

# 羧甲基纤维素固定化胰凝乳蛋白酶的 稳定性研究

左秀凤, 杨 莉

(河南职工医学院医学技术系, 河南郑州 450003)

**摘要:** 研究以羧甲基纤维素作为载体, 通过接枝后与胰凝乳蛋白酶进行偶联, 通过正交实验测得酶固定化特性的最佳方案为: 接枝温度 50℃, 接枝时间 10min 酶偶联温度 20℃, 酶偶联时间 4h, 所得固定化酶的热稳定性提高 5℃, 最适 pH 提高到 8~9, 具有连续操作性, 在 2℃ 贮存放置 20d 后酶活仍在 75% 以上。

**关键词:** 胰凝乳蛋白酶, 固定化, 羧甲基纤维素, 稳定性

## Study on the stability of chymotrypsin immobilized by carboxymethyl cellulose

ZUO Xiu-feng YANG Li

(Department of Medical Technology, Henan Medical College for Staff and Workers, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract** A method was proposed to immobilize chymotrypsin on carboxymethyl cellulose. The characteristics of the immobilized enzyme was discussed and assured the best condition of immobilized enzyme by orthogonal experiment. The results showed that the best condition was 50℃ and 10min of a former-carboxymethyl cellulose, 20℃ and 4h of immobilized enzyme. Its heat stability was higher 5℃ than the native, and the optimum pH reached to pH8~9. Also its operational stability and storage stability were better. Its activity had over 75% staying for 20d at 2℃.

**Key words** chymotrypsin immobilization; carboxymethyl cellulose; stability

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup> 5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)010-0125-03

胰凝乳蛋白酶水解蛋白质、多肽、氨基酸的酯和酰胺, 特别是芳香族 L-氨基酸的羧基, 包括酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的多肽键的水解。此酶在医学上可以制成辅料贴于伤口, 用于止血、抗炎、促进伤口愈合等。但它容易发生降解, 因而催化效率下降, 致使药效不能很好的发挥。近几年来酶的固定化技术的研究不断深入和发展, 酶的固定化是用物理或化学的方法, 使游离酶转变为在一定空间内其运动受到完全约束或受到部分约束的一种不溶于水, 但仍具有活性的酶。固定化的酶以固相状态作用于底物, 进行催化反应。固定化酶与游离酶相比具有许多优点, 如在催化反应后, 易于和底物、产物分离, 而且产物不受污染, 容易精制; 酶可以反复使用, 使用效率提高, 成本显著降低等<sup>[3]</sup>。固定化后的酶大多数情况下的稳定性有所增加, 而且固定化酶有一定的形状和一定的机械强度, 可以装填在反应器中长期反复使用, 便于实现生产连续化和自动化。固定化方法很多, 主要有: 吸附法、共价结合法、包埋法和选择性

变性等<sup>[2,4]</sup>。羧甲基纤维素作为天然高分子材料, 因其安全、环保等已广泛应用于酶的固定化。本文就是以羧甲基纤维素为载体, 对胰凝乳蛋白酶进行固定化, 研究固定化条件对酶活的影响, 以及固定化后酶的操作温度、操作 pH 稳定性, 操作次数、贮藏的稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

羧甲基纤维素 购自二七有色仪器有限公司; 胰凝乳蛋白酶 购自美国 sigma 公司; 二氧六环、甲苯、丙酮、磷酸钠、碳酸钠等 均为分析纯。

DZKW-C 恒温水浴锅 北京光明医疗仪器厂; pH-S-3C 型酸度计 上海第二分析仪器厂; HJ-6 六联体磁力加热搅拌器 江苏省金坛金城教学仪器厂。

### 1.2 实验方法<sup>[1]</sup>

1.2.1 2-氨基-4,6-二氯-S-三嗪的制备 在溶剂为 1L 的二氧六环和 200mL 甲苯中溶有 184g 氯化氰, 向其中通入干燥的氨气 0.88g 反应在 5~8℃ 进行, 逐渐有固体析出, 形成浓的悬浮液, 抽滤, 再用二氧六环 500mL 洗涤, 而后经蒸发除去二氧六环, 得粗产品。再用丙酮:水(1:1)溶解粗产品, 减压抽滤得沉淀, 沸水溶解, 冷却至室温后待结晶得精品, 备用。

1.2.2 羧甲基纤维素氯氨-S-三嗪衍生物的制备

收稿日期: 2007-12-06

作者简介: 左秀凤(1971-), 女, 硕士, 讲师, 从事生物化学与临床生化检验的研究。

10g羧甲基纤维素(干重)加入到含有 1g 2-氨基-4,6-二氯-S-三嗪的 50mL丙酮水(1:1)混合液中,在一定的温度下搅拌一定时间,再加入 pH8的碳酸钠-盐酸缓冲液,继续搅拌一定时间,迅速用盐酸调节 pH到 7.0而后抽滤,沉淀分别用丙酮水、蒸馏水、磷酸钠洗涤至 pH7.0 储存于 2℃备用。

1.2.3 酶偶联反应 将胰凝乳蛋白酶溶于水,使浓度为 20mg/mL,而后加入 0.5mol/L的 pH7.5~8的硼酸钠缓冲液,使反应的盐浓度在 0.07~0.2mol之间,加入用碱调 pH至 8.0的上述纤维素衍生物的悬浮液,使反应的酶浓度在 7~15mg/mL。反应在一定的温度和时间下搅拌进行,抽滤,沉淀经洗涤除去未反应的酶以及无氯离子,作为固定化胰凝乳蛋白酶。

1.2.4 固定化酶活的测定

1.2.4.1 相对酶活的测定 采用 RVA-3D型快速黏度分析仪测定经固定化酶作用后大豆分离蛋白的凝胶性,间接计算胰凝乳蛋白酶的相对酶活。

1.2.4.2 固定化酶酶活的测定<sup>[1]</sup> 在 25℃, pH8 1min水解 1.0μmol的苯甲酰-L-酪氨酸乙酯的酶量为 1单位,称为一个活性单位。

2 结果与讨论

2.1 酶的固定化条件的选择

经单因素实验,选择影响酶固定化作用的主要因素:接枝温度、接枝时间,酶偶联的温度、酶偶联的时间,选择合适的水平。采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表,安排 9个实验,每个实验重复 3次,取平均值,考察指标为胰凝乳蛋白酶的相对酶活,见表 1,表 2。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A接枝温度(℃)	B接枝时间(m in)	C酶偶联温度(℃)	D酶偶联时间(m in)
1	30	5	15	4
2	40	10	20	4.5
3	50	15	25	5

表 2 正交实验结果与分析

实验号	因素				相对酶活(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	56.2
2	1	2	2	2	89.6
3	1	3	3	3	79.1
4	2	1	3	3	81.8
5	2	2	1	1	96.8
6	2	3	2	2	68.5
7	3	1	2	2	86.5
8	3	2	3	3	73.9
9	3	3	1	1	99.0
K <sub>1</sub>	224.9	224.5	198.6	252.0	
K <sub>2</sub>	247.1	260.3	270.4	244.6	
K <sub>3</sub>	259.4	246.6	262.4	234.8	
k <sub>1</sub>	75.0	74.8	66.2	84.0	
k <sub>2</sub>	82.4	86.7	90.1	81.5	
k <sub>3</sub>	86.5	82.2	87.5	78.3	
R	11.5	11.9	23.9	5.7	
优方案	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	

由表 2可以看出,不同的固定化条件下,所制得的固定化胰凝乳蛋白酶的相对酶活有一定的差别,

其中 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>实验的固定化酶的相对酶活最大,为 99.0%; A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>实验的酶活最小,为 56.1%。进行极差分析的实验结果表明,对固定化胰凝乳蛋白酶的相对酶活影响最大的是酶偶联温度,其次是接枝温度和接枝时间,酶偶联时间影响最小。固定化酶的最佳偶联方案为: A<sub>3</sub> B<sub>2</sub> C<sub>2</sub> D<sub>1</sub>,即接枝温度 50℃,接枝时间 10m in,酶偶联温度 20℃,酶偶联时间 4m in,在最佳偶联方案下制备固定化胰凝乳蛋白酶,得相对酶活是 99.5%。

2.2 固定化胰凝乳蛋白酶的稳定性

2.2.1 固定化胰凝乳蛋白酶的最适反应温度和耐热稳定性 取一定量的固定化酶和游离酶,分别加入 pH8.0的 0.05mol/L的磷酸钠缓冲液,在不同的温度下分别处理 30m in,测定其酶活。

从图 1可以看出,在实验条件下游离酶的最适反应温度为 30℃,固定化后酶的最适作用温度提高到 35℃,并且固定化酶的酶活作用温度范围扩宽。而游离酶在高于最适温度后,随着温度增加,酶活降低得较快,即对温度较为敏感。这可能是羧甲基纤维素氯氨-S-三嗪衍生物与胰凝乳蛋白酶结合经固定化后,增加了酶分子的空间构象的牢固程度,使反应最适温度提高了 5℃,即固定化酶比游离酶的抗热稳定性有所提高<sup>[6]</sup>。

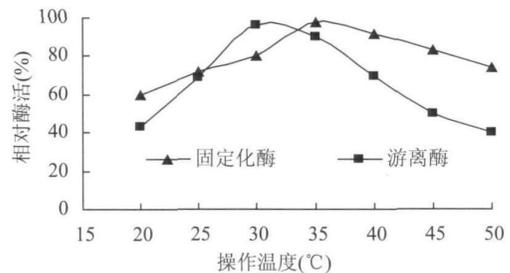


图 1 固定化酶和游离酶的最适反应温度和耐热稳定性

2.2.2 固定化胰凝乳蛋白酶的 pH 稳定性 称取一定量的固定化酶和游离酶,分别加入不同 pH的磷酸钠-盐酸缓冲液,处理 30m in,测定其相对酶活。

从图 2可以看到,在实验条件下游离酶的 pH 相对稳定范围是 7~8 固定化后酶的相对酶活最适 pH 提高到 8~9 并且,固定化酶的 pH 操作范围扩宽。这可能是固定化后酶分子所处的微环境得以改善,使酶的活性中心受到羧甲基纤维素氯氨-S-三嗪衍生物的影响,活性中心的必需基团解离状态发生了变化,适合于偏碱性范围的催化作用<sup>[5,6]</sup>。

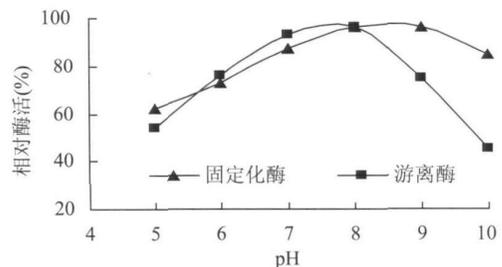


图 2 固定化酶和游离酶的 pH 稳定性

2.2.3 固定化酶的操作稳定性 游离酶一次性使用,反应后无法从反应体系中分离出来,又因酶的价

格较高,所以显得浪费。固定化的酶可以从反应体系中分离出来,进行重复使用。用 pH 8.0 的 0.05mol/L 的磷酸钠缓冲液浸泡固定化酶,在 35℃ 放置 30min (模拟底物反应),重复测定固定化酶的酶活。

从图 3 可以看出,连续操作 6 次后的相对酶活还保持在 70% 以上,说明固定化酶可以连续使用,减少酶的使用成本。

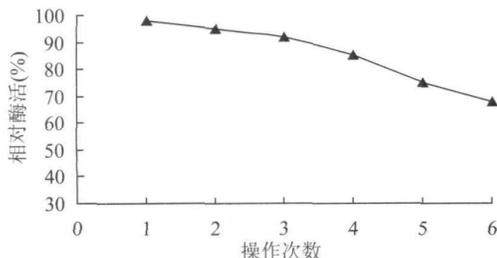


图 3 固定化酶的操作稳定性

2.2.4 固定化酶的贮存稳定性 将游离酶和固定化酶在 0.05mol/L 的磷酸钠缓冲液中 2℃ 贮存,每隔 24h 取样测定酶活,实验结果如图 4。

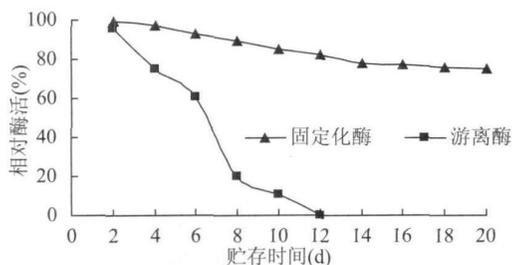


图 4 贮存时间与相对酶活的关系

从图 4 可以看出,游离酶随时间的增加,酶活力降低得很快,在 12d 后酶活力丧失。而固定化酶放置 20d 后仍能保持 75% 以上的酶活。这可能是由

(上接第 124 页)

用菌,2004(4): 44-45。  
[3] 魏秀俭. 竹荪及其营养保健价值[J]. 中国食品与营养, 2005(4).  
[4] 暴增海,马桂珍. 我国的竹荪资源及其开发利用[J]. 资源科学, 1994(3): 68-71.  
[5] 朱利泉,邓艳霞. 竹荪的研究与利用[J]. 中国野生植物资源, 2000(3): 21-23.  
[6] 谭敬军,胡亚平. 竹荪防腐作用初探[J]. 湖南农业大学学报, 1999, 25(6): 479-482.  
[7] 檀东飞,杜崢辉. 棘托竹荪正己烷提取物的抑菌作用研究[J]. 海峡药学, 2003, 15(1): 61-63.  
[8] 付陈梅,赵国华. 超声波技术在食品工业中的应用[J]. 四川食品与发酵, 2002(3): 31-33.  
[9] 檀东飞,梁鸣. 棘托竹荪乙酸乙酯提取物的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(1): 34-37.  
[10] 谭敬军,胡亚平. 竹荪抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2000 21(10): 54-56.  
[11] 马同锁,张红兵. 十三种天然香辛料的抑菌作用研究[J]. 山西食品工业, 2005(1): 8-10, 16.  
[12] 徐宝才. 天然食品防腐剂的研究[J]. 食品与机械, 2001(3): 4-7.

通过提取工艺的优化实验,可以看出:料液比、浸提温度、浸提时间等因素对长裙竹荪有效成分提取率有直接影响,最终优化的提取工艺条件为:浸提时间为 8h 浸提温度为 80℃,料液比为 1:15。

抑菌实验的结果表明:长裙竹荪子实体含有广谱抗菌成分,特别是对细菌有明显的抑制作用,为进一步提取并生产纯天然生物防腐剂<sup>[12]</sup>奠定了基础,但其有效抑菌成分的化学成分及其抑菌机理还有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 徐方. 食用真菌的药用价值[J]. 宁夏医学院学报, 1990 12(1): 46-48.  
[2] 郭渝南,刘晓玲,范娟. 竹荪的营养与药用功效[J]. 食

于羧甲基纤维素氯氨-S-三嗪衍生物与酶结合后,使酶的结构更加牢固,不易随着存放时间的延长而变化,保持酶的活力。

### 3 结论

羧甲基纤维素固定化胰凝乳蛋白酶的最佳酶偶联条件是:接枝温度 50℃,接枝时间 10min 酶偶联温度 20℃,酶偶联时间 4h,所制得的固定化相对酶活是 95.5%。又考察了最佳固定条件下胰凝乳蛋白酶的热稳定性、pH 稳定性、操作稳定性及贮存稳定性,实验结果表明,胰凝乳蛋白酶经羧甲基纤维素氯氨-S-三嗪衍生物固定化后,热稳定性提高 5℃,pH 作用范围从 7 提高到 8-9 连续操作 6 次后的相对酶活还保持在 70% 以上,固定化酶在 0.05mol/L 的磷酸钠缓冲液中 2℃ 贮存放置 20d 后仍能保持 75% 以上的酶活,并且固定化酶易于从反应体系中分离出来,使得价格昂贵的酶得以反复使用。

### 参考文献:

- [1] 谭佩幸,陶宗晋,等. 现代化学试剂手册(第三分册)[M]. 北京:化学工业出版社,1986.  
[2] 张春红,陈海英,等. 海藻酸钠固定化谷氨酰胺转氨酶稳定性的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(9): 69-71.  
[3] 梧桐. 酶工程技术的研究及其在医药领域的应用[J]. 药学进展, 1994, 18(3): 301-303.  
[4] Tao G L, Furusaki S. Methods for immobilizing enzymes and some application[J]. Polymer J, 1995, 27(2): 111.  
[5] Menger FM, Keiper J. Gemini surfactants[J]. Angew Chem Int Ed, 2000, 39: 1906-1920.  
[6] 王爱玲,杨江科,等. 海藻酸钠明胶固定化黑曲霉脂肪酶[J]. 应用化工, 2007, 36(4): 317-324.