

水滑石固定化木瓜蛋白酶制备的研究

籍 宏 王艳辉 马润宇*

(北京化工大学可控化学反应科学与技术基础教育部重点实验室,北京 100029)

摘 要: 文中研究了阴离子型层状材料—水滑石(LDHs)作为载体,经过戊二醛活化处理后采用共价结合的方法固定化木瓜蛋白酶。讨论了层板电荷密度对固定化酶活的影响,并优化固定化时间、温度、pH 值、给酶量和戊二醛质量分数等固定化条件,实验结果显示:木瓜蛋白酶的最佳固定化条件是给酶量为每 0.5 g 载体固定 16 mL 10 g/L 的溶液酶,固定化温度 15 °C, pH 7.0,固定化时间 12~24 h,与 2 mL 质量分数为 0.5% 的戊二醛交联,所得固定化木瓜蛋白酶酶活回收率平均可达 55% 左右。

关键词: 水滑石;木瓜蛋白酶;固定化

中图分类号: Q814.2

引 言

木瓜蛋白酶[EC 3.4.22.2]是一种来源广泛的植物蛋白酶,对蛋白质、短肽化合物、氨基酸酯以及酰胺等多类化合物的水解反应都具有良好的催化活性,同时也可用于催化合短肽和低聚氨基酸,它在食品工业中有广泛的用途,也用于医药、饲料、纺织和制革业。

水滑石(Layered Double Hydroxides, 简写 LDHs)是一类具有广泛应用前景的无机材料。其结构非常类似于水镁石 $Mg(OH)_2$,由 MgO_6 八面体共用棱形成单元层,位于层上的 Mg^{2+} 可在一定范围内被半径相似的 Al^{3+} 同晶取代,使得 Mg^{2+} , Al^{3+} , OH^- 层带正电荷,层间可交换的阴离子 CO_3^{2-} 与层上正电荷平衡,使得这一结构呈电中性,整体呈现有序层状。研究表明类水滑石层板厚度是 0.48 nm^[1],阴离子在层间的数量、尺寸、取向、键强度以及 LDHs 层板的羧基基团决定层间厚度。

本文采用典型的 CO_3^{2-} 镁铝水滑石,层间距约 0.76 nm。其层板结构及板间距适于酶分子进入,通过引入活性基团,使酶分子与层板形成共价键,具有作为固定化酶载体的可行性。由于无机材料拥有成

本低廉、易制取、无毒等特点,在固定化酶方面的应用越来越被重视。目前,以水滑石为载体固定化木瓜蛋白酶国内外还尚未有过报道,本文则重点以水滑石作为固定化酶的载体,摸索出一套适宜的固定化方法,并优化固定化条件。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

木瓜蛋白酶 市售;水滑石(LDHs) 自制;戊二醛、苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE), EDTA, L-Cys 等均为分析纯、市售。

HJ90B 数字式 pH 计 北京海淀航天计算机公司;离心机上海安亭科学仪器厂;T2-2EH 恒温振荡培养箱北京沃德电子实验仪器设备厂;78-1 型磁力加热搅拌器 杭州仪表电机厂。

1.2 实验方法

1.2.1 水滑石制备 目前,对水滑石类化合物的制备已经做了大量的工作,主要可分为直接合成法、离子交换法和焙烧复原法^[2-3],本实验中采用直接合成法(也叫水相沉淀结晶法^[4])制备水滑石。

1.2.2 酶活性的测定 以 BAEE 为底物,EDTA 和 L-Cys 为酶激活剂,用 HJ90B 数字式 pH 计连续监测反应液的 pH 值,酶反应不同时间消耗的标准 NaOH 体积^[5]。固定化酶测定时,pH 值为 8.0;游离酶测定时,pH 值为 6.0。

酶活回收率 = 固定化酶活性/加入偶联液的酶活性 × 100%

1.2.3 固定化酶制备 称取 0.5 g 干载体,依次加

收稿日期: 2003-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29973004);北京市自然科学基金资助项目(582014)

第一作者: 女,1978 年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: r.ma@mail.buct.edu.cn

入 2 mL 去离子水和 2 mL 一定质量分数的戊二醛溶液,室温下用磁力搅拌器搅拌交联活化 30 min,离心、洗涤数次,加入一定量 10 g/L 溶液酶和 40 mL 0.2 mol/L pH 值 7.0 磷酸缓冲溶液,置于恒温振荡箱 120 r/min 转速恒定温度振荡一定时间,离心、洗涤数次,除去上清液,即得固定化酶。

2 结果与讨论

2.1 载体的筛选

在制备水滑石时,改变 $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 和 $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 的投料比,得到 Mg 与 Al 摩尔比分别为 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 和 4.0 的水滑石载体。载体的 Mg 与 Al 摩尔比越高,载体的碱性就越强,而木瓜蛋白酶的适宜环境呈弱酸性,故碱性越强对酶的损害也越大;同时, Mg 与 Al 摩尔比越小,层板的 Al^{3+} 含量越大,层板电荷密度也越大,水滑石的相邻铝八面体增加,部分生成 $Al(OH)_3$,而这种结构据试验发现不利于酶活力的维持,故要选择 Mg 与 Al 摩尔比较为合适的水滑石作为固定化载体。

改变 Mg 与 Al 摩尔比制得不同水滑石,用不同 Mg 与 Al 摩尔比的水滑石固定化木瓜蛋白酶,测定酶活性,并计算得酶活回收率,结果如表 1 所示。从表 1 可看出 Mg 与 Al 摩尔比为 2.0 的水滑石酶活回收率最高,故实验选用 Mg 与 Al 摩尔比为 2.0 的水滑石作为固定化酶的载体。

表 1 层板电荷密度对固定化酶活性的影响

Table 1 Effects of electrical density of the layered sheet on immobilized enzymes activity

Mg 与 Al 摩尔比	酶活回收率/%	Mg 与 Al 摩尔比	酶活回收率/%
1 1	29.65	3 1	44.48
1.5 1	39.18	4 1	18.54
2 1	53.54		

2.2 固定化酶制备的条件优化

2.2.1 给酶量的确定 固定化时加入的酶量对固定化酶活性有很大影响。一方面,给酶量越多,载体结合酶越充分,对固定化有利;另一方面,载体结合位点有限,随着载体负载酶量的增大,酶分子相互拥挤造成的空间位阻也增大,所占载体的空间位点也越多,底物与产物不能及时扩散,所以酶的酶活回收率反而会下降。为确定一个较合适的载体结合酶量,固定化时分别加入不同体积溶液酶,其他固定化

条件相同,制备固定化酶,测定每克固定化酶的酶活性及酶活回收率,结果如图 1 所示,综合以上两点原因,实验选取每 0.5 g 载体的给酶量为 16 mL。

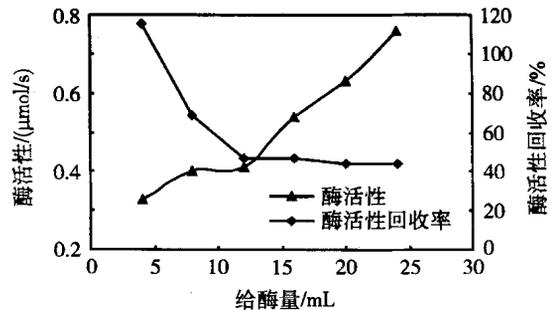


图 1 给酶量对固定化效果的影响

Fig. 1 Effect of enzyme loading on immobilization

2.2.2 固定化时间的确定 采用不同固定化时间(其他条件固定不变)制得的固定化酶酶活回收率见图 2。从图 2 看出,固定化时间为 12 ~ 24 h 的酶活回收率都保持较大的值。固定化时间少于 12 h,时间过短,交联反应不充分,酶结合有限;而 24 h 后,随着固定化时间的增加,酶活回收率反而下降,主要是由于酶的热失活作用造成。

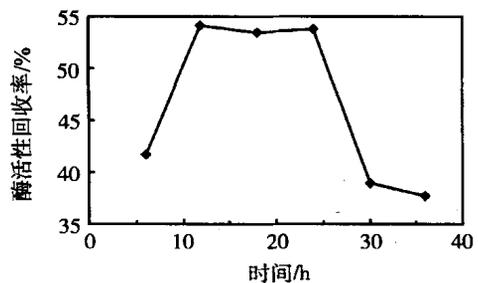


图 2 时间对固定化效果的影响

Fig. 2 Effect of time on immobilization

2.2.3 固定化温度的确定 采用不同的固定化温度,固定其他条件,温度对固定化酶活回收率的影响如图 3 所示,15 时酶活性回收率出现最大值。由于随着反应温度的提高,一方面固定化反应速度加

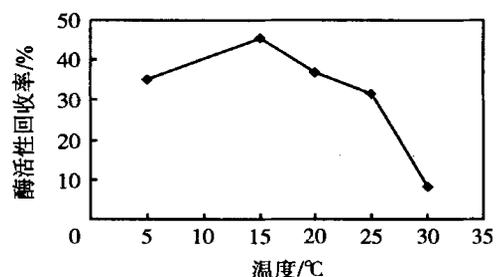


图 3 温度对固定化效果的影响

Fig. 3 Effect of temperature on immobilization

快,有利于固定化,另一方面,温度过高又会引起酶的失活,两方面相互作用的结果必然会出现一个最适温度。

2.2.4 固定化 pH 值的确定 在不同 pH 值 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液中进行木瓜蛋白酶的固定化反应,其他条件固定,缓冲液的 pH 值与酶活回收率关系如图 4 所示。由图 4 看到,pH5.0 一点出现酶活

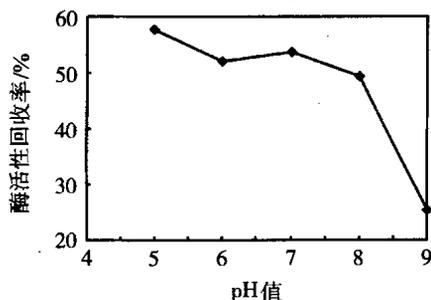


图 4 pH 值对固定化效果的影响

Fig. 4 Effect of pH on immobilization

性回收率异常,主要是因为水滑石载体呈碱性,pH 值过低会造成载体溶胀,从而黏附了一定量的木瓜蛋白酶,造成酶活回收率偏高,但此时载体层状结构已经破坏,而且载体呈黏稠状,不宜于固定化酶的分离,故此点值不可采用;pH 值 7.0 时固定化酶酶活回收率达到最大值,为最适固定化 pH;当 pH 过高,超出酶的适应范围,对酶有损害,酶活回收率会下降。

2.2.5 戊二醛质量分数的确定 戊二醛作为载体的活化剂,为酶分子提供可共价结合的活性基团,同时又可作为固定化反应的交联剂,但又是酶的变性剂。用量太少,提供的活性基团不充分,伯氨基未反应完全,结合酶量有限,影响固定化酶酶活回收率;用量太大,过量的戊二醛又会导致酶的变性。本实验在戊二醛质量分数分别为 0.1%~3% 之间制备固定化酶,其他条件固定不变,结果如图 5 所示。由

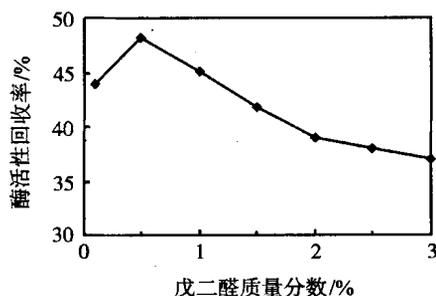


图 5 戊二醛浓度对固定化效果的影响

Fig. 5 Effect of glutaraldehyde concentration on immobilization

图 5 可知,戊二醛质量分数为 0.5% 时酶活回收率最高。

实验进一步比较了有戊二醛交联和无戊二醛交联制得的固定化酶(其他固定化条件相同),测得每克固定化酶活性及相对活性,结果见表 2。

表 2 有无戊二醛固定化酶活比较

Table 2 Comparison between immobilized enzyme activities with and without glutaraldehyde

	无戊二醛交联固定化酶活性/ ($\mu\text{mol/s}$)	无戊二醛交联固定化酶相对活性/ %	0.5% 戊二醛交联固定化酶活性/ ($\mu\text{mol/s}$)	0.5% 戊二醛交联固定化酶相对活性/ %
第一次	0.56	100	0.57	100
第二次	0.49	86.89	0.55	97.15
第三次	0.47	83.60	0.53	94.47

从表 2 看出,两种方法制得的固定化酶所得的初始酶活性相差不大,但连续操作三批后,有戊二醛交联活化制备的固定化酶相对活性要明显高于无戊二醛的固定化酶。主要是因为由于戊二醛共价结合作用使得酶与载体的结合力较强,不易脱落,而无戊二醛交联的固定化酶与载体主要靠物理吸附作用,容易脱落,所以证明水滑石制备固定化酶使用戊二醛质量分数为 0.5% 的固定化效果较好。

3 结 论

通过实验讨论了载体层板电荷密度对固定化酶活性的影响,从不同 Mg 与 Al 摩尔比的水滑石中筛选,得出 Mg 与 Al 摩尔比为 2.0 的水滑石作为载体;在实验条件下水滑石固定化木瓜蛋白酶的最佳固定化条件为:给酶量为每 0.5 g 载体固定 16 mL 10 g/L 的溶液酶,固定化温度 15 $^{\circ}\text{C}$,pH7.0,固定化时间 12~24 h,戊二醛质量分数 0.5%;在最佳条件下制得的固定化木瓜蛋白酶的酶活回收率最低可达 50%,最高达到 60% 以上。

参 考 文 献

- [1] Cavani F, Trifiro F, Vaccari A. Hydrotalcite type anionic clays: properties and application[J]. Catalysis Today, 1991, 11(2):173-301
- [2] 周燕婷. 镁铝复合金属氧化物的结构调控及其在烷氧基酯合成反应中的催化性能研究[D]. [硕士学位论文]. 北京:北京化工大学,1999
- [3] 任玲玲,何静,段雪. 阴离子型层柱材料的插层组装[J]. 化学通报,2001(11):686-691

- [4] Nicola, T Whilton, Paula J Vickers, Stephen Mann. Bioinorganic clays: synthesis and characterization of amino- and polyamino acid intercalated layered double hydroxides[J]. J Mater Chem, 1997, 7(8):1623 - 1629
- [5] 蒋传葵. 工具酶的活力测定[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1982

Preparation of immobilized papain on LDHs

Ji Hong Wang Yan-hui Ma Run-yu

(The Key Laboratory of Science and Technology of Controllable Chemical Reactions, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Immobilization of papain using a covalent method on the anion layer material-layered double hydroxides (LDHs) was studied. LDHs were activated by glutaraldehyde before being used as the carrier of the immobilization enzymes. The effects of the electrical density of the layered sheet on the immobilized enzymes activities were discussed, and the factors related with the activity of the immobilized papain on LDHs, such as time, temperature and pH of the immobilization reaction, concentration of glutaraldehyde and amount of papain used were studied. It is found that the optimum conditions for immobilization are as follows: the ratio of enzyme to carrier is 160 mg/g, activating with 0.5% glutaraldehyde and immobilizing for 12 ~ 24 h at 15 °C and pH 7.0, with the activity recovery rate 55%.

Key words: LDHs; papain; immobilization

(责任编辑 云志学)

(上接第 25 页)

Simulation of geometric effects of particles on flows and drag around abnormal shape particles

Gao Ji-xian Liu Hui Li Cheng-yue Yang Li-ying

(The Key Laboratory of Science and Technology of Controllable Chemical Reactions, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: CFD modeling and simulation of flows and experienced drag over abnormal-shaped particles, such as sphere, hexahedron, trihedron, cylinder and wheel shapes, were investigated over a range of Reynolds number from 10 to 400. Based on simulation results, the conventional method characterizing an abnormal-shaped particle by using the grain volume or surface area-mean diameters was re-evaluated and was found to be improper in terms of their use in particle drag prediction. Accordingly, a new parameter was defined to take account of the geometrical effects involved and put forward a new correlation of drag coefficients for the above four non-spherical particles. The prediction of drag coefficients was greatly improved.

Key words: CFD simulation; particle; drag coefficient; two phase flow

(责任编辑 云志学)