

醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜 固定化磷脂酶A₁的研究

时敏, 周晓丹, 李越, 李志平, 于殿宇*
(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜为载体对磷脂酶进行吸附固定,以酶活力为指标,进行单因素实验,并采用响应面的方法进行分析,确定最佳的固定化条件:酶液浓度0.06g/mL,吸附时间3h,温度60℃,搅拌速度200r/min,得到固定后的酶活力为4.0U/cm²。由SEM结果可知,CA/PTFE复合膜可较好的固定磷脂酶。

关键词:醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜,固定化,磷脂酶A₁,响应面,SEM

Study on phospholipase A₁ immobilized by CA/PTFE composite membrane

SHI Min, ZHOU Xiao-dan, LI Yue, LI Zhi-ping, YU Dian-yu*

(School of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The phospholipase was immobilized on the cellulose acetate (CA)/polytetrafluoroethylene (PTFE) by adsorption. The single-factor tests of immobilization condition were made though investigate lipase activity, then the results were optimized by the response surface methodology. The optimal condition of the immobilization was as follows: phospholipase concentration 0.06g/mL, adsorption for 3h, adsorption temperature at 60℃, oscillation velocity 200r/min, the activity of immobilized lipase reached 4.0U/cm². From the results of SEM, phospholipase were well immobilized by the CA/PTFE.

Key words: CA/PTFE composite membrane; immobilization; phospholipase A₁; response surface; SEM

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0127-05

磷脂酶A₁ (Lecitase Ultra) 是一种羧酸酯水解酶,专一水解磷脂Sn-1位脂肪酸,生成溶血磷脂和脂肪酸,在磷脂改性、油脂精炼等方面有广泛应用^[1]。但是,游离磷脂酶A₁价格昂贵,不易回收,催化水解时条件苛刻。而固定化磷脂酶A₁具以下优点:容易从产品中分离;在反应器位置容易固定;稳定性高,可长时间连续操作;保留活性高,并可获得超高活性^[2-3]。所谓固定化酶就是利用物理或化学方法处理,将游离酶限定或束缚于一定范围之内使其与整体流体分开,但仍能发挥催化作用的酶制剂^[4-5]。现固定化酶在化学、生物学及生物工程、医学、生命科学等领域得到迅速发展^[6]。近年来,一些学者研究主要集中在固定化方法上^[7]。目前已建立的固定化方法一般可分为:包埋法^[8]、吸附法^[9]、交联法^[10]及共价偶联法等。目前,国内外关于酶的膜固定化技术已经成为研究的热点领域^[11-12]。但关于磷脂酶A₁的固定化研究却很少见。本实验以醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜为载体固定磷脂酶,醋酸

纤维素/聚四氟乙烯复合膜具有一定的吸附性、化学稳定性好、疏水性、机械性能优异等优点。根据复合膜的吸附特性固定化磷脂酶,提高了酶在反应体系中的活性和稳定性,调节和控制酶的活性与选择性,从而有利于酶的回收和产品的生产^[13-14]。在该复合膜固定化磷脂酶的过程中,研究了酶液浓度、吸附时间、温度和搅拌速度等不同固定化条件对磷脂酶固定化效率和催化效果的影响,并采用响应面的分析方法,得到了最佳固定化条件并对其进行了验证实验。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

磷脂酶A₁ (Lecitase Ultra, 酶活力6800U/g) 诺维信(中国)生物技术有限公司;醋酸纤维素 北京惠宝联化科技有限公司;聚四氟乙烯膜(平均孔径0.1μm,厚度85μm) 北京塑料研究所;二甲基甲酰胺(DMF) 天津市基准化学试剂有限公司;聚乙烯醇(PVA) 国药集团化学试剂有限公司等。

手动薄层涂铺器 上海信谊仪器厂;DF-101S焦热式恒温加热磁力搅拌器 郑州金育科贸有限公司;PHS-3C精密酸度计 梅特勒-托利多仪器有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 复合膜的制备 将15g醋酸纤维素60℃下溶

收稿日期:2011-09-26 * 通讯联系人

作者简介:时敏(1988-),女,在读硕士研究生,研究方向:粮食油脂加工。

基金项目:国家863高技术研究发展计划油脂非均相反应和多相分离精制技术(2010AA101503);国家十二五科技支撑计划大豆油加工关键技术和装备研究与示范(2011BAD02B01)。

于85g DMF中得到铸膜液。将PTFE基膜先用0.1mol/L的NaOH溶液和0.1mol/L的HCl溶液清洗,然后用去离子水清洗,真空干燥后,平铺在洁净的玻璃板上。控制厚度,将CA铸膜液用特制的刮刀涂在PTFE表面,在室温下挥发适当的时间完成干相转换后,浸入去离子水完成湿相转换。12h后用去离子水清洗,自然干燥待用。

1.2.2 磷脂酶的固定化 取若干份1cm²的CA/PTFE复合膜于三角瓶中,分别加入一定量的酶液和pH5.0的磷酸氢二钠/柠檬酸缓冲液,搅拌吸附一定时间。反应结束后取出酶膜,用去离子水冲洗,放于干燥处待其风干后测定酶活。

1.2.3 游离酶酶活力的测定^[15] 一定量的底物无油磷脂、0.5% PVA溶于预定pH5的缓冲液中,经磁力搅拌器充分搅拌,混合均匀,得到4%底物溶液。取4个100mL三角瓶,2个作为空白瓶,2个作为样品瓶,各加底物溶液25mL,再于空白瓶中加入95%乙醇15mL,于预定温度的水浴中预热5min,然后在各瓶中加入用缓冲液稀释10倍的Lecitase Ultra酶液1mL,立即混匀计时,在预定温度的水浴中180r/min的条件振荡准确反应15min,然后于样品瓶中立即补加95%乙醇15mL终止反应,取出,用微量滴定管和配制好的NaOH标准溶液滴定,计算标准碱液平均消耗量。

$$X = \frac{(V - V_0) \times c \times 50 \times n}{0.05 \times t}$$

式中: X——样品的酶活力, U/cm²; V——滴定样品时消耗的NaOH标准溶液体积, mL; V₀——滴定空白时消耗的NaOH标准溶液体积, mL; c——NaOH标准溶液的浓度, mol/L; 50——0.05mol/L NaOH标准溶液1.00mL相当于脂肪酸0.05μmol; n——酶液样品的稀释倍数; t——测定酶活时的反应时间, min。

1.2.4 固定化酶活力的测定 取1cm²的固定化酶膜,按照游离酶酶活力的测定方法进行相应的测定。

2 结果与分析

2.1 影响固定化的单因素分析

2.1.1 酶液浓度的影响 分别在不同酶液浓度的磷酸盐缓冲溶液中对醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜进行吸附固定,吸附时间3.5h,温度55℃,搅拌速度200r/min,结果如图1所示。

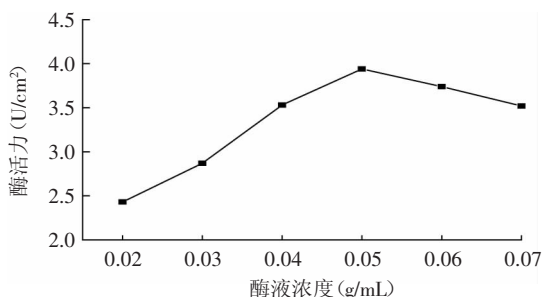


图1 酶液浓度对固定化酶活的影响

Fig.1 Effect of lipase concentration on activity of immobilized lipase

从图1可以看出当酶液浓度为0.05g/mL时酶活力最大,这是因为磷脂酶在吸附固定化时,载体吸附的酶量是有限的,一方面可能是载体的吸附能力较低,

使载体可吸附的酶量较少,催化活性较低;另一方面即使载体吸附性较强,但吸附的蛋白质过多,造成酶分子相互聚集导致磷脂酶的活性中心互相遮盖,导致酶的催化活性低。因此,本实验的最适酶液浓度为0.05g/mL。

2.1.2 吸附时间的影响 当磷脂酶的浓度为0.05g/mL时,分别选取不同的吸附时间对醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜进行吸附固定,温度55℃,搅拌速度200r/min,结果如图2所示。

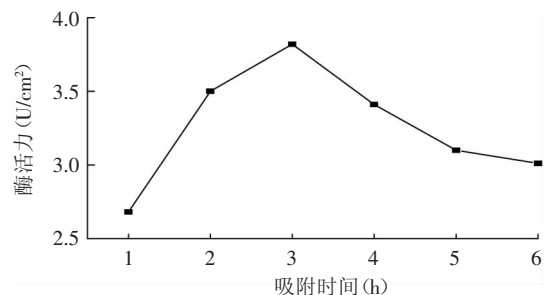


图2 吸附时间对固定化酶活的影响

Fig.2 Effect of adsorption time on activity of immobilized lipase

从图2可以看出醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜在吸附时间为3h时酶活力最大,当吸附时间低于3h时固定化酶活随着吸附时间的增大而增加,而高于此值后固定化酶活呈下降趋势,这是因为随着固定化时间的延长,单位载体上吸附的酶过多而使孔道堵塞,从而影响酶活。因此,本实验的最适吸附时间为3h。

2.1.3 温度的影响 当磷脂酶的浓度为0.05g/mL、吸附时间为3h时,搅拌速度200r/min,分别在不同温度条件下对醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜进行吸附固定,结果如图3所示。

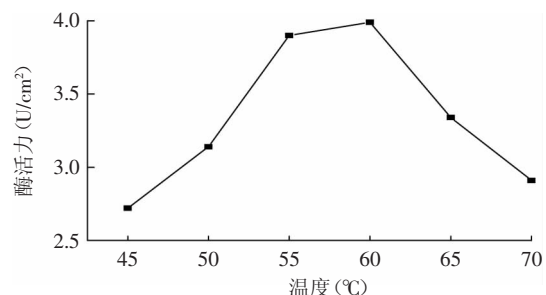


图3 温度对固定化酶活的影响

Fig.3 Effect of temperature on activity of immobilized lipase

从图3可以看出当温度为60℃时效果最好,酶活力最大。这是因为温度过低不利于酶分子和载体分子接触,而随着温度的升高,可能引起酶分子的变性甚至失活。因此,本实验选取的最适温度为60℃。

2.1.4 搅拌速度的影响 当磷脂酶的浓度为0.05g/mL、吸附时间为3h、温度为60℃时,选取80~280r/min不同转速进行吸附固定,结果如图4所示。

从图4可以看出当搅拌速度为200r/min时效果最好,酶活力最大,这是因为一定的搅拌速度可以使酶分子和载体分子充分的接触,有利于酶分子进入载体分子的孔隙中,完成固定化过程,因此,本实验采取的最适搅拌速度为200r/min。

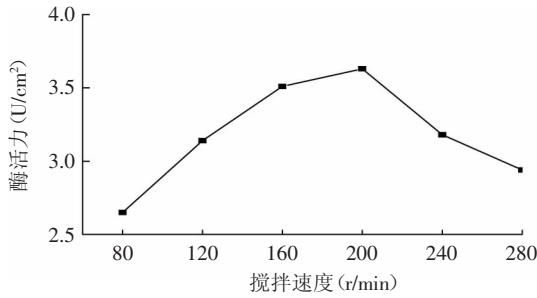


图4 搅拌速度对固定化酶活的影响

Fig.4 Effect of stirring rate and on activity of immobilized lipase

2.2 回归方程的建立与分析

由单因素实验可以看出在磷脂酶的固定化过程中,反应酶液浓度、反应时间、反应温度对酶活力影响较大,而搅拌速度对酶活力影响不大,因此确定反应酶液浓度为0.05g/mL,反应时间为3h,反应温度为60℃,在此基础上采用中心组合设计(Box-Behnken)^[6],以酶液浓度(A)、吸附时间(B)和温度(C)为自变量,酶活力(R_i)为响应值设计响应面实验。自变量水平编码见表1,实验设计方案及结果见表2。

表1 因素水平编码表

Table 1 Code of factors and levels

水平	因素		
	A 酶液浓度(g/mL)	B 吸附时间(h)	C 温度(℃)
-1	0.04	2	55
0	0.05	3	60
+1	0.06	4	65

利用Design Expert 7.0.0软件对实验结果进行方差分析,结果见表3(p<0.05为显著项)。

通过对实验数据进行多元回归拟合,得到酶活力(R_i)对自变量酶液浓度(A)、吸附时间(B)和温度(C)的回归方程为:

$$Y = 4.09 + 0.026A - 0.021B - 0.10C + 2.500 \times 10^{-3}AB + 5.000 \times 10^{-3}AC + 0.000BC - 0.14A^2 - 0.15B^2 - 0.16C^2$$

由表3可知,方程因变量与自变量之间的线性关系明显,该模型回归显著(p<0.0001)失拟项不显著(p>0.05),并且该模型R²=98.88%,R²_{Adj}=97.39%,说明

表3 方差分析结果

Table 3 The test results of variance analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	Prob>F	
模型	9	0.41	0.046	67.22	<0.0001	显著
A	1	5.513×10 ⁻³	5.513×10 ⁻³	8.12	0.0247	显著
B	1	3.612×10 ⁻³	3.612×10 ⁻³	5.32	0.0545	
C	1	0.084	0.084	123.73	<0.0001	显著
AB	1	2.500×10 ⁻⁵	2.500×10 ⁻⁵	0.037	0.8533	
AC	1	1.000×10 ⁻⁴	1.000×10 ⁻⁴	0.15	0.7126	
BC	1	0.000	0.000	0.000	1.0000	
A ²	1	0.079	0.079	116.76	<0.0001	显著
B ²	1	0.098	0.098	143.68	<0.0001	显著
C ²	1	0.11	0.11	158.19	<0.0001	显著
回归	7	4.755×10 ⁻³	6.793×10 ⁻⁴			
失拟项	3	4.750×10 ⁻⁴	1.583×10 ⁻⁴	0.15	0.9258	不显著
纯误差	4	4.280×10 ⁻³	1.070×10 ⁻³			
总回归	16	0.42				

表2 响应面设计方案及实验结果

Table 2 Design proposal and experiment result of response surface

实验次数	A 酶液浓度 (%)	B 吸附时间 (h)	C 温度 (℃)	酶活力 (U/cm ²)
1	-1	-1	0	3.81
2	1	-1	0	3.85
3	-1	1	0	3.75
4	1	1	0	3.8
5	-1	0	-1	3.87
6	1	0	-1	3.94
7	-1	0	1	3.66
8	1	0	1	3.73
9	0	-1	-1	3.9
10	0	1	-1	3.87
11	0	-1	1	3.69
12	0	1	1	3.66
13	0	0	0	4.08
14	0	0	0	4.09
15	0	0	0	4.1
16	0	0	0	4.14
17	0	0	0	4.05

该模型与实验拟合良好,仅有约1.12%的响应值的总变异不能用该模型表示。由表3还可以看出,磷脂酶的固定化过程中的A、C、A²、B²和C²为显著影响因素,即酶液浓度、温度、酶液浓度平方项、吸附时间平方项和温度平方项为显著因素。图5~图7分别给出了反应的酶液浓度与吸附时间、反应的酶液浓度与温度和吸附时间与温度的交互作用对酶活力的响应曲面图。

由图5可以看出,酶活力的极值出现在实验范围内,在酶液浓度为0.05~0.06g/mL,吸附时间约为3h时,酶活力在4.0U/cm²以上。

由图6可以看出,酶活力的极值出现在实验范围内,在酶液浓度为0.05~0.06g/mL,反应温度约为55~60℃时,酶活力在4.0U/cm²以上。

由图7可以看出,酶活力的极值出现在实验范围内,在吸附时间为2.5~3.5h,反应温度为55~60℃时,酶活力在4.0U/cm²以上。

应用响应面优化分析方法对回归模型进行分析,寻找最优响应结果见表4。

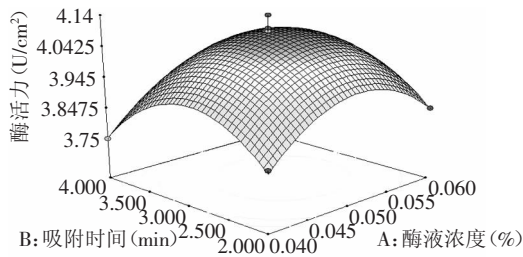


图5 酶液浓度与吸附时间交互影响对酶活力的响应面图
Fig.5 Contour plots and response surface of lipase concentration VS adsorption time

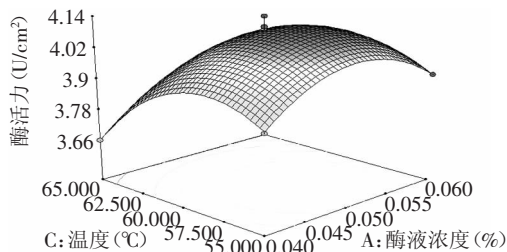


图6 酶液浓度与温度交互影响对酶活力的响应面图
Fig.6 Contour plots and response surface of lipase concentration VS temperature

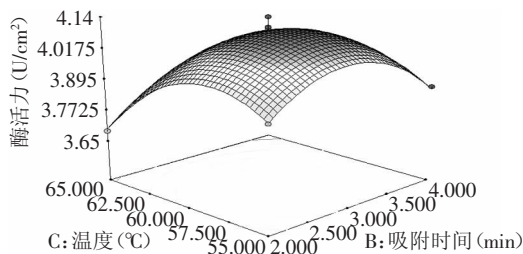


图7 吸附时间与温度交互影响对酶活力的响应面图
Fig.7 Contour plots and response surface of adsorption time VS temperature

表4 响应面寻优结果

Table 4 Results of response surface optimization

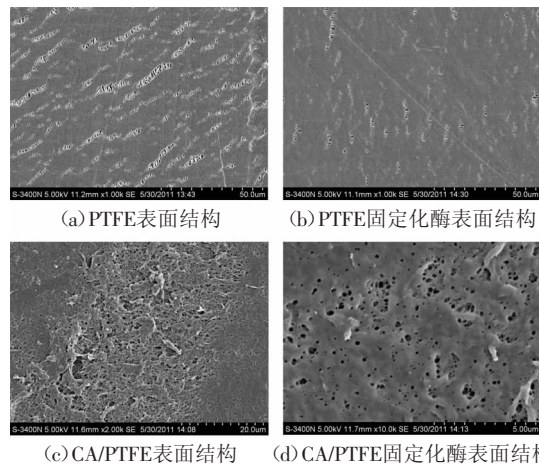
因素	实际值转化	整理值	预测酶活力(U/cm ²)
酶液浓度(g/mL)	0.06	0.06	4.03
吸附时间(h)	2.94	3	
温度(°C)	58.46	60	

为检验响应面方法所得结果的可靠性,按照上述整理值进行实验,得到的酶活力为4.0U/cm²。预测值与实验值之间的良好拟合性证实了模型的有效性。表明所得出的回归方程可以很好的反映酶液浓度、吸附时间和反应温度与酶活力的关系。因此响应面分析法所得到的固定化条件参数准确可靠,在实践中具有可行性。

2.3 SEM图像的研究

如图8所示,a、b、c、d分别为PTFE、PTFE固定化酶、CA/PTFE、CA/PTFE固定化酶表面结构的SEM图。由图像对比可知:图a中PTFE是多孔性结构,开孔率比较高,因此有较大的空间来负载酶。图b中用PTFE单膜来固定化磷脂酶,得到的图像仍有少许孔隙可见,这说明PTFE膜表面只负载了部分磷脂酶。图c中CA涂在PTFE表面制成CA/PTFE复合膜,CA/PTFE复合膜表

面较致密,生物兼容性好,稳定性好。图d中CA/PTFE复合膜表面的微孔大部分被酶覆盖,且酶堆积的非常致密,表明大部分酶滞留在CA和PTFE的界面上,这种结构较利于磷脂酶的固定化。



(a) PTFE表面结构 (b) PTFE固定化酶表面结构
(c) CA/PTFE表面结构 (d) CA/PTFE固定化酶表面结构

图8 SEM图像
Fig.8 SEM images

3 结论

3.1 本实验以醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜为载体对磷脂酶进行吸附固定的研究。由单因素及响应面分析得到最佳的固定化条件为:酶液浓度0.06g/mL,吸附时间3h,温度60°C,搅拌速度200r/min,得到固定后的酶活力为4.0U/cm²。

3.2 SEM结果显示:CA/PTFE复合膜表面的孔隙大部分被酶覆盖,且酶堆积得非常均匀,表明大部分酶滞留在CA/PTFE的界面上,这种结构较利于磷脂酶的固定化。

参考文献

- [1] 陶明,张丽霞,单良.有机改性凹凸棒土交联吸附法固定化磷脂酶A₁研究[J].粮食与油脂,2009(11):12-14.
- [2] 张智,王瑾,王腾宇,等.磷脂酶固定化方法的研究[J].油脂化学,2009,34(9):35.
- [3] 陈声.固定化酶理论与应用[M].北京:中国轻工业出版社,1987.
- [4] 蒋璐.丙烯晴丙烯酸共聚物纳米纤维膜的制备及脂肪酶的固定化[D].杭州:浙江大学,2007.
- [5] 鹿波.固定化酶的制备和酪蛋白合成类蛋白的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.
- [6] Rahman MBA,Tajudin SM,Hussein MZ. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from Candida rugosa as biocatalyst for effective esterification[J]. Applied Clay Science,2005,29:111-116.
- [7] Hilal N,Nigmatullin R,Alpatova A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes[J]. Membr Sci,2004,238:131-141.
- [8] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases[J]. Biotechnology Advances,2001,19(8):627-662.

(下转第134页)

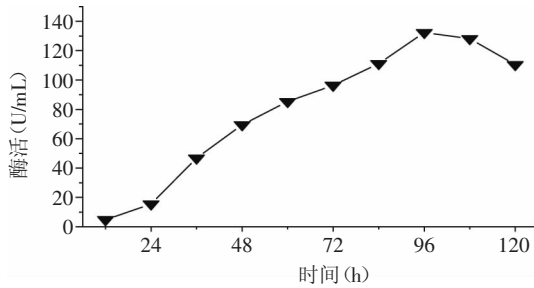


图8 培养时间对产酶的影响

Fig.8 Effect of time on enzyme production

的80%以上,最适作用温度约70℃(图9b),高于75℃,酶活显著降低。

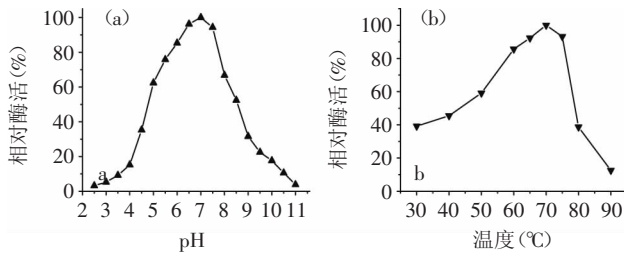


图9 葡聚糖酶最适pH和最适温度

Fig.9 The optimal pH and temperature of glucanase from *Paecilomyces* sp. FLH30

3 结论

从新乡关山土样及腐殖质筛选得到一耐热产 β -1,3(4)-葡聚糖酶真菌菌株,经菌落形态特征及分生孢子梗和分生孢子显微形态观察,初步鉴定为拟青霉(*Paecilomyces* sp. FLH30),其最适生长温度45℃,在40~60℃之间,生长良好。在培养温度为45℃,初始培养基pH6.5,以大麦麸皮为碳源,以蛋白胨、酵母粉和玉米浆为有机氮源,发酵4d,葡聚糖酶活达132.4U/mL。

该菌株所产 β -1,3(4)-葡聚糖酶最适pH约7.0,最适作用温度约70℃。在pH5.0~7.5之间及75℃以下,仍具有较高的酶活力,可较好地运用于啤酒、制糖及饲料工业。

参考文献

[1] Buliga GS, Brant DA, Fincher GB. The sequence statistics and

solution conformation of a barley(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -D-glucan[J]. Carbohydrate Research, 1986, 157:139-156.

[2] McCarthy T, Hanniffy O, Savage AV, et al. Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1,4- and β -1,3;1,4-linked glucans [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1-3):141-148.

[3] Bang ML, Villadsen I, Sandal T. Cloning and characterization of an endo- β -1,3(4)glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(2):215-222.

[4] Boyce A, Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4):835-841.

[5] Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, et al. Hydrolysis of β -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- β -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6):898-906.

[6] Martín-Cuadrado AB, del Dedo JE, de Medina-Redondo M, et al. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization [J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(1):188-200.

[7] 王金玲,何国庆,吕长山. 响应面法优化康氏木霉产 β -葡聚糖酶的液体发酵条件[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9):204-207.

[8] 金欣,夏黎明. 厌氧真菌内切- β -葡聚糖酶基因在里氏木霉中的重组与表达[J]. 高校化学工程学报, 2011(4):637-642.

[9] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京:高等教育出版社,1999.

[10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3):426-428.

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227:680-685.

(上接第130页)

[9] Bahar T, Celebi SS. Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23:301-304.

[10] Bahar T, Celebi SS. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR) [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26:28-33.

[11] Hong-tao Deng, Zhi-kang Xu, Zhen-mei Liu, et al. A comparative study on lipase immobilized Polypropylene microfiltration membranes modified by suga-reontaining polymer and polypeptide[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2004, 28:95-100.

[12] Hong-tao Deng, Zhi-kang Xu, Zhen-mei Liu, et al.

Immobilization of candida rugosa lipases by adsorption on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(5):437-443.

[13] 彭立凤,刘新喜. 棉织物上SESA活化法固定化脂肪酶工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2001, 22(2):30-33.

[14] 杨昌英,潘家荣,钟珩,等. 醋酸纤维素固定化脂肪酶催化猪油合成单甘酯[J]. 湖北化工, 2002(6):20-21.

[15] 李脉,杨继国,杨博. 磷脂酶A₁酶活测定方法的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(8):80-82.

[16] 吴有炜. 实验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社, 2002:115-154.