

· 研究简报 ·

高分子复合物固定化纤维素酶的研究*

王玲治 杨守平 江英彦

(中国科学院化学研究所, 北京)

关键词 固定化酶、纤维素酶、高分子复合物

固定化酶是将水溶性的酶用物理或化学方法处理, 使之变成不溶于水的仍具有酶活性的酶衍生物。在催化反应中, 它以固相状态作用于底物。固定化酶不但仍然具有酶的高度专一性及温和条件下高效率催化的特点, 还可反复使用。这样, 酶经固定后, 稳定性有较大增加, 可贮藏较长时间。

用高分子复合物固定生物酶是固定化酶的一个新的尝试^[1]。两种不同的高分子链通过氢键力、库伦力、范德华力、疏水键力等所谓次价键而聚集成高分子复合物。高分子复合物具有一些特殊功能, 如优良的质量传递性能、对水、电解质的灵敏介电特性, 对氧和水的选择透过性以及生物的相容性等特性, 为生物酶的固定化技术提供了一种新型载体。

目前, 国内外从事高分子复合物固定纤维素酶的研究较少, 用其它方法制得的固定化纤维素酶催化纤维素水解成葡萄糖, 转化率为 30% 左右, 使用 5 次, 活性下降 30—50%^[2,3]。我们用聚丙烯酰胺、聚乙烯胺、聚丙烯酰肼, 分别和聚甲基丙烯酸复合, 用这三种高分子复合物作载体固定纤维素酶。这三种固定化酶稳定性较好, 使用 10 次以上, 放置一个月活性不下降。其中聚甲基丙烯酸-聚乙烯胺固定化纤维素酶活性较高, 转化率可达 40% 左右, 活性产率可达到 90%。

1. 高分子载体的制备 用过硫酸钾作引发剂制备聚甲基丙烯酸 (PMAA) 和聚丙烯酰胺 (PAA)^[4]。丙烯酰胺中加入异丙醇和过硫酸钾制备聚丙烯酰胺 (PAAm)^[5]。聚丙烯酰胺中加入水合肼制备聚丙烯酰肼 (PAH)^[6]。聚丙烯酰胺溶液冷却至 0℃, 再加安替福民, 冷却至 -5℃, 迅速冷至 -15℃, -10℃ 时加入 10mol 氢氧化钠溶液, 制备聚乙烯胺 (PVAm)^[7]。

2. 固定化酶的制备 取 2ml 0.4 mol PMAA 溶液, 滴入 2ml (8.5 mg) 纤维素酶 (From Trichoderma 东京化成工业株式会社), 搅拌 1 小时, 再滴入 2ml 0.4mol 另一种高聚物, 搅拌 2 小时, 过滤, 抽干, 得固定化酶。

$$\text{活性产率} = \frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{加入溶液酶总活率} - \text{上清液活力}} \%$$

3. 处理纤维素溶液及测定纤维素转化率 用浓硫酸处理棉花, 用 CY-2 测氧仪测定耗氧率, 以耗氧率对葡萄糖溶液浓度作图, 即得测试所需标准曲线^[8]。

4. 酶促反应 取 10ml 0.0125 mol 纤维素溶液, 加入一定量的固定化酶 (含 8.5mg

* 1987 年 11 月 16 日收到。

cellulase) 室温搅拌 24 小时, 取 1ml 产物, 稀释至 10ml, 测出纤维素转化率^[8].

5. 不同载体对酶活性的影响 不同的高分子复合物载体对固定化酶活性影响见表 1.

表 1 载体对固定化酶活性影响*

固定化酶种类	纤维素转化率(%)	固定化酶种类	纤维素转化率(%)
PMAA-E-PAAm	25.0	PMAA-E-PAH	4.6
PMAA-E-PVAm	10.2	PAA-E-PAAm	2.6

* 实验条件: 室温 (25°C), 搅拌 24 小时, pH = 3.4, 酶量: 8.5mg cellulase.

从表 1 可以看出, PMAA-E-PAAm、PMAA-E-PVAm 两种固定化酶活性较高, 而 PMAA-E-PAH、PAA-E-PAAm 两种固定化酶活性很低. 这可能是由于 PAH 碱性较 PAAm、PVAm 强, 它与 PMAA 混合在一起有可能成盐, 而不能形成高分子复合物, 因而不能很好地包埋酶. 同样的 PAA 酸性比 PMAA 强, PAAm 具有两性, 它在酸性介质中呈碱性, 在碱性介质中呈酸性^[9], 因而 PAA-PAAm 加在一起时形成盐, 也不能很好地包埋酶. 而 PMAA-PAAm、PMAA-PVAm 能很好地形成高分子复合物, 因而能很好地包埋酶, 因此, 这两种固定化酶活性较高.

6. 酶量对固定化酶活性的影响 PMAA-E-PAAm 固定化酶载酶量对活性的影响结果列于表 2.

表 2 酶量对固定化酶活性的影响*

酶量 (mg/lg 固定化酶)	相对活力(%)	酶量 (mg/lg 固定化酶)	相对活力(%)
40.75	100	116.43	76.5
58.21	91.5	174.65	24.1

* 实验条件同表 1.

从表 2 可看出, 载体上偶联酶的量变化, “相对活力”也有变化. 单位载体上偶联的酶少, “相对活力”就比较高; 偶联酶越多, “相对活力”就越低. 这是由于酶越集中, 空间位阻就越大, 而且底物和产物也来不及扩散. “相对活力”即酶的最高活力为 100%.

7. pH 值对固定化酶活性的影响 每种酶都有一个表现最大活力的 pH 值, 我们把这个 pH 值称为最适 pH 值. 然而, 酶在固定化之后, 往往引起 pH 值的改变. 如图 1 所示, 溶液酶的最适 pH 值为 4.5, 而固定酶 PMAA-E-PAAm 为 8.3, PMAA-E-PAA 为 4.7, PMAA-E-PVAm 为 5.6. 可见不同载体的最适 pH 值也不一样. 这是由于酶固定化后, 在不同的载体中所处的微环境发生了变化, 因此, 外层溶液的 pH 值必须发生变化才能消除这一差别, 使酶的作用达到最大效率. 从图 1 可以看出, pH 值的改变对酶活性的影响是很大的, 因此, 找出酶的最适 pH 值是很重要的. 固定酶 PMAA-E-PVAm 在最适 pH 值为 5.6 时, 活性接近溶液酶, 活性产率可达到 90% 以上. PMAA-E-PAAm 比溶液酶 pH 值范围加宽许多.

8. 温度对固定化酶活性的影响 酶是蛋白质, 蛋白质的特点是不耐热, 因此, 温度对

酶的影响具有两面性。它既可以加速酶的催化反应,也可引起酶的失活。温度对酶的活性影响示于图 2。

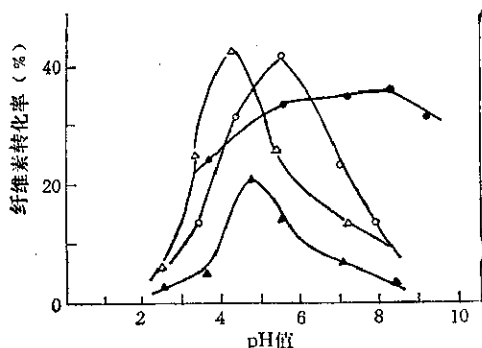


图 1 pH 值与纤维素转化率的关系

室温 (25℃), 搅拌 24 小时; —△—溶液酶,
—○—PMAA-E-PVAm; —▲—PMAA-E-PAH;
—●—PMAA-E-PAAm。

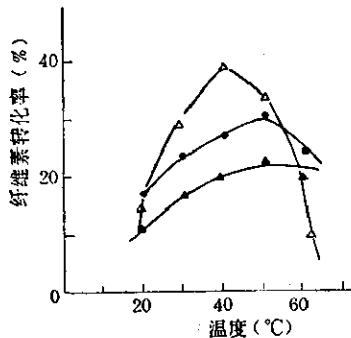


图 2 反应温度和纤维素转化率的关系

pH = 3.4, 搅拌小时; —△—溶液酶;
—●—PMAA-E-PAAm;
—▲—PMAA-E-PAH。

从图 2 可以看出,溶液酶受温度影响较大,而固定化酶的热稳定性增加,它的最适反应温度比游离酶高,而且受温度影响较小。这是由于酶经固定化后,酶分子从游离状态变为牢固地结合于载体的状态,从而形成了一个与液相酶完全不同的微环境,因此,外界对它的影响通过水不溶网块和周围扩散层后就变得很微弱了。

9. 稳定性变化 (1) 贮存稳定性 PMAA-E-PVAm、PMAA-E-PAAm、PMAA-E-PAH 三种固定化纤维素酶和可溶性纤维素酶的贮存稳定性情况示于图 3。它们都同样放置在室温 (25℃), 溶液酶 15 天后相对保留活性 (第一天活性为 100%) 仅为 9.1%, 而三种固定化酶贮存 30 天后, 其相对保留活性仍为 100%。固定化酶的贮存稳定性大大提高, 这对于工业生产非常有利, 运输贮藏过程中不失活, 就有可能把固定化酶作为商品制剂, 供应边远地区使用。 (2) 反应稳定性 酶只能与底物作用一次, 不可分离, 而酶加

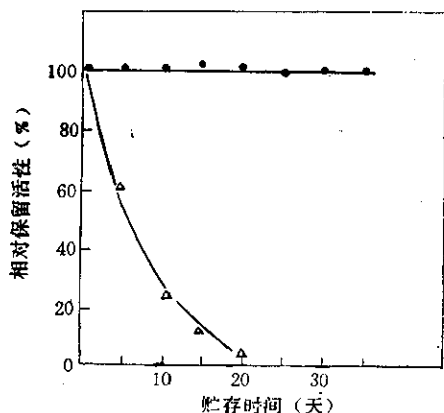


图 3 贮存时间与酶活性的关系

室温 (25℃); 搅拌 24 小时; —△—溶液酶;
—○—三种固定化酶

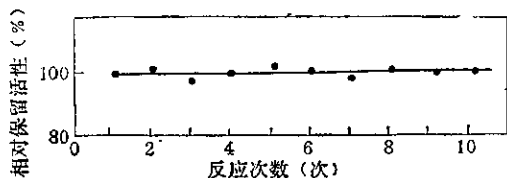


图 4 PMAA-E-PAAm、PMAA-E-PAH 固定化酶反

应次数与相对活性的关系
室温 (25℃); 搅拌 24 小时。

以固定化以后反应后即可沉淀下来,分离后又可重复使用。我们将 PMAA-E-PAAm、PMAA-E-PAH 两种固定化酶反复使用 10 次(由于时间关系没有继续往下做),结果示于图 4。从图 4 可以看出这两种固定化酶相对保留活性(第一次的活性为 100%)没有下降。

我们使用聚丙烯酰胺、聚乙烯胺、聚丙烯酰肼分别和聚甲基丙烯酸复合,这三种高分子复合物固定纤维素酶,制得的三种固定化酶都能使酶获得较大的稳定性,使它们能在较广的 pH 范围内,较高的温度下发挥较大的作用,并能贮存,反复使用,这为今后固定化酶的工业化生产开辟了广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Osada, Y., Iino, Y. and Namajiri, Y., *Chemistry Letters*, 1982, 559—562.
- [2] Fadda, M. B., Dessi, M. R., Maurici, R., Rinaldi, A. and Satta, G., *Appl. Microbioc. Biotechnol.*, 1984, 19 (5), 306—11.
- [3] Karube, I., Tanaka, S., Shirai, T., and Suzuki, S., *Biotechnol. and Bioeng.*, 1977, 19, 1183.
- [4] Barret, G. R. (Monsanto Chemical Co.), *U. S. Pat.*, 1959, 2, 904, 541.
- [5] Hiroo Tanaka and Ryoichi Senju, *Bull. Chem. Soc., Japan*, 1976, 49, 2821.
- [6] 美, G. G., 吉尔鲍特, 酶法分析手册, 427.
- [7] Tanka, H., Serju, R., *The Chemical Society of Japan*, 1976, 49, 2821.
- [8] 王玲治、张莉、江英彦, 高分子学报, 1987, 6, 449—453.

A STUDY ON IMMOBILIZATION OF CELLULASE BY THE INTERPOLYMER COMPLEXES

WANG Lingzhi, YANG Shouping and JIANG Yingyan

(*Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing*)

ABSTRACT

A series of immobilized cellulase were prepared by using polymethylacrylic acid (PMAA)-polyacrylamide (PAAm), polymethylacrylic acid (PMAA)-polyacrylic hydrazide (PAH) and polymethylacrylic acid (PMAA)-polyvinylamine (PVAm) interpolymer complexes. It was found that these immobilized enzymes have very high activity for transformation of cellulose to glucose. The cellulose conversion by PMAA-E-PAAm was about 40%. And these immobilized enzymes have an excellent stability and can be reused many times without any appreciable loss in catalytic activity. The immobilized enzyme activity was almost unchanged after storage for 30 days at room temperature.

Key words Immobilized enzyme, Cellulase, Intermacromolecular (Interpolymer) complex