

大分子拥挤下介孔中木瓜蛋白酶的微波辅助固定化

刘明庆¹, 王安明¹, 王华¹, 周成¹, 杜志强¹, 祝社民², 杨明¹, 张俊¹, 沈树宝¹

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009;

2. 南京工业大学材料科学与工程学院材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 为了增强酶的固定化效果, 通过添加大分子试剂, 在微波辐射作用下将木瓜蛋白酶固定在介孔泡沫硅的孔道中. 结果表明, 在加酶量为 400 mg/g 时, 微波辐射下木瓜蛋白酶与牛血清白蛋白(BSA)共固定化制得的固定化酶催化效果最好. 当 BSA 含量为加酶量的 5%(ω)时, 固定化酶表观活力高达 419.1 U/mg, 相对活力和酶活回收率分别为 126.0%和 119.1%. 影响固定化酶活力的主要因素依次为加酶量、BSA 含量、微波功率和固定化 pH. 该固定化酶的最适反应 pH 为 7.0, 最适反应温度为 75 °C, 热稳定性优于游离酶和未加入 BSA 的固定化酶, 80 °C 下热处理 3 h, 剩余活力仍为初始活力的 88.2%.

关键词: 木瓜蛋白酶; 微波辐射; 介孔泡沫硅; 大分子拥挤; 固定化

中图分类号: Q556.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2009)01-0157-04

1 前言

木瓜蛋白酶(Papain, EC 3.4.22.2)在食品、医药等领域中应用广泛^[1,2], 然而游离酶对温度、pH 等的耐受性较差, 且难以回收利用. 国内外对木瓜蛋白酶的固定化进行了广泛的研究, 各种新型的固定化载体和固定化方法不断被提出和应用^[3-7]. Diaz 等^[3]用 MCM-41 吸附固定木瓜蛋白酶, 酶的固定化效率与 pH 有关, 最佳 pH < 7, 但该固定化酶的酶负载量只有 4.9 mg/g; Li 等^[4]采用溶胶-凝胶法把木瓜蛋白酶固定在棉织物上, 酶的热稳定性与游离酶相比没有显著提高; Zhao 等^[5]用戊二醛把木瓜蛋白酶交联固定在 MCM-48 载体上, 酶负载量仅为 20 mg/g, 酶活力为 8.9 U/mg; 高波等^[6]采用冷冻-真空吸附法把木瓜蛋白酶固定在介孔材料 SBA-15 中, 因该类载体孔道性能的限制, 使加酶量 1000 mg 条件下, 酶负载量只达 450 mg/g, 王安明等^[7]研究了银纳米粒子在木瓜蛋白酶固定化中的应用, 80 °C 下处理 2 h, 固定化酶剩余活力为初始活力的 30% 左右. 然而酶在细胞外的催化活力远低于在细胞内, 根据酶的仿生效应, 模拟生物体中酶的胞内环境^[8], 可以提高酶的催化活性. 同时随着大分子拥挤效应的深入研究^[9], 加入拥挤试剂以模拟细胞内拥挤环境^[10], 从而提高酶的催化性能已成为研究热点.

同时, 随着微波控制技术和专业反应系统的发展, 微波辐射具有的加快物质传输、加快化学反应等优点^[11]已被广泛用于有机合成、食品医药等许多领域^[12,13]. 王

华等^[14]在微波辐射下将青霉素酰化酶固定在介孔泡沫硅材料(Mesocellular Siliceous Foams, MCFs)中, 明显提高了固定化酶的性能. 然而在不控温的情况下, 微波辐射会使体系温度上升很快, 容易导致蛋白酶的自解, 从而破坏酶的结构. 本工作利用制备的 MCFs^[15], 加入大分子拥挤试剂, 组合微波反应器的智能控温系统和冰浴条件, 通过微波辐射将木瓜蛋白酶固定至其孔道中, 初步探讨了胞外大分子拥挤环境对木瓜蛋白酶固定化的影响.

2 实验

2.1 主要试剂及仪器

木瓜蛋白酶(广西南宁庞博生物工程有限公司), 考马斯亮蓝 G250(国药集团化学试剂有限公司), 酪蛋白(上海青析化工科技有限公司), 聚蔗糖 Ficoll 70(70 kDa, Fluka), 牛血清白蛋白 BSA(国药集团化学试剂有限公司), 葡聚糖 Dextran 10(10 kDa, Sigma), 葡聚糖 Dextran 40(40 kDa, Sigma), 乙二胺四乙酸 EDTA(上海凌峰化学试剂有限公司), 三氯乙酸(国药集团化学试剂有限公司), L-半胱氨酸(中国惠生化试剂有限公司).

MARS5 微波反应器(美国 CEM 公司), BP110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司), LAMBDA25 紫外-可见扫描光谱仪(美国 Pekin-Elmer 公司), PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁电子厂), W201 恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司), 磁力搅拌器(江苏金坛医疗仪器厂),

收稿日期: 2008-04-17, 修回日期: 2008-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20376034); 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2006AA02Z211); 江苏省自然科学基金资助项目(编号: BK2006181); 江苏省高校研究生创新计划资助项目(编号: 2007)

作者简介: 刘明庆(1984-), 男, 江苏省兴化市人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化工; 沈树宝, 通讯联系人, Tel: 025-83587349, E-mail: zsbshen@njut.edu.cn.

EXPERT 20K-R 台式高速冷冻离心机(长沙市鑫奥仪器仪表有限公司), SHZ-82 水浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司).

2.2 木瓜蛋白酶在微波辐射下的固定化

据文献^[15]制备带模板的 MCFs, 并对其去模板^[14,16], 得到去模板的 MCFs. 固定化过程中将 20 mg 去模板的 MCFs 分散于 2 mL pH 9.0 的磷酸缓冲液(PBS 0.1 mol/L)中, 加入 1 mL 木瓜蛋白酶酶液(酶/MCFs 400 mg/g), 在设定功率下磁力搅拌, 冰浴, 微波反应 80 s. 反应结束后, 用 0.01 mol/L pH 7.0 的 PBS 洗涤, 离心得到固定化酶, 同时收集上清液, 用 Bradford 法^[17]测定上清液中的酶含量.

在大分子拥挤试剂与酶的共固定过程中, 分别将 Ficoll 70, BSA, Dextran 10, Dextran 40 四种大分子试剂与酶液一起与介孔载体 MCFs 混合, 并在微波辐射下将其与酶共同固定在 MCFs 中, 从而制得具有大分子拥挤的固定化酶.

2.3 木瓜蛋白酶的酶活测定

以酪蛋白为底物测定木瓜蛋白酶活力. 木瓜蛋白酶的一个标准活力单位(U)定义为 37℃及 pH 7.0 条件下, 1 min 内产生 1 μg 酪氨酸的酶量. 酶的负载率、相对活力和活力回收率分别按下述公式进行计算:

$$\text{负载率} = (\text{加入酶总量} - \text{上清液中酶总量}) / \text{加入酶总量} \times 100\%$$

$$\text{相对活力} = \text{固定化酶的总活力} / \text{等量游离酶的总活力} \times 100\%$$

$$\text{酶活回收率} = \text{固定化酶的总活力} / \text{加入酶的总活力} \times 100\%$$

游离酶活力测定: 将 100 μL 1 mg/mL 的酶液和 3 mL 酶激活剂(含 0.005 mol/L L-半胱氨酸和 0.002 mol/L EDTA 的 pH 7.0 的 PBS)混匀, 37℃水浴中预热 3 min, 再加入 0.7% pH 7.0 的酪蛋白溶液 7 mL (37℃水浴预热), 37℃下振荡反应 10 min, 然后加入 10 mL 5%(w)的三氯乙酸溶液, 在 37℃下振荡 15 min 后过滤, 测滤液 275 nm 处的吸光值.

空白: 加入底物前先加入三氯乙酸, 其余步骤不变.

固定酶活力测定: 称取一定量固定化酶, 试剂和步骤与游离酶活力测试相同.

3 结果与讨论

3.1 微波辐射功率的确定

将 MCFs 分散于 2 mL 0.1 mol/L pH 9.0 的 PBS 中, 加入 1 mL 木瓜蛋白酶酶液, 冰浴, 磁力搅拌下微波辐射 120 s, 设定功率为 100~400 W, 实验结果见图 1. 300 W 时酶活最高, 微波功率进一步增加, 相对酶活开始下降. 一方面微波辐射可以提供额外的促进力, 加快传质

速度^[18], 从而大大缩短固定化时间; 另一方面, 微波辐射强度过大会使酶结构发生改变, 影响酶的催化性能.

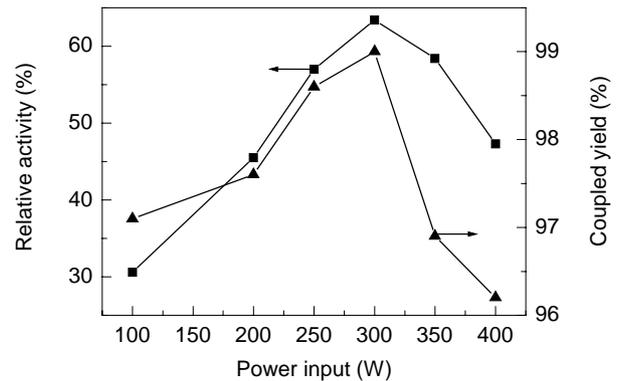


图1 微波辐射功率对固定化酶的影响

Fig.1 Effect of power input of microwave on the immobilized enzyme

3.2 大分子试剂种类对酶固定化的影响

选取 Ficoll 70, Dextran 10, BSA 和 Dextran 40 四种生物大分子试剂, 含量均为加酶量的 5%(w), 分别将其与载体一起分散于酶液中, 冰浴, 300 W 微波辐射 80 s (条件经实验优化), 将酶与大分子试剂一起固定在载体上. 从表 1 可以看出, 相同固定化条件下, 加入大分子试剂的固定化酶催化效果明显优于未加任何大分子试剂的固定化酶, 添加 BSA 的固定化酶催化效果最佳.

表 1 不同大分子试剂对固定化酶的影响
Table 1 Effect of various macromolecular agents on the immobilized enzyme

Enzyme preparation	Coupled yield (%)	Relative activity (%)
MCFs-papain (CM ¹⁾)	96.7	55.5
MCFs-papain (MWM ²⁾)	97.9	81.1
MCFs-papain-Ficoll 70 (MWM)	96.2	111.1
MCFs-papain-Dextran 10 (MWM)	98	110.4
MCFs-papain-BSA (MWM)	94.5	126.0
MCFs-papain-Dextran 40 (MWM)	97.4	121.4

Note: 1) Conventional method; 2) Microwave-assisted method.

3.3 大分子含量对酶固定化的影响

加入 BSA 对提高固定化酶的活力有显著效果. 图 2 给出了固定化酶相对活力随 BSA 含量变化曲线, 固定化酶活力呈现先增后减的趋势, 当 BSA 含量为加酶量的 5%(w)时, 固定化酶的相对酶活最大, 为 126.0%, 其表观活力达 419.1 U/mg(以干酶计).

3.4 影响固定化酶活力的主要因素

结合上述实验结果, 采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 考察微波功率(A)、加酶量(B)、BSA含量(C)和固定化pH(D)四个重要因素对固定化酶活力的影响. 实验结果如表2所示, 4种因素对固定化酶相对活力的影响程度为 $B > C > A > D$, 最佳条件是 $B_1C_2A_2D_3$, 即加酶量

400 mg/g, BSA 含量为 5%, 微波功率 300 W, 固定化 pH 为 9, 这与上述实验结果一致。

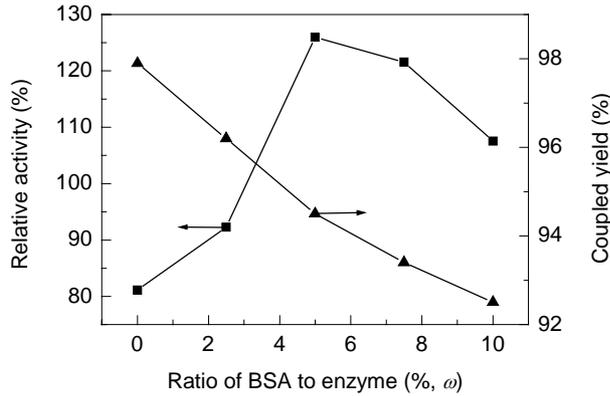


图 2 BSA 含量对固定化酶的影响
Fig.2 Effect of the ratio of BSA to enzyme on the immobilized enzyme

表 2 正交实验设计及结果

Table 2 The results of orthogonal experiments

Test	A	B	C	D	Relative activity (%)
1	1(200)	1(400)	1(2.5%)	1(7)	63.78
2	1(200)	2(800)	2(5.0%)	2(8)	67.29
3	1(200)	3(1200)	3(7.5%)	3(9)	51.47
4	2(300)	1(400)	2(5.0%)	3(9)	125.97
5	2(300)	2(800)	3(7.5%)	1(7)	60.12
6	2(300)	3(1200)	1(2.5%)	2(8)	57.16
7	3(400)	1(400)	3(7.5%)	2(8)	78.43
8	3(400)	2(800)	1(2.5%)	3(9)	57.04
9	3(400)	3(1200)	2(5.0%)	1(7)	50.12
k_1	60.85	89.39	59.33	58.01	
k_2	81.08	61.48	81.13	67.63	
k_3	61.86	52.92	63.34	78.16	
R	20.24	36.48	21.80	20.15	

3.5 固定化酶的 pH 及温度特性

如图 3 所示, 游离酶的最适催化反应 pH 为 6.5, 而固定化酶则偏移至 7.0, 加入 BSA(含量为 5%)的固定化木瓜蛋白酶最适反应 pH 并未发生明显变化, 但其酶活力比游离酶和未加 BSA 的固定化酶明显增加。

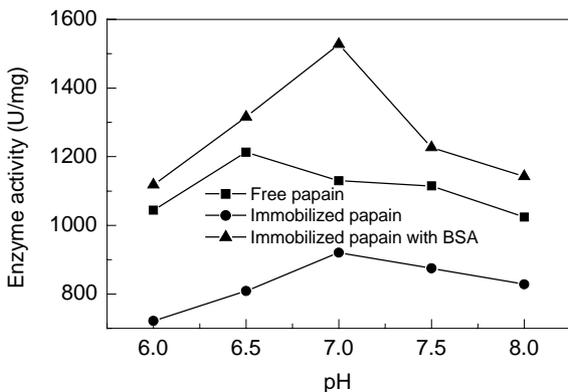


图 3 pH 对游离酶和固定化酶活力的影响
Fig.3 Effect of pH on the activities of free and various immobilized enzymes

固定化酶的最适温度与游离酶相比没有变化, 仍为 75 °C, 如图 4 所示. 此外, 固定化酶活力下降速度低于游离酶。

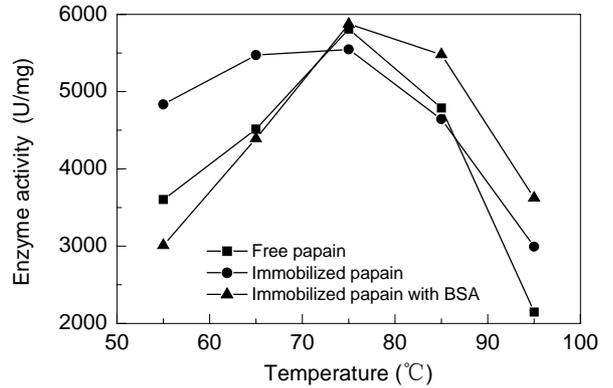


图 4 温度对游离酶和固定化酶活力的影响
Fig.4 Effect of temperature on the activities of free and various immobilized enzymes

3.6 固定化酶的热稳定性

取一定量游离酶、未加入 BSA 的固定化木瓜蛋白酶和加入 BSA(含量为加酶量的 5%)的固定化木瓜蛋白酶, 80 °C 水浴处理 1~4 h 后, 迅速冷却至 37 °C 测定酶活, 计算各自的剩余活力. 从图 5 可以看出, 热处理 1 h 后, 游离酶的残余活力急剧下降, 固定化酶仍能保持相对缓慢的下降趋势, 而加入 BSA 的固定化酶活力则维持在较高水平. 热处理 3 h 后, 加入 BSA 的固定化酶活力仍维持在 88.2%, 而普通固定化酶剩余活力已降到 80% 以下, 明显优于文献^[6,7]结果。

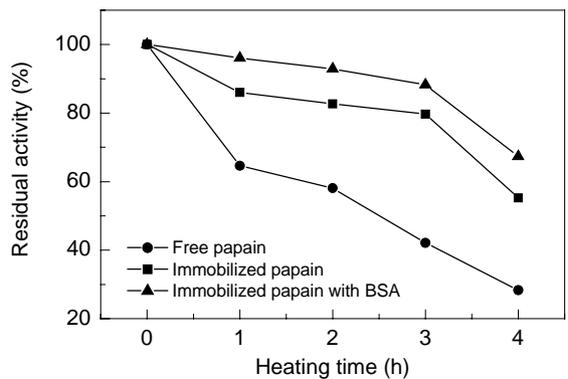


图 5 80 °C 处理后游离酶和固定化酶的剩余活力
Fig.5 Residual activities of free and various immobilized enzymes treated at 80 °C

4 结论

(1) 探讨了大分子试剂种类对酶固定化的影响, 比较实验结果可知, 添加 BSA 的木瓜蛋白酶固定在 MCFs 载体上制得的固定化酶催化效果最好, BSA 的最佳含量

为加酶量的 5%(ω)；此时固定化酶表观活力为 419.1 U/mg, 相对活力和酶活回收率分别为 126.0%和 119.1%.

(2) 影响固定化酶活力的主要因素依次为加酶量、BSA 含量、微波功率和固定化 pH.

(3) 与游离酶和未加 BSA 的固定化酶相比, 加入 BSA 的固定化酶热稳定明显提高, 在 80 °C 下处理 3 h 后, 酶活力仍保持在初始活力的 88.2%.

参考文献:

- [1] Sangeetha K, Abraham T E. Chemical Modification of Papain for Use in Alkaline Medium [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2006, 38(3/6): 171–177.
- [2] Hayashi T, Hyon S H, Cha W I, et al. Immobilization of Thiol Proteases onto Porous Poly(vinyl alcohol) Beads [J]. *Polym. J.*, 1993, 25(5): 489–497.
- [3] Diaz J F, Balkus K J Jr. Enzyme Immobilization in MCM-41 Molecular Sieve [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1996, 2(2/3): 115–126.
- [4] Li F Y, Xing Y J, Ding X. Immobilization of Papain on Cotton Fabric by Sol-Gel Method [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, 40(7): 1692–1697.
- [5] Zhao B C, Shi B, Ma R Y. Immobilization of Papain on the Mesoporous Molecular Sieve MCM-48 [J]. *Eng. Life Sci.*, 2005, 5(5): 436–441.
- [6] 高波, 朱广山, 付学奇, 等. 冷冻-真空吸附法在介孔材料中固定木瓜蛋白酶 [J]. *吉林大学学报(理学版)*, 2005, 43(6): 858–862.
- [7] 王安明, 宗璟, 王华, 等. 银纳米粒子在木瓜蛋白酶固定化中的应用 [J]. *过程工程学报*, 2007, 7(5): 1018–1021.
- [8] Minton A P. How Can Biochemical Reactions within Cells Differ from Those in Test Tubes? [J]. *J. Cell Sci.*, 2006, 119(4): 2863–2869.
- [9] Ellis R J, Minton A P. Cell Biology: Join the Crowd [J]. *Nature*, 2003, 425: 27–28.
- [10] Ellis R J. Macromolecular Crowding: An Important but Neglected Aspect of the Intracellular Environment [J]. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 2001, 11(1): 114–119.
- [11] Dallinger D, Kappe C O. Microwave-assisted Synthesis in Water as Solvent [J]. *Chem. Rev.*, 2007, 107(6): 2563–2591.
- [12] Galema S A. Microwave Chemistry [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 1997, 26(3): 233–238.
- [13] Adam D. Microwave Chemistry: Out of the Kitchen [J]. *Nature*, 2003, 421: 571–572.
- [14] 王华, 王安明, 周成, 等. 微波辐射高效共价固定青霉素酰化酶 [J]. *化学学报*, 2008, 66(2): 271–275.
- [15] Schmidt W P, Lukens W W, Zhao D Y, et al. Mesocellular Siliceous Foams with Uniformly Sized Cells and Windows [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121(1): 254–255.
- [16] Wang A M, Wang H, Zhu S M, et al. An Efficient Immobilizing Technique of Penicillin Acylase with Combining Mesocellular Silica Foams Support and *p*-Benzoquinone Cross Linker [J]. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2008, 31(5): 509–517.
- [17] Kruger N. The Bradford Method for Protein Quantitation Protein Protocols Handbook, 2nd ed [M]. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1994. 15–22.
- [18] Galinada W A, Guiochon G. Influence of Microwave Irradiation on the Intraparticle Diffusion of an Insulin Variant in Reversed-phase Liquid Chromatography under Linear Conditions [J]. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1163(1/2): 157–168.

Immobilization of Papain by Macromolecular Crowding in Mesopores under Microwave Irradiation

LIU Ming-qing¹, WANG An-ming¹, WANG Hua¹, ZHOU Cheng¹, DU Zhi-qiang¹,
ZHU She-min², YANG Ming¹, ZHANG Jun¹, SHEN Shu-bao¹

(1. State Key Lab. Materials-oriented Chem. Eng., Col. Life Sci. Pharm. Eng., Nanjing Univ. Technol., Nanjing, Jiangsu 210009, China;
2. State Key Lab. Materials-oriented Chem. Eng., Col. Mater. Sci. Eng., Nanjing Univ. Technol., Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: To improve the immobilization of papain, papain was immobilized on the mesocellular siliceous foams (MCFs) by macromolecular crowding under microwave irradiation. It was observed that the immobilized enzyme exhibited the highest catalysis activity when papain was co-immobilized on MCFs with bovine serum albumin (BSA) and the ratio of enzyme to support at 0.4 (ω). The observed activity of dry immobilized enzyme was 419.1 U/mg, the relative activity and activity yield of immobilized enzyme 126.0% and 119.1%, respectively, when the ratio of BSA to papain was 5%(ω). The main factors influencing the activity of immobilized enzyme were orderly the amount of papain, ratio of BSA to enzyme, power input of microwave and pH. The optimum pH and temperature of immobilized enzyme were 7.0 and 75 °C, respectively. The co-assembled papain with BSA was more resistant to heat than free enzyme and the papain assembled solely in MCFs. Its residual activity was still maintained as 88.2% of the initial activity after heating at 80 °C for 3 h.

Key words: papain; microwave irradiation; mesocellular siliceous foams; macromolecular crowding; immobilization