

聚丙烯二氧化钛负载膜固定化脂肪酶的研究*

汤 斌 张庆庆 李 松

(安徽工程科技学院生化工程系, 芜湖, 241000)

摘 要 利用二氧化钛的吸附性, 将脂肪酶固定于聚丙烯二氧化钛负载膜上, 研究固定化酶的水解特性。结果表明, 二氧化钛负载膜上酶的最大负载量为 3.0 U/cm^2 , 固定化酶的最适反应温度为 30°C , 与自由酶最适温度相比降低了 6°C ; 固定化酶的最适 pH 为 8.7, 与原酶最适 pH 相比, 向碱性一侧偏移了 0.9 个单位; 在对大豆油水解时, 固定化酶的催化效果比自由酶提高了 25 倍。

关键词 脂肪酶, 聚丙烯膜, 二氧化钛, 固定化

脂肪酶(Lipase EC 3.1.1.3 甘油酯水解酶)是一类特殊的酰基水解酶, 它的天然底物是油脂, 具有对油-水界面的亲和力。脂肪酶具有区域选择性, 立体选择性, 较高的稳定性, 能够抑制水参加的副反应^[1]。根据脂肪酶的催化特性, 将脂肪酶固定在膜上组成反应器, 是发挥脂肪酶的催化性能比较有效的方式^[2]。刘新喜等人^[3]研究了以棉纤维为载体固定化脂肪酶, 在实验条件下获得最高负载酶活力为 33 U/g , 且该固定化脂肪酶的最适使用温度为 $30 \sim 35^\circ\text{C}$, 最适使用 pH 值为 9.0。彭立凤等人^[4]分别用 4 种方法研究了以棉纤维滤纸膜为载体对猪胰脂肪酶进行固定化, 发现在最适条件下得到的固定化酶活达 0.52 U/cm^2 , 酶活回收率为 20%。Vemuri 等人^[5]用蛋壳和海藻胶质作为载体固定化脂肪酶, 得出以蛋壳作载体固定化脂肪酶比用海藻胶质固定化脂肪酶的效果要好。高贵等人^[6]采用硅藻土为载体对脂肪酶进行固定化, 得到的最佳固定化条件为: 温度 $30 \sim 35^\circ\text{C}$, pH 值 7.7, 缓冲液离子浓度为 $0.01 \sim 0.03 \text{ mol/L}$ 之间, 载体与脂肪酶之间的比例为 8:1。Toshiyuki Itoh 等^[7]利用金属氧化物、陶瓷、多孔硅等多种材料作为脂肪酶的载体, 在离子溶剂系统中研究支持体与溶剂系统依赖性, 发现氧化钨覆盖在金属氧化物表面对脂肪酶的固定化有非常好的效果。

与其他用于固定化的载体相比, 聚丙烯二氧化钛负载膜具有很强的机械性能并且对微生物也有很强的抗性, 对有机油脂类有很好的亲和性能, 能够为二氧化钛固定化脂肪酶与底物的充分接触提供更加优越的条件。研究中以聚丙烯为支持体, 负载二氧化钛

后, 利用二氧化钛的吸附特性吸附固定脂肪酶, 研究了其固定化特性。

1 材料与方法

1.1 聚丙烯二氧化钛负载膜的制备

选择聚丙烯纤维在熔融状态下, 将纳米二氧化钛粉末(德国产 P-25, 平均粒径为 16 nm) 喷射成雾状, 均匀喷洒在聚丙烯纤维的表面, 经热压、固化后形成聚丙烯二氧化钛负载膜,

二氧化钛在聚丙烯纤维表面上的负载量为 0.0516 mg/cm^2 , 对聚丙烯纤维的比负载量为 10.6 mg/g ^[8], 如图 1 所示。从图 1 可以发现, 二氧化钛粒子均匀的粘结在聚丙烯纤维表面, 若喷洒不均匀, 可导致纤维表面有不同大小颗粒积结。

图 1 二氧化钛负载在聚丙烯纤维膜表面 SEM 照片

1.2 脂肪酶提纯

精确称取脂肪酶粉(扩张青霉菌脂肪酶, 深圳市绿微康生物工程有限公司), 用磷酸缓冲液溶解在 100 mL 的容量瓶中, 将定容后的酶液于 $3\,500 \text{ r/min}$ 处离心 15 min , 收集上清液, 测定提纯后的酶活。

1.3 反应底物乳化液的制备

(1) 4% 聚乙烯醇(PVA)水溶液的制备: 称取聚

第一作者: 学士, 教授。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 20276001)·安徽省高校自然科学基金重点资助项目(No. 2002kj692d)

收稿日期: 2004-12-10

乙烯醇(PVA) 20 g, 加 400 mL 水, 于 90~100℃ 溶解, 冷却后定容至 500 mL。

(2) 25% 橄榄油乳化液的制备: 取 300 mL, 4% 聚乙烯醇溶液, 向其中加入橄榄油 100 mL, 于冰箱内静置 2 h。然后在组织捣碎机中, 在一定转速下, 乳化 3 次, 每次 3 min。将制备的乳化液放入冰箱内保存, 备用, 每次使用前再重新乳化 1 次。

1.4 脂肪酶的固定化方法

准确量取一定体积的提纯后的酶液, 将经过亲水性处理的负载膜浸入酶液中, 然后把装有酶液和负载膜的烧杯放于振荡培养箱中, 在一定的温度下进行吸附固定。每隔一定时间根据需要取出负载膜进行固定化酶活力的测定。

1.5 负载膜的干燥

将在最适条件下固定得到的固定化酶膜从烧杯中取出, 用蒸馏水充分洗涤 5 次, 再用滤纸吸去膜上水分, 然后放入冰箱内进行预冷, 最后在 -45℃ 下冷冻干燥 24 h 后, 取出放到冰箱内保存, 备用。

1.6 酶活力的检测方法

将固定好的聚丙烯二氧化钛负载膜固定化酶取出, 先用蒸馏水充分洗涤 3 次, 再用测定酶活力时所使用的相应缓冲液充分洗涤 2 次。然后直接利用酸碱滴定法测定酶的活力, 以 pH 电极指示滴定终点。

固定化酶活力定义为: 每平方厘米固定化酶膜在 37℃, pH9.4 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 1 个酶活单位(U/cm²)。

2 结果与讨论

2.1 温度对酶固定化的影响

分别选取 10, 15, 20 和 25℃, 将聚丙烯二氧化钛负载膜与酶液混合, 进行酶的吸附固定(图 2)所示。

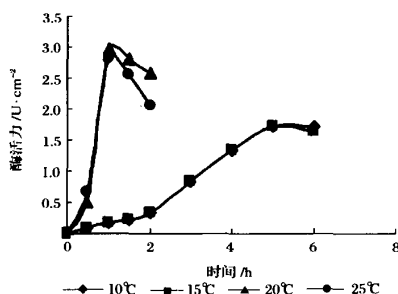


图2 不同温度下固定化时间对固定化酶比活力的影响

从图2可以看出, 聚丙烯二氧化钛负载膜对脂肪酶的吸附在 20℃ 和 25℃ 下, 1 h 内酶的活力达到最

大。而在 10℃ 和 15℃, 2 h 内酶的吸附量一直处于上升趋势, 并且一直到 5 h 之后才分别达到最大。合适的温度能够促进酶的固定化速度。

2.2 负载膜上固定化酶最大活力的确定

选择 20℃ 作为固定化温度, 将离心所得的酶液稀释成不同的浓度, 分别加入等面积膜的聚丙烯二氧化钛负载膜并在同样条件下进行酶的吸附固定。每隔 30 min 测定酶液的浓度变化, 结果如图 3 所示。酶活力是随着时间而变化, 固定化 2 h 左右, 酶活力趋于平稳, 最大活力达到 3 U/cm²。

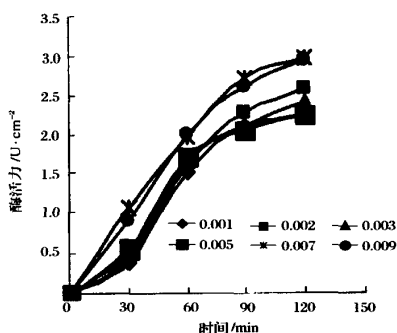


图3 固定化酶的最大比活力的确定

2.3 固定化酶的最适反应温度

取经过充分洗涤后聚丙烯二氧化钛负载膜固定化脂肪酶膜, 在不同的温度下进行水解橄榄油的反应, 用标准碱溶液滴定生成的脂肪酸以测定酶活力与温度的关系, 结果如图 4 所示。

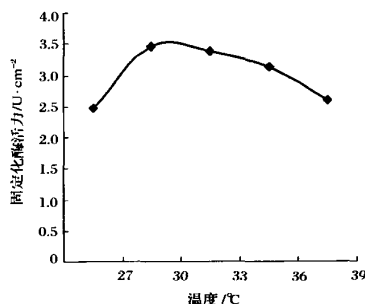


图4 固定化酶活力与反应温度的关系

固定化酶的最适反应温度为 30℃, 而自由酶的最适反应温度为 36℃, 与自由酶相比膜固定化酶的最适反应温度下降了 6℃, 并且它在 30~36℃ 之间水解橄榄油所表现的酶活力还是比较稳定的, 说明固定化酶最适温度范围变宽。

2.4 固定化酶的最适反应 pH

选择不同的反应 pH, 按上述测定脂肪酶酶活力的方法和步骤进行聚丙烯二氧化钛负载膜固定化脂

肪酶分解底物的反应(图5)。

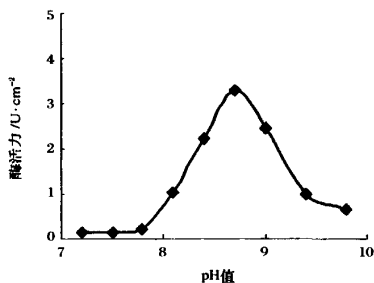


图5 固定化酶活力与 pH 的关系

由图5可以看出,聚丙烯二氧化钛负载膜固定化脂肪酶的最适 pH 为 8.7,而自由酶的最适 pH 为 7.8,与自由酶的最适 pH 相比较,固定化脂肪酶向碱性一侧偏移 0.9 个单位。其 pH 上升可能归因于聚丙烯二氧化钛负载膜固定化脂肪酶的微环境,因为微环境与表面溶液相比偏酸性,以致固定化脂肪酶的最适 pH 与自由酶的最适 pH 相比向碱性一侧偏移。

2.5 固定化酶与自由酶对豆油的水解效果

取一定量的 pH9.4 的甘氨酸 + NaOH 缓冲液,置于 37℃ 的水浴锅中预热 5 min 后,分别加入一定量的豆油,放入 1 片经冷冻干燥后的固定化酶膜片,同时开始计时,精确保温 10 min 后,立即取出并各加入体积分数为 95% 的乙醇 15 mL 进行灭酶,同时与自由酶作比较。然后分别加 10 mL 饱和正己烷溶液抽提生成的脂肪酸,从上层取 2.5 mL 抽提液置于干燥的锥形瓶中,加入 3~4 滴酚酞指示剂,用标准 KOH + 乙醇溶液滴定生成的脂肪酸,酶活定义同上。实验证明,对等同酶活力而言,聚丙烯二氧化钛负载膜固定化脂肪酶对大豆油有良好的分解效果,比自由酶对豆油的分解所产生的脂肪酸提高了 25 倍。

自由酶之所以不能很好地催化大豆油水解,原因可能是酶蛋白为亲水性物质,不溶于油类等有机物

中,在此反应系统中,油类聚集成团,使得酶蛋白分子不能与底物充分接触,仅在一个很小的油水界面上进行反应,因而其催化底物的水解效果比较差。而聚丙烯二氧化钛负载膜对油有良好的亲和性,在反应系统中,底物可以很好地吸附并分散到膜内,这样就使得底物与其中的二氧化钛固定化酶有一个良好的接触,获得较大的接触面积并得到良好的催化效果。

3 结 论

研究证明,聚丙烯二氧化钛负载膜对酶蛋白有良好的吸附作用,对脂肪酶的吸附,最终可以达到的最大酶活力为 3.0 U/cm²。由于载体聚丙烯具有良好的亲油性,导致二氧化钛固定化酶与有机物存在良好的亲和性能,使得脂肪酶在豆油的水解过程中取得了良好的效果。

参 考 文 献

- 1 李香春,甄宗园. 脂肪酶特性及其应用[J]. 粮食与油脂, 2003(3):19~20
- 2 李秋生,余若黔,杨 博. 固定化脂肪酶的应用研究进展[J]. 四川食品与发酵, 2003,39(2):9~12
- 3 刘新喜,彭立凤. 棉纤维膜固定化脂肪酶的研究[J]. 河北科技大学学报, 2001,22(2):15~18
- 4 彭立凤,谭天伟. 脂肪酶膜固定化的研究[J]. 中国油脂, 2000,25(1):58~61
- 5 Vemuri G, Banerjee R, Bhattacharyya B C. Immobilized of lipase using egg shell and alginate as carriers: optimization of reaction conditions[J]. Bioprocess Engineering, 1998,19:111~114
- 6 高 贵,韩四平. 硅藻土固定化脂肪酶[J]. 吉林大学学报, 2002,40(3):324~326
- 7 Toshiyuki Itoh, Nozomi Ouchi. Novel supporting materials of lipase PS suitable for use in an ionic liquid solvent system [J], Green Chemistry, 2003(5): 494~496
- 8 张庆庆,汤 斌. 聚丙烯二氧化钛负载膜固定化活性污泥对污水处理[J]. 生物学杂志, 2004,21(1): 15~16

Study of Immobilized Lipase on Polypropylene Membrane with Titanium Dioxide

Tang Bin Zhang Qingqing Li Song

(Department of Biochemical Engineering Anhui University of Science and Technology, Wuhu, 241000, China)

ABSTRACT The hydrolytic specificity of the immobilized enzyme has been investigated by immobilizing lipase on polypropylene membrane with titanium dioxide. The result showed that the maximal capacity of the membrane for lipase was 3.0U/cm². The optimal reaction temperature for the immobilized enzyme was 30℃, which is 6℃ lower than that of using free enzyme alone. The optimal pH of the enzyme was 8.7, which drifted 0.9 units to the alkaline side. The catalytic effect has been raised 25 fold of that of free enzyme when used to hydrolyzing soybean oils.

Key words lipase, polypropylene membrane, titanium dioxide, immobilize