

菠萝蛋白酶的固定化及表面活性剂对其活性影响的研究

梁 雪

西安培华学院 陕西西安 710125

摘要:目的: 基于菠萝蛋白酶的固定化和表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响为基础, 探索菠萝蛋白酶的固定化和表面活性剂的优缺点。方法: 本文对固定化方式: 吸附法、交联法以及包埋法等对菠萝蛋白酶的活性的影响进行研究; 同时对表面活性剂: 阳离子表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、阴离子表面活性剂十六烷基硫酸钠 (SDS)、非离子表面活性剂辛基苯基聚氧乙烯醚 (Tx-100) 等不同表面活性剂对菠萝蛋白酶的活性的影响。在试验后, 测量和统计菠萝蛋白酶的活性, 并展开对比和分析。结果: 不同固定化方式对菠萝蛋白酶的活性的影响不同, 包埋法对菠萝蛋白酶的活性影响最小, 吸附法次之, 交联法菠萝蛋白酶的活性最低, $P < 0.05$; 表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响试验结果显示, 阳离子和非离子表面活性剂能够提高菠萝蛋白酶的活性, 而阴离子会降低菠萝蛋白酶的活性。结论: 菠萝蛋白酶的活性受到不同的固定化方式和表面活性剂的影响, 采用包埋法下的菠萝蛋白酶活性最好, 而选择阳离子和非离子表面活性剂下的菠萝蛋白酶活性最好。

关键词: 菠萝蛋白酶; 固定化; 表面活性剂; 活性影响; 研究

前言

菠萝蛋白酶 (Bromelain) 是一种浅黄色蛋白水解酶, 分布在菠萝植株的果、茎和叶之中。菠萝蛋白酶在医药领域、食品领域得到广泛应用, 其在医药领域能够在各种炎症疾病中发挥作用, 在食品领域能够发挥食品添加剂的作用, 使得食品的质量得到优化^[1]。菠萝蛋白酶的活性受到其固定化量和表面活性剂的影响, 不同的固定化方式条件不同, 引起酶的变形或者失活以及对酶的活力的固定化程度也不同, 不同的表面活性剂在保持酶的活性方面的作用也不同。基于此, 本文基于菠萝蛋白酶的固定化和表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响为基础, 吸附法、交联法以及包埋法等对菠萝蛋白酶的活性的影响进行研究; 同时对表面活性剂: 阳离子表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、阴离子表面活性剂十六烷基硫酸钠 (SDS)、非离子表面活性剂辛基苯基聚氧乙烯醚 (Tx-100) 等不同表面活性剂对菠萝蛋白酶的活性的影响, 探索菠萝蛋白酶的固定化和表面活性剂

的优缺点, 现报道如下。

一、材料和方法

(一) 实验材料

取 10mg/mL 来自北京科奥生物科技有限公司的菠萝蛋白酶、0.6% 酪蛋白、0.1mol/L 的氢氧化钠、0.4mol/L 的三氯乙酸、0.4mol/L 的碳酸钠溶液、盐酸、福林酚试剂、磷酸缓冲液、烧杯、离心管、离心机、试管、试管架、电子天平、分光光度计、恒温水浴锅、一次性手套若干。

(二) 研究方法

1. 固定化对菠萝蛋白酶活性的影响

(1) 吸附法: 将菠萝蛋白酶液和具有活泼表面的硅藻土接触, 再采用洗涤剂除去未吸附的酶, 即获得固定化酶; (2) 交联法: 采用吸附交联法, 先将菠萝蛋白酶吸附再硅胶上, 再采用戊二醛进行交联; (3) 包埋法: 将菠萝蛋白酶包埋在聚丙烯酰胺之中。将悬浮在缓冲液中的菠萝蛋白酶和丙烯酰胺单体和交联剂充分混合后, 再加入聚合催化系统进行聚合, 即可再酶分子周围获得交联的高聚物网络。

2. 表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响

将菠萝蛋白酶分别置于以下三种表面活性剂中: 阳离子表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、阴离子表面活性剂十六烷基硫酸钠 (SDS)、非离子表面活性剂辛基苯基聚氧乙烯醚 (Tx-100), 再处理 10min 后对其活性进行测量。

课题项目: 陕西省教育厅专项科研项目“菠萝蛋白酶的固定化及表面活性剂对其活性影响的研究” (20JK0822)

作者简介: 梁雪 (1994-12-), 女, 汉族, 山西省吕梁市文水县, 西安培华学院, 研究生, 助教, 研究方向: 天然药物化学。

3. 菠萝蛋白酶活性的测量方法

通过对既往菠萝蛋白酶活性测量的方法进行改进, 采用以下方式进行菠萝蛋白酶活性的测量: 将每组处理后的菠萝蛋白酶采用加样器将上层 1mL 的上清液取出, 再与 5mL 的碳酸钠溶液混合与试管内, 均分别加入 1mL 福林酚, 再将其放入到冷水中, 将溶液的上层清液放到 700nm 的波长下对其吸光值 A 进行测定。

(三) 观察指标

统计三组不同固定化方式: 吸附法、交联法以及包埋法等对菠萝蛋白酶的活性; 以及三组表面活性剂: 阳离子表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、阴离子表面活性剂十六烷基硫酸钠 (SDS)、非离子表面活性剂辛基苯基聚氧乙烯醚 (Tx-100) 等处理后菠萝蛋白酶的活性, 并展开对比和分析。

(四) 统计学处理

使用 SPSS 26.0 进行数据分析, 其中计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现, 而比较则采取 t 检验; 计数数据则以百分比 (%) 的形式展示, 并通过 χ^2 检验进行对比。在 p 值小于 0.05 时, 差异具有统计学上的意义。如果是等级资料, 则采用等级秩和检验; $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有非常显著性差异, 均具有统计学意义; $P > 0.05$ 为无显著性差异, 无统计学意义。

二、结果

(一) 不同固定化对菠萝蛋白酶活性的影响比较

不同固定化对菠萝蛋白酶活性的影响结果比较结果见表 1。不同的固定化方法下对菠萝蛋白酶活性的影响不同。其中, 包埋法固定法下, 菠萝蛋白酶活性为 (0.66 ± 0.09) , 其次, 吸附法固定化下, 菠萝蛋白酶活性为 (0.41 ± 0.06) , 交联法固定化下, 菠萝蛋白酶活性为 (0.34 ± 0.04) 。

表 1 不同固定化对菠萝蛋白酶活性 (吸光值) 的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1	2	3	平均值
吸附法	0.419	0.392	0.421	0.41 ± 0.06
交联法	0.362	0.332	0.336	0.34 ± 0.04
包埋法	0.671	0.641	0.667	0.66 ± 0.09
t	2.210	3.062	3.781	4.078
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

(二) 不同表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响比较

不同表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响结果比较结果见表 2。不同的表面活性剂下对菠萝蛋白酶活性的影响不同。其中, CTAB 表面活性剂下, 菠萝蛋白酶活性为 (0.50 ± 0.03) , 其次, 阴离子 Tx-1000 表面活性剂下, 菠

萝蛋白酶活性为 (0.50 ± 0.01) , SDS 表面活性剂下, 菠萝蛋白酶活性为 (0.21 ± 0.04) 。

表 2 不同表面活性剂对菠萝蛋白酶活性 (吸光值) 的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1	2	3	平均值
CTAB	0.521	0.482	0.501	0.50 ± 0.03
SDS	0.212	0.225	0.206	0.21 ± 0.04
Tx-100	0.489	0.502	0.513	0.50 ± 0.01
t	1.782	2.078	2.783	2.067
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

三、讨论

菠萝蛋白酶是一种通过对菠萝的果肉、茎、叶等部位进行处理后, 提取出来的生物催化剂, 其是一种天然的催化剂, 颜色表现为白色、浅棕黄色, 可溶于水, 不溶于乙醇。其能够对蛋白质、酰胺以及脂类等进行分解^[2]。质量最佳的菠萝蛋白酶是从菠萝的茎中提取出来的, 经过超滤, 低温冷冻、干燥等方式获得。菠萝蛋白酶用于食品添加剂可在嫩滑肉质、使啤酒澄清、水解蛋白的生产等方面发挥重要的作用; 在医学领域中, 菠萝蛋白酶可发挥水解生物体内的溶解纤维蛋白、血凝块的作用, 同时对生物体正常的组织无害, 进而被应用在治疗炎症、水肿等临床上。同时作为一种酶, 其具有生物催化剂的作用, 且催化作用非常高效。但是酶的活性受到其稳定性的影响, 使其很容易失活, 一旦菠萝蛋白酶的某些位点发生反应就会降低酶的活性, 导致失效。因此, 确保菠萝蛋白酶的生物稳定性, 保障菠萝蛋白酶使用的有效性, 是提高菠萝蛋白酶生物应用价值的关键所在。目前提高和保障菠萝蛋白酶的手段有固定化技术和表面活性剂的添加。固定化技术包括吸附法、交联法以及包埋法等, 固定化技术不是使得单个酶的活性发生改变, 而是将酶活性位点展示到同一个方向, 进而使得酶的活性位点在同一方向, 提高去和底物进行反应的效率, 进而提高群体效应, 提高菠萝蛋白酶的活性^[3]; 同时在对菠萝蛋白酶进行固定化后, 使得菠萝蛋白酶的稳定性有所上升, 固定化后酶分子结构性增加, 进而预防酶分子变形, 减少了自降解酶的机会。但是, 酶在固定化后, 酶分子中的氨基残基和载体相结合, 导致部分酶失去活性, 同时和载体结合后酶与底物结合后, 产物扩散, 进而出现位阻效应。因此, 在固定化的过程中, 在构象效应得影响下, 出现无法结合底物得情况, 使得固定化后得酶得活性反而比游离得酶活性更低。因此, 如何保障固定化的有效性是非常关键的。而表面活性剂是一类较为复杂的化学物质, 被广泛应用在液体、粉末等化学领域,

能够有效发挥分散、稳定的功效,进而使得酶的活性得到稳定。因此,本文对菠萝蛋白酶的固定化和表面活性剂对其活性的影响进行研究,探索不同的菠萝蛋白酶的固定化和表面活性剂的优缺点,为提高菠萝蛋白酶的活性提供证据。

本次试验研究结果显示,不同的固定化方法下对菠萝蛋白酶活性的影响不同。其中,包埋法固定法下,菠萝蛋白酶活性为 (0.66 ± 0.09) ,其次,吸附法固定化下,菠萝蛋白酶活性为 (0.41 ± 0.06) ,交联法固定化下,菠萝蛋白酶活性为 (0.34 ± 0.04) 。由此可见,不同固定化方式对菠萝蛋白酶的活性的影响不同,包埋法对菠萝蛋白酶的活性影响最小,吸附法次之,交联法菠萝蛋白酶的活性最低, $P < 0.05$ 。究其原因在于,包埋法是一种将菠萝蛋白酶用物理的方法包埋在各种载体内,通过将菠萝蛋白酶溶液和聚合物的单体进行混合的方式,在聚合助进剂的促进下实现物质之间的聚合,这是一种常应用在小分子酶的固定化中的方式。其优点在于,在包埋法下,能够不同酶蛋白氨基酸残基发生反应,也几乎不改变菠萝蛋白酶的高级结构,使得菠萝蛋白酶的活性回收率非常高。在本次试验中,结果显示,包埋法的固定化作用效果更好;吸附法是一种借助吸附剂的帮助将菠萝蛋白酶吸附在其表面进行固定化的方式,这种固定化方式是借助带电的酶或者细胞与载体之间存在的静电作用,进而使得菠萝蛋白酶能够吸附在惰性固体表面。最常用的吸附剂是硅藻土,且具有操作简单,条件温和,且不会导致酶发生变形或者失活的情况出现,因此酶活力损失较少。但是其缺点在于菠萝蛋白酶与吸附体之间的结合力较弱,吸附容易解开。因此,在本次试验中,吸附法的固定化效果较好,但是次于包埋法;交联法是一种通过双功能试剂或者多功能试剂进行酶分子之间交联,进行形成共价键,提高固定化酶活性的方式^[4]。其优点在于戊二醛的两个醛基能够和菠萝蛋白酶的游离氨基发生反应,实现酶蛋白的交联,且不需要载体进行交联。但是其具有以下缺点:第一,在物质之间作用过程中,反应较为剧烈,酶分子多个基团发生交联,导致菠萝蛋白酶活性损失较大;第二,需要制备的固定化菠萝蛋白酶的颗粒较小,使得使用和操作不便捷^[5]。因此,在本次试验中,交联法的固定化酶活性最低。

其次,本次试验结果显示,不同的表面活性剂下对菠萝蛋白酶活性的影响不同。其中,CTAB表面活性剂下,菠萝蛋白酶活性为 (0.50 ± 0.03) ,其次,阴离子Tx-1000表面活性剂下,菠萝蛋白酶活性为 (0.50 ± 0.01) ,SDS表面活性剂下,菠萝蛋白酶活性为 (0.21 ± 0.04) 。可见,

表面活性剂对菠萝蛋白酶活性的影响试验结果提示,阳离子和非离子表面活性剂能够提高菠萝蛋白酶的活性,而阴离子会降低菠萝蛋白酶的活性。究其原因在于,表面活性剂同菠萝蛋白酶结合会对菠萝蛋白酶产生影响,导致出现酶构象的变化出现,进而对其表面的活性和稳定性产生影响。而阳离子表面活性剂可使得菠萝蛋白酶的酶构象更为稳定,进而提高菠萝蛋白酶的活性;非离子活性剂与菠萝蛋白酶结合后,会使得菠萝蛋白酶粗酶的活性得到提高;而阴离子表面活性剂会对菠萝蛋白酶的活性造成抑制。在本次试验中,阳离子CTAB表面活性剂菠萝蛋白酶活性最高,阴离子Tx-1000表面活性剂下菠萝蛋白酶活性与阳离子相似,而在阴离子,SDS表面活性剂下菠萝蛋白酶活性最低。因此,菠萝蛋白酶的活性受到不同的固定化方式和表面活性剂的影响,采用包埋法下的菠萝蛋白酶活性最好,而选择阳离子和非离子表面活性剂下的菠萝蛋白酶活性最好^[6]。

综上所述,菠萝蛋白酶在食品领域、医疗领域的应用价值较高,同时其的生物不稳定性和活性的稳定受到社会各界的广泛关注。固定化和表面活性剂添加法是保障菠萝蛋白酶活性稳定性的常见手段,但是不同的固定化手段和表面活性剂添加的方法,都会导致固定化酶的活性不同。在本次试验中研究结果显示,菠萝蛋白酶活性最佳的固定化方式为包埋法,其次为吸附法,最差为交联法。但是,包埋法固定化菠萝蛋白酶的活性回收率非常高,这是其优点,但是因包埋法只适用于小分子底物和产物酶的固定化中,因此也存在局限性。表面活性剂添加显示,阳离子和非离子下菠萝蛋白酶活性的活性得到提高,而在阴离子表面活性剂下菠萝蛋白酶活性的活性受到抑制。

参考文献

- [1] 易元龙,李媚,谢涛,等.菠萝果浸提取液中菠萝蛋白酶的稳定性研究.广西民族大学学报(自然科学版).2008,14(4):76-78
- [2] 胡丽娟.提取菠萝蛋白酶工艺的研究[J].陕西林业科技.2009,(3):20-21,25
- [3] 贾峰,郑连炳,王志强.生物酶固定化技术研究现状[J].资源节约与环保,2020(4),116.
- [4] 刘茹,焦成瑾,杨玲娟,等.酶固定化研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(5):1861-1869.
- [5] 张璟,高兵兵,何冰芳.生物催化剂中的酶固定化研究进展[J].生物加工过程,2022,20(1):9-19.
- [6] 侯向华.醋酸纤维素微球的制备及吸附菠萝蛋白酶的研究[D].广西民族大学,2017.