

# 氧化硅介孔泡沫材料固定木瓜蛋白酶的研究

邹泽昌, 韦奇, 纳薇, 孙慧, 聂祚仁

(北京工业大学材料科学与工程学院, 北京 100124)

**摘要:** 以氧化硅介孔泡沫材料(Siliceous Mesocellular Foam, MCF)为载体对木瓜蛋白酶进行了固定, 并对固定化酶的性能和影响因素以及酶的稳定性作了系统的研究. 结果表明, 木瓜蛋白酶在 MCF 上能获得较大的负载量(334mg/g MCF). 固定化木瓜蛋白酶的最适反应温度较游离酶提高了 10℃, 最适 pH 向碱性方向偏移 0.5 个单位. 固定化木瓜蛋白酶的米氏常数( $K_m$ )为  $6.99 \times 10^{-3}$  mol/L, 在八批次操作后酶活保留 65.1%. 在 4℃ 条件下放置 60d 后, 固定化酶的剩余活性仍保持 75% 以上, 而游离酶的活性只有初始活性的 53.6%. 与游离酶相比, 固定化木瓜蛋白酶的 pH 稳定性、热稳定性、操作稳定性和储藏稳定性都有明显改善, 有利于酶的重复使用和储藏. 介孔泡沫材料是一种良好的木瓜蛋白酶固定载体.

**关键词:** 介孔泡沫材料; 木瓜蛋白酶; 酶固定化; 稳定性

中图分类号: O629; Q814

文献标识码: A

## Immobilization of Papain on Siliceous Mesocellular Foam

ZOU Ze-Chang, WEI Qi, NA Wei, SUN Hui, NIE Zuo-Ren

(College of Materials Science & Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

**Abstract:** Siliceous mesocellular foam (MCF) was employed as carriers in the immobilization of papain, and the properties and the stabilities of the immobilized enzyme were investigated in detail. The results show that the amount of papain immobilized on MCF material reaches 334 mg/g MCF. The optimal pH and reaction temperature of the immobilized papain are 7.5 and 50℃, respectively. The Michaelis constant ( $K_m$ ) of immobilized papain is disclosed as  $6.99 \times 10^{-3}$  mol/L by the Lineweaver-Burk plot at 37℃. The immobilized papain with 65.1% of the activity remains after repeating the catalysis of casein for 8 times. After stored at 4℃ for 60d, the immobilized papain retains 75% of the activity, while the free papain only retains 53.6%. The pH, thermal, operational, storage stabilities of the immobilized enzyme are improved due to the large pore microenvironment and the shield of the mesopores of MCF, which can be considered as excellent supports for papain immobilization.

**Key words:** siliceous mesocellular foam; papain; enzyme immobilization; stability

木瓜蛋白酶(Papain, EC 3.4.22.2)是一种巯基蛋白水解酶, 具有很强的蛋白水解活力, 能催化水解肽键、脂键、酰胺键等, 又含凝乳、溶菌、脂解及蛋白合成等功能, 在轻纺、食品、医药等工业领域中应用广泛<sup>[1-2]</sup>, 在食品中, 用于肉类嫩化、啤酒澄清、饲料添加剂, 饼干松化剂和鱼类加工等; 在工业上, 用于明胶制造、蚕茧脱胶、皮革脱毛等; 在医疗方面, 用于驱除肠道寄生虫的片剂, 用于治疗消化不良、各种炎症和水肿, 防止腹膜粘连, 处理血检及创伤脱痂等;

此外它还用于研究蛋白质结构, 合成生物活性短肽等<sup>[3]</sup>. 但是游离的木瓜蛋白酶稳定性较差, 并且使用后分离纯化较困难, 这大大降低了其使用效率<sup>[4]</sup>, 为了解决这些问题, 人们对该酶的固定化进行了研究. 番木瓜在我国有着大面积的栽培, 在现代人类社会日益追求“绿色天然产品”的趋势下, 它具有诱人的开发前景. 随着科学技术的发展, 对木瓜蛋白酶的固定化研究, 特别是对其固定化载体的研究开发, 将会加快木瓜蛋白酶的工业化应用步伐, 从而带动相关

产业的发展<sup>[5]</sup>。

自从1992年Beck<sup>[6]</sup>和Kresge<sup>[7]</sup>等首次报道了介孔氧化硅材料M41S以来,具有均一可调的介孔孔径、稳定的骨架结构、易于修饰的内表面和高比表面积各个系列的介孔材料(MCM、SBA、PMOs、MSU、KIT、JLU、FDU等)相继被合成出来,这些具有优异性能的无机介孔材料克服了微孔沸石分子筛孔径尺寸不足的限制,在酶固定领域受到众多研究者的关注<sup>[8-11]</sup>。其中MCF是一种具有超大三维介孔和热稳定性的新型材料,其孔径约在20~50nm,是目前所合成的介孔材料中孔径最大的一类材料<sup>[12-13]</sup>。相对于具有较小孔径的MCM-41和SBA-15等二维直孔道介孔材料,MCF大而可调的孔径、较大的孔容及特殊的三维泡沫状结构,不仅加大了酶蛋白分子的负载量,而且有利于反应物和溶剂分子在孔道中的扩散,同时其孔与孔相连接的特殊的窗口结构降低了酶蛋白分子在应用中的泄露现象,在酶的固定方面具有较大的应用前景<sup>[14-15]</sup>。本工作合成了MCF材料,将木瓜蛋白酶组装到其孔道中,并对固定化酶的性能和影响因素以及酶的稳定性做了系统研究。

## 1 实验

### 1.1 氧化硅介孔泡沫材料的制备与表征

在10mL HCl(37%)和65mL去离子水的酸性混合液中加入2.0g表面活性剂P123( $M_{av}=5800$ , Sigma-Aldrich Chemical Company)和2.0g扩孔剂1,3,5-三甲苯(Aldrich Chemical Company Inc),在40℃中搅拌2h直至溶液混合均匀,然后滴加4.6mL的硅源正硅酸乙酯(广东汕头市西陇化工厂),继续搅拌24h。将混合溶液倒入聚四氟乙烯瓶中,于100℃高压釜中水热晶化24h,然后用砂芯漏斗抽滤产物,并依次用无水乙醇、蒸馏水各洗涤3次,室温干燥,最后在马弗炉中加热到500℃煅烧6h除去表面活性剂。采用日本JEOL JEM-2010型透射电镜观察介孔材料结构;氮气吸附-脱附实验在液氮温度(-196℃)下进行,由美国Micromeritics ASAP 2020比表面和孔隙度分析仪自动完成,测定前将样品在真空下200℃预先脱气5h。

### 1.2 木瓜蛋白酶的固定

用磷酸缓冲液(pH=7.0)配制质量浓度为1mg/mL的木瓜蛋白酶(Sigma P3250)溶液,取30mg MCF加入到30mL酶液中于4℃冰箱中搅拌吸附5h,混合液以4000r/min的速度离心5min,保留上清液,沉淀用磷酸缓冲液洗涤,直到溶液中检测不到蛋白酶为止。将洗脱液与上清液混合形成剩余酶液,测定

剩余酶液的浓度就可以计算负载在MCF上的木瓜蛋白酶量,最后将离心所得沉淀放入冰箱中干燥得到固定化酶。

### 1.3 酶活的测定

酶活的定义是在pH=7.0和37℃条件下,1min内每毫克木瓜蛋白酶分解酪蛋白(Casein)产生1 $\mu$ mol酪氨酸作为一个活力单位(U)。具体步骤如下:向5mL浓度为1mg/mL游离酶液(或者30mg固定化酶)中加入5mL激活剂(2mmol/L的L-半胱氨酸和1mmol/L的乙二醇四乙酸在pH7.0磷酸缓冲液中的混合液),置于37℃水浴中10min,然后向混合液中加入5mL浓度为5g/L的底物酪蛋白溶液,反应5min后加入5mL 5wt%的三氯乙酸溶液终止反应,离心分离后用美国Thermo Evolution 600紫外分光光度计在275nm处测定酪氨酸的浓度(根据预先在275nm处测定的酪氨酸标准曲线,相关系数为0.9997),从而计算得到游离酶和固定化酶的活力。

### 1.4 pH、温度对固定酶活力的影响

恒定其它条件,按照酶活力测定的方法,测定游离酶和固定化酶在不同温度、不同pH条件下的活力(以酶活最高者为100%),研究温度和pH对游离酶和固定化酶活性的影响。

### 1.5 酶的稳定性实验

将游离酶和固定化酶放置于不同pH的缓冲溶液24h,然后进行活力测定,研究酶的pH稳定性。将游离酶和固定化酶放置于50℃的缓冲溶液(pH=7.0, 0.1mol/L)中,间隔一段时间测定其活性,研究酶的热稳定性。将已测定酶活的固定化酶用去离子水洗涤,抽滤,测定上清液中酶蛋白的含量,重复上述操作,比较多次测定结果,由酶蛋白的脱落程度来比较固定化酶的操作稳定性。最后,将固定化酶储藏于4℃的冰箱中,间隔一段时间测定其活力,研究其活力与储藏时间的关系,即固定化酶的储藏稳定性。

### 1.6 米氏常数 $K_m$ 的测定

分别用1.00、1.25、2.50、3.75、5.00g/L的酪蛋白磷酸缓冲溶液为底物在pH=7.0和37℃条件下测定游离酶和固定化酶的活力,从而计算出米氏常数 $K_m$ 的值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 介孔泡沫材料的结构及酶固定化

从介孔泡沫材料的TEM图(图1)可以看出,所合成的MCF具有较大的孔径(>20nm),孔与孔之间由较小的窗口相连通,没有规则的介观结构,呈现泡沫状结构,这与文献[13]报道的一致。

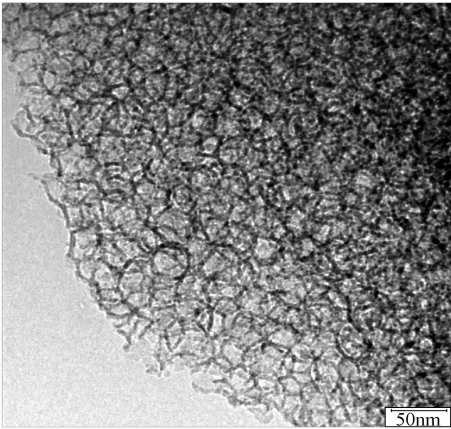


图 1 介孔泡沫材料的 TEM 图像  
Fig. 1 TEM image of MCF sample

从图 2 木瓜蛋白酶固定前后 MCF 材料的吸附-脱附等温线中可以看出, 固定前后样品都具有典型的第 IV 类等温线和 H1 型滞后环, 这表明酶蛋白的进入并未破坏 MCF 的介孔骨架结构, 但由于酶蛋白部分地填充了 MCF 的孔道, 导致比表面积和孔容都减小. 比表面积从  $469\text{m}^2/\text{g}$  降低到  $95\text{m}^2/\text{g}$ , 孔容从  $1.52\text{cm}^3/\text{g}$  降低到  $0.26\text{cm}^3/\text{g}$ , 说明大量酶分子成功组装进了 MCF 的孔道中. 由于木瓜蛋白酶分子尺寸为  $3.5\text{nm} \times 3.5\text{nm} \times 3.7\text{nm}$ , 与所得介孔泡沫材料 MCF 窗口尺寸 ( $5.6\text{nm}$ ) 相互匹配, 一方面, 酶分子通过这些小窗口能快速进入孔道内部; 另一方面, 当吸附达到饱和后, 这些小窗口又起到降低酶泄露的作用. 木瓜蛋白酶在 MCF 载体上的负载量达到  $334\text{mg/g}$  MCF, 其较高的负载量可归因于 MCF 三维泡沫结构及其较大的孔容 ( $d = 29.7\text{nm}$ ,  $V = 1.52\text{cm}^3/\text{g}$ ).

2.2 pH、温度对固定酶活力的影响

从图 3 可以看出, 固定化酶的最适 pH 值为 7.5, 较游离酶向碱性方向移动了 0.5 个 pH 值单位. 这可

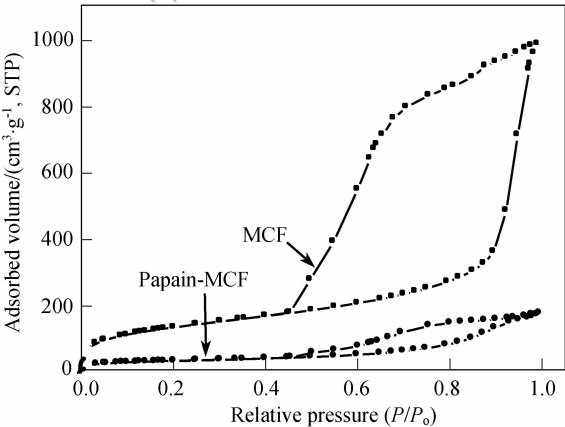


图 2 酶固定化前后 MCF 的吸附-脱附等温线  
Fig. 2  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherms of MCF and papain-immobilized MCF (papain-MCF)

能是由于 MCF 内表面含有丰富的羟基, 带负电, 载体会吸引反应液中的氢离子到其附近, 产生  $\text{H}^+$  浓度梯度; 另外, 酪蛋白的水解产物是含有酚羟基的酪氨酸酸性产物, 产物的扩散活动受到介孔材料内部微环境的约束和限制, 以至在介孔孔道里出现局部的 pH 浓度梯度. 所以, 越靠近微环境表面的地方, pH 值越低, 这时外部环境的 pH 值就要提高一点, 这样才能抵消微环境的这种作用, 使酶达到最适 pH, 充分发挥其催化功能.

由图 4 可以看出, 固定化酶的最适反应温度为  $50^\circ\text{C}$ , 较游离酶升高了  $10^\circ\text{C}$ , 当温度超过  $50^\circ\text{C}$  时, 随着温度的升高, 游离酶的活性下降很快, 而固定化酶的活性则下降得相对较慢, 这说明固定化酶受温度的影响较小. 固定化酶的酶分子受到介孔骨架的屏蔽作用, 另外酶分子与孔道内壁上的羟基之间的氢键作用使其构象的稳定性有了一定程度的提高, 从而导致固定化酶的活性受到温度的影响相应减小.

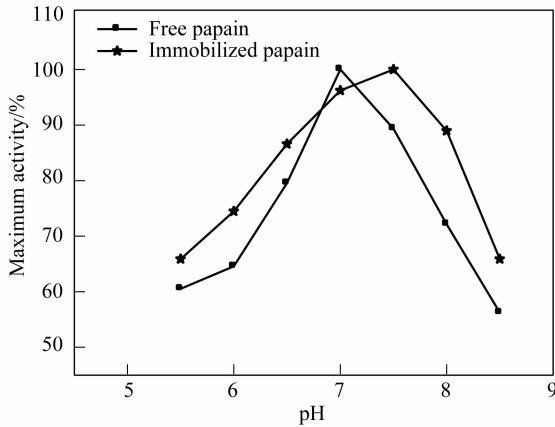


图 3 pH 对酶活性的影响  
Fig. 3 Effect of pH on the activity of free papain and immobilized papain

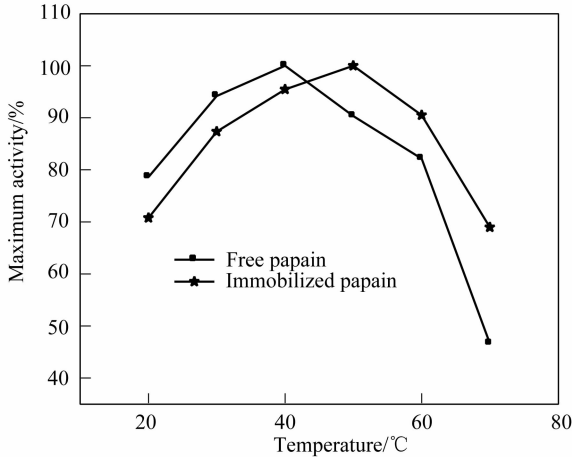


图 4 温度对酶活性的影响  
Fig. 4 Effect of temperature on the activity of free papain and immobilized papain

2.3 固定化酶的 pH 稳定性和热稳定性

从图 5 可以看出,在 pH 为 6.0~8.5 的范围内,固定化酶的活力保持在 80% 以上,并且在碱性条件下,随 pH 的变化没有游离酶明显,耐碱性能增强,酶经过固定化后,其 pH 稳定性有了一定程度的改善. MCF 的表面有许多羟基,对孔道中的溶液 pH 起到缓冲作用,使得孔道内溶液与外部的主体溶液相比,其 pH 变化范围要窄一些,这可能是固定化酶 pH 稳定性升高的原因.

从图 6 可以看出,在 50℃、0.1mol/L 磷酸缓冲液中放置 40min 后,游离酶的活力只有最初的 70% 左右,而固定化酶在同样条件下放置 40min 后,其活性仍在最初的 90% 以上,可能是由于酶的固定化抑制了酶在孔道中的聚集或构象转变,热稳定性有了很大程度的改善.

2.4 固定化酶的操作稳定性和储藏稳定性

从图 7 中可以看出,经过前两批次的反应后,酶活下降得较多,可能是载体表面吸附着游离的木瓜

蛋白酶,还有在离心和洗涤过程中,固定在 MCF 孔道口的木瓜蛋白酶脱落下来导致总体酶活下降;而接下来的几个批次酶活相差不大. 八批次后酶活保留 65.1%,说明吸附在载体上的木瓜蛋白酶基本没有脱落,固定化酶的操作稳定性较好.

从游离酶和固定化酶的储藏稳定性随时间的变化曲线(图 8)可以看出,在 4℃ 条件下放置 60d 后,固定化酶的剩余活性仍保持 75% 以上,而游离酶的活性只有初始活性的 53.6%. 结果表明,与游离酶相比,固定化酶的储藏稳定性有了很大程度的改善.

2.5 米氏常数(Km 值)

米氏常数是酶的特征常数(它与温度、pH 值和酶的性质有关,与酶浓度无关),表明酶与催化底物的亲和性大小. 由于载体内部介孔孔道的影响,固定化酶与底物酪蛋白的亲和力会发生变化.

按 Lineweaver-Burk 双倒数曲线法(图 9)求得的固定化木瓜蛋白酶的米氏常数  $K_m$  为  $6.99 \times 10^{-3}$  mol/L,稍大于游离酶的  $6.71 \times 10^{-3}$  mol/L,说明固定后木瓜蛋白酶与底物的亲和力变化较小,这是由于 MCF 的大孔径及特殊的三维泡沫状结构,对孔道内

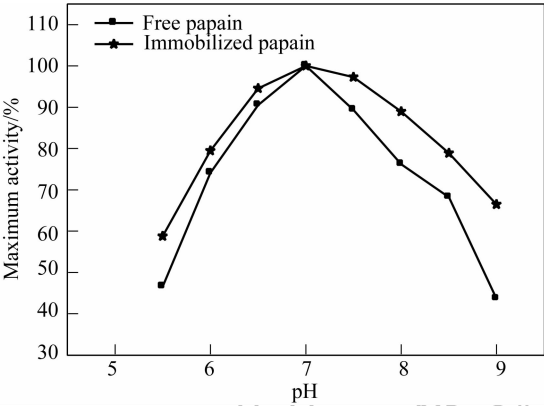


图 5 游离酶和固定化酶的 pH 稳定性  
Fig. 5 pH stabilities of free papain and immobilized papain incubated in different pH buffer (0.1mol/L) at 25℃ for 24h

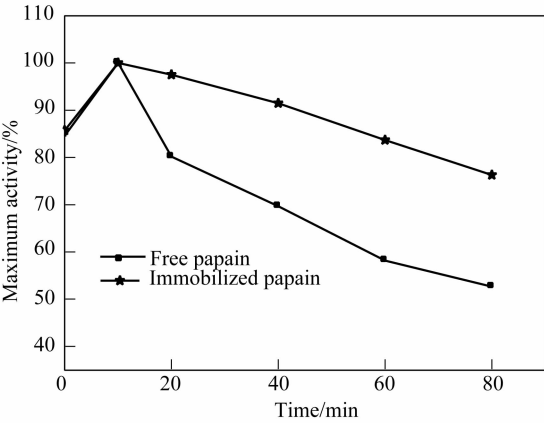


图 6 游离酶和固定化酶的热稳定性  
Fig. 6 Thermal stabilities of free papain and immobilized papain incubated in 0.1mol/L phosphate buffer at 50℃

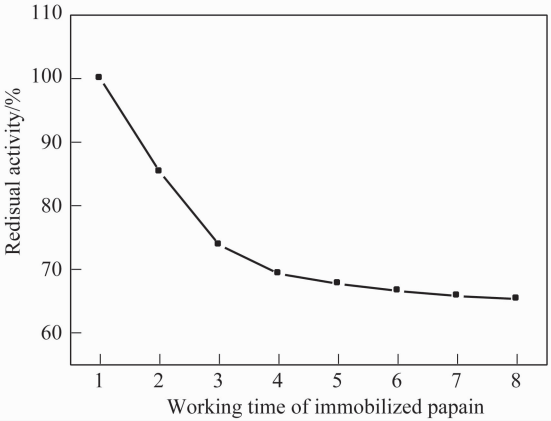


图 7 固定酶的操作稳定性  
Fig. 7 Operational stability of immobilized papain

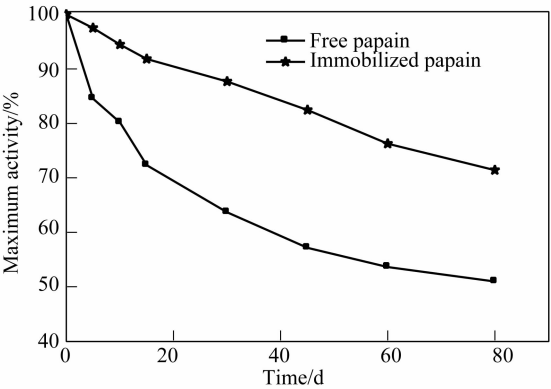


图 8 游离酶和固定化酶的储藏稳定性  
Fig. 8 Storage stabilities of free papain and immobilized papain stored at 4℃

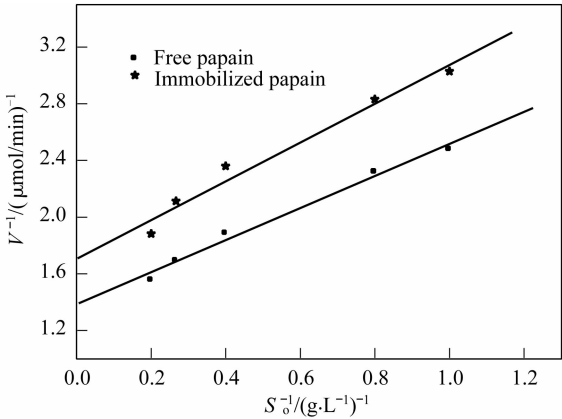


图 9 游离酶和固定化酶的 Lineweaver-Burk 线  
Fig. 9 Lineweaver-Burk plot of free papain and immobilized papain in 0.1mol/L phosphate buffer (pH = 7.0) at 37℃

的酶分子构象影响较小,而且有利于反应物和溶剂分子在孔道中的扩散. 固定化酶  $K_m$  值有所升高可从两个方面进行解释:一方面,在 pH = 7.0 的缓冲溶液中,载体所带负电荷和底物所带负电荷之间会产生排斥作用,以致只有增加底物浓度,才能获得最大反应速度,故  $K_m$  值升高;另一方面,酶经过固定化后产生了扩散限制效应及空间位阻作用,导致  $K_m$  值升高.

3 结论

以氧化硅介孔泡沫材料为酶固定化载体,由物理吸附法所制得的固定化木瓜蛋白酶具有较高的负载量,达到 334mg/g MCF,米氏常数  $K_m$  为  $6.99 \times 10^{-3} mol/L$ . 与游离酶相比,固定化酶的 pH 稳定性、热稳定性、操作稳定性和储藏稳定性都有明显

的改善,有利于酶的重复使用和储藏. MCF 是一种良好的木瓜蛋白酶固定载体.

参考文献:

[1] Nitsawang S, Rajni H K, Kanasawud P. *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, **39**(5): 1103-1107.

[2] 乙引,张显强,唐金刚,等. 贵州师范大学学报, 2002, **20**(1): 11-14.

[3] Atkinson B, Mavituna F. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. HongKong: The Natural Press, 1985:508-509.

[4] Sangeetha K, Abraham T E. *J. Mol. Catal. B; Enzyme*, 2006, **38**(3-6): 171-177.

[5] 叶启腾,陈强. 广西热作科技, 1999, **4**(73): 34-35.

[6] Beck J S, Vartuli J C, Roth W J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**(27): 10834-10843.

[7] Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. *Nature*, 1992, **359**(6397): 710-712.

[8] Diaz J F, Balkus K J. *J. Mol. Catal. B; Enzymat*, 1996, **2**(2/3): 115-126.

[9] Hudson S, Coney J, Hodnett B K, et al. *Chem. Mater.*, 2007, **19**(8): 2049-2055.

[10] Qiao S Z, Yu C Z, Xing W, et al. *Chem. Mater.*, 2005, **17**(24): 6172-6176.

[11] 高波,朱广山,付学奇,等. 高等学校化学学报, 2005, **26**(10): 1852-1854.

[12] Schmidt-Winkel P, Lukens W W, Yang P D, et al. *Chem. Mater.*, 2000, **12**(3): 686-696.

[13] Schmidt-Winkel P, Lukens W W, Zhao D Y, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**(1): 254-255.

[14] Hudson S, Coney J, Hodnett B K, et al. *Chem. Mater.*, 2007, **19**(17): 2049-2055.

[15] Park K H, Kim S, Chung Y K. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2008, **29**(10): 2057-2060.