

肠溶衣聚合物固定化纤维素酶性质的研究*

柴 梅¹ 袁振宏² 颜涌捷^{1* *}

(华东理工大学资源与环境工程学院 上海 200237)(中国科学院广州能源研究所 广州 510640)

摘要 选用国内固定化酶方面研究较少的 EudragitL-100 为载体,采用物理吸附法,制备出具有可溶-不可溶性质的固定化纤维素酶。固定化酶的溶解度变化的条件是: $\text{pH} \geq 5.0$ 时,呈可溶性; $\text{pH} \leq 4.0$ 时,呈不可溶性。固定化酶的稳定性较好,重复利用 4 次后,酶活力保留值在 65% 以上。比较了固定化酶和游离酶的最适反应条件和动力学常数的大小。以 2% 的滤纸为底物(15FPU/g 底物),固定化酶水解反应的效果比游离酶好。该研究结果在提高纤维素原料酶水解工艺的经济性方面具有重要意义。

关键词 EudragitL-100 固定化 纤维素酶

中图分类号: Q814.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0410-04

Studies on the Properties of Enteric Coating Polymer Immobilized Cellulase*

CHAI Mei¹ YUAN Zhen-Hong² YAN Yong-Jie^{1* *}

(College of Resource and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237);

(Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract Cellulase was immobilized on the EudragitL-100 by adsorption. The soluble-insoluble immobilized cellulase was gotten. The operational condition of immobilized enzyme is: $\text{pH} \geq 5.0$, soluble; $\text{pH} \leq 4.0$, insoluble. The immobilized enzyme was stable. When the immobilized enzyme was reused four times, more than 65% of the enzyme activity was found to be retained on binding to Eudragit. Kinetic properties and optimal conditions for activity of the immobilized enzyme were compared with that of the native enzyme. This research results were meaningful in the conversion and utilization of renewable biomass.

Key words EudragitL-100, Immobilized, Cellulose

生物质是唯一能转化为液体燃料的可再生能源。由生物质生产乙醇燃料,可以直接代替汽油作为民用燃烧或内燃机燃料。利用纤维素酶水解纤维素原料是乙醇生产的重要工艺,固定化纤维素酶能够增大酶的利用率和增强酶的稳定性。肠溶衣聚合物是一类固定化酶效果很好的 S-IS 载体^[1,2]。S-IS 载体是指随着溶液某个特定条件如 pH 值、温度的变化,或加入了某种金属离子,其溶解性质会改变的聚合物。这种载体克服了不溶性和可溶性载体存在的缺点,可以在可溶状态进行水解反应,在不可溶状态下方便回收。Eudragit 是一种包括甲基丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸酯共聚物的肠溶衣聚合物,由于其结构中含有羧基,在水中很容易与碱生成盐而溶解。Taniguchi 等人曾将其用于固定淀

粉酶、蛋白酶等种类的酶^[3,4]。

目前,国内利用 Eudragit 作为固定化酶载体的研究未见报道,国外近几年利用其固定化纤维素酶的报道也比较少。本文根据纤维素酶水解反应的特点,选择 EudragitL-100 作为固定化酶的载体,采用物理吸附法固定化纤维素酶,并对固定化酶的溶解度性质及稳定性、最适 pH 值、最适反应温度、表观米氏常数、离子强度对酶活力的影响等理化性质进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

EudragitL-100,德国赛化学(上海)有限公司提供;纤维素酶,诺维信(中国)投资有限公司提供;底

* 国家高技术研究发展计划项目("863"项目)(No. 2003AA514020)

* * 通讯作者 Tel: 021-64253409, E-mail: yyansc@online.sh.cn

收稿日期: 2006-06-21, 修回日期: 2006-08-01

物及滤纸,杭州新华纸业有限公司产品;其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 载体溶液的配制 将 2.5g EudragitL-100 加入到持续搅拌的 40mL 蒸馏水中,滴加 3mol/L NaOH 直到 pH = 11.0,聚合物完全溶解后,加入 3 mol/L 乙酸溶液,使溶液的 pH = 9.0,用蒸馏水将溶液定容为 50mL,将溶液 4℃ 保存。

1.2.2 纤维素酶的固定化 将一定量的酶液加入到 5mL EudragitL-100 溶液中,混合均匀,恒温放置一段时间后,边搅拌边滴加 1 mol/L 乙酸,至 pH = 4.0 左右,树脂基本沉淀下来,溶液呈现一种不溶解状态,静置 20min,离心(4000g × 10min),取出上清液,沉淀用 0.01 mol/L, pH = 4.0 醋酸盐缓冲液冲洗,最后溶解在 pH 5.8, 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液中,定容至 8mL。由此得到的就是固定化酶溶液。

1.2.3 纤维素酶活力的测定 游离态纤维素酶的活力按照文献 [5] 在 4 个比色管中加入不同稀释度的酶溶液 0.5mL 和 1mL 乙酸-乙酸钠缓冲液以及一条 1.0cm × 6.0cm (约 50mg) 的滤纸, 50℃ 恒温 1h, 分别加入 3mL DNS, 在沸水浴中显色 5min, 冷却至室温, 于 540nm 测上清液吸光度值。计算上述条件下生成 2.0mg 葡萄糖时, 每毫升纤维素酶液含有多少国际单位, 用 FPU 表示。

固定化酶活力的测定 在固定化酶呈溶解性的状态下测定酶液的酶活, 测定和计算方法同游离酶。

2 结果与讨论

2.1 载体溶液和固定化酶溶液的溶解性质

EudragitL-100 溶液溶解性变化的条件很多文献都已报道过^[3,4,6,7], 但载体在固定酶以后, 这个变化范围会有所改变^[6,8], 变化的结果与酶的种类有关但与量无关^[6]。为此, 应先考察固定化纤维素酶的 pH 溶解范围与纤维素酶水解反应的最适 pH 大致相符, 本文按照 Margolin^[8] 等人的方法, 研究了 EudragitL-100 溶液 (E) 和 EudragitL-100 固定化纤维素酶溶液 (E-C) 的溶解度性质, 分别取一定量的载体溶液和固定化酶溶液, 滴加乙酸溶液, 并不停的搅拌, 调节溶液至指定的 pH 值, 分别在 470nm 测量溶液的吸光度, 以吸光度的最大值为 100%, 两种溶液在不同 pH 值下的相对吸光度结果见图 1。

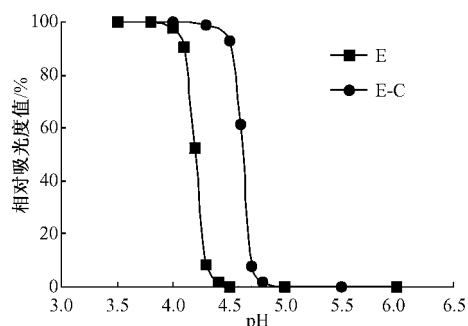


图 1 pH 值对 E 和 E-C 的溶解性质的影响

由结果 (图 1) 可以看出, 当 pH > 4.3 时, EudragitL-100 溶液在 470nm 没有吸光度, 溶液的溶解度为 100%。随着溶液 pH 值的减小, 吸光度值逐渐增大, pH < 3.8 时, 吸光度达到最大值, EudragitL-100 溶解度为 0。固定化酶溶液的溶解度在 pH > 5.0 时为 100%, pH < 4.0 时为 0。EudragitL-100 在固定了纤维素酶以后溶解度的 pH 值变化范围发生了变化。向碱性方向发生了偏移。这是因为 EudragitL-100 本身是酸性的, 当其吸附纤维素酶后, 结构中的自由羧基数减少, 所以会向碱性偏移。

由以上的实验结果可知, 纤维素酶的水解反应的 E-C 溶液溶解性变化范围为 pH 4.0 ~ 5.0, 这与纤维素酶水解反应最适 pH 值在 5.0 左右基本相符; 在 pH = 4.6 左右, 固定化酶溶液的溶解度变化很快, 这说明只要在很小的范围内调整反应体系的 pH 值, 就能使固定化纤维素酶沉淀, 回收纤维素酶操作十分方便。可见, 利用 EudragitL-100 固定纤维素酶是初步可行的, 于是本文进一步考察了固定化纤维素酶的性质。

2.2 固定化酶重复利用性能的考察

能够重复利用是固定化酶的优点之一, 本文首先考察了固定化纤维素酶的重复利用性能。取一定量已知酶活的固定化酶液, 边搅拌边滴加乙酸溶液, 调节酶液 pH = 4.0, 静置 20min, 离心去上清液, 沉淀用醋酸盐缓冲液冲洗, 然后用 pH 5.8 的缓冲液和少量的 NaOH 溶液溶解, 定容, 测定该酶液的酶活。重复进行上述的操作过程 6 次, 以酶液的初始酶活为 100%, 计算酶液的相对酶活, 结果见图 2。

由图 2 可以看出, 一次重复利用后, 固定化酶活力下降 8% 左右, 重复利用四次后, 固定化酶活力保留值为 65% 以上。随着固定化酶重复利用次数的增加, 固定化酶活力逐渐下降, 重复 4 次以后, 下降速度加快。产生这样的结果可能是以下几个原因, 纤维素

酶在固定过程中,并不能全部吸附在载体上,重复固定操作,反复使用酸碱溶液和缓冲液调节固定酶的pH值,酶液的盐浓度会逐渐增加,这将减弱载体与酶分子之间的吸附作用,造成纤维素酶脱附。

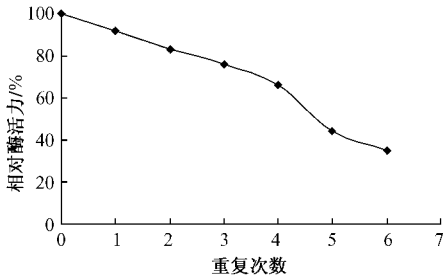


图2 固定化纤维素酶的重复利用性

本文对游离酶也进行了上述操作,结果发现游离酶在重复利用2次后,就基本失去活力了。在pH值低的环境下能否保持酶活力是固定化酶有效重复利用的关键。由以上的实验结果可以看出,固定化酶的稳定性尤其是在pH值低环境下的稳定性较好,游离酶与其相比要差很多。因此,利用EudragitL-100固定的纤维素酶是能够有效重复利用的。

2.3 pH值对酶活力的影响

在50℃条件下,将游离酶和固定化酶分别置于不同pH值的缓冲液中测定活力,两者均以各自的最高酶活力为100%,得到不同pH值下的相对酶活力值见图3。

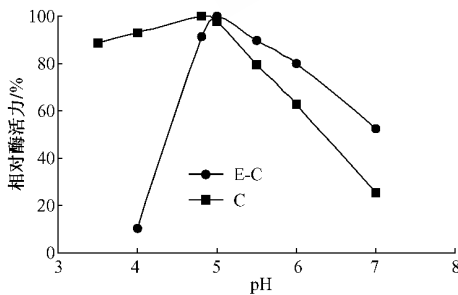


图3 pH值对酶活力的影响

由图3可以看出,游离酶的最适反应pH值为4.8,固定化酶的最适反应pH值为5.0。这与EudragitL-100是阴离子型载体,固定化酶的最适pH值应比游离酶的最适pH值偏碱性相符。固定化酶的活力在pH<5.0的范围内下降很快,pH4.0下的相对酶活力只有10%,由图1可知,在此范围内随着pH值的减小,固定化酶的溶解度逐渐减小。以上实验结果说明,不溶解状态的固定化酶是不能有

效进行水解反应的,最适pH值与固定化酶的呈溶解状态的pH范围相一致,进一步说明EudragitL-100固定纤维素酶的可行性,同时也为以后固定化酶水解反应条件的确立提供了参考数据。

2.4 温度对酶活力的影响

在不同温度(35℃~70℃)条件下,分别测定一定量的游离酶和固定化酶的活力,两者均以各自的最高酶活力为100%,其不同温度下的相对酶活力值见图4。

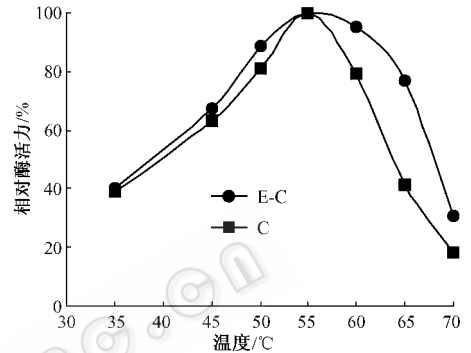


图4 温度对酶活力的影响

图4表明,游离酶和固定化酶的活力都在55℃时达到最大值,温度大于55℃时,游离酶活力减小的速度比固定化酶快。纤维素酶水解反应的温度一般在50℃左右,因此在反应过程中,游离态的纤维素酶活力会不断降低,实验结果表明,EudragitL-100固定纤维素酶后,提高了纤维素酶的热稳定性,使得固定化酶能够重复用于水解反应,达到纤维素酶回收再利用的目的。

2.5 离子强度对酶活力的影响

分别在不同离子强度条件(0mol/L~0.4mol/L NaCl)下测定一定量的固定化酶和游离酶的活力,两者均以各自在0mol/L离子强度下的酶活力为100%,不同离子强度下的相对酶活力见图5。

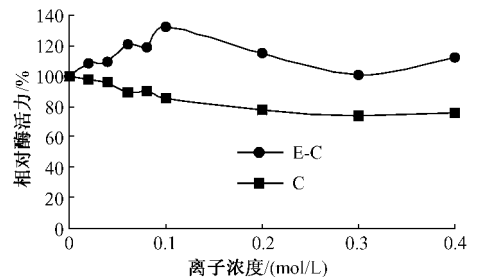


图5 离子强度对酶活力的影响

如图5所示,随着NaCl浓度的升高,游离酶活力随之逐渐减小,而固定化酶活力先是随之逐渐增

大 ,当浓度升高到一定程度后活力值又随之减小 ,但在 NaCl 浓度小于 0.4 mol/L 的范围内 ,固定化酶的相对酶活都大于 100%。在固定化酶的重复利用过程中 ,由于反复使用酸碱溶液调节 pH 值 ,会不断生成盐 ,由图 5 的实验结果说明 ,在一定的浓度范围内 ,盐分是不会影响固定化酶活力的 ,也就是说 ,酸碱中和生成的盐不会加快固定化酶活力的衰减速度。

2.6 米氏常数

分别取一定量的稀释好的游离酶溶液和固定化酶溶液 ,与不同浓度(0.2g/L ~ 1.0g/L)底物 ,于 50℃水浴中反应 1h ,测定溶液的还原糖浓度。根据 Lineweaver-Burk 法(双倒数作图法) ,将实验所得的游离酶和固定化酶的初速度数据 v 和 $[S]$ 取倒数 ,分别得到各种 $1/v$ 和 $1/[S]$ 值 ,将 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图 ,得两条直线。分别由直线纵截距 $= 1/V_{max}$,斜率 $= K_m/V_{max}$,计算得到游离酶和固定化酶的 V_{max} 和 K_m 值 ,见表 1。

表 1 游离酶和固定化酶的动力学参数

	K_m (g/L)	V_{max} [g(min/L)]
游离酶	57.27	0.04717
固定化酶	79.43	0.05312

文献中有关 S-IS 载体固定酶动力学常数研究的报道比较少 ,并且研究结果也都有很大不同。其中包括 Cong 等^[7]用 Eudragit L-100 固定淀粉酶 ,其固定化酶的 K_m 、 V_{max} 值与游离酶相差很小 ;Dinnella 等^[9]研究结果是两者相比 , K_m 值没有变化 , V_{max} 值减小 ;Roy 等^[10]将木聚糖酶固定在 Eudragit L-100 上 ,研究得到固定化酶的 K_m 、 V_{max} 值都要比游离酶大。由表 1 的结果 ,固定化纤维素酶的 K_m 、 V_{max} 值比游离酶有所增大 ,这为 S-IS 载体固定纤维素酶的

研究提供了一项重要的动力学数据。

3 结论

本文利用 EudragitL-100 固定纤维素酶 ,除了具有传统的固定化酶稳定性好 ,能够重复利用的优点 ,还克服了传统载体无法兼顾酶反应和酶回收两方面的缺点。通过简单的调节反应体系的 pH 值 ,固定化酶就能够在溶解状态下水解底物 ,在不溶状态下回收再利用。本文对固定化酶一些理化性质的研究表明 ,固定化纤维素酶的 pH 溶解范围与纤维素酶水解反应的最适 pH 值相符 ,其低 pH 值稳定性和热稳定性较好。因此 ,利用 EudragitL-100 固定纤维素酶 ,为回收纤维素原料制乙醇中酶水解工艺的纤维素酶 ,提高酶的利用率 ,降低生产成本提供了一种很好的方法。

参考文献

[1] Fujii M , Taniguchi M. Trends Biotechnol , 1991 , **9** :191 ~ 196.
[2] Taniguchi M , Hoshino K , Watanabe K. Biotechnol Bioeng , 1992 , **39** :287 ~ 292.
[3] Fujimura M , Mori T , Tosa T. Biotechnol Bioeng , 1987 , **29** :747 ~ 752.
[4] Taniguchi M , Tanahashi S , Fujii M. Appl Microbiol Biotechnol , 1990 , **33** :629 ~ 632.
[5] Ghose T K. Pure&Appl Chem , 1987 , **59**(2) :257 ~ 268.
[6] Dourado F , Bastos M , Mota M , *et al.* Journal of Biotechnology , 2002 , **99** :121 ~ 131.
[7] Cong L , Kaul R , Dissing U , *et al.* J Biotechnol , 1995 , **42** :75 ~ 84.
[8] Taniguchi M , Kobayashi M , Fujii M. Biotechnol Bioeng , 1989 , **34** :1092 ~ 1097.
[9] Dinnella C , Lanzarini G , Ercolessi P. Process Biochem , 1995 , **30** :151 ~ 157.
[10] Roy I , Gupta A , Khare S K , *et al.* Appl Microbiol Biotechnol , 2003 , **61** :309 ~ 313