

海藻酸钠包埋法制备固定化脂肪酶研究

鲁玉侠, 蔡妙颜, 郭祀远, 王兆梅

(华南理工大学轻工研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 研究了以海藻酸钠为载体, 用包埋法制备固定化脂肪酶的条件, 将一定量的海藻酸钠用蒸馏水加热溶解, 将 500mg 脂肪酶溶解在 pH=6 的缓冲溶液中, 然后两者混合均匀, 用注射器将海藻酸钠酶液逐滴到 1% 的无菌 CaCl₂ 溶液中, 搅拌条件下室温固定 1h, 过滤, 洗涤, 干燥, 得球状固定化脂肪酶。试验表明, 此固定化酶具有良好的耐热性能, 在 60℃ 下加热固定化脂肪酶和游离脂肪酶 1.5h, 固定化酶活力仅损失 30%, 而游离脂肪酶的酶活只为原来的 18%。固定化脂肪酶还有良好的可操作性, 连续使用反应 10 次, 固定化脂肪酶的酶活依然为初始酶活的 95%。

关键词: 脂肪酶; 海藻酸钠; 固定化

中图分类号: Q814.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)01-0030-03

The Preparation of Immobilized Lipase by Embedded in Sodium Alginate

LU Yu-Xia, CAI Miao-yan, GUO Si-yuan, WANG Zhao-mei

(Institute of Light Ind. & Chem. Eng., South China Univ. of Technol., Guangzhou 510640, China)

Abstract: The conditions of the immobilized lipase using sodium alginate as carrier were studied. First, sodium alginate solution (dissolved with hot distilled water) and 500 mg lipase solution (dissolved with buffer solution (pH=6)) were mixed and the obtained mixture was dropped into 1% aseptic CaCl₂ solution using an injector. After immobilized for 1h with shaking, filtration, washing and drying, the round immobilized lipase was finally obtained with good thermal stability. The residue activities of the immobilized lipase and free lipase after incubated at 60℃ for 1.5h were 70% and 18%, respectively. Moreover, the immobilized lipase had good operational stability, which could be repeatedly used for 10 times and the relative activity of the lipase was as high as 95%.

Key words: Lipase; Sodium alginate; Immobilize

固定化酶是酶工程的核心内容之一, 近年来引起人们的极大关注。脂肪酶是文献报道使用较多的一种酶, 能在油-水界面上催化酯水解或醇解、酯合成、酯交换、内酯合成、多肽合成、高分子聚合物的合成, 以及手性化合物的拆分等反应, 但是游离酶一般溶于水, 在有机溶剂中聚集成团, 其本身不稳定, 使用后也不易分离, 而若将酶固定在载体上, 可扩大其与底物的接触面积, 有利于底物分子的扩散, 提高酶的热力学稳定性, 调节和控制酶的活性和选择性, 有利于在有机溶剂中的反应, 并可以很方便地分离和重复使用, 对提高酶的利用效率, 延长使用时间具有重要意义。

脂肪酶催化技术应用于工业很大程度上取决于酶的固定化。酶的固定化方法很多, 常用的有: 物理吸附法、共价偶联法、包埋法等。

本文采取海藻酸钠包埋法制备固定化脂肪酶, 并

收稿日期: 2006-06-12

作者简介: 鲁玉侠, 在读硕士, 研究方向: 天然碳水化合物分离提纯新方法、新技术

取得良好的结果。

1 试验方法

1.1 仪器

电位滴定仪: 法国 radiometer SAS; 磁力加热搅拌器: 德国 IKA。

1.2 试剂

脂肪酶: 诺维信 Lipase 2000L; 天然乳脂: 新西兰无水天然乳脂; 海藻酸钠: 丹尼斯克(中国)有限公司; 氯化钙; 95%乙醇; 无水乙醚; 1%酚酞指示剂。

1.3 测定所需试剂

1.3.1 滴定剂配制

准确称取一定量氢氧化钾固体, 用 95%乙醇溶液溶解, 配制 0.5mol/L 的氢氧化钾的 95%乙醇溶液。

1.3.2 邻苯二甲酸氢钾标准溶液配置

精确称量 105℃干燥至恒重的邻苯二甲酸氢钾固体, 配置 0.5mol/L 的邻苯二甲酸氢钾标准溶液。

1.3.3 缓冲溶液的配制

称取 8.34g KH₂PO₄ 和 0.87g K₂HPO₄ 分别放在两

个烧杯中溶解,待完全溶解后,混溶,用蒸馏水稀释到 1000mL。即为 pH 5.8 的磷酸盐缓冲溶液。

1.3.4 酶液的配制

取脂肪水解酶 500mg,用 pH 5.8 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液,稀释至 100mL,即为浓度为 5g/L 的酶液。

1.4 脂肪酶的固定化

将 2g 海藻酸钠放入 200ml 烧杯中,加蒸馏水约 60ml,加热溶解,待海藻酸钠溶液冷却后,将浓度为 5g/L 的酶液加入海藻酸钠溶液混合,用注射器滴入 1% CaCl_2 溶液中,固化 1h,过滤,洗涤,干燥,得球状固定化脂肪酶。

1.5 游离酶和固定化酶活力的测定

用一定量的脂肪酶水解天然乳脂,在 40℃ 时水解 1h,取 10g 水解产物,0.5mol/L 氢氧化钾的 95%乙醇溶液滴定水解产物,通过消耗的 0.5mol/L 氢氧化钾的 95%乙醇溶液的量计算出混合脂肪酸的量,从而求出酶活力。固定酶活的测定可以用同样方法。

2 结果与讨论

2.1 固定化条件对固定化酶活力的影响

2.1.1 海藻酸钠的浓度对固定化酶活力的影响

海藻酸钠作为固定化酶的载体,对固定化酶的酶活有显著的影响。海藻酸钠具有强烈的吸附作用,可以与钙、铜等正二价阳离子迅速形成凝胶。海藻酸钠的浓度过大,凝胶的孔径越小,影响酶与底物的结合。海藻酸钠浓度太小,凝胶的孔径较大,固定化酶容易流失,所以酶活较低。所以海藻酸钠浓度有一个最佳浓度值。

将酶液与海藻酸钠溶液混合,配制海藻酸钠浓度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 五个样品,检测固定化酶的活性。图 1 可看出,海藻酸钠的浓度为 1.0% 时,酶活达到了最大值。

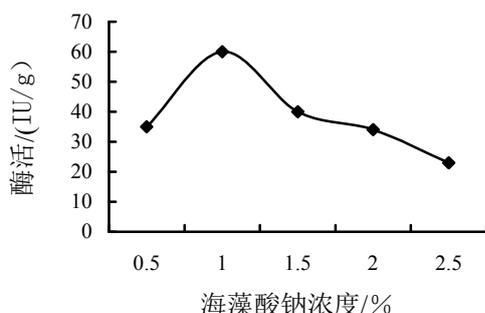


图 1 海藻酸钠浓度对酶活影响

2.1.2 CaCl_2 浓度对固定化酶活力的影响

氯化钙的浓度太大,海藻酸钠与钙离子形成的凝胶表面会布满钙离子,由于钙离子会与酶作用,从而降低酶活性;而氯化钙的量太少又会导致凝胶强度太小,包埋不完全,包埋在内部的部分酶会流失。

在海藻酸钠浓度为 1% 条件下,与一定量的酶液混合均匀,逐滴分别加到 0.01mol/L、0.03mol/L、0.05mol/L、0.07mol/L、0.09mol/L 的 CaCl_2 溶液中。从图 2 的结果表明, CaCl_2 浓度为 0.03mol/L 时,酶活力最大。

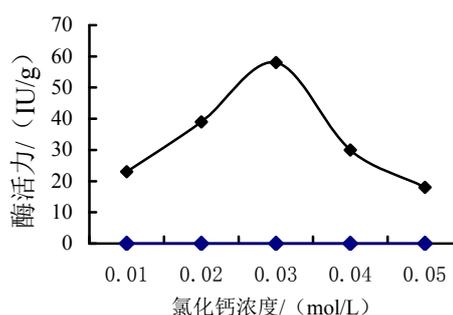


图 2 氯化钙浓度对固定化酶活力的影响

2.1.3 脂肪酶用量对固定化酶活力的影响

脂肪酶用量亦有一最佳值。量太大,在海藻酸钠凝胶里包埋的浓度太高,酶蛋白分子不能很好的伸展,部分酶分子无法与底物接触,所以酶的回收率降低,表现出酶活力较低。

保持海藻酸钠的浓度为 1%,脂肪酶的添加量对酶活的影响见图 3。从图 3 可看出,开始时,脂肪酶活随添加量增大而增大,然后又随酶添加量增大而降低;酶活回收率随添加量的增大而减少。综合两方面因素,选择 30mL 加酶量为宜。

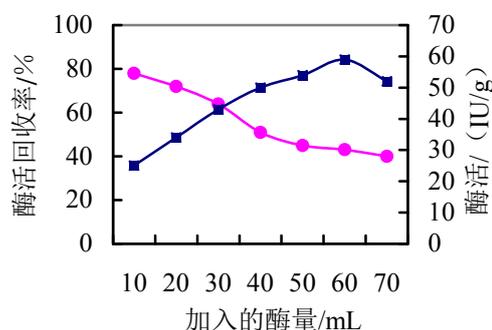


图 3 酶加入量对酶活影响

■ 为酶活曲线, ◆ 为酶活回收率曲线

2.1.4 固定化时间的影响

开始固定化时,由于包埋逐渐紧密,流失减少,固定化酶的活性呈升高趋势;60min 固定化酶活达到最大,再延长只会使 Ca^{2+} 与酶作用,影响活性,

和包埋过于紧密,影响酶与底物的结合。

考察固定时间对固定化酶活的影响,从图4可看出,1h为最佳固定化时间。

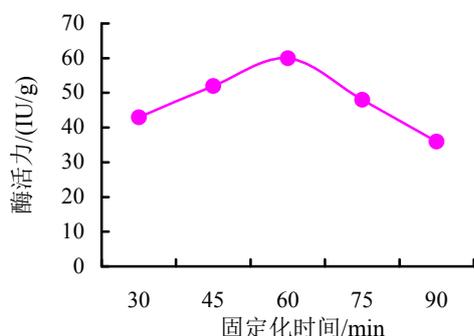


图4 固定化时间对酶活的影响

2.2 固定化酶的酶学性质

2.2.1 游离脂肪酶与固定化脂肪酶的热稳定性比较

分别取一定量的游离脂肪酶和固定化脂肪酶,分别放在10℃,20℃,30℃,40℃,50℃,60℃保存1.5h。测定酶活的变化,结果如图5。

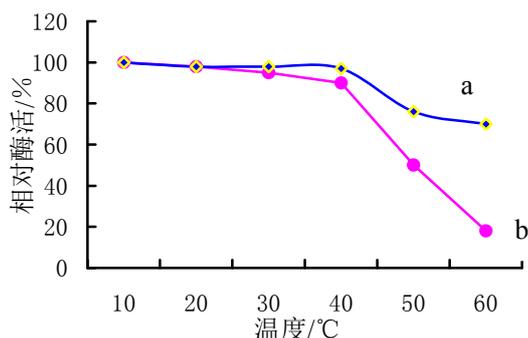


图5 游离酶与固定酶热稳定性比较

注: a 为游离酶, b 为固定化脂肪酶

图5可看出,游离酶经固定化后耐热性能变好,

耐热范围变宽。在60℃时固定化酶的相对活力为初始酶活的70%,而游离酶只有初始酶活的18%。

2.2.2 固定化脂肪酶的操作稳定性

将脂肪酶固定化的目的就是要提高操作稳定性,便于回收利用,重复操作。称取100g天然乳脂,和缓冲溶液及适量固定化脂肪酶,在最佳温度下搅拌水解18h。将水解产物与固定化酶分离,再重复使用固定化酶。用0.5mol/L的95%乙醇氢氧化钾溶液滴定,计算每次的酶活力。结果发现,重复10次以后,酶活力降为原来的95%。具有游离酶不可相比的优越性。

3 结论

本文以海藻酸钠为载体,采用包埋法制备固定化脂肪酶,具有工艺简单、条件温和及操作简便的特点。通过试验可知,固定化酶的化学热稳定型很高,60℃保持1.5h酶活力依然保留70%以上。制备的固定化酶可多次再生,重复使用10次,酶活力依然为初始酶活的95%,具有较好的工业前景。

参考文献

- [1] 崔娟,吴坚平等.脂肪酶固定化研究和应用[M].化学反应工程与工艺,2005,21(1):43
- [2] 杨本宏,蔡敬民等.海藻酸钠固定化根霉脂肪酶的制备及其性质[J].催化学报.2005,26(11):977-979
- [3] 毕金峰,李春红,等.海藻酸钙固定化 α -转移葡萄糖苷酶研究[J].食品科学,2004,25,增刊:4-10.
- [4] X.Fu, X.Zhu. Oil and Fat Hydrolysis with Lipase from *Aspergillus* sp[J]. JAOCS,1995,72,(5):527-530.
- [5] 毛跟年,范金波,等.海藻酸钙固定化半乳糖苷酶及催化合成低聚半乳糖[J].食品技术,2004,(10):7

(上接第34页)

从实验结果看,经过纤维素酶处理后,大豆低聚糖提取率有了显著提高。这是因为,在纤维素酶的作用下细胞壁被破坏,低聚糖更易浸出。

3 结论

碱浸提法制备大豆低聚糖的工艺条件为:浸提温度55℃、pH11、时间1h。用微波处理后使大豆低聚糖浸出率降低,采用纤维素酶对脱脂豆粕进行前处理可显著提高大豆低聚糖浸出率。

参考文献

- [1] 程云辉,贾振宝.大豆低聚糖的研究进展[J].食品与机械,

2004, 20(6):57-60.

- [2] 金其荣,徐勤.豆低聚糖生产、生理功能及应用[J].食品科学,1994,(11):7-12.
- [3] 徐誉泰.稀碱液中大豆低聚糖的溶出举动[J].食品科学,1998,(7):12-14.
- [4] 郭尽力.大豆低聚糖的提取工艺研究[J].烟台大学学报,2004,17(4):298-302.
- [5] 潘学军,刘会洲,徐永源.微波辅助提取研究进展[J].化学通报,1999,(5):7-14.
- [6] 徐贵华,赵金奎,严晓艳.微波、纤维素酶对大豆低聚糖提取工艺的影响[J].食品工业科技,2004,25(5):76-78.
- [7] 刘峥,蒋毅民.微波法提取大豆中低聚糖的研究[J].食品研究与开发,2002,23(2):24-26