

PVA 小珠表面固定化  $\alpha$ -淀粉酶及其性质研究

郭仁妹, 陆大年

( 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海, 201620)

**摘 要** 聚乙烯醇(PVA)具备优良的生物相容性和大量可以用于修饰的羟基。文中通过戊二醛交联得到水不溶性PVA小珠,对PVA小珠的表面进行环氧改性,并采用共价交联法固定化 $\alpha$ -淀粉酶。对固定化与自由 $\alpha$ -淀粉酶性质进行对比;固定化酶的最适催化温度(70℃)比自由酶(65℃)高,最适催化pH(6)与自由酶相同,热稳定性优于自由酶,对酸碱的敏感性也降低;重复使用8次仍保持60%酶活力。

**关键词** 聚乙烯醇,固定化, $\alpha$ -淀粉酶,热稳定性

淀粉酶的固定化是解决其高效催化剂实现工业化应用的关键技术之一,将其固定于合适的载体材料,其稳定性得到提高且可以重复使用。近年来人们已先后开发出性能多样的材料, $\alpha$ -淀粉酶的固定化研究也有了巨大进展<sup>[1~3,8]</sup>。聚乙烯醇是一种新型的固定化载体,它具有强度高、化学稳定性好、价格低廉等一系列优点,是一种具有工业应用价值的载体材料。但聚乙烯醇凝胶具有非常强的附聚倾向,在制备小珠时比较困难<sup>[4]</sup>。故以聚乙烯醇作为包埋载体时都采用复合法,例如与海藻酸钠、 $\text{SiO}_2$ <sup>[5~8]</sup>混合制成凝胶,复合凝胶成珠比较容易;包埋法固定化酶,工艺简单,但固定化酶在使用过程中,会有一定酶活泄漏损失。此外,存在传质速度的问题,导致酶与底物接触不充分,影响催化速率与效率。

此外,通过共价交联法固定化酶也是现在研究的热点,Julio C. Santos<sup>[9]</sup>以PVA为载体,戊二醛为交联试剂,以共价结合方式固定脂肪酶。固定化酶的操作稳定性得到改善,但反应条件剧烈,活性下降。利用己二酰氯<sup>[10]</sup>或酰胺<sup>[11]</sup>作为聚乙烯醇与酶的连接剂固定酶,酶活也有所损失。找到较温和的固载方法是酶的固定化研究中亟待解决的问题。

利用含环氧基团的载体固定化酶,固定化条件温和,固定化过程中酶活性较稳定,因而有着良好的工业化应用前景。本文以聚乙烯醇为原料,戊二醛为交联剂,制得交联聚乙烯醇小珠;在小珠表面用环氧氯丙烷进行环氧改性,为 $\alpha$ -淀粉酶的固定化提供了新的载体。

## 1 实验方法

## 1.1 材料

聚乙烯醇(17-99型),醇解度99.9%,国药集团化学试剂有限公司;环氧氯丙烷(分析纯),上海凌峰化学试剂有限公司;戊二醛25%(分析纯),国药集团化学试剂有限公司; $\alpha$ -淀粉酶,无锡杰能科公司;可溶性淀粉(分析纯),中国国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

紫外分光光度计(U-3310),日本日立公司;电热恒温水浴锅(H. H. S11-2),上海医疗器械五厂;电子天平(JY10002),上海精密科学仪器有限公司。

1.2 交联聚乙烯醇小珠的制备<sup>[12]</sup>

取100 g质量分数为10%的PVA溶液,加入2 mL质量分数为25%戊二醛,使得聚乙烯醇的交联度为8.8%[聚乙烯醇的理论交联度(%)=(聚乙烯醇分子中发生交联的羟基摩尔量/总羟基摩尔量) $\times$ 100,以下所用聚乙烯醇小珠都是此交联度],再逐滴加入HCl调节PVA水溶液pH至1~2,20℃下搅拌30 min后,缓慢升温至60℃,保温3 h。聚乙烯醇凝胶用搅拌器打碎成小珠状,丙酮洗、水洗,过滤处理后备用。

## 1.3 交联聚乙烯醇小珠的环氧化反应

将10 g湿状的PVA小珠和10 mL的环氧氯丙烷,30 mL二甲亚砜,NaOH调节pH为10~11,反应4 h后;以2 mol/L的HCl滴定溶液至中性,再用丙酮与清水洗净。用硫代硫酸钠法测得PVA表面环氧含量为0.25 mmol/g。

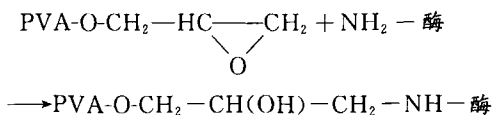
## 1.4 环氧化交联聚乙烯醇小珠对淀粉酶的固定化

称取5 g含环氧基团为0.25 mmol/g的交联聚乙烯醇小珠,与0.15 g淀粉酶溶液混合,在0~40℃,

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期:2008-09-05,改回日期:2008-11-28

缓冲液 pH 4.0~8.0(10 mL)条件下振荡反应 1~8 h 后,磷酸氢二钾-柠檬酸缓冲液(pH 7)洗涤,直到没有游离酶被洗出,4℃下保存。



### 1.5 淀粉酶活力测定与计算

采用淀粉-碘显色法测定淀粉含量<sup>[13]</sup>, 40℃, pH6 时,以 10 mL2%可溶性淀粉为底物,反应 5 min 后,立即加入 5 mL HCl(1 mol/L)失活,加入 5 mL 碘-碘化钾液显色,定容至 50 mL。紫外分光光度法测溶液在 560 nm 处吸光度的变化。每分钟使 1μg 的淀粉降解所需的酶量为 1 个酶活单位(U)。

游离酶的活性以下简称(A)。其次,测定未被固定的酶活力单位总数(B):取 n mL 洗涤后的缓冲液进行测定,测定方法同上。最后,测定固定化酶制品的酶活力单位总数:取 m g 固定化酶制品,按上述测定方法测得固定化酶的酶活力单位总数(C),即固定化酶的绝对活力。根据求得的 A、B、C 值,即可计算出:

未被固定的酶的活力/% = (B/A) × 100, 也称为残活力。

固定化酶活力回收率/% = (C/A) × 100

固定化酶活力表现率/% = [C/(A - B)] × 100

## 2 结果与讨论

### 2.1 环氧乙烷聚乙醇醇固定化淀粉酶的条件

#### 2.1.1 淀粉酶固定化温度确定

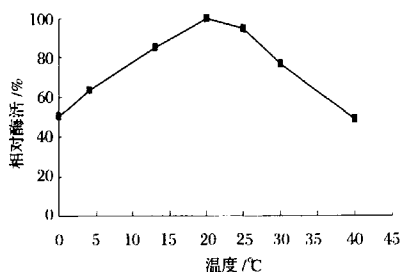


图1 固定化温度对固定化酶活影响

5g 聚乙醇醇小珠,加入 0.15 g 淀粉酶溶液,10 mL 缓冲液(pH 7),分别在 0℃, 4℃, 13℃, 20℃, 25℃, 40℃下轻微振荡反应 6 h 后,缓冲液洗涤至无酶蛋白被洗出,分别取 0.2 g 固定化酶测定其酶活。酶的固定化过程中,酶分子中的一NH<sub>2</sub> 与聚乙醇醇小珠表面环氧基团发生反应,由图 1 可知,20℃是最

适固定化温度。低温时固定化反应进行缓慢,固定化酶量较低;温度过高时固定化反应虽然加快,但淀粉酶容易变性失活,导致固定化酶无效。

#### 2.1.2 淀粉酶固定化时间确定

最佳的固定化温度 20℃,其他条件同 2.1.1,反应时间分别为 1,2,4,6,8,10 h,结果如图 2 表示。随着固定化时间的增加,相对酶活升高;反应进行 4 h 时,酶活达到最大值;此后延长反应时间,相对酶活几乎没有变化。

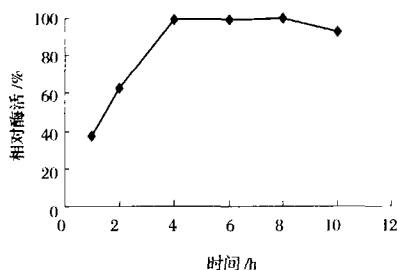


图2 固定化时间对固定化酶活的影响

#### 2.1.3 淀粉酶固定化 pH 值的确定

反应 4 h,其他条件同 2.1.2,由图 3 可知,淀粉酶的固定化反应 pH 为 6~7 时,固定化淀粉酶的相对活性最高。由图 4 可知淀粉酶的最适 pH 为 6,图 6 可知淀粉酶在 pH6 时最稳定,酶活损失少;故 pH6 的环境中,有利于淀粉酶固定化后保持其较好的构象结构状态,活性较高。

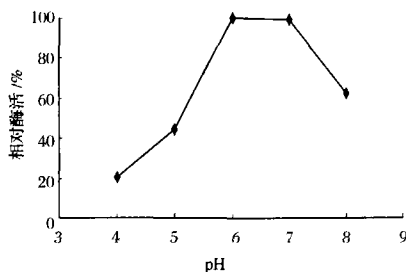


图3 固定化 pH 对固定化酶活的影响

#### 2.1.4 固定化淀粉酶特性

在最佳的固定化条件下得到固定化酶:即 5 g 聚乙醇醇小珠在与 0.15 g α-淀粉酶(活力为 34 288 U)固定化后,测定其总活力为 19 188 U(每克固定化酶的总活力为 3 837 U);洗涤液中酶的总活力为 1 2721U,残活力为 37.1%,固定化酶回收率为 55.9%;固定化酶表现率为 88.96%。较高的固定化酶表现率说明此固定化方法对酶活的损失较小。

### 2.2 固定化淀粉酶的催化性质

### 2.2.1 最佳酶催化 pH

在 pH 值为 4.0~8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中,以 1.0 的间隔分别测定固定化酶和游离酶的活性,以最大活性值为 100,计算各自相对酶活力。

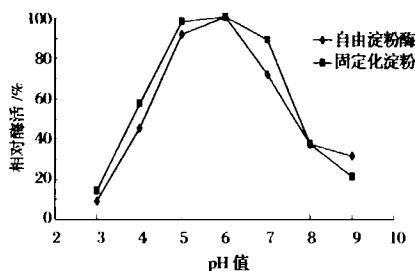


图4 固定化与自由淀粉酶的最适反应 pH

图4表明,固定化酶反应的最适 pH 值为 6 左右,与自由酶(pH6)一致。通常酶催化活性的 pH 与该酶活性中心的氨基酸残基组成有关<sup>[14]</sup>,所以可以认为组成该酶活性中心的氨基酸残基受固定化过程的影响较小。

### 2.2.2 最佳酶催化温度

在 40~80℃,分别测定固定化酶和游离酶活力。以最大活性值为 100,计算各自相对酶活力。图5表明,固定化酶应用的最适温度是 70℃,比自由酶(65℃)高 5℃。这可能是因为  $\alpha$ -淀粉酶被共价固定在载体上,酶分子的自由度降低,刚性增加,需在更高的温度下才能使其活性中心与底物分子发生配合完成酶解作用。

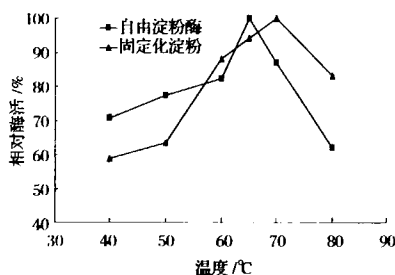


图5 固定化与自由淀粉酶的最适反应温度

### 2.3 固定化淀粉酶的热稳定性

将相同活力单位的游离酶和固定化酶,置于 60℃,70℃,80℃,90℃下保温,隔一定时间取样测酶活。以加入的初始酶活值为 100,计算各自相对活力,取样直至其酶活降至初始酶活的 50%。结果如表 1,自由酶在 60℃时  $t_{1/2}$  才 30 min,而固定化酶几乎不失活。同时自由酶在 70℃以上几乎完全失活,而固定化酶在 <80℃范围内显示出较高的热稳定性,失

活  $t_{1/2}$  保持在 60 min 以上,90℃时失活很快;酶固定在载体上,增加了酶构型的牢固度,使其耐高温能力较自由酶强。

表1 固定化与自由淀粉酶的热稳定性

温度/℃	半衰期 $t_{1/2}$ /min	
	固定化酶	自由酶
90	8	—
80	65	—
70	95	8
60	720(失活很少)	30

### 2.4 酸碱稳定性

将相同活力单位的游离酶和固定化酶,各在 pH 值为 3~9 的缓冲溶液中浸置 2 h,以最大活性值为 100,计算各自相对活力,结果如图 6 所示。自由酶在 pH 为 3 时几乎完全失活,而固定化酶仍有 30% 的相对活力。同时固定化酶在 pH 为 5~7,酶活保持在 90% 以上。淀粉酶固定化后,对环境的敏感性降低,耐酸碱比自由酶有所提高,酸碱稳定性得到改善。

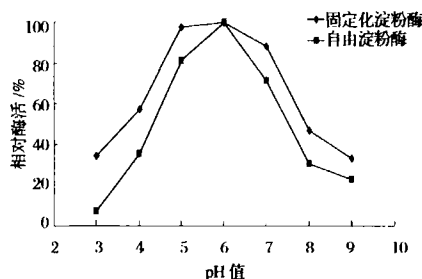


图6 固定化与自由淀粉酶的 pH 稳定性

### 2.5 固定化淀粉酶的反复使用性

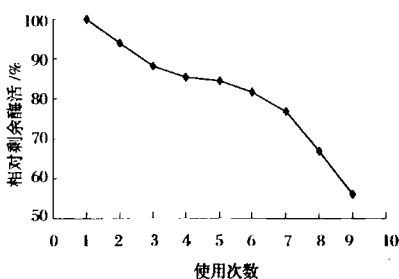


图7 固定化淀粉酶的操作稳定性

将 0.2 g 固定化酶,0.004 g 淀粉加入试管中,pH 为 6,40℃下反应 5 min;磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液(pH 为 7)洗涤,抽滤,用 UV-3100 紫外可见分光光度计测定反应液 5 min 内在 560 nm 处的吸光度变化,计算出固定化酶活力。重新装入新鲜底物溶液,再次测定固定化酶活力。这样进行多次氧化循环,来测定固定化酶重复使用性。以初次测定的活性值为

100, 计算各自相对活力。图 7 表明, 固定化淀粉酶在使用 8 次后催化活性仍保持在 60% 以上, 固定化淀粉酶的反复使用性很好。

### 3 结论

环氧改性聚乙烯醇能有效地固定淀粉酶, 固定化淀粉酶最适反应温度比自由酶高, 最适反应 pH 变化不大; 但其热稳定大大提高, 尤其在较高温度情况下, 稳定性提高更明显, 从而改善游离酶对环境的敏感性, 使得酶在使用中更易保持活性。反复使用 8 次后, 仍保持 60% 的酶活, 解决了回收难, 使用成本高的问题。此外聚乙烯醇价廉, 无毒, 从工业应用的角度考虑, 环氧交联聚乙烯醇固定化淀粉酶方法在成本控制上更具有竞争力。

### 参 考 文 献

- 1 陈莉敏, 李柱来, 王津. 固定化 A2 淀粉酶的研究[J]. 海峡药学, 2006, 18 (5): 59~61
- 2 黄铃. 琼脂包埋法固定化-淀粉酶特性的研究[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(8): 56~58
- 3 Bajpai A K, Bhanu S. Immobilization of  $\alpha$ -amylase in vinylpolymer-based interpenetrating polymer networks[J]. Colloid Polym Sci, 2003, 282: 76~83
- 4 李峰, 吕锡武, 严为. 聚乙烯醇作为固定化细胞包埋剂的研究[J]. 中国给水排水, 2000, 16(12): 14~17
- 5 杨丽, 张晶, 熊强, 等. 聚乙烯醇-海藻酸钙作为德氏乳酸杆菌包埋剂的研究[J]. 南京工业大学学报, 2007, 29(1): 65~69
- 6 周剑平, 龚伟中, 魏甲乾, 等. 聚乙烯醇复合凝胶固定化糖化酶研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 10~13
- 7 张建辉, 孔瑛, 侯影飞, 等. 聚乙烯醇包埋石油脱硫菌 UP-2 的研究[J]. 中国环境科学, 2006, 26 (Suppl.): 92~96
- 8 吴 颖, 王君, 景晓燕, 等. 磁性聚乙烯醇缩丁醛微球固定化  $\alpha$ -淀粉酶[J]. 精细化工, 2003, 20(3): 143~146
- 9 Julio C Santos, Patr Lcia D Mijone. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane-polyvinyl alcohol with different activating compounds[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 3102: 1~8
- 10 刁颖辉, 付时雨, 余惠生, 等. 利用酰胺活化聚乙烯醇作为载体固定漆酶的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2002, 10 (3): 11~15
- 11 Ali Kilinc' Secil Onal, Azmi Telefoncu. Chemical attachment of porcinepancreat-ic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride [J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 641~647
- 12 张克胜, 孙君坦, 何炳林. 交联聚乙烯醇水凝胶对胆红素的吸附性能研究[J]. 离子交换与吸附, 1998, 14(4): 204~209
- 13 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 74~75
- 14 周晓云. 酶学原理与酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005. 82~84

## Immobilization of $\alpha$ -Amylase on PVA Bead and Its Properties

Guo Renmei, Lu Danian

(Department of Applied Chemistry, College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

**ABSTRACT** The polyvinyl alcohol (PVA) is biocompatible and has lots of hydroxyls which can be modified. In this work, the PVA bead crosslinked with glutaraldehyde agent was modified with epichlorohydrin to immobilize the  $\alpha$ -amylase by covalent binding. The properties of free and immobilized  $\alpha$ -Amylase were also investigated and compared; the optimum catalyzed reaction pH (6) of immobilized  $\alpha$ -Amylase was same as the free and the optimum catalyzed reaction temperature was 70°C, 5°C higher than the free; the results show that the stability of the immobilized  $\alpha$ -amylase was improved; after eight times repeat operation, the relative activity of immobilized enzyme was about 60%.

**Key words** polyvinyl alcohol, immobilization,  $\alpha$ -amylase, thermal stability