

# 丝素固定化木瓜蛋白酶的特性研究

陈芳艳<sup>1</sup>, 纪平雄<sup>2</sup>

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 理学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**以活化丝素为载体,采用共价交联法固定木瓜蛋白酶,研究了丝素固定化木瓜蛋白酶的酶学性质. 结果表明:固定化酶的表观米氏常数  $K_m^{app}$  [酪蛋白] 为 0.092%, 是溶液酶的米氏常数  $K_m$  的 0.46 倍;最适 pH 为 7.5; pH 稳定性在 6.5 ~ 8.0; 在 4 ~ 55 °C 范围内酶活力稳定;溶液酶的操作半衰期为 38 d, 固定化酶为 54 d. 固定化酶的操作半衰期较溶液酶长.

**关键词:**丝素; 固定化木瓜蛋白酶; 酶学特性

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 04-0081-03

## Studies on characteristics of immobilized papain on silk fibroin

CHEN Fang-yan<sup>1</sup>, JI Ping-xiong<sup>2</sup>

(1 College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Using the activated fibroin as carrier, the papain was immobilized using covalence-crosslinking method. Studies on some characteristics of the fibroin-immobilized papain showed: the  $K_m^{app}$  [casein] of the immobilized papain was 0.092%, and the  $K_m$  [casein] of the free papain was 0.198%, which mean the affinity of the immobilized papain for casein increased greatly, being 0.46 times of the free papain. The optimum pH value was 7.5 for the immobilized papain. The immobilized papain was stable under 6.5 - 8.0. The heat stability of the immobilized papain was 4 - 55 °C. The operation half-life of the free papain was 38 d while the immobilized papain was 54 d. The operation half-life of the immobilized papain was longer than that of the free papain.

**Key words:** silk fibroin; immobilized papain; characteristics of papain

酶作为一类重要的生物催化剂,具有催化效率高、专一性强、反应条件温和、无污染等特点,被广泛应用于制药、环保、食品、酿造等领域;但大多数溶液酶在实际应用中也存在诸多缺陷,如对热、强酸、强碱、有机溶剂等不够稳定,难以从反应体系中回收,污染产物并给产物提纯造成困难,最终导致生产成本的提高等<sup>[1]</sup>. 20 世纪 60 年代兴起的固定化酶技术为这些问题的解决提供了有效的手段,从而使酶的固定化成为当前酶工程的热门课题之一<sup>[2,3]</sup>. 固定化酶的优点是可以反复多次使用,有较长的使用寿命,反应后又很容易和反应液分离,故产品质量较有保证. 所以,固定化酶将成为酶在工业上的主要形式<sup>[4,5]</sup>. 固定化对酶活性及酶反应系统产生的影响

十分复杂,固定化酶和水溶性酶表现出来的性质不同,掌握这些性质对固定化酶的应用和研究都有很重要的意义<sup>[6]</sup>. 本试验在研究了丝素固定化木瓜蛋白酶固定化条件的基础上,进一步研究丝素固定化木瓜蛋白酶的酶学性质.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蚕壳(由华南农业大学动物科学学院提供);质量分数为 25% 戊二醛溶液(汕头光华化学厂,进口分装);酪蛋白(ICN-Biochemical 公司);木瓜蛋白酶(华南农业大学动物科学学院蚕学实验室制备);其余试剂均为市售生化或分析纯试剂.

收稿日期: 2005-03-03

作者简介: 陈芳艳(1971-),女,讲师,硕士. 通讯作者: 纪平雄(1956-),男,副教授;

E-mail: xiongpi16591@263.net

基金项目: 华南农业大学校长基金资助项目(5400-K00014)

## 1.2 木瓜蛋白酶溶液酶的制备及其活力测定

称取0.1 g木瓜蛋白酶,溶于0.1 mol/L的pH 7.2的磷酸缓冲液并定容至100 mL,过滤,制得 $\rho$ (蛋白质)=0.64 mg/mL、酶活力1 538.46 U/mL的木瓜蛋白酶液.酶活力的测定按Weetall等<sup>[7]</sup>的方法.在测定条件下每增加0.001个光吸收单位的酶量为1个酶活力单位(U).

## 1.3 固定化木瓜蛋白酶的制备及其活力测定

固定化木瓜蛋白酶的制备按陈芳艳等<sup>[8]</sup>方法.

## 1.4 丝素固定化木瓜蛋白酶部分酶学性质的测定

1.4.1 溶液酶米氏常数( $K_m$ )和固定化酶表观米氏常数( $K_m^{app}$ )的测定 取5组各0.1 mL的0.16 mg/mL活力为187.5 U/mL的木瓜蛋白酶液和5组各0.075 g(干质量)活力为1 533 U/g的固定化酶,分别按溶液酶和固定化酶的酶活力测定方法测其活力,其中各组所加底物酪蛋白溶液的质量浓度分别为1、2、3、4、5 g/L.用Lineweaver-Burk作图法,求出溶液酶的 $K_m$ 值和固定化酶的 $K_m^{app}$ 值.

1.4.2 溶液酶和固定化酶的最适pH值测定 取7组各0.1 mL的0.16 mg/mL、活力为180 U/mL的木瓜蛋白酶液和7组各0.075 g(干质量)活力为1 056 U/g的固定化酶,分别按溶液酶和固定化酶的酶活力测定方法测其活力,其中各组分别加入pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0的激活剂和相应pH值的5 mg/mL酪蛋白溶液底物(pH 7.5以下为磷酸缓冲液,pH 8.0以上为Tris-HCl缓冲液,下同).分别测定溶液酶与固定化酶在各pH条件下的酶活力.

1.4.3 溶液酶和固定化酶的pH稳定性测定 分别用pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0的缓冲液配制0.16 mg/mL活力129 U/mL的木瓜蛋白酶液,于20℃静置3 h后,调pH至7.2,按溶液酶的活力测定方法分别测其活力;分别于pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0的缓冲液中加入活力为1 160 U/g固定化酶,于20℃静置3 h后,调pH至7.2,按固定化酶的活力测定方法分别测定其活力.

1.4.4 溶液酶和固定化酶的热稳定性测定 将等量的活力112 U/mL, $\rho$ (蛋白质)=0.16 mg/mL溶液酶与活力为1 080 U/g固定化酶分别在4、25、35、45、55、65、75、85℃下水浴恒温30 min,流水冷却后,分别按溶液酶和固定化酶的活力测定方法测其活力.

1.4.5 溶液酶和固定化酶的操作半衰期测定 将溶液酶和固定化酶置于4~8℃保存,每隔1 d取样测定酶活力;半衰期的计算按张树政<sup>[9]</sup>的方法.

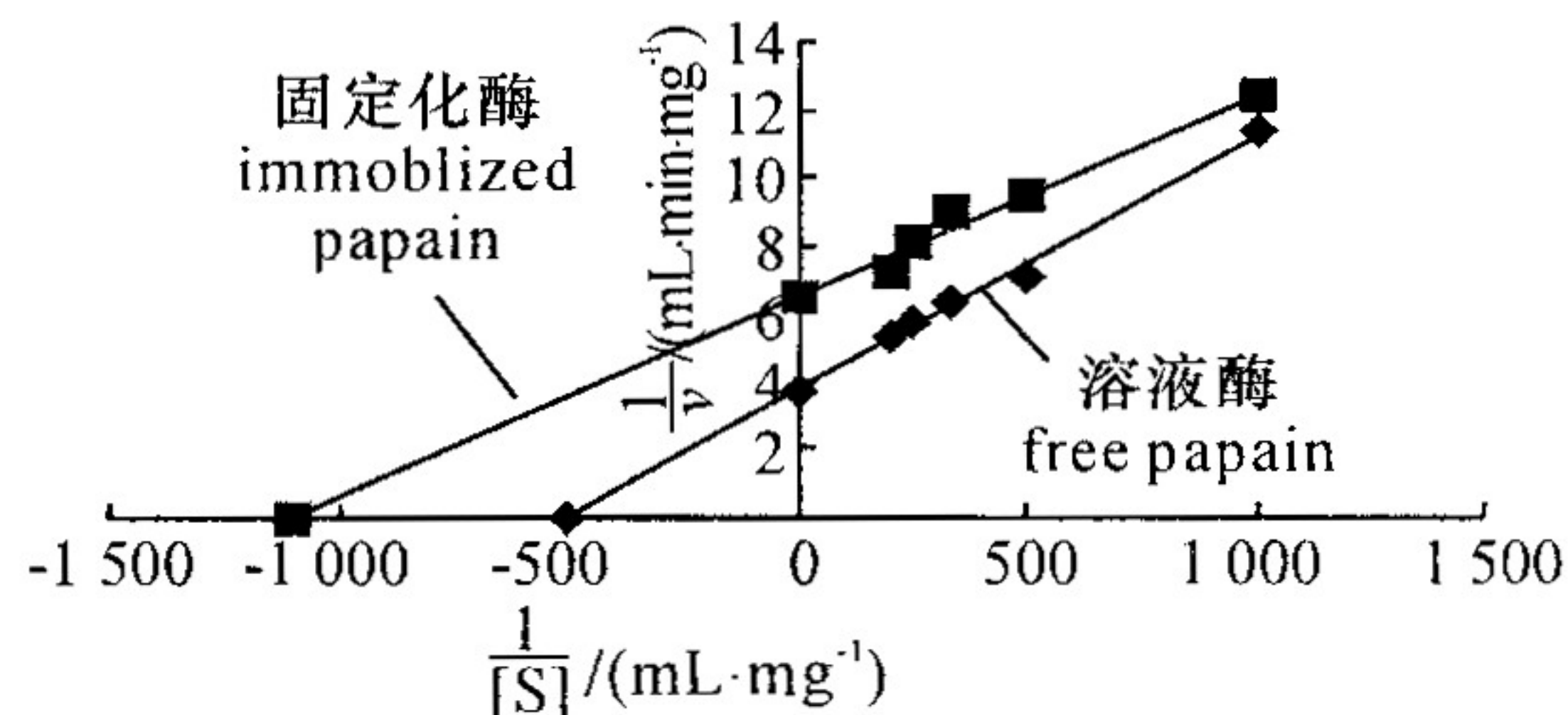
$$t_{1/2} = 0.693 [2.303 / t \cdot \lg([E_0] / [E_t])],$$

$[E_0]$ —起始酶浓度, $[E_t]$ — $t$ 时间后的酶浓度, $t$ —时间/h.

## 2 结果

### 2.1 溶液酶和固定化酶的米氏常数

分别以1、2、3、4、5 g/L的酪蛋白溶液为底物,测定溶液酶和固定化酶活力.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,结果如图1.溶液酶的 $K_m$ [酪蛋白]为0.198%,固定化酶的 $K_m^{app}$ [酪蛋白]为0.092%,即固定化酶 $K_m^{app}$ 是溶液酶 $K_m$ 的0.46倍,说明固定化酶对底物酪蛋白的亲合力大幅度增加.



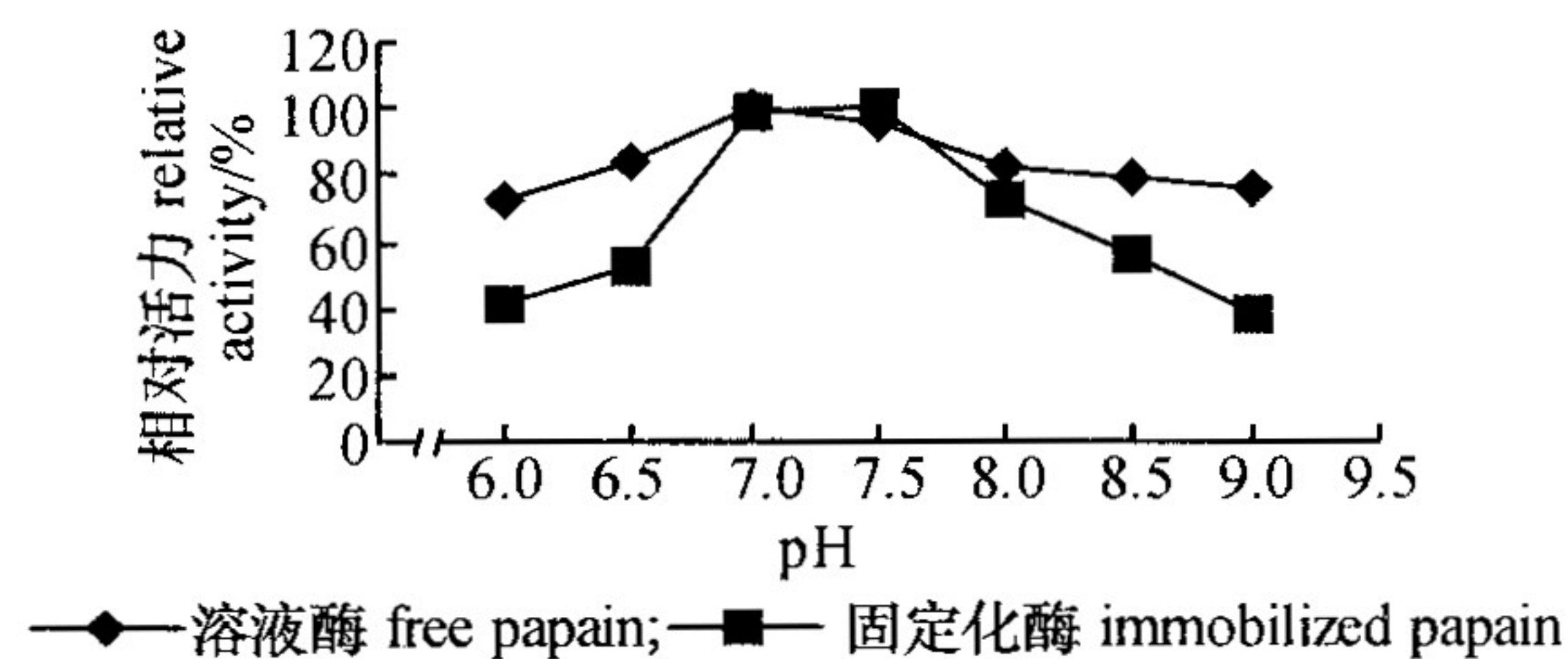
溶液酶活力187.5 U/mL, $\rho$ (蛋白质)=0.078 4 mg/mL; 固定化酶活力1 533 U/g  
Activity of free papain was 187.5 U/mL,  $\rho$ (protein) = 0.078 4 mg/mL; Activity of immobilized papain was 1 533 U/g

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

### 2.2 溶液酶和固定化酶的最适pH值

溶液酶和固定化酶的最适pH值分别为7.0和7.5(图2),最适条件下的酶活力为100%.固定化酶的pH值向碱性方向偏移了0.5个单位.这主要是由于分配效应所致,载体带正电荷时,通过静电作用将溶液本体中的阴离子(如 $OH^-$ )吸引到其表面,导致酶分子微环境中 $OH^-$ 浓度的增加,而本体溶液中的 $OH^-$ 浓度减少,试验中所测得的本体溶液pH偏低,使得最适pH值向偏酸的一侧移动;反之,载体带负电荷时,向偏碱的一侧移动<sup>[10]</sup>.丝素的等电点为3.5~5.2,带负电荷,因而导致最适pH向碱性方向偏移.最适pH的提高有利于工业上的应用.



溶液酶活力180 U/mL, $\rho$ (蛋白质)=0.16 mg/mL; 固定化酶活力1 056 U/g  
Activity of free papain was 180 U/mL,  $\rho$ (protein) = 0.16 mg/mL; Activity of immobilized papain was 1 056 U/g

图2 溶液酶和固定化酶的最适pH

Fig. 2 Optimum pH of free papain and immobilized papain

### 2.3 溶液酶和固定化酶的 pH 稳定性

溶液酶和固定化酶以最稳定条件下的酶活力为 100% (图 3). 溶液酶在 pH 6.0 ~ 8.5 范围内活力稳定, 而固定化酶在 pH 6.5 ~ 8.0 范围内活力稳定 (图 3). 固定化酶 pH 稳定范围比游离酶稍窄.

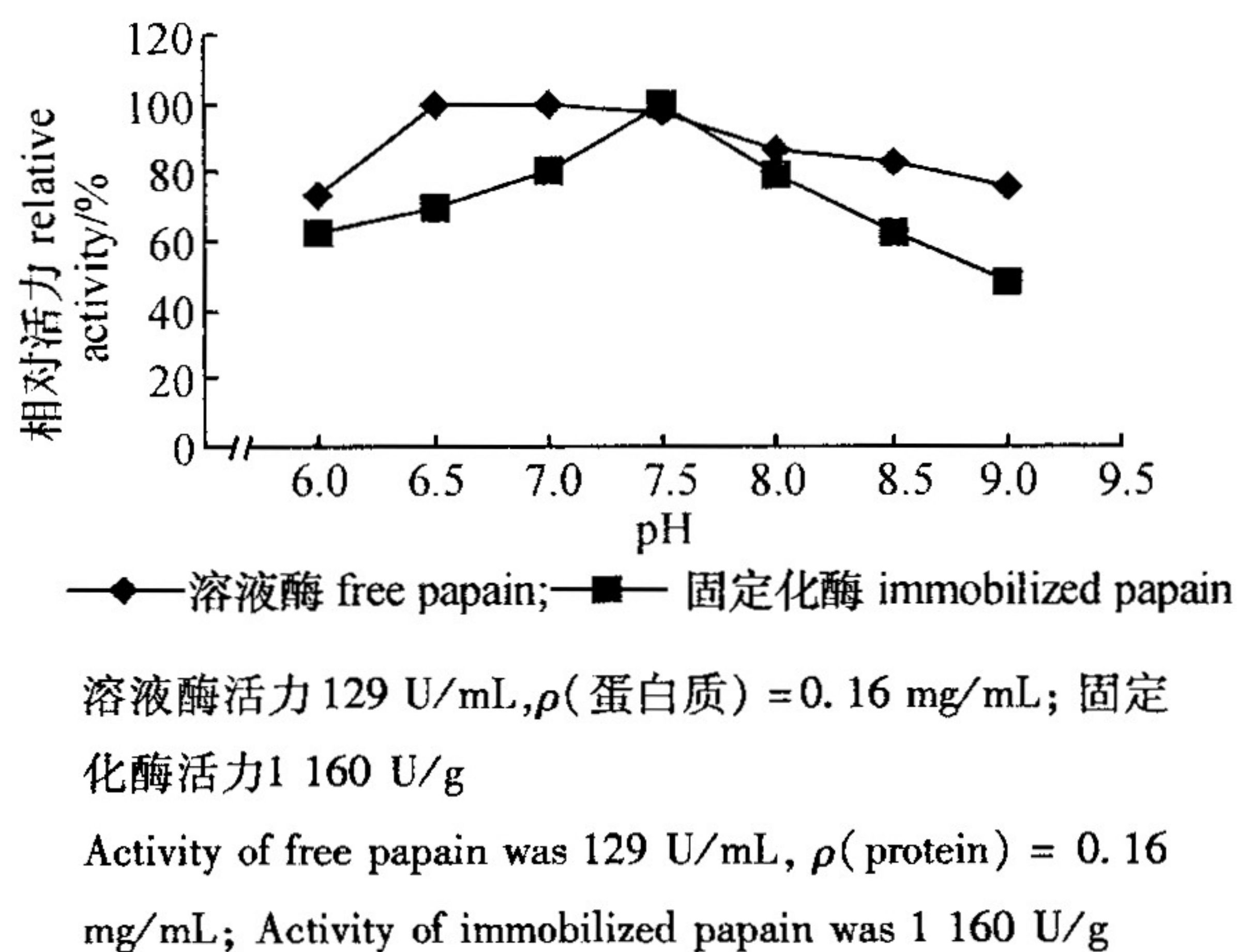


图 3 溶液酶和固定化酶的 pH 稳定性

Fig. 3 pH stability of free papain and immobilized papain

### 2.4 溶液酶和固定化酶的热稳定性

溶液酶和固定化酶的热稳定性如图 4. 溶液酶和固定化酶分别以最稳定温度下的酶活力为 100%. 溶液酶在 4 ~ 65 °C 酶活力稳定, 而固定化酶在 4 ~ 55 °C 酶活力稳定. 固定化酶的热稳定性较游离酶稍窄.

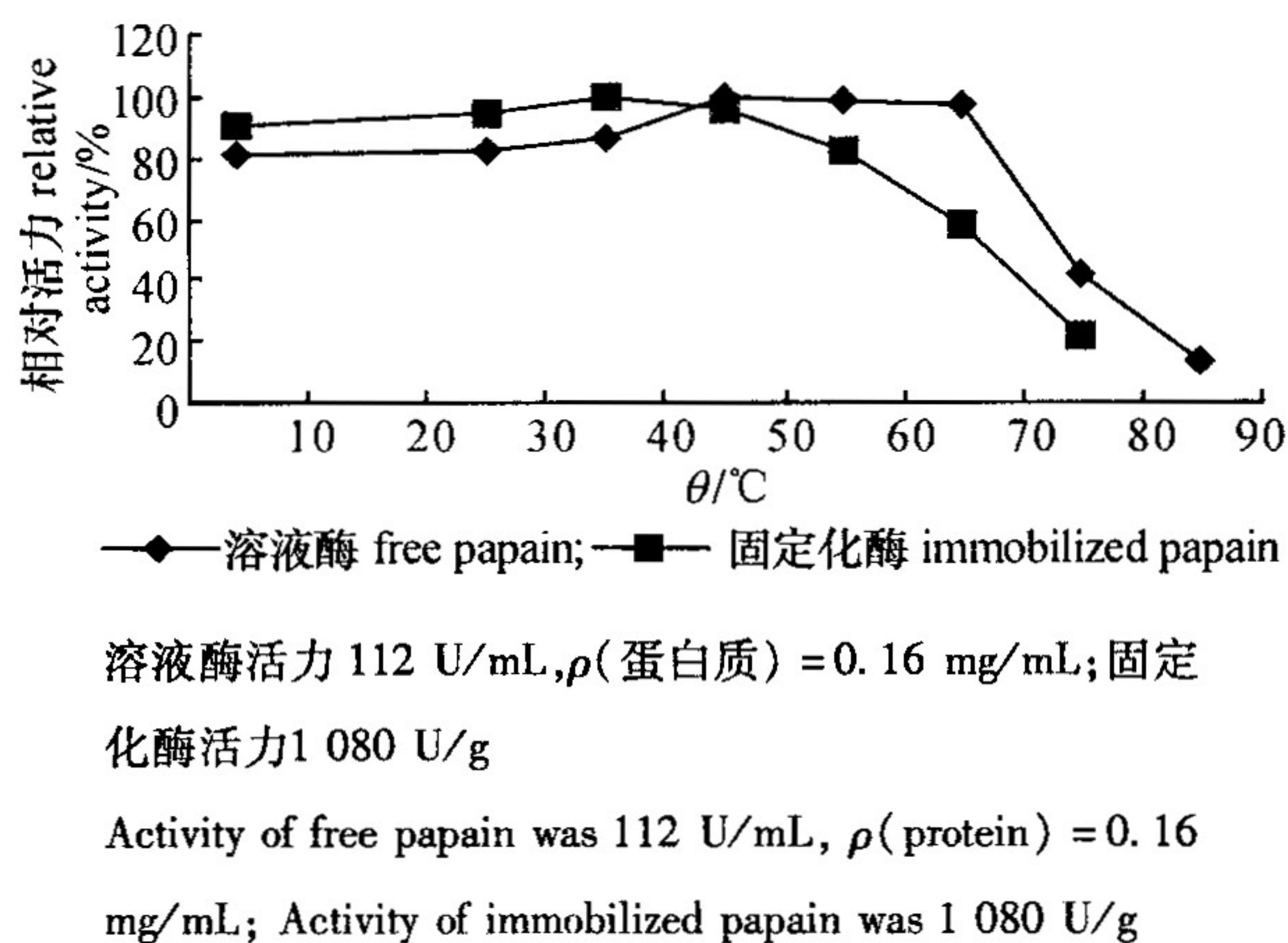


图 4 溶液酶和固定化酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of free papain and immobilized papain

### 2.5 溶液酶和固定化酶的操作半衰期

溶液酶活力为 720 U/mL, 固定化酶活力为 1 070 U/g, 分别置于 4 ~ 8 °C 下, 每隔 1 d 取样测定酶活力, 14 d 后活力分别为 557.79 U/mL 和 894.1 U/g. 按公式计算<sup>[9]</sup>, 溶液酶在 4 ~ 8 °C 的操作半衰期为 38 d, 而固定化酶的操作半衰期为 54 d. 固定化酶的半衰期高于溶液酶.

## 3 结论

本试验研究了木瓜蛋白酶的溶液酶及以丝素为载体的固定化木瓜蛋白酶的部分酶学性质上的差异. 丝素是一种亲水聚合物, 以丝素为载体制备的固定化木瓜蛋白酶对底物的亲和力大幅度增加, 溶液酶的  $K_m$  [酪蛋白] 为 0.198%, 固定化酶的  $K_m^{app}$  [酪蛋白] 为 0.092%, 即固定化酶的  $K_m^{app}$  是溶液酶  $K_m$  的 0.46 倍, 表明固定化酶对底物酪蛋白的亲和力大大提高了. 固定化酶的最适 pH 为 7.5 而溶液酶为 7.0, 最适 pH 的提高有利于工业上的应用. 溶液酶在 pH 6.0 ~ 8.5 范围内活力稳定, 而固定化酶在 pH 6.5 ~ 8.0 范围内稳定. 固定化酶在 4 ~ 55 °C 稳定而溶液酶在 4 ~ 65 °C 酶的活力稳定. 固定化酶 pH 稳定范围和热稳定性较溶液酶稍窄一些, 这些可能是固定化过程中, 由于酶与载体的结合, 使酶分子构象改变所引起的. 固定化酶操作半衰期较溶液酶操作半衰期明显延长. 溶液酶在 4 ~ 8 °C 的操作半衰期为 38 d, 而固定化酶的操作半衰期为 54 d, 固定化酶的半衰期高于溶液酶. 说明固定化酶的稳定性高于溶液酶. 这些性质都扩大了木瓜蛋白酶的实用范围.

#### 参考文献:

- [1] 邓红涛, 吴健, 徐志康, 等. 酶的膜固定化及其应用的研究进展[J]. 膜科学与技术, 2004, 24(3): 47-53.
- [2] EL-MASRY M M, de MAIO A, MARTELLI P L, et al. Influence of the immobilization process on the activity of  $\beta$ -galactosidase bound to nylon membranes grafted with glycidyl methacrylate: Part 1. Isothermol behavior[J]. J Mol Cat B: Enzy Matic, 2001, 16: 175-189.
- [3] ARICA M Y. Epoxy-derived pH EMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: Covalently bound urease in a continuous model system[J]. J Appl Polym Sci, 2000, 77: 2 000-2 008.
- [4] 李继珩. 生物工程[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1995. 138-258.
- [5] 顾其丰. 生物化工原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997. 36-54.
- [6] 陈石根, 周润琦. 酶学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987. 169-183.
- [7] WEETALL H, MASON R. Studies on immobilized papain[J]. Biotechnol, 1973, 15(3): 455.
- [8] 陈芳艳, 纪平雄. 家蚕丝素固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(3): 83-86.
- [9] 张树政. 酶制剂工业: 上册[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 375-377.
- [10] ARICA M Y, KACAR Y, ERGENE A, et al. Reversible immobilization of lipase on phenylalanine containing hydrogel membranes[J]. Process Biochem, 2001, 36: 845-847.

【责任编辑 柴 焰】