

文章编号:1673-1689(2009)04-0479-04

PVA-SA-活性炭共聚物固定脂肪酶的研究

孙凤麟, 孙玉梅*, 曹芳, 王珊

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 大连 116034)

摘要:以聚乙烯醇(PVA)-海藻酸钠(SA)-活性炭共聚物为载体,对脂肪酶进行固定化。研究了活性炭浓度、酶初始浓度、缓冲液pH值、吸附时间及温度对固定化酶的活性及蛋白载量的影响。结果表明:在聚乙烯醇(PVA)-海藻酸钠凝胶中加入1 g/dL活性炭制成复合凝胶球,在25℃、pH值5.5的条件下对30 mg/mL的酶液吸附12 h,所得吸附固定化脂肪酶的活性较好。吸附固定的脂肪酶较游离酶的最适作用温度升高10℃,最适作用pH范围变宽,且向碱方向偏移0.2个单位。
关键词:脂肪酶;聚乙烯醇;海藻酸钠;活性炭;固定化

中图分类号:Q 814-2

文献标识码:A

Study of the Lipase Immobilized on PVA-Alginate-Active Carbon

SUN Feng-lin, SUN Yu-mei*, YANG Hong, HOU Bai-you

(College of Biological & Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Liaoning 116034, China)

Abstract: In this manuscript, the immobilized conditions, such as active carbon concentration in the gel, enzyme concentration, pH, adsorption time and temperature, of lipase to PVA-alginate-active carbon were carefully investigated. It was found that a highest lipase activity was achieved at the condition of 30 mg/ml attached to 1% PVA-alginate gel pellet when temperature is 25℃ and pH is 5.5. Compared with that of free lipase, the optimal reaction temperature increased by 10℃ and pH range extended to 7.2.

Key words: lipase; PVA; sodium alginate; active carbon; immobilization

随着世界范围内能源短缺和环境优化的需要,生物柴油的应用成为人们关注和研究的热点,其中生物酶法合成生物柴油已成为研究的重要方向^[1-2]。脂肪酶是酶催化法制备生物柴油的重要生物催化剂,但是游离酶在水溶液中不稳定,不能重复使用,难以实现生产过程的连续化^[3]。同时酶在高温、高离子浓度、强酸、强碱等条件下容易失活,催化能力降低,从而大大限制了游离酶的广泛应用。固定化技术的应用克服了上述不足。

酶的固定化方法有包埋法、吸附法、共价法以

及交联法等。其中吸附法具有操作简单、处理条件温和、酶的损害作用小以及吸附剂可反复使用等优点,但也存在吸力弱,易在不适宜pH值、高盐浓度、高底物浓度及高温条件下解吸脱落的缺点。研究在聚乙烯醇(PVA)-海藻酸钠凝胶载体中加入适量的活性炭粉末,以期改善载体内部结构,提高其机械强度和吸附能力^[4],对PVA-海藻酸钠-活性炭为载体固定化脂肪酶的最适制备条件及酶学特性进行了研究。

收稿日期:2008-04-25

基金项目:辽宁省教育厅2006年创新团队项目(2006T030)。

* 通讯作者:孙玉梅(1962-),女,大连人,教授,主要从事研究微生物代谢控制发酵方面的研究。

Email:sunyumei62@163.com

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

脂肪酶 LVK-F100:深圳绿微康生物有限公司生产;橄榄油:化学纯,国药集团化学试剂有限公司产品;聚乙烯醇:聚合度 1750±50,国药集团化学试剂有限公司生产;海藻酸钠:化学纯,上海化学试剂站分装厂生产;活性炭:辽宁永强医药器械化玻有限公司试剂生产;牛血清蛋白:Xiasi Bio 生产;其它试剂均为国内分析纯。

WFJ-1P9:722 型数显光栅分光光度计,上海航空测控技术研究所生产;THZ-82 水浴恒温振荡器:金坛市华峰仪器有限公司产品;85-2 型恒温磁力搅拌器:巩义市英峪予华仪器厂生产;LB801 型超级恒温器:辽阳市恒温器厂生产。

1.2 脂肪酶活力的测定

脂肪酶活力定义:在最适反应条件下,以每分钟脂肪酶催化橄榄油水解产生 1 μmol 脂肪酸的酶量为 1 个酶活单位(u)。

固定化酶比酶活:固定化载体上吸附的每毫克酶蛋白的活力单位(u/mg)。

用铜皂比色法^[5]测定脂肪酸量,每个样品测 3 组平行样。

1.3 蛋白质质量浓度的测定

采用考马斯亮蓝法^[7]测定蛋白质质量浓度。

固定化载体吸附脂肪酶后,用磷酸缓冲液冲洗至无蛋白洗出为止。酶液初始蛋白含量与洗液中剩余蛋白量之差,即为载体吸附的酶蛋白量。

1.4 酶液的制备

称取 2.25 g 脂肪酶粉,加 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)溶解,定容至 100 mL,储于 4 °C 冰箱中备用。

1.5 固定化载体的制备

将 9 g/dL 聚乙烯醇与 1 g/dL 海藻酸钠(w/v)在 90 °C 水浴中加热搅拌溶解于蒸馏水中,待 PVA 与海藻酸钠完全溶解后,加入一定量的活性炭,用搅拌机充分混合均匀。将混合物滴入到含有 2 g/dL CaCl₂ 的饱和硼酸溶液中成球,于 4 °C 固化交联 12 h,分别用蒸馏水和磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.0)冲洗 2 次,得 3~4 mm 的小球,挑选其中直径一致的小球作为固定化载体,浸泡在磷酸缓冲液中备用^[5]。

1.6 酶的固定化

将载体与脂肪酶液按 600 粒/dL 配比加入三角瓶中,置于恒温振荡器内吸附一定时间,用磷酸缓冲

液(pH 7.0, 50 mmol/L)充分洗涤、过滤,测定洗液中蛋白质浓度,直至滤液中蛋白质浓度为零为止。

2 结果与讨论

2.1 活性炭浓度对固定化酶活力的影响

按方法 1.4 制作聚乙烯醇和海藻酸钠复合胶体,在胶体中分别添加 1 g/dL、2 g/dL、3 g/dL 的活性炭,制得固定化酶,其比酶活测定结果如图 1。

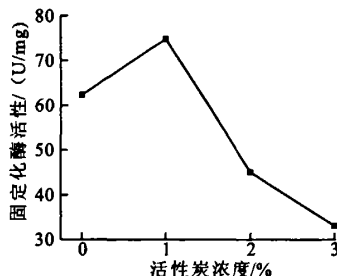


图1 活性炭浓度对固定化酶比酶活的影响

Fig. 1 Effect of active carbon concentration on the specific immobilized lipase activity

由图 1 可知,随着载体中活性炭浓度的增加,蛋白载量逐渐增加,含炭量 1% 时,固定化酶比酶活较好;当含炭量大于 1% 时,随着活性炭浓度的增加,固定化酶比酶活下降。PVA-海藻酸钠载体中添加适量的活性炭粉末,可改善载体表面吸附能力^[4];活性炭浓度增大,载体的吸附能力加强,使酶分子聚集,影响固定化酶活力^[8]。因此本实验中载体中活性炭的最适浓度为 1 g/dL。

2.2 酶的吸附固定化条件

2.2.1 酶的吸附固定化时间 取一定量的聚乙烯醇-海藻酸钠-活性炭固定化载体小球,在 pH 7.0、20 °C 的条件下对 40 mg/mL 的酶液进行吸附,从吸附 6 h 开始,每隔 3 h 取样测定固定化酶的活性及蛋白载量,结果见图 2。

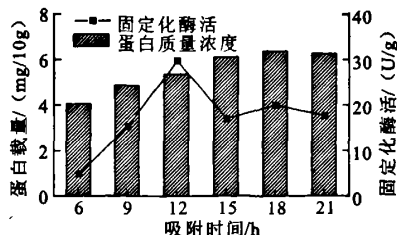


图2 吸附时间对固定化酶活性及蛋白载量的影响

Fig. 2 Effect of adsorption time on the protein content and the immobilized lipase activity

由图 2 可知,在吸附的前 12 h,随着吸附时间的延长,蛋白载量逐渐增加,固定化酶的活性逐渐增大;在吸附 12 h 时,固定化酶活力达到最大值,随

后开始减小;在吸附 15 h 时,蛋白载量达最大,随后蛋白载量基本不变,表明载体已达最大吸附;在吸附 15 h 后,固定化酶活力基本不变。在吸附初期,脂肪酶逐渐结合到载体上,固定化酶的活性随着蛋白载量的增加而上升,但超过一定时间后,酶分子在载体上的吸附量过大,可能会产生空间位阻^[9],影响底物与酶活性中心接触,而且过长的吸附时间可能引起酶失活,表现出酶活下降。因此本研究选择适宜的酶液吸附时间为 12 h。

2.2.2 用于吸附固定化的酶液浓度 取一定量的聚乙烯醇-海藻酸钠-活性炭固定化载体小球,在 pH 值 7.0, 20 °C 时,分别对 7.5、15、22.5、30、37.5 mg/mL 酶液进行吸附 12 h,制得固定化酶,测定固定化酶的活性及蛋白载量,结果见图 3。

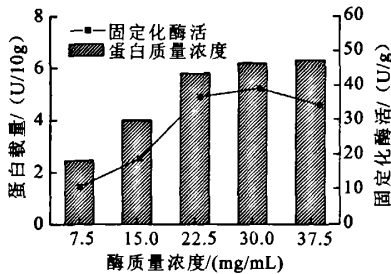


图 3 初始酶液浓度对固定化酶的活性及蛋白载量的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on the protein content and the immobilized lipase activity

由图 3 可知,当酶液质量浓度小于 30 mg/mL 时,随着酶液质量浓度的增大,蛋白载量逐渐增加,固定化酶的活性逐渐增大;当酶质量浓度达到 30 mg/mL 时,固定化酶的活性较大;在酶液浓度达到 37.5 mg/mL 时,固定化酶的活性下降。这可能是由于酶液浓度偏大,载体上吸附的酶蛋白量过多,因产生空间位阻,影响底物与酶活性中心接触,从而影响了脂肪酶与底物的接触,固定化酶活性降低,这与刘薇等人研究的结果一致^[9]。所以,本研究选择用于吸附固定化的酶液适宜质量浓度为 30 mg/mL。

2.2.3 酶的吸附固定化温度 取一定量的聚乙烯醇-海藻酸钠-活性炭固定化载体小球,在 pH 值 7.0 以及温度分别为 20、25、30、35 °C 的条件下,对 30 mg/mL 酶液吸附 12 h,制得固定化酶,测定固定化酶的活性及蛋白载量,结果见图 4。

由图 4 可知,随着温度的升高,蛋白载量逐渐增加;当温度小于 25 °C 时,随着温度的升高,固定化酶的活性逐渐增大;在 25 °C 时,达到最大值,25 °C 后酶活力下降。温度适当提高可加剧分子热运

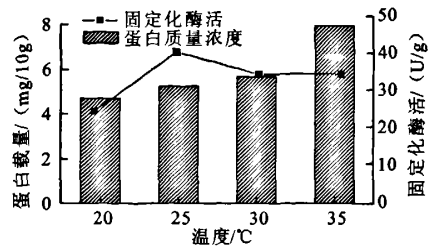


图 4 温度对固定化酶的活性及蛋白载量的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the protein content and the immobilized lipase activity

动,蛋白吸附速度增加,相同时间内,蛋白载量增加。在一定的酶蛋白吸附量下,酶活力随着蛋白载量的增加而增加。载体蛋白吸附量过多时,空间位阻增大^[9],酶活性下降,并且酶蛋白在高温条件下较容易失活。所以,本研究选择吸附固定化的适宜温度为 25 °C。

2.2.4 酶的吸附固定化 pH 值 取一定量的聚乙烯醇-海藻酸钠-活性炭固定化载体小球,25 °C 时,分别对不同 pH 缓冲溶液中的 30 mg/mL 酶液吸附 12 h,制得固定化酶,测定固定化酶的活性及蛋白载量,结果见图 5。

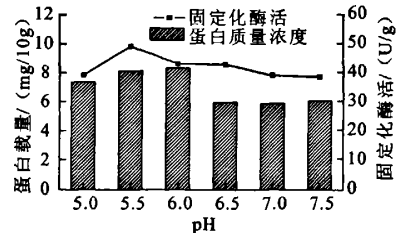


图 5 pH 值对固定化酶的活性及蛋白载量的影响

Fig. 5 Effect of pH on the protein content and the immobilized lipase activity

由图 5 可知,在 pH 小于 5.5 时,固定化酶的活性随着 pH 值的增大而逐渐增大;在 pH 大于 5.5 时,固定化酶的活性随着缓冲液 pH 的增大而逐渐减小;在 pH 值 5.5 时,固定化酶的活性达最大值。在 pH 值小于 6.0 时,随着 pH 的增大,蛋白载量逐渐增加;在 pH 大于 6.0 时,蛋白载量减少;在 pH 值为 6.0 时有最大值。所以,本研究选择吸附固定化的适宜 pH 值 5.5。

2.2.5 最适反应温度 在 20~60 °C 的不同温度下测定游离酶与固定化酶的活性,将最适温度下测得的脂肪酶活力定义为 100%,不同温度下相对酶活力结果见图 6。由图 6 可知,酶经固定化的最适作用温度较游离酶提高 10 °C。酶的固定化,可提高酶的热稳定性,提高最适反应温度。反应温度低于最适反应温度时,酶活随反应温度的升高而增大,

酶催化反应在较高温度下进行,可加快反应速率,提高酶的作用效率^[10];过高的反应温度会破坏蛋白氢键或疏水键,改变蛋白活性中心基本构象,从而使脂肪酶失活。

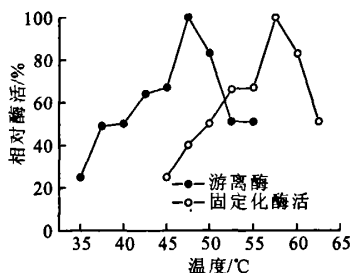


图6 温度对固定化酶和游离酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the immobilized and free lipase activity

2.2.6 最适反应 pH 值 在反应体系中加入不同 pH 的磷酸盐缓冲液,分别在最适反应温度下测定脂肪酶活性,将最适 pH 条件下的脂肪酶活力定义为 100%,在不同 pH 条件下相对酶活力结果见图 7。

由图 7 可知,游离酶最适作用 pH 7.0,固定化酶最适作用 pH 7.2~7.8,固定化酶最适作用 pH 比游离酶高 0.2~0.8 个 pH 单位,并且最适 pH 作

参考文献(References):

- [1] Yuji shimada, Yomi Watanabe, Akio Sugihara et al. 生物柴油燃料反应的生产和应用中酶醇解对油的处理[J]. 分子催化 B 学报;酶,2002,17(3-5):133-142.
Yuji shimada, Yomi Watanabe, Akio Sugihara et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing[J]. *Journal of Molecular Catalysis B; Enzymatic*,2002,17(3-5):133-142. (in Chinese)
- [2] Karl-Erich Jaeger, Thorsten Eggert. 生物工艺脂肪酶[J]. 生物工艺学评论,2002,13 (4):390-397.
Karl-Erich Jaeger, Thorsten Eggert. Lipases for biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002,13 (4) ;390-397. (in Chinese)
- [3] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997:151-159.
- [4] 张磊,张烨,侯红萍. 固定化细胞技术的研究进展[J]. 四川食品与发酵,2006,42(1):17-18.
Zhang Lei,Zhang Ye,Hou Hong pin. Developments in cells immobilization technique[J]. *Sichuan Food and Fermentation*, 2006,42(1):17-18. (in Chinese)
- [5] 纪建业. 脂肪酶活力测定方法的改进[J]. 通化师范学院学报,2005,26(6):51-53.
Ji Jian ye. The determination of the activity of lipase[J]. *Journal of Tonghua teachers' college*. 2005,26(6):51-53. (in Chinese)
- [6] 李花子,王建龙,文湘华,等. 聚乙烯醇-硼酸固定化方法的改进[J]. 环境科学研究,2002,15(5):25-27
Li Hua zi,Wang Jian long, et al. Improvement of PVA - H3BO3 Immobilization Method[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2002,15(5):25-27. (in Chinese)
- [7] 江南,吴开力,黄强,等. 一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白染色方法[J],生物化学与生物物理进展.2000,27(5):560-561.
Jian Nan, Wu Kai li, Huang Qiang, et al. A simple G250 Coomassie brilliant blue protein staining method[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*,2000, 27 (5) ;560-561. (in Chinese)
- [8] 鲁玉侠,蔡妙颜,郭祀远等. 海藻酸钠包埋法制备固定化脂肪酶研究[J]. 现代食品科技,2007,23(1):30-32.
Lu Yu Xia,Cai Miao yan,Guo Si yuan,et al. The preparation of immobilized lipase by embedded in sodium alginate[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007,23(1):30-32. (in Chinese)
- [9] 刘薇,白姝,孙彦. 磁性纳米粒子的制备及脂肪酶的固定化[J]. 过程工程学报,2004,4(4):362-366.
Liu Wei, Bai Shu, Sun yan. Preparation of magnetic nanoparticles and its application to enzyme immobilization[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2004,4(4):362-366. (in Chinese)
- [10] 陈秀琳. 脂肪酶固定化的研究概况[J]. 海峡药学,2007,19(12):114-116.
Chen Xiu lin. Lipase fossilization research survey[J]. *Strait Phar maceutical Journal*, 2007, 19(12): 114-116.

(责任编辑:杨萌)

用范围扩大。固定化酶在 pH 8.0 的缓冲溶液中反应时,载体表面有粘连现象,可能是过多 OH⁻与硼酸反应破坏了载体结构所致,其结果可能导致酶泄漏。

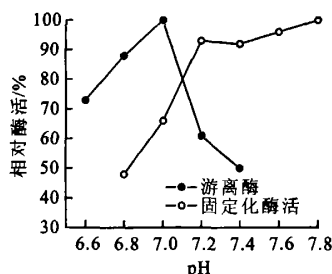


图7 pH对固定化酶和游离酶活性的影响

Fig. 7 Effect of pH on the immobilized and free lipase activity

3 结语

本研究确定了脂肪酶固定化的载体活性炭浓度及吸附固定化条件。研究表明,在聚乙烯醇(PVA)-海藻酸钠复合凝胶中的活性炭适宜浓度为 1 g/dL,吸附固定化的适宜条件为:在 pH 5.5、25 °C 对 30 mg/mL 酶液吸附 12 h。吸附固定的脂肪酶较游离酶的最适作用温度升高 10 °C,最适作用 pH 范围变宽,且向碱方向偏移 0.2 个单位。