


褐藻酸钙凝胶固定化木瓜蛋白酶的研究

STUDIES ON IMMOBILIZATION OF PAPAIN BY CALCIUM ALGINATE GELS

高居易 李连煌

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

关键词 褐藻酸钙, 凝胶, 固定化, 木瓜蛋白酶

 褐藻酸盐凝胶是固定化酶和固定化细胞的理想载体, 已广泛地应用于纺织工业, 塑料工业, 食品和医药工业中^[1-3]。本实验以褐藻酸钙凝胶作为载体, 用包埋的方法来固定木瓜蛋白酶。通过正交设计试验法探讨了最佳固定化条件, 测定了固定化酶的催化特性和动力学性质: 固定化酶的最适 pH 值, 最适温度和表观米氏常数。并且还对固定化酶的热稳定性, 固定化酶的半衰期, 固定化酶和游离态酶的活性进行了比较; 初步探讨了固定化酶在工业生产上应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

木瓜蛋白酶 Merck 公司产品。

褐藻酸钠 (进口分装), 上海化学试剂站分装厂产品。酪蛋白为 Merck 公司产品。其余试剂均为分析纯和生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 木瓜蛋白酶固定化方法

木瓜蛋白酶固定化步骤 取一定量的木瓜蛋白酶溶于水溶液中, 加入适量的褐藻酸钠, 让其充分溶解。搅拌均匀后, 形成胶体状。待静置于胶体中气泡大部分排除后, 将此胶体用滴管在距液面约 20 cm 处匀速地滴入高浓度的 CaCl₂ 液中, 迅速地产生反应, 形成了颗粒状均匀, 直径为 3 mm 左右, 圆形的凝胶珠体。待反应停止后, 凝胶珠沉淀下来, 滤出珠体, 冲洗多次, 冷冻干燥, 冰箱冷藏。

固定化最佳条件的选择 固定化最佳条件的选择通过正交设计试验法来确定^[4]。选取 3 个因素: 即褐藻酸钠浓度、作用时间和木瓜蛋白酶浓度。每个因素选取 4 个水平, 详见表 1。用正交表 $L_4(3^3)$ 来安排实验方案。

1.2.2 游离态的木瓜蛋白酶活性测定

采用 Folin-酚法。即以 2% 酪蛋白为底物, 加入一

收稿日期: 1998-08-17; 修回日期: 1999-05-21



定量酶液, 40 °C 恒温振荡 10 min, 中止反应后, 取滤液用 Folin 试剂显色, 测定 650 nm 波长处的吸光度。

表 1 木瓜蛋白酶固定化最佳条件的选择(25 °C)

水平	褐藻酸钠浓度 (%)	反应时间 (min)	木瓜蛋白酶浓度 (mg/ml)
1	1.0	5	2.0
2	2.0	15	3.0
3	3.0	25	4.0
4	4.0	35	5.0

1.2.3 固定化木瓜蛋白酶活性的测定

采用上述测定蛋白酶活性的方法。

1.2.4 木瓜蛋白酶蛋白质含量的测定

采用微量 Kjeldahl 定氮法。

2 结果与分析

2.1 木瓜蛋白酶固定化最佳条件的选择

根据正交试验法结果, 运用方差分析确定固定化最佳条件是: 褐藻酸钠的浓度为 4.0 %, 作用时间为 15 min, 木瓜蛋白酶浓度为 3.0 mg/ml。这时, 在室温下形成的固定化酶凝珠呈半透明的圆球体, 边缘清晰, 颗粒均匀饱满, 机械强度高, 手感弹性强, 冰箱冷藏 30 d 不变形。

2.2 固定化木瓜蛋白酶催化特性的研究

2.2.1 最适 pH 值

取一定量固定化酶和游离态酶, 固定其他条件, 选择 pH 值在 4.0~8.0 变化范围内, 分别测其酶的相对活性, 结果如图 1 所示。

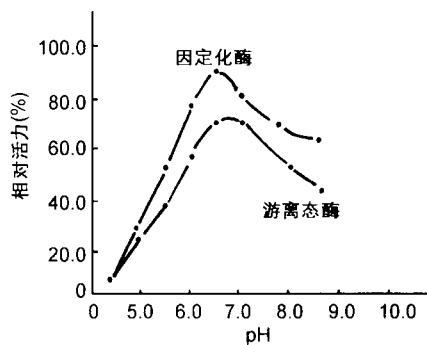


图 1 木瓜蛋白酶最适 pH 值比较

比较表明: 固定化酶最适 pH 值在 6.0~7.0 之间。固定化酶最适 pH 值上的相对活性要比游离态酶的最适 pH 值上的相对活性来的高。

2.2.2 最适反应温度

取一定量固定化酶, 固定其他条件, 选择温度在

30~100 °C 变化范围内, 测其酶的相对活性, 结果如图 2 所示。

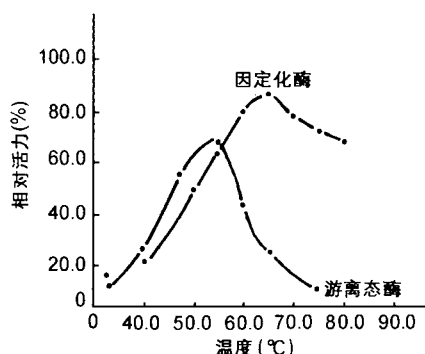


图 2 固定化木瓜蛋白酶最适反应温度

图 2 表明, 固定化酶的最适反应温度为 58~65 °C; 图还表明, 在 70~78 °C 较高温度时, 固定化酶仍有活性。由此可见, 木瓜蛋白酶经凝胶固定化之后, 提高了最适反应的温度, 这样也就提高了木瓜蛋白酶应用的范围。

2.3 表观米氏常数的研究

取一定量固定化酶和游离态酶, 在最适反应条件下, 选用不同的底物浓度, 求其相应酶促反应的初速度。用双倒数作图法, 分别求其表观米氏常数^[5], 计算得游离态酶的米氏常数为 25.38 mg/ml, 固定化酶的表观米氏常数为 31.25 mg/ml, 固定化酶的米氏常数值有所提高。

2.4 固定化酶热稳定性的研究

取一定量的游离态酶和固定化酶, 分别在 30~75 °C 下保温 30 min, 冷却后在最适反应条件下, 测其酶的相对活性, 结果如图 3 所示。

图 3 表明, 游离态酶在 55 °C 以上温度处理后, 酶活性有显著下降。而固定化酶在 65 °C 以上温度处理后, 仍保持有一定的活性, 这说明木瓜蛋白酶固定化之后对热的稳定性有明显升高。

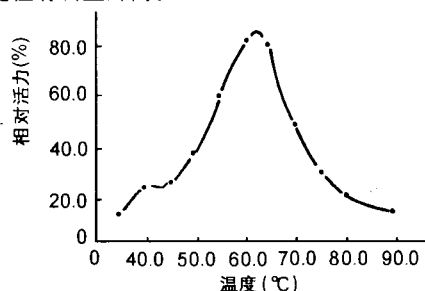


图 3 木瓜蛋白酶的热稳定性

2.5 固定化木瓜蛋白酶半衰期的研究

取一定量的固定化酶, 加入经过灭菌处理后久置浑



浊的啤酒,在室温下浸泡处理 3~5 d 后,观察啤酒完全澄清。

另将固定化酶凝胶珠,装填于带夹套的玻璃柱($\phi 10\text{ mm} \times 200\text{ mm}$)上,用 2% 酪蛋白灌流,流速为 70 ml/h,恒温为 25 °C,每天取样测定,按 $t_{1/2} = 0.693 t (2.303 \text{ Log } E_0/E)^{-1}$ 公式计算,固定化酶的半衰期为 42 d。

2.6 游离态酶和固定化酶活性的比较

取一定量的游离态酶和固定化酶,在最适反应条件下,反应时间为 60 min,测其酶活性。结果表明,固定化酶平均比活力为 5 810 U/mg,而游离态酶平均比活力为 1 277 U/mg。固定化酶和游离态酶的活力比为 45.48%。固定化酶活性提高的原因很多。其中一个主要原因是木瓜蛋白酶被凝胶固定化之后,能够均匀地分散在底物的介质之中,这样提高了酶与底物接触的有效面积,加快了酶促反应速度。

3 讨论

3.1 本实验采用褐藻酸钙凝胶包埋木瓜蛋白酶的固定化技术,具有许多优点:首先,避免使用交联剂,减少一些副反应;其次用包埋法形成凝胶珠,具有颗粒

均匀,机械性能好,弹性强,对温度,pH 和其他微环境的变化相对稳定,半衰期长,易于保藏并能成批生产的特点。

3.2 从理论上讲,整个包埋酶固定化过程中,酶的活性没有受到破坏。从固定化酶和游离态酶活性的比较中可以看到,固定化酶的活性近似地提高了 50%,提高的幅度还是较大的。

3.3 本实验过程中,酶与载体的相互作用,无机离子对酶的修饰作用,以及凝胶颗粒大小对酶促反应的影响等,均有待于进一步研究。🌞

参考文献

- 1 北京大学数学力学系概率统计组编.正交设计法.北京:石油化学出版社,1976. 1~35
- 2 Bodalo, A., Bastida, J., Gomey, J. L. et al. . *Engyme Microb Technol*, 1997, 21(1) 64~69
- 3 Lim, L. Y. and Wan Lucy S. C. . *Drug Dev Ind Pham*, 1997, 23(10):973~987
- 4 Seifert Douglas B. and Phillips Janice A. . *Biotechnol Prog*, 1997, 13(5):562~568
- 5 Dixon, M. and Webb, E. C. . *Engymes* 3 rd ed. London: Longman Group Ltd., 1979. 61~63