

文章编号: 1001-411X(2001)02-0056-03

壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的特性研究

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: 研究了以壳聚糖微球为载体固定化木瓜蛋白酶的特性, 包括其形态、外观和酶学性质. 结果表明: 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶是粒径分布范围较均匀的球形微粒; 固定化酶的表观米氏常数 K_m^{app} (酪蛋白) 为 0.055%, 是溶液酶的米氏常数 K_m 的 0.13 倍; 最适 pH 为 8.0, pH 稳定性在 7.0 左右; 热稳定性在 15~35℃ 范围内; 操作半衰期为 25 d. 该结果为壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶反应器的试制和研究提供了重要的参考价值.

关键词: 壳聚糖微球; 固定化木瓜蛋白酶

中图分类号: Q552.2

文献标识码: A

本文是在研究壳聚糖微球的制备及其固定化木瓜蛋白酶最佳条件的基础上展开, 研究目的是为壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的酶反应器试制和研究提供参考因素. 由于在选择酶反应器类型时没有一个简单的法则和标准, 必须根据具体情况进行权衡, 一般考虑以下因素: 酶的应用形式、底物的物理性质、酶反应动力学、酶的稳定性、操作要求、应用的可塑性以及成本等^[1], 因此研究壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的特性具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料

药品与试剂: 壳聚糖 [w (脱乙酰度)=93.28%, 粘度 ≤ 50 mPa·s, 广州凯利生物制剂制品厂]; φ (戊二醛)为 50% (Fluka 公司, 上海化学试剂公司分装); 30 $^\circ$ 透平油(新疆克拉玛依炼油厂); 木瓜蛋白酶(Papain, EC 3.4.22.2, 华南农业大学酶工程实验室制备, 30 133 U/g 粗酶); 酪蛋白(ICN Biochemical 公司); 其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂.

1.2 壳聚糖微球的制备方法

壳聚糖微球的制备参考李田士^[2]、丁明^[4]等方法, 并稍加改进. 称取一定量的壳聚糖并溶于 φ 为 2% 的醋酸溶液, 制得 w 为 4% 的壳聚糖酸性溶胶. 在烧杯中加入透平油, 搅拌下, 缓慢加入 w 为 4% 的壳聚糖酸性溶胶, 搅拌 15 min, 使溶胶液滴均匀分散, 然后滴入一定量 φ 为 25% 戊二醛溶液, 搅拌 10 min 后, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将其 pH 调至 9~10, 于 60~70℃ 水浴保温 3 h, 静置冷却后, 弃去上层油层, 再依次用石油醚(I)、丙酮、无水乙醇抽洗, 真空

干燥后, 过筛(80 目), 最后用蒸馏水抽洗, 真空干燥, 备用.

1.3 木瓜蛋白酶的溶液酶制备及其活力测定

称取 0.16 g 木瓜蛋白酶, 溶于 0.1 mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液并定容至 100 mL, 过滤, 制得 1.6 g/L 的木瓜蛋白酶溶液. 其酶活力的测定方法按 Weetall^[4] 方法. 在 37℃ 下, 每 10 min 内增加 0.1 个光吸收单位所需的酶量为一个酶活力单位(U).

1.4 固定化木瓜蛋白酶的制备及其活力测定

将壳聚糖微球在 0.1 mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液中浸泡 24 h, 抽干. 称取 0.5 g 壳聚糖微球置于试管中, 加入 1.6 g/L 的木瓜蛋白酶溶液 0.6 mL, 于 4~8℃ 吸附 12 h, 并不时搅动. 然后滴入 φ 为 0.6% 的戊二醛溶液 3 mL(0.1 mol/L、pH 8.0 的硼酸缓冲液配制), 使 φ (戊二醛)的最终浓度达到 0.5%, 于 4~8℃ 交联 3 h 后, 用 0.1 mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液洗去多余的戊二醛溶液, 吸干水分. 取 0.1 g 固定化酶测活力, 除加入 1 mL 激活剂(0.1 mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液中含 20 mmol/L 半胱氨酸和 1 mmol/L EDTA, 现配现用, 下同)外, 其活力测定均与溶液酶的相同. 固定化酶活力以 U/g 表示, 固定化酶活力回收率按下式计算: 固定化酶活力回收率=固定化酶总活力(U)/溶液酶总活力(U)×100%.

2 结果

2.1 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的形态和外观测定

经 XSP-16A 光学显微镜(65×)观察测定, 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶分布在粒径范围 21~42 μm

之间,微球粒径的分布范围较均匀;用 OLYMPUS SZH 立体镜(100×)观察壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶呈红棕色球形微粒。

2.2 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的酶学性质测定

(1)壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的米氏常数的测定:以依次为 1~5 g/L 的酪蛋白溶液为底物,测定溶液酶和固定化酶的酶活力.用双倒数作图法,求出溶液酶的 K_m 值和固定化酶的 K_m^{app} 值.结果(图 1)显示:溶液酶的 K_m 值(酪蛋白)为 0.418%,固定化酶的 K_m^{app} 值(酪蛋白)为 0.055%,即溶液酶的值是固定化酶的值 7.6 倍,说明固定化酶对底物酪蛋白的亲和力大幅度增加。

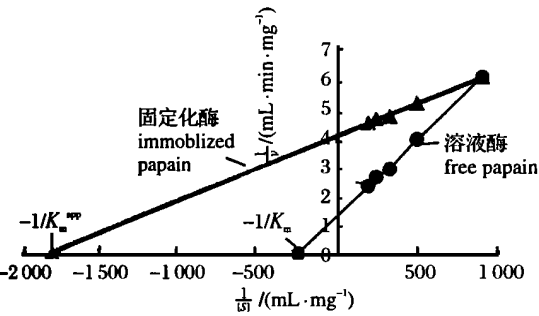


图 1 溶液酶和固定化酶的米氏常数

Fig. 1 Michaelis constants of free papain and immobilized papain

(2)溶液酶和固定化酶的最适 pH: 分别以 pH 6.0~9.0 的激活剂(pH 7.0 以下用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0 以上用 Tris-HCl 缓冲液配制)和相应 pH 条件下的 5 g/L 的酪蛋白溶液为底物,测定溶液酶和固定化酶在不同 pH 条件下的酶活力.结果(图 2)显示:溶液酶和固定化酶的最适 pH 分别为 7.0 和 8.0,即固定化酶的最适 pH 高于溶液酶的最适 pH。

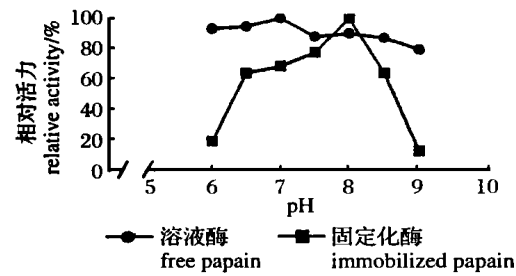


图 2 溶液酶和固定化酶的最适 pH 值

Fig. 2 Optimum pH of free papain and immobilized papain

(3)溶液酶和固定化酶的 pH 稳定性: 分别用 pH 6.0~9.0 的缓冲液配制 1.6 g/L 的木瓜蛋白酶溶液,于 20℃ 静置 3 h.按溶液酶的酶活力测定方法分别测其活力,分别在 pH 6.0~9.0 的缓冲液中加入固定化

酶,于 20℃ 静置 3 h,按固定化酶的酶活力测定方法分别测其活力.结果(图 3)显示:溶液酶在 pH 6.0~7.0 范围内活力稳定,而固定化酶在 pH 7.0 左右活力稳定。

(4)溶液酶和固定化酶的热稳定性: 将一定量的溶液酶和固定化酶在温度 15~85℃ 的条件下,水浴恒温 30 min,流水冷却,然后测定相应的酶活力.结果(图 4)显示:溶液酶在温度 15~65℃ 的范围内活力稳定,固定化酶在温度 15~35℃ 的范围内具活力稳定性。

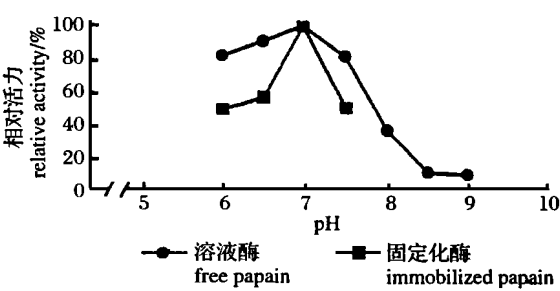


图 3 溶液酶和固定化酶的 pH 稳定性

Fig. 3 pH stability of free papain and immobilized papain

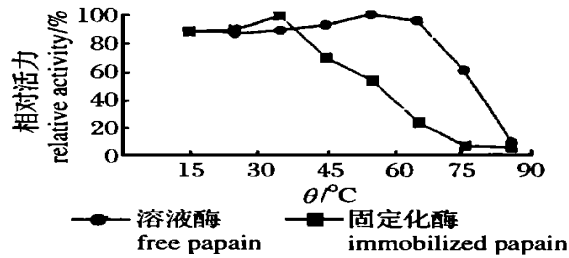


图 4 溶液酶和固定化酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of free papain and immobilized papain

(5)固定化酶的操作半衰期: 称取 10 g 固定化酶(81.3 U/g)并装柱(2 cm×12 cm),以 5 g/L 的酪蛋白溶液为底物,并加入同体积的激活剂,底物流上行,20℃ 恒温水浴,8 mL/h 恒流,连续反应 10 d 后,固定化酶的酶活力为 61.61 U/g.按下式计算^[5]:

$$t_{1/2} = 0.693 \, t / 2.303 \log(E_0/E),$$

$t_{1/2}$: 半衰期(酶活力达原始活力一半的时间), t : 时间, E_0 : 原始酶活力, E : t 时的活力。

结果表明:壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的操作半衰期为 25 d。

3 结论

本文研究了壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的外观、形态和以壳聚糖微球为载体的固定化木瓜蛋白

酶与木瓜蛋白酶的溶液酶在部分酶学性质上的差异. 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶是粒径分布范围较为均匀的球形微粒. 由于壳聚糖微球富含羟基和氨基, 是亲水性高的阳离子聚合物, 所以利用壳聚糖微球为载体制备的固定化酶对底物的亲和力大幅度增加, 即表现为固定化酶的 K_m^{app} 值是溶液酶的 K_m 值的 0.13 倍. 固定化酶的最适 pH 是 8.0, 而溶液酶 pH 为 7.0. 固定化酶最适 pH 的提高, 有利于其在工业上的应用. 溶液酶在 pH 6.0~7.0 活力稳定, 而固定化酶在 pH 7.0 左右稳定. 固定化酶的热稳定性较溶液酶的差, 即固定化酶在 15~35℃具有酶活力稳定性, 而溶液酶的酶活力在 15~65℃稳定, 这可能是由于构向改变效应所造成, 而且利用固定化酶在 15~35℃的条件下保持酶活力稳定这一酶学性质, 其在工业应用上可以免除调节温度的设备和工艺. 固

定化酶的操作半衰期为 25 d, 与徐凤彩等^[9]的报道相近. 以上研究结果为壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶反应器的试制和研究提供了重要的参考价值.

参考文献:

[1] 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.
[2] 李田土. 珠状壳聚糖凝胶的合成[J]. 福建师范大学学报 (自然科学版), 1990, 6(1): 69—74.
[3] 丁 明, 施建军, 皇甫立霞, 等. 壳聚糖微球的制备研究[J]. 化学世界, 1998 (12): 636—640.
[4] WEETAIL H, MASON R. Studies on immobilized papain[J]. Biotechnol, 1973, 15(3): 455—460.
[5] 张树政. 酶制剂工业: 上册[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 337.
[6] 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.

Studies on Characteristics 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: Papain was immobilized on chitosan microspheres. The immobilized papain were microspheres with red-brown and sole dispersed evenly. The characteristics of the immobilized papain were determined. The results indicated: the K_m^{app} (casein) of the immobilized papain was 0.055%, which was 0.13 that of the K_m (casein) of the free papain; its optimum pH was 8.0; its pH stability was about 7.0; its thermal stability was 15~35℃; its operation half-life time was 25 d.

Key words: chitosan microspheres; immobilized papain

【责任编辑 柴 焰】