



一个活力单位。

### 1.3 微晶纤维素的活化及固定化木瓜蛋白酶的制备

一步法: ① 维晶纤维素预处理 称取维晶纤维素 20 g, 室温下在 1 mol/L NaOH 溶液中充分搅拌使其充分溶胀 1 h. 用 5 倍维晶纤维素体积的蒸馏水冲洗 3 次, 再用 5 倍体积  $\varphi=50\%$  丙酮水溶液和无水丙酮先后各洗涤一次. 最后用 5 倍体积的干燥丙酮 (氯化钙干燥) 洗涤 3 次; ② 对甲基苯磺酰氯活化微晶纤维素 称取 5 g 对甲基苯磺酰氯溶于 20 mL 干燥丙酮配成溶液. 将预处理过的微晶纤维素加入所配的对甲基苯磺酰氯溶液并补充适量丙酮调成糊状, 加入 5 mL 吡啶作催化剂. 在室温下搅拌 3 h 使其充分反应. 反应完毕后用丙酮洗去微晶纤维素表面位反应试剂, 再用 1 mmol/L HCl 溶液充分洗涤, 再用蒸馏水洗至中性; ③ 木瓜蛋白酶的固定化 1 g 活化载体加到 5 mL 酶浓度为 20 mg/mL 的碳酸氢钠缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 8.5) 中, 4 °C 下搅拌过夜, 然后用磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.1) 冲洗, 去除载体表面未反应的游离酶。

二步法: 依照一步法的步骤①对维晶纤维素进行预处理; ②用对甲基苯磺酰氯活化维晶纤维素; ③引入有机胺基团 取上 2 步处理过的维晶纤维素加入到 0.01 mol/L 的乙二胺溶液, 室温下搅拌反应 1 h, 用蒸馏水充分洗涤至中性, 即得引入有机胺基的维晶纤维素; ④戊二醛活化维晶纤维素 引入氨基的维晶纤维素膜悬浮于  $\varphi=2\%$  的戊二醛溶液, 室温反应过夜. 然后用磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.1) 冲洗去除载体表面吸附的未反应的戊二醛; ⑤瓜蛋白酶的固定化 1 g 戊二醛活化的载体加到 10 mL 酶浓度为 20 mg/mL 的磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.1) 中, 4 °C 下搅拌过夜, 然后用磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.1) 冲洗去除载体表面未反应的游离酶。

## 2 结果与讨论

### 2.1 木瓜蛋白酶浓度对固定化酶活力的影响

无论是一步法活化的维晶纤维素, 还是两步法活化的维晶纤维素, 在不同浓度的酶溶液中进行酶的固定化反应, 所得的固定化酶的活力都随着酶浓度的增加而增大. 当酶浓度达到 20 mg/mL 时, 固定化酶的活力达到最大, 酶浓度的增

加对固定化酶的活力变化影响不大 (图 1). 实验结果还表明, 无论在那种酶溶液中进行酶的固定化反应, 两步法所得的固定化酶活力远高于一步法所得的固定化酶活力. 酶浓度在 20 mg/mL 时, 两步法所得的固定化酶活力为 104 U/g, 而一步法所得的固定化酶活力仅为 49 U. 这种实验现象的解释是: 用一步法活化的载体用于酶的固定化时, 反应必须在碱性条件下进行 (pH 8.5), 较长时间固定化反应会使酶分子大幅度的变性失活; 而用两步法活化的载体用于酶的固定化时, 固定化反应对酸碱条件没有任何要求, 可选择能使酶稳定的 pH 值 (7.2) 下进行固定化反应, 固定化过程中酶活力的损失会大为减小; 其次, 一步法所得的固定化酶, 酶分子直接连接在载体上, 大分子底物蛋白质要接近酶分子的活性中心要克服载体造成的较大空间位阻, 两步法所得的固定化酶, 酶分子通过 9 个原子组成的长臂连接在载体上, 载体造成的空间位阻要小得多<sup>[6]</sup>.

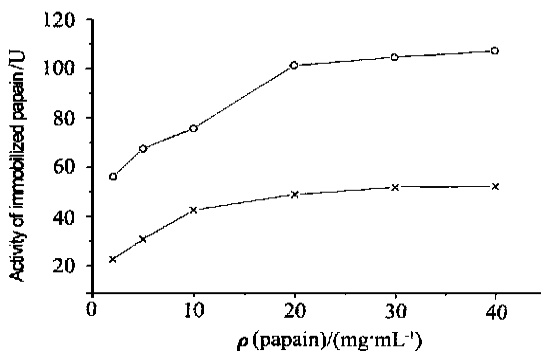


图 1 木瓜蛋白浓度对固定化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of papain concentration on activity of immobilized papain (1g support)  
○—○: immobilized papain prepared by two-step activation method;

×—×: immobilized papain by one-step activation method

### 2.2 pH 值对固定化酶活力的影响

取 0.2 g 固定化酶, 在不同 pH 介质中测定其活力. 实验结果表明, 无论是一步法所得的固定化酶, 还是两步法所得的固定化酶, 最适 pH 均为 6.0~7.0, 2 种固定化方法对所得固定化酶最适 pH 影响不. 溶液酶的是适 pH 为 6.5~7.5 (图 2).

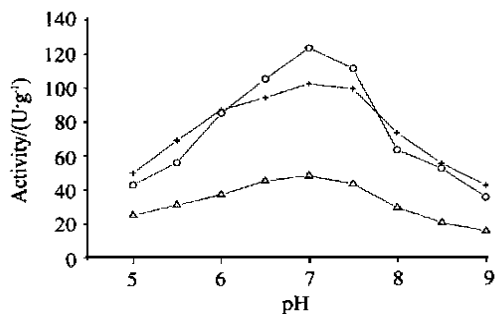


图2 pH值对固定化酶及溶液酶的活力影响

Fig. 2 Effect of pH on activity of immobilized and soluble papain

—+—+: immobilized papain prepared by two-step activation method;

△—△: immobilized papain by one-step activation method;

○—○: for soluble papain

○—○: for soluble papain

### 2.3 固定化酶的热稳定性

取0.2 g 固定化酶在不同温度的 pH 7.2 的磷酸缓冲液中悬浮振荡 1 h, 然后测定酶活力. 以未作处理的固定化酶作为参照. 实验结果表明(图 3), 2 种固定化方法所得固定化酶的热稳定性都有显著提高, 在温度 65 °C 处理 1 h, 2 种酶活力均保持在 58% 以上, 而溶液酶的活力则低于 30%.

通过两步活化微晶纤维素进行木瓜蛋白酶的固定化, 由于反应条件温和, 所得的固定化酶活力较高. 由于微晶纤维素具有良好的柱层析性能, 由这种方法固定适当的生物配体, 可用于亲和柱层析. 从理论上讲, 本文所涉及的方法也可用于其它富含羟基的载体的活化.

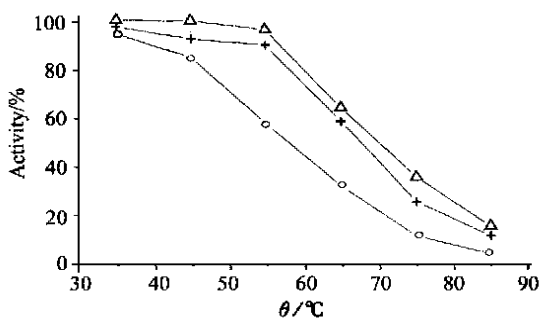


图3 固定化酶和溶液酶的热稳定性

Fig. 3 Thermal stability of immobilized and soluble papain

—+—+: immobilized papain prepared by two-step activation method;

△—△: immobilized papain prepared by one-step activation method;

○—○: soluble papain

### 参考文献:

- [1] FABER K. Biotransformation in organic chemistry[M]. 3rd edition. New York: Springer-Verlag, 1997. 345.
- [2] MARCH S C, PARIKH I, CUATRECASAS P A. Simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography[J]. Anal Biochem, 1974, 60: 149.
- [3] SUCKLING C J. Immobilized enzymes[J]. Chem Soc Rev, 1977, 6: 215.
- [4] SPECTER P K. Refinement of Coomassie blue method of protein quantitation[J]. Anal Biochem, 1978, 86: 142.
- [5] 徐采凤, 李雪苹, 程京燕. 壳聚糖固定化木瓜蛋白酶研究[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(5): 608.
- [6] OSTROVE S. Affinity chromatography: general methods[J]. Methods enzymol, 1990, 182: 357.

## Activation of Microcrystalline Cellulose by Two-step Method and Its Use in Immobilization of Papain

GUO Gang jun, MA Lin, XIE Wen lin, CHEN Guo xiong, GU Lian quan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Immobilized papain was prepared using microcrystalline cellulose as support which was activated by two-step method. The microcrystalline cellulose was first activated with *p*-toluenesulfonyl chloride, followed by coupling with ethyl diamine. After treated with glutaraldehyde, papain was immobilized to the support. Immobilized papain was obtained with activity 103 U/g support and high stability.

**Keywords:** immobilization; microcrystalline cellulose; papain