

醋酸纤维素固定化酰化酶膜的研究

郭永胜 王杰* 董军 宋锡谨

(浙江大学化学系, 杭州 310028)

摘要 采用正交实验法, 考察了铸膜液比对醋酸纤维素固定化氨基酰化酶微孔滤膜的影响, 对酶膜的泡点压力、孔径、孔隙率及透水速率等性能进行了表征。结果表明, 铸膜液组合最佳时, 酶相对活力产率高达 98.2%, 酶膜的透水率适当, 重复使用 10 次后仍保留原活力的 79.7%, 而其存放稳定性也大大提高。

关键词 醋酸纤维素, 固定化, 氨基酰化酶, 膜性能

学科分类号 Q55

固定化酶是生物化学中较为活跃的一个领域^[1], 其中由于膜固定化酶反应器兼具反应与分离两种功能而引起人们广泛关注^[2, 3]。传统意义上的膜固定化酶反应器, 通常是将一种不能透过高分子化合物的分离膜置入容器中, 然后加入酶及底物, 使其进行酶反应, 其反应生成物会连续不断地透过分离膜, 而被回收利用。这种酶虽然也被称为固定化酶, 但因酶和膜相对独立, 酶和膜的特征实质没有改变, 因而酶在游离态时的一些缺陷如稳定性差, 使用寿命短等并未得到改善。显然, 将酶以包埋法直接固定在分离膜上可以有效地避免上述不足, 但这须改变分离膜的制作工艺, 由此可能会影响到膜的一些使用性能。文献上有关这方面的研究报道较少, 因此, 确定制作酶膜最佳的铸膜液组成并对酶膜的特性进行表征, 在理论上和实际应用中都具有重要意义。本文在醋酸纤维素膜上固定化脲酶^[4]的基础上, 采用正交实验法, 进一步考察了铸膜液比对固定化氨基酰化酶膜的影响, 同时测定了微孔滤膜的活力产率、平均孔径分布、孔隙率、透水速率以及稳定性等性质。

1 材料与方法

1.1 固定化氨基酰化酶膜的制备

将二醋酸纤维素 (CA) 及三醋酸纤维素 (CTA) 置于三颈瓶中, 加入二氯甲烷和正丁醇, 开动搅拌器搅拌使混合物在室温下充分溶解, 加入异丁醇, 待完全混合均匀后, 加入氨基酰化酶 I 溶液, 迅速搅匀并脱气泡后立即置于自制的制膜器上流延成膜。然后在温度为 4℃ 的冰箱中放至恒重 (约需 3 d) 后备用。

1.2 酶液活力测定

参照文献 [5], 取大试管一支, 加入 0.1 mol/L、pH=7 的磷酸盐缓冲液及 0.04 mol/L 的 N-乙酰-DL-蛋氨酸溶液各 5 ml; 摇匀后于 37℃ 的水浴中预热 5 min, 加入 1 ml 事先配置好并预热至 37℃ 的酶液, 在不同时间 (1, 2, 3, 4, 5 min) 分别取 0.5 ml 反应液, 立即加入预先加有 0.5 ml 5% 三氯乙酸的小试管中混匀以使酶迅速失活而终止反应。用茚三酮显色法测定并计算出酶活力。酶活力定义为每分钟生成 1 μmol 的 L-蛋氨酸所需的酶量为一个活力单位。

1.3 固定化酶膜活力测定

取一片酶膜安装在小型超滤器上, 分别将 10 ml 0.04 mol/L 的 N-乙酰-DL-蛋氨酸溶液和 10 ml 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液加入其中混匀。用氮气加压使混合液滤过酶膜流入已装有 20 ml 5% 三氯乙酸的烧杯中并不断搅拌, 记录所需时间。然后取样按茚三酮显色法测算出酶膜活力。本文酶膜活力的单位统一采用 U/g 干膜。

1.4 固定化酶膜性能表征

1.4.1 最大孔径测定: 采用泡压法测定装置, 根据气泡逸出时的压力计算出对应孔径尺寸^[6]。

$$r = (2\sigma \cos\theta) / p$$
, 式中 r 为膜孔半径, σ 为测定液的表面张力, p 为气体压力, θ 为液体与孔壁之间的接触面。

1.4.2 平均孔径测定: 采用 Hagen-Poiseuille 定律测定,
$$r = (8\eta L J / P_r \Delta p)^{1/2}$$
, 式中 r 为平均孔半

* 通讯联系人, 浙江大学化学系 (西溪校区), 杭州 310028.

Tel: 0571-5968981, E-mail: wangjie328@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2001-01-05, 接受日期: 2001-01-20

径, J 为流体流速, η 流体粘度, L 为膜厚度, P_r 为膜的孔隙率, Δp 为操作压力^[7].

1.4.3 孔隙率测定: 膜的孔隙率 $p_r = (1 - \rho_f / \rho_p) \times 100\%$, 式中 ρ_f 为膜的表观密度, ρ_p 为膜材料的密度.

1.4.4 透水速率测定: 室温条件下, 以氮气为压力源, 在 1 kg/cm^2 压力下测定蒸馏水的透过速率: $J = V / At$, 式中 J 为透水速率, V 为总透水量, A 为膜的有效面积, t 为测定时间.

2 结果与讨论

2.1 铸膜液组分对酶膜性能的影响

制作固定化氨基酰化酶微孔滤膜的铸膜液由 CA 、 CTA 、二氯甲烷、正丁醇、异丁醇和酶溶液 6 种组分组成, 为了研究的一致性, 每次实验所取酶液量相同. 而在作为载体的 5 种物质中以二醋酸纤维素的量为定值, 进行四因素四水平的正交实验. 各因素变化范围见表 1, 实验结果列入表 2.

Table 1 Code of factors level

No.	A	V (Dichloromethane) / ml	B	V (Butanol) / ml	C	m (CTA) / g	D	V (Isobutanol) / ml
1	A ₁	28.0	B ₁	3.0	C ₁	0.8	D ₁	15.0
2	A ₂	32.0	B ₂	4.0	C ₂	1.0	D ₂	18.0
3	A ₃	36.0	B ₃	5.0	C ₃	1.2	D ₃	21.0
4	A ₄	40.0	B ₄	6.0	C ₄	1.4	D ₄	24.0

Table 2 Results of crossed experiment

Level combination	V (Dichloromethane) / ml	V (Butanol) / ml	m (CTA) / g	V (Isobutanol) / ml	Rate of dankness / $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	Porosity / %	Yield of activity / %
A ₁ B ₁ C ₁ D ₄	28.0	3.0	0.8	24.0	3.90	77.5	96.8
A ₁ B ₄ C ₂ D ₁	28.0	6.0	1.0	15.0	2.28	77.6	70.0
A ₁ B ₃ C ₄ D ₂	28.0	5.0	1.4	18.0	2.46	77.1	53.0
A ₁ B ₂ C ₃ D ₃	28.0	4.0	1.2	21.0	3.24	76.8	78.6
A ₂ B ₁ C ₂ D ₂	32.0	3.0	1.0	18.0	1.62	77.9	80.0
A ₂ B ₄ C ₄ D ₃	32.0	6.0	1.4	21.0	0.96	76.5	77.3
A ₂ B ₃ C ₃ D ₄	32.0	5.0	1.2	24.0	2.22	77.4	54.0
A ₂ B ₂ C ₁ D ₁	32.0	4.0	0.8	15.0	3.90	78.1	96.6
A ₃ B ₁ C ₄ D ₄	36.0	3.0	1.4	24.0	1.80	76.2	41.9
A ₃ B ₄ C ₃ D ₁	36.0	6.0	1.2	15.0	4.74	74.8	74.9
A ₃ B ₃ C ₁ D ₂	36.0	5.0	0.8	18.0	5.22	76.2	74.5
A ₃ B ₂ C ₂ D ₃	36.0	4.0	1.0	21.0	3.36	77.5	78.8
A ₄ B ₁ C ₃ D ₂	40.0	3.0	1.2	18.0	1.92	78.6	56.2
A ₄ B ₄ C ₁ D ₃	40.0	6.0	0.8	21.0	4.14	76.5	85.5
A ₄ B ₃ C ₂ D ₄	40.0	5.0	1.0	24.0	2.58	78.2	85.8
A ₄ B ₂ C ₄ D ₁	40.0	4.0	1.4	15.0	2.04	75.7	73.3

通过对表 2 实验结果进行极差分析 (表 3), 可以看出, 对酶膜的活力收率而言, CTA 的水平变化影响最大, 丁醇次之, 二氯甲烷的影响最小; 而影响酶膜透水速率的因素依次为 CTA 、二氯甲烷、丁醇和异丁醇由强到弱, 各因素的水平变化对

膜的孔隙率影响不大. 综合分析得出制作高活力收率酶膜的最佳组合为 $A_2B_2C_1D_3$, 而 $A_3B_2C_1D_1$ 组合对提高膜的透水速率最有利. 上述两组合均未出现在 16 次实验中. 本着酶膜透水速率适当, 而活力收率越高越好的原则, 最终确定了以 $A_2B_2C_1D_3$ 为

Table 3 Analysis of extreme difference (Δ)

Item	Rate of dankness / $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$				Porosity / %				Yield of activity / %			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	2.97	2.31	4.29	3.24	77.3	77.6	77.1	76.6	74.6	68.7	88.4	78.7
2	2.18	3.14	2.46	2.81	77.5	77.0	77.8	77.5	76.9	82.6	79.4	65.9
3	3.78	3.12	3.03	2.93	76.2	77.2	76.9	76.8	68.3	66.8	65.9	80.8
4	2.67	3.03	1.82	2.63	77.3	76.4	76.4	77.3	75.2	77.0	61.4	69.6
Δ	1.60	0.83	2.47	0.61	1.3	1.2	1.4	0.9	8.6	15.8	27.0	14.9

基础, 结合CTA对活力收率和透水速率的影响进行了补充实验, 其结果如图1所示.

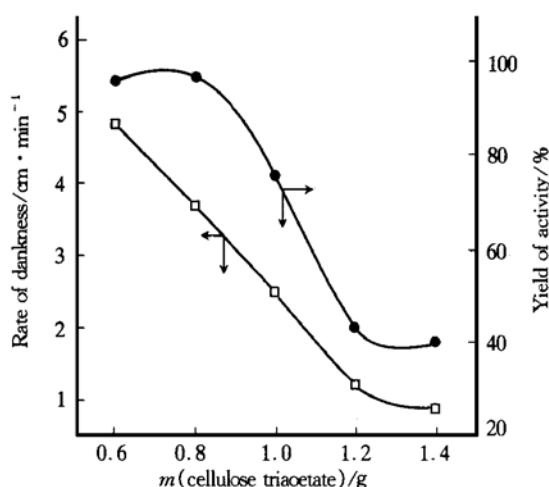


Fig. 1 Effect of CTA content on yield of activity and rate of darkness

□ — □: Rat of darkness; ● — ●: Yield of activity.

Table 4 Yield of enzymatic activity immobilized membrane

Protein in enzyme solution	0.98 g/L	Loss of enzyme	0.09 g
Activity of enzyme solution	15.56 U/ml	Amount of eluted enzyme	0.12 mg
Added enzyme solution	1.0 ml	The rate of entrapped enzyme	78.95%
Mass of enzyme membrane	2.78 g	Yield of activity entrapped enzyme	98.20%
Activity of enzyme membrane	4.34 U/g	Total yield of enzymatic activity	77.54%

从表4可见, 采用包埋法在醋酸纤维素共混体微孔滤膜上固定化氨基酰化酶, 按负载上的酶计算, 其相对活力收率高达98.20%, 即使将制膜过程酶的损失量和成膜后酶的洗脱量计算在内, 酶膜的总活力收率也达到77.54%. 说明在包埋和制膜过程中, 制膜溶剂及添加剂基本上未引起酶的失活, 制膜条件也十分适宜酶的固定化. 实验中还观察到, 酶膜在滤洗过程中, 前两次操作所得滤液中含有微量酶蛋白, 且第一次含量远远超过第二次, 而在第三次的滤洗液中已完全测不出酶蛋白. 我们认为这是由于有少量的酶吸附于膜的表面, 故而容易被洗脱. 同时也表明大部分的酶被包埋在膜的网状结构中, 非常牢固.

2.3 酶膜性能评价

微孔酶膜的孔径大小和均匀性是影响酶膜性能的主要因素, 而孔径大小及均匀性又与铸膜液中聚合物的浓度密切相关. 表5是在制膜温度、及铸膜液组成相同的条件下, 对几种酶膜的最大孔径、平均孔径与泡点压力的测定结果.

可以看出, 当铸膜液组分按 A₂B₂C₁D₃ 组合时, 酶膜的相对活力收率高达98.2%, 且透水速率也适当, 这与极差分析结果吻合. 实验结果还表明, 随着三醋酸纤维素在酶膜组成中比例的加大, 乙酰基含量提高, 混合载体的疏水性增加, 不利于载体接酶, 导致酶膜的活力收率和透水速率大幅下降. 但与CA膜相比, CA-CTA膜的强度和抗水解性能明显提高, 因此, 在不显著影响酶活力收率的范围内适当的多使用三醋酸纤维素, 对提高酶膜的综合性能有利.

2.2 固定化酶膜的蛋白负载率及活力收率

取干燥至恒重的新制酶膜安装在超滤器上, 每次用20 ml的蒸馏水通氮气加压滤洗三次, 分别取样用库马斯 (Coomassie) 亮蓝法^[8]测定酶蛋白的洗脱量, 然后按1.3法测定酶膜的活力. 所得实验结果列入表4中.

Table 5 Determination of enzyme membrane property

No.	Polymer concentration / %	Bubble pressure / kPa	The biggest aperture / μm	Average aperture / μm	Rate of darkness / cm · min ⁻¹
1	3.87	29.3	2.56	0.667	3.68
2	4.15	53.3	1.41	0.420	2.48
3	4.43	74.7	1.01	0.261	1.20
4	4.72	86.7	0.87	0.203	0.86

结果显示, 随着铸膜液中聚合物浓度的改变, 酶膜的性能也发生显著变化. 聚合物浓度高, 酶膜内部高分子之间的间隙小, 膜的孔径变小, 因而导致泡点压力上升, 透水速率下降. 利用这一特点, 可以适当调整铸膜液中聚合物的浓度, 以满足不同使用条件下对酶膜性能的要求. 图2采用泡压法对表5中1号酶膜测得的孔径分布曲线, 从曲线的宽窄及峰值的高低可以看出, 酶膜孔径的集中度较高, 分布比较均匀, 酶膜的最可几孔径为0.670 μm.

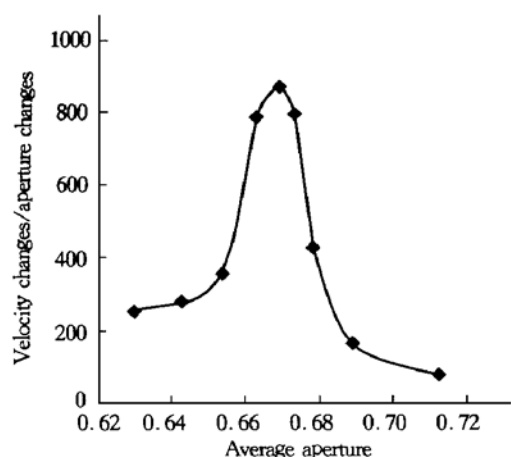


Fig. 2 Normal distribution of enzyme membrane aperture

2.4 酶膜的存放及重复使用稳定性

将两片相同的酶膜分别在 4℃ 冰箱内及室温下干燥器内存放 60 d, 然后测定其活力变化. 存放于 4℃ 冰箱内的酶膜剩余活力超过原酶膜活力的 78.6%, 而室温下存放的酶膜活力仅剩余 41.1%, 说明低温贮存对稳定酶膜的活力有利.

将比活力为 4.49 的酰化酶固定膜每间隔 24 h 重复测定一次以考察其重复使用性. 结果显示该酶膜在重复使用 10 次后, 其剩余活力仍接近原来的 80%, 说明此酶膜具有良好的重复使用稳定性.

实验结果表明, CA-CTA 膜可以较好地用于氨基酰化酶的固定. 当铸膜液的配比适当时, 酶膜具

有较高的活力产率、合适的透水速率、均匀的孔径以及高稳定性.

参 考 文 献

- 1 邱广亮, 德力格尔, 栗淑媛, 等. 磁性聚乙二醇载体固定化葡萄糖淀粉酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (1): 56~ 58
Qiu G L, Deligeer, Li S Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 1999, 26 (1): 56~ 58
- 2 Turker B, Yakup A M, Adil D. Comparison of β -galactosidase immobilization by entrapment in and adsorption on poly (2-hydroxyethylmethacrylate) membranes. Polym Int, 1997, 44: 530
- 3 Chen J P, Sun Y M, Chu D H. Immobilization of α -amylase to a composite temperature-sensitive membrane for starch hydrolysis. Biotechnol Prog, 1998, 14 (3): 473
- 4 王 杰, 宋锡谨, 伍 明, 等. 醋酸纤维素固定化脲酶的研究. 高等学校化学学报, 1998, 19 (7): 1104
Wang J, Song X J, Wu M, *et al.* Chem J Chin Univ, 1998, 19 (7): 1104
- 5 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 155
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. Method and Technology of Biochemical Experiment. Beijing: Higher Education Press, 1981: 155
- 6 高以煊, 叶凌碧. 膜分离技术基础. 北京: 科学出版社, 1989: 173
Gao Y X, Ye L B. The Elements of Membrane Separation Technique. Beijing: Science Press, 1989: 173
- 7 Kesting R E. Synthetic Polymeric Membrane. 2nd. New York: Wiley Interscience, 1985. 69
- 8 张 旭. 蛋白质的定量法. 北京: 农业出版社, 1981: 186
Zhang X. Quantitative Methods of Protein. Beijing: Agriculture Press, 1981: 186

Study on Immobilization of Acylase with Cellulose Acetate Membrane

GUO Yong-Sheng, WANG Jie*, DONG Jun, SONG Xi-Jin

(Chemical Department, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

Abstract Using crossed experiment method, the influence of casting solutions proportion on the cellulose acetate membrane immobilized acylase was studied, and the properties of the membrane: bubbling point pressure, aperture, porosity and rate of dankness were characterized. The results showed that when the casting solution proportion is optimum, the yield of enzymatic activity can reach 98.2% and enzyme membrane has proper rate of dankness. The residual activity can get 79.7% after it is used repeatedly for 10 times. and after being stored at 4℃ for 60 days almost no out-of-activity is observed.

Key words cellulose acetate membrane, immobilization, acylase, membrane property

* Corresponding author. Tel: 86-571-5968981, E-mail: wangjie328@mail.hz.zj.cn

Received: January 5, 2001 Accepted: January 20, 2001