

醋酸纤维素 - 聚四氟乙烯复合膜 固定化脂肪酶的研究

梁单琼¹, 周晓丹², 时敏², 王雪², 于殿宇^{2,*}

(1. 黑龙江省造纸工业研究所, 黑龙江 牡丹江 157013; 2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 以醋酸纤维素(CA)和聚四氟乙烯(PTFE)为材料制备醋酸纤维素-聚四氟乙烯复合膜, 采用吸附-交联相结合的固定化方法, 用该复合膜固定化脂肪酶。研究温度、吸附时间、酶液质量浓度、交联时间和交联剂体积分数对脂肪酶固定化效率和催化效果的影响, 并对固定化酶膜的酶学性质进行研究。得到最佳的固定化条件为: 温度 25℃、吸附时间 2h、酶液质量浓度 0.02g/mL、交联时间 3h、交联剂(戊二醛)体积分数 0.2%, 固定化酶最大酶活力为 17.2U/cm²。固定化酶膜的酶学性质为: 最适温度 35℃, 比游离酶降低了 5℃; 最适 pH8.5, 与游离酶相比 pH 值向碱性偏移 1.0; 经 10 次(10h / 次)重复使用后, 固定化酶相对酶活力为 55.5%。SEM 结果显示 CA-PTFE 复合膜能较好的固定化脂肪酶。

关键词: 醋酸纤维素-聚四氟乙烯复合膜; 脂肪酶; 固定化; 酶活力

Immobilization and Characterization of Lipase Immobilized onto Cellulose Acetate-Polytetrafluoroethylene Composite Membrane

LIANG Dan-qiong¹, ZHOU Xiao-dan², SHI Min², WANG Xue², YU Dian-yu^{2,*}

(1. Heilongjiang Research Institute of Pulp and Paper Industry, Mudanjiang 157013, China;

2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In the present work, we immobilized lipase onto cellulose acetate (CA)-polytetrafluoroethylene (PTFE) composite membrane by a combined method of adsorption and cross-linking. The effects of different immobilization conditions such as immobilization temperature, adsorption time, lipase concentration, cross-linking time and cross-linking agent concentration on lipase immobilization efficiency and catalytic activity were explored. Immobilized lipase was also characterized. The optimal immobilization conditions were reaction temperature of 25 °C, adsorption time of 2 h, lipase concentration of 0.02 g/mL, crosslinking time of 3 h, and cross-linking agent concentration of 0.2%. Under the optimal immobilization conditions, the maximum activity of immobilized lipase reached up to 17.2 U/cm². The optimal temperature and pH of immobilized lipase were 35 °C and 8.5, respectively, which exhibited a decrease by 5 °C and shift to alkaline side by 1.0 when compared with the free enzyme. After repeated use for 10 times for 10 h each time, the residual activity was still up to 55.5%. The SEM micrographs revealed better immobilization of the enzyme on CA-PTFE composite membrane.

Key words: CA-PTFE composite membrane; lipase; immobilization; lipase activity

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0171-06

脂肪酶是一类特殊的酰基水解酶, 在动植物各种组织及许多微生物中普遍存在, 是人类最早研究的酶类之一^[1]。它的天然底物是油脂, 具有对油-水界面的亲和力, 能催化酯水解或醇解、酯合成、酯交换、多肽

合成等反应, 在制药、试剂、食品加工、生物能源等方面有着很大的应用潜力^[2-3]。但脂肪酶是水溶性的, 不易回收重复使用, 粉末状脂肪酶分散于有机溶剂中容易失活, 而酶的固定化有利于酶的分散、回收和再利

收稿日期: 2011-06-13

基金项目: 国家“863”计划项目(2010AA101503)

作者简介: 梁单琼(1965—), 女, 高级工程师, 本科, 主要从事高分子材料及制浆造纸技术研究。

E-mail: liangdanqiong602@163.com

* 通信作者: 于殿宇(1964—), 男, 教授, 博士研究生, 主要从事大豆油脂加工技术研究。E-mail: dyu2000@yahoo.com.cn

用,减少了酶的损耗和残余酶产生的再次污染。所谓固定化酶就是利用物理或化学方法处理,将游离酶限定或束缚于一定范围之内使其与整体流体分开,但仍能发挥催化作用的酶制剂^[4-5]。科学家们一直对酶的固定化技术进行研究,但迄今为止,几乎没有一种固定化技术能普遍适用于每一种酶,所以要根据酶的应用目的和特性,来选择其固定化方法。目前已建立的固定化方法一般可分为:包埋法^[6]、吸附法^[7]、交联法^[8]及其价偶联法等。

从20世纪50年代膜分离技术进入工业化以来,经过几十年的发展,它已广泛渗透到化工、冶金、环保、生物工程等领域。分离膜不仅能对气体、有机物、各类生物制剂等进行有效的分离、浓缩、纯化,而且还能作为固定化酶的载体,实现酶的膜固定化。固定化酶膜可将酶的催化特性和膜的分离、载体和分隔功能等结合起来^[9],从而构成酶膜生物反应器,具有其他载体不可比拟的优点,近年来酶的膜固定化技术已经成为研究的热点领域^[10-11]。

醋酸纤维素-聚四氟乙烯(CA-PTFE)复合膜具有一定的吸附性、化学稳定性好、疏水性、机械性能优异等优点,根据复合膜的吸附特性固定化脂肪酶,可提高酶在反应体系中的活性和稳定性,调节和控制酶的活性与选择性,从而有利于酶的回收和产品的生产^[12-13]。但是,已有研究都是采用吸附法,而本实验采用吸附-交联相结合的方法固定化脂肪酶,以期得到更高酶活力的固定化酶。

本实验以醋酸纤维素(CA)和聚四氟乙烯(PTFE)为材料制备了CA-PTFE复合膜,采用吸附-交联相结合的固定化方法(吸附法主要通过范德力固定酶,把酶吸附在材料表面或内表面;交联法是在酶分子和交联试剂之间形成共价键,从而把酶束缚在固体材料上^[14]),用该复合膜固定化脂肪酶。研究温度、酶液质量浓度、吸附时间、交联时间和交联剂体积分数对脂肪酶固定化效率和催化效果的影响,并对固定化脂肪酶膜的最适温度、pH值和使用稳定性进行研究。以期得到最佳的固定化条件、固定化酶膜温度、pH值和使用稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

脂肪酶(猪胰) 上海源叶生物科技有限公司。

醋酸纤维素 北京惠宝联化科技有限公司;聚四氟乙烯膜(平均孔径0.1 μm,厚度85 μm) 北京塑料研究所;磷酸二氢钾 天津市光复精细化工研究所;磷酸氢二钠 天津市耀华化学试剂有限责任公司;二甲基甲酰胺(DMF) 天津市基准化学试剂有限公司;氢氧化钠、95%乙醇 天津市天士力化学试剂有限公司;聚

乙烯醇(PVA) 国药集团化学试剂有限公司;戊二醛 广州伟伯化学试剂有限公司;盐酸 上海贺宝化工有限公司;橄榄油 中国医药上海化学试剂;以上试剂均为分析纯;去离子水 娃哈哈集团有限公司。

ML 54 电子分析天平、PHS-3C 精密酸度计 梅特勒-托利多仪器有限公司;DK-2000-III 恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;YHW1104 远红外恒温干燥箱 天津北华仪器厂;DF-101S 焦热式恒温加热磁力搅拌器 郑州金育科贸有限公司;JJ-2(2003-61)组织捣碎匀浆机 苏州江东精密仪器有限公司;手动薄层涂铺器 上海信谊仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 复合膜的制备

将15g醋酸纤维素于60℃溶于85g DMF中得到铸膜液。将PTFE基膜先用0.1mol/L的NaOH溶液和0.1mol/L的HCl溶液清洗,然后用去离子水清洗,真空干燥后,平铺在洁净的玻璃板上。控制厚度,将CA铸膜液用特制的刮刀涂在PTFE表面,在室温下挥发适当的时间完成干相转换后,浸入去离子水完成湿相转换。12h后用去离子水清洗,自然干燥待用。

1.2.2 脂肪酶的固定化

取若干份1cm²的CA-PTFE复合膜于三角瓶中,分别加入一定量的酶液和pH7.5的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液,恒温搅拌吸附一定时间(25℃,170r/min)。再加入一定量戊二醛进行交联反应,反应结束后取出酶膜,用去离子水冲洗,放于干燥处待其风干后测定酶活力。

1.2.3 酶活力的测定

采用橄榄油乳化法。量取4%的PVA溶液150mL,加橄榄油50mL,用高速组织捣碎机处理6min(分两次处理),成为乳白色的PVA乳化液,即底物溶液(该溶液要现用现配)。取两个100mL三角瓶,分别标注空白瓶(A)和样品瓶(B),在两瓶中各加底物溶液4.00mL和pH7.5的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液5.00mL,再于A瓶中加入95%乙醇15.0mL于40℃水浴预热5min,然后,在两瓶中各加待测酶液1.00mL,立即混匀计时,在40℃水浴中准确反应15min,在B瓶中立即补加95%乙醇15.0mL终止反应,取出。用0.05mol/L的NaOH标准溶液滴定,记录其平均消耗量,根据下式即可计算出酶活力。

$$X = (V - V_0) \times (c/0.05) \times 50 \times (1/t) \times n$$

式中:X为样品的酶活力/(U/g);V为滴定样品时消耗的NaOH标准溶液体积/mL;V₀为滴定空白时消耗的NaOH标准溶液体积/mL;c为NaOH标准溶液的浓度/(mol/L);0.05为NaOH标准溶液浓度换算系数;50为0.05mol/L NaOH标准溶液1.00mL相当于脂肪酸

50 μmol ; n 为酶液样品的稀释倍数; t 为测定酶活力时的反应时间。

用上述方法测定固定化酶活力时, 每次取固定化酶膜两份, 其中一份做空白实验。在样品瓶中加入固定化酶膜 1 cm^2 , 其他参照游离酶活力测定过程。

酶活力单位定义为: 每平方厘米固定化酶膜在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH7.5 条件下, 水解脂肪每分钟产生 1 μmol 的脂肪酸所消耗的酶量为一个酶活力单位, 用 U/cm^2 表示。

1.3 固定化条件的单因素试验

1.3.1 温度的影响

当吸附时间 2h、酶液质量浓度 0.02g/mL、交联时间 3h、交联剂(戊二醛)体积分数为 0.2% 时, 分别选取温度为 5、10、15、20、25、30 $^{\circ}\text{C}$, 将 CA-PTFE 复合膜与酶液混合, 进行酶的吸附固定, 测定固定化酶活力。

1.3.2 吸附时间的影响

当温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、酶液质量浓度 0.02g/mL、交联时间 3h、交联剂体积分数为 0.2% 时, 分别选取吸附时间为 0.5、1、1.5、2、2.5、3h, 将 CA-PTFE 复合膜与酶液混合, 进行酶的吸附固定, 测定固定化酶活力。

1.3.3 酶液质量浓度的影响

当温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、吸附时间 2h、交联时间 3h、交联剂体积分数为 0.2% 时, 分别选取酶液质量浓度为 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03g/mL, 将 CA-PTFE 复合膜与酶液混合, 进行酶的吸附固定, 测定固定化酶活力。

1.3.4 交联时间的影响

当温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、吸附时间 2h、酶液质量浓度 0.02g/mL、交联剂体积分数为 0.2% 时, 分别选取交联时间为 1、2、3、4、5、6h, 将 CA-PTFE 复合膜与酶液混合, 进行酶的吸附固定, 测定固定化酶活力。

1.3.5 交联剂体积分数的影响

当温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、吸附时间 2h、酶液质量浓度 0.02g/mL、交联时间为 3h 时, 分别选取交联剂体积分数为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%, 将 CA-PTFE 复合膜与酶液混合, 进行酶的吸附固定, 测定固定化酶活力。

1.4 固定化酶的酶学性质实验

1.4.1 固定化酶的最适温度

CA-PTFE 复合膜在固定化温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、吸附时间 2h, 酶液质量浓度 0.02g/mL, 交联时间 3h, 交联剂体积分数 0.2%, pH 值为 7.5 时, 在该条件下固定化一批脂肪酶, 分别在不同温度条件下测定固定化酶活力, 以具有相同酶蛋白量的固定化酶与游离酶活力的比值作为相对酶活力。

1.4.2 固定化酶的最适 pH 值

选择不同的反应 pH 值, 按 1.4.1 节测定固定化酶最适温度的步骤进行实验。

1.4.3 固定化酶的操作稳定性

取两种固定化脂肪酶, 以其中一种固定化脂肪酶为对照, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 7.5 的橄榄油乳化液中反应 10h, 分别在相同条件下连续进行 10 批次操作, 测定酶活力, 以第 1 批次酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.4.4 CA-PTFE 复合膜及固定化脂肪酶结构与表征实验

用 S-3400N 型扫描电镜对 CA-PTFE 复合膜及固定化脂肪酶样品进行扫描。

2 结果与分析

2.1 固定化条件的选择

2.1.1 温度的影响

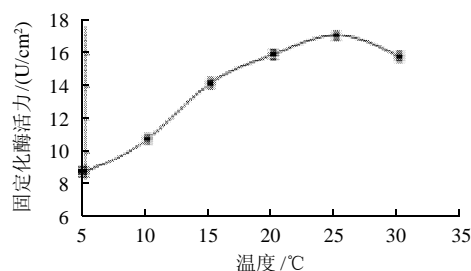


图1 固定化温度对固定化酶活力的影响

Fig.1 Effect of immobilization temperature on the activity of immobilized lipase

由图1可知, 温度对固定化酶的影响比较显著, 这是因为温度影响分子热运动的速度, 温度升高使酶蛋白变性, 在相同的固定化时间内, 它将直接影响酶的固定化效率。温度过低不利于传质及酶与载体的结合, 过高则会使酶失活, 本实验选取最适温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 此时的固定化酶活力为 17.2 U/cm^2 。

2.1.2 吸附时间的影响

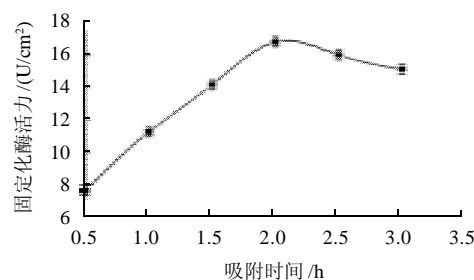


图2 吸附时间对固定化酶活力的影响

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

由图2可知,随着吸附时间的延长,CA-PTFE复合膜在2h时固定化酶的活力最大,当进一步延长固定化时间时,由致密的亲水层和多孔的疏水层组成的CA-PTFE复合膜载体含有的大量羟基与酶分子中的极性官能团结合,发生离子反应,使酶的吸附量变大^[1]。酶分子与载体反应基团的结合已经不是主要因素,酶在环境中失活或者由于酶分子相互聚集导致脂肪酶的活性中心互相遮盖而影响酶活力。因此,本实验选取的最适吸附时间为2h,此时的固定化酶活力为16.8U/cm²。

2.1.3 酶液质量浓度的影响

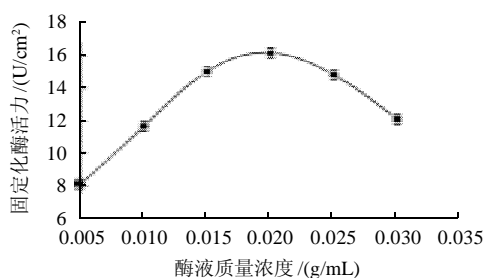


图3 酶液质量浓度对固定化酶活力的影响

Fig.3 Effect of lipase concentration on the activity of immobilized lipase

由图3可知,当酶液质量浓度为0.02g/mL时效果最好,当酶液质量浓度低于0.02g/mL时,固定化酶活力随酶质量浓度的增大而增加,而高于此值后固定化酶活力有所下降。说明脂肪酶在固定化时,载体吸附的酶量是有限的,一方面可能是载体的吸附能力较弱,使载体可吸附的酶量较少,催化活性较低;另一方面即使载体吸附性较强,但吸附的酶过多,造成酶分子相互聚集导致脂肪酶的活性中心互相遮盖,使酶的催化活性降低。因此,本实验选取的最适酶液质量浓度为0.02g/mL,此时的固定化酶活力为16.22U/cm²。

2.1.4 交联时间的影响

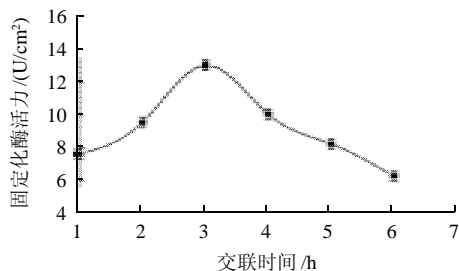


图4 交联时间对固定化酶活力的影响

Fig.4 Effect of cross-linking time on the activity of immobilized lipase

由图4可知,当交联时间为3h时固定化酶活力最

大,为13.08U/cm²,明显低于温度、吸附时间、酶液质量浓度这3个影响因素最佳条件时的酶活力。说明交联时间对脂肪酶固定化酶活力的影响相对较小。

2.1.5 交联剂体积分数的影响

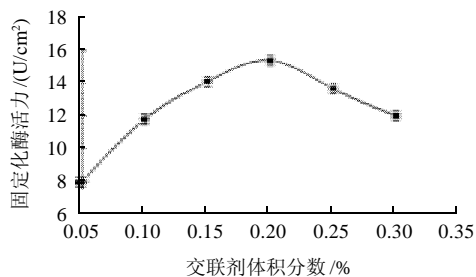


图5 交联剂体积分数对固定化酶活力的影响

Fig.5 Effect of cross-linking agent concentration on the activity of immobilized lipase

由图5可知,当交联剂体积分数为0.2%时固定化酶活力最大为15.4U/cm²,当交联剂体积分数低于0.2%时,固定化酶活力随交联剂体积分数的增大而增加,而高于此值后固定化酶活力逐渐下降。这是因为酶与交联剂发生化学反应,当交联剂体积分数过高时,就不可避免地导致酶部分活性的损失,从而降低酶的活力。

2.2 固定化酶的酶学性质

2.2.1 固定化酶的最适温度

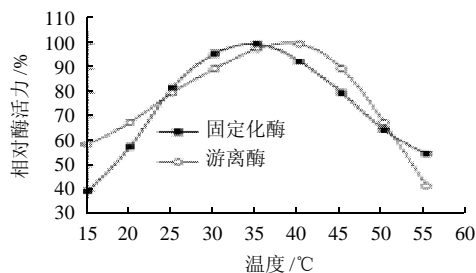


图6 温度对固定化酶相对酶活力的影响

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

由图6可知,固定化酶的最适反应温度为35℃,而自由酶的最适反应温度为40℃,与自由酶相比,固定化酶的最适反应温度下降了5℃,并且在30~40℃之间水解橄榄油所表现的酶活力比较稳定,相对酶活力都在90%以上,说明固定化酶最适反应温度范围变宽。温度超过40℃时,固定化酶酶活力变化较游离酶小,主要是因为固定化酶比游离酶稳定,不易失活。

2.2.2 固定化酶的最适 pH 值

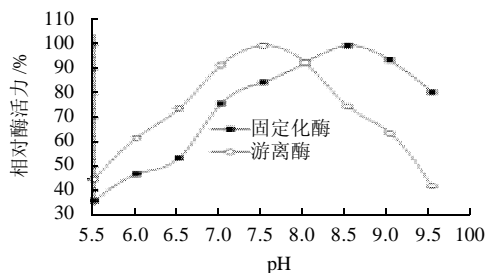


图7 pH 值对固定化酶相对酶活力的影响

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

由图7可知,游离脂肪酶的最适pH值为7.5,固定化脂肪酶的最适pH值为8.5,向碱性偏移1.0。固定化酶pH值在7.5~9.5范围内相对酶活力都保持在80%以上;而自由酶对pH值的变化很敏感,只在pH7~8范围内保持较好的酶活力。这说明固定化脂肪酶受pH值的影响比游离酶小,其耐受pH值的范围明显变宽。

2.2.3 固定化酶的操作稳定性

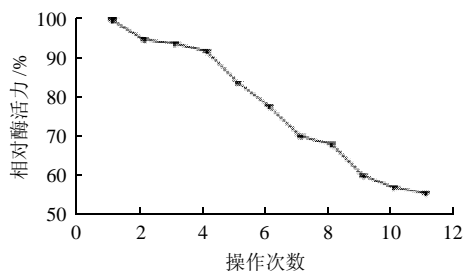


图8 重复使用次数对固定化酶相对酶活力的影响

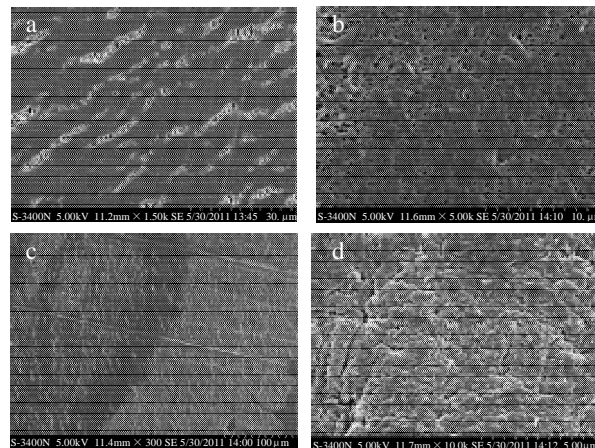
Fig.8 Effect of repeated applications on relative activity of immobilized lipase

固定化酶膜的使用稳定性是评价其固定化方法优劣的重要指标。经10次使用后,相对酶活力为55.5%,这可能是由于在使用过程中,膜本身的溶胀导致其孔结构发生了变化。Luo等^[15]的研究表明,微孔膜溶胀会导致其孔隙率降低。本实验PTFE层的孔隙率降低,降低了孔面积,使得其能够提供用于脂肪酶活化的疏水界面减小,从而降低了固定化酶的催化活性。同时,由于流体的冲刷会导致部分酶的流失,以及脂肪酶本身的失活都会导致固定化酶活性的降低。

2.3 CA-PTFE 复合膜及固定化脂肪酶结构与表征

如图9所示,图a中PTFE的开孔率比较高,因此有较大的空间负载酶。图b中CA的表面较致密,生物兼容性好,而将CA涂在PTFE表面制成的CA-PTFE复合膜孔径致密、均匀,稳定性好。图c中用PTFE单膜固定化脂肪酶,膜表面负载了部分酶,但仍有许多

孔径清晰可见,说明PTFE表面负载的酶量相对较少,不足以将膜的孔径全部覆盖。图d中CA-PTFE复合膜表面的微孔大部分被酶覆盖,且酶堆积的非常致密,表明大部分酶滞留在CA-PTFE的界面上,这种结构较利于脂肪酶的固定化。



a.PTFE 表面结构; b.CA-PTFE 表面结构; c.PTFE 固定化酶表面结构; d.CA-PTFE 固定化酶表面结构。

图9 CA-PTFE 复合膜及固定化脂肪酶的 SEM 图

Fig.9 Scanning electron micrographs of CA-PTFE composite membrane and immobilized lipase

CA-PTFE 复合膜能较好的固定化脂肪酶是由脂肪酶本身的特性所决定的。各种脂肪酶的氨基酸顺序可能有很大的差别,但却具有相似的折叠方式和活性中心。一般地,脂肪酶的多肽链折叠成两个结构域,即N末端和C末端结构域。N末端的活性部位有一条可结合长链脂肪酸的疏水性通道,而催化活性部位位于此疏水通道中。本实验所选的CA-PTFE复合膜经大量文献^[1,9]证实为疏水性较好的膜材料,因此这种复合膜较利于脂肪酶的固定化。

3 结 论

以CA和TFE为材料制备CA-PTFE复合膜,采用吸附-交联相结合的固定化方法固定化脂肪酶,过程简单,酶催化活性较高,是一种很有应用前景的固定化脂肪酶膜的制备方法。用该复合膜固定化脂肪酶具有很好的固定化效果。得到最佳的固定化条件为:温度25℃、吸附时间2h、酶液质量浓度0.02g/mL、交联时间3h、交联剂体积分数0.2%。制得固定化酶的最适温度为35℃,比游离酶降低了5℃;最适pH值为8.5,与游离酶相比pH值向碱性偏移1.0;经10次(110h以上)重复使用后,固定化酶相对酶活力为55.5%,说明固定化酶膜的稳定性较好。SEM结果显示,CA-PTFE复合膜表面的微孔

大部分被酶覆盖,且酶堆积的非常致密,表明大部分酶滞留在CA-PTFE的界面上,这种结构较利于脂肪酶的固定化。

参考文献:

- [1] 徐坚,王玉军,骆广生,等.膜材料的亲疏水性对固定化脂肪酶的影响[J].高校化学工程学报,2006,20(3):396-400.
- [2] 高阳,谭天伟,聂开立,等.大孔树脂固定化脂肪酶及在微水相中催化合成生物柴油的研究[J].生物工程学报,2006,22(1):114-118.
- [3] 聂开立,王芳,谭天伟.固定酶法生产生物柴油[J].现代化工,2003,23(9):35-38.
- [4] 蒋琨.丙烯晴丙烯酸共聚物纳米纤维膜的制备及脂肪酶的固定化[D].杭州:浙江大学,2007.
- [5] 鹿波.固定化酶的制备和酪蛋白合成类蛋白的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.
- [6] SHARMA R, CHISTI Y, BANERJEE U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(8): 627-662.
- [7] BAHAR T, CELEBI S S. Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly (styrene) particles[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23: 301-304.
- [8] BAHAR T, CELEBI S S. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR)[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26: 28-33.
- [9] 徐坚,王玉军,骆广生,等.利用醋酸纤维素-聚四氟乙烯复合膜中的微结构固定化脂肪酶[J].化工学报,2006,57(10):2372-2377.
- [10] DENG Hongtao, XU Zhikang, LIU Zhenmei, et al. A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes modified by suga-reontaining polymer and polypeptide[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 28(2/3): 95-100.
- [11] DENG Hongtao, XU Zhikang, LIU Zhenmei, et al. Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases by adsorption on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(5): 437-443.
- [12] 彭立凤,刘新喜.棉织物上 SESA 活化法固定化脂肪酶工艺的研究[J].食品工业科技,2001,22(2):30-33.
- [13] 杨昌英,潘家荣,钟珩,等.醋酸纤维素固定化脂肪酶催化猪油合成单甘酯[J].湖北化工,2002(6):20-21.
- [14] 彭立凤,谭天伟.脂肪酶固定化方法的研究[J].中国油脂,2000,25(1):58-61.
- [15] LUO Guangsheng, XIA Fang, DAI Youyuan. Wetting and swelling for polymeric membrane[J]. Membrane Science and Technology, 1998, 18: 38-41.