

不同疏水参数有机溶剂中木瓜蛋白酶及其 固定化酶活性的变化

何 平, 黄家乐, 史清翠, 巫光宏, 初志战, 黄卓烈

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

[摘 要] **【目的】**探寻疏水参数($\log P$)不同的有机溶剂对木瓜蛋白酶及其固定化酶活性的影响。**【方法】**制备固定化木瓜蛋白酶,在疏水参数不同($\log P = -1.30, -1.10, -0.76, -0.33, -0.24, 0.28, 0.49, 0.68, 0.80, 1.31, 1.80, 2.0, 2.5, 3.5$ 和 5.0)的 15 种有机溶剂及其不同体积分数($\varphi = 5\%, 10\%, 15\%, 20\%, 25\%, 30\%, 35\%, 40\%, 50\%, 60\%$ 和 70%)的溶液中,测定木瓜蛋白酶及其固定化酶的活性,以不含相应有机溶剂的 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液或 Tris-盐酸缓冲液为对照,分析不同有机溶剂及其体积分数对酶活性的影响。**【结果】**在低疏水参数($\log P \leq -0.24$)的有机溶剂中,有机溶剂二甲基亚砜、1,4-二氧六环和乙腈具有在低体积分数($\varphi \leq 10\%$)下,激活木瓜蛋白酶及其固定化酶活性的特性,有机溶剂甲醇、乙醇虽然在低体积分数($\varphi \leq 10\%$)下不能激活木瓜蛋白酶及其固定化酶活性,但其活性与对照($\varphi = 0$)相当;低疏水参数有机溶剂在高体积分数($\varphi \geq 30\%$)下抑制酶活。当有机溶剂的疏水参数为 $0.28 \sim 1.31$ 时,其对木瓜蛋白酶及其固定化酶活性有显著抑制作用。在有机溶剂疏水参数较高($\log P \geq 1.80$)条件下,低体积分数($\varphi \leq 10\%$)时酶活性下降较慢,超过一定体积分数($\varphi \geq 30\%$)后,酶活性开始升高。**【结论】**低 $\log P$ ($\log P \leq -0.24$)有机溶剂在低体积分数($\varphi \leq 10\%$)时可激活或稳定木瓜蛋白酶及其固定化酶活性,而在高体积分数($\varphi \geq 30\%$)时对酶活有抑制作用;中 $\log P$ ($0.28 \leq \log P \leq 1.31$)有机溶剂对木瓜蛋白酶及其固定化酶活性具有显著抑制作用;高 $\log P$ ($\log P \geq 1.80$)有机溶剂在低体积分数($\varphi \leq 10\%$)时抑制木瓜蛋白酶及其固定化酶活性,但在高体积分数($\varphi \geq 30\%$)时酶活性升高。

[关键词] 木瓜蛋白酶;固定化酶;有机溶剂;疏水参数;酶活性

[中图分类号] Q556⁺.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)03-0223-07

Enzyme activity changes of papain and immobilized papain in organic solvents with different $\log P$ values

HE Ping, HUANG Jia-le, SHI Qing-cui,

WU Guang-hong, CHU Zhi-zhan, HUANG Zhuo-lie

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: **【Objective】** The aim of this paper was to study the effect of organic solvents with different $\log P$ values on enzyme activity papain and immobilized papain. **【Method】** Immobilization of papain on sodium alginate-chitosan and nylon cloth were prepared. Enzyme activity of papain and immobilized papain were determined in 15 kinds of organic solvents with different $\log P$ values ($\log P = -1.30, -1.10, -0.76, -0.33, -0.24, 0.28, 0.49, 0.68, 0.80, 1.31, 1.80, 2.0, 2.5, 3.5$ and 5.0) and volume fractions ($5\%, 10\%, 15\%, 20\%, 25\%, 30\%, 35\%, 40\%, 50\%, 60\%$ and 70%), the effect of enzyme activity in different organic solvents and volume fractions were analyzed by taking pH 7.2 Tris-hydrochloric acid buffer or pH 7.2

* [收稿日期] 2008-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(10074016);广东省自然科学基金项目(7006655);广东省科技计划项目(2008B011000006)

[作者简介] 何 平(1967—),男,安徽枞阳人,副教授,博士,主要从事酶学研究。

[通信作者] 黄卓烈(1950—),男,广东廉江人,教授,博士生导师,主要从事酶学研究。

phosphate buffer without corresponding organic solvents as comparison. 【Result】 The results showed that in lower $\log P$ values($\log P \leq -0.24$) and lower volume fractions($\varphi \leq 10\%$) of the added organic solvents, enzyme activity of papain and immobilized papain was activated by some organic solvents(e. g. dimethyl sulfoxide, 1,4-dioxane and acetonitrile), and it was observed in higher volume fractions($\varphi \geq 30\%$) of organic solvents($\log P \leq -0.24$) that the enzyme retained their activity in some organic solvents(e. g. methanol and ethanol), but decreased in their activity. In organic solvents with $\log P$ values between 0.28 and 1.31, a dramatic reduction in their activity was observed. In organic solvents with higher $\log P$ values ($\log P \geq 1.80$), it was observed at higher volume fractions ($\varphi \geq 30\%$) enzyme activity decreased slowly in lower volume fractions($\varphi \leq 10\%$), but increased in the activity of the enzyme. 【Conclusion】 Enzyme activity of papain and immobilized papain were activated or stabilized in lower $\log P$ values($\log P \leq -0.24$) and lower volume fractions($\varphi \leq 10\%$) of the added organic solvents, but a reduction in their activity was observed in higher volume fractions($\varphi \geq 30\%$) of organic solvents. In organic solvents with middle $\log P$ values ($0.28 \leq \log P \leq 1.31$) enzyme activity decreased remarkably. In organic solvents with higher $\log P$ values ($\log P \geq 1.80$), it was observed at higher volume fractions($\varphi \geq 30\%$) enzyme activity decreased in lower volume fractions($\varphi \leq 10\%$), but increased in the activity of the enzyme.

Key words: papain; immobilized enzyme; organic solvent; $\log P$; enzyme activity

近年来,针对非水酶学的研究十分活跃,显示了有机溶剂中酶的巨大应用潜力^[1-5]。大量研究结果表明,酶在有机介质中的催化反应有很多优点,为许多重大理论的研究提供了新的方法和手段^[6-8]。如在低水环境中,可用于稳定具有未知催化性质的构象异构体及在水中寿命极短的酶反应中间体,这有利于弄清酶反应机理;利用非水体系可以精确地控制蛋白质分子表面的含水量,以研究水分子与蛋白质结构和功能的关系等。但目前尚没有很好的理论预测反应介质的选择,仅粗略地参考有机溶剂的疏水参数 $\log P$ (P 为一种溶剂在正辛醇和水两相体系中的分配系数)来选择反应介质^[9-10]。

有关学者较为详细地研究了有机溶剂对酶活的抑制作用及低体积分数的有机溶剂对酶的激活作用等^[11-13],但尚未见关于不溶性有机溶剂中酶活性变化的报道,也没有对疏水参数不同的有机溶剂及其不同体积分数下酶及其固定化酶活性的变化、及这些因素相互关系的系统研究。为此,本研究就不同体积分数、不同疏水参数的有机溶剂在单相共溶剂体系(水/水溶性溶剂)或水-有机溶剂两相体系中,对木瓜蛋白酶(papain, PA)及其固定化木瓜蛋白酶(Immobilized papain, IPA)活性的影响进行了详细研究,以为有机溶剂中酶的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

部分纯化的木瓜蛋白酶粗酶由广西热带作物研

究所提供;尼龙布(0.147 mm, 100 目)和壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$)购于试剂公司;酪蛋白,美国 Sigma 公司产品。本试验所用的 15 种有机溶剂——二甲基亚砷、1,4-二氧六环、甲醇、乙腈、乙醇、丙醇、四氢呋喃、乙酸乙酯、丁醇、戊醇、己醇、苯、甲苯、环己烷和十二醇的 $\log P$ 依次为 $-1.30, -1.10, -0.76, -0.33, -0.24, 0.28, 0.49, 0.68, 0.80, 1.31, 1.80, 2.0, 2.5, 3.5$ 和 5.0 ^[14],均为国产分析纯试剂。

1.2 研究方法

1.2.1 有机溶剂中木瓜蛋白酶(PA)活性的测定
取 0.2 mL (1 g/L) PA 溶液,加入 0.25 mL 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,内含 36 mmol/L 半胱氨酸和 0.6 mmol/L EDTA)和 2.3 mL 有机溶液,用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液配制,使反应体系中有有机溶剂的体积分数分别达到 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% 和 70%,于 37 °C 下预热 10 min,加入 37 °C 预热的 10 g/L 酪蛋白溶液 0.5 mL,准确反应 10 min(可溶性有机溶剂如二甲基亚砷、1,4-二氧六环、甲醇、乙腈、乙醇、丙醇、四氢呋喃等,于恒温水浴振荡反应,160 次/min;不溶性有机溶剂如乙酸乙酯、丁醇、戊醇、己醇、苯、甲苯、环己烷、十二醇等,水浴搅拌机搅拌反应,250 r/min)后,加入 1.0 mL 200 g/L 三氯乙酸溶液终止酶反应。过滤,取其上清液于波长 275 nm 处测定消光值。以不含相应有机溶剂的 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液为对照(CK)。每项试验设 3 个重复,测定 2 次取平均值,下同。以 37 °C 下,

PA 水解酪蛋白时每 min 产生 1 μg 酪氨酸的酶量定义为 1 个酶活性单位(U),下同。

1.2.2 海藻酸钠-壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的制备及其在有机溶剂中酶活性的测定 海藻酸钠-壳聚糖固定化木瓜蛋白酶(Immobilized papain on sodium alginate-chitosan, IPSAC)的制备参考郑婉玲等^[15]的方法并有所改进。称取 2 g 海藻酸钠溶于 100 mL 0.1 mol/L pH 7.2 的 Tris-盐酸缓冲液中,再加入 1 g 壳聚糖粉末,微波炉加热至 80 $^{\circ}\text{C}$ 左右并搅拌均匀,冷却至 40 $^{\circ}\text{C}$ 左右,加入 PA 粉末,搅拌均匀。将此混合液缓慢滴入 0.5 mol/L 氯化钙溶液中形成小球,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱下 30 min。使用前用蒸馏水洗涤 3 次,用粗滤纸吸干。

取 1 g IPSAC,加入 0.25 mL 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 Tris-盐酸缓冲液,内含 36 mmol/L 半胱氨酸和 0.6 mmol/L EDTA)和 2.5 mL 有机溶剂,用 0.1 mol/L pH 7.2 Tris-盐酸缓冲液进行配制,使反应体系的有机溶剂体积分数分别达到 5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,50%,60%和 70%,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 10 min,加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 10 g/L 酪蛋白溶液 0.5 mL,准确反应 10 min(对可溶性有机溶剂,如二甲基亚砜、1,4-二氧六环、甲醇、乙腈、乙醇、丙醇、四氢呋喃等,恒温水浴 160 次/min 振荡反应;不溶性有机溶剂,如乙酸乙酯、丁醇、戊醇、己醇、苯、甲苯、环己烷、十二醇等,水浴搅拌器搅拌反应,250 r/min),然后加入 1.0 mL 200 g/L 三氯乙酸溶液终止酶反应。过滤,取其上清液于波长 275 nm 处测定消光值。以不含相应的有机溶剂的 Tris-盐酸缓冲液为对照(CK)。

1.2.3 尼龙布固定化木瓜蛋白酶的制备及其在有机溶剂中酶活性的测定 尼龙布固定化木瓜蛋白酶(Immobilized papain on nylon cloth, IPN)制备参考徐凤彩等^[16]的方法进行。取尼龙布(3 cm $\times$ 3 cm)洗净,晾干;用含 186 g/L CaCl_2 和 186 mL/L 水的甲醇溶液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 10 s 左右,并轻轻搅拌至尼龙布发粘,取出用水冲去污物,用吸水纸吸干;尼龙布用 3.5 mol/L HCl 于室温水解 45 min,用蒸馏水洗至 pH 中性,再用体积分数 5%戊二醛在室温下浸泡偶联 20 min;取出尼龙布,用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液反复冲洗去除多余的戊二醛,吸干,立即用酶液(酶液用量为每块布 1 mL)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 3.5 h;从酶液中取出尼龙布,用 0.5 mol/L NaCl (用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液配制)洗去多余的酶蛋白,即得 IPN。

取一块固定化木瓜蛋白酶的尼龙布,加入 0.25 mL 激活剂(0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,内含 36 mmol/L 半胱氨酸和 0.6 mmol/L EDTA)和 2.5 mL 有机溶剂,用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液配制,使反应体系中有有机溶剂的体积分数分别达到 5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,50%,60%和 70%,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 10 min,加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 10 g/L 酪蛋白溶液 0.5 mL,准确反应 10 min(可溶性有机溶剂,如二甲基亚砜、1,4-二氧六环、甲醇、乙腈、乙醇、丙醇、四氢呋喃等,恒温水浴振荡反应,160 次/min;不溶性有机溶剂,如乙酸乙酯、丁醇、戊醇、己醇、苯、甲苯、环己烷、十二醇等,水浴搅拌器搅拌反应,250 r/min),然后加入 1.0 mL 200 g/L 三氯乙酸溶液终止酶反应。过滤,取其上清液于波长 275 nm 处测定消光值。以不含相应有机溶剂的 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液为对照(CK)。

1.2.4 数据统计与分析 用 SAS(statistic analysis system)软件分析酶活性差异显著性。

2 结果与分析

2.1 低疏水参数($\log P \leq -0.24$)有机溶剂对 PA 及其 IPA 活性的影响

从表 1 可以看出,二甲基亚砜、1,4-二氧六环、乙腈在低体积分数($\varphi \leq 10\%$)时,对 PA 及其 IPA 活性有激活作用,酶活性较对照(CK)有所升高。随着二甲基亚砜、1,4-二氧六环、乙腈体积分数的进一步升高,PA 及 IPA 的活性呈下降趋势。方差分析发现,二甲基亚砜体积分数为 10%时,IPSAC 和 IPN 的活性与对照(CK)相比差异显著;1,4-二氧六环的体积分数为 5%,10%,15%及乙腈的体积分数为 5%,10%时,PA、IPSAC、IPN 活性与对照差异显著。对甲醇、乙醇而言,在低体积分数($\varphi \leq 10\%$)时,PA 及其 IPA 活性与对照基本相当;随着甲醇、乙醇体积分数的进一步提高,PA 及其 IPA 活性逐渐降低。

由以上分析可以看出,在 $\log P$ 较低($\log P \leq -0.24$)的有机溶剂中,有机溶剂二甲基亚砜、1,4-二氧六环和乙腈具有在低体积分数下激活 PA 及 IPA 活性的特性,有些有机溶剂如甲醇、乙醇虽然在低体积分数下不激活 PA 及其 IPA 活性,但其活性与对照相当。

2.2 中疏水参数($0.28 \leq \log P \leq 1.31$)有机溶剂对 PA 及其 IPA 活性的影响

从表 2 可以看出,随着丙醇、四氢呋喃体积分数

的逐渐升高,PA 及其 IPA 的活性逐渐降低,且降低幅度加快。对乙酸乙酯而言,在低体积分数时,PA 及其 IPA 活性下降较快,但当其体积分数超过 30% 时,酶活性虽开始升高,但仍低于对照(CK)中的酶

活性。随着丁醇、戊醇体积分数的逐渐升高,PA 及其 IPA 活性迅速下降。由此可见,当有机溶剂疏水参数为 0.28~1.31 时,其对 PA 及其 IPA 活性有显著抑制作用。

表 1 不同体积分数低 log*P* 有机溶剂对木瓜蛋白酶及其固定化酶活性的影响

Table 1 Effect of different volume fractions of organic solvents with lower log*P* values on activities of PA and IPA

有机溶剂 Organic solvent	酶 Enzyme	体积分数/% Volume fraction					
		0(CK)	5	10	15	20	25
二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	PA	34.12±0.62 ab	35.75±0.66 a	36.96±0.36 a	36.53±0.23 a	35.77±0.72 a	31.56±0.65 b
	IPSAC	27.29±0.44 bc	27.67±0.19 ab	28.56±0.11 a	26.48±0.18 c	25.46±0.80 d	23.59±0.71 e
	IPN	21.58±1.09 b	22.47±1.13 ab	23.35±0.16 a	22.50±0.11 ab	18.51±0.61 c	17.41±0.32 c
1,4-二氧六环 1,4-dioxane	PA	34.39±1.05 c	38.78±1.35 b	42.56±1.17 a	38.34±1.49 b	33.36±1.25 c	26.87±0.21 d
	IPSAC	25.76±0.79 c	28.58±0.84 b	32.03±0.68 a	28.98±0.79 b	25.92±0.89 c	20.76±1.19 d
	IPN	22.99±0.77 d	25.37±0.43 c	27.93±0.31 a	26.48±1.08 b	25.77±0.52 bc	25.04±0.51 c
甲醇 Methanol	PA	34.19±0.96 a	35.07±1.30 a	34.45±0.77 a	34.25±0.78 a	32.76±0.48 ab	30.66±2.59 b
	IPSAC	25.64±0.72 a	25.94±0.84 a	25.11±0.57 a	25.21±0.54 a	24.22±0.43 ab	23.44±1.62 ab
	IPN	22.91±0.64a	22.95±0.52 a	21.95±0.32 a	20.54±1.73 a	20.45±1.07 ab	16.77±0.96 ab
乙腈 Acetonitrile	PA	31.81±0.36 b	35.40±0.73 a	34.25±0.39 a	31.67±0.03 b	27.15±1.27 c	22.03±1.53 d
	IPSAC	24.16±0.16 dc	25.99±1.03 ab	26.02±0.06 a	24.36±0.09 bc	22.69±0.75 d	18.96±2.61 e
	IPN	21.93±0.25 c	25.41±1.96 a	23.92±0.38 b	23.47±0.07 b	23.07±0.42 bc	15.28±1.04 d
乙醇 Ethanol	PA	33.32±1.11 a	33.98±0.86 a	34.15±0.30 a	33.80±0.60 a	33.64±0.38 a	32.57±1.37 ab
	IPSAC	27.32±0.33 ab	27.15±0.39 ab	27.31±0.46 ab	27.31±0.24 ab	27.61±0.45 a	26.24±1.04 bc
	IPN	22.32±0.74 a	22.28±0.32 a	21.80±0.38 a	21.95±0.26 a	21.34±0.24 a	18.25±0.92 b

有机溶剂 Organic solvent	酶 Enzyme	体积分数/% Volume fraction					
		30	35	40	50	60	70
二甲基亚砜 Dimethyl sulfoxide	PA	26.35±1.17 c	26.18±2.61 c	22.59±1.89 d	20.77±0.35 d	16.51±0.32 e	13.05±0.43 f
	IPSAC	22.12±0.62 f	20.83±0.24 g	18.44±0.88 h	17.50±0.16 i	14.71±0.43 j	11.81±0.89 k
	IPN	17.31±2.32 c	14.37±0.41 d	13.62±0.23 d	11.91±0.39 e	6.66±0.91 f	6.09±0.71 f
1,4-二氧六环 1,4-dioxane	PA	26.22±0.28 de	25.17±0.69 de	24.63±0.69 e			
	IPSAC	19.56±0.36 d	19.28±0.43 e	18.45±0.51 e			
	IPN	22.07±0.53 d	18.54±0.14 e	18.09±0.19 e			
甲醇 Methanol	PA	30.53±1.60 b	25.03±1.43 c	23.94±2.64 c	23.90±2.56 c	17.26±2.97 d	13.37±3.08 e
	IPSAC	22.37±1.35 b	18.46±1.00 c	17.31±1.92 c	16.94±0.91 c	14.00±3.43 d	9.62±2.31 e
	IPN	16.04±1.77 b	16.01±1.72 c	11.56±1.99 c	9.10±2.06 c	8.96±0.97 d	6.72±0.43 e
乙腈 Acetonitrile	PA	20.45±0.60 e	11.72±0.57 f	9.20±0.64 g	1.80±0.55 h	0	0
	IPSAC	15.31±0.68 f	9.05±0.59 g	7.02±0.36 h	1.41±0.26 i	0	0
	IPN	14.20±0.41 d	8.27±0.39 e	6.56±0.43 f	1.52±0.38 g	0	0
乙醇 Ethanol	PA	31.10±0.72 b	28.74±0.16 c	25.01±0.42 d	24.57±1.08 d	18.98±3.57 e	16.48±1.14 f
	IPSAC	25.37±0.24 c	23.18±0.31 d	20.49±0.32 e	19.38±0.31 e	15.10±1.62 f	13.22±0.68 g
	IPN	17.27±0.48 b	15.68±0.11 c	13.18±0.28 d	11.59±0.79 e	9.15±2.39 f	7.47±0.76 g

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。无数据的空格是因为滤液混浊而无法测定。下表同。

Note:Data with different letters in the same column indicate remarkable differences($P<0.05$). The blanks in the table above show that the data were not determined by unclear filtrated solutions. The followings are the same.

2.3 高疏水参数(log*P*≥1.80)有机溶剂对 PA 及其 IPA 活性的影响

由表 3 可以看出,对有机溶剂己醇而言,在低体积分数时,PA 及其 IPA 活性下降较快,但体积分数超过 20%后,酶活性开始升高,但仍低于对照(CK)的酶活性。有机溶剂苯、甲苯、环己烷、十二醇中的情况与己醇的相似,不同的是超过一定体积分数($\varphi\geq30\%$)后,酶活性开始升高,并逐渐高于对照中

的酶活性。

由表 1~3 可以看出,随体积分数上升,供试的 15 种有机溶剂对 PA 和 IPA 活性的作用趋势不同,但就每一种有机溶剂而言,其对 PA 和 IPA 活性的作用趋势表现一致。方差分析结果表明,15 种有机溶剂在体积分数不同时,均对 PA 及其 IPA 的影响差异极显著。

表 2 不同体积分数中 log*P* 有机溶剂对木瓜蛋白酶及其固定化酶活性的影响

Table 2 Effect of different volume fractions of organic solvents with middle log*P* values on activities of PA and IPA

有机溶剂 Organic solvent	酶 Enzyme	体积分数/% Volume fraction					
		0	5	10	15	20	25
丙醇 Propanol	PA	34.75±0.32 a	34.91±0.34 a	28.30±1.19 b	23.62±0.52 c	21.88±0.50 d	17.51±0.66 e
	IPSAC	26.32±0.12 a	26.15±0.09 a	20.94±0.97 b	14.11±0.55 c	11.33±0.93 d	9.01±1.22 e
	IPN	20.94±0.97 a	20.85±1.54 a	18.57±0.72 b	18.31±1.02 b	14.91±1.23 c	11.01±0.51 d
四氢呋喃 Tetrahydrofuran	PA	33.32±1.11 a	32.96±0.45 a	30.58±0.37 b	26.18±0.46 c	18.25±0.39 d	10.87±0.93 e
	IPSAC	25.74±0.42 a	24.45±0.52 a	21.13±2.36 b	16.58±0.48 c	14.86±0.77 c	8.40±1.95 d
	IPN	22.01±0.45 a	20.82±0.71 a	17.71±0.58 b	15.41±0.45 c	13.28±0.30 d	7.89±0.24 e
乙酸乙酯 Ethyl acetate	PA	34.49±0.42 a	32.82±0.91 ab	31.73±0.51 b	28.00±1.92 c	18.94±0.96 e	15.71±1.43 f
	IPSAC	26.81±1.10 a	25.25±0.48 b	23.27±1.46 c	21.95±0.54 d	19.26±0.69 ef	16.92±0.37 hi
	IPN	23.11±0.28 a	21.99±0.61 ba	21.26±0.34 b	18.76±1.29 c	13.45±1.06 e	10.52±0.96 fg
丁醇 Butanol	PA	34.57±0.51 a	29.60±2.08 b	26.75±1.05 c	19.38±0.89 d	15.43±0.77 e	9.68±0.40 f
	IPSAC	26.65±0.17 a	23.03±1.19 b	19.38±0.89 c	15.43±0.77 d	12.49±0.27 e	7.85±0.30 f
	IPN	22.77±0.45 a	21.64±0.28 a	16.54±0.66 b	13.92±0.79 c	9.64±0.50 d	7.28±0.35 e
戊醇 Pentanol	PA	32.59±0.85 a	24.64±0.46 b	18.11±0.87 c	14.95±1.12 d	11.05±0.64 e	9.06±1.32 f
	IPSAC	25.06±0.64 a	19.02±0.35 b	14.06±0.66 c	11.66±0.85 d	8.70±0.48 e	7.19±1.01 f
	IPN	20.01±0.92 a	12.83±0.79 b	10.85±0.51 c	9.77±0.59 d	8.55±0.34 e	7.62±0.39 f
有机溶剂 Organic solvent	酶 Enzyme	体积分数/% Volume fraction					
		30	35	40	50	60	70
丙醇 Propanol	PA	14.91±1.23 f	6.47±0.20 g	3.39±0.43 h	0	0	0
	IPSAC	5.71±0.26 f	4.91±0.16 f	2.58±0.33 g	0	0	0
	IPN	8.59±0.28 e	6.35±0.53 f	2.16±0.32 g	0	0	0
四氢呋喃 Tetrahydrofuran	PA						
	IPSAC						
	IPN						
乙酸乙酯 Ethyl acetate	PA	13.70±1.39 f	14.41±1.29 f	14.14±0.86 f	15.23±1.15 f	21.02±2.18 e	23.78±2.08 d
	IPSAC	15.87±0.43 i	17.80±0.67 gh	17.94±0.63 gh	18.83±0.61 fg	19.63±1.08 ef	20.31±0.51 e
	IPN	9.18±0.93 g	10.91±0.28 f	11.64±0.99 f	11.62±0.36 f	13.70±1.39 e	15.71±1.43 d
丁醇 Butanol	PA	8.07±0.59 g	7.26±0.37 g	5.35±0.33 h	4.17±0.80 hi	2.74±0.42 ij	2.10±0.25 j
	IPSAC	6.65±0.44 g	6.04±0.28 g	4.18±0.25 h	3.25±0.63 h	2.13±0.32 i	1.64±0.19 i
	IPN	6.13±0.31 fe	5.51±0.36 f	4.05±0.12 g	3.45±0.33 g	2.98±0.27 hg	1.76±0.28 h
戊醇 Pentanol	PA	5.77±0.78 g	5.75±0.51 g	4.86±0.74 gh	5.00±1.07 gh	4.32±0.42 hi	3.05±0.40 i
	IPSAC	4.66±0.59 g	4.73±0.29 g	3.99±0.56 gh	3.83±0.67 gh	3.58±0.32 hi	2.62±0.30 i
	IPN	4.88±0.39 g	4.21±0.34 gh	3.53±0.45 h	3.39±0.12 h	2.48±0.30 i	2.16±0.18 i

表 3 不同体积分数高 log*P* 有机溶剂对木瓜蛋白酶及其固定化酶活性的影响

Table 3 Effect of different volume fractions of organic solvents with higher log*P* values on activities of PA and IPA

有机溶剂 Organic solvent	酶 Enzyme	体积分数/% Volume fraction					
		0(CK)	5	10	15	20	25
己醇 Hexanol	PA	32.90±1.42 a	27.53±1.28 de	27.41±0.57 de	26.79±1.28 de	24.83±1.65 f	25.66±0.95 fe
	IPSAC	23.58±0.87 a	22.12±0.69 b	20.03±0.23 cd	18.23±0.30 ef	15.75±0.61 g	16.24±0.52 g
	IPN	20.15±0.74 a	20.13±0.23 a	18.33±0.30 b	15.63±0.79 d	13.49±0.52 ef	12.74±0.17 f
苯 Benzene	PA	33.48±0.50 gh	32.67±0.70 h	32.47±0.62 h	31.18±0.53 i	33.34±0.42 gh	34.23±1.03 g
	IPSAC	26.16±1.21 d	25.53±0.94 de	22.08±0.54 f	21.64±0.96 f	22.55±0.93 f	22.79±0.51 f
	IPN	22.43±0.33 e	21.89±0.47 e	22.08±0.54 e	20.89±0.35 f	22.34±0.28 e	22.79±0.51 e
甲苯 Toluene	PA	33.84±0.25 ef	30.56±0.46 h	31.83±0.37 gh	33.06±0.14 fg	34.69±0.23 e	34.83±1.05 e
	IPSAC	26.60±0.36 fg	24.58±0.62 h	25.94±0.51 gh	25.96±0.70 gh	27.17±0.41 fg	27.60±0.46 ef
	IPN	22.23±0.21 g	21.04±0.27 h	22.62±0.19 g	23.71±0.30 f	23.95±0.23 f	25.14±0.12 e
环己烷 Cyclohexane	PA	34.89±1.68 ef	33.48±1.07 ef	32.81±1.11 f	33.84±0.19 ef	34.47±0.51 ef	36.10±0.64 de
	IPSAC	26.85±2.04 de	26.13±1.85 de	25.27±0.88 e	26.11±2.31 de	26.23±1.24 de	26.40±0.67 de
	IPN	24.46±1.09 fg	23.13±1.52 gh	22.23±0.79 h	23.62±0.51 fgh	25.53±0.37 ef	26.74±0.48 de
十二醇 Dodecanol	PA	34.25±0.82 h	33.27±0.55 h	33.81±0.78 h	36.94±0.71 gh	39.35±0.28 fg	40.88±0.37 f
	IPSAC	26.61±0.44 h	22.48±0.49 i	20.01±0.84 j	21.03±0.44 j	25.82±0.56 h	30.56±0.38 g
	IPN	22.19±0.37 e	18.74±0.41 f	16.68±0.70 g	17.54±0.37 fg	19.23±0.65 f	21.53±0.47 e

续表 3 Continue table 3

有机溶剂 Organic solvent	酶 Enzyme	体积分数/% Volume fraction					
		30	35	40	50	60	70
己醇 Hexanol	PA	27.29±0.59 de	27.79±1.30 d	28.62±0.31 cbd	28.28±1.18 cd	29.95±0.60 cb	30.32±1.73 b
	IPSAC	16.03±0.99 g	17.57±0.44 f	19.26±0.97 de	19.38±0.79 de	20.25±0.71 cd	20.63±0.96 c
	IPN	13.86±0.66 e	15.18±0.57 d	15.72±0.15 d	17.22±0.10 c	17.35±0.62 c	17.67±0.87 bc
苯 Benzene	PA	37.86±0.87 f	41.85±0.51 e	44.88±0.42 d	47.94±0.56 c	50.24±0.64 b	52.62±0.68 a
	IPSAC	24.51±0.83 e	26.32±0.64 d	28.30±0.75 c	31.20±0.70 b	33.27±0.85 a	34.13±0.60 a
	IPN	26.32±0.64 d	28.04±0.34 c	28.30±0.75 c	29.33±0.66 b	31.28±0.80 a	32.08±0.57 a
甲苯 Toluene	PA	37.48±0.87 d	39.03±0.69 c	39.89±0.89 c	42.30±0.92 b	43.59±0.29 ab	44.66±0.31 a
	IPSAC	28.83±0.32 de	29.66±0.37 d	31.83±0.23 c	32.97±0.45 bc	33.97±1.11 b	38.04±0.98 a
	IPN	25.42±0.19 e	27.46±0.27 d	28.47±0.18 c	28.11±0.11 cd	29.15±0.13 b	30.65±0.26 a
环己烷 Cyclohexane	PA	38.42±1.62 cd	40.06±0.97 bc	41.04±1.31 abc	40.48±3.58 bc	42.66±2.40 ab	43.61±0.55 a
	IPSAC	26.95±0.19 de	28.62±2.53 cd	30.58±2.53 bc	32.75±0.83 b	37.35±1.02 a	37.64±0.54 a
	IPN	28.45±1.20 cd	29.68±0.72 bc	30.40±0.97 abc	29.99±2.65 bc	31.60±1.78 ab	32.31±0.40 a
十二醇 Dodecanol	PA	42.50±0.99 f	48.19±0.75 e	54.66±2.33 d	58.72±7.08 c	65.84±1.02 b	74.33±1.40 a
	IPSAC	33.89±0.73 f	35.42±0.10 e	36.94±0.71 d	40.88±0.37 c	48.19±0.75 b	65.84±1.02 a
	IPN	22.85±0.49 de	24.15±2.32 d	28.12±0.88 c	28.85±0.76 c	41.98±1.78 b	53.50±1.41 a

3 讨论与结论

固定化酶因具有诸多优越性而被广泛应用^[17-19],其研究发展迅速,人们已先后进行了多种固定化方法研究^[14]。目前,常用的酶的固定化方法主要有吸附法、包埋法、共价键结合法、交联法等。IP-SAC、IPN 的固定化方法分别为包埋法和共价键结合法。

本研究表明,在低疏水参数的有机溶剂(log*P*≤-0.24)中,二甲基亚砜、1,4-二氧六环、乙腈在低体积分数时,PA 及其 IPA 的活性较对照有所升高;随着二甲基亚砜、1,4-二氧六环、乙腈体积分数的升高,PA 及其 IPA 的活性逐渐下降;在低体积分数时,有机溶剂甲醇和乙醇中的 PA 及其 IPA 活性与对照基本相当,但随着甲醇、乙醇体积分数的进一步提高,PA 及其 IPA 活性逐渐降低。林建城等^[11]研究表明,甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇、乙二醇和丙三醇对南美白对虾 *N*-乙酰-β-*D*-氨基葡萄糖苷酶的作用,均表现为在低体积分数时有激活作用,但随着体积分数的升高,激活作用减弱并迅速转为抑制作用。黄小红等^[12]的研究结果表明,乙醇、丙醇、乙二醇和二甲基亚砜在低体积分数时,对苏云金芽孢杆菌几丁质酶有激活作用,但随着体积分数的升高逐渐表现出抑制作用。本试验结果与上述研究结果相似。

本研究发现,在中疏水参数(0.28≤log*P*≤1.31)的有机溶剂中,随着丙醇、四氢呋喃体积分数的逐渐升高,PA 及其 IPA 活性降低,且酶活性的降低幅度随有机溶剂体积分数的提高而加快;随着丁醇、戊醇体积分数的逐渐升高,PA 及其 IPA 活性从

一开始就迅速下降。可见,在中疏水参数的有机溶剂中,疏水参数越高,其对 PA 及其 IPA 活性的抑制作用越显著。乙酸乙酯的疏水参数为 0.68,虽然低于丁醇(0.80)和戊醇(1.31)的,但其对 PA 及 IPA 活性的影响方式却与高疏水参数有机溶剂相似,其原因尚待进一步研究。

本研究表明,在高疏水参数(log*P*≥1.80)有机溶剂中,当体积分数较低时,己醇中的 PA 及其 IPA 活性下降较快,但当其体积分数超过 20%时,酶活性开始升高,但仍低于对照。苯、甲苯、环己烷、十二醇的情况与乙酸乙酯、己醇相似,不同的是随着 log*P* 的增高,有机溶剂在低体积分数时对 PA 及其 IPA 活性的抑制作用逐渐减弱;但当其体积分数超过一定值后,酶活性开始升高,并高于对照的酶活性,且随着有机溶剂 log*P* 的增高,酶活性升高更多。其原因可能是:尽管这些有机溶剂对酶活性有一定影响,但随着有机溶剂体积分数的升高,体系中的水溶液含量越来越少,从而使水溶液中的底物与酶的浓度相对提高,间接降低了有机溶剂的影响,使酶活性不降反升。

从表 2 和表 3 可以看出,乙酸乙酯、己醇在低体积分数时,PA 及其 IPA 活性下降较快,但当其体积分数分别超过 30%和 20%时,酶活性开始升高,但仍低于对照中的酶活性。二者酶活性升高所需的体积分数有所不同,可能是由于己醇的疏水参数较乙酸乙酯的高。

本试验研究表明,在所有 15 种有机溶剂中,同种有机溶剂在不同体积分数下对 PA 及其 IPA 活性的作用趋势是一致的。这说明 PA 不论是在溶液

中,还是被固定化,其活性受这些有机溶剂影响的趋势是相同的。PA 被包埋在海藻酸钠-壳聚糖(形成 IPSAC)中,或通过戊二醛与尼龙布共价键结合(形成 IPN)形成固定化酶,并没有改变有机溶剂对木瓜蛋白酶影响的趋势。方差分析表明,体积分数不同的 15 种有机溶剂对 PA 及其 IPA 的影响有极显著差异,这说明有机溶剂对木瓜蛋白酶活性影响很大,该试验结果与初志战等^[20]的研究结论一致。

从以上研究可以看出,低 $\log P$ 的有机溶剂在低体积分数时可激活木瓜蛋白酶,但激活能力与溶剂所带的基团有关。甲醇、乙醇的 $\log P$ 值虽然较低,但其在低体积分数时对木瓜蛋白酶并无激活作用,可能与甲醇、乙醇带有一 OH 基团有关。丁醇、戊醇的 $\log P$ 值较乙酸乙酯高,但其对 PA 及其 IPA 活性的影响趋势与乙酸乙酯不同(表 2),可能也与丁醇、戊醇带有一 OH 基团有关。在可溶性有机溶剂中,对木瓜蛋白酶紫外发射光谱的测定发现(另文发表),其在甲醇、乙醇、丙醇及水溶液中的紫外发射光谱峰型一致,而在二甲基亚砷、1,4-二氧六环、乙腈、四氢呋喃溶液中的紫外发射光谱峰型与水溶液中的差异较大,这可能是由于甲醇、乙醇、丙醇与水均有相同的一 OH 基团。因而推测这些有机溶剂对酶活性的影响程度与基团和疏水参数均有关系,但其具体机理尚需更深入的研究。

[参考文献]

[1] Zaks A,Klibanov A M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C [J]. Science,1984,224(4654):1249-1251.

[2] Theppakorn T,Kanasawud P,Halling P J,et al. Effect of solid-state buffers on the catalytic activity of papain in low water media [J]. Enzyme and Microbial Technology,2003,32(7):828-836.

[3] Buisson P,Pierre A C. Immobilization in quartz fiber felt reinforced silica aerogel improves the activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvents [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2006,39(1):77-82.

[4] Rodakiewicz-Nowak J , Jarosz-Wilkolazka A , Luterek J. Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents [J]. Applied Catalysis A: General,2006,308,56-61.

[5] Fatima A, Husain Q, Khan R H. A peroxidase from bitter gourd (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A comparison with horseradish peroxidase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 47:66-71.

[6] 罗贵民. 有机溶剂中的酶催化反应 [J]. 精细与专用化学品, 1999 (5):12-13.

Luo G M. Enzyme catalysis in organic solvents [J]. Fine and Specialty Chemicals,1999(5):12-13. (in Chinese)

[7] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响 [J]. 化学进展,2000,12(3):296-304.

Peng L F. Effect of organic solvents on enzymatic activity and selectivity [J]. Progress in Chemistry,2000,12(3):296-304. (in Chinese)

[8] Baldascini H, Janssen D B. Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system [J]. Enzyme and Microbial Technology,2005,36(2):285-293.

[9] Laane C, Boeren S, Vos K, et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents [J]. Biotechnology and Bioengineering,1987,30:81-87.

[10] 艾俊哲,梅 平. 非水介质中的酶催化反应 [J]. 化学通报, 2002(11):752-757.

Ai J Z, Mei P. The research progress of enzymatic reaction in non-aqueous media [J]. Chemistry,2002(11):752-757. (in Chinese)

[11] 林建城,谢晓兰,龚 敏,等. 有机溶剂对南美白对虾 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响 [J]. 厦门大学学报:自然科学版,2005,44(5):693-696.

Lin J C, Xie X L, Gong M, et al. Effects of different organic solvents on the activity of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science Edition,2005,44(5):693-696. (in Chinese)

[12] 黄小红,陈清西,王 君,等. 有机溶剂对苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 几丁质酶的影响 [J]. 应用与环境生物学报,2005,11(1):71-73.

Huang X H, Chen Q X, Wang J, et al. Effects of different organic solvents on the chitinase from *Bacillus thuringiensis* [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005,11(1):71-73. (in Chinese)

[13] Wu J C, Lee S S, Mahmood M M B, et al. Enhanced activity and stability of immobilized lipases treatment with polar solvents prior to lyophilization [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2007,45:108-112.

[14] 施巧琴. 酶工程 [M]. 北京:科学出版社,2005:220-343.

Shi Q Q. Enzyme engineering [M]. Beijing: Science Press, 2005:220-343. (in Chinese)

[15] 郑婉玲,邹云珍,藏向莹. 强化海藻酸钠凝胶制备固定化酶 [J]. 工业微生物,1998,28(3):15-18.

Zheng W L, Zou Y Z, Zang X Y. Preparation of immobilized enzyme by strengthened Na-alginate agglutination [J]. Industry Microorganism,1998,28(3):15-18. (in Chinese)

[16] 徐凤彩,李明启. 尼龙固定化木瓜蛋白酶及其应用研究 [J]. 生物化学杂志,1992,8(3):302-305.

Xu F C, Li M Q. Study on nylon immobilized papain and its application [J]. Biochemistry,1992,8(3):302-305. (in Chinese)