

介孔材料 SBA-15 固定化胰蛋白酶的研究

董颖超^{1,2}, 齐涛¹, 秦玉昌², 王丽娜¹, 李军国², 张懿¹

(1. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100080) (2. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要: 在酸性条件下以正硅酸乙酯 (TEOS) 为硅源、非离子表面活性剂 Pluronic P123 为模板剂合成了介孔分子筛 SBA-15, 将其作为载体, 对胰蛋白酶进行了固定化研究。研究了固定化条件对固定化酶量的影响, 以及固定化酶的热稳定性和操作稳定性。结果表明, 当酶液浓度大于 5 mg/mL, 固定化时间 10 h 时, 胰蛋白酶的固定化效果最好, 固定化酶量可达 23.6 mg/g。固定化酶的热稳定性与游离酶相比有了显著的提高, 且固定化酶具有较好的操作稳定性, 连续反应 6 批次后, 酶的剩余活性仍保持在 40% 以上。

关键词: 介孔材料; SBA-15; 胰蛋白酶; 固定化酶

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0019-04

Immobilization of Trypsin on Mesoporous Silica Material

DONG Ying-chao^{1,2}, QI Tao¹, QIN Yu-chang², WANG Li-na¹, LI Jun-guo², ZHANG Yi¹

(1. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

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

Abstract: The hexagonal silica mesoporous material SBA-15 with ordered 2-dimensional channel structure was used as a support to immobilize the enzyme trypsin which was assembled in the channel of SBA-15 by immersion method. The effects of immobilization conditions such as enzyme concentration, pH value and time on the absorbed amount of enzyme in SBA-15, the thermal and operational stabilities of the immobilized enzyme were studied. And the best enzyme concentration and immobilization time were 5 mg/ml and 10 h, respectively, under which the absorbed amount of enzyme reached 23.6 mg/g. It was also found that the thermal and operational stabilities of the immobilized enzyme were higher than those of the free enzyme. Silica mesoporous material SBA-5 was shown to be a good support for immobilization of enzyme.

Key words: silica mesoporous material; SBA-15; trypsin; immobilized enzyme

多孔材料由于具有较大的比表面积和孔体积, 因而在吸附分离、非均相催化、离子交换剂和光电纳米复合材料等领域存在着广阔的应用前景^[1-2]。1992 年美国 Mobil Oil Company 公司科学家首次报道了具有六方有序规整孔道排列和窄孔径分布的介孔分子筛 MCM-41 的合成, 引起了国际上各相关学术界的重视。该材料由于孔径分布均一, 孔道内富含弱酸性羟基, 因此在作为酶固定化载体方面表现出了很大的优越性, 但该类型介孔载体孔径较小, 限制了体积较大的酶分子进入孔道内部^[3]。复旦大学赵东元 (1998 年) 通过表面活性剂的方法合成了孔径更大的介孔分子筛 SBA-15, 该无机多孔材料具有稳定性好、机械强度高、对微生物无毒性、耐酸碱、成本低、寿命长等特性, 使介孔材料在酶固定化方面呈现出诱人的前景^[4]。胰蛋白酶是一种动物来源的蛋白水解酶, 该酶在酒类和

饮料的澄清、畜血蛋白质的水解、胰蛋白酶制备等方面用途广泛^[5]。但天然胰蛋白酶稳定性差, 且容易自溶, 难以控制反应条件, 从而降低了催化效率, 提高了使用成本。因此, 一些研究者正努力探索开发该酶的新型固定化载体和固定化方法, 以求制备出高稳定性、高机械强度的固定化酶, 从而扩大该酶的应用范围。本文合成了介孔材料 SBA-15, 并将其作为固定化胰蛋白酶的载体, 研究了不同固定化条件对固定化酶量的影响, 并探讨了固定化酶的热稳定性和操作稳定性。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

Pluronic P123 (EO20-PO70-EO20) 和阳离子表面活性剂 CTAB 购于 Aldrich 公司; 正硅酸乙酯 (TEOS) 购于 Fluka 公司; 胰蛋白酶购于 sigma 公司; 苯甲酰-精氨酸乙酯盐酸盐 (TAEE) 购于北京市化学试剂公司; 其他试剂等均为分析纯。

收稿日期: 2007-08-15

作者简介: 董颖超 (1975-), 男, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事酶固定化及蛋白质分离研究

Orion Aplus pH 计, Thermo Electron Corporation; 台式恒温振荡培养箱, 北京沃德电子实验仪器设备厂; 电热恒温水浴锅, 北京市医疗设备厂; 多头磁力加热搅拌器, 杭州仪表电机厂。

1.2 介孔材料 SBA-15 的制备及表征

按文献[4]方法合成并经焙烧后得到介孔分子筛 SBA-15。用 X-射线衍射 (XRD) 表征产物的介孔结构, 仪器 40 kV 电压, 电流 30 mA, Cu 靶, $\lambda=1.5418$ Angstrom, 在小角度 ($<5^\circ$) 范围内进行扫描; 扫描电镜 (SEM) 观察介孔材料的外部形貌, 将样品喷金后观察; N_2 吸附-脱附曲线测算材料的比表面、孔体积和孔径分布。

1.3 固定化胰蛋白酶的制备^[6]

取 200 mg 介孔材料, 加入到 10 mL 一定浓度的胰蛋白酶溶液中, 置于恒温摇床中, 150 r/min 转速振荡一定时间后, 将溶液以 8000 r/min 速度离心 10 min, 保留上清液, 沉淀用缓冲液洗涤多次, 直至检测不到蛋白为止, 制得固定化酶。

1.4 固定化及游离胰蛋白酶活性的测定

以 BAEE 为底物, 采用恒定 pH 计法, 用 0.05 mol/L 的碱滴定生成的酸, 记录酶反应不同时间消耗的 NaOH 量, 根据如下公式计算游离及固定化酶的酶活:

$$\text{酶活}[U/(g \cdot \text{min})] = V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times 100 / (m_{\text{载体干重}} \times t)$$

其中: V_{NaOH} - 消耗的 NaOH 的量 (mL), C_{NaOH} - NaOH 的摩尔浓度 (mol/L), $m_{\text{载体干重}}$ - 载体干重 (g), t - 测定时间 (min)。

1.5 固定化酶热稳定性的测定

在不加底物的条件下, 将游离酶和固定化酶在不同温度下温育 1 h 后, 流水冷却, 然后在室温下测定各自酶活力, 以比较酶固定化前后稳定性的变化。

1.6 固定化操作稳定性的测定

将已测定酶活的固定化酶离心分离, 用去离子水洗至中性, 重新测定酶活力, 重复上述操作, 比较固定化酶的酶活随使用次数的变化情况。

2 实验结果与讨论

2.1 介孔材料的结构表征

图 1 是 SBA-15 焙烧后的小角 X-射线多晶衍射谱图 (XRD), 图内小插图是对图 1 的放大, 由图可知, 在 1° 的主衍射峰以及 $1.5^\circ \sim 2.0^\circ$ 之间的衍射峰可依次归属于 100, 110, 200 晶面的衍射, 为典型介孔相的 XRD 衍射, 说明合成的 SBA-15 质量较好。图 2 是 SBA-15 的扫描电镜照片, 可以看出, 制备的材料为微米级短棒状颗粒。从氮吸附-脱附结果来看, SBA-15

的 N_2 吸附-脱附等温线符合 Langmuir IV 型, BJH 孔径为 7.5 nm, BET 比表面积为 $703 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔容为 1.01 mL/g , 说明它是一种大孔径、高比表面积分子筛。

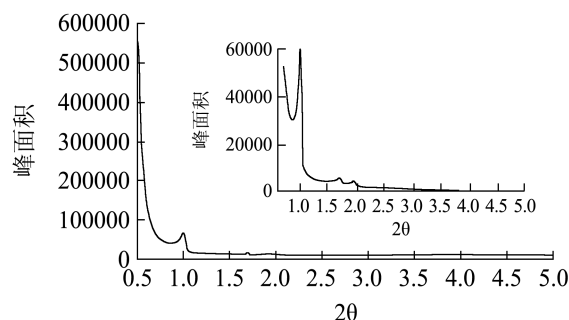


图 1 SBA-15 的 XRD 图谱

Fig.1 XRD patterns of SBA-15

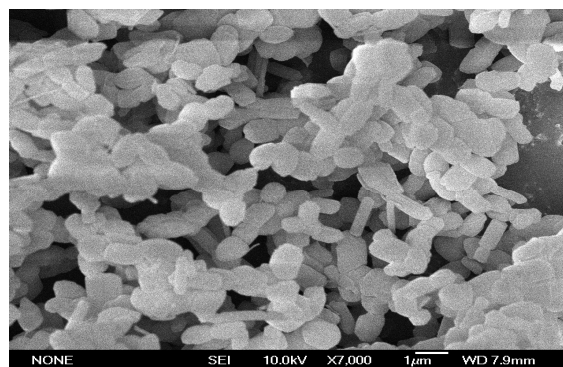


图 2 SBA-15 的 SEM 图

Fig.2 SEM image of SBA-15

2.2 酶浓度对固定化酶量的影响

按 1.3 方法, 以 SBA-15 为载体, 在不同酶浓度的条件下固定化反应 8 h 制备固定化酶, 结果见图 3。

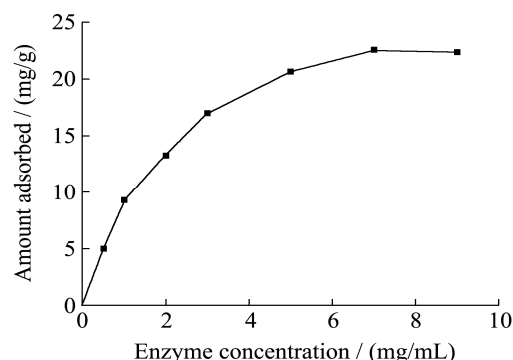


图 3 酶浓度对固定化酶量的影响

Fig.3 Enzyme concentration effect on amount of the adsorbed enzyme

由图 3 中可知, 随着酶浓度的增加, 酶的吸附量逐渐增高, 且在酶浓度低时吸附量上升速度快, 酶浓度高时上升的趋势平缓, 当酶浓度超过 5 mg/mL 时, 酶的固定量增加不大。综合考虑固定化效率, 当酶浓度为 5 mg/mL 时固定化效果较佳, 此时酶的固定量为

21.2 mg/g。

2.3 时间对固定化酶量的影响

按 1.3 方法, 以 SBA-15 为载体, 在酶浓度为 5 mg/mL 时考查不同固定化时间载体对固定化酶的吸附量影响, 结果见图 4。

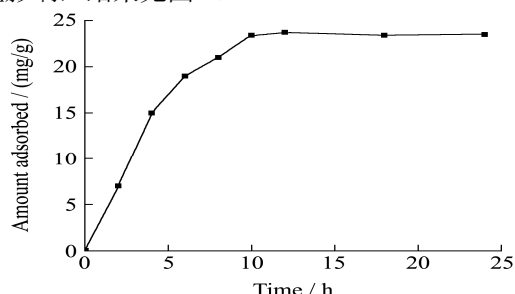


图 4 固定化时间对固定化酶量的影响

Fig.4 Time effect on amount of the adsorbed enzyme

从图 4 可以看出, 随着时间的延长, 载体吸附的酶量逐渐增加, 当吸附时间达到 10 h 时, 固定化酶量达最大值。其原因可能是刚开始一部分胰蛋白酶分子与载体孔口及靠近孔口的孔道内的羟基作用, 使酶分子停留在载体的孔口处, 由于这些酶分子的阻塞作用, 使另一部分酶需要克服扩散阻力才能进入到载体的孔道内部。

2.4 pH 值对固定化酶量的影响

其它条件固定不变, 在不同 pH 值的缓冲液中进行胰蛋白酶的固定化反应, 酶吸附量如图 5 所示。从图 5 可以看出, 当 pH 为 7.6 时, 酶吸附量达最大值, 即 23.6 mg/g; 当 pH 超过 7.6 以后, 酶吸附量开始下降。这可能是由于胰蛋白酶的等电点为 10.5, 而介孔分子筛的表面含有弱酸性羟基, 呈负电性, 从而当 pH=7.6 时, 由于酶分子和载体间的静电作用使酶吸附量达最大。

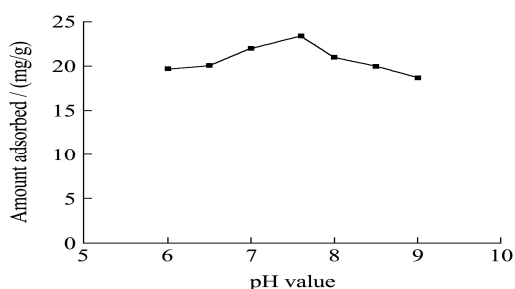


图 5 pH 对固定化酶量的影响

Fig.5 pH effect on amount of the adsorbed enzyme

2.5 固定化酶的热稳定性

将游离酶和固定化酶在不同温度的 pH=7.6 的磷酸缓冲液中温育 1 h 后, 流水冷却至常温, 然后加入 BAEE 测定其酶活性, 结果见表 1。

由表 1 可知, 游离酶经热处理后, 酶活性显著下

降, 经 80 °C 温育后仅有 25% 的酶活性, 而固定化酶则仍保持 56% 以上的酶活性。介孔材料具有 10 nm 左右的孔道结构, 这种结构能为酶分子提供一种不易受外部环境影响的微环境, 此外由于硅基材料孔道表面的硅羟基具有生物亲和相容性的特点, 能够有助于酶分子保持自身的天然构象, 正是由于介孔材料上述保护作用, 从而使固定化酶的热稳定性得到显著的提高。

表 1 固定化酶及游离酶热稳定性比较

Table 1 Thermal stability of immobilized and free enzyme

Temperature/°C	Relative activity of immobilized enzyme /%	Relative activity of free enzyme /%
50	70	51
60	61	32
70	64	27
80	56	25

2.6 固定化酶的操作稳定性

在 BAEE 浓度为 2 mg/mL、温度为 30 °C、pH 为 7.6 的条件下测定重复使用多次的固定化酶活性, 结果如图 6 所示:

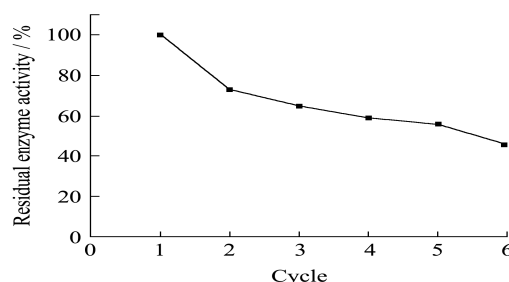


图 6 固定化酶的操作稳定性

Fig.6 Operational stability of immobilized enzyme

游离酶无法从反应体系中分离, 因此不能进行重复操作。固定化酶可从反应系统中分离, 可被重复使用。由图 6 可知, 固定化胰蛋白酶连续反应 6 批后, 酶剩余活性仍保持在 40% 以上, 说明采用该方法制得的固定化酶具有较好的操作稳定性。

3 结论

与其它酶固定化载体, 如纤维素、聚合脂质体、壳聚糖等相比, 介孔材料 SBA-15 具有比表面积大、孔径分布均一、表面富含易功能化的硅羟基等优点, 是一种很有潜力的用于酶固定化的无机材料。研究结果表明, 以 SBA-15 为载体进行胰蛋白酶固定化操作简便、条件温和、制备效果较好。通过控制固定化条件, 固定化酶量可达 23.6 mg/g, 在此条件下制得的固定化酶具有良好的操作稳定性, 使用 6 批次后, 仍保持 40% 的酶活力, 其热稳定性也远高于游离酶。(下接第 26 页)