

萝卜溶菌酶酶制剂配制的研究

穆虹 廖毅 梁雪芬 易继财

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

摘要 采用脱氨再生几丁质凝胶亲和层析法分离纯化得到电泳纯萝卜溶菌酶酶液, 研究了一些常用酶制剂的稳定剂和防腐剂对萝卜溶菌酶活性的影响, 结果表明: NaCl ($< 100 \text{ mmol/L}$) 对酶有少量的激活作用; NaF 、 CaCl_2 、苯甲酸等在不同程度上对酶活性有抑制作用; 而乙醇和甘油对该酶活性影响不大。进一步选择一定浓度的稳定剂、防腐剂等, 配制了一组(6个处理)萝卜溶菌酶液体酶制剂, 研究其在室温($26 \sim 37^\circ\text{C}$)条件下贮藏的稳定性, 结果表明: 质量分数为 0.1% 的 BSA; 体积分数为 20% 的甘油和质量分数为 0.05% 苯甲酸两种配制条件, 3 个月后酶活性保存达 65% 以上, 对于萝卜溶菌酶有较好的应用价值。

关键词 萝卜溶菌酶; 酶制剂

中图分类号 Q 556.2

溶菌酶(lysozyme, EC 3.2.1.17)广泛存在于动物组织或分泌物、植物组织或乳汁及微生物中, 其中鸡蛋清溶菌酶(HEWL)的研究和应用已相当深入和广泛, 而有关植物溶菌酶的研究则相对较少, 其应用尚未开展(船津胜等, 1982; 缪辉南, 1985; 相沢孝亮等, 1989; Chandan et al, 1981; Jolles et al, 1984)。袁世清等(结果待发表)在对华南地区 50 多科 120 多种植物进行普查中, 发现十字花科萝卜叶中溶菌酶含量最高, 且发现萝卜溶菌酶的耐热性、耐酸性均优于 HEWL。进一步研究发现, 该酶的抑菌效果与现在普遍生产和应用的 HEWL 有所不同, 其不但对白色葡萄球菌等 3 种 G^+ 菌, 而且对大肠杆菌等 6 种 G^- 菌及酵母、毛霉等 5 种真菌具有不同程度的抑制作用; 对另外参试的白菜软腐病等 7 种植物病原细菌、真菌及烟虫和小菜蛾两种昆虫都有抑杀作用。而 HEWL 对 G^+ 菌的抑制作用较强, 对 G^- 菌及真菌多不起作用(船津胜等, 1982)。萝卜溶菌酶抑菌的广谱性和较强的抑菌能力, 以及其原料成本低廉, 这些均为萝卜溶菌酶提供了良好的应用前景。

酶制剂的生产有粉末和液体两种剂型, 粉末型酶制剂需通过喷雾干燥或冷冻干燥途径获得, 对设备要求较高, 而液体酶制剂的生产过程短, 设备投资少, 虽说液体酶制剂存在包装、运输困难、保存期短等缺点, 但在短途运输、近期使用的条件下, 其优点则可充分表现, 因而在食品工业等酶制剂中, 液体酶制剂的使用将不断增加(张树政等, 1984)。根据萝卜溶菌酶的抑菌特点, 该酶可开发用作食品防腐保鲜剂、植物保护剂、真菌药物、口腔杀菌剂等, 采用液体酶制剂的形式将更为经济、方便, 故本实验通过萝卜溶菌酶液体酶制剂配制的研究, 为萝卜溶菌酶酶制剂的生产和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

萝卜(*Raphanus sativus*)叶。

1.2 方法

1.2.1 萝卜溶菌酶的制备 按王伟军等(1996)的方法, 获电泳纯萝卜溶菌酶。

1.2.2 酶活力的测定 按卢顺舵等(1996)的方法。

1.2.3 蛋白质含量的测定 按 Bradford(1976)的方法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.4 不同浓度 NaCl、苯甲酸、甘油等酶的稳定剂和防腐剂对萝卜溶菌酶活性的影响 在比色杯中加入相同浓度不同体积的有关溶液, 以 0.066 mol/L 磷酸(CaCl_2 用 NaAc-HAc)缓冲液($\text{pH}=6.2$)补充至 0.9 mL, 加入 0.1 mL 酶液混匀, 10 s 后加入 2.0 mL 溶壁微球菌底物溶液($\text{O.D}_{450}=0.6\sim0.7$), 测定酶活力。以 0.9 mL 0.066 mol/L 磷酸缓冲液, 加 0.1 mL 酶液, 加 2.0 mL 底物后测得的酶活力为 100%, 各种稳定剂和防腐剂的浓度以终浓度计。

1.2.5 不同处理配制的萝卜溶菌酶酶制剂贮藏稳定性的研究 经脱氨再生几丁质凝胶亲和层析, 0.1 mol/L HAc 洗脱得到的酶液, 各取 3 mL 酶液按 6 种处理配成总体积各为 5 mL 的酶制剂, 混匀密封后, 置于室温($26\sim37^\circ\text{C}$)下保存, 对照: 3 mL 酶液加 2 mL 0.1 mol/L HAc, 其它处理相同。

2 实验结果

2.1 不同浓度 NaCl、甘油、苯甲酸等酶的稳定剂和防腐剂对萝卜溶菌酶活性的影响

2.1.1 NaCl、NaF ($0\sim500\text{ mmol/L}$) 及 CaCl_2 ($0\sim100\text{ mmol/L}$) 对酶活性的影响 NaCl 在 $<100\text{ mmol/L}$ 时, 对酶活性有促进作用, 相对活力最高达 146%, 而在 $>100\text{ mmol/L}$ 时, 对酶活性有抑制作用, 400 mmol/L NaCl 对酶活性抑制达 50%; NaF 与 NaCl 不同, 在 $0\sim500\text{ mmol/L}$ 的浓度范围内, 对酶活性均有抑制作用, 且同样浓度下的抑制程度要高于 NaCl, 其在 400 mmol/L 时, 抑制酶活性达 70%(图 1)。 CaCl_2 在 $0\sim100\text{ mmol/L}$ 的浓度范围内均抑制酶活性, 在 30 mmol/L 时, 对酶活性的抑制程度已达 60%(图 2)。

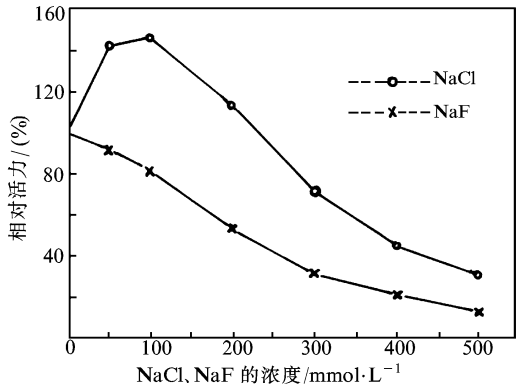


图 1 NaCl、NaF 对萝卜溶菌酶活性的影响
(酶比活力: 每 mg 蛋白含 69 091U)

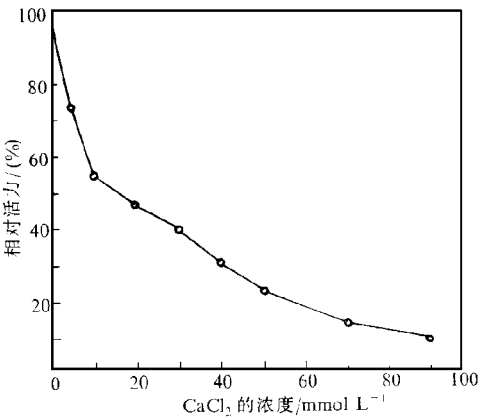


图 2 CaCl_2 对萝卜溶菌酶活性的影响
(酶比活力: 每 mg 蛋白含 69 091 U)

2.1.2 甘油和乙醇对酶活性的影响 甘油在 $0\sim1\text{ mol/L}$ 、乙醇在体积分数为 $2.5\%\sim12.5\%$ 的浓度范围内, 对酶活性的影响不明显(图 3, 图 4)。

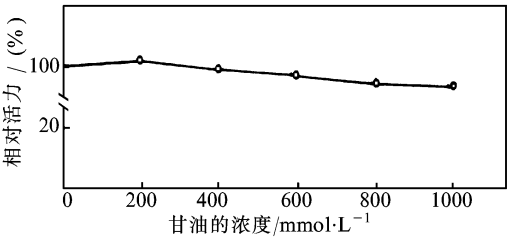


图 3 甘油对萝卜溶菌酶活性的影响
(酶比活力: 每 mg 蛋白含 69 091 U)

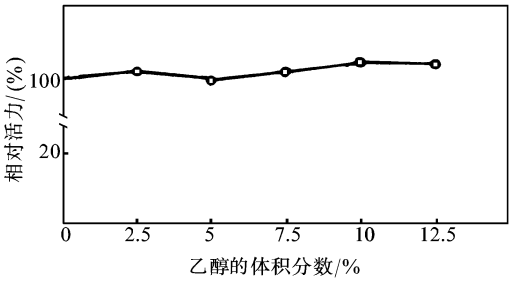


图 4 乙醇对萝卜溶菌酶活性的影响
(酶比活力: 每 mg 蛋白含 69 091 U)

2.1.3 苯甲酸对酶活性的影响 苯甲酸在 4~20 mmol/L 的浓度范围内,对酶活性有不同程度的抑制作用,在 8 mmol/L 时,对酶的抑制程度达 32%(图 5)。

2.2 不同处理配制的萝卜溶菌酶酶制剂贮藏稳定性的研究

选取酶保护剂、稳定剂和防腐剂的浓度分别为: 0.1%(质量分数)牛血清白蛋白(BSA)、80 mmol/L NaCl、12.5 mmol/L NaF、0.05%(质量分数)苯甲酸、20%(体积分数)甘油和 5%(体积分数)乙醇,配制成 6 组不同处理的酶制剂,在室温下放置 3 个月后,有 5 个处理酶活力保存达 50%以上,其中有 2 个处理达 65%以上,而此时对照酶活力只有 16.8%,约为处理的 1/4(图 6)。

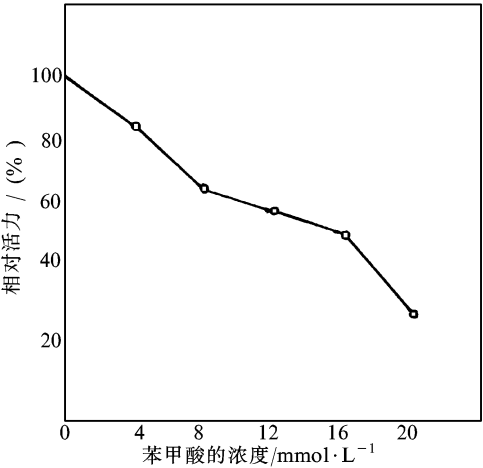


图 5 苯甲酸对萝卜溶菌酶活性的影响
(酶比活力: 每 mg 蛋白含 69 091 U)

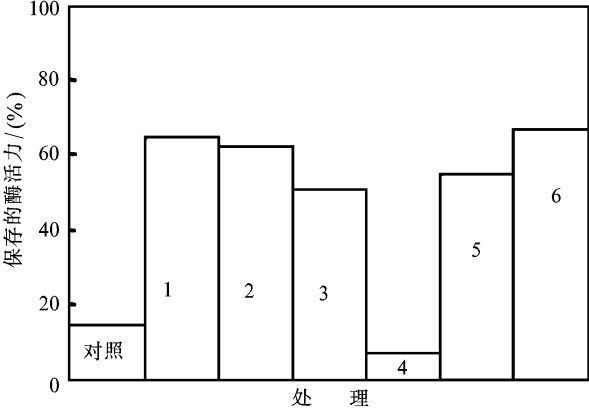


图 6 不同处理萝卜溶菌酶酶制剂的贮藏稳定性
(酶比活力: 每 mg 蛋白含 69 091 U)

1: 0.1% BSA; 2: 0.1% BSA+ 80 mmol/mLNaCl+ 20% 甘油; 3: 0.1% BSA+ 80 mmol/mLNaCl+ 20% 甘油 + 0.05% 苯甲酸; 4: 0.1% BSA+ 80 mmol/mLNaCl+ 20% 甘油+ 5% 乙醇; 5: 12.5 mmol/mLNaF+ 20% 甘油+ 5% 乙醇+ 0.05% 苯甲酸; 6: 20% 甘油+ 0.05% 苯甲酸

3 分析与讨论

酶在保存过程中易失活,失活的原因不明之处尚多,尤其是液体酶,不宜长期久存,保存的方法还多靠经验。已有的实验表明,为了达到长期贮存的要求,通常必须加入符合安全使用规定的酶的保护剂、稳定剂和防腐剂等,现较常用的酶的保护剂有白蛋白、球蛋白(质量分数为 0.1%),巯基乙醇、金属离子等,稳定剂有多元醇如:甘油、山梨醇、丙二醇等(体积分数

为 $<20\%$); 钙盐($\text{CaCl}_2/\text{CaAc}_2$, $10 \sim 10 \text{ mmol/mL}$)、食盐/中性盐(500 mmol/mL); 乙醇(体积分数为 $2\% \sim 10\%$)等, 防腐剂有苯甲酸(质量分数为 $0.2\% \sim 1.0\%$)、甲苯、醋酸乙酯等(张树政, 1984; 伯奇, 1991; 陈 声, 1994), 从中选用甘油、 CaCl_2 、 NaCl 、 NaF 、乙醇、苯甲酸作为萝卜溶菌酶的稳定剂和防腐剂, 并分别测定了上述稳定剂和防腐剂在一定浓度范围内对萝卜溶菌酶活性的影响, 结果表明: 甘油和乙醇对酶活性影响不大(图 3, 图 4); NaCl 在 $< 100 \text{ mmol/L}$ 时, 对酶活性有促进作用, 但在 500 mmol/L 时, 对酶活性抑制程度大于 50% (图 1); NaF ($0 \sim 500 \text{ mmol/L}$)、 CaCl_2 ($0 \sim 100 \text{ mmol/L}$)、苯甲酸 ($0 \sim 20 \text{ mmol/L}$) 对酶活性均有抑制作用, 在相同浓度下, CaCl_2 的抑制作用大于 NaF , 而苯甲酸在 8 mmol/L (相当于质量分数为 0.1%) 时, 对酶活性抑制程度达 32% (图 1, 图 2, 图 5)。

鉴此, 选用质量分数为 0.1% 的牛血清白蛋白(BSA)为保护剂, 80 mmol/L NaCl 、 12.5 mmol/L NaF 、体积分数为 20% 的甘油、体积分数为 5% 的乙醇为稳定剂, 质量分数为 0.05% 的苯甲酸为防腐剂, 并加以组合配成 6 种不同处理的萝卜溶菌酶制剂, 密封后在室温($26 \sim 37^\circ\text{C}$)下放置 3 个月, 萝卜溶菌酶的活力保存分别为 65.7% 、 62.6% 、 50.8% 、 7.6% 、 54.4% 和 66.7% , 而对照的活力仅为 16.8% (图 6)。其中, 仅添加质量分数为 0.1% BSA 的处理 1, 酶活力保存高达 65.3% , 表明 BSA 在酶蛋白浓度(0.013 mg 蛋白/mL)较低的情况下, 对酶起到了较好的保护作用。通常 3 种或 3 种以上的稳定剂混合使用, 效果较好, 如: 枯草杆菌碱性蛋白酶, 加入质量分数为 $0.16\% \text{CaAc}_2$ 、体积分数为 5% 、体积分数为 10% 的丙二醇和 10% 的乙醇($\text{pH}7.0$), 37°C 放置 1 个月后, 酶活力保存 72% , 但如不加体积分数为 10% 的乙醇, 则酶活力保存仅为 25% (张树政, 1984), 而在本实验中, 4 个多成份的处理(处理 2、3、4、5)效果, 似乎不如单独使用质量分数为 0.1% BSA 的处理 1 及使用体积分数为 20% 的甘油和质量分数为 0.05% 的苯甲酸的处理 6 要好, 其中, 处理 4 的酶活力保存出现了较对照还低的现象。由于多成份的稳定剂与防腐剂的混合使用, 其与酶分子的作用, 以及其间的相互作用较复杂, 其中的原因有待进一步的探讨。

酶制剂配制中, 保护剂、稳定剂和防腐剂的种类和浓度的选用因酶而异, 主要应着重酶活力保存的效果, 还应从应用的需求来定, 对于萝卜溶菌酶, 在处理 1 和处理 6 的配制条件下酶活力保存效果较好, 可供食品保鲜剂等使用, 处理 5 虽然酶活力保存的效果不如处理 1 和处理 6, 但其中含有 NaF 和乙醇, 可供口腔杀菌剂的配制使用。

参 考 文 献

王炜军, 徐凤彩. 1996. 溶菌酶的亲和层析. 华南农业大学学报, 17(4): 60~64

卢顺彪, 高向阳, 徐凤彩. 1996. 萝卜溶菌酶诱导作用的研究. 生物化学杂志, 12(3): 348~352

伯奇 G G 主编. 1991. 酶与食品加工. 郑寿亭等译. 北京: 轻工业出版社, 264

张树政主编. 1984. 酶制剂工业: 上册. 北京: 科学出版社, 214~216

陈 声主编. 1994. 酶制剂生产技术. 北京: 化学工业出版社, 162~164

相沢孝亮著. 1989. 酶应用手册. 黄文涛等译. 上海: 科学技术出版社, 390~407

船津胜, 鹤大典编著. 1982. 溶菌酶. 济南: 山东科学技术出版社, 256~293

缪辉南. 1985. 溶菌酶的生化特性. 生化药物杂志, (3): 28~41

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~252

Chandan R C, Ereifej K I. 1981. Determination of lysozyme in raw fruits and vegetables. J Food Sci, 46:

12678~12679

Jolles P, Jolles J. 1984. What's new in lysozyme research?. Mol Cell Biochem, 63(2): 165~189

A STUDY ON COMPOUNDING ENZYMATIC PREPARATIONS OF LYSOZYME FROM *Raphanus sativus*

Mu Hong Liao Yi Liang Xuefen Yi Jicai

(College of Biotechnology, South China Agr. Univ., Guangzhou 510642)

Abstract

A purified lysozyme was prepared from *Raphanus sativus* by the method of affinity chromatography on a crab deaminated regenerated chitin column. The effect on the lysozyme of some stabilizer and preservative for enzymatic preparation were studied. The activity of the lysozyme was slightly activated by NaCl ($< 100 \text{ mmol/L}$) and was inhibited in varying degrees by NaF, CaCl_2 and benzoic acid. Ethanol and glycerol had no effect on the activity of the lysozyme. Six enzymatic preparations of the lysozyme were compounded by using the stabilizer and preservative above and were placed in room temperature for 3 months. The activities remained were determined, it showed that the percentage of the activity remained of the enzymatic preparation treated with 0.1% BSA or 20% glycerol and 0.05% benzoic acid was higher than 65%.

Key words lysozyme from *Raphanus sativus*; enzymatic preparation