

· 研究简报 ·

## 聚甲基丙烯酸-聚乙烯吡啶复合物 固定纤维素酶的研究\*

王玲治 张 莉 江英彦  
(中国科学院化学研究所, 北京)

**关键词** 固定化酶、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡啶、纤维素酶、纤维素、高分子复合物

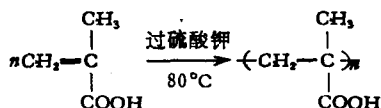
作为植物细胞壁主要成份的纤维素, 占植物总重的一半, 是地球上最丰富的有机物, 是对人类有用而且潜力很大的自然资源。将这些廉价易得的纤维素利用纤维素酶转变成葡萄糖, 不仅在食品工业上有现实意义, 而且对未来化学工业的发展有着不可估量的影响。但由于酶在水溶液中不稳定, 反应后难以分离和回收, 只能使用一次, 成本较高, 使其应用受到一定的限制, 固定酶的发展正好弥补了上述不足。

酶的固相化方法大致可分为吸附法、载体偶联法、交联法、包埋法四大类。这几个方法有的活性较高, 但不稳定; 有的酶和载体结合较牢固, 但活性不高。用高分子复合物固定生物酶是固定化酶的一个新的尝试<sup>[1]</sup>。目前, 从事高分子复合物固定纤维素酶的研究还不多, 据文献报道纤维素酶固定在各种载体上进行纤维素制备葡萄糖的反应, 转化率为30%左右, 反复使用5次, 活性下降30—50%<sup>[2,3]</sup>。

本文采用聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡啶的复合物固定纤维素酶(PMAA-cellulase-PVPy)的大分子效应, 使得固定后的纤维素酶活性较高, 贮存期延长, 可以反复使用, 综合了四种固相化方法的优点。因此, 此固定化酶温度在25℃, pH为3.5时, 转化率可达34%; 反复使用10次后放置25天, 活性几乎不下降, 显示出良好的稳定性。

### 1. 聚甲基丙烯酸的制备

在三口瓶中加入50ml蒸馏水, 加热至80℃, 在此温度下, 把30g减压蒸馏精制的甲基丙烯酸和0.8g过硫酸钾、20ml水、在搅拌下分别滴入瓶内, 升温至80℃, 继续搅拌1小时, 放置1天, 旋转蒸发得到透明的高聚物固体(PMAA)。

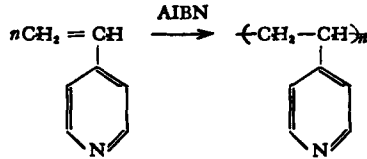


配制成0.4mol水溶液。

\* 1985年12月3日收到。

## 2. 聚乙烯吡啶的制备

减压蒸馏法提纯单体,在聚合管中加入 5.6g 无水乙醇和 0.12g 偶氮二异丁腈,再加入 24g 4-乙烯吡啶,将聚合管放入丙酮与液氮的冷却器中,然后充氮抽空.停止充氮,用冷水融化管中固体,再次冷却,充氮数次.真空下熔封,置 70°C 恒温槽中经 5 天后开封管,将溶液倒入水中沉淀出来,水洗数次后,真空干燥得浅橙色 PVPy 固体.



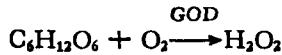
配制成 0.4mol 乙醇溶液.用粘度法测以上两种高聚物的分子量.

## 3. 处理纤维素溶液

将棉花用 50% 的浓硫酸溶解,用丙酮析出,将得到的絮状纤维素用丙酮洗涤、真空过滤后即可得到可溶性纤维素.用乙酸-乙酸铵缓冲液配制 0.0165mol 纤维素溶液.

## 4. 测定纤维素转化率

配制浓度为 0.001、0.0015、0.0025mol 的葡萄糖溶液,取 7ml 加入封闭式反应器,再注入 0.2ml 葡萄糖氧化酶溶液 (1mg GOD),用 Cy-2 测氧仪测出其耗氧率,以耗氧率对葡萄糖溶液浓度作图,即可得测试所需标准曲线.



根据测出的耗氧率从标准图上可找出葡萄糖浓度,从而推导出纤维素的转化率.

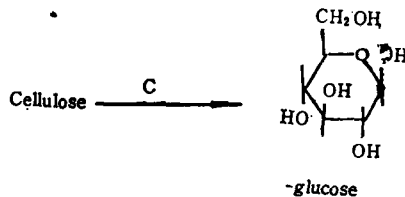
## 5. 固定化酶的制备

2ml 0.4mol PMAA 溶液,放入 25ml 烧杯中,滴入 0.75ml (3mg) 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 PVPy,搅拌 16 小时,真空过滤得 PMAA-cellulase-PVPy 固定酶.测出活性产率是 74%

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

## 6. 酶促反应

取 5ml 0.0165 mol 纤维素溶液,加入 0.03g 固定酶(含 1mg cellulase),搅拌 24 小时,取 1ml 产物,稀释至 10ml,测出纤维素转化率.纤维素转变成葡萄糖作用过程如下:



## 7. 两种大分子单体克分子比对纤维素转化率的影响

结果列于图 1. 由图 1 可以看出,当两种载体克分子比为 1 左右时,转化率较高.这

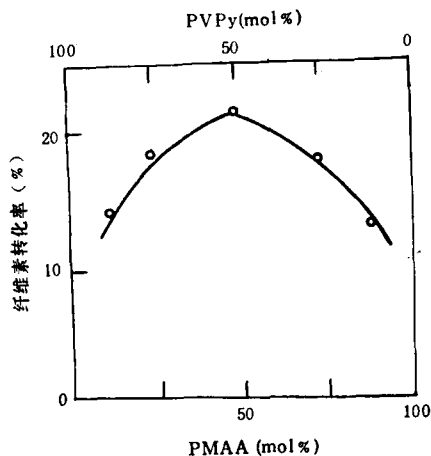


图1 两种高聚物克分子比对转化率的影响  
PVPy 分子量为  $8.0 \times 10^4$ ; PMAA 分子量为  $17.0 \times 10^4$ ;  $25^\circ\text{C}$ ; 搅拌 24h; pH3.5

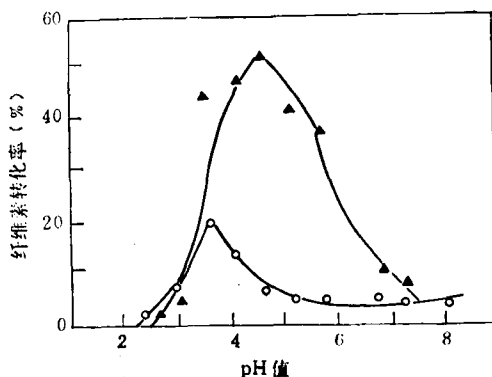


图2 pH 值与转化率的关系  
—▲— 液体酶; —○— 固定酶;  
其它条件同图1

可能是复合完全,包埋和结合酶的效果都比较好的缘故。而且从固定酶外观看,克分子比为 1 时,复合物沉淀完全,过滤容易。

### 8. 每一种酶有其表现最大活力的 pH 值

用 PMAA-cellulase-PVPy 固定酶进行纤维素转化为葡萄糖反应时,转化率与溶液 pH 值关系列于图 2。从图 2 看出液体纤维素酶最适宜 pH 值为 4.5,固定化后 pH 值为 3.5。最好的 pH 值下降的原因是由于复合后酶分子所处的微观环境发生了变化,复合物基团对其扩散产生了影响。从载体结构分析知道, PMAA 与 PVPy 属于弱酸强碱型复合物,故酶所处的微观环境略显碱性,使扩散层的 pH 值大于外部溶液的 pH 值,为了抵消这一影响,外部溶液的 pH 值必须向酸性方向偏移,才能使酶的作用达到最大效率。

### 9. 不同分子量的聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡啶对固定纤维素酶活性的影响

从表 1 看出,分子量大小对酶活性有一定的影响, PMAA 及 PVPy 之间分子量相差不应太大。

表 1 分子量对转化率的影响\*

聚合物分子量	PMAA $10^4$	PVPy $10^4$	纤维素转化率(%)
	17.0	8.0	20.8
17.0	1.0	13.6	
2.0	1.0	18.2	

\*  $25^\circ\text{C}$ ; pH = 3.5; 搅拌 24 小时。

### 10. 反应温度对转化率的影响

从图 3 可以看出,固定化前、后的纤维素最佳反应温度都是  $40^\circ\text{C}$ 。

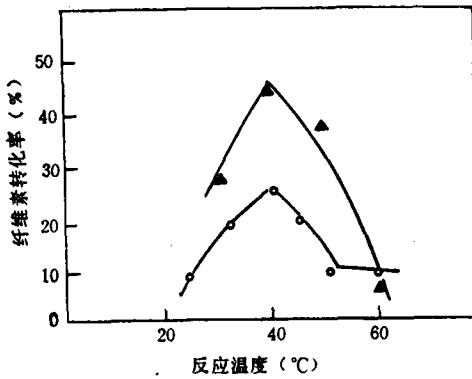


图3 反应温度对转化率的影响  
—▲— 液体酶；—○— 固定酶；  
pH为3.5；搅拌时间为24h

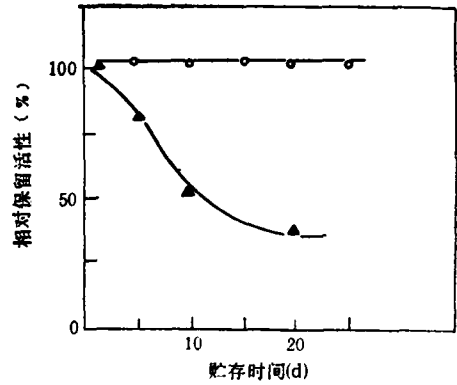


图4 贮存稳定性  
—▲— 液体酶；—○— 固定酶；液体酶和固定酶都含纤维素酶1mg；25°C；搅拌24h

### 11. 液体酶和固定酶贮存稳定性

纤维素酶用聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡啶复合物固定化前后的贮存稳定性实验结果列于图4(相对保留活性以贮存1天,反应第一次的纤维素转化率为100%)。从图4看出,同样在室温条件下,纤维素酶在稀溶液状态保存20天,相对活性仅有40%,而固定酶保存25天后,相对活性仍为100%。不仅从测量数据可以看出固定酶贮存稳定性增加,从外观可以看出,液体酶在室温保存5天,即长出丝霉,并渐渐产生凝胶。而固定酶外观不发生任何变化,室温下活性能保持不变。酶贮存稳定性的增加对酶的应用十分有利,这是固定酶的优点之一。

### 12. PMAA-cellulase-PVPy 固定化酶催化反应次数与相对保留活性的关系

液体酶只能与底物作用一次,不可分离。而固定酶反应完毕能沉淀下来,分离后可多次反复使用,本文所用 PMAA-cellulase-PVPy 固定酶连续反应10次,活性不下降。

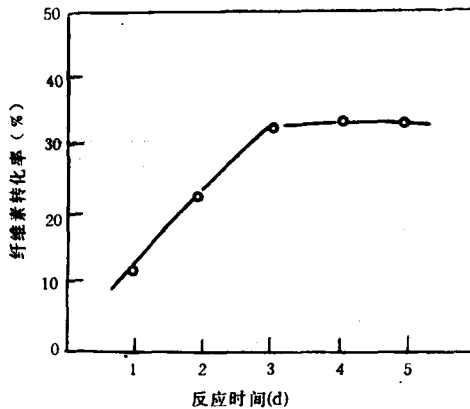


图5 纤维素转化率与反应时间的关系  
25°C；搅拌24h

### 13. 反应时间对转化率的影响

从图 5 可以看出, 反应经三天完成, 纤维素的转化率达到 34.4%。

我们还进行了用 3—9 小时作为反应时间, 对比溶液酶与固定酶的反应速度。实验结果表明, 两者相差不大。PMAA-cellulase-PVPy 固定酶的活性是较高的。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hua, J., Lui, L., Yi, R., Fang, S. and Jiang, Y., *The 2nd Symposium on Catalytic Science Chinese Chemical Society, Preprints, No 23, 1984.*
- [ 2 ] Fada, M. B., Dessi, M. R., Maurici, R., Rinaldi, A. and Satta, C., *Appl. Microbioc. Biotechnol.*, 1984, 19 (5), 306—11.
- [ 3 ] Karube, I., Tanaka, S., Shirai, T. and Suzuki, S., *Biotechnology and Bioengineering* 1977, XIX, 1183—1191.

## STUDIES ON IMMOBILIZATION OF CELLULASE BY THE COMPLEX OF POLYMETHACRYLIC ACID AND POLY-4-VINYLPYRIDINE

WANG Lingzhi, ZHANG Li and JIANG Yingyan

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

### ABSTRACT

An immobilized cellulase was prepared by the immobilization of cellulase with a complex of polymethacrylic acid and polyvinylpyridine for the use of transformation of cellulose to glucose. It has been found that the yield of glucose is affected by molecular weight of polymer support, pH value of solution, reaction temperature and so on. The immobilized cellulase was more stable than the soluble cellulase. It could be reused ten times and stored for 25 days without appreciable loss in catalytic activity.

**Key words** Immobilized, enzyme, Polymethacrylic acid, Poly-Vinylpyridene, Cellulase, Cellulose, Intermacromolecular (interpolymer) complex