

聚乙烯醇复合凝胶固定化糖化酶研究*

周剑平^{1,2} 龚伟中^{1,3} 魏甲乾¹ 杨晖^{1**}

(甘肃省科学院生物研究所 兰州 730000)¹ (甘肃工业大学轻工食品系 兰州 730050)²

(中国科学院兰州化学物理研究所 兰州 730000)³

摘要:以聚乙烯醇复合凝胶作为载体固定化糖化酶,最终酶活达到1,558u/g干胶,酶活回收率是30.2%。该固定化酶在pH4.6,45℃下,以10%的可溶性淀粉为底物进行分批试验,操作半衰期为350h,具备高底物浓度下操作及贮存稳定性。

关键词:聚乙烯醇复合凝胶,固定化,糖化酶

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)03-0010-04

THE IMMOBILIZATION OF GLUCOAMYLASE ON POLYVINYL ALCOHOL COMPLEX GEL

ZHOU Jian-Ping^{1,2} GONG Wei-Zhong^{1,3} WEI Jia-Qian¹ YANG Hui¹

(*Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000*)¹

(*Gansu University of Technology, Lanzhou 730050*)²

(*Institute of Chemistry and Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000*)³

Abstract: In this article, the Glucoamylase was immobilized onto the polyvinyl alcohol complex gel. The results showed that the activity of immobilized Glucoamylase was 1,558 U per gram dry gel, the activity recovery was 30.2%. The enzyme system could directly converted 10% starch hydrolyses to glucose under the conditions of pH4.6 and 45℃. The results showed that the working half-life of immobilized Glucoamylase was 350 hours. The immobilized Glucoamylase has excellent store and working stability.

Key words: Polyvinyl alcohol Complex gel, Immobilization, Glucoamylase

酶作为一种生物催化剂,其重复利用与稳定性研究一直是国内外研究的热点,固定化酶便是其中的方法之一^[1,2]。葡萄糖淀粉酶(EC.3.2.1.3)俗称糖化酶,能水解淀粉的 α -1.4葡萄糖苷键,也能缓慢水解 α -1.6葡萄糖苷键产生葡萄糖,在制糖、酿酒、发酵工业中广泛应用。随着固定化酶技术的发展,各个国家普遍开展了固定化糖化酶的研究工作^[3,4]。我们用聚乙烯醇复合凝胶对糖化酶的固定化方法及其应用进行了系统研究,尤其是高底物浓度下固定化糖化酶操作及贮存稳定性。此研究的成功将有助于固定化糖化酶在工业生产中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

糖化酶:无锡酶制剂厂出品,工业酶活为5万单位。

可溶性淀粉:北京试剂厂出品,分析纯。

聚乙烯醇:聚合度 1750 ± 50 兰州纤维尼龙厂出品。

* 甘肃省中青年科学基金资助项目(No. YS991-A22-014)

** 联系人

收稿日期:2002-09-30 修回日期:2002-09-30

其它试剂均为分析纯或化学纯。

1.2 方法

1.2.1 固定化糖化酶的制备: 将8%的聚乙烯醇凝胶溶液在室温下与10mL 10%的酶液(加1gPEG或粗酶)混合均匀,总体积为100mL,然后倒入平皿铺成平板,在低温下,冷冻成凝胶,切成3mm×3mm×3mm的小块,用蒸馏水洗涤数次置4℃冰箱中备用。

1.2.2 糖化酶活力的测定 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定法^[5]): 1g 固体酶于40℃, pH4.6的条件下, 1h分解可溶性淀粉,通过测定所生成的葡萄糖的量来计算酶活,每产生1mg葡萄糖,即为1个酶活单位。

1.2.3 固定化糖化酶活力测定^[5]: 以1g固定化酶作为计量单位。

1.2.4 DE值的测定: 采用铁氰化钾滴定法^[6]。DE值为葡萄糖值的缩写,表示淀粉的水解程度,定义为:还原糖总量占试样中干物质质量的百分数。

2 结果与讨论

2.1 固定化方法的选择

聚乙烯醇复合凝胶是多羟基的强亲水性高分子材料,在固定化方法上一般有两种:(1)是改性聚乙烯醇与酶混合后滴入饱和硼酸^[7]。这样做成的固定化酶载体外硬内软,强度太小,而且在较酸环境中固定化酶的活性损失较大。(2)改性聚乙烯醇与酶低温冷冻处理,形成的载体强度高^[8]。因此本实验利用第二种方法,可以作成颗粒状和块状的固定化酶,并用交联剂处理不同形状的固定化酶与未处理固定化酶对照,其处理结果如表1。

由表1可看出:固定化酶经双功能试剂戊二醛(pH5.0, 0.5%)交联处理后,其酶活性有所提高,但在实验过程中发现其稳定性较差,可能是聚乙烯醇多孔网状结构中的残留的戊二醛造成酶分子变性失活。

2.2 固定化条件的确定

2.2.1 pH值:糖化酶为酸性蛋白,在pH为5时较稳定。使聚乙烯醇复合凝胶溶液处于pH5的微酸环境,固定化后将有利于糖化酶保持其较好的构象结构状态,活性较高。

2.2.2 加酶量的选择:取相同量的聚乙烯醇凝胶各50mL,其它条件不变,分别加入0.25g、0.5g、0.75g、1g的糖化酶(分别用10mL pH4.6乙酸-乙酸钠缓冲液溶解)。然后分别制备固定化酶,结果如表2。

由结果可见,随着加酶量的增加,固定化酶表观酶活性随之增加,但其活性回收率先增加后降低,甚至发生凝聚。当每50mL聚乙烯醇凝胶固定0.5g糖化酶时,其活性回收率达到最大,即30%。

2.3 固定化糖化酶的性质研究

2.3.1 最适反应pH值:取一定量固定化酶(1g)或1mL游离酶(固体酶稀释500倍),以2%的可溶性淀粉溶液为底物,在40℃不同pH值条件下,反应30min,然后测

表1 不同形状的固定化酶活力回收率的对照

载体形状	处理方法	回收率(%)
立方块载体	交联	35.1
(3mm×3mm×3mm)	未交联	30.2
膜载体	交联	62.7
(d<1mm)	未交联	51.2

表2 加酶量对固定化酶活力的影响

加酶量(g)	表观活性(w/g.dry gel)	活性回收率(%)	备注
0.25	1244.0	24	-
0.50	1558.4	30	-
0.75	1894.2	21	-
1.00	-	-	凝聚

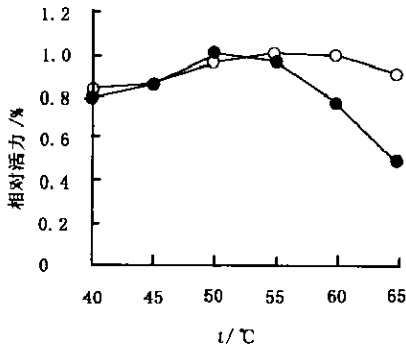


图1 固定化糖化酶的最适反应温度

—○— 固定化糖化酶, —●— 游离酶

其酶活。结果表明:固定化糖化酶的最适 pH 值在 4.6~5.0 之间,比游离酶的最适 pH 值 4.0 高 0.6~1 个单位。

2.3.2 最适反应温度:取 1g 固定化酶或 1mL 游离酶,在 pH4.6, 2% 可溶性淀粉溶液中,于不同温度条件下保温 30min,结果如图 1 所示。说明:该固定化酶的最适反应温度为 55°C~60°C,基本与游离酶最适反应温度接近。

2.3.3 热稳定性:取固定化酶或游离酶在无底物条件下,于 pH4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,在 30°C~70°C 的温度范围内,每下降 10°C 分别处理 60min,然后在 40°C 下测酶活,结果如图 2 所示。

固定化酶对温度的敏感性较小,证明其对温度有较好的稳定性。

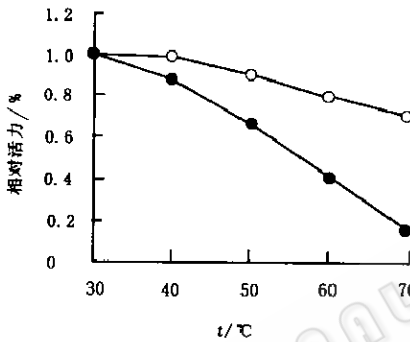


图2 固定化糖化酶的热稳定性

—○— 固定化糖化酶, —●— 游离酶

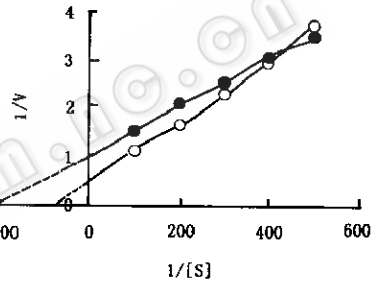


图3 Line weaver-Burk 双倒数图

—○— 固定化糖化酶, —●— 游离酶

2.3.4 米氏常数 Km 的测定:以 0.2%、0.25%、0.33%、0.5%、1%、2% 浓度的可溶性溶液为底物,在 40°C 下反应 10min,然后测定固定化酶以及游离酶的活性,做 Line weaver-Burk 双倒数曲线图(见图 3)。固定化酶的 Km 是 1.4%,游离酶的 Km 为 0.51%, Km/ Km = 2.75。结果说明,在多孔网络型聚乙烯醇凝胶载体表面以及载体内的酶活性部位在运转过程中存在着底物扩散限制。

2.3.5 贮存稳定性:经过固定的糖化酶于 0°C~4°C 冰箱中,在无底物存在下,保存

30d,其残余活力仍保持在 80%~90% (同等条件下,游离酶残余活力保持在 70%),其贮存稳定性优于游离酶。

2.3.6 底物浓度的影响:该固定化酶由于存在着底物扩散限制,因此需要最适的底物浓度以及一定分子量大小的反应底物。表 3 是不同浓度的底物在 45°C 的条件下酶促反应情况,最终 DE 值 > 95%。

由表 3 可以看出随着反应底物浓度的升高,

表3 底物浓度对固定化糖化酶的影响

底物浓度 (%)	酶活残留率 (%)	时间 (h)	DE 值 (%)
2	97.8	4.0	95.3
4	98.2	4.5	97.0
6	98.0	4.5	97.2
8	98.5	5.0	96.8
10	99.3	6.0	98.0
15	99.4	6.0	97.0

反应时间延长,酶活残留率升高。说明底物浓度对酶活有一定的影响。10%~15%的淀粉经液化后,粘度降低,可以较好地扩散到载体内部达到与酶分子的结合。通过实验得出淀粉底物浓度应小于15%,否则会使反应时间延长,造成酶分子的脱落。而10%~15%淀粉浓度是大部分工业生产中常用的淀粉浓度,所以该固定化酶使用的底物浓度能满足工业应用的要求。

2.4 固定化糖化酶的水解试验

2.4.1 可溶性淀粉的水解试验:以10%的可溶性淀粉液化液(DE值30%),在45℃、pH4.6的条件下进行分批水解反应,实验结果见表4。固定化酶可连续操作19批次,反应总时间240h,残余酶活62.8%,由半衰期 $t_{1/2} = 0.693/k_p$ 得出, $t_{1/2} = 350h$ [k_p 为衰减常数: $-2.303/t \cdot \log(E_0/E)$]^[9],即可重复23批次,DE值在95%~97%之间。

操作稳定性是评价固定化酶是否具有实用性的一个重要指标,本实验由于采用分批操作,在反应操作过程中易造成酶分子的脱落,若采用柱式连续反应器,固定化酶经多次使用后会有较高的活性保持率。

2.4.2 玉米淀粉的水解试验:将6g固定化酶加入到玉米粉(含淀粉70%)液化液中,45℃条件下进行分批水解试验,5批水解反应后,平均水解度(DE值)为85%,最高为89%。该固定化酶酶活残留率

为80%,且水解液颜色明显变浅,这可能是玉米粉中的磷脂及蛋白质分子被吸附在载体表面,从而阻碍了淀粉分子的进入。因此在以玉米粉作为反应底物时,需适当的进行原料预处理,尽量除去玉米中所含的脂类、其它杂蛋白及单宁类大分子物质,以减少对固定化酶水解带来的负影响。

表4 固定化糖化酶的操作稳定性

批次	残余酶活 (u/g.dry gel)	相对活力 (%)
0	1,558.2	100
1	1,534.1	98.5
.....
12	1,311.8	84.1
.....
15	1,178.4	75.7
.....
19	978.2	62.8

3 结论

以上结果表明,采用聚乙烯醇复合凝胶固定化糖化酶具有固定化酶活力较高、回收率较高、操作稳定等特点。选择适中回收率且稳定的固定化酶淀粉水解试验,表明淀粉水解率较高,尤其在10%~15%淀粉浓度下有较高的水解率,能满足工业应用的要求。

参考文献

- [1] Andres I. Electronic Journal of Biotechnology, 1999, 2 (1): 2~8.
- [2] 周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰. 北京: 清华大学出版社, 1998. 126~127.
- [3] Gordon F B. Immobilization of Enzyme and cells: Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa, NJ. 1997, 205~209.
- [4] 曲红波, 从威. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (2): 155~158.
- [5] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册. 北京: 中国轻工出版社, 1999. 286~289.
- [6] 魏述众. 生物化学. 北京: 中国轻工出版社, 1996. 25~26.
- [7] 李福锦, 赵萍. 科学通报, 1981, 15: 695~697.
- [8] 周剑平, 龚伟中, 王治业, 等. 微生物学通报, 2001, 28 (5): 29~32.
- [9] 郭勇. 酶工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 227~228.