

介孔分子筛 MCM-48 固定化木瓜蛋白酶性质的研究

赵炳超^{1,2} 马润宇¹ 石波²

1(北京化工大学生命科学与技术学院,北京,100029) 2(中国农业科学院饲料研究所,北京,100081)

摘要 以介孔分子筛 MCM-48 为载体、戊二醛作交联剂对木瓜蛋白酶进行了固定化。实验结果表明,与游离酶相比,固定化酶的热稳定性有了显著的提高,其半衰期达到了 2 500 min 以上,是游离酶(80 min)的 30 倍以上。固定化酶的 pH 稳定性和储藏稳定性也有了明显改善。此外,固定化酶还具有很好的操作稳定性,经过 12 d 的连续酶解,酶活力仍保持在初始酶活力的 70% 以上。

关键词 固定化,木瓜蛋白酶,介孔分子筛 MCM-48,戊二醛

木瓜蛋白酶(papain, EC3.4.22.2)是从番木瓜中提取出来的一种蛋白水解酶,具有很好的蛋白水解活性,在食品、医药等工业领域中应用广泛^[1,2]。然而游离的木瓜蛋白酶耐热性差,在水溶液中易发生自解,因此使用效率很低。与游离酶相比,固定化酶具有很好的热稳定性和操作稳定性,正逐步受到人们的重视。

新一族介孔分子筛 M41S 具有高度有序、孔径分布范围很窄的孔道,且孔径可在 2~10 nm 之间调节^[3,4]。M41S 表面富含羟基,可与酶分子形成氢键,从而将酶分子吸附在介孔分子筛的孔道内,是一类新型的固定化载体。Diaz 和 Balkus^[5]已用该族材料中的 MCM-41 为载体固定了木瓜蛋白酶。MCM-48 是该族材料中的另一种,介孔结构呈三维立方相,与一维六方相的 MCM-41 相比更利于酶分子进入孔道内。文中以自制的孔径为 6.0 nm 左右的 MCM-48 为载体固定化木瓜蛋白酶(3.7×3.7×5.0 nm),并对此进行了研究。该项研究国内外尚未见文献报道。

1 材料与方法

1.1 材料

木瓜蛋白酶(0.5 U/mg, 1 U 是指在 pH 6.2、25℃的条件下,1 min 内可以水解 1 μmol 的 N_α-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE))、酪蛋白(Sigma);酪氨酸、半胱氨酸、戊二醛(25%,质量分数)、EDTA、三氯乙酸(TCA)、正硅酸乙酯(TEOS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、间三甲苯(TMB)、AlCl₃·6H₂O、NaOH 以及配制缓冲溶液所用的试剂均为分析纯(北京化学试剂公司);实验中所用的磷酸盐、磷酸盐/碳酸盐以及碳酸盐缓冲液均为 0.1 mol/L 的钠盐;木瓜

蛋白酶和酪蛋白分别溶解于 pH 7.0 的磷酸缓冲液中制成 1 mg/mL 和 5 mg/mL 的溶液;激活剂是半胱氨酸和 EDTA,含量分别为 20 mmol/L 和 1 mmol/L 的 pH 7.0 的磷酸缓冲液;TCA 溶于去离子水中制成 5%(质量分数)的溶液;戊二醛用去离子水稀释为 7.5%,备用。

1.2 介孔分子筛 MCM-48 的制备

介孔分子筛 MCM-48 参照文献[6]的方法制备,为了增大孔径,加入扩孔剂 TMB。具体制备工艺如下:向 500 mL 容量瓶中依次加入 180 mL H₂O、4.4 g CTAB、2.4 g NaOH 和 0.4 g AlCl₃·6H₂O,待全部溶解后,加入 3.6 g TMB。继续搅拌 30 min 后,于 30 min 内向溶液中滴加 20.8 g TEOS。继续搅拌 1 h 后转入高压反应器中,120℃下水热晶化 48 h。然后过滤、水洗、55℃干燥,再在 540℃下煅烧 8 h,以除去表面活性剂 CTAB 和扩孔剂 TMB。

1.3 木瓜蛋白酶在 MCM-48 上的固定化

将 0.1 g MCM-48 和 5 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液加入 25 mL 的锥形瓶内,然后再加入 2 mL 的激活剂和 2 mL 的木瓜蛋白酶溶液,最后向溶液中滴加 7.5% 的戊二醛溶液直至溶液中的戊二醛含量为 0.75%。固定化反应在 180 r/min、15℃的条件下进行 2 h,再经过滤、50 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤后即可得到固定化酶。

1.4 固定化酶的性质

温度对酶活力的影响在 15~85℃的范围内进行,酶的热稳定性试验在 50℃、pH 7.0 的环境中进行;pH 对酶活力的影响在 5.5~9.0 的范围内进行(磷酸缓冲液 5.5~7.0,磷酸盐/碳酸盐缓冲液 7.0~8.0,碳酸盐缓冲液 8.0~9.0),酶的 pH 稳定性通过将其在不同的 pH 缓冲液中放置 24 h 测得;固定化酶的连续操作稳定性在 25℃下的柱式连续反应器内测

第一作者:博士研究生,副研究员。

收稿日期:2005-05-20

定;酶的储藏稳定性在 4℃ 的条件下测定。

1.5 酶活力的测定

木瓜蛋白酶的活力以酪蛋白作底物、酪氨酸作标准物的条件下采用紫外光谱方法进行测量。具体操作程序如下:将 0.5 mL 木瓜蛋白酶溶液与 4.5 mL 激活剂混合后,在 25℃ 下预热 10 min,然后与在同样条件下预热 10 min 的酪蛋白溶液混合,酶解 10 min 后加入 5 mL TCA 溶液终止酶解反应,过滤得到的上清液在 275 nm 处测量吸光度,以计算木瓜蛋白酶的酶解活力。固定化酶活力测定时除了 0.5 mL 木瓜蛋白酶溶液用 0.1 g 固定化酶(以 0.1 g 载体的干重计)放入 0.5 mL 磷酸缓冲液中代替外,其他与上述游离酶的活力测定方法相同。酶活力定义:在试验条件下,1 min 内分解酪蛋白产生 1 μmol 酪氨酸等价物的酶量为 1 个酶活力单位(U)。固定化酶活力回收率为固定化酶的活力与固定化前后酶溶液的活力变化之比。固定化酶(或游离酶)的相对活力是指以同组实验中固定化酶(或游离酶)活力最高点的值记为 100% 为前提,其他实验点的值与该点的值之比。固定化酶(或游离酶)的剩余活力是指以同组实验中固定化酶(或游离酶)初始活力记为 100% 为前提,其他实验点的值与该点的值之比。

2 结果与讨论

2.1 材料孔径分布分析

制备所得的介孔分子筛 MCM-48 进行了氮气等温吸附/解吸分析,并用 BJH 方法^[7]进行了孔径分布分析。等温吸附/解吸曲线和孔径分布曲线见图 1 和 2。从图 1 可以看出,吸附/解吸曲线中存在一明显的阶跃区,说明介孔结构均一。从图 2 可以很容易知道,孔径集中分布在 6 nm 附近。这些结果表明扩孔剂的加入并未破坏介孔分子筛的结构。

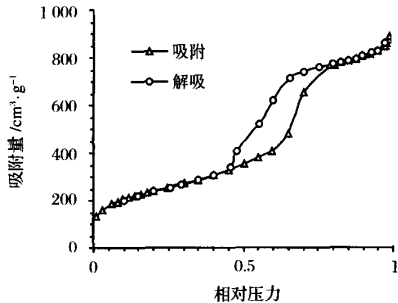


图 1 介孔分子筛 MCM-48 的等温吸附/解吸曲线

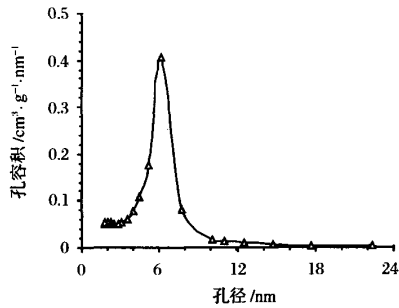


图 2 介孔分子筛 MCM-48 的孔径分布曲线

2.2 固定化酶的性质

木瓜蛋白酶用介孔分子筛 MCM-48 固定化后,其最适 pH 并未发生明显变化,仅由原来的 6.5 向右偏移至 7.0,如图 3 所示。固定化酶的 pH 稳定性与酶的固定化方法以及固定化载体自身的性质有关。从图 4 可以看出,固定化酶的 pH 稳定性范围比游离酶更宽。因为 MCM-41 表面富含羟基,这些羟基可以对孔道内的底物溶液的 pH 值起一定的缓冲作用,从而使得孔道内底物溶液的 pH 变化范围小于主体溶液的 pH 变化范围,这很可能是固定化酶 pH 稳定性提高的一个重要原因。

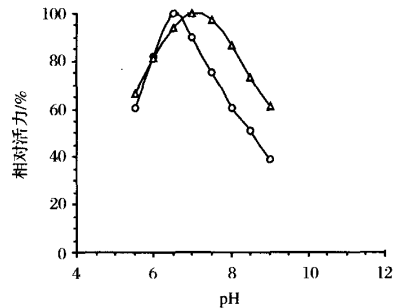


图 3 pH 对游离酶(O)及固定化酶(Δ)活力的影响

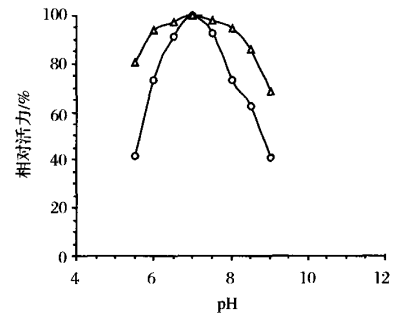


图 4 游离酶(O)及固定化酶(Δ)的 pH 稳定性

图 5 和图 6 分别给出了固定化酶的活力随温度的变化曲线及其在 50℃ 时热稳定性曲线。经过固定

化后,酶的最适温度由 35℃ 上升至 55℃ 左右。当温度超过 65℃ 后,游离酶的活力下降速度加快,这说明游离酶的活力比固定化酶更易受温度影响。从图 6 看出,120 min 后固定化酶的活力仍保持在 90% 以上,而游离酶的活力 40 min 后已降至 60%。估算固定化酶的半衰期在 2500 min 以上,比游离酶原来的 80 min 提高了 30 倍以上。固定化酶热稳定性的提高是由于酶分子的活性位受到了保护。由热传递知,孔道内的温度比孔道外主体溶液的温度要低一些,这可能是固定化酶热稳定性增加的一个主要原因。Li 等^[8]研究了木瓜蛋白酶在聚丙烯腈纤维上的固定化,所得到的固定化酶在 60℃、pH 8.0 的环境中的半衰期为 6 h。

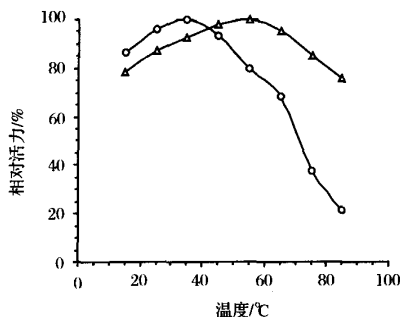


图5 温度对游离酶(O)及固定化酶(Δ)活力的影响

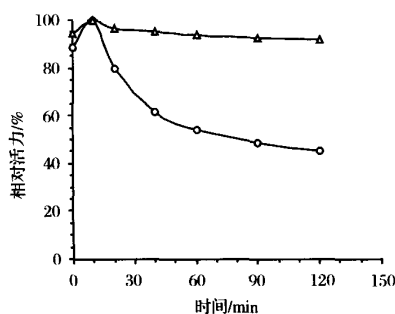


图6 游离酶(O)和固定化酶(Δ)在 50℃ 时的热稳定性

固定化酶的操作稳定性与其热稳定性和 pH 稳定性有直接关系。也就是说固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性越高,则其操作稳定性也会越高。从图 7 可知,固定化酶的操作稳定性很好。经过 12 d 不间断的酶解反应,固定化酶的活力仍保持在初始酶活力的 70% 以上。而固定化酶活力的下降可能是由于一些酶分子的失活或流失引起的。Xue 等^[9]以小孔径的 MCM-48 为载体固定了青霉素酰化酶,仅经过 6 个批次的操作后,固定化酶的剩余活力便降至最初的

83.5%。

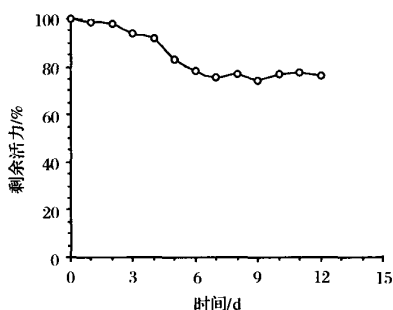


图7 固定化酶的操作稳定性

固定化酶在 4℃ 时的储藏稳定性与游离酶相比也有了显著改善,如图 8 所示。储藏 50 d 后,固定化酶的剩余活力仍保持在 90% 以上,而游离酶只有原来的 56%。Lei 等^[10]以磁性微球为载体固定了木瓜蛋白酶。储藏 45 d 后,固定化酶的剩余活力降至最初的 85%。Khan 和 Iqbal^[11]利用与抗体结合成沉淀的方法固定了木瓜蛋白酶,45 d 后其剩余活力为原来的 84%。

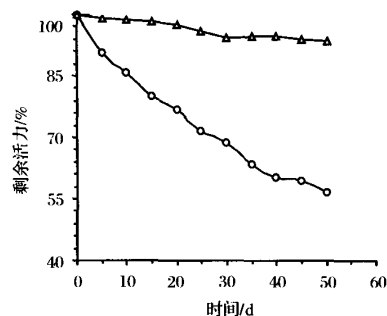


图8 游离酶(O)与固定化酶(Δ)的储藏稳定性

3 结 论

本文在戊二醛做交联剂的条件下,以介孔分子筛 MCM-48 做载体固定化木瓜蛋白酶。所得固定化酶的热稳定性有了显著提高,其半衰期达到 2500 min 以上,是游离酶的 30 倍以上。固定化酶的 pH 稳定性和储藏稳定性也有了明显改善。此外,固定化酶还具有很好的操作稳定性,经过 12 d 的连续酶解,酶活力仍保持在初始酶活力的 70% 以上。因此,用介孔分子筛 MCM-48 固定的木瓜蛋白酶具有很好的应用前景,同时对其他酶或生物催化剂在介孔分子筛 MCM-48 上的固定化也具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- 1 赵元藩,丁认全.木瓜蛋白酶的加工工艺及应用[J].云

- 南师范大学学报, 1999, 19(5): 46~48
- 2 乙引, 陈平, 王茜, 等. 木瓜蛋白酶改良啤酒品质的研究[J]. 贵州农业科学, 2000, 28(4): 14~16
 - 3 Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. Ordered mesoporous molecular-sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism[J]. Nature, 1992, 359: 710~712
 - 4 Beck J S, Vartuli J C, Roth W J, et al. A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates[J]. J Am Chem Soc, 1992, 114: 10 834~10 843
 - 5 Diaz J F, Balkus K J, Jr. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve[J]. J Mol Catal B: Enzymat, 1996(2): 115~126
 - 6 禹剑, 王连洲, 施剑林, 等. 低表面活性剂/硅比率中有序介孔材料的合成[J]. 无机材料学报, 2000, 15(1): 55~61
 - 7 Barrett E P, Joyner L G, Halenda P P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms[J]. J Am Chem Soc, 1951, 73: 373~380
 - 8 Li Y F, Jia F Y, Li J R, et al. Papain immobilization on a nitril fibre carrier containing primary amine groups[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2001, 33: 29~34
 - 9 Xue P, Lu G, Guo Y, et al. A novel support of MCM-48 molecular sieve for immobilization of penicillin G acylase[J]. J Mol Catal B: Enzymat, 2004, 30: 75~81
 - 10 Lei H, Wang W, Chen L, et al. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres [J]. Enzyme Microb Technol, 2004, 35: 15~21
 - 11 Khan S A, Iqbal J. Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2000, 32: 89~94

Immobilization of Papain on Mesoporous Molecular Sieve MCM-48

Zhao Bingchao^{1,2} Ma Runyu¹ Shi Bo²

1(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029, China)

2(Food Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, China)

ABSTRACT The present work dealt with the immobilization of papain on the mesoporous molecular sieve MCM-48 with the aid of a coupling agent, glutaraldehyde. The thermostability of immobilized enzyme was greatly improved. The half-life of the immobilized enzyme was more than 2 500 min, which was significantly higher than that of free enzyme (about 80 min). The influence of pH on immobilized enzyme activity was less than on free enzyme. The immobilized enzyme also showed preferable storage stability as compared with free enzyme. Moreover, the immobilized enzyme exhibited good operational stability, its activity was still over 70% based on the initial activity after 12-day continuous operation.

Key words immobilization, papain, mesoporous molecular sieve MCM-48, glutaraldehyde

我国输美苹果汁被征 51.74% 反倾销税

据美国国际贸易委员会日前的公告,将继续对原产于中国的非冷冻浓缩苹果汁征收 0%~51.74% 的反倾销税。这意味着中国苹果汁行业仍无法摘下“倾销”的帽子,部分企业在对美出口时需缴纳反倾销税。

而追溯 1999 年开始的美对华苹果汁反倾销案,不啻为中国企业应对国外贸易壁垒大获全胜的一场经典之战。中国应诉企业集体抗辩美国商务部裁决不公并胜诉,这在中国反倾销史上是首例。

美国苹果汁协会于 1999 年向美商务部提出对我苹果汁反倾销调查的申请。次年,美商务部终裁我应诉企业税率为 0%~27.57%,其中一家零税率;应诉企业平均税率为 14.88%;其余未应诉企业税率为 51.74%。

鉴于裁决有失公正,我应诉企业集体上诉至美国国际贸易法院。最终,美商务部去年 2 月签署反倾销修正令,我 10 家应诉企业中有 6 家获零税率,4 家获 3.83% 平均税率,未应诉企业为 51.74%。

在反倾销措施决定执行 5 年期满时,美国会就是否终止反倾销措施进行“日落复审”。中国苹果汁行业打赢“日落复审”、摘下“倾销”帽子的可能性很大,但最终大多企业还是放弃了“摘帽”的机会,“企业更多是担心一旦打赢了官司,没有了反倾销税,行业可能会重蹈过去竞相压价、无序竞争的覆辙,由此再惹来美方的‘反倾销’大棒。”

据美国苹果联合会的统计,1999~2004 年,美国从中国进口的苹果汁从 2400 万美元增至 1.55 亿美元。