

蚕丝固定化脂肪酶的研究

曹国民 黄杰 高广达

(江苏石油化工学院化工系 常州 213016)

摘 要 研究了蚕丝固定化脂肪酶的工艺条件,并考察了固定化脂肪酶的稳定性。试验结果表明:蚕丝与对- β -硫酸酯乙磺基苯胺(SESAs)进行反应的最适条件是 $\text{pH}=10.8$, SESAs:2.0 g/g 蚕丝,反应生成的对氨基苯磺酰乙基蚕丝(ABSE-蚕丝)经重氮化后与脂肪酶偶联的最适条件是: $\text{pH}=7.5$, 偶联时间 $>10\text{h}$ 。加酶量为 $168\sim308\text{u/g}$ 蚕丝时,所得固定化脂肪酶活力为 $106\sim160\text{u/g}$ 蚕丝,此时固定化酶的活力回收率较高($>52\%$)。固定化脂肪酶稳定性较高,其操作半衰期约为 250h 。

关键词 脂肪酶,固定化,蚕丝

脂肪酸是表面活性剂、肥皂、橡胶、油漆、维生素和颜料等的基本原料^[1]。目前,工业上脂肪酸主要是由油脂经 Colgate Energix 法^[2]水解而得,然而,这种化学水解法能耗大,且产生多种副反应。受能源价格上涨的影响,常温常压下的酶催化油脂水解技术受到了各国的普遍重视,但酶催化油脂水解工艺的工业化过程却进展缓慢,原因之一是脂肪酶的价格昂贵。因此重复使用昂贵的脂肪酶是工业界多年来的愿望,为达到这一目的,许多研究人员对脂肪酶的固定化技术进行了广泛的研究^[3~5]。从国外现有的一些报道来看,用以固定化脂肪酶的载体,主要是树脂类高聚物^[4,5],而我国树脂生产水平较低,我们用一些结构与国外类似的国产树脂作为载体,进行脂肪酶的固定化研究,结果发现所得固定化酶的活性和稳定性远不能满足要求,而从国外进口树脂价格较高。因此,有必要结合我国国情,开发一种具有我国特色的固定化脂肪酶的新载体。我国是一个蚕丝生产大国,各缫丝、丝绸厂每年都产生大量的废蚕丝,这些废蚕丝除很小一部分经深加工制成丝肽液和丝素蛋白粉外,其余大部分均未能制成高附加值的产品。1987年,楼一心,周文瑜^[6]报道了蚕丝经共价活化后作为固定化酶的蛋白质载体,这为废蚕丝的综合利用开辟了一条新的途径。

本文以缫丝厂提供的废蚕丝为原料,研究了蚕丝与对- β -硫酸酯乙磺基苯胺(SESAs)反应生成对氨基苯磺酰乙基蚕丝(ABSE-蚕丝)的最适条件及 ABSE-蚕丝经重氮化后与脂肪酶偶联的最适条件,并考察了固定化脂肪酶的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

江苏省科委应用基础研究基金资助项目。

本文于 1995 年 8 月 21 日收到。

1.1.1 脂肪酶:洗涤剂工业用固体脂肪酶(商品名:LIPOLASE 100T),丹麦 NOVO 公司生产。使用前按下述方法处理:准确称取 2.0000g 脂肪酶,溶于 0.05mol/L、pH7.5 的磷酸缓冲液中,并定容至 200ml。再用高速组织捣碎机捣碎 3min,离心,取上清液贮于冰箱内备用,临时作适当稀释。

1.1.2 对- β -硫酸酯乙砒基苯胺(SESAs):工业品,江苏泰兴染料化工厂生产。

1.1.3 蚕丝:江苏南通某缫丝厂的废蚕丝。试验所用其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 分析方法

1.2.1 固定化脂肪酶活力测定:称取适量的固定化酶,于 100ml 圆底烧瓶中,加入 15ml 橄榄油,12ml 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH8.0),50℃ 恒温水浴加热、搅拌反应 30min,立即转入沸水浴,终止反应。离心取油相用比色法^[7]测定脂肪酸量。

1.2.2 游离脂肪酶活力测定:见文献[8]。作者曾做过对照实验,即用测定固定化脂肪酶活力相同的方法,测定游离脂肪酶的活力,结果与按文献[8]测定的酶活力基本一致,两者的平均误差不到 6%。

1.2.3 SESAs 浓度测定:按文献[9]测定样品的苯胺含量,然后折算成 SESAs 的量。

1.3 脂肪酶的固定化方法

1.3.1 ABSE-蚕丝的制备:称取一定量的 SESAs,碾碎,加适量的蒸馏水,用饱和 Na_2CO_3 溶液调节 pH 至 6.0,滤去不溶物。然后将剪碎的蚕丝浸入其中,用 80℃ 水浴预热 10min 后,用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 11.0,继续在 80℃ 下保温 50min(保温过程中用 NaOH 维持 pH 在 10.5~11.0),过滤后用蒸馏水充分漂洗,使得 ABSE-蚕丝。

1.3.2 ABSE-蚕丝共价偶联脂肪酶:将 ABSE-蚕丝悬浮于蒸馏水中,冰水浴冷却,搅拌下顺序加入 1mol/L HCl 和 5% NaNO_2 溶液(1g 干蚕丝加 3.5ml 1mol/L HCl, 3.5ml 5% NaNO_2),冰水浴中搅拌反应 3~5min,过滤后用预冷的 0.05mol/L HCl 洗涤 3 次,再用冷蒸馏水洗涤 3 次,将滤干的重氮盐衍生物立即投入一定浓度的脂肪酶缓冲液中,冰箱内放置过夜,用蒸馏水充分洗涤,除去未偶联的酶,使得固定化酶。

2 结果与讨论

2.1 pH 对醚化反应的影响

蚕丝与 SESAs 的反应属于醚化反应^[6],为考察 pH 对此反应的影响,固定 SESAs 与蚕丝的用量,于 80℃ 下用 1mol/L NaOH 调节不同 pH,反应结束,洗涤后测定它们的醚化率,结果如图 1 所示。显然醚化反应受 pH 影响较大,pH 在 10.5~11.0,最适于 SESAs 在蚕丝上的连接,pH 高于 11.0 或小于 10.0,都会造成 SESAs 在蚕丝上醚化率的急剧下降。

2.2 SESAs 量对醚化反应与固定化酶活力的影响

SESAs 加入量的改变对蚕丝上醚化率的影响如表 1 所示。SESAs 加入量越高,偶联的酶就越多,但这并不等于固定化酶的活力就高。

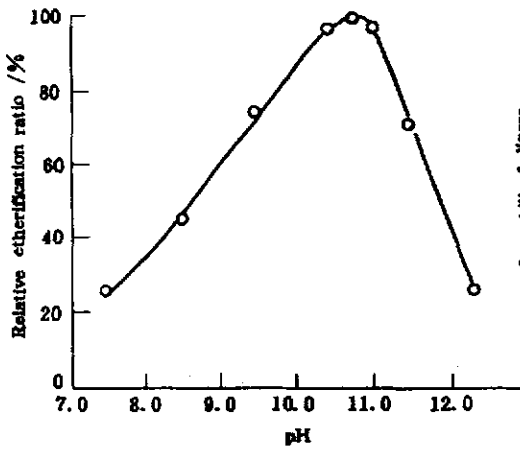


图1 pH对蚕丝与SESA醚化反应的影响

Fig.1 Effect of pH on the etherification reaction between silk with SESA

表1 SESA量对蚕丝醚化的影响

Table 1 Effect of SESA amount on etherifying silk

SESA/Silk (dry weight)/g	0.6	1.1	1.6	1.9	2.1	2.3
Etherification ratio/%	10.0	11.0	16.1	24.5	39.2	48.5

由图2可见,SESA与蚕丝之比为2:1时,所得固定化酶的活力最高。当SESA加入量小于此值时,能够与酶结合的偶联点少,偶联酶量较少。当SESA加入量大于此值时,载体上苯胺基含量增多,载体上偶联点增多,但固定化酶活力和残留活力明显下降,这可能是由于偶联点增多,导致酶与载体的多点结合,破坏酶的高级结构,使酶失去活性或是限制了酶在催化过程中的构型改变,使酶失去活性^[10]。

2.3 偶联反应 pH 对固定化酶活力的影响

ABSE-蚕丝重氮化后,浸入含有等量脂肪酶的不同pH的缓冲溶液中,使之与酶偶联,考察pH值对偶联反应的影响,结果见图3。由图3可见,偶联反应pH在7.5时所得固定化酶活力最高。pH偏酸性时,固定化酶活力与残留酶活力下降,说明在低pH下偶联引起了酶的失活。偶联反应时的碱性也不能太强,否则重氮盐与碱作用生成不能进行偶联反应的重氮酸^[11],导致固定化酶活力降低。

2.4 酶量对固定化酶活力的影响

ABSE-蚕丝重氮化后,均分成几份,加入相同体积不同浓度的酶液进行偶联,如图4所示,所得固定化酶活力随着给酶量的增加而增高。但固定化酶的活力回收率下降。这种现象说明,单位载体给酶量越多,载体上偶联的酶蛋白质量就越多,相应固定化酶活力就越高,偶联的酶量越多,造成的空间位阻效应就越大。因而,固定化酶的相对活力回收率下降幅度较大。由此看来,单位载体固定化酶活力只要能满足实验和实际需要,加酶量越少,酶损失就越少。为节省用酶本试验加酶量控制在168~308u/g蚕丝,所得固定化酶

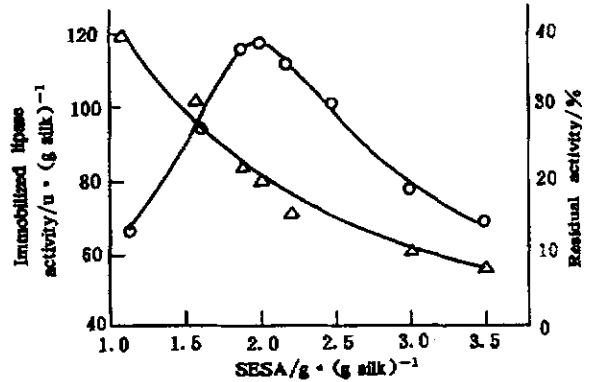


图2 SESA量对固定化酶活力的影响

Fig.2 Effect of SESA amount on

immobilized lipase activity

○ Immobilized lipase activity

△ Residual activity

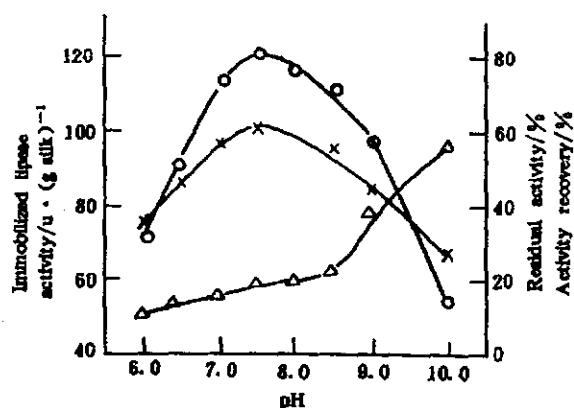


图3 pH对偶联反应的影响

Fig. 3 Effect of pH on link reaction

○ Immobilized lipase activity

△ Residual activity × Activity recovery

的活力为 106~160u/g 蚕丝, 对应的固定化酶活力回收率为 63%~52%。

2.5 偶联时间对固定化酶活力的影响

随着偶联时间加长, 载体上偶联的酶增多, 固定化酶活力增大, 残余酶活力减少。由表 2 可见, 偶联时间大于 10h 后, 固定化酶的活力就几乎不再增加了。但从固定化酶在室温下放置 10d 后的相对活性看, 偶联时间越长, 固定化酶的贮存稳定性越高。这是因为偶联反应被人中止后, 载体上残余的重氮盐就越多, 次结合就越严重。 α -萘酚能封闭可能残留的重氮盐^[9], 因此用 α -萘酚处理刚制备的固定化酶, 固定化酶的贮存稳定性明显提高。因此, 为了得到活力和稳定

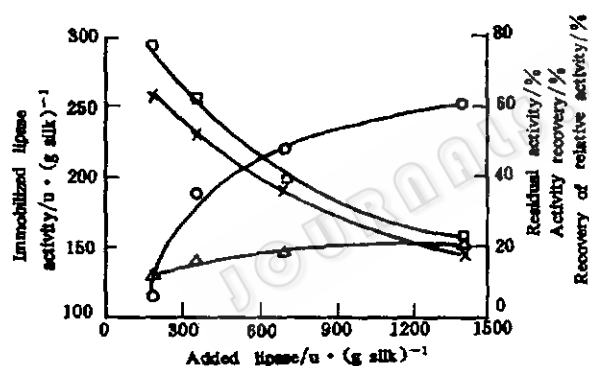


图4 加酶量对固定化酶活力的影响

Fig. 4 Effect of added lipase amount on immobilized lipase activity

○ Immobilized lipase activity, △ Residual activity

□ Recovery of relative activity, × Activity recovery

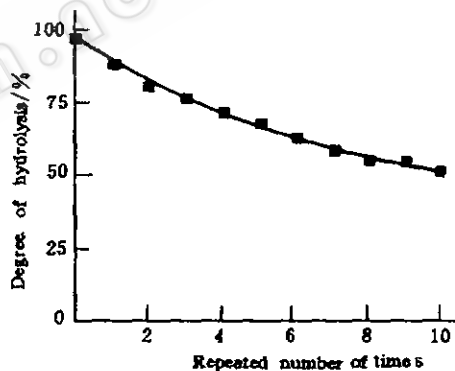


图5 固定化脂肪酶的稳定性

Fig. 5 The stabilization of immobilized lipase

性均较高的固定化酶, 偶联时间必须大于 10h。

2.6 固定化脂肪酶的稳定性

将脂肪酶固定化的目的就是要提高其稳定性, 便于重复使用。在间歇搅拌釜中, 加入一定量的橄榄油和磷酸缓冲液(油与水的体积比为 1:0.8)及适量的固定化脂肪酶(酶用量为 7u/ml 橄榄油), 在 50℃ 下搅拌反应 25h, 然后倾出油水混合物, 而将固定化酶留下, 供下一循环使用。固定化酶重复使用 10 次, 橄榄油的水解率降为原来的一半(见图 5), 即此固定化酶的活力还剩原来的一半, 故其半衰期约为 250h。显然固定化酶的使用稳定性还不是很理想。这可能是由于油脂水解过程中, 产生的脂肪酸使体系的 pH 减少, 从而导致酶部分失活。若能进行稳定连续操作, 就可避免 pH 下降对酶活性的影响, 提高固定

化酶的操作稳定性。

3 结 论

来源丰富,价格低廉的废蚕丝经共价活化后,制成的固定化酶载体,不同于一般的共价载体,它与酶之间用对- β -硫酸酯乙砒基苯胺(SESAs)连接,这样制得的固定化酶有较大的摆动自由度,可以大大减少大分子载体造成的空间障碍,提高了固定化酶的活性。酶与载体的结合力强,不易从载体上脱落下来,固定化酶的稳定性较高。此外固定化酶的回收率也高于一般的共价固定化。因此,用废蚕丝固定化脂肪酶是实现工业规模的油脂酶催化水解过程的理想载体。

表 2 偶联时间对固定化酶活力的影响

Table 2 Effect of link time on immobilized lipase activity

Link time /h	Immobilized lipase activity /u ⁺ (g silk) ⁻¹	Activity recovery /%	Residual activity /%	Relative activity after storage 10 days without α -naphthol treatment/%	Relative activity after storage 10 days with α -naphthol treatment/%
2	96	32.0	45.2	71.8	92.0
4	116	38.7	40.0	82.2	94.5
10	146	48.7	18.0	93.6	—
20	150	50.0	14.3	96.5	—
32	152	50.7	8.8	98.0	—

致谢 本院应用化学系 91 级学生王宏山、朱伟峰、周晔参加了部分试验工作,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Sonntag N O V. J Am Oil Chem Soc, 1984, 61:229~232.
- [2] R W 约翰逊, E 弗里兹编, 陆用海, 胡征宇主译. 工业脂肪酸及其应用, 北京:轻工业出版社, 1992, pp. 26~27.
- [3] Bradg C, Metcalf L, Slaboszewski D *et al*. J Am Oil Chem Soc, 1988, 65:917~921.
- [4] Yang D, Rhee J S. Biotechnol Bioeng, 1992, 40:553~558.
- [5] Kosugi Y, Tanaka H, Tomizaka N. Biotechnol Bioeng, 1990, 36:617~622.
- [6] 楼一心, 周文瑜. Pat CN 86 1 00565 A, 1987.
- [7] Know D Y, Rhee J S. J Am Oil Chem Soc, 1986, 63:89~92.
- [8] 邵显章编著. 酶的工业生产技术, 长春:吉林科学技术出版社, 1988, pp. 527~530.
- [9] 袁中一. 生物化学生物物理学报, 1981, 13(3):291~297.
- [10] 袁中一, 钱雪明. 科学通报, 1981, 12:749~752.
- [11] 徐寿昌主编. 有机化学, 北京:人民教育出版社, 1982, pp. 375.

Study on Immobilization of Lipase on Silk

Cao Guomin Huang Jie Gao Guangda

(Department of Chemical Engineering, Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, Changzhou 213016)

Abstract The conditions of the lipase immobilized on the silk and the stability of the immobilized lipase have been studied. The results showed that the optimal conditions for the reaction of the silk with p- β -sulfuric acid ester ethyl sulfone aniline (SESAs) are pH 10.8 and SESAs 2.0g/g silk. The product p-aminobenzent sulfanilyl ethyl silk (ABSE—silk) was diazotized and linked with lipase. The optimal pH for lipase linked to diazo-compound is 7.5. The link time is more than 10 hours. When the amount of lipase is between 168u/g silk to 308u/g silk, the activity of immobilized lipase is between 106u/g silk to 160u/g silk and the activity recovery is quite high (above 52%). The immobilized lipase is fairly stability, its operational half life is about 250 hours.

Key words Lipase, immobilization, silk