

固定化木瓜蛋白酶的制备和性质研究*

贺 枫 卓仁禧** 刘立建 徐勉懿

(武汉大学化学系国家教育部生物医用高分子材料开放研究实验室 武汉 430072)

摘 要 多孔硅球固定化木瓜蛋白酶具有热增活性.本文在前文研究的基础上,用载体交联法制备了甲壳胺固定化木瓜蛋白酶和纤维素固定化木瓜蛋白酶.考察了固定化 pH 值、戊二醛浓度和给酶量对固定化木瓜蛋白酶活力的影响.研究了固定化木瓜蛋白酶的性质,特别是热稳定性和耐热性,并与溶液酶和多孔硅球固定化木瓜蛋白酶进行了比较.所制得的甲壳胺固定化木瓜蛋白酶和纤维素固定化木瓜蛋白酶的最适反应温度均达到了 80℃;90℃ 温育 1h 后固定化酶的活力保持在 95% 以上;70℃ 温育处理 5h 和 6h 后固定化酶的活力也仍能保持在 90% 以上.固定化木瓜蛋白酶的热稳定性和耐热性得到了显著提高.

关键词 固定化酶, 甲壳胺, 纤维素, 热稳定性

甲壳质是一种大量存在于甲壳动物、昆虫和细菌中的直链多糖,它不溶于稀酸、稀碱以及有机溶剂,具有坚韧、惰性、无毒等特性;经浓碱处理后,其分子的乙酰基部分逐渐水解脱除,成为部分或全部脱去乙酰基甲壳质,也称为甲壳胺.甲壳胺已被广泛用于医药、食品、印染、纺织、造纸、生物工程等领域,它在生物化学领域应用的一个重要方面就是作为固定化酶的载体^[1~3].纤维素是世界上最丰富的有机化合物,广泛地存在于棉、麻、树木、野生植物等中,具有多种不同的形态,均不溶于水和有机溶剂.纤维素结构中存在大量的羟基,可通过各种反应制成多种纤维素衍生物而带有各种活泼基团.纤维素广泛用于酶的固定化领域^[4~6],用载体共价结合法制备固定化酶时,固定化方法多种多样,可适用于不同用途的需要.

酶在高温下的催化反应,不仅可大幅度地提高酶催化反应速度,而且还可大大降低细菌污染的可能性以及提高反应的产率^[7].前文曾首次报道了多孔硅球固定化木瓜蛋白酶的热增活性^[8,9],为高温下的酶促反应提供了很大的可能.本文继续报道以甲壳胺和纤维素为载体、戊二醛为交联剂的固定化木瓜蛋白酶的制备及有关性质,特别是热稳定性和耐热性的研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甲壳胺(脱乙酰度为 80%),广东省遂溪县南

星甲壳素有限公司;纤维素为杭州新华造纸厂生产的大张滤纸;25% (W/V) 戊二醛水溶液, Merck 产品,进口分装;木瓜蛋白酶, Fluka 产品;酪蛋白和半胱氨酸为生化试剂,其它试剂均为分析纯试剂.岛津 UV-240 紫外可见分光光度计.

1.2 实验方法

1.2.1 多孔硅球的活化及烷基化 氨丙基多孔硅球按文献方法^[10]制备.

1.2.2 甲壳胺的纯化 称取 10g 甲壳胺粗产品,溶于 200mL 的 2% 乙酸水溶液中,滤去不溶物,搅拌下向滤液中滴加 10% 的氢氧化钠溶液,将产生的沉淀过滤,滤出物在蒸馏水中浸泡 24h,然后用 2mol/L 的盐酸调节溶液的 pH 值至中性,过滤后用蒸馏水充分洗涤,再把滤出物于丙酮溶液中浸泡 48h,50℃ 下真空干燥至恒重.

1.2.3 胺化纤维素的制备^[11] 滤纸纤维素用 3mol/L 氢氧化钠溶液浸泡 24h,得到的纸浆用蒸馏水充分洗涤,得到较均匀的纤维素.将 50g 纤维素悬浮于 150mL 的 1mol/L 氢氧化钠溶液中,加入 30mL 的环氧氯丙烷,于 60℃ 温育反应 30min,过滤,水洗后,再加入 10g 对苯二胺水溶液,于 45℃ 下反应 30min,用蒸馏水充分洗涤,真空干燥至恒重.

1.2.4 固定化酶的制备 分别以氨丙基多孔硅球、甲壳胺(脱乙酰度为 80%)和胺化纤维素为载体,利用戊二醛载体交联法,制备固定化木瓜蛋白酶.具体方法如下:在锥形瓶中加入 0.5g 载体,一定

pH 值的 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (内含 0.005mol/L 半胱氨酸和 0.001mol/L EDTA), 以及一定量木瓜蛋白酶和 25% 戊二醛溶液, 室温下搅拌 12h, 抽滤, 所制备的固定化酶用 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液充分洗涤, 室温下真空干燥至恒重.

1.2.5 酶活力的测定^[12] (1) 固定化酶活力的测定方法为, 在试管中加入 1mL 的 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0, 内含 0.005mol/L 半胱氨酸和 0.001mol/L EDTA), 4mL 2% 酪蛋白溶液 (pH=7.0), 37℃ 水浴中预热 5min, 然后加入一定量的固定化酶, 于 37℃ 反应 30min 后加入 5mL 10% 三氯乙酸溶液, 振荡后于 37℃ 放置 10min, 过滤, 测滤液在 280nm 处的吸光度. (2) 溶液酶活力的测定方法为, 将酶溶于 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0, 内含 0.005mol/L 半胱氨酸和 0.001mol/L EDTA) 中, 配成 0.2mg/mL 的原酶液, 照上述方法测定酶的活力.

固定化酶或溶液酶的相对活力是指在同组实验中以活力最高的为 100, 与其余的固定化酶或溶液酶的活力之比, 通常以百分常数表示.

固定化酶或溶液酶的剩余活力是指在同组实验中以未处理前的固定化酶或溶液酶的活力为 100, 与处理以后 (包括热、酸、碱、试剂、固定化、冷藏等) 所显示的活力之比, 以百分常数表示.

2 结果与讨论

2.1 固定化酶的制备

2.1.1 固定化反应 pH 值对固定化酶活力的影响 在不同 pH 值的 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (内含 0.005mol/L 半胱氨酸和 0.001mol/L EDTA) 中进行了木瓜蛋白酶的固定化反应, 分别制备了多孔硅球、甲壳胺、纤维素固定化木瓜蛋白酶, 当 pH 值分别为 8.0、7.5、7.5 时, 固定化酶的活力达到最大值.

2.1.2 固定化反应戊二醛浓度对固定化酶活力的影响 戊二醛既是固定化反应的交联剂, 同时又是酶的变性剂. 制备多孔硅球固定化木瓜蛋白酶时, 戊二醛使用浓度最高值达到 2.5% (W/V); 制备甲壳胺固定化木瓜蛋白酶的最适戊二醛浓度为 0.50% (W/V); 而制备纤维素固定化木瓜蛋白酶的最适戊二醛浓度为 0.38% (W/V).

2.1.3 固定化反应给酶量对固定化酶活力的影响 固定化酶活力并不随固定化反应给酶量的增加而提高. 随着载体负载酶量的增大, 酶分子相互

拥挤造成的空间位阻增大. 制备多孔硅球固定化木瓜蛋白酶时, 最佳给酶量为 8.0mg/g 载体; 制备甲壳胺固定化木瓜蛋白酶的最适给酶量为 16.0mg/g 载体; 而制备纤维素固定化木瓜蛋白酶的最适给酶量为 10.0mg/g 载体.

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 固定化酶的最适反应 pH 值 如图 1 所示, 在不同 pH 值的 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (内含 0.005mol/L 半胱氨酸和 0.001mol/L EDTA) 中测定了固定化酶和溶液酶对底物酪蛋白的水解活力. 多孔硅球固定化木瓜蛋白酶的最适反应 pH 值为 7.0, 甲壳胺、纤维素固定化木瓜蛋白酶的最适反应 pH 值均为 8.0, 这三种固定化木瓜蛋白酶的最适反应 pH 值分别较溶液酶向碱性范围内移动了 0.5 和 1.5 个单位.

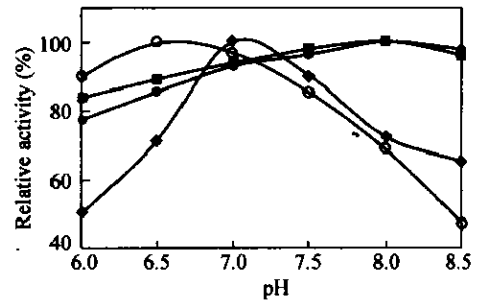


Fig. 1 Effect of pH on the relative activity of papain
a) Immobilized papain on porous silica beads; b) Immobilized papain on chitosan; c) Immobilized papain on cellulose; d) Native papain
◆ a; ■ b; ● c; ○ d

2.2.2 固定化酶的最适反应温度 (T_m) 如图 2 所示, 在不同温度下的 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0) 中, 测定了固定化酶和溶液酶对底物酪蛋白的水解活力. 溶液酶的最适反应温度为 60℃; 多孔硅球固定化木瓜蛋白酶的最适反应温度达到 90℃; 甲壳胺固定化木瓜蛋白酶和纤维素固定化木瓜蛋白酶的最适反应温度均为 80℃. 这说明固定化提高了木瓜蛋白酶的热稳定性.

2.2.3 温育温度对固定化酶活力的影响 在不加底物的情况下, 将溶液酶和固定化酶在不同温度下于 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0) 温育 1h 后, 冷至 4℃, 再于 37℃ 测定其活力, 如图 3 所示, 随着温育温度的升高, 多孔硅球固定化木瓜蛋白酶的活力始终比未经温育处理的固定化酶的活力高, 最适温育温度达到 90℃, 剩余活力达到

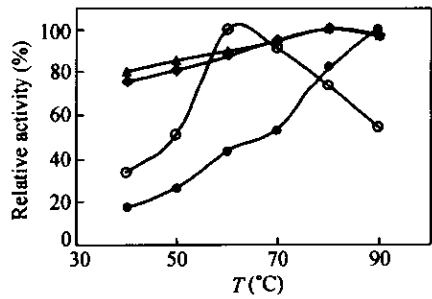


Fig. 2 Effect of temperature on the relative activity of papain
a) Immobilized papain on porous silica beads; b) Immobilized papain on chitosan; c) Immobilized papain on cellulose; d) Native papain
● a; ▲ b; ◆ c; ○ d

180%以上.同时,甲壳胺固定化木瓜蛋白酶和纤维素固定化木瓜蛋白酶的活力随着温育温度的升高,缓慢下降,90℃温育处理 1h 后,剩余活力保持在 95% 以上,而溶液酶 90℃温育处理 1h 后的剩余活力在 20% 以下.木瓜蛋白酶的热稳定性在固定化以后得到较大提高.

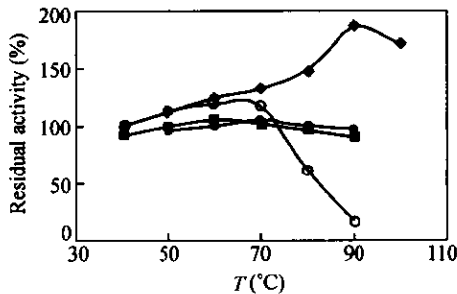


Fig. 3 Effect of temperature of preincubation for 1h on the residual activity of papain
a) Immobilized papain on porous silica beads; b) Immobilized papain on chitosan; c) Immobilized papain on cellulose; d) Native papain
● a; ■ b; ● c; ○ d

2.2.4 温育时间对固定化酶活力的影响 在不加底物的情况下,将溶液酶和固定化酶在 70℃ 下于 0.1mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=7.0)

中温育不同时间后,冷至 4℃,再于 37℃ 测定其活力,如图 4 所示,随着温育时间的延长,多孔硅球固定化木瓜蛋白酶的活力不仅没有下降,而且始终较未经温育处理的固定化酶的活力高,当温育处理 10h 后,剩余活力达到 250% 以上.同时,随着温育时间的延长,甲壳胺固定化木瓜蛋白酶和纤维素固定化木瓜蛋白酶的活力缓慢下降,70℃ 温育处理 5h 和 6h 后,活力仍保持在 90% 以上,固定化酶的耐热性得到了显著提高.

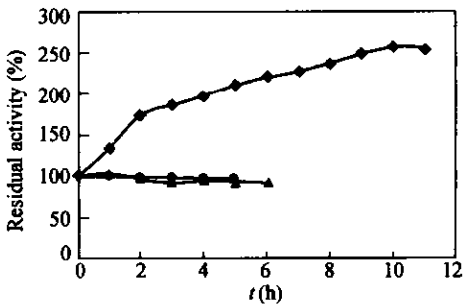


Fig. 4 Effect of duration of heating at 70℃ on the residual activity of papain
a) Immobilized papain on porous silica beads; b) Immobilized papain on chitosan; c) Immobilized papain on cellulose;
◆ a; ■ b; ▲ c

从以上实验结果可以看出,木瓜蛋白酶固定 在多孔硅球、甲壳胺以及纤维素这三种载体上后,其热稳定性和耐热性得到明显的提高,但只有多孔硅球固定化木瓜蛋白酶具有显著的热增活性.这可能是因为多孔硅球为无机载体,而甲壳胺和纤维素为有机载体;多孔硅球具有很强的刚性,酶分子固定在多孔硅球上以后,其结构得到了较好的稳定,对温育处理具有更好的耐受能力,不易失活;而且经过温育处理以后,固定在多孔硅球上的木瓜蛋白酶的构型可能发生转化而更适合于催化反应的需要,因而显示出较未经温育处理的固定化酶的更高活力,即具有热增活作用,其机理研究正有待进一步进行.

REFERENCES

- 1 Nozawa Y, Matsushita T, Higashide F. *Biotechnol Bioeng*, 1982, 24(3): 753~756
- 2 Lin S F, Hwang Y L, Tsai Y C. *Biotechnol Tech*, 1996, 10: 63~68
- 3 Martino A, Durante M, Pitteri P G, Spagna G, Bianchi G. *Process Biochem*, 1996, 31: 281~285
- 4 Grinshpan D D, Gavenas G A, Denis G I, Dobrolyubov A G, Itsygin S B. *Biotechnologiya*, 1989, 5: 747~748
- 5 Vladimír Kéry, Jana Haplová, Karol Tihlárík. *J Chem Technol Biotechnol*, 1990, 48: 201~207
- 6 Trzmiel T, Galas E, Fortak M. *Acta Biotechnol*, 1994, 14: 205~209
- 7 Klibanov A M. In: *Advances in Application Microbiology*. Vol. 29. New York: Academic Press, 1983. 1~28
- 8 He Feng(贺枫), Liu Lijian(刘立建), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Ion Exchange and Adsorption(离子交换与吸附)*, 1997, 13(3): 290~294
- 9 Zhuo R X, He F, Liu L J, Xu M Y. *Chinese J of Polym Sci*, 1998, 16(2): 142~146
- 10 Liu Lijian(刘立建), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Ion Exchange and Adsorption(离子交换与吸附)*, 1995, 11(6): 541~544
- 11 Guo Qiao(郭桥), Luo Guimin(罗贵民), Sun Qi-an(孙启安), Huang Zhongli(黄仲立), Ma Lin(马林). *Chinese Biochem J(生物化学杂志)*, 1994, 10(3): 259~263
- 12 Weetall H H, Marson R D. *Biotechnol Bioeng*, 1973, 15(3): 455~466

STUDIES ON THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED PAPAIN

HE Feng, ZHUO Renxi, LIU Lijian, XU Mianyi

(*Department of Chemistry, Laboratory of Biomedical Polymer Materials of the Ministry of Education, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract Papain was immobilized on porous silica beads, chitosan and cellulose by cross linking with glutaraldehyde. Thermal activation of immobilized papain on porous silica beads has been first found and reported by us. In this article, the factors related with the activity of the immobilized papain on chitosan and cellulose, such as pH of the immobilized reaction, concentration of glutaraldehyde and amount of papain were studied. We also studied the characters of these immobilized papain, comparing with native papain and immobilized papain on porous silica beads. Thermal stability and durability on heating were emphasized. Their optimum reaction temperature were 80℃. After incubation at 90℃ for 1h, the activity of these immobilized papain was retained above 95%. After incubation at 70℃ for 5h or 6h, the activity of immobilized papain was also retained above 90%. These results showed that thermal stability and durability on heating of immobilized papain on chitosan and cellulose were improved considerably.

Key words Immobilized enzyme, Chitosan, Cellulose, Thermal stability