

超声对包埋-交联法固定化木瓜蛋白酶催化活性的影响

王超¹, 曹雁平^{1,2,*}, 王蓓^{1,2}, 黄正华¹, 孙佳¹, 陈海清¹

(1.北京工商大学食品学院, 北京 100048; 2.食品添加剂与配料北京市高校工程研究中心, 北京 100048)

摘要: 研究超声对包埋-交联法固定化木瓜蛋白酶催化活性的影响。将醋酸纤维素铺制成膜, 包埋木瓜蛋白酶; 以戊二醛为交联剂, 进行交联反应, 制得固定化木瓜蛋白酶。分别研究超声频率、超声功率和超声时间对固定化酶活性的影响, 再由均匀试验得到超声强化固定化木瓜蛋白酶催化活性的最优条件。经均匀试验确定最优超声条件为 135kHz、0.05W/cm²、25min, 相对酶活力为 197.22%。验证实验证明最优的超声条件下测得固定化木瓜蛋白酶的相对酶活力为 182.68%, 相对标准偏差为 7.37%, 没有显著差异。

关键词: 超声; 固定化木瓜蛋白酶; 酶活力; 均匀试验

Effect of Ultrasound Treatment on the Activity of Immobilized Papain Prepared by Embedding-Crosslinking Method

WANG Chao¹, CAO Yan-ping^{1,2,*}, WANG Bei^{1,2}, HUANG Zheng-hua¹, SUN Jia¹, CHEN Hai-qing¹

(1. College of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing 100048, China)

Abstract: Immobilized papain was prepared through cellulose acetate membrane entrapment and glutaraldehyde crosslinking. The effects of power, frequency and time on the efficacy of ultrasound treatment to stimulate the activity of immobilized papain were investigated in this study. The optimal ultrasound treatment conditions were determined by uniform design and least square regression analysis to be 135 kHz, 0.05 W/cm² and 25 min. Under these conditions, the relative enzyme activity of immobilized papain was 197.22%. The results of validation experiments showed an actual value of 182.68% with a relative error of 7.37% and no significant difference.

Key words: ultrasound; immobilized papain; enzyme activity; uniform design

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0264-03

自1910年开始, 固定化酶因其稳定性高、可重复利用、易与产物分离、可实现自动化生产而逐渐成为酶工程领域中最为活跃的研究方向之一^[1-2]。但由于酶固定化过程中载体与酶之间的相互作用, 酶活力往往会有不同程度的损失^[3]。为提高固定化酶活力, 使固定化酶更符合工业化生产, 国内外学者进行了大量研究。有研究表明, 适当的超声处理可以促进固定化酶的催化活性, 从而为提高固定化酶活力提供了新的思路^[4]。Ishimori等^[5]发现超声可以激活固定化葡萄糖氧化酶活力。邱树毅等^[6]发现超声对固定化脂肪酶催化酯化反应的促进作用是十分明显的。Schmidt等^[7]发现固定化酶催化效率的增加是与超声强度成比例的。

本实验主要研究超声对包埋-交联法固定化木瓜蛋白酶催化活性的影响。采用醋酸纤维素膜为固定化载体, 包埋-交联组合固定法固定化木瓜蛋白酶。应用包埋法得到的固定化酶稳定, 酶活回收率高, 再由交联法对包埋后的

固定化酶进行加固, 固定化方法稳定高效, 得到的固定化酶膜集酶的催化特性及膜的优良分离特性为一身^[8], 具有一定的应用优势。在此基础上, 利用超声强化固定化木瓜蛋白酶的催化活性, 研究不同超声条件对固定化木瓜蛋白酶催化活性的影响, 为提高固定化酶的工业化利用程度提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

丙酮 北京化工厂; 丙三醇 西陇化工股份有限公司; 无水碳酸钠、醋酸纤维素、磷酸二氢钠、三氯乙酸、25%戊二醛溶液 国药集团化学试剂有限公司; 干酪素 北京奥博星生物技术有限公司; 磷酸氢二钠(分析纯) 天津市光复科技发展有限公司; 木瓜蛋白

收稿日期: 2012-06-25

作者简介: 王超(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: iamllacc1999@yahoo.cn

*通信作者: 曹雁平(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与安全。E-mail: caoyyp@th.btbu.edu.cn

酶、福林酚试剂 美国Sigma公司; L-谷胱甘肽 拜尔迪生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

JXD-02型多频槽式处理系统 北京金星超声波技术设备有限公司; DC-2006型低温恒温水浴 宁波新芝生物科技股份有限公司; UVmini-1240型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 固定化木瓜蛋白酶的制备

称取丙三醇25.2g、醋酸纤维素8.3g、丙酮80.5g, 加入磨口锥形瓶中。磁力搅拌加热至溶解并搅拌均匀, 在磨口锥形瓶上方接冷凝管, 进行回流冷凝。冷却至室温, 加入木瓜蛋白酶溶液1mL, 质量浓度为1mg/mL, 搅拌5min, 制成铸膜液。脱泡后, 用玻璃棒在10cm×20cm的平板玻璃上刮涂形成厚度约为0.15mm的薄膜, 置于50℃水浴锅中, 吸收水蒸气、挥发丙酮20min, 使其分相凝胶, 再浸入水中使膜固化。此时游离的木瓜蛋白酶被包埋在醋酸纤维素中。将制好的膜在去离子水中浸泡12h, 以便彻底交换出溶剂。最后每5张膜用200mL的体积分数5%戊二醛浸泡2h, 使固定化酶交联2h, 取出后在去离子水中冲洗, 去除多余的戊二醛, 即可使用^[9]。放置冰箱中4℃保存^[10]。

1.3.2 酶活力测定方法

参照福林-酚法^[11]测定固定化酶活力。

酶活力单位定义为在1min内催化酪蛋白水解生成1μg酪氨酸的酶量为一个活力单位(U)。固定化酶活力单位根据载体质量以U/g表示。

$$\text{相对酶活力}/\% = \frac{E_1}{E_0} \times 100$$

式中: E_1 为超声后固定化木瓜蛋白酶的活力; E_0 为超声前固定化木瓜蛋白酶的活力。

1.3.3 超声频率对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

在40℃、pH6.5、超声功率0.15W/cm², 超声频率28、40、50、135kHz的条件下分别进行酶促反应10min, 测定酶活力, 考察超声频率对固定化木瓜蛋白酶活力的影响。

1.3.4 超声功率对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

在40℃、pH6.5、超声频率135kHz, 超声功率0.05、0.15、0.25、0.35、0.45W/cm²的条件下分别进行酶促反应10min, 测定酶活力, 考察超声功率对固定化木瓜蛋白酶活力的影响。

1.3.5 超声时间对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

在40℃、pH6.5、超声频率135kHz、超声功率0.35W/cm², 时间为5、10、15、20、25min的条件下分别进行酶促反应, 测定酶活力, 考察超声时间对固定化木瓜蛋白酶活力的影响。

1.3.6 超声强化固定化木瓜蛋白酶催化活性的条件优化

选取超声频率、超声功率、超声时间3个因素, 利用DPS软件设计混合水平均匀试验优化超声强化固定化木瓜蛋白酶催化活性的条件。

2 结果与分析

2.1 超声频率对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

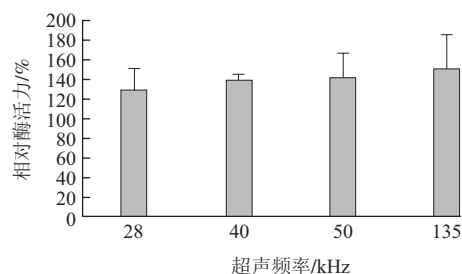


图1 超声频率对固定化木瓜蛋白酶相对酶活力的影响

Fig.1 Effect of ultrasound frequency on the relative enzyme activity of immobilized papain

由图1可知, 随着超声频率的增大, 超声对固定化木瓜蛋白酶活力的强化效果越明显。经过28、40、50、135kHz超声处理, 固定化木瓜蛋白酶的相对酶活力分别为128.4%、139.25%、142.49%、150.66%, 较非超声处理时的酶活力都有所提高, 并以135kHz超声处理条件下提高最为显著。吴葛洋等^[12]分别用28、40、50、135kHz超声处理包埋法固定化木瓜蛋白酶, 固定化木瓜蛋白酶的相对酶活力随超声频率的增大而增加。135kHz超声处理固定化木瓜蛋白酶的酶活力较非超声处理时增加了22.69%, 与实验结果有一定一致性。

2.2 超声功率对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

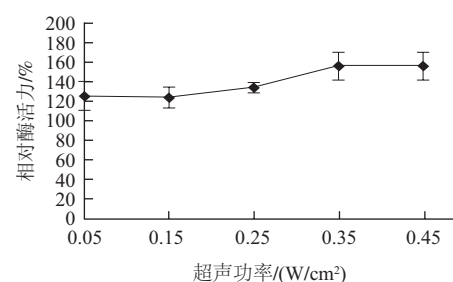


图2 超声功率对固定化木瓜蛋白酶相对酶活力的影响

Fig.2 Effect of ultrasound power on the relative enzyme activity of immobilized papain

由图2可知, 在低强度超声作用下, 相对酶活力随着功率增大呈上升趋势, 并在超声功率达到0.35W/cm²时, 相对酶活力最大, 达到155.44%。而进一步增大超声功率, 相对酶活力略有下降, 到0.45W/cm²时, 固定化酶活力为40.9U/g, 与未经超声处理时相比提高了55.41%。刘耘等^[13]研究表明, 脂肪酶的相对酶活力随超声功率的增大而先增加后减小, 激活脂肪酶的最适功率为96W。林影等^[14]发现, 超声可以促进酶催化反应, 用不同功率的超声作用, 其中20W的超声作用最明显。

2.3 超声时间对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

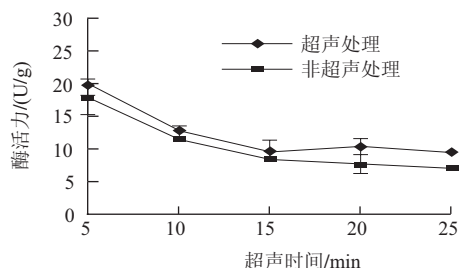


图3 超声时间对固定化木瓜蛋白酶活力的影响

Fig.3 Effect of ultrasound treatment time on the relative enzyme activity of immobilized papain

由图3可知, 超声处理5~25min内, 随着超声时间的延长, 固定化木瓜蛋白酶的酶活力有所变化, 得到超声条件下及非超声条件下酶促反应进程曲线。超声条件下固定化酶酶促反应进程曲线高于非超声条件下的反应进程曲线, 即超声条件下固定化酶的活力较非超声条件下有所提高。20min时, 超声条件下的酶活力相对于非超声条件下的固定化酶活力提高最显著, 提高了35.92%, 如果继续延长超声时间, 超声条件下的固定化酶活力仍高于非超声条件下的酶活力, 但是提高的程度有所下降, 即相对酶活力开始下降。故而最佳的超声时间应为20min。大多数关于超声时间对酶活性影响的研究中, 超声处理时间为5~20min, 开始时超声对酶活力的强化作用随着时间的延长而增大, 当达到一定的处理时间时, 酶活力迅速下降^[15-19]。

2.4 超声强化固定化木瓜蛋白酶催化活性的条件优化

表1 强化固定化木瓜蛋白酶活力的超声条件优化的均匀试验结果
Table 1 Uniform design matrix and corresponding results

因子	超声频率/kHz	超声功率/(W/cm ²)	超声时间/min	相对酶活力/%
N1	3(50)	3(0.25)	2(10)	121.67
N2	4(135)	4(0.35)	5(25)	171.11
N3	2(40)	1(0.05)	2	218.26
N4	1(28)	3	2	151.22
N5	1	2(0.15)	1(5)	101.04
N6	4	3	4(20)	154.99
N7	2	3	4	121.95
N8	3	2	3(15)	166.46
N9	3	1	5	178.27
N10	4	2	3	111.49
N11	1	4	3	152.66
N12	3	4	1	90.29
N13	2	2	5	112.59
N14	4	5(0.45)	2	93.78
N15	3	5	4	134.23
N16	2	5	1	176.52
N17	4	1	1	103.01
N18	1	1	4	153.75
N19	2	4	3	101.85
N20	1	5	5	148.14

使用DPS软件进行混合水平均匀试验设计, 目标函数为超声处理后的相对酶活力。均匀试验结果如表1所示。经最小偏二乘回归分析后, 得到最佳超声条件为135kHz、0.05W/cm²、25min, 相对酶活力为197.22%。验证实验证明在最优超声条件下, 相对酶活力为182.68%, 相对标准偏差为7.37%, 没有显著差异。

3 结论

通过单因素试验, 研究超声频率、超声功率和超声时间对固定化酶活性的影响。结果表明, 随着超声频率的增大, 超声对固定化木瓜蛋白酶活力的强化效果越明显; 在低强度超声作用下, 相对酶活力随着功率增大呈上升趋势, 当超声功率继续增大时, 相对酶活力略有下降; 超声处理时间为5~25min, 开始时超声对酶活力的强化作用随着时间的延长而增大, 当达到一定的处理时间时, 酶活力开始下降。通过均匀试验, 确定最优超声条件为135kHz、0.05W/cm²、25min, 相对酶活力为197.22%。验证实验证明最优的超声条件下测得固定化木瓜蛋白酶的相对酶活力为182.68%, 相对标准偏差为7.37%, 没有显著差异。

超声作用于固定化酶的效果受超声频率、超声时间、超声功率、载体颗粒、反应体系等多种因素影响, 不同的超声处理条件对于固定化酶活力的影响不同。将超声用于改善固定化酶催化活性的研究是一个新的领域, 在最佳超声条件、超声作用于酶的机理、超声对酶催化选择性的影响以及产物结构等方面都存在很大的研究空间, 有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 陈建龙, 祁建城, 曹仪植. 固定化酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2006(2): 7-9.
- [2] LIN Hong, WANG Haiying, XUE Changhu, et al. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(5): 588-592.
- [3] 张茜, 刘涛, 侯红萍. 提高固定化酶活力方法的研究进展[J]. 酿酒, 2008, 35(2): 15-17.
- [4] HA S H, HIEP N M, KOO Y M. Enhanced production of fructose palmitate by lipase-catalyzed esterification in ionic liquids[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010, 15: 126-130.
- [5] ISHIMORI Y, KARUBE I, SUZUKI S. Ultrasound sensitive enzyme-membrane[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1981, 13(4): 197-201.
- [6] 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华. 超声波在生物工程中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 1999, 19(3): 45-48.
- [7] SCHMIDT P, ROSCENFELD E, MILLUER R, et al. Effects of ultrasound on the catalytic activity of matrix-bound glucoamylase[J]. Ultrasonics, 1987, 25(5): 295-299.
- [8] 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.
- [9] 陈兆安, 叶震, 陈勇, 等. 两步法制备醋酸纤维素微滤膜的研究[J]. 膜科学与技术, 2003, 23(3): 11-15.
- [10] 郭永胜, 王杰, 董军, 等. 醋酸纤维素固定化酯酶膜的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(5): 748-751.
- [11] KEAY L, WILDI B S. Proteases of the genus *Bacillus* I. neutral proteases[J]. Biotechnology and Bioengineer, 1970, 12(2): 179-212.
- [12] 吴葛洋, 曹雁平, 王蓓, 等. 超声场对固定化木瓜蛋白酶的影响研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 142-145.
- [13] 刘耘, 宗敏华, 黄秋月, 等. 有机相中超声辐照对脂肪酶活性的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(1): 151-153.
- [14] 林影, 高大维, 李国基. 超声波对菊糖酶催化作用的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 1997, 25(9): 142-144.
- [15] 肖咏梅, 赵贞, 毛璞, 等. 超声辐照对酶促反应影响的研究进展[J]. 应用声学, 2009, 28(2): 156-160.
- [16] 黄卓烈, 林茹, 何平, 等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 89-93.
- [17] 钱春梅, 谭兆赞, 李云, 等. 超声波对菜豆种子超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(3): 73-77.
- [18] 朱国辉, 黄卓烈, 徐凤彩, 等. 超声波对菠萝蛋白酶活性和光谱的影响[J]. 应用声学, 2003, 22(6): 10-14.
- [19] 梁春红, 黄惠华. 超声波场致效应对酶的影响[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 133-136.