

# 采用双层静电自组装技术制备 nPAM-木瓜蛋白酶-CNC 催化剂

娄文勇<sup>1, 2</sup>, 岳东梅<sup>1</sup>, 曹诗林<sup>3</sup>, 范晓丹<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640) (3. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究利用载体材料纤维素纳米晶(CNC)、木瓜蛋白酶(papain, PA)以及非离子型聚丙烯酰胺(non-ionic polyacrylamide, nPAM)的表面电荷特性, 制备了新型的固定化木瓜蛋白酶, 利用Zeta电位分析, 探寻固定化过程中的静电作用机制; 并通过傅立叶变换红外光谱(FTIR)分析固定化PA的组成成分和各物质的相互作用。通过对固定化过程中的各因素进行研究, 得到了制备该固定化酶的最优条件, 分别为pH 5.0, CNC和PA质量比为36:1(CNC/PA), nPAM(5%质量分数)的添加量为0.3 mL, 酶层自组装时间30 min; 在此条件下酶活回收率达85.8%。随后, 对游离酶和固定化酶的动力学参数研究显示固定化酶的 $V_{max}/K_m$ 值( $1.40 \text{ min}^{-1}$ )明显高于游离酶( $0.80 \text{ min}^{-1}$ ), 表明所制备的固定化PA具有更高的催化效率、更广的最适pH范围和温度范围以及操作稳定性, 在重复使用5批次之后, 相对酶活仍在96.5%以上。可见双层自组装技术是一种进行固定化酶的新途径。

**关键词:** 纤维素纳米晶(CNC); 静电作用; 自组装; 固定化木瓜蛋白酶

文章编号: 1673-9078(2015)8-192-198

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.031

## Preparation of nPAM-papain-cellulose Nanocrystal (CNC) Biocatalyst by Double-layer Electrostatic Self-assembly Technique

LOU Wen-yong<sup>1,2</sup>, YUE Dong-mei<sup>1</sup>, CAO Shi-lin<sup>3</sup>, FAN Xiao-dan<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (3. College of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** A novel, immobilized papain (PA) was prepared by double layers electrostatic self-assembly using the surface charge characteristics of support material cellulose nanocrystal (CNC), papain (PA), and non-ionic polyacrylamide (nPAM). The electrostatic interaction mechanism of the immobilization process was explored via zeta potential (ZP) analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to analyze the composition of immobilized PA and the interactions between each substance. The optimal immobilization conditions were obtained through a study of each factor in the immobilization process, as follows: pH: 5.0; CNC/PA mass ratio: 36:1; dosage of 5% (by mass) nPAM: 0.3 mL; the enzyme layer assembly time: 30 min. Under these conditions, the enzyme activity recovery was as high as 85.8%. Subsequently, the kinetic parameters of the free and immobilized enzymes were studied, and the results showed that the  $V_{max}/K_m$  of immobilized enzyme ( $1.40 \text{ min}^{-1}$ ) was significantly higher than that of free enzyme ( $0.80 \text{ min}^{-1}$ ), indicating that the prepared immobilized enzyme had higher catalytic efficiency as well as wider optimal pH and temperature range. Moreover, the immobilized PA still remained > 96.5% of its initial enzyme activity after the repeated use for five cycles. Therefore, double-layer electrostatic self-assembly technique is a novel and convenient method for enzyme immobilization.

**Key words:** cellulose nanocrystals(CNC); electrostatic interaction; self-assembly; immobilized papain

收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21222606; 21376096); 广东省自然科学基金重点项目(S2013020013049); 华南理工大学中央高校基本科研业务费(2013ZG0003); 全国百篇优秀博士论文作者资助项目(201504)

作者简介: 娄文勇, 教授, 博导, 研究方向: 应用生物催化

通讯作者: 范晓丹(1980-), 女, 讲师, 研究方向: 生物催化与发酵工程

PA 主要提取于未成熟的青木瓜乳液中,是一种能作用于各类蛋白的天然产物,被广泛应用于各个行业<sup>[1]</sup>。在食品加工中,PA 具有重要的作用:在肉类加工中能使肉类嫩化,口感风味提高,经 PA 加工生产的嫩肉粉是健康天然的食品添加剂,脱水汤料的制作可使产品利用率更高<sup>[2]</sup>;另外还有碎肉杂骨蛋白质的回收,因为经酶解的肉骨粉盒羽毛都是优质利用高的饲料;PA 还可用作饼干的膨松剂,酱类食品的酿造,饮料澄清剂和酵母提取物等等。

近年来,纳米生物科学技术的发展表明纳米结构材料在固定化酶和细胞领域具有良好的应用前景。目前,固定化酶的纳米结构载体包括无机纳米粒子,有机多孔材料,有机聚合物纳米材料等。聚合物纳米材料的结构功能多样,有良好的表面性能,亲疏水性可控,能够很好地适应不同生物催化剂和不同催化介质的要求。同时,聚合物载体固定化的生物催化剂能够较好地保持酶的催化活性、提高酶在极端环境的稳定性,并能够方便地进行回收利用,是目前的研究热点。纤维素、甲壳素、淀粉等天然多糖化合物具有廉价易得、可生物降解、可再生、无毒、生物相容性好等特点,同时,多糖带大量活性羟基,能够根据需要进行改性以适应不同的要求<sup>[3]</sup>。因此,研究多糖纳米材料作为载体制备固定化生物催化剂具有重要的科研价值和现实意义。

纤维素纳米晶体(Cellulose nanocrystals, CNC)作为一种新型的基质材料,不仅具有优异的物理和化学特性(如高结晶度、纯度、强度、杨氏模量,高生物相容性,可改性等)而且在自然界中含量丰富,天然可再生,生物可降解<sup>[4]</sup>。此外,CNC 还具有独特的纳米尺寸和形态结构,这使其成为生物基质材料方面的研究热点。但是 CNC 作为载体材料固定化酶分子的研究报道还不多<sup>[5-6]</sup>,而且目前的研究主要通过对 CNC 进行活化使其与酶发生分子间交联从而达到固定化酶的目的,其活化过程较复杂,固定化过程耗时较长,不利于 CNC 作为酶载体在生物催化研究领域的进一步应用。

研究表明,经硫酸水解得到的 CNC 表面带有大量的负电荷,可以与带正电荷的壳聚糖分子在水溶液中发生静电自组装<sup>[7]</sup>。酶是两性分子,在溶液中通过调节 pH 值,可以酶分子表面带有正电荷<sup>[8]</sup>。本研究通过调节 pH,使木瓜蛋白酶带有一定量的正电荷,与带有负电荷的 CNC 进行静电自组装,使木瓜蛋白酶分子负载到纤维素纳米晶表面;随后利用表面带负电的聚丙烯酰胺与木瓜蛋白酶进行第二层组装,从而制备出新型木瓜蛋白酶制剂。这种双层静电自组装固定化

简化了以 CNC 作为酶载体的固定化酶过程,有效避免了交联法固定化酶过程中由于戊二醛、二氮烯等交联剂的毒害作用酶失活较严重的缺点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

试剂:微晶纤维素购于国药集团化学试剂有限公司;木瓜蛋白酶(PA,来源于木瓜乳)购于 Sigma-Aldrich(USA),酶活为 1.8 U/mg 粗酶粉;非离子聚丙烯酰胺(non-ionic polyacrylamide, nPAM):相对分子量为  $9 \times 10^6$ ,工业级;其它试剂均为市售分析纯。

主要仪器:HITACHI UV-3010 紫外-可见分光光度计(日本日立公司),用于蛋白含量和木瓜蛋白酶酶活测定;Zeta 电位用 Mastersize 2000 (Malvern 仪器公司)来测定;德国 Bruker 公司的 Tensor 37 傅立叶变换红外光谱仪(DTGS 检测器)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 纤维素纳米晶(CNC)的制备

参照文献制备纤维素纳米晶<sup>[9]</sup>:将 5 g 微晶纤维素置于 200 mL 质量分数为 64%的浓硫酸溶液中,45 °C 下加热搅拌 90 min;随后置于 4 °C 冰浴中冷却停止反应,去离子水洗涤后 4000 r/min 离心 5 min 除去上层溶液中残留的酸(重复 5 次);加入氨水调节 pH 至 7.0;最后,搅拌情况下将 CNC 分散于蒸馏水中,得到固体含量为 2%的 CNC 原液备用。

#### 1.2.2 双层自组装固定化木瓜蛋白酶的过程中各因素对固定化效果的影响

如图 1 所示:将一定质量的 CNC 加入 2 mL 磷酸缓冲溶液中配成 CNC 原液,向其中加入 2 mL 含有 2 mg/mL PA 的磷酸缓冲溶液,冰浴条件下搅拌 30 min,PA 和 CNCs 进行静电自组装(酶层自组装过程);然后再加入一定体积质量分数为 0.5%的 nPAM 溶液,冰浴中搅拌 30 min(保护层自组装过程),得双层自组装固定化 PA,离心洗涤,直至上清液无蛋白后,分别测定洗涤液和上清液中的蛋白含量,用于负载量和负载率的分析;下层所得到的双层自组装固定化酶,4 °C 冰箱保存备用。

为了确定制备该固定化酶的最佳条件,研究了固定化过程中各因素(木瓜蛋白酶与载体 CNC 的质量比、固定化过程的 pH、nPAM 的添加量、酶层自组装时间)对固定化效果的影响。

CNC/PA:取适量粗酶粉溶于 pH 6.0,200 mM PBS 中,测定蛋白含量后取一定体积于 10 mL 试管中,加

入一定体积固体含量为 2% 的 CNC 溶液（分散于 pH 6.0 的 PBS 缓冲液中）使 CNC 和 PA 的质量比（CNC/PA）分别为 7:3、9:2、7:1、9:1、18:1、36:1 冰浴中搅拌进行酶层自组装，30 min 后加入 1 mL 质量分数为 5% 的 nPAM，搅拌 30 min 进行保护层自组装。离心洗涤，收集上清测洗涤液的蛋白含量，计算固定化效率。

**nPAM 添加量：**固定化过程使用 200 mM pH 6.0 的 PBS 溶液中，按质量比 CNC/PA 为 36:1 加入反应体系，冰浴搅拌进行酶层自组装，30 min 后分别加入不同体积（0.05 mL、0.15 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL）的质量分数为 5% 的 nPAM 溶液，保护层自组装 30 min。离心洗涤，收集上清测洗涤液的蛋白含量，计算固定化效率。

**固定化过程 pH：**分别用 200 mM 不同 pH（5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5）的缓冲液来溶解粗酶粉和分散 CNC，按质量比 CNC/PA 为 36:1 加入反应体系，酶层自组装 30 min 后，加入 0.3 mL 质量分数为 5% 的 nPAM，搅拌 30 min 进行保护层自组装。离心洗涤，收集上清测洗涤液的蛋白含量，计算固定化效率。

**酶层自组装时间：**固定化过程使用 200 mM pH 5.0 的 PBS 溶液中，按质量比 CNC/PA 为 36:1 加入反应体系，冰浴搅拌进行不同时间（0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、4.0 h）的酶层自组装；之后加入 0.3 mL 质量分数为 0.5% 的 nPAM 溶液，保护层自组装 30 min。离心洗涤，收集上清测洗涤液的蛋白含量，计算固定化效率。

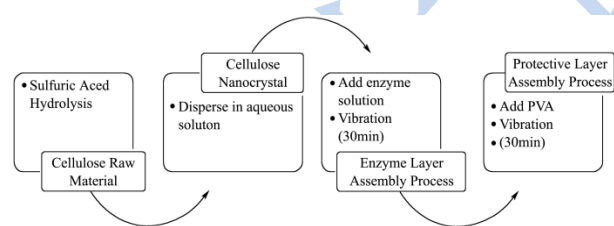


图 1 双层自组装固定化酶的制备示意图

Fig.1 Schematic illustration of double-layer self-assembly to prepare immobilized enzymes

### 1.2.3 木瓜蛋白酶中蛋白含量和酶活力的测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

将国标（GB/T 23527-2009）进行略微改进之后用于测定游离/固定化木瓜蛋白酶的酶活：将含 3 mg PA 的游离酶或固定化酶置于 2 mL 磷酸缓冲液（200 mM pH 7.0）中，随后加入 2 mL 质量分数为 1% 的酪蛋白溶液，60 °C 200 r/min 反应 15 min 后加入 4 mL 5% 三氯乙酸溶液终止反应，离心，用紫外可见分光光度计测上清液在 275 nm 波长的吸光度。根据游离酪氨

酸含量与吸光度的标准曲线，计算出游离酪氨酸含量，从而可得酶活<sup>[10]</sup>。

酶活（U/g）定义为：1 g 游离或固定化木瓜蛋白酶每分钟催化酪蛋白水解生成的酪氨酸的含量（ $\mu\text{g}$ ）。

### 1.2.4 固定化各组分的 Zeta 电位分析

用 Mastersize 2000（Malvern 仪器公司）在不同 pH 下测定 CNCs 和 PA 表面 Zeta 电位（平行测定三次取平均值）。

### 1.2.5 各材料及固定化酶的红外光谱分析

将 PA、CNC、nPAM、PA 和 CNC 组装后的半成品（CNC+E）以及最终所得的双层自组装固定化酶（Immobilized PA）压片之后，用德国 Bruker 公司的 Tensor 37 傅立叶变换红外光谱仪（DTGS 检测器）在  $400\text{ cm}^{-1}\sim 4000\text{ cm}^{-1}$  波长下扫描。

### 1.2.6 固定化木瓜蛋白酶酶学性质的研究

**动力学参数：**以酪蛋白作为模型底物，在 65 °C，pH 6.0，底物浓度为 1~15 mg/mL（0.1~1.5 wt%）的范围内，分别测定游离 PA 和固定化 PA 的反应初速度，根据双倒数作图计算出这 2 种酶制剂各自的  $K_m$  与  $V_{max}$ 。

**最适 pH 的研究：**含 3 mg PA 的固定化酶或 3 mg 游离蛋白酶分别在 200 mM pH 4.0~10.0（pH 为 4.0 时为柠檬酸-磷酸盐缓冲液；pH 5.0~8.0 时为磷酸盐缓冲液；pH 为 9.0~10.0 时为甘氨酸-NaOH 缓冲液），45 °C 的条件下按照上述方法测定酶活。以所测得最大酶活为 100%。

**最适温度的研究：**含 3 mg PA 的固定化酶或 3 mg 游离蛋白酶分别在 200 mM PBS（pH 6.0），55~90 °C 的条件下按照上述方法测定酶活。以所测得最大酶活为 100%。

**操作稳定性：**用 1.2.3 中所提及的酶活测试法对固定化酶进行 5 个批次的反应，考察固定化酶的操作稳定性。在每一批次反应结束后，通过离心（4000 r/min，3 min）将反应介质与固定化酶分离，并用磷酸缓冲液（pH 6.0，200 mM）洗涤，离心（4000 r/min）弃去缓冲溶液（重复三次）。随后再进行下一批次反应。依此方法进行 5 批次实验。以第一批反应时所加入酶的酶活为 100%。

### 1.2.7 数据分析

每组试验平行三次，利用 Excel 2010 计算数据的平均值以及 95% 置信水平下的标准差，试验结果以平均值±标准差表示。采用 Origin 8.0 进行图形绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化酶各组分的 Zeta 电位分析

为了确定固定化酶材料表面的电荷密度,在不同 pH 下测定 CNC、PA 以及 nPAM 的 Zeta 电位。如图 2 所示,在 pH 8.5~10.0 的范围内,PA 和 CNC 带有相同的电荷,容易发生排斥作用;而在 pH 5~8 的范围内,PA 带正电荷而 CNC 带有相反的电荷,易通过静电作用进行自组装(第一层的酶层自组装)。而 nPAM 在 pH 为 2~12 之间 Zeta 电位一直是 -14.5 mV 左右<sup>[11]</sup>,其 Zeta 电位值随环境 pH 的变化改变不大,可利用 nPAM 表面的负电荷进行第二层(保护层)的组装。

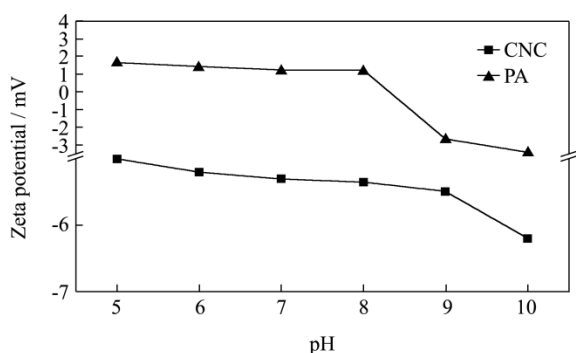


图 2 不同 pH 时 CNC 和 PA 的 Zeta 电位

Fig.2 Zeta potentials of PA and CNC at different pH values

## 2.2 材料及固定化酶的红外光谱分析

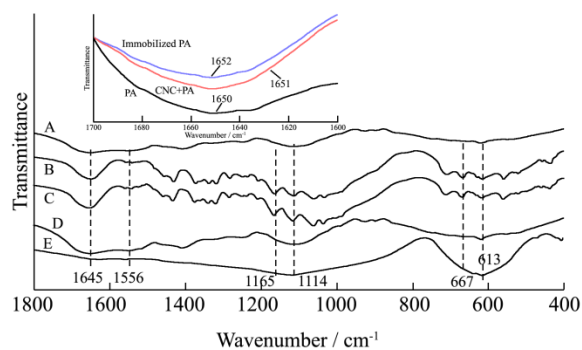


图 3 材料及固定化酶的红外图谱

Fig.3 FT-IR spectra for immobilized enzymes and various materials

Note: A, CNC; B, CNC+PA; C, Immobilized PA; D, PA; E, nPAM.

对 CNC(3A), 第一层自组装后的产物(CNC+E, 3B), 固定化酶(3C), PA(3D), nPAM(3E), 进行了傅立叶红外光谱分析,如图 3A 所示,1645  $\text{cm}^{-1}$  和 1556  $\text{cm}^{-1}$  分别为 CNC 中的氨基 I、II 振动峰;1165  $\text{cm}^{-1}$  和 1114  $\text{cm}^{-1}$  分别为 C-O-C 和不对称环的振动峰;667  $\text{cm}^{-1}$  为 C-C-O 的振动峰,613  $\text{cm}^{-1}$  为糖单元典型的  $\beta$ -糖苷键的振动峰。如小图所示,PA 的氨基峰在 1650  $\text{cm}^{-1}$ ,但是当 PA 和 CNC 发生静电自组装作用后(CNC+E)该峰偏移至 1651  $\text{cm}^{-1}$  处,与 nPAM 进行第二层自组装之后(Immobilized PA)该峰偏移至 1652  $\text{cm}^{-1}$ 。两次自

组装后氨基 I 特征峰位置发生偏移且偏移幅度较小(仅为 2  $\text{cm}^{-1}$ ),表明 CNC、PA、nPAM 之间通过温和的弱静电作用结合形成固定化酶,这也是本文后面研究中固定化酶活回收较高的原因。

## 2.3 固定化过程中各因素对固定化效果的影响

### 2.3.1 木瓜蛋白酶质量与载体 CNC 质量比对固定化效果的影响

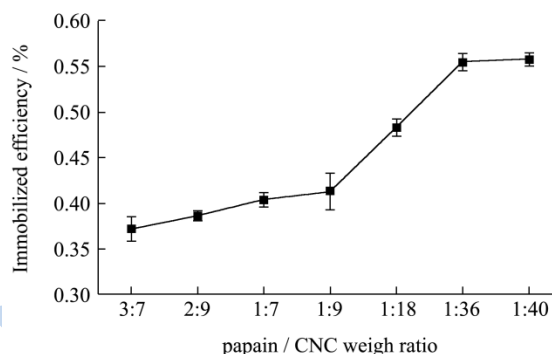


图 4 PA 和 CNC 的质量比对固定化效率的影响

Fig.4 Effect of the mass ratio of PA and CNC on immobilization efficiency

注:反应条件:200 mM pH 6.0 的 PBS 溶液,不同质量比的 PA 与载体 CNC,酶层自组装 30 min,1 mL 质量分数为 5% 的 nPAM,保护层自组装 30 min。

酶的负载率除与 CNC 的比表面及孔径有关外还与 CNC 的添加量有密切关系,因此我们考察了 CNC 和 PA 不同质量比(CNC/PA)对固定化效果的影响。如图 4 所示,当 CNC 与 PA 质量比超过 40:1 时载体所负载的酶量达到稳定不再增加为 55.8%,但是此时每 g 载体所负载的酶量较低,造成材料的浪费。当 CNC 与 PA 质量比为 36:1 时酶蛋白固定化效率达到 55.5%,其酶在载体上的负载量为 19.1 mg 酶/g CNC,随着质量比继续加大到 7:3,固定化效率逐渐降低(42.1%~37.2%)。综合考虑固定化效率,酶量和载体量可以看出 36:1 为所得的最适 CNC 和 PA 的质量比。

### 2.3.2 nPAM 的添加量对固定化效果的影响

nPAM 表面含有大量的负电荷,能够与酶层的正电荷进行二次组装,作为保护层。因此 nPAM 的添加量对固定化效果有很大影响。考察了分别添加 0.05~0.6 mL 质量分数 0.5% 的 nPAM 对固定化效果的影响。如图 5 所示,当 nPAM 的添加量由 0.05 mL 增加到 0.3 mL 时,固定化效率由 36.8% 增加至 55.5%;但是当继续增加 nPAM 的用量时,固定化效率基本不变,表明保护层能组装的 nPAM 量已经达到饱和且过

量的 nPAM 会对酶产生毒害作用, 造成酶活损失。综上所述, nPAM 的最佳添加量为 0.3 mL。

### 2.3.3 固定化过程 pH 对固定化效果的影响

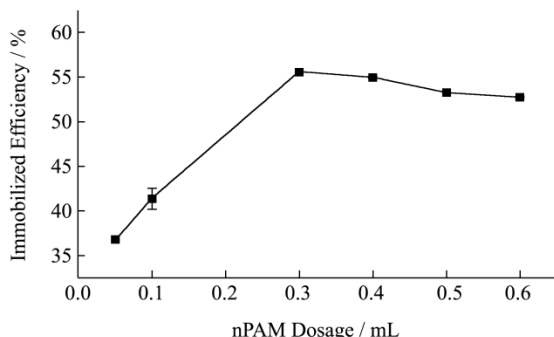


图 5 nPAM 的添加量对固定化效果的影响

Fig.5 Effect of nPAM dosage on immobilization efficiency

注: 反应条件: 200 mM pH 6.0 的 PBS 溶液, CNC/PA 质量比为 36:1, 冰浴搅拌, 酶层自组装 30 min, 分别加入不同体积 (0.05 mL、0.15 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL) 的质量分数为 5% 的 nPAM 溶液, 保护层自组装 30 min。

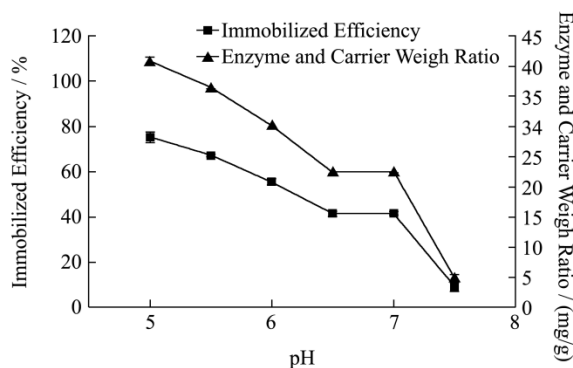


图 6 固定化过程 pH 对固定化效果的影响

Fig.6 Effect of pH on immobilization efficiency

注: 反应条件: CNC/PA 质量比为 36:1 加入反应体系, 不同 pH, 酶层自组装 30 min, 加入 0.3 mL 质量分数为 5% 的 nPAM, 搅拌 30 min 进行保护层自组装。

固定化过程中 pH 是影响固定化效果的关键因素之一。酶作为一个两性分子, pH 可以影响酶在溶液中的离子状态, 当 pH 位于酶分子的等电点以下时酶分子带正电荷, 当 pH 位于酶分子的等电点以上时酶分子带负电荷; 因此通过调节 pH 使其处于 PA 的等电点以下使其带正电荷与带负电荷的 CNC 发生静电作用进行自组装。根据 Zeta 电位图 (图 1), 在 pH 5.0~8.0 的范围内 CNC 和 PA 带有相反的电荷, 能够进行静电自组装。因此, 考察了 pH 在 5.0~7.5 的范围内对固定化效果的影响。如图 6 所示, pH 在 5.0 时, 固定化效率达到最大为 75.21%, 固定上的载体与酶的质量比为 21.32 mg 酶/g CNC 载体, 该条件下酶活回收率达到 85.8%。随着 pH 的升高, 其固定化效率和基于载体的

负载量随着降低, 这可能是因为随着 pH 的升高, PA 的 Zeta 电位逐渐降低, 所带的正电荷减少, 与 CNC 的静电作用变弱, 从而导致通过静电自组装负载到 CNC 表面的酶量减少。

### 2.3.4 酶层自组装时间对固定化效果的影响

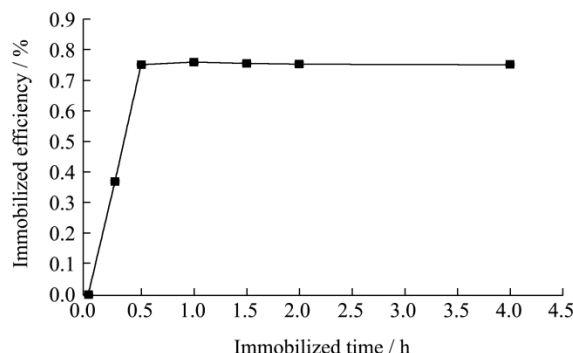


图 7 酶层自组装时间对固定化效果的影响

Fig.7 Effect of immobilization time on immobilization efficiency

注: 反应条件: 200 mM pH 5.0 的 PBS 溶液, CNC/PA 质量比为 36:1, 冰浴搅拌, 进行不同时间 (0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、4.0 h) 的酶层自组装; 0.3 mL 质量分数为 0.5% 的 nPAM 溶液, 保护层自组装 30 min。

酶层自组装时间过短会导致酶分子不能充分和载体 CNC 发生静电作用, 从而导致负载率低; 但是若自组装时间过长又会造成酶分子与 nPAM 接触, 由于 nPAM 的毒害作用使酶失活。因此, 考察了自组装 0.5~4 h 对固定化效果的影响。如图 7 所示, 当酶层自组装时间由 0.5 h 增加至 1 h 时, 固定化效率由 75.2% 增加至 75.8%; 随后虽然自组装时间增长, 但是固定化效率略为下降后持平, 因此选择酶层自组装时间为 0.5 h。

## 2.4 酶学性质的研究

### 2.4.1 pH 对游离酶和固定化酶的影响

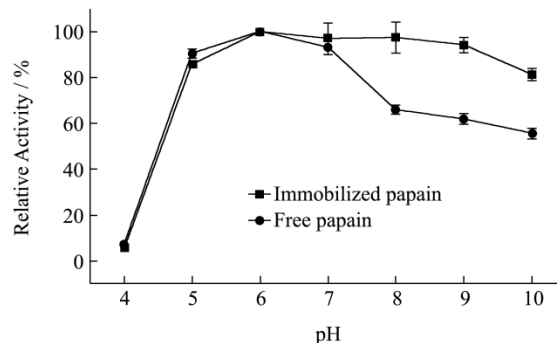


图 8 pH 对固定化酶和游离酶的影响

Fig.8 Effect of pH on the immobilized and free enzymes

注: 反应条件: 含 3 mg PA 的固定化酶或 3 mg 游离酶, 2 mL 不同 pH 的缓冲液, 2 mL 质量分数为 1% 的酪蛋白溶液, 200

r/min, 45 °C。以所测得最大酶活为 100%。

研究了 pH 在 4~10 范围内对游离酶和固定化酶的影响,如图 8 所示,虽然游离酶和固定化酶都在 pH 6.0 相对酶活最大,但是在 pH 为 7.0~9.0 的范围内,固定化酶的相对酶活始终在 94% 以上,相比之下,游离酶在 pH 为 9.0 时相对酶活下降为 61.85%。当 pH 为 10.0 时,固定化酶和游离酶的相对酶活分别为 81.27% 和 55.63%。结果表明,酶经过固定化后,最适 pH 范围有所扩大,这和其它课题组的研究保持一致<sup>[12]</sup>。

### 2.4.2 温度对游离酶和固定化酶的影响

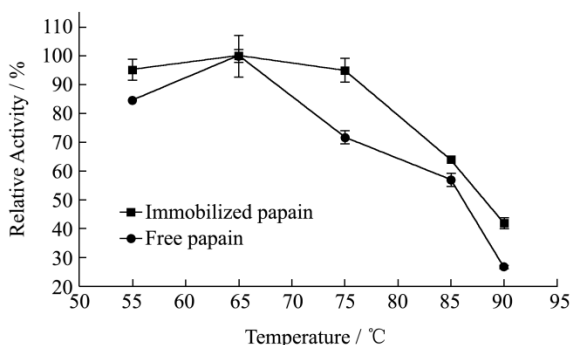


图 9 温度对游离酶和固定化酶的影响

Fig.9 Effect of temperature on the free and immobilized enzymes

注:反应条件:含 3 mg PA 的固定化酶或 3 mg 游离酶, 2 mL pH6.0 的磷酸缓冲液, 2 mL 质量分数为 1% 的酪蛋白溶液, 200 r/min, 不同温度。以所测得最大酶活为 100%。

如图 9 所示,游离酶和固定化酶的都在 65 °C 相对酶活最大,但是可以看出 65 °C~75 °C 之间固定化酶的相对酶活在 95% 以上,但是 75 °C 时游离酶的相对酶活仅为 71.84%;且随着温度的升高,游离酶的相对酶活下降迅速。

由此可以看出,与游离酶相比,固定化酶的最适温度范围更广。

### 2.4.3 游离酶和固定化酶的动力学参数研究

表 1 游离酶和固定化酶的表现动力学参数比较

Table 1 Comparison of apparent kinetic parameters of the free and immobilized enzymes

Enzyme preparation	$K_m$ / (mg/mL)	$V_{max}$ / [ $\mu$ g/(mL min)]	$V_{max}/K_m$ / min <sup>-1</sup>
Free	13.33	10.83	0.81
Immobilized	8.29	11.58	1.40

注:反应条件:含 3mg PA 的固定化酶或 3 mg 游离酶,磷酸缓冲液(200 mM, pH 6.0),酪蛋白浓度为 1~15 mg/mL (0.1~1.5 wt%) 的范围内, 65 °C, 220 r/min, 反应 15 min。

动力学参数可以直观地表示酶催化能力的大小,如表 1 所示,游离酶和固定化酶的米氏常数  $K_m$  分别为 13.33 mg/mL 和 8.29 mg/mL,固定化酶的表现  $K_m$

低于游离酶,表明固定化酶具有更好的底物亲和力<sup>[10, 13]</sup>。这可能是因为 PA 在静电自组装过程中,三级结构发生改变,使底物分子更容易接近酶活性中心,因此固定化 PA 表现出较小的表观  $K_m$  值。从酶的催化效率的比较可以看出固定化 PA 的  $V_{max}/K_m$  值 (1.40 min<sup>-1</sup>) 高于游离酶 (0.80 min<sup>-1</sup>),表明通过这种双层静电自组装技术固定化的 PA 具有更高的催化效率。

### 2.4.4 固定化酶的操作稳定性研究

固定化酶的重复使用是衡量固定化酶稳定性的一个重要指标<sup>[14]</sup>。从图 10 可以看出,固定化 PA 在重复使用 5 批次后其相对酶活依然很高,达到 96.94%。表明了该酶经过双层自组装固定化之后便于回收和重复利用,降低了生产成本,具有潜在的工业应用价值。

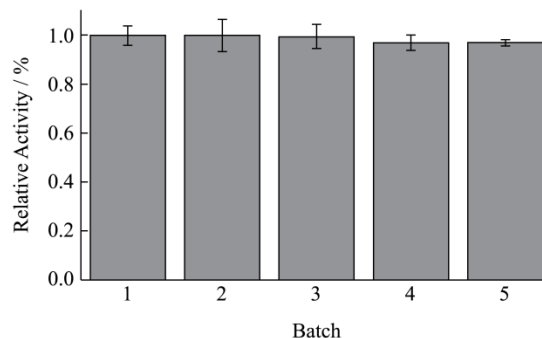


图 10 固定化 PA 的操作稳定性

Fig.10 Stability of the operation to immobilize PA

## 3 结论

本研究报道了一种基于双层静电自组装技术的简单、温和快速的木瓜蛋白酶的固定化方法,并利用 Zeta 电位分析阐明固定化的原理。在 pH5.0, CNC/PA 质量比为 36:1, nPAM 添加量为 0.3 mL, 酶层自组装时间 30min 时,固定化效率最高,达 98.48%。与游离酶相比,固定化酶具有更好的 pH 稳定性、温度稳定性及更高的催化效率,重复使用 5 批次之后,固定化 PA 仍保持很高的活力。该固定化酶制剂有望进一步用于手性氨基酸拆分以及手性小肽合成等领域,拥有良好的潜力。

### 参考文献

[1] 尤朋勇.木瓜脂肪酶的制备、性质及应用研究[D].上海:华东理工大学,2012  
YOU Peng-yong. Carica papaya lipase purification and its application [D]. Shanghai, 2012

[2] 郑贤孟,杨文鹤,徐大伦.木瓜蛋白酶嫩滑秘鲁鱿鱼肉工艺条件研究[J].食品工业科技,2013,34(16):203-206  
ZHENG Xian-meng, YANG Wen-ge, XU Da-lun. Study on

- optimization for tenderization conditions of *dosidicus gigas* meat by papain [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(16): 203-206
- [3] R Xiong, XX Zhang, D Tian, et al. Comparing microcrystalline with spherical nanocrystalline cellulose from waste cotton fabrics [J]. Cellulose, 2012, 19(4): 1189-1198
- [4] Y Habibi, LA Lucia, OJ Rojas. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-Assembly, and applications [J]. Chem. Rev., 2010, 110(6): 3479-3500
- [5] V Incani, C Danumah, Y Boluk. Nanocomposites of nanocrystalline cellulose for enzyme immobilization [J]. Cellulose, 2013, 20(1): 191-200
- [6] J Wang, G Zhao, Y Li, et al. Reversible immobilization of glucoamylase on to magnetic chitosan nanocarriers [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2013, 97(2): 681-692
- [7] J P de Mesquita, C L Donnici, F V Pereira. Biobased nanocomposites from layer-by-layer assembly of cellulose nanowhiskers with chitosan [J]. Biomacromolecules, 2010, 11 (2): 473-480
- [8] 吴敏,何琴,左勇刚,等.微纳尺度无机-有机杂化凝胶固定化木瓜蛋白酶研究[J].化学学报,2011,69(12):1475-1482
- WU Min, HE Qin, ZUO Yong-Gang, et al. Studies on immobilization of papain based on inorganic-organic hybrid gel of micro-nano-scale [J]. Acta Chimica Sinica, 2011, 69(12): 1475-1482
- [9] Z Liu, H Wang, B Li, et al. Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials [J]. J. Mater. Chem., 2012, 22(38): 15085-15091
- [10] S L Cao, X H Li, W Y Lou, et al. Preparation of a novel magnetic cellulose nanocrystal and its efficient use for enzyme immobilization [J]. J. Mater. Chem., 2014, 2: 5522-5530
- [11] 吴敏,崔秀云,苗茂栋.Zeta 电位与菌悬液絮凝活性[J].化工学报,2008,59(9):2263-2269
- WU Min, CUI Xiu-yun, MIAO Mao-dong. Flocculation of bacterial suspensions by using zeta potential analysis [J]. J. Chem. Ind. Eng., 2008, 59(9): 2263-2269
- [12] H Lei, W Wang, L L Chen, et al. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres [J]. Enzyme Microb. Technol., 2004, 35(1): 15-21
- [13] Yu C Y, Li X F, Lou W Y, et al. Cross-linked enzyme aggregates of mung bean epoxide hydrolases: a highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 166: 12-19
- [14] Tischer W, Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? [J]. Trends in Biotechnology, 1999, 17(8): 326-335