

甘蔗渣纤维素固定化木瓜蛋白酶 及其应用研究

徐凤彩 张薇 罗刚跃 李明启

(光合作用研究室)

摘要 匀浆状甘蔗渣纤维素用 NaOH 活化后, 顺次经过高碘酸钠、尿素、甲醛处理, 成为高反应性固定化酶载体, 可用于木瓜蛋白酶的固定化。其酶蛋白的结合量与甲醛处理时间、酶固定时间, 溶液酶浓度等有关。甲醛处理最适时间为 14 h, 酶固定 8 h 后, 载体结合酶量趋向稳定; 溶液酶最佳浓度范围为 1~2.0 mg/ml 粗酶。固定化酶活力回收达 34.5%, 半衰期 35 天。固定化酶和溶液酶的 K_m 值(底物酪蛋白, w/v, %)分别为 0.12% 和 0.26%; 固定化酶和溶液酶的最适 pH 分别为 pH8.0 和 pH8.5; 二者的最适温度均为 60~70℃。固定化酶和溶液酶一样有底物抑制现象; 固定化酶在 6 mol/L 脲中处理 6 h 活力趋向稳定, 其活力为原有活力的 46.7%。用固定化酶处理啤酒, 啤酒浊度下降了 2~9.25 倍, 蛋白质含量下降了 78.8%, 冷藏 120 天, 处理啤酒无冷混浊现象发生, 同时啤酒原有风味和其它理化指标保持不变。

关键词 甘蔗渣纤维素; 木瓜蛋白酶; 固定化酶; 啤酒

纤维素是最早用于蛋白质固定化的载体, 1949 年 Micheel 和 Ewers 就曾用羟基纤维素迭氮衍生物固定了明胶和球蛋白。纤维素具有亲水、活性侧链基团较多、机械强度较好, 结构疏松等性状, 又有价格便宜易得等优点, 可用于许多类型的固定床、流动床中。经处理的纤维素是固定化酶的良好载体。纤维素作为酶的载体, 适应于酶的各种固定化方法, 因而被广泛地应用于酶的固定化。其中使用最早、报告最多的是共价键结合法。纤维素经各种处理后产生的活性基团, 可与酶分子中的氨基、羧基、酚基、巯基、咪唑基、吡啶基起反应, 而将酶固定于载体上。

1970 年 Crook 等^[1]将纤维素依次用高碘酸、脲和甲醛溶液处理, 形成高反应性的纤维素衍生物, 在 pH2~10 范围内能与酶的侧链基团形成牢固的共价键结合。并用此法固定了 α -胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、卵类粘蛋白。

用纤维素固定木瓜蛋白酶也有报告, Pekin 等^[2]用对氨基苯纤维素衍生物, 共价固定木瓜蛋白酶达到良好效果, 固定化酶最适 pH6.8~7.5, 表观 K_m ($K_{m'}^*$) 为 $1.2\sim1.6\times10^{-2}$ mol/L, 比溶液酶的 K_m (4.2×10^{-2} mol/L) 小。用纤维素为载体, 采用其它方法固定木瓜蛋白酶的也有报告, 如 Kenndy 等^[3]用 Zn^{2+} 将木瓜蛋白酶螯合于以 1, 3-二氨基重氮苯和 TiO_2 处理的纤维素载体上, 抑制了酶活性中心基团与载体结合, 从而提高了固定化酶的活力。但用处理甘蔗渣纤维素固定木瓜蛋白酶的尚未见报告。

甘蔗渣纤维素是甘蔗榨取蔗糖后残渣制得的, 资源丰富。我国上海生物化学所^[4]用甘蔗渣纤维素固定了 5'-磷酸二脂酶, 并已投入生产。本实验以甘蔗渣纤维素为载体, 甲醛为交联剂, 对木瓜蛋白酶固定化技术进行了研究。

1991-01-02 收稿

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

甘蔗渣纤维素由广东江门甘蔗化工厂提供。

木瓜蛋白酶粗酶制品由本室制备,酶活力为60万 $\mu\text{gTyr/g}$ 粗酶单位^[7]。

考马氏亮蓝G-250为瑞士进口,牛血清蛋白为进口分装,酪蛋白为进口分装,其它试剂均为分析纯。

鲜啤酒(未经过滤)由广东惠阳啤酒厂提供。

1.2 方法

1.2.1 溶液酶配制 称取一定量木瓜蛋白酶粗制品,溶于一定量pH7.2,0.1 mol/L磷酸缓冲液中,过滤为溶液酶,其蛋白质浓度为0.38 mg/ml,置冰箱保存备用。

1.2.2 固定化酶制备

载体活化:称取60 g甘蔗渣纤维素,匀浆,抽滤干,浸于500 ml 0.6%NaOH溶液中,85℃以上处理30 min后,用蒸馏水洗涤,抽干,即得碱化型纤维素。

载体处理:(1)高碘酸钠处理 将碱化型纤维素悬于 NaIO_4 溶液中,室温下搅拌一定时间,用蒸馏水反复洗涤,抽滤干,即得氧化型纤维素。(2)脲处理 将上述氧化型纤维素悬于1 L尿素溶液中,搅拌、产物用水反复洗涤,除去过量尿素,抽干,即得纤维素衍生物。产品可在4℃湿润状态下无限期保存而无变化。(3)甲醛处理 上述产物于12%的甲醛溶液中搅拌处理14 h后,用蒸馏水洗涤除去过量的甲醛,即得酶固定化载体。

载体处理反应如图1

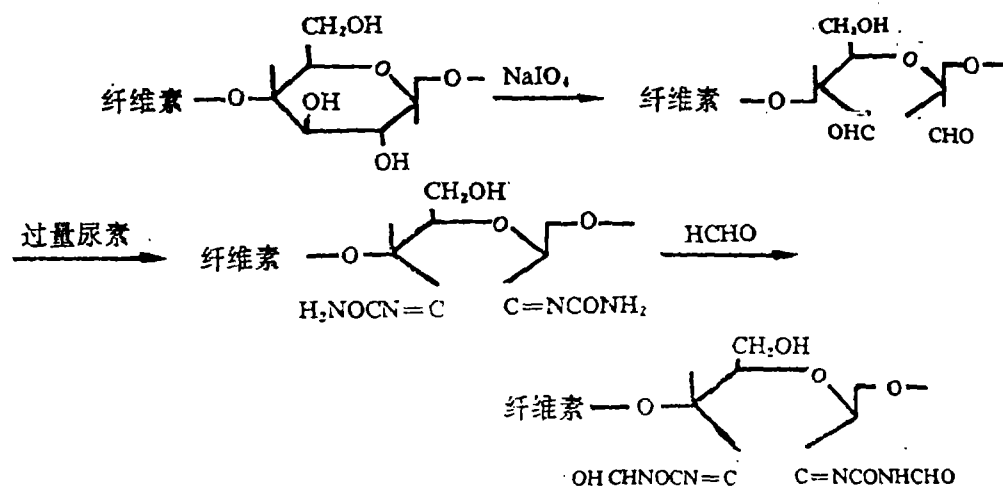


图1 纤维素载体处理反应

加酶固定:上步所得载体抽干后,加入溶液酶,固定18 h后,用0.1 mol/L pH7.2磷酸缓冲液、蒸馏水先后漂洗至洗脱液在280 nm波长处无光吸收。抽干,即为甘蔗渣纤维素固定化木瓜蛋白酶。4℃下干燥密封保存。

1.2.3 酶活力测定 依 Weetall 和 Mason 的方法^[8]。

溶液酶活力测定:0.1 ml 酶液加入0.9 ml 激活剂(0.1 mol/L, pH7.2 磷酸缓冲液内含

20 mmol/L Cys 及 1 mmol/L EDTA, 现备现用, 下同), 于 37℃ 水浴中保温恒定后, 加入同样保温的 1% 酪蛋白溶液 (0.1 mol/L, pH7.2 磷酸缓冲液配制, 4℃ 下可保存 1 个月) 1 ml, 37℃ 下准确反应 10 min 后, 立即加入 3 ml 三氯乙酸 (TCA) 溶液 (内含 0.11 mol/L TCA, 0.22 mol/L NaAc, 0.33 mol/L HAc) 终止反应。对照先加 TCA 溶液后加酪蛋白溶液, 其余同测定管。静置 30 min 后, 过滤 (或离心 5 000 r/min, 10 min), 滤液于 275 nm 波长下测定光吸收值。

在上述条件下, 每克粗酶每增加一个光吸收单位定义为一个酶活力单位 (U/g 粗酶)。

固定化酶活力测定: 取 0.1 g 固定化酶加入 1 ml 激活剂。其余同溶液酶活力测定。

在上述条件下, 每克载体每增加 1 个光吸收单位定义为 1 个酶活力单位 (U/g 载体)。

1.2.4 蛋白质含量测定 按考马氏亮兰 G-250 法^[4]。

2 试验结果

2.1 酶的固定化条件研究

2.1.1 溶液酶浓度对固定化作用的影响 以不同的酶浓度进行固定化, 测定各处理的固定化酶活力, 结果如图 2。

从图 2 中可见, 一方面随着溶液酶浓度的增加, 载体结合酶量越多, 固定化酶活力越高, 当溶液酶浓度增加到 2 mg/ml 时, 其载体连接臂基本被酶饱和, 结合酶量趋向饱和, 固定化酶活力达到最高和趋向稳定; 另一方面随着溶液酶浓度增加, 固定化酶活力回收 (见下文) 下降, 从而造成溶液酶的浪费。综合两方面的因素, 溶液酶浓度为 1.0~2.0 mg/ml (即 0.38~1.2 mg 蛋白/ml) 酶的固定化效果较好。

2.1.2 甲醛交联时间对固定化作用的影响 用同一甲醛浓度分别交联 4, 8, 12, 16 h 后, 测定不同交联时间的固定化酶活力, 结果如图 3。从图 3 可见, 载体交联 14 h 后, 固定化酶活力最高, 随后反而下降。这可能是随着时间延长, 甲醛自身缔合, 影响了与载体的交联。但交联 4 h 后, 固定化酶活力基本趋向稳定, 接近 14 h 的固定化效果, 因此, 为节省时间, 提高效率, 采用交联 4~5 h, 可达到较好的效果。

2.1.3 固定时间对固定化作用的影响 取一定浓度 (蛋白含量为 0.38 mg/ml) 的溶液酶, 分别固定 4, 8, 12, 16, 20 h 后, 测定各自的固定化酶活力, 结果如图 4。从图 4 可见, 随着固定时间的延长, 载体结合酶量相应增加, 固定化酶活力也增加, 直到载体连接臂被酶饱和, 固定化酶活力趋向最大, 此时的固定时间为 18 h。

2.2 固定化效果测定

综上所述, 处理载体用 1~2 mg/ml 酶浓度, 12% 甲醛交联 4~5 h 后, 固定 18 h 等条件下, 可获得较好的固定化效果, 从下列各式计算^[2]结果, 可以看出固定化酶活力及其活力

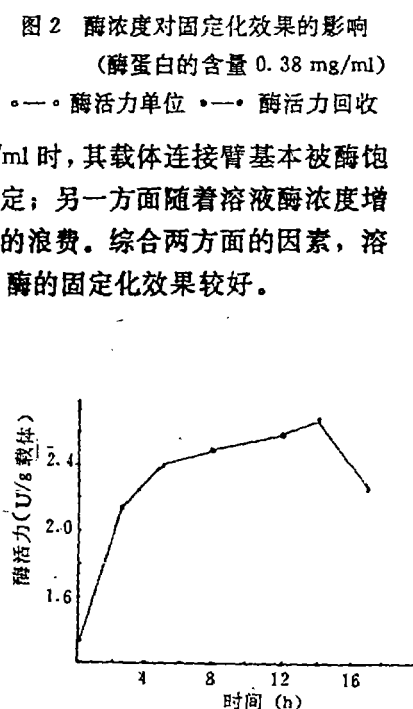
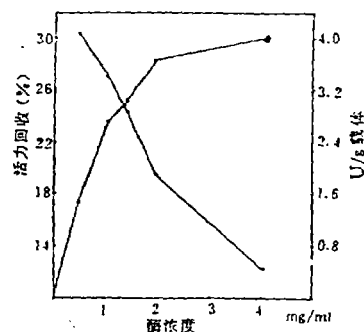


图3 甲醛交联时间对固定化效果的影响
(酶蛋白含量 0.38 mg/ml)

回收都较高。

2.2.1 酶活力 溶液酶活力为 298.6 U/g 粗酶(蛋白质含量 0.38 mg/ml), 每克载体需用 29.86 U 溶液酶, 即 29.86 U/g 载体。固定化酶活力为 10.3 U/g 载体。

2.2.2 固定化酶活力回收(%) (固定化酶总活力/溶液酶总活力) $\times 100$, 即 $10.3/29.86 \times 100 = 34.5\%$ 。

2.2.3 固定化酶相对活力(%) [固定化酶总活力/(溶液酶总活力-残留酶总活力)] $\times 100$, 即 $[10.3/(29.86-12.09)] \times 100 = 57.9\%$ 。

2.2.4 未偶联酶量(%) (残留酶总活力/溶液酶总活力) $\times 100$, 即 $(12.09/29.86) \times 100 = 40.5\%$ 。

2.3 固定化酶酶学性质研究

2.3.1 固定化酶的 K_m 值 分别以 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% 酪蛋白(w/v) 为底物^[4]测定固定化酶和溶液酶活力, 再用双倒数作图法, 求出它们的 K_m , K_m 值。结果如图 5。从图 5 中可得 K_m 为 0.12%, K_m 为 0.26%, K_m 比 K_m 小了 2 倍多, 说明固定化酶对底物(酪蛋白)的亲和力增加了。

2.3.2 固定化酶的最适 pH 分别以 pH 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0 的激活剂和相应 pH 条件下的 1% 酪蛋白为底物, 测定溶液酶和固定化酶在各 pH 的酶活力, 结果如图 6, 从图 6 中可见, 溶液酶和固定化酶的最适 pH 分别为 8.6 和 8.0。溶液酶的最适 pH 略高于固定化酶的。

2.3.3 固定化酶的最适温度 取一定量固定化酶和溶液酶分别测定在 10, 25, 35, 45, 60, 70, 85℃ 下的酶活力, 结果如图 7。从图 7 中可见, 溶液酶和固定化酶的最适温度均在 60~70℃ 间。

2.3.4 固定化酶的底物效应 分别以 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 的酪蛋白为底物, 测定固定化酶和溶液酶的活力, 结果如图 8。如图所示, 在一定底物范围内, 固定化酶和溶液酶活力均随底物浓度的增加而增加, 当底物浓度为 2% 时酶活力均达最高; 超过 2.0% 时, 酶活力反而下降, 即产生了底物抑制现象。

2.3.5 固定化酶对蛋白质变性剂—脲的效应 取一定量固定化酶(活力为 10.64 U/g 载体)浸泡于脲溶液(6 mol/L, 以 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液配制)中, 6 h 后取出固定化酶, 洗净, 测定其剩余活力为 4.97 U/g 载体, 固定化酶活力尚存 46.7%, 说明固定化酶

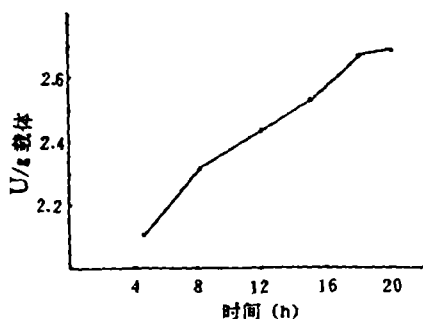


图4 固定时间对固定化效果的影响
(酶蛋白含量 0.38 mg/ml)

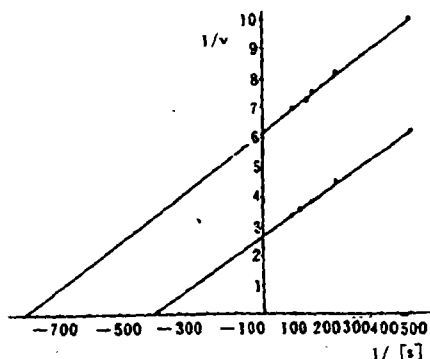


图5 固定化酶的 k_m 和溶液酶的 K_m 值(酪蛋白, w/v, %)
—•— 固定化酶 —•— 溶液酶
(固定化酶活力 10 U/g 载体, 溶液酶活力 2.98 U/g 酶)

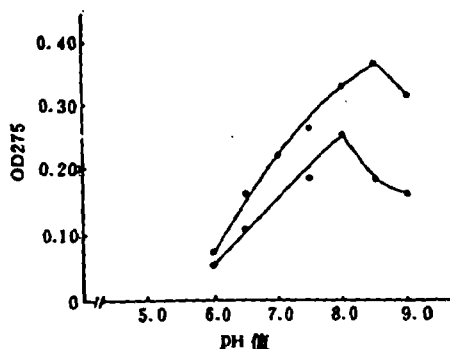


图6 固定化酶和溶液酶的最适 pH
—•— 固定化酶 —•— 溶液酶
(酶活力均同图 5)

对蛋白质变性剂抵抗能力强。

2.3.6 固定化酶半衰期测定 取2 g固定化酶(活力为17.63 U/g载体[E]),激活15 min,装柱(1.0 cm×20 cm),以1%酪蛋白溶液为底物,上行,恒温(20℃),恒流(12 ml/h),连续反应15天(t)后,酶活力为13.12 U/g载体(E_0),按下式计算:

$$t_{1/2} = 0.693 / (2.303/t \log [E_0] / [E])^{[3]}$$

半衰期为35天。

2.4 固定化酶在啤酒生产上应用

本实验在广东惠阳啤酒厂进行,10 g固定化酶(活力为10.63 U/g载体)充分激活后,加入5 000 ml鲜啤(未过滤)酒中,酒温6~8℃,间歇搅拌30 min,过滤取出固定化酶,另取同样鲜啤不加固定化酶同样处理为对照,经该厂质检部门检验,结果如下:

2.4.1 感官检验 处理啤酒保持了啤酒原有风味。

2.4.2 各项理化指标测定 按1984年轻工业部颁发的《普通淡色啤酒及其试验方法》(北京:轻工业出版社,1984)中规定的方法,由厂质检部门进行检测,现行标准也按1984年轻工业部颁发的标准(同上),结果如表1。

从表1中可见,除浊度外,各项理化指标均与对照基本相同并符合部颁标准;其中浊度,处理啤酒比对照下降了2.02倍。冷藏37天后,处理啤酒各项理化指标保持不变,而对照的浊度明显上升,增加了4.46倍,与处理啤酒比浊度高9.25倍。

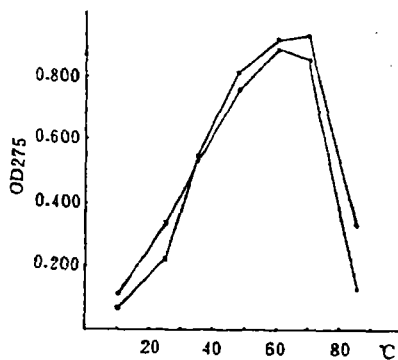


图7 固定化酶和溶液酶的最适温度
—●— 固定化酶, —●— 溶液酶
(酶活力同图5)

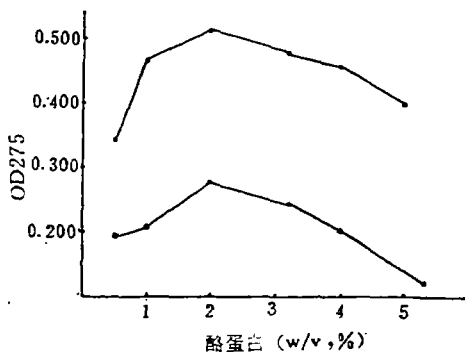


图8 固定化酶的底物效应
—●— 固定化酶, —●— 溶液酶
(酶活力均同图5)

表1 固定化酶处理啤酒理化指标测定结果

样 品	酒精含量 (w/v, %)	原麦汁浓 度(w/v, %)	真正发酵 度(%)	色度 (EBC)	总酸	双乙酰 (mg/L)	浊度 (EBC)	真正浓度 (%)
部相应指标	3.5 以下	12±0.2	≥56	5.0~12.0	≤2.7	≤0.20	≤0.8	—
处理后冷藏前测定(1990~03~24)								
CK	4.21	12.1	67.3	10.84	2.25	0.096	0.83	3.95
处理	3.84	11.42	65.41	9.84	2.10	0.029	0.41	3.95
冷藏37天后测定(1990~04~29)								
CK	4.1	11.94	66.5	11.58	2.20	0.122	3.70	4.0
处理	3.9	11.48	66.0	11.08	2.10	0.115	0.40	3.90

2.4.3 啤酒蛋白质含量测定 用考马氏亮蓝G-250法^[4]测定处理啤酒和对照啤酒中蛋白质如表2,从表2中可见,处理啤酒中蛋白质含量与对照啤酒比较下降了78.8%,这与处理啤酒浊度下降一致。

表2 啤酒中可溶性蛋白质含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)

重复	1	2	3	平均	相对含量(%)
CK	184	189.4	190.5	188	100
处理	39.0	40.5	39.8	39.8	21.2

2.4.4 冷藏实验 将上述处理和对照啤酒于 -20°C 低温下冷藏120天,结果对照啤酒基本混浊失去饮用价值,而处理啤酒无冷浊现象发生。

综合上述结果,可以看出,经充分激活的固定化酶,用量为0.2%,酒温 $6\sim 8^{\circ}\text{C}$ 时,处理啤酒半小时,即可达到防止啤酒冷混浊的效果,酒中蛋白质含量下降与浊度下降一致,同时啤酒风味和各项理化指标不变。

3 讨论

作为固定化酶的载体,一般亲水基团越多,表面积越大,单位载体结合的酶量也越多,制得的高活力固定化酶也就最多,甘蔗渣纤维素资源丰富,同样具有纤维素的特点,纤维素是由葡萄糖单位经 $\beta-1,4$ -糖苷键连结在一起的大分子物质,每个葡萄糖残基有4个游离羟基,有很强的亲水性,吸附能力也强,因此纤维素作为酶固定化载体,存在有一定的非专一性吸附,这在应用中不利,在制备固定化酶时应适当改造这些羟基,克服这一缺点。另外,纤维素比其它某些载体如多孔玻璃等,其表面不够大,这也需在纤维素的形态上加以改进。一般在制成颗粒状基础上再增加其多孔性。Kennedy等^[4]报告,纤维素在与酶结合前浸于二甲亚砜中,共价结合的凝乳蛋白酶量及其水解蛋白质的活性都有提高,原因在于载体的多孔性增加。可见以纤维素为载体进行酶的固定化,要根据酶的结构特点,底物特性,选择适当的固定方法,根据采用的方法对纤维素进行适当的处理和改造,使酶最大限度地固定于纤维素载体上。

本实验采用的甘蔗渣纤维素经NaOH膨胀活化,高碘酸钠氧化、尿素、甲醛处理、使之更利于酶的固定化。上述各步的处理产物分别固定木瓜蛋白酶,结果如表3。从表3可见,随着载体连接臂的增长,固定化酶活力增加。这是由于载体连接臂短,造成空间位阻大的缘故。氧化型纤维素固定化酶易结块,以后在溶液中也易分散,不利于底物与酶的接触。纤维素经上述处理后,葡萄糖残基上羟基减少,非专一性吸附减少,从表1中也可看出,处理啤酒的理化性质如色度等变化很小,也说明载体非专一性吸附小。

表3 各种纤维素衍生物为载体酶的固定化效果

载 体	碱化纤维素	氧化纤维素	纤维素尿素衍生物	纤维素甲醛衍生物
固定化酶活力U/g载体	0.29	0.06	1.84	3.49
活力回收%	11.52	10.31	19.65	27.3

目前国内啤酒生产中,一般采用硅藻土过滤工艺,成本较高,而且由于啤酒中多酚类等物质与蛋白质结合形成复合物,冷藏时,其溶解度下降,出现冷混浊现象。应用0.2%固定化木瓜蛋白酶处理啤酒,在酒温 $6\sim 8^{\circ}\text{C}$ 左右、pH为4~5的条件下,啤酒浊度及蛋白质明显下降,冷藏120天,无冷混浊现象产生,这对啤酒生产十分有利。

参 考 文 献

- 1 中国科学院上海生物化学研究所固相酶组. 固定化酶生产核苷酸的扩大实验获得良好效果. 生物化学与生物物理进展, 1977, 6: 17~19
- 2 张树政主编. 酶制剂工业. 上册, 北京: 科学出版社, 1984. 375
- 3 张树政主编. 酶制剂工业. 上册, 北京: 科学出版社, 1984. 377
- 4 Bradford M. A simple and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72, 248
- 5 Crook E M, et al. Cellulose insolubilized enzymes. Method in Enzymology, 1970, 19: 903
- 6 Kennedy J F & Pike V W. Water insoluble papain conjugates of hydroxy titanium (IV) oxide. Enzyme Microb Technol, 1979, 1: 31
- 7 Kennedy J F & Epton J. Poly (N-acryloyl-4-and-5-aminosalicylic acids) III. Uses as their titanium complexes for the insolubilization of enzymes. Carbohydr Res, 1973, 27: 11
- 8 Pekin B, et al. Covalent attachment of papain to PAB-cellulose by means of terephthalic diazide. Biotechnol Bioeng, 1981, 23 (8): 1907
- 9 Weetall H H & Mason R D. Studies on immobilized papain. Biotechnol, 1973, 15 (3): 455

STUDY OF BAGASSE—CELLULOSE FIXED—PAPAIN AND ITS APPLICATION

Xu Fengcai Zhang Wei Lo Gangyao Li Mingqi

(Laboratory of Photosynthesis Research)

Abstract Homogenized bagasse—cellulose activated by NaOH and treated in turn with sodium periodate, urea, formaldehyde, was used in the fixation of papain as a fast reactional carrier. The binding capacity of the enzyme protein was related to the duration of formaldehyde treatment and enzyme fixation as well as the concentration of solution enzyme. The optimum time for formaldehyde treatment was fourteen hours. After papain was fixed for eighteen hours, the papain-combining capacity of the carrier tended to remain stable. The range of optimum concentration of solution enzyme was 1 to 2.5 mg/ml raw enzyme. The recovery rate for fixed papain activity reached 34.5%. The half-life was 35 days. The K_m values (casein as substance % w/v) and optimum pH values for fixed papain and solution papain were 0.12% and 8.0, 0.26% and 8.5 respectively. The optimum temperature for both of them was 60~70 degree Celsius. Fixed papain showed substrate inhibition as solution papain also did. The activity of fixed papain treated with 6 mol/L urea for six hours tended to be stable, and was 46.7% of the original activity. The clarification of beer treated with fixed papain was raised by 2~9.25 times, and the content of protein in beer decreased by 78.8%, the treated beer refrigerated for 120 days did not show turbidity, while the original flavour of the beer and other physical and chemical indices remained unchanged.

Key words Bagasse-cellulose; Papain; Fixed-enzyme; Beer