

文章编号: 1001-411X(2000)03-0060-03

壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶 填充床反应器的试制研究

李 红, 王炜军, 徐凤彩

(华南农业大学生物技术学院, 广东广州 510642)

摘要: 在研究了壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的酶学性质的基础上, 试制壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的填充床反应器以降解酪蛋白, 研究了该反应器的实验条件、操作参数及对酪蛋白的降解能力。结果表明: 在一定的实验条件下, 该填充床反应器的生产强度最高可达到 $0.096 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$; 产品转化率在第 1~4 d 均达 $98.56\% \sim 99.71\%$; 高效毛细管电泳图谱显示该填充床反应器对酪蛋白的降解能力良好。

关键词: 固定化木瓜蛋白酶; 填充床反应器

中图分类号: Q552.2

文献标识码: A

本文是在研究壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的酶学性质的基础上展开。酪蛋白是母乳、牛乳中的主要成分, 它不仅是婴幼儿不可缺少的营养物质, 还可作为功能性食品添加剂^[1,2]。而酪蛋白的降解产物可制成婴幼儿、老人、病人等的功能性食品, 所以酶解酪蛋白在功能性食品工业的研究中具有重要地位和广阔的应用前景^[3]。在有关的固定化木瓜蛋白酶的应用研究中, 学者们主要是将其用于啤酒的澄清^[4,5], 而用于酶解酪蛋白的研究尚鲜见报道。酶反应器是利用酶的催化原理, 在一定的生物反应装置中将原料转变为有用物质的装置^[6]。为了开发固定化酶的应用潜力, 本文针对壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的酶学性质, 试制了壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的填充床反应器(Plug-flow Reactor, PFR)降解酪蛋白, 并对该填充床反应器的性能和应用的可行性进行初步研究, 从而希望探索出一条用固定化木瓜蛋白酶的填充床反应器降解酪蛋白, 以获得有益的酶降解产物的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

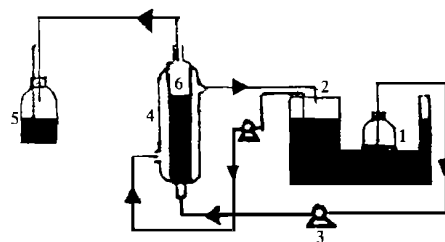
药品与试剂: 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶(广东省高教厅现代生物技术实验室酶工程分室制备); 酪蛋白(ICN Biochemical 公司); 考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司, 上海化学试剂公司分装); L-酪氨酸(层析纯, 上海伯奥生物科技有限公司); 其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂。

1.2 蛋白质含量测定

按 Bradford^[7] 方法。

1.3 酶反应器的试制

称取一定量的壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶(广东省高教厅现代生物技术实验室酶工程分室制备, 酶活力 $91.30 \text{ U}/\text{mL}$), 方法参照 1.4。称取 10 g 固定化酶($81.3 \text{ U}/\text{g}$), 装柱($2 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$), 以 $5 \text{ g}/\text{L}$ 的酪蛋白溶液为底物(含 $20 \text{ mmol}/\text{L}$ 半胱氨酸和 $1 \text{ mmol}/\text{L}$ 的 EDTA, 现配现用), 底物流上行, 20°C 恒温水浴, 恒流 $8 \text{ mL}/\text{h}$, 连续反应 16 d , 并定时取样测定。装置示意图(图 1)如下:



- 1 底物流(substrate flow) 2 恒温水浴装置(homeothermic water bath)
3 恒流泵(steady flow bump) 4 反应柱(reaction column)
5 产物收集瓶(collection of products) 6 固定化酶(immobilized papain)

图 1 填充床反应器的装置示意图

Fig. 1 Sketch map of plug-flow reactor's installation

1.4 底物和产物浓度的测定

底物浓度测定即蛋白质含量的测定, 方法同 1.2。

产物浓度的测定: 分别于 0.25、0.5、1、2、3、4、...、16 d 取底物和降解产物各 2 mL , 各加入 2 mL 的 TCA 溶液, 静置 30 min , 过滤。以 $50 \text{ mg}/\text{L}$ 的 L-酪氨酸标准溶液为对照, 在波长 275 nm 下测定光吸收值($\Delta A_{275\text{nm}}$), 并按下式计算:

生产强度(Q_p) = $P \cdot q / V_R$; 产品转化率(Y_p/s) =

$(S_0 - S_t)/S_0$; 停留时间 $(t) = V_R/q$,
其中, P : 流出液中的产物浓度(g/L), q : 流速(L/h),
 V_R : 反应器的体积(L), S_0 : 流入反应器的底物浓度(g/L), S_t : 流出反应器的底物终浓度(g/L).

1.5 底物和降解产物的平均相对分子质量分布的测定

用高效毛细管电泳仪测定其平均相对分子质量分布.

2 结果

2.1 填充床反应器的试制

(1) 填充床反应器的实验条件和操作参数: 本研究在采用微球状的固定化酶、底物为 5 g/L 的酪蛋白溶液等具体条件下, 试制了填充床反应器(图 2). 将壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶填充于反应柱中(约占柱体积的 2/3), 反应柱外套恒温水浴装置, 用 5 g/L 的酪蛋白溶液为底物, 上行流经固定化酶, 20℃恒温水浴, 8 mL/h 恒流, 产物由反应柱上端流出, 连续测定 16 d.

填充床反应器的生产强度与时间的函数(图 3)显示: 当连续反应时间为第 2 d 时, 填充床反应器的生产强度达到最大值, 为 0.096 g/(L·h); 然后, 随着时间的延长, 固定化酶的酶活力逐步下降, 其生产强度也随之降低.

填充床反应器的产品转换率与时间的函数(图 4)显示: 当反应时间为第 1~4 d 期间, 填充床反应器的产品转换率均能达到 98.56%~99.71% 的范围; 之后, 由于固定化酶的酶活力随着时间的延长而逐步下降, 其产品转换率也随之降低. 结果表明该填充床反应器的操作效果良好.

(2) 底物和降解产物的平均相对分子质量分布: 高效毛细管电泳图谱(图 5a, 5b)显示: 底物酪蛋白的平均相对分子质量为 31 419~31 838; 降解产物的平均相对分子质量为 13 239~13 703. 结果表明壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的填充床反应器对酪蛋白具有良好的降解能力.



图2 填充床反应器的实验装置照片

Fig. 2 Photo of plug-flow reactor's experimental installation

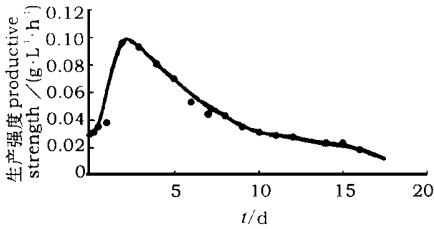


图3 填充床反应器的生产强度与时间的函数

Fig. 3 Function between plug-flow reactor's productive strength and time

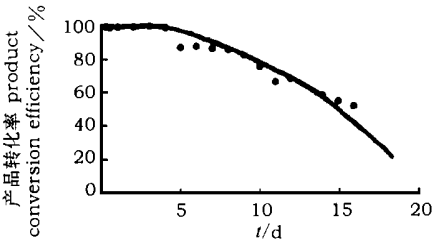


图4 填充床反应器的产品转化率与时间的函数

Fig. 4 Function between plug-flow reactor's product conversion efficiency and time

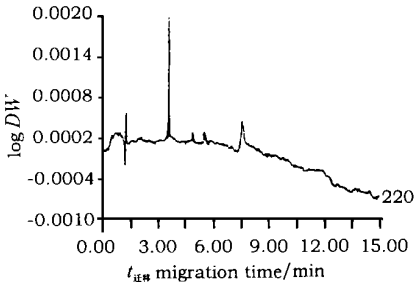


图5a 底物酪蛋白的高效毛细管电泳图谱

Fig. 5a High performance capillary electropherogram of casein substrate

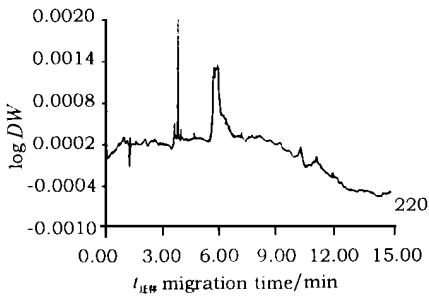


图5b 降解产物的高效毛细管电泳图谱

Fig. 5b High performance capillary electropherogram of hydrolysate

3 讨论

根据进料和出料方式的不同, 酶反应器目前存在多种类型. 其中, 填充床反应器是应用最多的一种, 已广泛应用于 L-氨基酸、延胡索酸、6-氨基青霉烷酸及高果糖浆等的生产, 但用于高分子蛋白质的降解尚鲜见报道. 酶反应器类型的选择主要依据酶的应用形式、底物的物理性质、酶反应动力学及稳定

性、操作要求、成本及应用的可塑性等^[8]:(1)在本研究中,自制的壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶具有比表面积大、吸附性能良好及耐酸、耐碱性能好等优良特性,完全符合PFR的酶的应用形式的要求。(2)底物酪蛋白溶液是一种亲水胶体,因此底物浓度不宜过高(5 g/L);采取一定流速的底物上行方式,既能使固定化酶与底物充分混合,又不会堵塞填充床反应器。(3)酶反应器的动力学极为复杂,本研究只讨论在理想条件下,Michaelis-Menten方程在反应器中的表现性态。首先,在等温状态(水浴恒温20℃)、固定化酶在反应器内均匀分布等条件下,该PFR中既没有轴向扩散或梯度扩散又能保持较好的物质交换和热交换。其次,在及时排出产物的同时,又等量地补充新鲜底物,故不会造成产物的回混和产物的抑制作用。另外,酶动力学参数的测定结果显示:固定化酶对底物的亲和力比溶液酶提高了7.6倍,即有利地改善了酶反应器的表观动力学性态。以上因素使该PFR的生产强度和产品转换率得以提高。研究中测得固定化酶在pH7.0和35℃以下活力稳定,即在近中性和常温条件下,PFR中的固定化酶活力稳定,这便使反应器的操作工艺简单,免除了运行中调整酶活力、pH及升温的设备和工艺。该PFR不带搅拌、底物流速较慢等条件有效地克服了切变作用;同时微球状的固定化酶使摩擦力减小,这些因素都有利地保证了酶的稳定性。(4)该PFR的结构简单,操作方便,因此不仅增加了其应用的可塑性,还降低了成本。同时,在实验条件下,固定化酶的操作半衰期

达25 d,该PFR连续反应16 d,其生产强度在第2 d达到最高,为0.096 g/L·h,其产品转换率在第1~4 d均达98.56%~99.71%;产物的平均相对分子质量为13 239~13 703,分布较为均一。以上结果表明:用该PFR降解蛋白质、以制备蛋白质降解产物的功能性食品的思路是可行的,从而为酶促降解蛋白质提供了新途径和新工艺。

参考文献:

- [1] 清水 诚. 机能性食品成分と食品加工[J]. New Food Industry, 1995, 37(9): 45-49.
- [2] 中村哲郎, 宿野部孝存, 土岐良一. 乳カゼインの酵素加水分解によるペプチド, 混合物の制造[J]. 日本工业学会, 1991, 38(5): 377-383.
- [3] MD フーヅ, MARTIN S. 蛋白质分解物の机能性とその利用[J]. 食品と开発, 1994, 29(7): 23-25.
- [4] 徐凤彩, 李雪萍, 程京燕, 等. 壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(5): 608-613.
- [5] 姜涌明, 隋德新, 赵国骏, 等. 壳聚糖固定木瓜蛋白酶的研究[J]. 生物化学杂志, 1993, 9(4): 404-407.
- [6] 李再资. 生物工程与酶催化[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1995. 98-226.
- [7] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, (72): 248-254.
- [8] 陈驹声, 居乃琥, 陈石根. 固定化酶理论和应用[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987. 76-108.

Studies on Plug-Flow Reactor of Immobilized Papain on Chitosan Microspheres

LI Hong, WANG Wei-jun, XU Feng-cai

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

Abstract: The plug-flow reactor was established to hydrolyze casein. The results of the studies indicated: the reactor's productive strength reached the highest [0.096 g/(L·h)] on the second day; its product conversion efficiency was kept at 98.56%~99.71% during the first four days; its hydrolysis ability was good.

Key words: immobilized papain; plug-flow reactor

【责任编辑 李 玲】