科学研究与技术开发项目(桂科攻 10124008-13); 广西自然科学基金项目(桂科能 0992028-13); 广西高校人才小高地建设创新团队项目(桂教人[2011]47); 南宁市科学研究与技术开发项目(20060214A); 地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201310608018)

作者简介: 唐梅(1987—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 生物与化工过程强化研究。

* 通信作者: 廖安平(1964—), 男(汉), 教授, 硕士生导师。

过过滤除去,从而达到提纯浓缩的目的。此法操作步骤简单,条件好控制,无需大型仪器设备投入,而且生产的菠萝蛋白酶活性高,纯度高,最重要的是基本上没其他废物排放,所以超滤法越来越受到关注。

响应面法(response surface methodology, RSM)是一种较好的试验优化方法,考虑了试验随机误差,同时,它将复杂的未知的函数关系运用图形技术显示出来,并采用一次或多元二次回归方程来拟合,通过对响应面等值线的分析寻求最优工艺参数,计算方便^[17-19]。菠萝皮渣作为菠萝加工的副产品,产量巨大,约占总果质量 50%~60%。本文以菠萝皮渣为原料,从中提取菠萝蛋白酶,由于酶会受到多种因素的影响,而且各个因素之间还存在着交互作用。所以,采用响应面法中的中心组合设计法(Box-Behnken Design, BBD)对影响菠萝蛋白酶提取的各个因素进行优化,获得较优提取工艺条件,从而得到最大的菠萝蛋白酶提取率。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

菠萝加工下脚料:广西南宁某菠萝加工企业;聚醚砜超滤膜:上海摩速科学器材有限公司;氮气:南宁蓝天实验设备有限公司;干酪素(BR):北京奥博星生物科技有限公司;三(羟甲基)氨基甲烷(BR)、L-半胱氨酸(BR):国药集团化学试剂有限公司;盐酸、冰乙酸、三水乙酸钠、三氯乙酸均为分析纯试剂。

1.2 仪器

TU-1810 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限公司;C501-3C 超级恒温器:重庆四达实验仪器有限公司;SJ-5000 型特级捣碎机:广州闪明电器有限公司;pHS-3C 精密 pH 计:上海雷磁;TGL-16G 冷冻高速离心机:上海安亭科学仪器厂;THS-15 数控超级恒温槽:宁波天恒仪器厂;CJJ78-1 磁力加热搅拌器:上海精风仪器有限公司;MSC300 杯式超滤器:上海摩速科学器材有限公司。

1.3 方法

取一定质量的菠萝加工下脚料,洗干净,将其晾干,放入榨汁机中,汁液先用 200 目的纱布过滤,得到的滤液在 8 000 r/min, 4 ℃ 的条件下冷冻离心 10 min, 倒出上清液,并存放于 4 ℃ 的冰箱备用。称取一定质量的菠萝上清液,在一定条件下进行超滤,一段时间后,得到截留液和透过液,分别测其体积,并取 1 mL 截留液和透过液进行酶活性的测定,计算出酶活截留率 Y 。酶活截留率 Y 按式(1)计算。

$$\text{菠萝蛋白酶活截留率}(Y)\% = \frac{\text{截留液中菠萝蛋白酶的总酶活}}{\text{原进料液的总酶活}} \times 100 \quad (1)$$

1.4 分析方法

菠萝蛋白酶活性采用 F.I.P.法测定^[20]。准备两支 15 mL 的试管,准确量取 2.5 mL 的底物溶液分别放入两支试管中,把超级恒温槽调至 35 ℃,然后量取 2.5 mL 的酶制备溶液,放入另外两支分别写着主值和空白的试管中,把主值和空白试管放入(35±0.20)℃的恒温槽预热 2 min。主值试管加入底物溶液混合,摇动试管,精确保温 10 min,之后加入 5.0 mL 的蛋白质凝固剂,终止反应。空白试管加入 5.0 mL 蛋白质凝固剂之后,再迅速加入经预热酶制备溶液,然后水浴保温 30 min,过滤,以空白值为参比液,在波长 275 nm 下,用分光光度计测定其吸光度。一个 F.I.P.法菠萝蛋白酶活性单位定义为:在规定条件下[(35±0.20)℃;pH 值 7.0],每分钟水解酪蛋白释出的三氯乙酸可溶物肽在 275 nm 下测得的吸光度与 1 μmol 酪氨酸(相对分子量为 181.20)所产生的吸光度相等。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

以酶活截留率为考察指标,选择膜截留分子量、压力、超滤 pH 和超滤时间 4 个影响菠萝蛋白酶提取效果的因素进行单因素试验,通过分析,确定影响菠萝蛋白酶提取效果的相关因素大小,也为响应面试验提供合理的取值范围。

2.1.1 膜截留分子量对酶活截留率的影响

称取 5 份等质量的菠萝上清液(pH 3.68),在相同条件下,分别用 10、20、30、50、100 kD 的超滤膜在压力为 0.2 MPa 下超滤 60 min,以菠萝蛋白酶的酶活截留率为考察指标,研究膜截留分子量对酶活截留率的影响,试验结果如图 1。

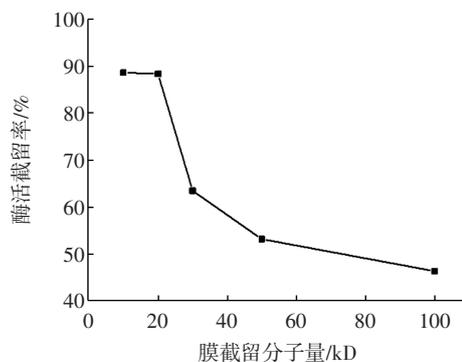


图 1 膜截留分子量对酶活截留率的影响

Fig.1 Effect of ultrafiltration membrane molecular weight on the enzyme activity intercept rate

从图 1 可以看出,当膜截留分子量增大时,酶活截留率逐渐减小,在 10 kD 时,酶活截留率为 88.65 %,

20 kD 时,酶活截留率为 88.37%,酶活截留率减小幅度不大,当使用 30 kD 的超滤膜时,酶活截留率减小到 63.48%,使用 100 kD 时,酶活截留率最低,为 46.37%。由于菠萝蛋白酶的分子量为 26 kD~33 kD 左右,用膜截留分子量为 10 kD 的超滤膜超滤时,会有很多杂蛋白,因此,选择 20 kD 的超滤膜进行超滤。

2.1.2 压力对酶活截留率的影响

选择 20 kD 的超滤膜,称取 3 份等质量的菠萝上清液(pH 3.68),在不同压力下进行超滤 60 min,以菠萝蛋白酶的酶活截留率为考察指标,研究压力对酶活截留率的影响,结果如图 2。

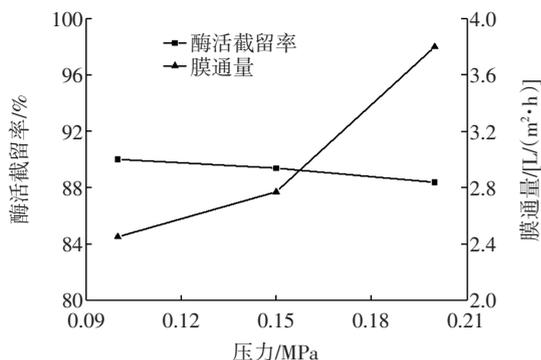


图 2 压力对酶活截留率的影响

Fig.2 Effect of pressure on the enzyme activity intercept rate

由图 2 可以看出,随着压力的增大,酶活截留率变化幅度不大,当压力在 0.1 MPa 时,酶活截留率是 90.21%,压力为 0.15 MPa 时,酶活截留率为 89.32%,压力为 0.2 MPa 时,酶活截留率是 88.37%,在一定压力范围内,压力越大,超滤膜的膜通量越大,为了有较高的酶活截留率的同时,又能保证超滤的速率,选取 0.15 MPa 作为超滤压力为宜。

2.1.3 超滤 pH 对酶活截留率的影响

选择 20 kD 的超滤膜,称取 5 份等质量的菠萝上清液,超滤压力 0.15 MPa,超滤时间 60 min,以菠萝蛋白酶的酶活截留率为考察指标,研究超滤 pH 对酶活截留率的影响,结果见图 3。

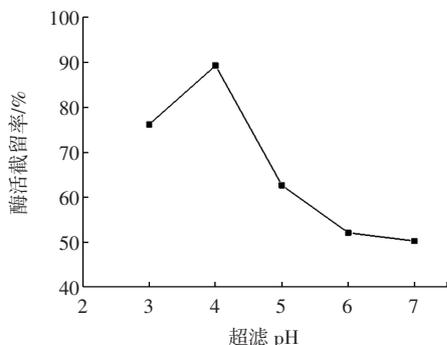


图 3 超滤 pH 对酶活截留率的影响

Fig.3 Effect of ultrafiltration pH on the enzyme activity intercept rate

由图 3 可以看出,酶活截留率随着超滤 pH 的增大而先升高后降低,在超滤 pH4 时,酶活截留率达到最高,为 89.32%,超滤 pH>4 之后,酶活截留率大幅度降低,所以选择超滤 pH4 为好。

2.1.4 超滤时间对酶活截留率的影响

选择 20 kD 的超滤膜,称取 5 份等质量的菠萝上清液,压力 0.15 MPa,超滤 pH4,以菠萝蛋白酶的酶活截留率为考察指标,研究超滤时间对酶活截留率的影响,如图 4 所示。

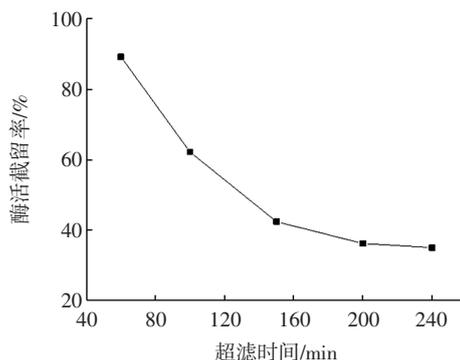


图 4 超滤时间对酶活截留率的影响

Fig.4 Effect of ultrafiltration time on the enzyme activity intercept rate

如图 4 所示,随着超滤时间的延长,酶活截留率呈下降趋势,60 min 时酶活截留率最大,240 min 时,酶活截留率下降到 34.93%,原因可能是随着时间的延长,菠萝蛋白酶失活而使酶活截留率下降。所以选取超滤时间为 60 min。

2.2 响应面法优化菠萝蛋白酶提取工艺条件

根据中心组合试验设计原理,在单因素的基础上,选取膜截留分子量 X_1 、压力 X_2 、超滤 pH X_3 、超滤时间 X_4 为自变量,以菠萝蛋白酶酶活截留率为响应值,设计了四因素三水平共 29 个试验点的 BBD 响应面试验进行优化试验,试验因素及水平见表 2,试验设计及结果见表 3。

表 2 响应面分析因素及水平表

水平	因素			
	X_1 膜截留分子量/kD	X_2 压力/MPa	X_3 超滤 pH	X_4 超滤时间/min
-1	10	0.1	3	30
0	20	0.15	4	60
1	30	0.2	5	90

2.3 回归模型方差分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合,得到菠萝蛋白酶的酶活截留率 Y 对

表 3 响应面试验设计及结果分析

Table 3 The design of experiment and result analysis of response surface

试验号	X ₁ 膜截留分子量/kD	X ₂ 压力/MPa	X ₃ 超滤 pH	X ₄ 超滤时间/min	酶活截留率 Y/%
1	20	0.1	3	60	69.16
2	10	0.1	4	60	82.83
3	30	0.1	4	60	66.31
4	20	0.15	4	60	89.46
5	10	0.15	4	30	88.16
6	20	0.15	5	90	39.94
7	30	0.2	4	60	79.90
8	30	0.15	4	30	87.56
9	20	0.2	3	60	76.21
10	20	0.15	4	60	88.92
11	20	0.15	4	60	89.14
12	20	0.15	4	60	89.31
13	10	0.15	3	60	70.87
14	20	0.15	3	90	55.90
15	20	0.1	5	60	55.22
16	20	0.2	5	60	44.16
17	10	0.15	5	60	79.78
18	20	0.2	4	90	70.84
19	20	0.15	4	60	88.42
20	20	0.1	4	90	59.50
21	20	0.15	3	30	76.82
22	10	0.15	4	90	75.14
23	20	0.15	5	30	72.42
24	20	0.2	4	30	81.24
25	30	0.15	5	60	50.62
26	10	0.2	4	60	77.08
27	30	0.15	3	60	63.18
28	30	0.15	4	90	54.04
29	20	0.1	4	30	84.84

自变量 X₁、X₂、X₃ 和 X₄ 的二次多项回归方程:

$$Y=89.05-6.02X_1+0.96X_2-5.83X_3-11.31X_4+4.83X_1X_2-5.37X_1X_3-5.13X_1X_4-4.53X_2X_3+3.74X_2X_4-2.89X_3X_4-4.33X_1^2-7.85X_2^2-19.48X_3^2-7.96X_4^2 \quad (2)$$

方程中的二次项的系数均为负数,方程表征的抛物线开口向下,有极大值点,对上述回归模型进行方差分析,见表 4。

对模型进行分析,从表 4 可以看出,在一次项中,膜截留分子量、超滤 pH 和超滤时间都是显著因素(P<0.05),此外,在二次项中,膜截留分子量、压力、超滤 pH 和超滤时间也均达到显著水平(P<0.05),回归模型 F_{回归}=0.000 1<0.01,表明此回归模型极其显著。模型复相关系数 R²=0.937 5,说明该模型拟合程度较好,不可

表 4 回归模型方差分析表

Table 4 Variance analysis for the regression model

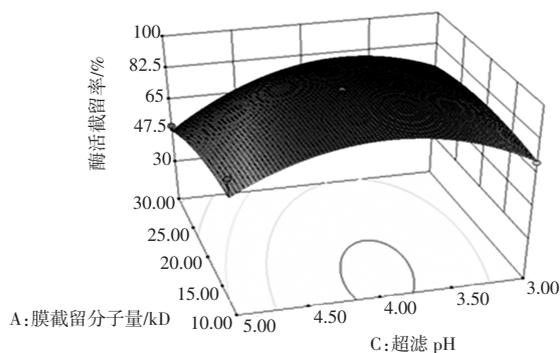
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr>F
模型	5 543.49	14	395.96	15.01	0.000 1
X ₁ 超滤膜分子量	435.01	1	435.01	16.49	0.001 2
X ₂ 压力	11.16	1	11.16	0.42	0.526 0
X ₃ 超滤 pH	408.33	1	408.33	15.48	0.001 5
X ₄ 超滤时间	1 543.09	1	1 543.09	58.16	<0.000 1
X ₁ X ₂	93.51	1	93.51	3.55	0.080 7
X ₁ X ₃	115.24	1	115.24	4.37	0.055 3
X ₁ X ₄	105.06	1	105.06	3.98	0.065 8
X ₂ X ₃	81.99	1	81.99	3.11	0.099 7
X ₂ X ₄	55.8	1	55.8	2.12	0.167 9
X ₃ X ₄	33.41	1	33.41	1.27	0.279 3
X ₁ ²	121.59	1	121.59	4.61	0.049 8
X ₂ ²	399.93	1	399.93	15.16	0.001 6
X ₃ ²	2 461.01	1	2 461.01	93.31	<0.000 1
X ₄ ²	411.34	1	411.34	15.6	0.001 5
残差	369.26	14	26.38		
失拟项	368.6	10	36.86	224.21	<0.000 1
纯误差	0.66	4	0.16		
总和	5 912.75	28			

知的因素对试验的干扰很小。校正后 R²_{adj}=0.875 1,说明此模型能够解释 87.51 %的试验数据的变异性,用此模型可对超滤法提取菠萝蛋白酶工艺进行分析和预测。

2.4 响应曲面图与等高线图的分析

RSM 法等高线图可以直观地反映各因素 X₁、X₂、X₃、X₄ 对响应值 Y 的影响,根据二元二次回归方程绘出相应的响应面及其等高线图 5~图 7。

当压力 X₂ 和超滤时间 X₄ 一定时,膜截留分子量 X₁ 和超滤 pH X₃ 的交互作用对菠萝蛋白酶酶活截留率的影响见图 5。由图可看出,当 X₁ 不变时,X₃ 在一定范围内(3~4),随着超滤 pH 的增大,酶活截留率呈明显的上升趋势,之后慢慢下降。膜截留分子量在 10 kD~30 kD 时,酶活截留率上升并达到极大值。



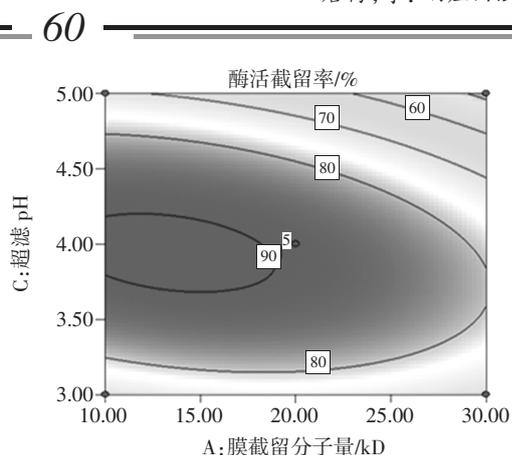


图5 膜截留分子量和超滤 pH 对菠萝蛋白酶提取影响的响应面和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots of the bromelain as affected by membrane intercept molecular weight and ultrafiltration pH

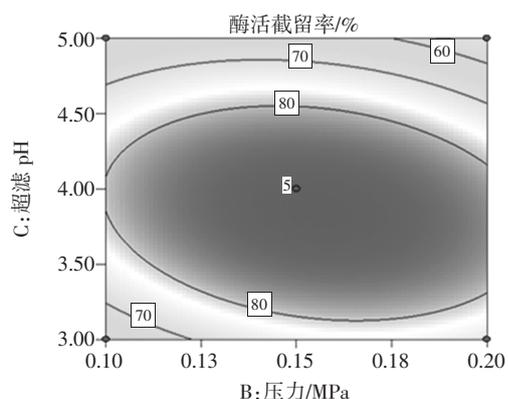
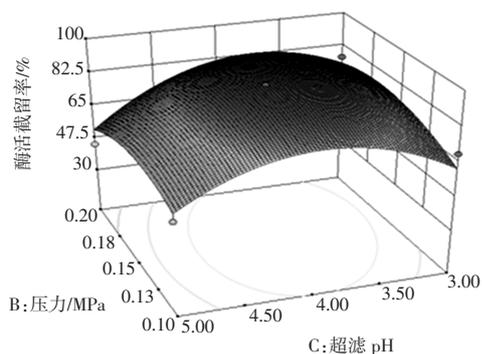


图6 超滤 pH 和压力对菠萝蛋白酶提取影响的响应面和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plot of the bromelain as affected by ultrafiltration pH and the pressure

膜截留分子量 X_1 和超滤时间 X_4 一定时,压力 X_2 和超滤 pH X_3 的交互作用对菠萝蛋白酶酶活截留率的影响见图 6,由图可以看出,当 X_2 固定不变时, X_3 在一定范围内(3~4),酶活截留率随着超滤 pH 的增加而上升,之后下降。压力在 0.1 MPa~0.16 MPa 范围内,酶活截留率呈上升趋势并有极大值。

膜截留分子量 X_1 和压力 X_2 一定时,超滤 pH X_3 和超滤时间 X_4 的交互作用对菠萝蛋白酶酶活截留率的

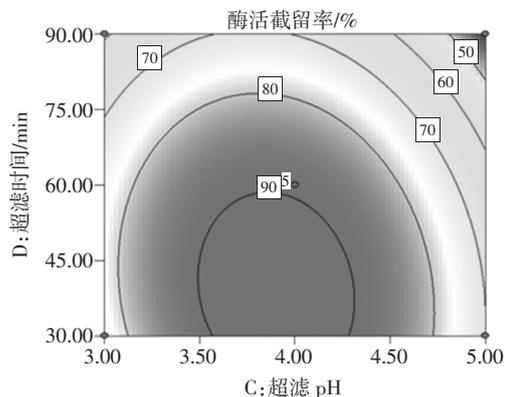
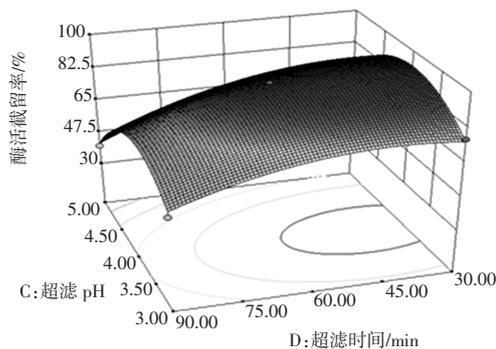


图7 超滤时间和超滤 pH 对菠萝蛋白酶提取影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plot of the bromelain as affected by ultrafiltration time and ultrafiltration pH

影响见图 7。由图可看出,当 X_3 固定时, X_4 在 30 min~60 min 时,酶活截留率随着时间的增加有上升趋势,之后下降。超滤 pH 为 3~4 时,酶活截留率称上升趋势并有极大值。

2.5 验证试验

通过软件 Design-Expert8.0.6 分析得到超滤法提取菠萝蛋白酶的最佳条件为:膜截留分子量 20 kD,压力 0.14 MPa,超滤 pH 3.98,超滤时间 42 min。模拟最大酶活回收率为 93.8%。由于超滤膜尺寸的特殊性,在此用 20 kD 的超滤膜对以上条件做验证试验,重复 3 次试验取平均值,验证的试验结果如表 5。

表 5 验证试验的结果

Table 5 The results of validation experiments		
编号	酶活截留率/%	平均酶活截留率/%
1	93.14	93.19
2	93.19	
3	93.23	

3 结论

通过试验研究证明,将单因素试验与 Central Composite Design 联合起来应用于菠萝蛋白酶提取工

艺中是可行的,单因素试验结果表明,膜截留分子量 20 kD、压力 0.15 MPa,超滤 pH4,超滤时间 60 min 时,可较好的提取菠萝蛋白酶。为了进一步优化工艺参数,对以上几个因素进行 Box-Behnken Design 响应面试验,用 Design-Expert8.0.6 软件对模型进行二次多元回归拟合,得到二次多项回归方程 $Y=89.05-6.02X_1+0.96X_2-5.83X_3-11.31X_4+4.83X_1X_2-5.37X_1X_3-5.13X_1X_4-4.53X_2X_3+3.74X_2X_4-2.89X_3X_4-4.33X_1^2-7.85X_2^2-19.48X_3^2-7.96X_4^2$ 通过分析,获得最佳条件:膜截留分子量 20 kD,压力 0.14 MPa,超滤 pH 3.98,超滤时间 42 min,回归方程预测 $Y=93.8\%$ 。为了对模型进行验证,在最佳条件下进行 3 次重复试验,试验结果酶活截留率平均值为 93.19%,可见模型是可靠的,利用响应面法分析得到的提取菠萝蛋白酶工艺参数真实可用,在保证酶活截留率的同时,简化了工艺,降低了成本,为提高工业化生产效率奠定了基础。

参考文献:

- [1] 孙伟生,吴青松,孙光明.我国菠萝产业发展现状及对策[J].中国热带农业,2013(3):22-23
- [2] Letícia Celia de Lencastre Novaes,Valéria de Carvalho Santos E-binuma,Priscila GavaMazzola, et al. Polymer-based alternative method to extract bromelain from pineapple peel waste[J].Biotechnology and Applied Biochemistry,2013,60(5):527-535
- [3] 董定超,李玉萍,梁伟红,等.中国菠萝产业发展现状[J].热带农业工程,2009,33(4):13-16
- [4] Arshad ZI,Amid A,Yusof F, et al. Bromelain:an overview of industrial application and purification strategies[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2014,98(17):7283-7297
- [5] 蔡泽祺,胡卫东,翁丽君.广东省湛江地区菠萝产业化发展现状及对策[J].中国热带农业,2009(5):11-13
- [6] 吴茂玉,马超,乔旭光,等.菠萝蛋白酶的研究及应用进展[J].食品科技,2008(8):17-20
- [7] 王燕,赵力超,陈洁兰,等.菠萝蛋白酶工业化提取工艺的改良及酶学性质研究[J].食品工业科技,2011,32(10):353-357
- [8] Ralf Bahde M D Daniel Palme M D Evgeni Minin M D, et al. Bromelain Ameliorates Hepatic Microcirculation After Warm Ischemia[J]. Journal of Surgical Research,2007,139(1):88-96
- [9] Romano B,Fasolino I,Pagano E, et al. The chemopreventive action of bromelain, from pineapple stem (Ananas comosus L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects[J]. Mol Nutr Food Res,2014,58(3):457-465
- [10] 季皓.菠萝蛋白酶对肌肉拉伤治疗作用的研究[J].中国保健营养,2013(2):553-554
- [11] Pandjaitan,Maruli,Nugraha. Bromelain Enzyme in Fresh Pineapple Juice as a Healing Pathway for HIV/AIDS[J]. Advanced Science, Engineering and Medicine,2014,6(1):119-123
- [12] D.Swaroop Rani,Krishna Nand. Ensilage of pineapple processing waste for methane generation[J].Waste Management,2004(24):523-528
- [13] Katya Chobotova,Ann B Vernallis,Fadzilah Adibah Abdul Majid. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent:Current evidence and perspectives[J].Cancer Letters, 2010,290(2):148-156
- [14] 李淑喜,黎新明.菠萝蛋白酶的提取及其在医药中的应用[J].广州化工,2009,37(2):52-53,57
- [15] D F Coelho, E Silveira, A Pessoa Junior, et al. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate)[J].Bioprocess Biosyst Eng,2013,36(2):185-192
- [16] 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
- [17] 何为,薛卫东,唐斌.优化试验设计方法及数据分析[M].北京:化学工业出版社,2012:218-245
- [18] 陈霞,石维忱,翟明昌,等.响应面优化大麦中热稳定蛋白质的提取条件[J].食品研究与开发 2010, 31(9):11-14
- [19] 俞坚.响应面分析优化加压溶剂法提取甜菊糖苷工艺[J].食品研究与开发,2014,35(7):43-47
- [20] 施特尔马赫.酶的测定方法[M]. 钱嘉渊,译.北京:中国轻工业出版社,1992:9-101

收稿日期:2015-01-16