

沙蒿胶磁性微球固定化脂肪酶 及部分理化性质的研究

王冰, 王云普*, 曾家豫, 张继, 魏玉丽, 唐功

(西北师范大学高分子研究所, 甘肃省高分子材料重点实验室, 甘肃兰州 730070)

摘要:以沙蒿多糖-壳聚糖复合磁性微球为载体, 采用物理吸附法固定化脂肪酶, 对固定化过程中对酶活力有影响的各种因素做了研究, 同时对固定化酶的部分理化性质、最适 pH、最适温度、酶的热稳定性以及表观米氏常数与游离酶做了比较。固定化酶的 K_m 小于游离酶的 K_m , 其最适 pH 和最适温度分别为 8.0 和 50℃, 而且固定化脂肪酶具有良好的热稳定性、可应用性和重复使用性。

关键词:脂肪酶, 固定化, 磁性微球, 酶活力, 动力学

Study on characterization and kinetics of immobilized lipase

WANG Bing, WANG Yun-pu*, ZENG Jia-yu, ZHANG Ji, WEI Yu-li, TANG Gong

(Institute of Polymer of Northwest Normal University, Key Laboratory of Polymer Materials of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Lipase was immobilized on magnetic composite microsphere by physical adsorption. Different factors which effect enzymatic activities were investigated by measuring the hydrolysis of olive oil, and comparative studies of pH, temperature, thermal stability and apparent K_m between free lipase and immobilized lipase were conducted. The value of apparent K_m of immobilized lipase was lower than that of free lipase. The optimum pH and temperature of the immobilized lipase were 8.0 and 50℃. Meanwhile, the immobilized lipase had a good thermal stability, adaptability and reusability.

Key words: lipase; immobilized enzyme; magnetic microsphere; enzymatic activity; kinetics

中图分类号: TS201.2*5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)01-0143-03

大多数酶都被广泛应用于生物技术领域, 例如脂肪酶就被大量运用于食品、精细化工和制药工业中^[1,2]。最近比较热门的课题是用植物油、动物油、工业废油作原料, 用脂肪酶催化生成生物柴油^[3]。但游离酶在热、高离子浓度、强酸强碱及部分有机溶剂中均不够稳定, 这就大大限制了酶促反应的广泛应用。固定化酶的出现克服了上述不足, 提高了酶的热稳定性和化学稳定性^[4], 有利于酶的分散、回收、再利用, 降低了成本, 从而使酶催化反应工业化成为可能。本文以实验室自制磁性微球为载体, 用物理吸附法固定化脂肪酶。研究了固定化的条件, 同时对酶的动力学性质进行了分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脂肪酶 来源于 candida antarctica, 购于 Sigma 公司; 沙蒿粉、壳聚糖 购于浙江玉环试剂公司; 橄榄油 化学纯; 其它试剂 均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 载体的制备^[5]

1.2.1.1 磁流体的制备 配制 34.8% 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 水溶液, 54.1% 的 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 水溶液, 36.0% 的 NaOH 水溶液, 将亚铁盐 4 份 (v) 与铁盐水溶液 5 份 (v) 混匀, 搅拌, 升温至 55℃, 加入 5 份 (v) 碱溶液, 反应 30min 后加入 PEG10000 3.6% (w/v), 升温至 80℃, 并反应 30min 后停止反应, 冷却至室温, 用盐酸中和至中性, 静置, 上层清液即为水溶性磁流体。

1.2.1.2 磁性微球的合成 在 50mL 水溶液中, 加入 1mL 水溶性磁流体、0.4g 沙蒿胶、75mL 有机石蜡、5mL 乙酸乙酯、2mL span-80, 在 500r/min 的转速下搅拌 20min, 缓慢滴加甲醛 3mL, 搅拌 1h, 倾去上清液, 用石油醚、丙酮洗涤, 再用无水乙醇作溶剂, 洗涤若干次, 得沙蒿胶磁性微球。所得沙蒿胶磁性微球再用 3.0% 的对氨基苯磺酸溶液处理 2h, 50℃ 真空干燥, 即得表面羟基被对氨基苯磺酰化的磁性沙蒿胶微球。

1.2.2 脂肪酶的固定化 称取 100mg 载体, 加入 2% 的脂肪酶溶液 (pH = 8.0, 0.2mol/L, 含有 2mg 脂肪酶), 然后在一定温度下, 在恒温振荡仪中振荡 8h, 最

收稿日期: 2007-06-12 * 通讯联系人

作者简介: 王冰 (1979-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物柴油及固定化酶技术。

后过滤,并用一定量的磷酸缓冲液(pH8.0,0.1mol/L)洗涤,将所得的固定化酶放置在冰箱内4℃下保存。

1.2.3 酶活力的测定 脂肪酶的水解活性采用聚乙烯醇乳化橄榄油法(Yamada-Machida改进法)测定^[6]。一个脂肪酶活力单位定义为:在实验条件下脂肪酶水解橄榄油,每分钟催化产生1 μ mol脂肪酸的酶量。反应中生成的脂肪酸的含量由所加入和滴加的标准酸碱溶液的平衡方程中计算得到。具体步骤为:准确配制2%(m/v)的聚乙烯醇(PVA)水溶液,与橄榄油按3:1(v/v)混合,置于冰水浴中冷却至5~10℃,然后用搅拌器强烈搅拌20min,即为乳白色PVA橄榄油乳化液(底物)。取2.0mL,0.1mol/L pH7.0的磷酸缓冲液和2.5mL底物置于三角瓶中,充分混合,水浴加热至37℃且恒定10min,然后加入0.5mL酶液,同时计时,温和搅拌,保温反应30min后,加入丙酮-乙醇混合液(v:v=1:1)以终止反应,然后再加入5.0mL一定浓度(一般0.0500mol/L)的NaOH标准溶液,2滴1%的酚肽指示剂,用已知浓度(一般0.0500mol/L)的标准盐酸滴定至溶液无色,即为终点。空白样的测定方法和操作步骤与上述相同,只是在反应中不加酶液。固定化酶的测定方法与上述相同,只是加入0.1g固定化酶。

1.2.4 最适 pH 和温度的反应条件(游离酶与固定化酶) 游离酶和固定化酶的最适 pH 和反应温度具体为:在不同 pH(硼酸-氢氧化钠缓冲液 pH8.0~9.5,0.1mol/L 磷酸缓冲液 pH6.0~8.0)条件下保温 30min(如上所述),温度 30~70℃。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶反应条件研究

2.1.1 给酶量的确定 图1给出了加酶量对酶活力回收率的影响,固定化酶的活力回收计算公式为:

$$R(\%) = (A/A_0) \times 100\%$$

式中,R为固定化酶的活力回收值(%);A是固定化酶的活力(U);A₀是酶固定化前酶液中游离酶的活力(U)。

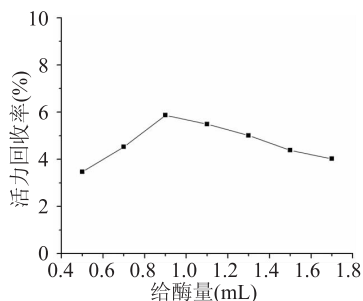


图1 给酶量对活力回收率的影响

由图1可见,活力回收率在所加酶量为0.9mL以前,随给酶量的增大而升高,当酶量超过这一值后活力回收率开始降低。这是因为进一步提高给酶量,一方面由于载体负载酶达到饱和,从而使得固定化酶的活力不再增大;另一方面由于有足够多的酶蛋白后,过多的酶蛋白造成酶分子的相互堵塞,这样就遮盖了酶的活力中心,所以出现了降低的现象,因此最佳给酶量为0.9mL(2%酶液/0.1g载体,w/v)。

2.1.2 固定化时间的确定 如图2所示,固定化时间低于8h时,活力随时间的推移而增大,当超过8h,酶活力开始降低。这是因为载体上有磺化基团,它们可以使活性氨基处于一种酸性的微环境下,这种环境可以使氨基稳定,所以最初固定化酶的活性随固定化时间的增大而升高;固定化后,酶的结构发生变化,活性降低,因此最佳固定化时间为8h。

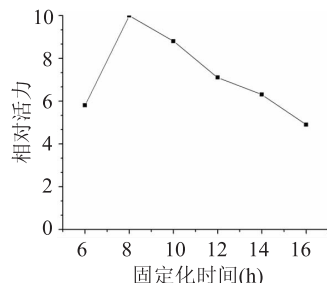


图2 固定化时间对酶固定化的影响

2.1.3 固定化反应 pH 对固定化酶活力的影响 平行取0.1g载体9份,各加入1mL酶液和pH分别为6.0、6.4、7.0、7.4、8.0、8.4、9.0、9.4、10.0的缓冲液2mL,混匀进行固定化,结果见图3。结果表明:在pH为8.0条件下进行固定化,所得固定化酶的活力回收率最高。

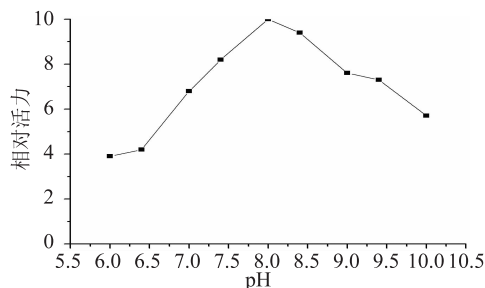


图3 pH对酶固定化的影响

2.2 固定化脂肪酶的理化性质测定

2.2.1 pH对酶活力的影响(最适pH的测定) 酶的主体是蛋白质,其催化能力对外部环境特别是对pH非常敏感^[7]。图4表示游离酶和固定化酶反应溶液的pH与其相对活力的关系。从图中可以看出,游离酶发挥最佳催化活性时的pH为7.4,而固定化酶最佳催化活性为8.0。固定化酶的最佳pH向碱性方向偏移,这是因为载体吸引溶液中的阳离子,使其附着于载体表面,结果使固定化酶扩散层的氢离子浓度比周围的外部溶液高,即偏酸,这样外部溶液中的pH必须向碱性偏移才能抵消微环境作用,使其表现出酶的最大活力,所以最适pH向

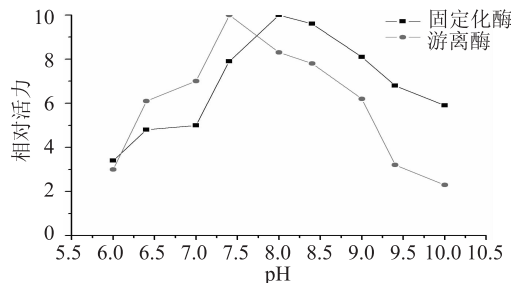


图4 pH对酶活力的影响

碱性偏移。

2.2.2 温度对酶活力的影响 酶反应的最适温度是酶热稳定性与反应速率的综合结果^[8]。图5所示为游离酶与固定化酶的反应温度与其相对活力的关系,游离酶和固定化酶的最佳反应温度分别是30℃和50℃。同游离酶相比,固定化酶活力高于90%的温度范围在45~60℃。

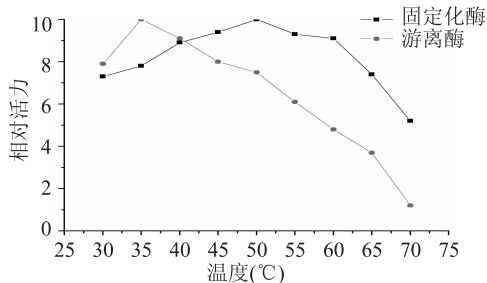


图5 温度对酶活力的影响

2.2.3 固定化酶的操作稳定性 重复使用性是固定化酶在应用方面的一个重要指标,大部分酶在固定化后,其使用和保存时间显著延长。具体操作为:称取1g固定化酶,测其活力,然后用0.1mol/L pH7.0的磷酸缓冲液洗涤,间隔0.5h后,再测其活力,用第N次的测定值与第一次的比表示固定化酶的相对活力。图6为固定化酶的重复使用性能,从图中可以看出,固定化酶显示出较高的操作稳定性,在固定化酶使用9次后,其相对活力还保持在50%以上。

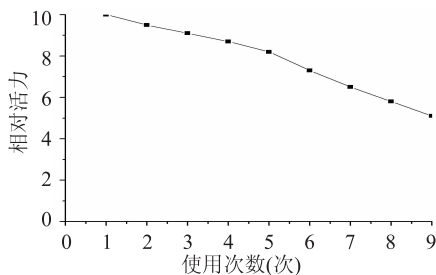


图6 固定化酶的重复使用性

2.2.4 固定化酶的热稳定性 在无底物存在的情况下,将固定化酶在不同温度下保存2h,冷却,在37℃分别测定它们的残余活力,结果见图7。

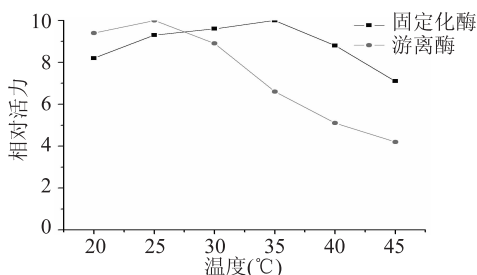


图7 游离酶和固定化酶的热稳定性比较

由图7可见,固定化酶在20~40℃之间活力变化

较小,而游离酶的活力在25℃后随温度的升高迅速下降,这说明固定化酶的热稳定性较游离酶强。

2.2.5 表观米氏常数的测定 游离酶与固定化酶的反应速率与不同底物浓度的关系用Lineweaver-Burk曲线表示, K_m 和 V_m 从相应的X轴和Y轴的截距求得。由结果可知, K_m (固定化酶)=0.00741 < K_m (游离酶)=0.0128,说明脂肪酶经固定化后,与底物的亲和力增强。

2.3 固定化酶的扫描电镜观察

磁性微球的形态用扫描电子显微镜观察,沙蒿胶磁性微球固定化脂肪酶表面呈多孔蜂窝状结构,微球形态均一,机械性能好,多次重复使用,未见载体变粘。

3 结论

用物理吸附法制备固定化酶,条件温和,操作简便。实验结果表明:固定化脂肪酶的最佳条件为每0.1g载体加2% (w/v)的酶溶液0.9mL,固定8h, pH8.4,温度为50℃。固定化酶与游离酶相比,最适pH和最适温度均升高,热稳定性增强,可重复使用,其 K_m 小于游离酶,说明脂肪酶经固定化后,与底物的亲和力增强,反应更容易进行。

参考文献:

- [1] Adlereutz P. Enzymes in food processing[M]. New York: Academic Press, 1993. 103~109.
- [2] Al-Duri B, Robinson E, McNerlan S, et al. Hydrolysis of edible oils by lipase immobilized on hydropHobic support: Effect of internal structure[J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, 72: 1351~1359.
- [3] Cao S G, Yang H, Ma L. Enhancing enzymatic properties by the immobilization method[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1996, 59: 7~14.
- [4] Watanabe N, Yasude O, Yasuji M, Koichi Y. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms: cultural conditions and some properties of crude enzymes[J]. Agric Biol Chem, 1977, 41: 1353~1358.
- [5] Ji Zhang, Shengtang Zhang, et al. Immobilized β -galactosidase: preparation and characterization[J]. Polymers and polymer composites, 2006(8): 755~766.
- [6] Yamada K, Machida H. Nippon Nogeikagaku Kaisi [J]. 1962, 36: 858.
- [7] Lei C, Shin Y S, Liu J, et al. Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support[J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(38): 11242~11243.
- [8] 罗贵民主编. 酶工程(第一版)[M]. 化学工业出版社, 2003, 7.