第 18卷 无锡轻工大学学报 Vol. 18
第 1期 JOURNAL OF WUXI UNIVERSITY OF LIGHT INDUSTRY 1999 No. 1

脂肪酶固定化工艺

应国清 周晓云

(浙江工业大学生物与环境工程学院,杭州 310032)

摘要 研究了以纸纤维素为载体,对β-硫酸酯乙砜基苯胺(SESA)为活化剂共价偶联法固定化脂肪酶的最适条件及固定化酶的稳定性。结果表明:醚化反应最适pH为 10.0,偶联最适条件为 pH8.0,酶量控制在 800μmol/(min·g),所获得固定化脂肪酶具有较高的酶活和酶回收率,且有较好的稳定性,其半衰期为 375 h.

关键词 脂肪酶;固定化;纸纤维素

分类号 Q556.1

0 前 言

脂肪酶[1](Lipase, EC3.1.1.3,甘油酯水解酶)是特殊的酰基水解酶,在常温常压下能催化油脂水解成脂肪酸与甘油。但这种酶价格昂贵,游离酶催化反应技术虽成熟但工业化成本高而难以推广。1990年 Kosugi Y[1]、1992年 Yang D[2]等人相继报道了以树脂和葡聚糖为载体离子交换法固定化脂肪酶,因采用物理法固定化酶技术,研究结果不甚理想;1997年曹国民[4]等又报道了采用蚕丝为载体共价偶联法固定化脂肪酶的研究结果。笔者研究了以来源丰富的纸浆(纸纤维素)为载体,对β-硫酸酯乙砜基苯胺(SESA)为活化剂共价偶联法固定化脂肪酶的最适工艺条件及固定化酶的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶:按文献[5]方法提纯的脂肪酶。纸浆(纸纤维素):浙江杭州新华纸业有限公司提供。对β-硫酸酯乙砜基苯胺(SESA):上海染料化工八厂产品。

1.2 实验方法

醚化:取 SESA溶液 300 mL与碱处理过的纸纤维素混合,0.5 mol/L NaOH调节 pH6~12,85℃恒温 40 min,并搅拌,用 0.5 mol/L NaOH洗 2次,再用去离子水洗 2次,压干。

重氮化:在已醚化的纸纤维中加入 100 mL去离子水,捣匀,在 4℃冰浴,置通风柜内,加入 1 mol/L HCl 25 mL和 5% $NaNO_2$ 25 mL.搅拌反应 25 min,过滤,用冷 0.05 mol/L

浙江省科委重点项目(编号:94-45)
收稿日期:1998-08-26
第一作者:应国清,男,1965年 6月生,工学硕士

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www

HCl洗 2次,冷去离子水洗 2次,压干。

偶联: 将已重氮化的纸纤维立即加入的脂肪酶缓冲溶液中,在 4℃冰浴中搅拌反应 6 h, pH控制值为 6~ 10,用去离子水洗 2~ 3次,压干,即得固定化脂肪酶,置冰箱中保存备用。

1.3 分析方法

游离脂肪酶活力测定: 参见文献 [1]方法;固定化脂肪酶活力测定;参见文献 [4]方法。

SESA浓度测定: 参见文献 [6]方法。

2 结果与讨论

2.1 pH对醚化反应的影响

在酶固定化过程中,醚化反应程度的高低直接影响酶的固定化,而 pH对醚化反应影响较大。笔者在 85℃下用 0.5 mol/L NaOH调节 pH值,醚化反应后测定各醚化率,其结果如图 1所示。醚化反应在 pH为 10左右时,醚化率最高,即最适合于 SESA和纸纤相结合。

2.2 偶联反应 pH对固定化酶活力的影响

如图 2所示,偶联反应 pH值 8.0时,所固定化酶活最高;酶活回收率在 pH为 7.0时最高。pH偏酸性时,固定化酶和酶活回收率都下降,说明在低 pH下偶联会引起酶的失活。pH偏碱性时,因重氮盐与碱作用生成不能进行偶联反应得重氮酸[7],导致固定化酶活降低。

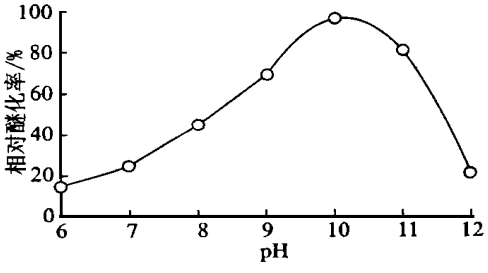

图 1　pH对醚化反应的影响

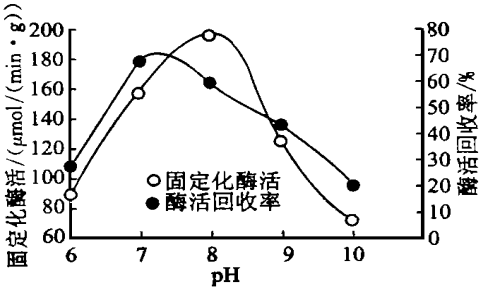

图 2　偶联反应 pH对固定化酶活的影响

2.3 酶量对固定化酶活力的影响

见图 3,所获得的固定化酶活力随着加酶量的增加而增加,酶活回收率却逐渐下降。说明单位载体给酶量越多,载体上被偶联的酶就越多,相应的固定化酶活力就越高,但同时造成载体空间位阻效应增大,导致酶活回收率下降。

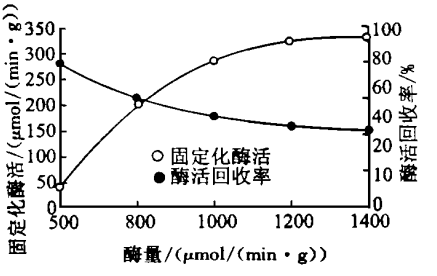

图 3　酶量对固定化酶活的影响

2.4 固定化酶的最适 pH值

见图 4,游离酶的最适作用 pH约 8.0,而固定化酶的 pH约 9.0,脂肪酶经过固定化最适作用 pH明显偏向碱性,这可能与载体的性质、酶的构象及酶所处的微观环境有关[6]。

2.6 固定化脂肪酶催化油脂水解反应

在一定量的橄榄油和磷酸缓冲液 (体积比 1∶0.8)中,加入适量固定化酶,在 50℃下搅拌反应 25 h,倾出油水混合物,将固定化酶滤出,供下一次循环使用。如图 5所示,固定化酶

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www

重复使用 10次后,酶活还保留 68.3%;使用 15次后酶活降为 49.2%,因而可以得出该固定化脂肪酶的半衰期为 375 h.

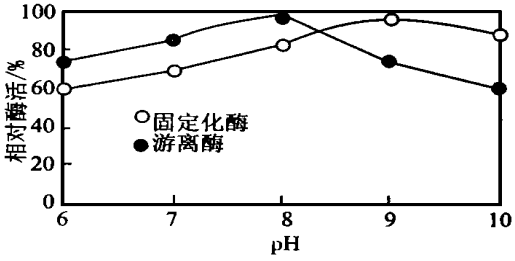

图 4 固定化酶活和游离酶最适 pH的变化

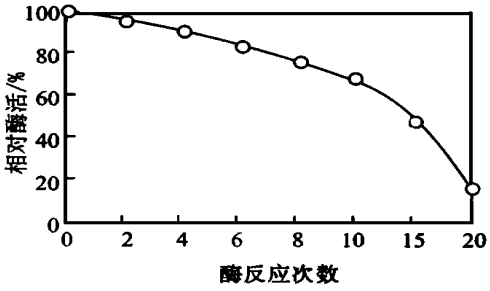

图 5 固定化脂肪酶反应的稳定性

3 结 论

采用纸浆为载体,以价格的国产双功能活化剂对 β-硫酸酯乙砜基苯胺 (SESA)进行共价偶联固定化脂肪酶的方法是可行的。获得的固定化脂酶具有较高的酶活、酶活回收率及稳定性,为用固定化酶水解油脂制备脂肪酸和甘油工业化生产提供了应用前景。

参 考 文 献

1 张树政主编.酶制剂工业(下册).北京:科学出版社,1984 235~238
2 Kosugi Y, Tanaka H, Tomizaka N. Continuous Hydrolysis of Oil by Immobilized Lipase in a Countercurrent Reactor. Biltechnol Bileng, 1990, 36 617~622
3 Yang D, Rhee J S. Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Immobilied Lipase in Organic Solvent. Biotechnlo Bileng, 1992, 40 748~752
4 曹国民,黄杰,高广达.蚕丝固定化脂肪酶的研究.生物工程学报,1997,13(1):88~92
5 应国清,王伟娜,周晓云.疏水作用层析分离纯化脂肪酶.分析生物技术,1997,7(5)15~17
6 千烟一郎著.固定化酶.胡宝华,吴维江译.石家庄:河北人民出版社,1974 54~55

Study on Immobilization of Lipase

Ying Guoqing Zhou Xiaoyun
(College of Biotechnology & Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

Abstract The conditions of the lipase immobilized on the paper cellulose with P-β-sulfuric acid ester ethyl sulfone aniline (SASE) and the stability of the immobilized lipase have been studied. As a result, the optimal pH for the paper cellulos with SASE is 10.0; when the opimal conditions for lipase linked reaction are pH 8.0 and the amount of lipise of 800 μ/g cellulose, the immobilized lipase is stable, and its operational half life is about 375 hours.

Key words lipase; immobilized; paper cellulose

(责任编辑:陈 娇)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www