

木瓜蛋白酶的固定化及其性质研究

何平¹, 黄卓烈^{1*}, 黎春怡², 巫光宏¹, 初志战¹, 詹福建¹

(1. 华南农业大学生命科学院, 广州 510642; 2. 茂名职业技术学院, 广东 茂名 525000)

摘要: 在海藻酸钠-壳聚糖固定化木瓜蛋白酶(immobilized papain on sodium alginate-chitosan, IPSAC)的实验中, 当给酶量为 1 mg g⁻¹ 载体时, 酶活性为 39.2 U, 酶活力回收为 21.1%。在尼龙布固定化木瓜蛋白酶(immobilized papain on nylon, IPN)的实验中, 当每块尼龙布(3 cm × 3 cm)给酶量为 1 mg 时, 酶活性为 35.6 U, 酶活力回收为 19.2%。木瓜蛋白酶(papain, PA)、IPSAC、IPN 的最适 pH 分别为 7.2、7.2 和 6.8。PA 及 IPSAC 在 70℃ 以下活性稳定; IPN 在 50℃ 以下活性稳定。IPSAC 与 IPN 半衰期分别为 59 d 和 66 d。

关键词: 木瓜蛋白酶; 固定化酶; 海藻酸钠; 尼龙布

中图分类号: Q946.563

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)04-0334-05

Studies on Immobilization of Papain and the Properties of Immobilized Enzyme

HE Ping¹, HUANG Zhuo-lie^{1*}, LI Chun-yi², WU Guang-hong¹,
CHU Zhi-zhan¹, ZHAN Fu-jian¹

(1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Maoming Vocational and Technological College, Maoming 525000, China)

Abstract: Papain was immobilized on sodium alginate-chitosan and nylon, respectively. The immobilization conditions and characterization of the immobilized enzyme were studied. When 1 mg g⁻¹ carrier papain (PA) was loaded on sodium alginate-chitosan (IPSAC), the IPSAC activity was 39.2 U, and the recovery of activity was 21.1%. As PA was loaded 1 mg on one block nylon (3 cm × 3 cm), the IPN activity was 35.6 U, and the recovery of activity was 19.2%. The optimum pH of PA, IPSAC and IPN were 7.2, 7.2 and 6.8, respectively. PA and IPSAC were stable when the temperature was lower than 70℃, while IPN was stable below 50℃. The half-life of IPSAC and IPN were 59 d and 66 d, respectively.

Key words: Papain; Immobilized enzyme; Alginate; Nylon

木瓜蛋白酶(papain, PA)大量存在于番木瓜(*Carica papaya*)的未成熟果实的乳汁中, 是一种含巯基(-SH)的肽链内切酶。由于木瓜蛋白酶稳定性好, 对动植物蛋白、多肽、酯、酰胺等具有强的水解能力^[1-3], 因而被广泛应用于医药工业、食品、美容、制革等方面。

它还可以用于研究蛋白质结构^[4]。在 PA 的活性位点上, Cys(25)、His(159)和 Asp(158)参与了催

化反应, 其中 Cys(25)是不可缺少的。因此其活性易受氧化剂的氧化或重金属的抑制。PA 被氧化剂氧化后可由谷胱甘肽、半胱氨酸和 β-巯基乙醇解除; 重金属对 PA 的抑制可由 EDTA 解除。

Nelson 和 Griffin 最先发现了酶的固定化现象; 1971 年在美国召开的首届酶工程会议正式建议采用“固定化酶”的名称。我国固定化酶的研究始于 1970 年。固定化酶有其诸多优越性而被广泛

应用^[5-10]。

固定化酶的研究发展迅速,人们已经先后进行多种固定化方法研究。酶的固定化方法主要有:吸附法、包埋法、共价键结合法、交联法等。这些方法各有利弊。载体材料作为固定化酶的重要部分,其结构和性能对固定化酶的酶学性质产生很大的影响。因此很多学者一直致力于对载体的研究,以求获得适于某种酶的价格低廉的载体、操作简便和酶活力回收更高的固定化方法^[11-14]。前人利用海藻酸钠进行固定化酶,由于海藻酸钠钙化后小球硬度不够,装柱时易变形,较易溶解,本试验在海藻酸钠中加入壳聚糖粉末,小球硬度明显提高;此方法还未见报道。本文利用此改进的包埋法来制备固定化木瓜蛋白酶(immobilized papain, IPA),与尼龙布的共价键结合法固定化木瓜蛋白酶进行比较,并对其性质进行研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

木瓜蛋白酶由广西热带作物研究所提供;尼龙布(100目);壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$);酪蛋白(Sigma公司);其它试剂为国产分析纯。

1.2 PA 活性的测定

PA活性的测定参照罗远秀^[15]的方法。取0.2 ml(1 g L⁻¹)PA液,加入0.25 ml 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,内含36 mmol/L 半胱氨酸、0.6 mmol/L EDTA)和2.3 ml 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,于37°C下预热10 min,加入37°C预热的10 g L⁻¹酪蛋白溶液0.5 ml,37°C下恒温水浴振荡反应10 min(160 r min⁻¹),然后加入1.0 ml 200 g L⁻¹三氯乙酸溶液终止酶反应。对照管先加入200 g L⁻¹三氯乙酸溶液,后加酪蛋白溶液,其它与测定管相同。过滤,取其上清液于波长275 nm处测定消光值。

在37°C下,PA水解酪蛋白每分钟产生1 μg 酪氨酸的酶量定为一个活性单位(U),下文的酶活性就以活性单位数(U)表示。

1.3 IPSAC 的制备及其酶活测定方法

IPSAC制备参考郑婉玲等^[16]的方法进行。称取2 g 海藻酸钠溶于100 ml 0.1 mol/L pH 7.2 Tris-盐酸缓冲液中,再加入1 g 壳聚糖粉末,微波炉加热至80°C左右并搅拌均匀,冷却至40°C左右,加入PA粉末,搅拌均匀。将此混合液缓慢滴入0.5 mol/L

氯化钙溶液中形成小球,置于4°C冰箱下30 min。使用前用蒸馏水洗涤3次,用粗滤纸吸干。

取上述IPSAC 1g,加入0.25 ml 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 Tris-盐酸缓冲液,内含36 mmol/L 半胱氨酸、0.6 mmol/L EDTA)和2.5 ml 0.1 mol/L pH 7.2 Tris-盐酸缓冲液,于37°C下预热10 min,加入37°C预热的10 g L⁻¹酪蛋白溶液0.5 ml,37°C下恒温水浴振荡反应10 min(160 r min⁻¹),然后加入1.0 ml 200 g L⁻¹三氯乙酸溶液终止酶反应。对照管先加入200 g L⁻¹三氯乙酸溶液,后加酪蛋白溶液,其它与测定管相同。过滤,取其上清液于波长275 nm处测定消光值。

在37°C下,IPSAC水解酪蛋白每分钟产生1 μg 酪氨酸的酶量定为一个活性单位(U),下文的酶活性就以活性单位数(U)表示。

1.4 IPN 的制备及其酶活测定方法

IPN制备方法参考徐凤彩等^[17]方法进行。取尼龙布(3 cm × 3 cm)洗净,晾干。用含18.6% CaCl₂和18.6%水的甲醇溶液在50°C下保温10 s左右,并轻轻搅拌至尼龙布发粘,取出用水冲去污物,用吸水纸吸干。尼龙布用3.5 mol/L HCl在室温水解45 min,用蒸馏水洗至pH中性。尼龙布用5%戊二醛在室温下浸泡偶联20 min。取出尼龙布,用0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液反复洗去多余的戊二醛,吸干,立即用酶液在4°C下固定3.5 h(酶液用量是每块布1 ml)。从酶液中取出尼龙布,用0.5 mol/L NaCl(用0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液配制)洗去多余的酶蛋白,即得IPN。

取上述IPN一块,加入0.25 ml 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,内含36 mmol/L 半胱氨酸、0.6 mmol/L EDTA)和2.5 ml 0.1 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液,于37°C下预热10 min,加入37°C预热的10 g L⁻¹酪蛋白溶液0.5 ml,37°C下恒温水浴振荡反应10 min(160 r min⁻¹),然后加入1.0 ml 200 g L⁻¹三氯乙酸溶液终止酶反应。对照管先加入200 g L⁻¹三氯乙酸溶液,后加酪蛋白溶液,其它与测定管相同。过滤,取其上清液于波长275 nm处测定消光值。

在37°C下,IPN水解酪蛋白每分钟产生1 μg 酪氨酸的酶量定为一个活性单位(U),下文的酶活性就以活性单位数(U)表示。

2 结果和分析

2.1 IPSAC 制备结果

所制备得到的IPSAC为3~5 mm的球体(图

1)。由于加入壳聚糖粉末,壳聚糖上的正电荷(-NH₃⁺)与海藻酸的羧基相互作用,起到稳定凝胶的作用,并提高凝胶硬度,适用于装柱使用;加与不加壳聚糖粉末的固定化酶活性相同。

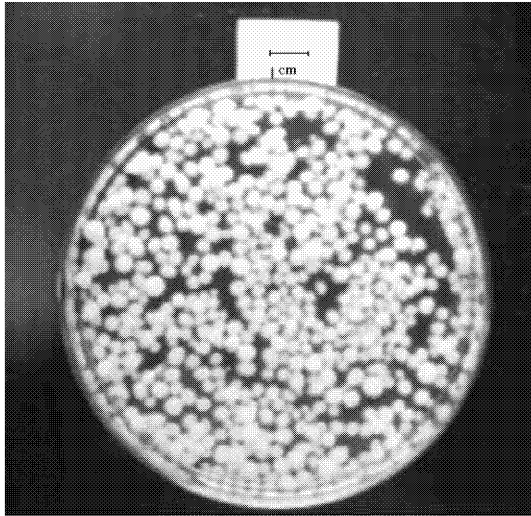


图 1 IPSAC 的照片
Fig. 1 Photograph of IPSAC

2.2 IPA 的给酶量、活性与活力回收

给酶量的计算方法为:IPSAC 的给酶量为每克凝胶球体中所含 PA 的毫克数;IPN 的给酶量为浸泡每块尼龙布所用 PA 的量。

从图 2、图 3 可以看出,随着给酶量的增加,IPSAC 与 IPN 活性逐渐增加,但达到一定给酶量时增幅逐渐放缓;IPA 活力回收逐渐降低。

在 IPSAC 实验中(图 2),当给酶量为 1 mg g⁻¹载体时,酶活性为 39.2 U,酶活力回收为 21.1%。从 IPSAC 活性与 IPSAC 活力回收两方面来综合考虑,确定其给酶量为 1 mg g⁻¹载体较适合。

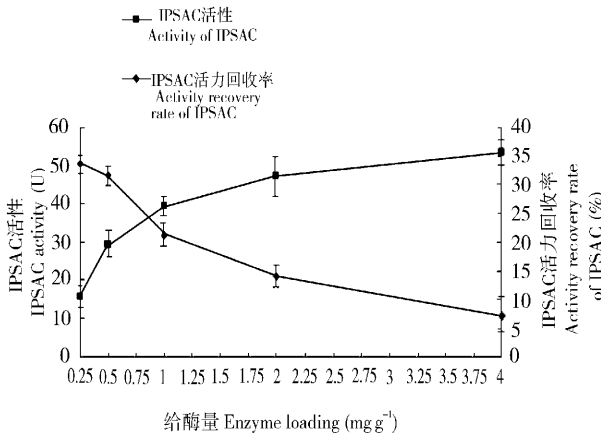


图 2 给酶量对 IPSAC 的固定化效果的影响
Fig. 2 Effect of enzyme loading on immobilization of IPSAC

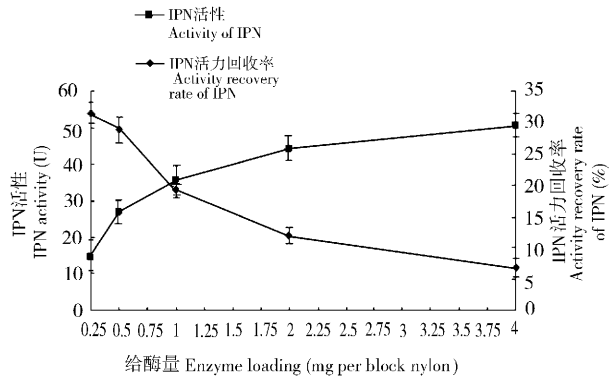


图 3 给酶量对 IPN 的固定化效果的影响
Fig. 3 Effect of enzyme loading on immobilization of IPN

在 IPN 实验中(图 3),当每块尼龙布的给酶量为 1 mg 时,酶活性为 35.6 U,酶活力回收为率 19.2%。从 IPN 活性与 IPN 活力回收两方面来综合考虑,确定每块尼龙布的给酶量为 1 mg 比较适合。

2.3 EDTA 对 PA 及其 IPA 活力的影响

用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液(IPSAC 则用 0.1 mol/L pH7.2 Tris-盐酸缓冲液)配制含 36 mmol/L 半胱氨酸和 EDTA 分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 的 7 种激活剂,分别测定含不同浓度 EDTA 的激活剂对 PA、IPSAC、IPN 的酶活性影响(图 4)。

EDTA 对该酶有激活作用。EDTA 可以络合水溶液中的重金属离子,消除重金属离子对酶蛋白的变性作用。当 EDTA 浓度在 0~1 mmol/L 时,PA 与 IPA 的酶活性随 EDTA 浓度的升高而提高,当 EDTA 浓度大于 0.6 mmol/L 时,PA 与 IPA 的酶活性基本保持稳定。因此确定 EDTA 的最佳激活浓度是 0.6 mmol/L。

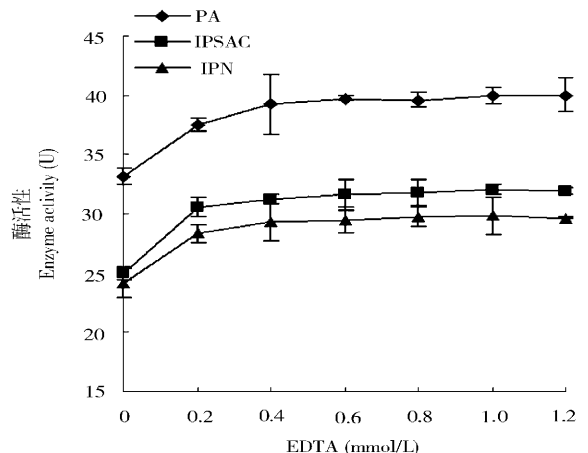


图 4 EDTA 浓度对 PA 与 IPA 的酶活性影响
Fig. 4 Effect of EDTA concentration on activities of PA and IPA

2.4 半胱氨酸对 PA 及其 IPA 活性的影响

用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液 (IPSAC 用 0.1 mol/L pH 7.2 Tris-盐酸缓冲液) 配制含 0.6 mmol/L EDTA 和半胱氨酸 (Cys) 分别为 0、12、24、36、48、60 mmol/L 的 6 种激活剂, 测定不同浓度 Cys 的激活剂对酶活性的影响 (图 5)。

Cys 对 PA 有激活作用, Cys 可防止 PA 活性中心的巯基被氧化。当 Cys 浓度在 0~36 mmol/L 时, 酶活力随 Cys 浓度的升高而提高。当 Cys 浓度大于 36 mmol/L 时, 酶活力基本保持稳定。因此确定 Cys 的最佳激活浓度是 36 mmol/L。在 Cys 对 IPSAC 与 IPN 激活中, Cys 浓度为 24 mmol/L 时, 它们酶活性与 Cys 浓度为 36 mmol/L 时的差别较 PA 的小, 说明 PA 比 IPA 需要 Cys 量要大一点。

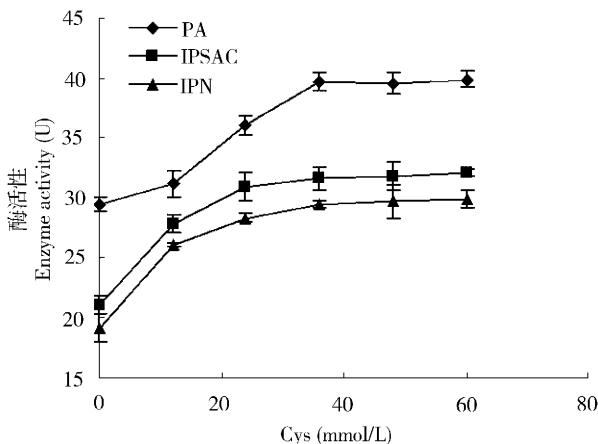


图 5 Cys 对 PA 与 IPA 活性的影响

Fig. 5 Effect of Cys concentration on activities of PA and IPA

2.5 pH 对 PA 及其 IPA 活力的影响

用 pH 为 5.0、6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、9.0 的缓冲液配制激活剂 (PA 与 IPN 用磷酸缓冲液, IPSAC 用 Tris-盐酸缓冲液), 测定不同 pH 下的酶活力, 结果见图 6。PA 与 IPSAC 的最适 pH 均为 7.2; IPN 的最适 pH 为 6.8。

2.6 PA 及 IPA 的热稳定性

将 PA 及 IPA 分别在 30、40、50、60、70、80、90℃ 下保温 30 min, 流水冷却后, 分别对酶活性进行测定 (图 7)。PA 及 IPSAC 在 70℃ 以下活性稳定; IPN 在 50℃ 以下活性稳定。

2.7 IPA 的操作稳定性测定

IPA 操作稳定性测定参考施巧琴^[8]的方法进

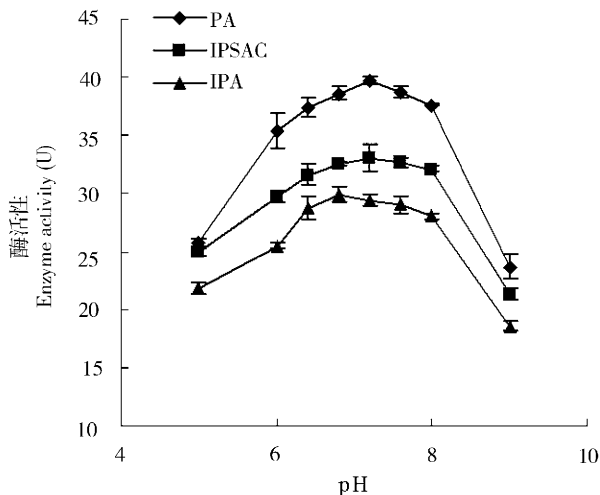


图 6 pH 对 PA 及其 IPA 活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on activities of PA and IPA

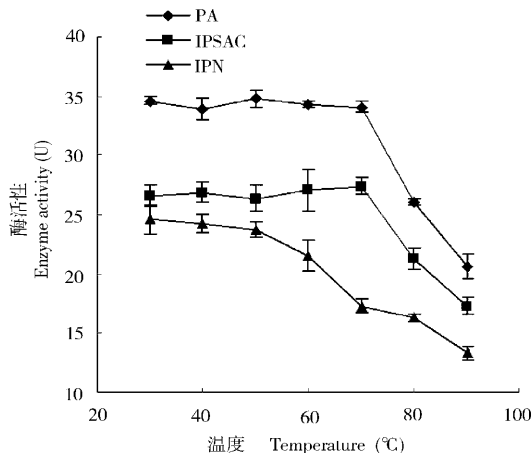


图 7 温度对 PA 及其 IPA 活力的影响

Fig. 7 Effect of temperature on activities of PA and IPA

行。将 IPA 激活后装柱 (2 cm × 10 cm), 10 g L⁻¹ 酪蛋白为底物, 37℃ 恒温, 恒流 (20 ml h⁻¹) 10 d, 上行。10 d 后 IPSAC 与 IPN 活性分别尚存 88.9% 和 90.1%。按 $t_{1/2} = -0.3 \times t \times (\log E/E_0)^{-1}$ 计算 (E/E_0 是时间 T 后酶活性残留的百分数), IPSAC 与 IPN 的半衰期分别为 59 d 和 66 d。

3 讨论

海藻酸是从褐藻提取的, 是甘露糖醛酸以 β-1,4 键相连接的多糖类物质。海藻酸钠盐是可溶的, 由钙、钡等多价金属离子可以交联成网状结构的凝胶, 它是包埋酶较为理想的载体, 其固定化方法较为简单, 条件温和, 操作可在室温下进行, 酶很少失活。但是, 海藻酸钙凝胶在含多价阴离子 (磷酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐等) 的溶液以及高浓度电解质 (K^+ ,

Na⁺)溶液中不稳定, Ca²⁺ 离子易脱落, 凝胶变软, 甚至溶解^[18]。本研究中一方面在制作凝胶时使用 Tris-盐酸缓冲液, 减少 Ca²⁺ 离子的脱落, 保持凝胶的稳定; 另一方面首次通过加入壳聚糖粉末来提高凝胶硬度, 壳聚糖上的正电荷(-NH₃⁺)与海藻酸的羧基相互作用, 起到稳定凝胶的作用, 适用于装柱使用; 加与不加壳聚糖粉末的固定化酶活性相同。

在本研究中, PA 与 IPSAC 的最适 pH 均为 7.2; IPN 的最适 pH 为 6.8, 可能因为戊二醛与 PA 的共价结合, 改变了 PA 的空间结构, 最适 pH 有所降低; 而 IPSAC 是包埋法, PA 的空间结构没有发生变化, 故最适 pH 与未固定化的 PA 一样为 7.2。徐凤彩等^[17]的研究表明 IPN 最适 pH 为 8.0。本研究与他的结果有差别, 但在本研究中, pH 6.8 与 pH 8.0 时的 IPN 活性差别并不大(图 6)。

PA 的热稳定性较好。PA 及 IPSAC 在 70℃ 以下活性稳定; IPN 在 50℃ 以下活性稳定。与 PA 的热稳定性进行比较, IPN 的降低可能是因为戊二醛与 PA 的共价结合, 改变了 PA 的空间结构, 热稳定性有所降低; 而 IPSAC 是包埋法, 其 PA 的空间结构没有发生变化, 故与原来的基本一样。

IPSAC 与 IPN 半衰期分别为 59 d 和 66 d。IPSAC 的半衰期比 IPN 的短, 这可能因为尼龙布通过戊二醛与 PA 进行共价结合, 改变 PA 的空间结构, 使其活性在 37℃ 下变得更稳定一些, 另外共价键结合 PA 的空间环境相对独立、稳定; 使 IPN 的半衰期比 IPSAC 的稍长。

海藻酸钠-壳聚糖固定化木瓜蛋白酶(IPSAC), 其热稳定性好, 半衰期长, 凝胶硬度较高, 可用于装柱使用, 便于工厂中自动化生产。

参考文献

[1] Deng J(邓静), Wu H C(吴华昌), Zhou J(周健). Progress studies of papain [J]. Guangxi Light Ind(广西轻工业), 2003 (3): 5-7. (in Chinese)

[2] Sangeetha K, Abraham T E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium [J]. J Mol Cataly B: Enzym, 2006, 38(3): 171-177.

[3] Lee W C, Chen T C. Functional characteristics of egg white solids obtained from papain treated albumen [J]. J Food Engin, 2002, 51 (4): 263-266.

[4] Jones J, Gand M. Refined papain [J]. Proc Biochem, 1974, 23: 21-24.

[5] Li F Y, Xing Y J, Ding X. Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method [J]. Enzym Microb Techn, 2007, 40: 1692-1697.

[6] Lin H, Wang H Y, Xue C H, et al. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain [J]. Enzym Microb Techn, 2002, 31(5): 588-592.

[7] Lei H, Wang W, Chen L L, et al. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magn-etic composite microspheres [J]. Enzym Microb Techn, , 2004, 35 (1): 15-21.

[8] Shi Q Q(施巧琴). Enzyme Engineering [M]. Beijing: Science Press, 2005: 220-343. (in Chinese)

[9] Buisson P, Pierre A C. Immobilization in quartz fiber felt reinforced silica aerogel improves the activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvents [J]. J Mol Cataly B: Enzym, 2006, 39(1): 77-82.

[10] Andrés S, Márta K, Ilona L L, et al. Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents [J]. J Mol Cataly B: Enzym, J Mol Cataly B: Enzym, 2006, 41: 43-48.

[11] Yao X L(姚晓玲), Ku H S(庠汉生), Song W J(宋卫江). Study on enzymatic characteristics of immobilizing trypsin with difference carrier [J]. Biotechnology (生物技术), 2007, 17(3): 71-73. (in Chinese)

[12] Zhou G(周桂), He Z P(何子平), Xuan J C(禰金彩). Chitosanase production by immobilized *Aspergillus niger* cells [J]. J SW Univ (Nat Sci) (西南大学学报: 自然科学版), 2007, 29(5): 104-107. (in Chinese)

[13] Li F Y, Xing Y J, Ding X. Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method [J]. Enzym Microb Techn, 2007, 40: 1692-1697.

[14] Rosales-Hernández M C, Mendieta-Wejbe J E, Correa-Basurto J, et al. Catalytic activity of acetylcholinesterase immobilized on mesoporous molecular sieves [J]. Inter J Biol Macromol, 2007, 40: 444-448.

[15] Luo Y X(罗远秀). Studies on the determination of enzymatic active for papain [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2000, 35(8): 556-558. (in Chinese)

[16] Zheng W L(郑婉玲), Zhou Y Z(邹云珍), Zang X Y(藏向莹). Preparation of immobilized enzyme by strengthened Na-alginate agglutination [J]. Ind Microb(工业微生物), 1998, 28(3): 15-18. (in Chinese)

[17] Xu F C(徐凤彩), Li M Q(李明启). Study on nylon immobilized papain and its application [J]. Chin Biochem J(生物化学杂志), 1992, 8(3): 302-305. (in Chinese)

[18] Li W(李伟), Sun J Z(孙建中), Zhou Q Y(周其云). Advance in studies on polymer carriers for enzyme entrapment [J]. J Funct Polymers(功能高分子学报), 2001, 14(3): 365-369. (in Chinese)