

金属螯合载体定向固定化木瓜蛋白酶的研究

Oriented Immobilization of Papain on Metal Chelating Carriers

刘琳琳, 曾力希, 刘 婷, 邓 乐*

LIU Lin-Lin, ZENG Li-Xi, LIU Ting and DENG Le*

湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081

College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

摘 要 以磁性金属螯合琼脂糖微球为载体, 利用金属螯合配体(IDA- Cu^{2+})与蛋白质表面供电子氨基酸相互作用的原理, 定向固定了木瓜蛋白酶。固定化最适条件为 Cu^{2+} 1.5×10^{-2} mol/g 载体、固定化时间 4h、固定化 pH7.0、给酶量 30mg/g 载体。固定化酶的最适反应温度 70℃、最适反应 pH8.0, 固定化酶的热稳定性明显高于溶液酶, 固定化酶活力回收为 68.4%, 且有较好的操作稳定性, 载体重复使用 5 次后固定化酶酶活为首次固定化酶 79.71%。

关键词 金属螯合载体, 定向固定化, 固定化酶, 木瓜蛋白酶

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0789-05

Abstract Based on the technology of protein separation with immobilized metal ion affinity chromatography(IMAC), a method for oriented immobilization of papain has been selected. Papain was successfully immobilized on magnetic agarose carriers. Cu^{2+} with iminodiacetate(IDA) was used as the chelating ligand to be correlated with the histidine on papain(His-81). The optimum immobilization conditions of enzyme were as follows: Cu^{2+} 0.15×10^{-2} mol/g carriers, time was 4h, enzyme load was 30mg/g carrier, pH was 7.0, respectively. The pH and temperature were 8.0 and 70℃ for immobilized enzyme. The recovery activity of immobilized enzyme was retained 68.4%. The carrier could be recovered from the spent immobilized enzyme, to be reused. After 5 times, the reimmobilization of papain on the regenerated matrix was 79.71% effective with the retention of maximum enzyme activity. The cost of carriers used for industrial applications is very important. The regenerability of carriers is therefore, relevant. The mild conditions used for immobilization, the high recovery of immobilized preparations, the stability and the regenerability of the matrix are the main features of the method reported here. All above indicate this method can be applicable and promising in enzyme immobilization field.

Key words metal chelating carriers, oriented immobilization, immobilization, papain

固定化酶是 20 世纪 60 年代开始发展的一项技术, 它对提高酶的稳定性, 拓展酶的应用领域具有非常重要的意义^[1]。目前用于固定化酶的方法主要有物理吸附、化学偶联、交联、凝胶包埋和微胶囊法等。但这些常用固定化方法普遍存在固定化使用试剂和

载体成本高, 固定化过程中酶的构象受到影响及底物结合部位和活性中心受载体封闭所引起的酶活损失较大, 固定化操作过程繁琐等缺点, 限制了固定化酶的产业化应用^[2]。针对当前固定化酶载体和方法的不足, 开发和研究成本低或重复利用性好的载体,

减少固定化过程中酶活损失,并简化操作工艺的载体和方法一直是酶固定化领域的研究热点。

金属螯合亲和层析(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography,简称IMAC)是近30年发展起来的一项分离技术。它利用金属螯合配体与蛋白质表面的供电子氨基酸-组氨酸的咪唑基,半胱氨酸的巯基等(其中以组氨酸最为重要)以配位作用紧密结合的原理,从而对蛋白质进行分离、纯化^[3]。金属螯合载体对固定到表面的蛋白质构象影响小^[4],且载体可以重复利用,若将这种技术应用于固定化酶,有望克服目前常用固定化载体和方法的一些不足。

木瓜蛋白酶(EC 3.4.22.2)是一种来源广泛的巯醇类植物蛋白酶,侧链存在供电子氨基酸(组氨酸-81)具备与金属螯合配体相结合的条件。木瓜蛋白酶在酶动力学和结构学上都已得到深入的研究^[5,6],并且在各种载体上的固定化国内外也有广泛研究,因此很合适作为评测酶固定化方法效率的模式酶。

本文利用金属螯合配体与蛋白质相结合的原理,选用磁性琼脂糖-亚氨基二乙酸(IDA)- Cu^{2+} 做为金属螯合载体,定向固定了木瓜蛋白酶,并对固定化条件和酶学参数进行了深入研究,为这种技术广泛应用于固定化酶奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

木瓜蛋白酶(Sigma)、盐酸半胱氨酸(BBI)、亚氨基二乙酸(IDA)、BBI、EDTA(BBI)、 Fe_3O_4 磁流体(自制)、琼脂糖(Span-80)、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、三氯乙酸、环氧氯丙烷、硼氢化钠、甲苯、三氯甲烷等其它试剂均为市售分析纯。实验用水为双蒸水(ddH_2O)。

UV751 GD型紫外可见分光光度计(上海分析仪器总厂)、GFU-202C原子吸收分光光度计(北京分析仪器厂)、85-2型恒温磁力搅拌器(江苏环保仪器厂)、AB204-E型电子分析天平(Mettler)、PB-10型酸度计(Sartorius)。

1.2 载体的制备与酶的固定化

1.2.1 载体的制备 磁性琼脂糖微球采用反相悬浮包埋法制备。将72mL甲苯和28mL三氯甲烷混匀后加入三颈瓶,加入1.0mL Span-80混匀,50℃水浴加热,在快速搅拌下将6%的琼脂糖溶液(1.5g琼脂糖粉溶于25mL Fe_3O_4 磁流体)缓慢加入三颈瓶中,继续快速搅拌,使琼脂糖在有机相中分散均匀,减慢搅拌速度,自然冷却,过滤,用乙醚清洗3次,用

ddH_2O 大量冲洗,湿态筛分得到60目的磁敏性琼脂糖微球。

取15g 60目的载体置于30mL 2mol/L NaOH溶液中,加入110mg 硼氢化钠,3mL 环氧氯丙烷于37℃摇床中振荡,在以后的2h内陆续滴加15mL NaOH和9mL 环氧氯丙烷,总反应时间为24h。反应结束后,以大量 ddH_2O 冲洗微球,于 ddH_2O 中浸泡12h。将充分洗涤过的载体加入到40mL 2mol/L Na_2CO_3 溶液中,加入2.5g IDA,于37℃摇床中振荡24h,反应结束后,以大量 ddH_2O 冲洗,浸泡过夜,载体保存于4℃ ddH_2O 中备用。

取IDA化的琼脂糖载体加入一定量的 CuCl_2 溶液,室温下振荡,随后以大量 ddH_2O 洗涤,即得琼脂糖-IDA- Cu^{2+} 螯合载体。利用原子吸收分光光度法测定上清 Cu^{2+} 浓度,计算载体吸附 Cu^{2+} 的量。

1.2.2 酶的固定化 取螯合载体,加入木瓜蛋白酶(溶于0.1mol/L 磷酸缓冲液(PBS),pH7.0)室温下振荡4h,用0.1mol/L PBS(含1mol/L NaCl)洗涤数次至上清中检测不到酶活,即得固定化的木瓜蛋白酶。

1.3 载体的重复利用

载体的再生:将使用多次的固定化酶加入洗脱液(0.1mol/L PBS 含0.1mol/L EDTA,1mol/L NaCl)室温下振荡1h,再用0.1mol/L PBS(含1mol/L NaCl)冲洗3次,最后以 ddH_2O 多次洗涤。再生载体对酶的再次固定化同上述(1.2.2)操作。

1.4 酶活测定

酶活测定采取紫外分光光度法^[7]。以1min内催化酪蛋白水解生成 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸的酶量定义为一个活力单位(u)。

固定化酶活的测定:在固定化酶中加入1mL 0.1mol/L PBS 40℃预热,加入5mL 40℃预热的0.6%的酪蛋白PBS溶液,40℃反应10min,加入10%三氯醋酸2mL,摇匀静置20min后过滤,取滤液测定 OD_{275} 。

溶液酶活力测定:将酶溶于0.1mol/L PBS中,取1mL按上述方法测定溶液酶活力。

为便于考察变量(给酶量、pH、温度等)对酶活的影响,以同组实验中酶活最高值为100进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶的制备

2.1.1 载体吸附 Cu^{2+} 的量对固定化酶的影响 取IDA化的载体,改变加入 Cu^{2+} 的量($0.5 \times 10^{-2} \sim 7 \times 10^{-2} \text{ mol/g}$ 载体),制备吸附不同 Cu^{2+} 量的螯合载体。

再以此金属螯合载体固定木瓜蛋白酶,测固定化酶活及载体的载酶量,结果见图 1。

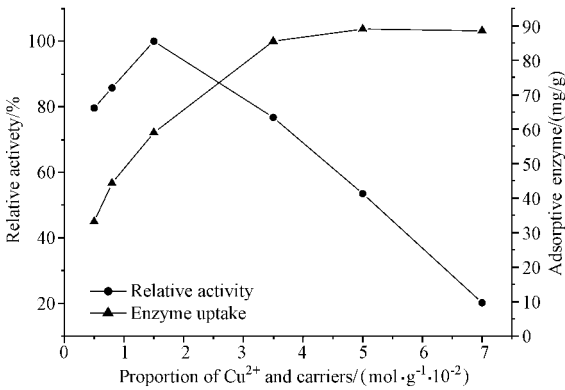


图 1 载体吸附 Cu²⁺ 的量与固定化酶活及载酶量的关系

Fig.1 Influence of different proportion of Cu²⁺ and carriers on relative activity and adsorptive enzyme

从图 1 可见,随着 IDA 化载体对 Cu²⁺ 固定量的增大,固定化酶的酶活先升高后降低。当 Cu²⁺:载体 < 1.5 × 10⁻² mol·g⁻¹ 时,酶活随给 Cu²⁺ 量的增加而增加,这是因为琼脂糖-IDA 只有在结合了 Cu²⁺ 后才能以配位作用固定酶,随给 Cu²⁺ 量的增加载体表面固定木瓜蛋白酶的位点增多,导致载酶量增加而引起酶活上升;当 Cu²⁺:载体 > 1.5 × 10⁻² mol·g⁻¹ 时,载体表面的 IDA 逐渐被 Cu²⁺ 饱和至过饱和,载体的载酶量达到并稳定在最大值,但被琼脂糖-IDA 载体过量吸附的 Cu²⁺ 在随后的酶反应过程中溢出至溶液中抑制了木瓜蛋白酶的活性,所以在 Cu²⁺:载体 > 1.5 × 10⁻² mol·g⁻¹ 时,酶活随给 Cu²⁺ 量的增加而减少。在以后的实验中,加入的量为 Cu²⁺ 1.5 × 10⁻² mol/g 载体,这样可以保证载酶量又可以消除 Cu²⁺ 对酶的抑制作用,此时载体吸附 Cu²⁺ 的量为 Cu²⁺ 0.5 × 10⁻² mol/g 载体。

2.1.2 固定化时间的影响:取金属螯合载体,加入木瓜蛋白酶溶液,不同时间测定上清蛋白及被 PBS 洗脱下来的蛋白质的量,计算载体载酶量。

从图 2 可以看出,载体的载酶量随固定化时间的延长而增加,4h 达到最大值并趋于稳定,可达到酶 89.01mg/g 载体,载体的载酶量较大。在以下的固定化实验中固定化时间均采用 4h。

2.1.3 pH 对固定化酶的影响:在不同 pH(5~9)的磷酸缓冲液中制备固定化酶,缓冲液的 pH 值与载体的载酶量关系见图 3。

从图 3 可以看出,载体的载酶量随 pH 值的增大而增加,pH 7 时饱和。根据价键理论,蛋白质与金属

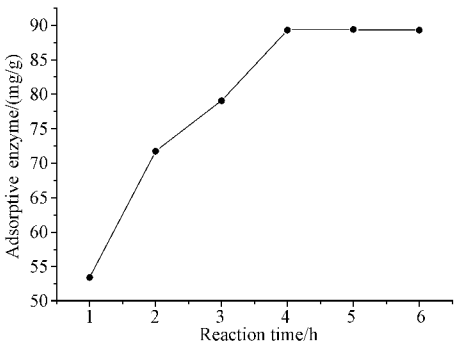


图 2 固定化时间对载酶量的影响

Fig.2 Effect of immobilization time on adsorptive enzyme

的螯合是通过蛋白质表面的氨基酸上的给电子原子(组氨酸的 N 原子)的孤对电子与金属离子上的空杂化轨道结合形成的,而氢原子也可以提供空轨道,因此会与金属离子竞争蛋白质表面的孤对电子,pH 值越低(氢离子浓度越高),它的这种竞争就越强烈,所以随着 pH 的增加,载体的载酶量也随之增加。

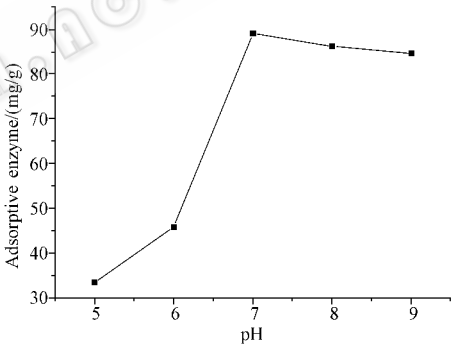


图 3 固定化反应介质 pH 值对载酶量的影响

Fig.3 Effect of pH on adsorptive enzyme

2.1.4 给酶量对固定化酶的影响:取金属螯合载体,通过改变给酶量得到不同给酶量的固定化酶,测固定化酶酶活与固定化率。结果如图 4。

从图 4 可以看出,给酶量为 10mg/g 载体时,酶的固定化率最高,随着给酶量的增大,载体上金属螯合配体结合位点逐渐饱和,固定化率逐渐降低,与此相反,所得的固定化酶的活力逐渐增加。根据以上结果,在固定化酶的制备实验中,每次给酶量为 30mg/g 载体,这样就能以较低的给酶量得到较高活力的固定化酶和较高的固定化率。固定化酶的相对活力为 65%,固定化酶的活性为 7745u/g,所得固定化酶的活力回收为 68.4%,明显高于国内外的报道(32%~52%)^[8]。

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 固定化酶的最适反应温度:取固定化酶与适

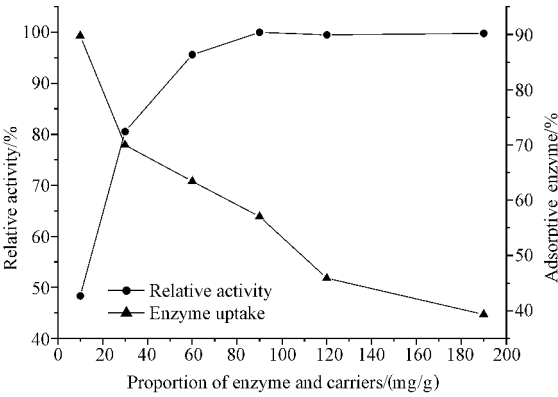


图 4 给酶量与酶活及固定化率的关系

Fig. 4 Effect of the ratio of enzyme and carriers on relative activity and adsorptive enzyme

当稀释的溶液酶于不同的温度(40 ~ 80℃)下分别测定其酶活 结果(图 5)表明固定化酶在 70℃ 时酶活力最高 ,较溶液酶的最适反应温度(60℃)高。这可能是因为固定化过程稳定了酶分子的构象 ,提高了酶的变性温度。

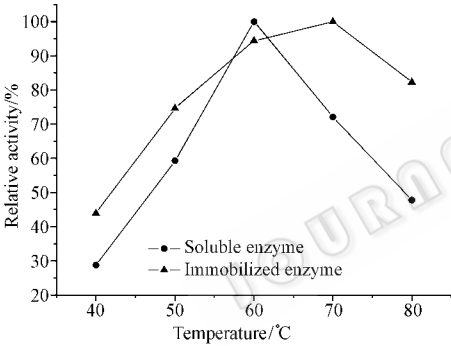


图 5 酶活力与温度的关系

Fig. 5 Effect of temperature on relative activity of soluble and immobilized enzyme

2.2.2 固定化酶的热稳定性 :取固定化酶和适当稀释的溶液酶 ,不同温度下保温 30min ,测定酶活力 ,结果(图 6)表明固定化酶有良好的热稳定性。

2.2.3 固定化酶的最适反应 pH 值 :取固定化酶和适当稀释的溶液酶分别在不同 pH 值(6.0 ~ 8.5)条件下测定酶活力 结果见图 7。

从图 7 可见 ,固定化酶的最适 pH 为 8.0 ,较溶液酶(7.0)高出 1 个单位。原因可能为载体经活化后 ,表面带羧基 ,是一种带负电荷载体 ,载体会吸附溶液中阳离子(包括 H^+)使其附着于载体表面 ,结果使固定化酶扩散层偏酸 ,这样外部溶液中的 pH 必须向碱性偏移 ,才抵消微环境作用 ,使其表现出酶的最大活力。

2.2.4 米氏常数的测定 :取一定量的固定化酶和溶

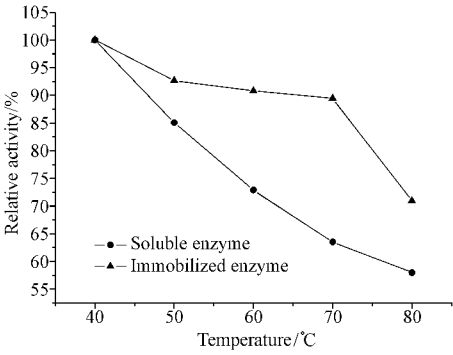


图 6 酶的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of enzyme

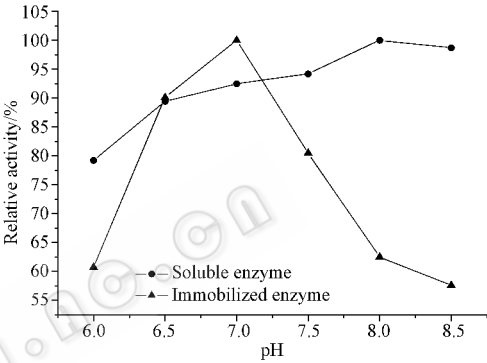


图 7 pH 对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on relative activity of soluble and immobilized enzyme

液酶 ,在 pH7.0 40℃ 下 ,选用不同的底物浓度 ,测量相应酶促反应的初速度(OD_{275}) ,用双倒数作图法 ,分别求其米氏常数 ,结果如图 8 所示。溶液酶的米氏常数(K_m)为 1.41mg/mL ,固定化酶的米氏常数为 3.95mg/mL ,说明固定化酶对底物的亲和力低于溶液酶。

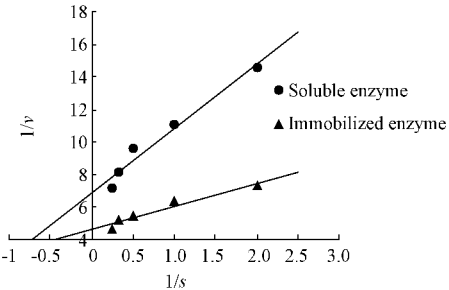


图 8 酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 8 Lineweaver-Burk plot of soluble and immobilized papain

原因可能为 ,固定化酶的米氏常数 K_m 与载体的带电性质相关^[9]。底物酪蛋白(pI 4.6)在反应体系中带负电荷 ,与载体电荷性质相同 ,在固定化酶微

环境中底物浓度较低,因此固定化酶需要较高的底物浓度才可达到最大反应速度,固定化酶的 K_m 值高于溶液酶的 K_m 值。

2.2.5 固定化酶的操作稳定性 取 0.1g 固定化酶,加入 15mL 0.6% 的酪蛋白 PBS 溶液,40℃ 反应 10min,磁场下分离固定化酶,PBS 洗涤。重复以上步骤直至得到重复反应 6 次的固定化酶,测定酶活力的结果表明:使用 6 次后,酶剩余活力保持在 75% 左右,说明该固定化酶有较好的操作稳定性。

2.3 载体的重复利用

从表 1 可以看出载体在重复利用 5 次后,仍可达酶 75.1mg/g 载体,酶活为首次固定化酶酶活的 79.71%,说明载体的重复利用性较好。

表 1 载体的重复利用与载酶量及固定化酶活力的关系

Table 1 Immobilization and reimmobilization of papain on metal chelating magnetic carriers

Number of cycles	Enzyme uptake/(mg/g)	Relative activity/ %
First	89.01	100
Second	89.01	96.65
Third	82.2	90.67
Fourth	81.4	86.63
Fifth	75.1	79.71

3 讨论

以金属螯合载体固定木瓜蛋白酶,在固定过程中用高盐洗脱液将以静电作用吸附在载体表面的酶蛋白洗脱下来,只剩余以配位作用与载体结合的酶,载体再生时的洗脱液成份(含 EDTA,高盐)及 pH 对固定化酶的影响曲线(图 3)也说明了酶和载体是以配位作用结合的,这种作用使酶与载体结合牢固。

以金属螯合载体固定木瓜蛋白酶,固定化过程不使用交联剂,避免了交联剂的使用对酶分子造成的化学损伤,酶以配位作用固定在载体上更大程度上保持酶分子的天然构象,可以更大限度保留酶活,同时用金属螯合载体固定木瓜蛋白酶实质上实现了对木瓜蛋白酶的定向固定化(site-specific immobilization),根据木瓜蛋白酶的立体结构图(3D domains, PubMed)分析,木瓜蛋白酶表面只有一个组氨酸(His-81),且远离酶的活性中心,将其固定在载

体上时,载体通过对木瓜蛋白酶的特定定位点(His-81)作用,使木瓜蛋白酶在载体表面形成一种高度有序的酶分子的二维阵列,载体对酶的作用位点远离催化活性中心,酶的活性中心朝向溶液方向,底物能充分接近活性中心,所以固定化酶酶活力回收高(68.4%)。

综上所述,在使用金属螯合载体定向固定木瓜蛋白酶时,固定化反应条件温和,对酶的高级结构影响小,酶活回收高;固定化酶的热稳定性明显提高,载体的载酶量大;载体的再生、酶的固定化过程操作简单;固定化酶及载体可多次重复利用,固定化酶生产成本低。因此,该技术在工业上具有广泛的应用前景。

REFERENCES(参考文献)

[1] Guo GJ(郭刚军),Ma L(马林),Xie WL(谢文林) *et al.* Activation of microcrystalline cellulose by two-step method and its use in immobilization of papain. *Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报) 2001, **40**(3):45-47

[2] Shao WH(邵文海),Zhang XE(张先恩). Orientation control of immobilized enzyme. *Biotechnology Information*(生物技术通讯), 2000, **11**(1):25-28

[3] Chen MZ, Susan AR, Charles EG. Suitability of immobilized metal affinity chromatography for protein purification from canola. *Biotechnology and Bioengineering* 2000, **68**(1):52-58

[4] Evelynne L, Thomas AK, Zoltan D. Reversible orientde surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Analytical Chemistry*, 1997, **69**(11):1979-1985

[5] Shakil A, Khan, Jawaid I. Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnol Appl Biochem* 2000, **32**:89-94

[6] Cheng FL(程凡亮),Chen LL(陈伶利),Wang W(王卫) *et al.* Immobilization and stabilization of papain on SiO₂ particles containing amine groups. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2004, **20**(2):287-290

[7] Guo Y(郭勇). Enzyme Engineering(酶工程). China Light Industry Press, 1994, pp.314-316

[8] Wang HY(王海英),Lin H(林洪),Ye M(叶眉) *et al.* Study on immobilized papain and its application. *Journal of Ocean University of Qingdao* (青岛海洋大学学报) 2001, **31**(5):689-694

[9] Luo GM(罗贵民). Enzyme Engineering(酶工程). Beijing: Chemical Industry Press 2003, p.69