

多孔陶瓷膜固定木瓜蛋白酶的研究

方 焕¹, 高向阳², 张洪利², 梁建开², 林静芬²

(1 广州市华琪生物科技有限公司, 广东 广州 510308; 2 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:用经磷酸缓冲液处理后的多孔陶瓷膜作为固定化酶的载体, 采用物理吸附法固定木瓜蛋白酶。试验结果表明, 当溶液酶质量浓度为 1.0 ~ 2.0 mg/mL、pH 7.0、固定 2 h 时, 固定化酶活力最高达 111.1 U/g, 活力回收率达 57.9%。固定化酶反应最适 pH 为 6.0 ~ 8.0, 最适温度为 60 ~ 70 °C, 70 °C 下保温 4 h 活力仍保持在 50% 以上, 半衰期 54 d。试验证明, 多孔陶瓷膜吸附能力强、吸附速度快, 制备的固定化木瓜蛋白酶的 pH 稳定性、热稳定性、贮藏稳定性明显优于溶液酶。

关键词:多孔陶瓷膜; 木瓜蛋白酶; 固定化

中图分类号: Q556.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2006)04-0036-04

Preparation and Characterization of China Granule Immobility-Papain

FANG Huan¹, GAO Xiang-yang², ZHANG Hong-li², LIANG Jian-kai², LIN Jing-fen²

(1 Huaqi Bio-Tech Company Limited, Guangzhou 510308, China;

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

Abstract: As a new-style carrier to immobilize enzyme, china granule was used in the immobilization of papain by physical adsorption in the experiment. The china granule should be treated with the phosphoric acid buffer before immobilization. The results of the experiment demonstrated that the optimum conditions for immobilization were as follows: the range of optimum concentration of solution papain was 1.0 ~ 2.0 mg/mL, pH value was 7.0 and the time for immobilization was 2 h. The maximal activity of the immobility papain was 111.1 U/g and the activity recovery of the immobility papain was 57.9%. The optimum pH values of immobility papain for reaction was 6.0 ~ 8.0 and the optimum temperature for fixed papain to react was 60 ~ 70 °C. The activity of the immobility papain has been maintained more than 50% at 70 °C for 4 h, and its operation half-life time was 54 d. The results indicated: China granule has better and faster adsorptive power; The immobilization of papain using china granule was much steadier than the solution papain at different pH and temperature conditions. And the immobilization of papain has longer time of reserve.

Key words: china granule; papain; immobility

木瓜蛋白酶对蛋白质、短肽化合物等的水解反应都具有良好的催化活性, 也可用于非水相催化合成短肽^[1-2], 在医药、食品、轻纺等领域有着广泛的应用。为了克服溶液酶对热、酸、碱、有机溶剂等因素的不稳定性, 固定化木瓜蛋白酶已有了较为广泛深入的研究。李红等^[3]以壳聚糖微球为载体制备并研究

了固定化木瓜蛋白酶的特性, 程凡亮等^[4]进行了氨基化二氧化硅颗粒固定木瓜蛋白酶的探索, 贺枫等^[5]研究了多孔硅球固定木瓜蛋白酶的制备和性质。载体的选择是形成固定化酶的关键之一。多孔陶瓷膜是一种无机膜, 它主要由 Al₂O₃ 和 SiO₂ 等材料经 1 400 ~ 1 500 °C 烧结制备而成。与其他的载体

收稿日期: 2005-09-23

作者简介: 方 焕(1962—), 男, 工程师; 通讯作者: 高向阳(1966—), 女, 副教授, E-mail: gaogxy@yahoo.com.cn

基金项目: 广东省高教厅自然科学基金项目(F02019)

相比,多孔陶瓷膜化学稳定性好,耐酸、耐碱、耐有机物,机械强度大,抗微生物能力强,耐高温^[6]。多孔陶瓷膜表面积大,吸附容量大,有较好的机械强度,能够长期反复使用,工艺操作性能良好,是一种很有前途的固定化酶载体。本文以多孔陶瓷膜为载体,研究木瓜蛋白酶固定化条件及其固定化酶的性质。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

多孔陶瓷膜(孔径 0.2 ~ 0.3 mm、半径约为 4 mm,广东省佛山陶瓷研究所),木瓜蛋白酶(广州市华琪生物科技有限公司,1 mg/mL 木瓜蛋白酶溶液中含蛋白质 23.2 $\mu\text{g/mL}$ 、酶活力 48 000.0 U/g),考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白(进口分装),半胱氨酸、酪蛋白(上海伯奥生物科技有限公司),三氯乙酸等其他试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 固定化酶的制备 称取适量多孔陶瓷膜,用磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)室温浸泡 15 min,转移到三角瓶中,加适量木瓜蛋白酶溶液(pH 7.0, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制),保鲜膜封口,置于摇床上摇动(50 r/min)进行固定化。一定时间后,尽量倾去液体,冷冻干燥后,置于冰箱低温保存备用。

1.2.2 酶活力测定 溶液酶活力测定:参照 Weetall 和 Mason^[7]的方法,稍有改动。取 0.1 mL 的 1 mg/mL 木瓜蛋白酶液,加入 0.9 mL 激活剂(0.1 mol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液内含 0.02 mol/L Cys 及 0.001 mol/L EDTA),于 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 min,加入 $w = 1\%$ 酪蛋白溶液 1 mL,35 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后,立即加入 $w = 10\%$ 三氯乙酸(TCA)溶液 2 mL 终止反应。静置过滤,测定滤液 $D_{275\text{nm}}$ 值(以先加 TCA 溶液,后加酪蛋白同样处理的滤液作为对照)。

固定化酶活力测定:取 0.1 g 固定化酶,加入 1 mL 激活剂(同上),其余步骤同溶液酶活力测定。

酶活力定义:在上述条件下,每 10 min 增加 0.1 个光密度单位所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。固定化酶活力单位根据载体质量以 U/g 表示。

酶活力回收率 = 固定化酶总活力/溶液酶总活力 $\times 100\%$ 。

1.2.3 蛋白质含量测定 按照考马斯亮蓝 G-250 法,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

所用溶液酶活力 48.0 U/mL,蛋白质质量浓度

23.2 $\mu\text{g/mL}$;在最适条件下制备的固定化酶活力 111.1 U/g,蛋白质质量比 53.7 $\mu\text{g/g}$ 。所有测定试验设 3 次重复。

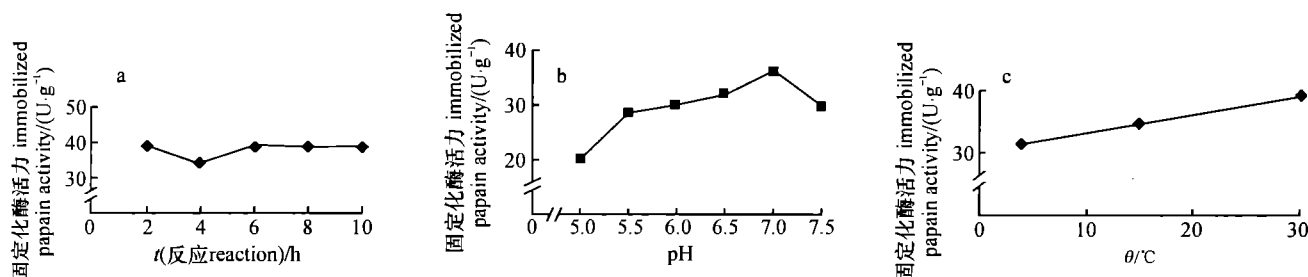
2 结果与分析

2.1 固定化条件的研究

2.1.1 固定化时间对固定化作用的影响 各取 1 g 处理多孔陶瓷膜,分别加入等量 0.1 mol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液配制的质量浓度 1 mg/mL 木瓜蛋白酶溶液,固定 2、4、6、8 和 10 h,测定其固定化酶活性,结果如图 1a。从图 1a 可以看出固定化 2 h,每克载体的固定化酶活力达到最大值,为 39.1 U/g,说明这种载体对酶的吸附速度较快。

2.1.2 pH 对固定化作用的影响 各取 1 g 处理多孔陶瓷膜,分别在 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的 1 mg/mL 木瓜蛋白酶溶液中固定 2 h,得到的固定化酶活性如图 1b 所示。当 pH 为 7.0 时,固定化酶的酶活力达到最高,为 36.5 U/g,随着 pH 继续上升,酶活力又逐渐下降。因此在制备固定化酶时均采用 pH 7.0 的磷酸缓冲液。

2.1.3 温度对固定化作用的影响 各取 1 g 处理多孔陶瓷膜,加入 1 mL 0.1 mol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液配制的 1 mg/mL 木瓜蛋白酶,分别在 4、15、30 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 2 h,固定化酶活性如图 1c 所示,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 进行固定,固定化酶活力达到最大,为 39.1 U/g,说明这种载体在较高温度下固定效果更好。



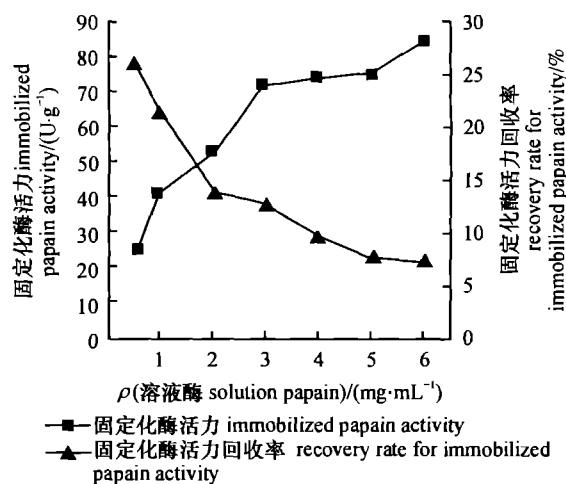
所用溶液酶活力为 48.0 U/mL,蛋白质质量浓度 23.2 $\mu\text{g/mL}$

the activity of solution papain is 48.0 U/mL, the protein mass concentration of papain is 23.2 $\mu\text{g/mL}$

图 1 时间、pH 和温度对固定化效果的影响

Fig. 1 Effects of reaction time, pH and temperature on papain uptake

2.1.4 溶液酶浓度对固定化作用的影响 各取1 g 处理多孔陶瓷膜,分别加入不同浓度的木瓜蛋白酶溶液2 mL,于pH 7下固定2 h,制备得到固定化酶活力如图2。从图2可见:随着溶液酶浓度的增加,载体结合酶量越多,酶活力越高;同时随着酶浓度增加,载体结合酶量趋向饱和,再增加酶量,固定化酶活力回收下降。综合两方面的因素,固定化的最佳溶液酶质量浓度为1.0~2.0 mg/mL。



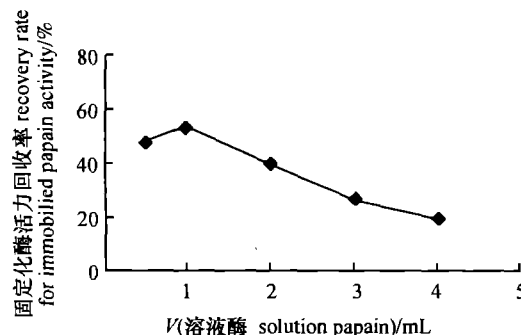
所用溶液酶活力为48.0 U/mL,蛋白质质量浓度23.2 $\mu\text{g/mL}$
the activity of solution papain is 48.0 U/mL, the protein mass concentration of papain is 23.2 $\mu\text{g/mL}$

图2 溶液酶质量浓度对固定化效果的影响

Fig.2 Effect of reaction concentration of papain on papain uptake

2.1.5 溶液酶体积对固定化作用的影响 各取1 g 处理多孔陶瓷膜,分别加入0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL

木瓜蛋白酶溶液(质量浓度1.0 mg/mL、pH 7.0)固定2 h,制得固定化酶的活力回收如图3。溶液酶体积为1 mL时制得的固定化酶,活力回收率最高,达到53.67%,说明此时载体吸附能力较强。



所用溶液酶活力为48.0 U/mL,蛋白质质量浓度23.2 $\mu\text{g/mL}$
the activity of solution papain is 48.0 U/mL, the protein mass concentration of papain is 23.2 $\mu\text{g/mL}$

图3 溶液酶体积对固定化效果的影响

Fig.3 Effect of reaction the volume of papain on papain uptake

2.1.6 多因素正交试验分析 根据单因素试验结果设计多因素正交试验(表1)。由表1可看出,第5组试验制得的固定化酶酶活力显著高于其他组,高达111.1 U/g,活力回收可达到57.9%,试验条件为 $A_2B_2C_3D_1$,与各因素位级 K 值最适条件结果分析相一致。因此,各因素最佳的参数组合是 $A_2B_2C_3D_1$,即给酶量4 mg/g, pH 7.0, 固定温度30 $^{\circ}\text{C}$, 固定时间2 h。由各因素水平的极差值分析可见, $R_A > R_B > R_C > R_D$,与单因素试验结果基本相符。因此,在本试验条件下,影响固定化酶效率的主要因素是给酶量。

表1 正交试验及结果

Tab.1 The result of orthogonal experiments

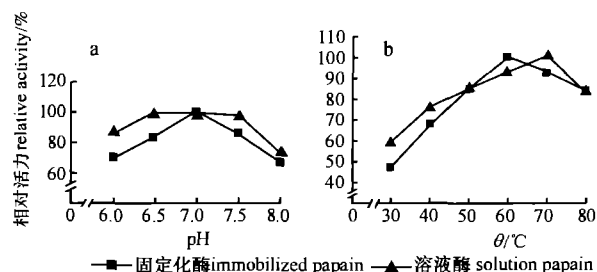
试验号 ¹⁾ group	$m(\text{酶 papain}):m(\text{干载体 dry carrier})/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	pH	$\theta/^{\circ}\text{C}$	$t(\text{固定化 reaction})/\text{h}$	固定化酶活力 immobilized papain activity/(U·g ⁻¹)	固定化酶活力回收率 recovery rate for immobilized papain activity/%
	A	B	C	D		
1	2	6.5	4	2	38.7	40.3
2	2	7.0	15	4	49.8	51.9
3	2	7.5	30	6	55.6	58.0
4	4	6.5	15	6	64.9	33.8
5	4	7.0	30	2	111.1	57.9
6	4	7.5	4	4	83.4	43.4
7	6	6.5	30	4	69.1	24.0
8	6	7.0	4	6	94.7	32.9
9	6	7.5	15	2	80.6	28.0
K1	144.1	172.7	216.8	230.4		
K2	259.4	255.6	195.3	202.3		
K3	244.4	219.6	235.8	215.2		
极差 R	115.3	82.9	40.5	28.1		
合计 total					647.9	

1) K1~K3:各级酶活力之和;极差 R:K1~K3 各自最大值与最小值之差

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 固定化酶反应最适 pH 分别在 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 磷酸缓冲液条件下测定固定化酶和溶液酶活力,并计算相对活力(均设定 pH7.0 时酶活力为 100%),结果如图 4a。从图 4a 可见,固定化酶的反应最适 pH 为 6.5~7.5,较溶液酶最适 pH7.0 范围要广,说明固定化酶拓宽了其反应的最适 pH 范围。

2.2.2 固定化酶反应的最适温度 在不同温度条件下,测定固定化酶和溶液酶的酶活力,并计算相对活力(设定各自酶活力最高时相对活力为 100%),结果如图 4b 所示。图 4b 表明,固定化酶和溶液酶最适温度均在 60~70℃,可见固定化后对酶的最适温度的影响不大。



溶液酶活力为 48.0 U/mL,蛋白质质量浓度 23.2 μg/mL,固定化酶活力为 111.1 U/g

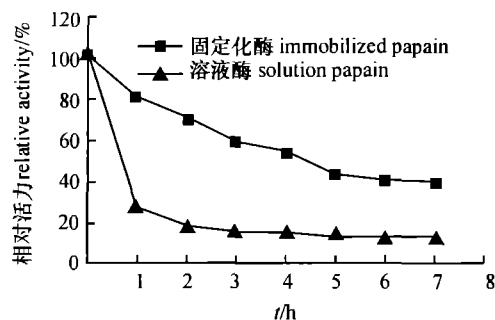
the activity of the solution papain is 48.0 U/mL, the protein mass concentration of the solution papain is 23.2 μg/mL, the activity of the immobilized papain is 111.1 U/g

图 4 固定化酶和溶液酶的最适 pH 及最适反应温度

Fig. 4 Optimum pH and temperature of solution papain and immobilized papain

2.2.3 固定化酶的热稳定性研究 固定化酶和溶液酶分别在 70℃ 下保温 1、2、3、4、5、6 和 7 h,流水冷却,按酶活力测定方法,测定各酶活性,并计算相对活力(设定开始时酶的相对活力为 100%),如图 5 所示。从图 5 可以看出,1 h 内,溶液酶的相对活力急剧降低,而固定化酶的变化则缓慢得多,在处理 4 h 后,固定化酶相对活力仍然维持在 50% 以上。说明固定化酶具有更高的热稳定性。

2.2.4 固定化酶的贮藏稳定性 溶液酶在 4℃ 放置 15 d 后,酶活力下降了一半;而固定化酶在 4℃ 放置 15 d 后酶活力几乎不变,参照文献[8]的方法,按半衰期计算公式 $t_{1/2} = 0.693t / [2.303 \lg(E_0/E)]$ 进行计算[式中: $t_{1/2}$ 为半衰期(酶活力达原始活力一半的时间,单位为 d); E_0 为原始酶活力; E 为 t 时的酶活力],得到半衰期计算值达 54 d,表明固定化酶的贮藏稳定性明显优于溶液酶。



溶液酶活力为 48.0 U/mL,蛋白质质量浓度 23.2 μg/mL,固定化酶活力 111.1 U/g

the activity of the solution papain is 48.0 U/mL, the protein mass concentration of the solution papain is 23.2 μg/mL, the activity of the immobilized papain is 111.1 U/g

图 5 70℃ 下不同温浴时间对固定化酶和溶液酶活力的影响
Fig. 5 Effect of duration of heating at 70℃ on solution papain and immobilized papain activity

3 结论

从上述试验数据可以得知,多孔陶瓷膜固定化酶具有吸附时间短、吸附能力强的特点,2 h 几乎可以达到最大吸附容量,最高吸附效率即活力回收可达 57.9%。固定化最适条件为:给酶量 4 mg/g, pH 7.0,固定温度 30℃,固定时间 2 h。与溶液酶相比较,多孔陶瓷膜固定化酶的 pH 值稳定性得到提高,对热更稳定,70℃ 温浴 4 h 仍有 50% 以上的酶活力,而且还具有非常高的贮存稳定性,因此多孔陶瓷膜固定化木瓜蛋白酶有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] FITE M, ALVARO G, CLAPES P, et al. Reactivity of easily removable protecting groups for glycine in peptide synthesis using papain as catalyst[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23: 199-203.
- [2] ROSINA L, IQBAL G, EVGENY N. Protease-catalyzed synthesis of oligopeptides in heterogeneous mixtures[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 43: 1024-1030.
- [3] 李红,王炜军,徐凤彩. 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的性研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 56-58.
- [4] 程凡亮,陈伶利,王卫,等. 氨基化二氧化硅颗粒固定化木瓜蛋白酶研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 287-289.
- [5] 贺枫,刘立建,卓仁禧. 多孔硅固定化木瓜蛋白酶的制备和性质[J]. 离子交换与吸附, 1997, 13(3): 290-294.
- [6] 徐南平,邢卫红,赵宜江. 无机膜分离技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2003: 1-8.
- [7] WEETALL H, MASON R. Studies on immobilized papain[J]. Biotechnol, 1973, 15(3): 455-458.
- [8] 徐凤彩. 酶工程[M]. 北京:中国农业出版社, 2001: 129.

【责任编辑 李晓卉】