

丁二酸酐修饰对枯草芽孢杆菌氨肽酶结构及酶学特性的影响

张 静, 田亚平*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用丁二酸酐(SA)对经硫酸铵盐析和截留相对分子质量 30 000 的超滤膜分离提取后的氨肽酶(AE)在优化条件下进行化学修饰,SA 对 AE 的平均氨基修饰率为 55.86%,酶活保留率为 105.81%;修饰后的氨肽酶紫外吸收光谱发生一定红移,圆二色谱分析其二级结构中无规卷曲比例有一定的增加, α 螺旋、 β 折叠以及 β 转角的含量有所下降,说明修饰后的氨肽酶空间构象有一定改变;修饰后的氨肽酶,70℃保温 5 h 后仍然能保留 70%以上的活性,与修饰前同等条件下酶活残留 35%相比,其热稳定性显著提高。修饰后的氨肽酶动力学参数 K_m 从 1.0 mmol/L 降低到 0.75 mmol/L,表明其对底物的亲和力有明显的提高。此外,修饰后的氨肽酶最适温度和最适 pH 值也有一定的变化。结果表明 SA 化学修饰是一种可明显提高枯草芽孢杆菌氨肽酶与底物的亲和力及其热稳定性的有效方法。

关键词: 氨肽酶;丁二酸酐;化学修饰;稳定性;动力学

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)06—0622—06

Chemical Modification of the *Bacillus subtilis* Aminopeptidase by Succinic Anhydride and Its Enzyme Properties

ZHANG Jing, TIAN Ya-ping*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Aminopeptidase which was isolated from *Bacillus subtilis* was purified by ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration using of a 30 kDa MWCO polyether sulfone (PES) membrane. Succinic anhydride (SA) was used as a modifier for the chemical modification of the purified Aminopeptidase. The effects of modification were characterized using the 6-trinitrobenzene sulfonic acid method, ultraviolet spectroscopy, and CD spectroscopy. The results showed the structure of native and modified Aminopeptidase is different. The average amino modification yield of the modified Aminopeptidase was 55.86% and the enzymatic activity increased to 105.81%. Compared with the native Aminopeptidase, the modified Aminopeptidase exhibited apparently higher thermal stability. The K_m of the modified Aminopeptidase ($K_m=0.75$ mmol/L) was lower than native

收稿日期: 2012-07-29

基金项目: 国家 863 计划项目(2011AA100905)。

* 通信作者: 田亚平(1964—),女,安徽淮南人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物活性物质方面的研究。

E-mail: yapingtian@hotmail.com

Aminopeptidase ($K_m=1.0\text{ mmol/L}$). The result indicated that the chemical modification of Aminopeptidase increased the affinity. In addition, enzyme properties have been changed after modification.

Keywords: aminopeptidase, succinic anhydride, chemical modification, stability, kinetics

氨肽酶是一类从蛋白质或肽链的 N 端酶切氨基酸残基的外肽酶的总称^[1]。氨肽酶的分布广泛,主要存在于动物组织和植物中,由于动植物中的氨肽酶的含量比较低,提取成本高,所以利用微生物发酵法生产酶是近年来酶制剂行业的热点和趋势,产氨肽酶的微生物的种类繁多,例如细菌、霉菌、酵母等。

氨肽酶的应用广泛,可协助切掉肽链末端疏水性氨基酸,脱除蛋白水解物的苦味^[2];与不同的内切酶复配,参与蛋白质的深度水解^[3];制备多功能活性肽;还可以作为 N 端测序工具酶和医疗诊断用酶。

酶作为一种生物催化剂,因其半衰期短、易失活等缺点严重影响着酶的使用效果。氨肽酶作为一种工业化酶制剂,酶的热稳定性是一个很关键的因素。酶的热稳定性提高具有明显的优势,延长酶的储存时间、减少在运输过程中的酶活损失,使酶在较高反应温度下延长酶的反应时间,提高生产效率,有效的降低生产成本^[4]。所以,如何提高酶的稳定性,从而扩大酶的应用范围的研究越来越引起人们的重视。

目前,提高酶稳定性的策略主要从酶分子改造和微环境改良^[5]两方面入手。酶分子改造包括定点突变、化学修饰以及酶固定化等方法;微环境改良包括添加保护剂、防腐剂、蛋白酶抑制剂、抗氧化剂和还原剂等。其中化学修饰是提高和改善酶催化性能的有效方法之一。季波、徐滢波等^[6]采用氰脲酰氯法活化的聚乙二醇-6000 对牛血 Cu,Zn-SOD 进行化学修饰,制得的修饰酶比天然 SOD 在热稳定性、酸碱条件以及抗酶解三方面的稳定性均有不同程度的提高。曹向宇、刘剑利等^[7]利用右旋糖酐对玉米 SOD 进行修饰,修饰后玉米 SOD 的温度稳定性、pH 稳定性均有显著提高,半衰期延长,对蛋白酶的耐受性增强。天然酶分子上的 Lys 残基末端的 $\varepsilon\text{-NH}_2$ 由于具有较强的亲核性,使得 $\varepsilon\text{-NH}_2$ 成为化学修饰的首选官能团。Marta Kotorman、Andras Cseri、Ilona Laczko 等^[8]用乙酸酐、丙酸酐、丁二酸酐、邻苯

二甲酸酐等不同的酸酐修饰 α -胰凝乳蛋白酶,提高了酶在不同有机溶剂中的稳定性。

采用丁二酸酐对氨肽酶进行化学修饰,通过紫外-可见吸收光谱和圆二色光谱表征修饰前后酶的结构变化,并考察了修饰前后酶反应动力学常数、最适温度、稳定稳定性、最适 pH、pH 稳定性等酶学性质的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) Zj016,作者所在实验室保藏菌种。

1.1.2 主要试剂 L-亮氨酸-对硝基苯胺:美国 Alfa 公司;氨肽酶:作者所在实验室制备;2,4,6-三硝基苯磺酸:上海晶纯实业有限公司;丁二酸酐:化学纯,国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝试剂:自制;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 BCD-208K 型低温冰箱:青岛海尔股份有限公司;722 型分光光度计:上海第三分析仪器厂;SHZ-22 电热恒温水浴锅:上海医疗器械五厂;Delta320 pH 计:电子天平 AL204,梅特勒-托利多公司;MOS-450 圆二色光谱仪:法国 Biologic 公司;UV-3000 扫描型紫外-可见分光光度计:日本 HITACHI 公司;透析袋(截留相对分子质量为 10 000):Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 丁二酸酐对氨肽酶的化学修饰方法 参考文献[9]方法并进行优化,称取 20 mg 的氨肽酶粉溶解在 15 mL、0.05 mol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,然后向混合液中缓慢加入 10 mg 的丁二酸酐,搅拌溶解,在整个反应过程中用 2 mol/L NaOH 溶液维持反应体系的 pH 值为 8.0,在 4 ℃条件下反应 1 h,反应结束后,用 0.05 mol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液在 4 ℃透析过夜,以除去多余的修饰剂,得到丁二酸酐修饰的氨肽酶(修饰酶 SA-AE);称取 20 mg 的氨肽酶粉溶解在 15 mL、0.05 mol/L pH 8.5 的

Tris-HCl 缓冲液中, 用 0.05 mol/L pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液在 4 °C 透析过夜, 得到原酶液(AE), 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 紫外-可见吸收光谱 采用 UV-3000 扫描型紫外分光光度计, 扫描波长为 200~600 nm, 石英比色皿光程为 10 mm, 酶质量浓度为 0.5~2.0 mg/mL。

1.2.3 圆二色性光谱 采用 MOS-450 圆二色光谱仪, 波长范围为 190~250 nm, 速度 1 nm/2 s, 使用 0.1 cm 石英池, 酶质量浓度为 0.5~2.0 mg/mL。

1.2.4 动力学特征参数的测定 以 L-亮氨酸-4-硝基苯胺为底物, 在原酶和修饰酶的最佳酶活测定的条件下, 测定底物浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L 时原酶和修饰酶的酶活。按照 Lineweaver-Burk 作图法取双倒数作 $1/v-1/s$ 曲线, 计算原酶和修饰酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_m 。

1.2.5 原酶液和修饰酶液最适温度的测定 分别取原酶液和修饰酶液各 1 mL, 用 0.05 mol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液在不同的温度条件下测定酶活力, 温度梯度为 40、45、50、55、60、65、70 °C, 以同组实验中酶活最高的一组作为对照。

1.2.6 原酶液和修饰酶液的温度稳定性 将原酶液和修饰酶液放置在 70 °C、0.05 mol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 每隔 1 h 取样, 立即冰浴, 测定其酶活力, 以同组实验中酶活最高的一组作为对照。水浴保温时间为 0、1、2、3、4、5 h。

1.2.7 原酶液和修饰酶液最适 pH 值的测定 分别取原酶液和修饰酶液各 1 mL, 在不同 pH、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中, 50 °C 下测定其酶活力, pH 值梯度为 6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0。以同组实验中酶活最高的一组作为对照。

1.2.8 原酶液和修饰酶液的 pH 稳定性 将原酶液和修饰酶液分别在 pH 5.0~7.0 (0.05 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液)、pH 7.0~10.0 (0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 体系中于 4 °C 下放置, 6 h 后取样将 pH 调至它们的最适反应 pH 值以测定酶活力。以同组实验中酶活最高的一组作为对照。

1.3 分析方法

1.3.1 氨肽酶酶活测定方法 LNA 法: 加入 2 mL、0.05 mol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 1 mL 的 L-亮氨酸对硝基苯胺溶液, 再加入稀释一定倍数的酶液 1 mL, 50 °C 水浴反应 10 min 后, 在 405 nm 波长

处测定吸光值^[10]。

酶活力定义: 50 °C 下, 每分钟分解 L-亮氨酸对硝基苯胺产生 1 μ mol 的对硝基苯胺所需酶量定义为一个酶活单位。

1.3.2 平均氨基修饰度测定 采用三硝基苯磺酸 (TNBS) 法对修饰酶进行平均氨基修饰度的测定^[11]。

氨基修饰率(%)=1-氨基残留率(%)。

1.3.3 相对酶活力测定 在同组实验中以酶活力最高的为 100, 与其余的酶活力之比, 通常以百分数表示。

1.3.4 酶活残留率测定 酶活残留率=样品酶液残余酶活/样品酶液初始酶活 $\times 100\%$ 。

1.3.5 蛋白质总量测定 考马斯亮蓝染色法^[12], 以牛血清白蛋白作为标准。

2 结果与讨论

2.1 丁二酸酐化学修饰结果

在最佳修饰条件下, 采用丁二酸酐对氨肽酶进行化学修饰, 得到化学修饰酶。修饰酶的相对酶活为 105.81%, 较原酶有所提高, 氨基修饰率为 55.86%。与透析前相比, 透析后原酶液和修饰酶液的酶活均有所下降, 这是因为枯草芽孢杆菌 Zj016 氨肽酶是一种金属酶^[13], 透析导致部分金属离子除去, 酶活下降。可通过加入适当浓度的相应金属离子提高酶活。

2.2 修饰酶的结构与催化特性表征

2.2.1 紫外-可见吸收光谱分析 蛋白质在紫外光范围内有两个特征吸收峰, 一是由于蛋白质所含有的色氨酸残基和酪氨酸残基, 其分子内部存在共轭双键, 在 280 nm 处有一个吸收峰, 二是因肽键存在而引起的, 在 200~220 nm 处有一个吸收峰。由图 1 可知, 原酶液的最大吸收波长在 213.5 nm 处, 经过修饰之后, 修饰酶的最大吸收波长出现红移, 为 216.5 nm。其原因可能是丁二酸酐的引入改变了酶分子的微环境, n 和 π^* 轨道间的能量差减小, 引起吸收峰向长波长移动^[14]。吸收峰的微小变化表明丁二酸酐修饰后已导致酶分子的构象发生了一定程度的改变。

2.2.2 圆二色性光谱分析 在蛋白质的二级结构中, 存在着 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角、无规则卷曲等结构。蛋白质的 α 螺旋结构在靠近 192 nm 处有一正的谱带, 在 222 nm 和 208 nm 处表现出两个负的特

征肩峰谱带; β 折叠的 CD 谱在 216 nm 有一个负谱带,在 185~200 nm 有一正谱带; β 折叠在 206 nm 附近有一正 CD 谱带^[15]。由图 2 可知,原酶液和修饰酶液的 CD 光谱特征产生了一定的变化,进一步说明酶经修饰后其结构发生了改变。

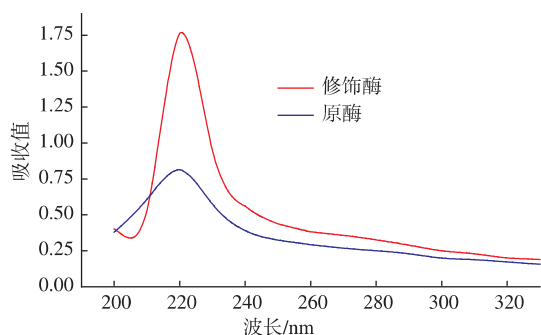


图 1 原酶液和修饰酶液的紫外吸收光谱

Fig. 1 Absorbance spectra of native and modified Aminopeptidase

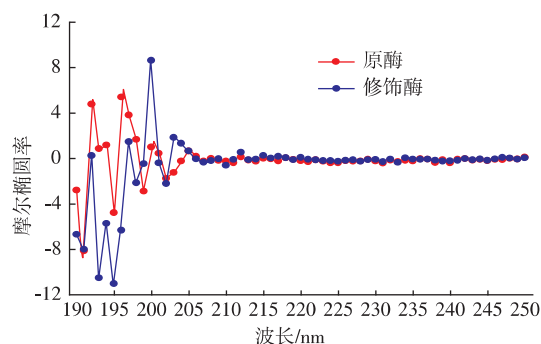


图 2 原酶液和修饰酶液的圆二色性光谱图

Fig. 2 CD spectra of native and modified Aminopeptidase

用 Selcon3 软件分析修饰前后酶的二级结构含量的变化,结果见表 1。由表 1 可见,酶经修饰后, α 螺旋 β 折叠以及 β 转角的含量均有所下降,无规则卷曲的含量有所增加。在经化学修饰引入丁二酸酐之后,酶的二级结构发生了改变。

表 1 原酶液与修饰酶液的二级结构变化

Table 1 Secondary structure of native and modified Aminopeptidase

酶	α 螺旋/%	β 折叠/%	β 转角/%	无规卷曲/%
原酶	2.7	11.3	28.6	59.6
修饰酶	1.5	7.1	25.3	68.0

2.2.3 修饰氨肽酶的催化特征 在丁二酸酐修饰前后,分别考察了原酶和修饰酶的动力学参数,以双倒数作图法作图, Lineweaver-Burk 曲线见图 3,

求得反应动力学参数见表 2。

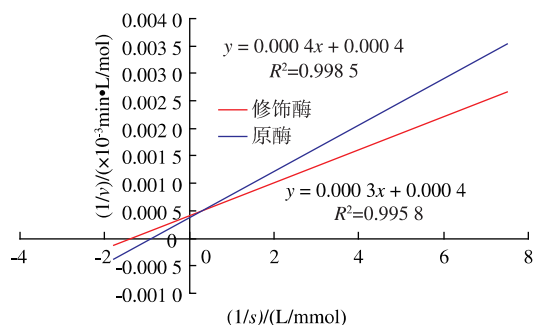


图 3 原酶和修饰酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of native and modified Aminopeptidase

表 2 原酶和修饰酶的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of native and modified Aminopeptidase

酶	K_m /mmol/L	V_{max} /(mmol/(L/min))
原酶	1	2 500
修饰酶	0.75	2 500

由表 2 可知,与原酶相比,修饰酶的 K_m 值减小,表明修饰剂的加入导致氨肽酶的空间构象发生了改变,使其对底物 L-亮氨酸-4-硝基苯胺的亲合力增加,更加有利于底物分子进入酶的活性中心。

2.2.4 原酶液和修饰酶液的最适温度 由图 4 可知,不管是原酶液还是修饰酶液,其酶活均随着温度的上升而增加,原酶液的最适温度是 60℃,而修饰酶液的最适温度是 65℃,较原酶液有所提高。

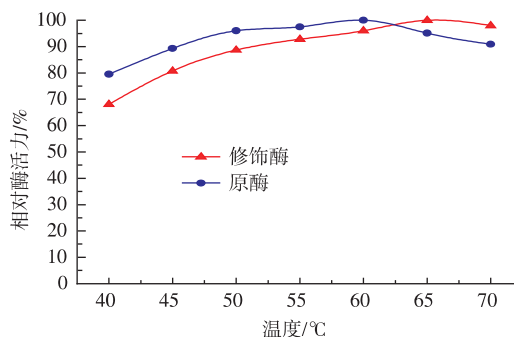


图 4 原酶液和修饰酶液的最适作用温度

Fig. 4 Optimal reaction temperature of native and modified Aminopeptidase

2.2.5 原酶液和修饰酶液的热稳定性 由图 5 可知,随着时间的延长,原酶液和修饰酶液酶活的变化趋势相同,但是,修饰酶液在 70℃保温 5 h 后,仍

然保留 70% 的酶活, 而原酶液的酶活仅余 35%。和原酶液相比, 修饰酶液具有较好的热稳定性。

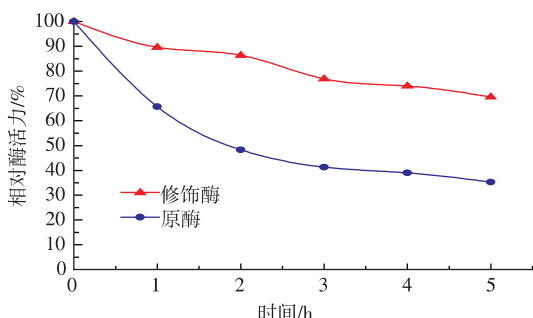


图 5 原酶液和修饰酶液的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of native and modified Aminopeptidase at 70 °C

至于酶经化学修饰后热稳定性提高的原因, 不同学者都围绕着修饰后酶分子结构的变化进行讨论。如 Baek 等^[16]认为可能是由于修饰剂共价连接在酶分子后, 使其天然构象局部产生一定的“刚性”, 不易伸展失活, 并减少了酶分子内部基团的热振动, 从而提高酶的热稳定性; Gouda 等^[17]认为修饰剂与酶分子共价连接后, 使得酶分子的结构变得致密, 其分子内的作用力增强, 导致酶的热稳定性提高。

2.2.6 原酶液和修饰酶液的最适 pH 值 由图 6 可知, 原酶液的最适 pH 值为 8.5, 修饰酶液的最适 pH 值为 9.5~10.0。原酶液在 pH 值为 10.0 时的相对酶活为 90%。经丁二酸酐修饰后, 酶的最适 pH 值向碱性方向偏移了 1~1.5 个单位。

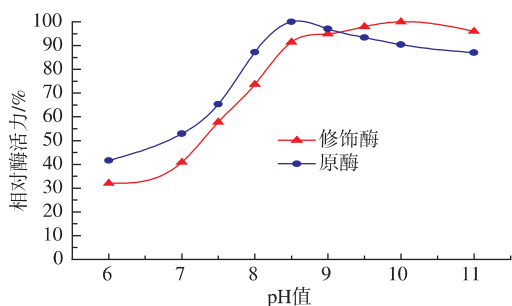


图 6 原酶液和修饰酶液的最适作用 pH 值

Fig. 6 Optimal reaction pH of native and modified Aminopeptidase

参考文献:

- [1] 王俊. 枯草芽孢杆菌氨肽酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [2] 魏亚娟, 田亚平, 须瑛敏. 枯草芽孢杆菌脱苦氨肽酶在水解大豆分离蛋白中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2008, 4: 149-151.

WEI Ya-juan, TIAN Ya-ping, XU Ying-min. Study on hydrolysis of soybean protein isolate by *Bacillus subtilis* aminopeptidase

Kharpard 等^[18]采用丁二酸酐修饰木瓜蛋白酶导致最适反应 pH 值由 6.0 偏移至 7.5, 熊亚红等^[19]用邻苯二甲酸酐 (PA) 修饰木瓜蛋白酶使其最适反应 pH 值由 7.0 提高到 8.5。人们普遍认为这可能是由于酸酐与酶分子的 Lys 残基上带正电荷的氨基反应后, 在酶分子中引入了带负电荷的羧基, 使得最适 pH 向碱性方向偏移。

2.2.7 原酶液和修饰酶液的 pH 稳定性 由图 7 可知, 在 4 °C 放置 6 h 后, 缓冲液的种类对酶活的测定也有影响, 所以在更换缓冲液之后, pH 7 时相对酶活力出现不同。以最高酶活的 80% 为界确定酶的最适 pH 稳定范围, 原酶在 pH 7.0~9.0 范围内, 酶活力较高且稳定; 而修饰酶在 pH 6.0~9.0 范围内较稳定, pH 稳定性范围比原酶变宽, 说明修饰酶的 pH 稳定性得到提高。

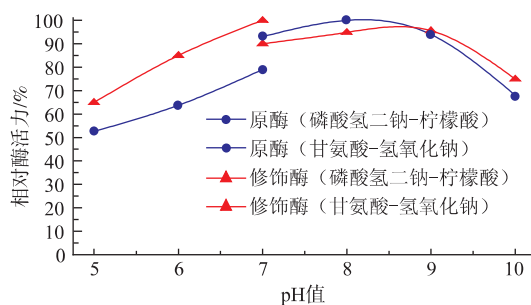


图 7 原酶液和修饰酶液的 pH 稳定性

Fig. 7 pH stability of native and modified Aminopeptidase

3 结 语

作者采用丁二酸酐在经过一定优化的最佳修饰条件下对氨肽酶进行化学修饰, 修饰后的枯草芽孢杆菌氨肽酶酶活较原酶有所提高, 分子构象发生了一定的改变, 同时伴随了一系列的酶学特性表征方面的变化。修饰后酶学特征中最突出的变化是修饰酶的热稳定性比原酶显著增强, 对底物的亲和力也有所增加, 表明特定条件下的丁二酸酐化学修饰可较好地改善枯草芽孢杆菌氨肽酶的应用特性, 对促进该酶的工业化生产和进一步的应用有一定的参考作用。

- [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 4: 149-151. (in Chinese)
- [3] 吕广林, 田亚平. 氨肽酶与中性蛋白酶协同水解大豆分离蛋白的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(1): 101-105.
LU Guang-lin, TIAN Ya-ping. Study on hydrolysis of soybean protein isolate by aminopeptidase and neutral protease[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(1): 101-105. (in Chinese)
- [4] 郑贤良. 重组 α -环糊精葡萄糖基转移酶酶制剂稳定性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [5] Iyer P V, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment [J]. *Biochemistry Prog*, 2008, 43: 1019-1032. (in Chinese)
- [6] 季波, 徐滢波, 赵树进. 聚乙二醇修饰超氧化物歧化酶及其稳定性研究[J]. *广州医学院学报*, 2002, 30(3): 16-18.
JI Bo, XU Yin-Bo, ZHAO Shu-Jin. A stability study of PEG-SOD [J]. *Academic Journal of Guangzhou Medical College*, 2002, 30(3): 16-18. (in Chinese)
- [7] 曹向宇, 刘剑利, 朱俊丰, 等. 右旋糖酐修饰玉米 SOD 研究[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(3): 17-19.
CAO Xiang-yu, LIU Jian-li, ZHU Jun-feng, et al. Study on modification of SOD from maize with dextran [J]. *Food Research and Development*, 2010, 31(3): 17-19. (in Chinese)
- [8] Marta Kotorman, Andras Cseri, Ilona Laczkó, et al. Stabilization of α -chymotrypsin in aqueous organic solvents by chemical modification with organic acid anhydrides[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 59: 153-157.
- [9] 熊亚红, 高敬忠, 郑坚鹏, 等. 丁二酸酐修饰对漆酶稳定性和除酚效率的影响[J]. *催化学报*, 2011, 32(10): 1584-1591.
XIONG Ya-hong, GAO Jing-zhong, ZHENG Jian-peng, et al. Effects of succinic anhydride modification on laccase stability and phenolics removal efficiency[J]. *Chin J Catal*, 2011, 32(10): 1584-1591. (in Chinese)
- [10] 王俊, 吕广林, 田亚平. 一种枯草芽孢杆菌亮氨酸氨肽酶的提取及部分酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 30(1): 203-206.
WANG Jun, LV Guang -lin, TIAN Ya -ping. Study on extraction process and partial characterization of the leucine aminopeptidase of *Bacillus subtilis*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 1: 203-206. (in Chinese)
- [11] Habeeb A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid[J]. *Analytical Biochemistry*, 1966, 14(3): 328-336.
- [12] 王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 124-125.
- [13] 田亚平, 须瑛敏. 一种枯草芽孢杆菌氨肽酶的纯化及酶学性质[J]. *食品工业科技*, 2006, 32(3): 7-9.
TIAN Ya-ping, XU Ying-min. Purification and characterization of one kind of *Bacillus subtilis* aminopeptidase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 32(3): 7-9. (in Chinese)
- [14] 高向阳. 新编仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 16-17.
- [15] 李苏, 闫明, 戈钧, 等. 葡聚糖修饰漆酶的制备及其催化特性和稳定性[J]. *化工学报*, 2007, 58(12): 3046-3052.
LI Su, YAN Ming, GE Jun, et al. Dextran conjugated laccase and its catalytic property and stability [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2007, 58(12): 3046-3052. (in Chinese)
- [16] Beak W O, Wijayalakshmi M A. Effect of chemical glycosylation of RNase A on the protein stability and surface histidines accessibility in immobilized metal ion affinity electrophoresis (IMAGE) system [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1997, 1336(3): 394-402.
- [17] Gouda M D, Singh S A, Rao A G, et al. Thermal inactivation of glucose oxidase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 324-333.
- [18] Khaparde S S, Singhal R S. Chemically modified papain for applications in detergent formulations [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 78: 1-4.
- [19] 熊亚红, 吴巧儿, 苏健鸿. 化学修饰木瓜蛋白酶的酶学性质研究[J]. *分子催化*, 2010, 24(6): 529-536.
XIONG Ya-hong, WU Qiao-er, SU Jian-hong. Study on the enzymatic property of chemical modification papain [J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 2010, 24(6): 529-536. (in Chinese)