

家蚕丝素固定化木瓜蛋白酶的研究

陈芳艳¹, 纪平雄²

(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:采用质量分数为5%戊二醛在常温下处理脱胶丝素40 min,洗净、真空干燥,制备活化丝素。以活化丝素为载体,采用共价交联法制备固定化木瓜蛋白酶。研究表明,最佳的固定化条件为:给酶量0.36 mg/g(蛋白质质量浓度为0.12 mg/mL)、pH 7.5、温度4℃左右条件下,固定6 h,所得到的固定化酶活力为1 786.93 U/g,活力回收高达69.54%。

关键词:丝素;木瓜蛋白酶;固定化酶

中图分类号:Q55

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)03-0083-04

Immobilization of papain and its application to silk peptide production

CHEN Fang-yan¹, JI Ping-xiong²

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

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

Abstract: The degummed fibroin was treated with $w = 0.5\%$ glutaraldehyde at normal temperature for 40 min and got the activated fibroin. Using the activated fibroin as carrier, the papain was immobilized by covalence-crosslinking method. The result showed that the optimum conditions for immobilization were: the enzyme loading amount was 0.36 mg/g silk fibroin; the temperature was 4℃; the immobilizing time was 6 h; and the pH value was 7.5. The activity and activity recovery of the immobilized papain were 1 786.93 U/g and 69.54%, respectively.

Key words: silk fibroin; papain; immobilized enzyme

蚕丝由于其优良的服用性特征自古以来便是传统的服装用纤维材料。然而,随着科技发展和对蚕丝副产品的综合利用开发不断地深入,为蚕丝应用于非纺织领域开辟了一条新路。丝素为蚕丝脱胶后的丝心蛋白质,由于其特殊的氨基酸组成和结晶结构,大量的研究证明丝素是一种优良的固定化酶载体,具有反应条件温和、反应性强、热安全性好等许多优点^[1],国内外研究人员已用丝素固定了多种酶^[2-6]。木瓜蛋白酶是由木瓜乳汁经提炼而得到的一类蛋白水解酶,主要用于防止啤酒冷浑浊、肉类的嫩化、蛋白质水解产物的制备、饼干和糕点膨化、辅助消化药物等^[7]。为了提高木瓜蛋白酶的使用效率,降低生产成本,国内外研究人员对木瓜蛋白酶的固定化进行

了许多研究,建立了许多固定化方法^[8-11]。但用丝素固定木瓜蛋白酶鲜见报道。本研究以丝素为载体,采用共价交联法固定木瓜蛋白酶,研究了木瓜蛋白酶的最佳固定化条件。

1 材料与方法

1.1 材料

茧壳(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);酪蛋白(ICN-Biochemical公司);考马斯亮兰G-250(上海聚源生物有限公司,进口分装);木瓜蛋白酶(动物科学学院蚕学实验室制备);其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂。

收稿日期:2003-06-16

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。

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 pH 7.2 的磷酸缓冲液并定容至 100 mL,过滤,制得 0.64 mg/mL 的木瓜蛋白酶液.酶活力的测定按徐凤彩^[8]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

用质量分数为 1% Na_2CO_3 为脱胶液,在 100 °C 条件下对蚬壳脱胶 60 min,洗净、烘干;重复以上操作,得到脱胶率为 31.5% 的丝素.此脱胶丝素,用质量分数为 5% 戊二醛(0.2 mol/L pH 8.5 硼酸缓冲液配制,现备现用)于 20 °C 交联 40 min 后,用 0.1 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液洗除多余戊二醛,真空干燥.称取 0.23 g 经戊二醛活化后的丝素(干质量),加入 0.6 mL 活力为 98.5 U/mL 的木瓜蛋白酶液(蛋白质质量浓度为 0.096 mg/mL)于 4~8 °C 固定 6 h 后用 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸缓冲液(含 0.5 mol/L NaCl)洗至洗脱液在 280 nm 波长处无光吸收,吸干.固定化酶活力测定,除加入 1 mL 激活剂外,其余与溶液酶的测定相同.在上述条件下每克载体每增加 0.001 个光吸收单位的酶量为 1 个酶活力单位(U),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/溶液酶总活力] × 100%.

1.4 蛋白质质量浓度测定

按 Bradford^[12]法,并以牛血清白蛋白为标准蛋白质.

1.5 不同因素对酶固定化效果的影响

1.5.1 戊二醛交联时间 称取 5 组各 0.23 g(干质量,下同)脱胶丝素,用质量分数为 5% 戊二醛按浴比为: $m_{\text{丝素}}(\text{g}):V_{\text{溶液}}(\text{mL}) = 1:6.7$ 在 20 °C 分别交联 10、20、30、40、50 min,用 0.1 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液洗去多余戊二醛,真空干燥.称取活化丝素 5 组各 0.23 g,各加入活力为 70 U/mL,蛋白质质量浓度为 0.1 mg/mL 的酶液 0.6 mL 固定,并测定酶活力.

1.5.2 固定化时间 称取 4 组各 0.23 g 活化丝素,各加入酶活力为 116 U/mL,蛋白质质量浓度为 0.14 mg/mL 的酶液 0.6 mL,在 4~8 °C 分别吸附 2、4、6、8 h.测定酶的活力.

1.5.3 固定化温度 称取 3 组各 0.23 g 活化丝素,各加入酶活力为 74 U/mL,蛋白质质量浓度为 0.12 mg/mL 的酶液 0.6 mL,分别在 4、10~14、37 °C 条件下吸附交联 6 h.测定酶活力.

1.5.4 给酶量 称取 5 组各 0.23 g 活化丝素,分别加入 0.6 mL 蛋白质质量浓度依次为 0.077、0.154、

0.230、0.307、0.384 mg/mL(对应活力分别为 78、150、201、321、351 U/mL)的酶液,即给酶量依次为 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/g 载体.测定固定化酶的活力.

1.5.5 溶液酶 pH 称取 7 组各 0.23 g 活化丝素,分别加入活力为 98.5 U/mL,蛋白质质量浓度为 0.12 mg/mL 的酶液 0.6 mL, pH 值依次为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0(pH 7.8 以下为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0 以上为 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液)的酶液 0.6 mL(蛋白质质量浓度 0.096 mg/mL).测定酶的活力.

2 结果

2.1 戊二醛交联时间对酶固定化效果的影响

用质量分数为 5% 戊二醛溶液分别处理丝素 10~50 min 后,制备丝素固定化酶.结果(图 1)表明:用质量分数为 5% 戊二醛对丝素处理 40 min 时,酶活力及活力回收均达最大值,分别为 1 297.8 U/g 及 70.07%.当处理时间小于或大于 40 min 时,酶活力及活力回收明显下降.

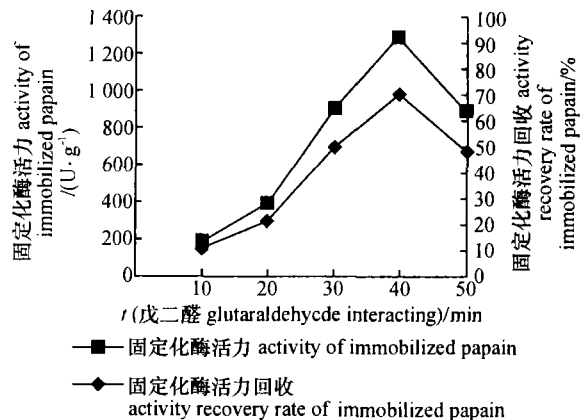


图 1 戊二醛处理时间对酶固定化效果的影响

Fig. 1 Effect of glutaraldehyde interacting time on immobilization results

2.2 固定化时间对酶固定化效果的影响

结果(图 2)表明:当交联时间达 6 h,固定化酶活力及活力回收达最大,分别为 1 604.4 U/g 及 53.02%.在小于或大于 6 h 的时间范围,固定化酶活力及活力回收均降低.因此选取 6 h 作为最佳固定化时间.

2.3 交联温度对酶固定化效果的影响

结果(图 3)表明,交联温度在 4 °C 左右时固定化效果最好,固定化酶的活力达 1 545.6 U/g,活力回收达 79.53%.此后,随着交联温度的升高,固定化酶活力及活力回收均下降.因而选取 4 °C 左右作为最佳固定化温度.

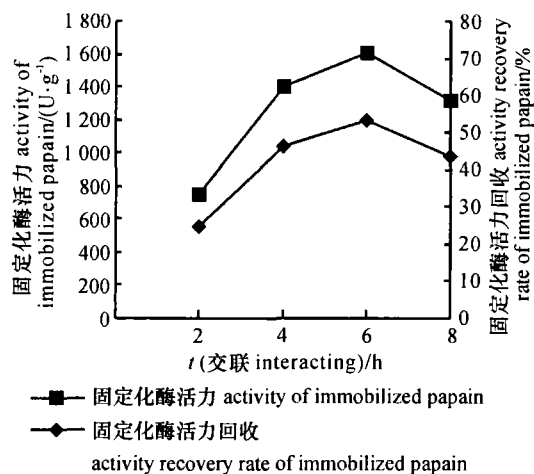


图2 固定化时间对酶固定化效果的影响

Fig. 2 Effect of interacting time on immobilization results

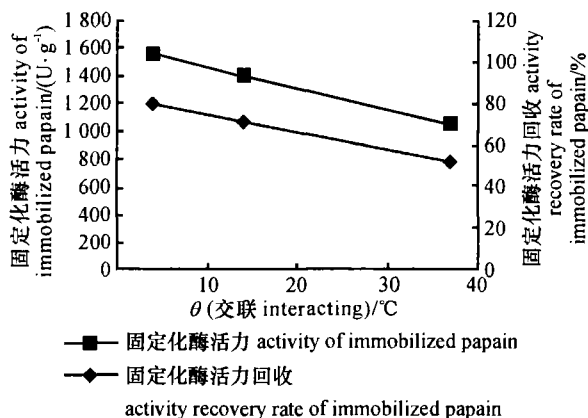


图3 处理温度对酶固定化效果的影响

Fig. 3 Effect of interacting temperature on immobilization results

2.4 给酶量对酶固定化效果的影响

结果(图4)表明:随着给酶量增加,载体结合酶量越多,固定化酶的活力增高,当给酶量达到0.8 mg/g时,固定化酶活力最高,继续增加给酶量,固定化酶的活力不再增加反而下降.另一方面,酶的活力回收随着给酶量的增加而下降.兼顾二者,给酶

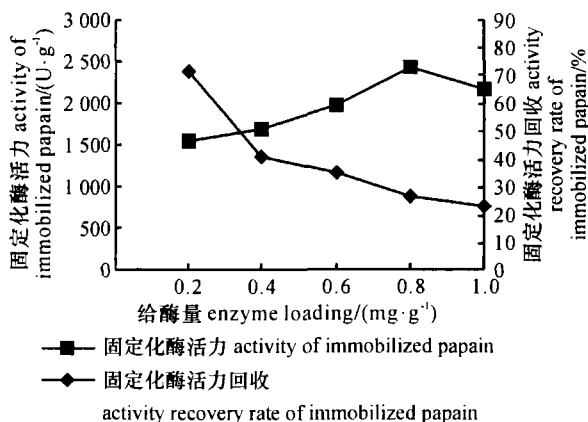


图4 给酶量对固定化酶活力的影响

Fig. 4 Effect of enzyme loading on immobilized results

量为0.36 mg/g,固定化效果达最佳,固定化酶的活力及活力回收,分别达1668.0 U/g和50%.

2.5 溶液酶 pH 对酶固定化效果的影响

结果(图5)表明:当溶液酶 pH 值为7.5时,固定化酶活力和酶的活力回收最大,分别为1786.98 U/g和69.54%.因而溶液酶的最佳 pH 为7.5.

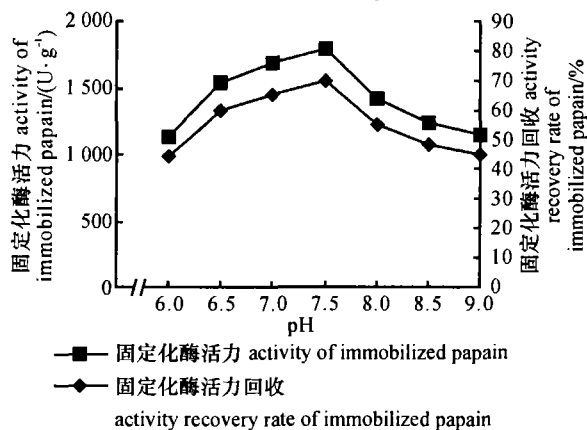


图5 pH 对酶固定化效果的影响

Fig. 5 Effect of pH on immobilized results

综上所述,丝素固定木瓜蛋白酶的最佳固定化条件是:经2次脱胶处理的丝素,用质量分数为5%戊二醛在常温下处理40 min,然后用pH 7.8缓冲液洗净后真空干燥.按活化丝素(m/g):酶液(V/mL)=1:2.6,在溶液酶活力为98.5 U/mL(蛋白质质量浓度为0.096 mg/mL),pH 7.5的条件下于4℃左右处理6 h,可获得活力较高的固定化酶.固定化酶的酶活力为1786.93 U/g,活力回收69.54%.

3 讨论

固定化方法大体可以概括为4种类型:吸附法、共价偶联法、交联法和包埋法.吸附法易脱落,不具备工业应用价值,仅限于实验室研究.包埋法大分子底物和产物不易进出.本研究联合采用共价偶联法和交联法即共价交联法,取得了比较满意的效果.该法结合牢固,不易脱落,可反复利用,适用于大分子底物,而且条件温和、操作简便.

质量分数为5%的戊二醛溶液与丝素交联时间以40 min为最佳.固定化酶的活力回收及酶活力随着戊二醛处理时间的延长而增大,当达到一定程度后,固定化酶的活力及活力回收反而下降.这是因为戊二醛是一种双功能试剂,它与载体结合,可破坏丝素分子间的氢键,使部分氨基得以自由,增加与酶分子的交联点.同时戊二醛的另一个羰基也可与酶结合.但是,交联时间过长,戊二醛自身缔合,加之导致酶与载体的多点结合,破坏酶的高级结构,影响酶活

力及活力回收^[13]。

酶与载体的交联时间以6 h作为最佳固定化时间。随着交联时间的延长,被交联的酶量增加,当交联时间为6 h时,固定化酶的活力及活力回收达最大,此时载体已被酶饱和。之后,随着交联时间的延长,固定化酶的活力及活力回收均降低。这可能是由于酶分子的失活和部分酶脱离载体,引起固定化酶活力和活力回收下降。

交联温度以4~8℃为最佳,此时固定化酶的活力较高。这可能是由于丝素与木瓜蛋白酶的交联是一种放热过程,低温利于交联反应;另外温度过高也易造成酶失活从而影响到固定化的效果。

随着给酶量增加,交联的酶量越多,固定化酶的活力越高,直至载体结合酶量达饱和;若继续增加给酶量,固定化酶的活力及活力回收均下降。这可能是由于交联的酶量过多,产生空间阻抑作用,造成酶活力降低^[14]。同时,随着给酶量的增加,未交联上载体的溶液酶浓度增加,酶损失增大,造成酶的活力回收下降。综合考虑两方面的因素以给酶量0.36 mg/g为宜。

溶液酶pH值为7.5时,固定化酶活力和酶的活力回收最大。小于或大于这个值,酶的活力和活力回收均降低。由于丝素蛋白的等电点为3.5~5.2,当pH为7.5时,丝素载体带负电;木瓜蛋白酶等电点为10.1,当pH为7.5时,木瓜蛋白酶带正电,此时,木瓜蛋白酶才能很好地交联到载体上。

参考文献:

- [1] 朱良均,姚菊明,李幼禄. 蚕丝蛋白——功能性生物材料[J]. 中国蚕业,1996, 68:26-28.
- [2] INOUE S, MATSUNAGA Y, IWANE H, et al. Entrapment of phenylalanine ammonia-lyase in silk fibroin for protection from proteolytic attack[J]. Biochem Bio-Phys Res Commun, 1986, 141(1): 165-170.
- [3] ASAKURA T, YOSHIMIZU H, KAZUHARA A, et al. Mechanism of glucose oxidase immobilization with silk fibroin[J]. Nippin Sanshigaku Zasshi, 1988, 57(3):203-209.
- [4] DEMURA M, ASAKURA T, NAKAMURA E, et al. Immobilization of peroxidase with a bombyx mori silk fibroin membrane and its application to biophotosensors[J]. Biotechnol, 1989, 10(2):113-119.
- [5] 曹国民,黄杰,高广达. 蚕丝固定化脂肪酶的研究[J]. 生物工程学报,1997,13(1):88-92.
- [6] 黄晨,徐新颜,徐静斐,等. 丝素膜固定化青霉素酰化酶[J]. 丝绸,1996,(8):13-15,19.
- [7] 相识孝亮. 酶应用手册[M]. 黄文涛,等译. 上海:上海科学技术出版社,1989.113-116.
- [8] 徐凤彩,张薇,罗刚耀. 甘蔗渣纤维素固定化木瓜蛋白酶及其应用研究[J]. 华南农业大学学报,1992, 13(1):53-59.
- [9] 徐凤彩,李明启. 尼龙固定化木瓜蛋白酶以及应用研究[J]. 生物化学杂志,1992,8(3):302-306.
- [10] 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):609-613.
- [11] 张明春,陈庆森,王肱,等. 壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 天津商学院学报,1998,(2):40-44.
- [12] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding [J]. Anal Biochem, 1976, (72): 248-254.
- [13] 曹国民,黄杰,高广达. 蚕丝固定化脂肪酶的研究[J]. 生物工程学报,1997,13(1):88-92.
- [14] 朱祥瑞,林蓉,王建瓯. 家蚕丝素固定化果胶酶的研究[J]. 浙江农业大学学报,1998,24(1):74-78.

【责任编辑 柴焰】