

固定化根霉发酵生产脂肪酶

杨学昊 谭天伟*

(北京化工大学生物工程系,北京 100029)

摘 要 以聚氨酯为少根根霉固定化载体,对固定化后的细胞连续重复批次发酵进行了研究。优化了重复批次发酵培养基组成。在取代发酵液 40mL,取代培养基组成为全脂豆粉 3%,花生油 0.5%条件下,固定化菌体摇瓶实验可连续使用 140h,重复 9 批次。酶的时空产率提高 6 倍。5L 发酵罐小试固定化菌体可连续发酵 6 批次。固定化细胞连续发酵,大大缩短了发酵的时间,酶的时空产率获得大幅提高。

关键词 脂肪酶,固定化,根霉,连续发酵

中图分类号 TQ925 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0284-03

脂肪酶目前已广泛用于食品发酵、轻工产品的脱脂和化工产品的生产等^[1,2,3],具有巨大的商业和工业潜在价值。微生物脂肪酶按其位置专一性划分为两大类:第一类无位置专一性,它可以从 1、2、3 位置上释放脂肪酸,如柱形假丝酵母脂肪酶,发酵酶活力可达 8000u/mL^[4]。第二类是 1,3-专一性的脂肪酶,它仅从甘油部分的 1,3 位置上释放脂肪酸,如根霉脂肪酶,其发酵水平比较低;乔红群^[5]等筛选的一株根霉菌最高酶活 32u/mL,徐岩^[6]等对 *Rhizopus* Y-92 发酵进行优化得到发酵液最高酶活力 99.15u/mL,Abel Hio^[7]优化 *Rhizopus oryzae* 发酵获得 120 u/mL 酶活力。根霉、毛霉等微生物脂肪酶具有良好的 1,3-位置专一性,这类脂肪酶有重要用途,如酯类改性,制备营养保健油脂和特种油脂等^[8]。

脂肪酶的产生有传统的固态培养^[9]、液态发酵^[10]和细胞固定化方法生产^[11]。由于脂肪酶是胞外酶,固态培养带来提取的繁琐。而游离培养,由于菌丝不耐剪切又易成团,会造成搅拌和传质困难。Murat Elibof^[11]摇瓶固定化培养少根根霉,并连续批次发酵使用 120h,证明其有连续批次发酵的能力,但是酶活力只有 80u/mL,没有对固定化细胞的连续发酵进行系统研究。本实验室尹春华也证明了固定化根霉具有连续批次发酵的能力。

本研究从固定化细胞重复批次发酵的取代培养基组成、取代量和取代时间考察了固定化细胞的重复批次发酵。

1 材料和方法

1.1 菌种

少根根霉(*Rhizopus arrhizus* BUCT-11)为实验室保存菌种。

1.2 培养基

1.2.1 斜面种子培养基(马铃薯培养基):马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 15~20g。将马铃薯切成小块,加水煮沸 30min,经沙网过滤,加葡萄糖和琼脂溶解后冷却定容至 1000mL,倒斜面灭菌备用。

1.2.2 摇瓶和小罐培养基:全脂豆粉(市售)3%,花生油(市售)1%,磷酸氢二钾 0.5%,硫酸铵 0.2%,硫酸镁 0.1%。以上均为 AR。

1.3 载体的预处理

将聚氨酯处理成 5mm×5mm×5mm 的小块,浸泡在蒸馏水中,121℃灭菌 20min,更换蒸馏水,重复 3 次。处理完毕,烘干。称取 0.29 克于 250mL 摇瓶中,恰好没过瓶底,倒入培养基灭菌待用。

1.4 摇瓶培养

少根根霉斜面于 27℃ 恒温培养箱培养 3d,待其菌丝长有大量孢子,然后置于 4℃ 冰箱保存。每次钩取一环接种于含 100mL 的培养基的 250mL 摇瓶中,恒温摇床培养。摇床设定 26.5℃,130r/min。

1.5 小罐培养

少根根霉斜面倒入 20mL 无菌水,刮下根霉孢子,制得孢子悬液接种 5L 小罐。发酵罐操作体积 2.7L。温度 26.5℃,搅拌转速 120r/min。

1.6 酶活测定

橄榄油乳化法测定酶活力^[12]。37℃,pH7.0 缓冲液以每分钟水解出 1 微克分子的脂肪酸所需的酶量为一个脂肪酶活力单位(u)。

收稿日期 2003-09-04,修回日期 2003-12-17。

基金项目 国家 863 项目(No.2002AA514030),国家“十五”攻关项目(No.2001BA708B02-08),国家自然科学基金项目(No.2107600C),中石化项目(No.202059)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

* 通讯作者。 Tel:86-10-64434778; Fax:86-10-64715443; E-mail:tantw@mail.buct.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 载体选择

对于细胞固定化主要有三种方法:吸附、包埋和自聚集。包埋由于在介质中传质受限制,使得脂肪酶的产率往往有限。自聚集则主要受到菌种的限制。对根霉而言吸附是比较优良的固定化方法^[13]。尹春华^[14]等报道珍珠岩和聚氨酯为较好的固定化载体,固定化细胞比无固定的酶活提高 8 倍。

实验比较了不同载体。当没有载体存在时,菌丝成球,严重阻碍了传质和传氧,酶活力很低。而使用聚氨酯的效果最好。聚氨酯能够吸附菌丝体,同时聚氨酯的网孔也起到一定的包埋作用,比单纯的吸附作用力大,且传质效果较好^[11]。

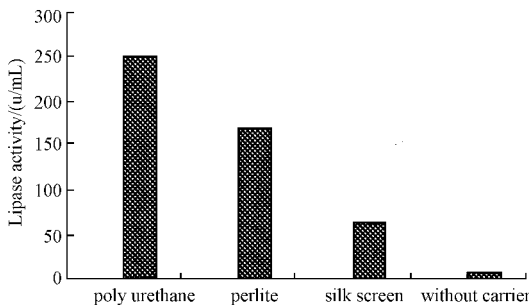


图 1 不同载体对酶活的影响

Fig. 1 Effect of different carriers

3% soybean flour, 1% peanut oil, 0.5% K_2HPO_4 ,
0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% $MgSO_4$, temperature 26.5°C,
130r/min, culture time 72 h

2.2 重复批次发酵

使用固定化的一大优点就是菌体可以重复利用,固定化细胞重复批次发酵由于去掉菌体的生长时间,因此可以大大提高酶的时空产率。我们从替换量、替换培养基组成和替换时间探讨固定化根霉的重复批次发酵。

2.2.1 培养基替换量的影响:250mL 摇瓶发酵 72h 后,无菌操作分别取出 40、50、60mL 发酵液,同时分别补入原培养基至原体积数。间隔 3h 取样测酶活(图 2)。

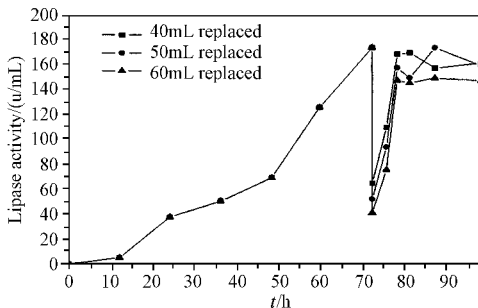


图 2 替换量的影响

Fig. 2 Effect of the substitution quantity

temperature 26.5°C, rotation speed: 130r/min;

replaced medium: soybean flour 3.0% (W/V), peanut oil 0.5% (V/V)

取代部分培养基后,经过 4~9h 酶活即可达到原来的发酵水平。相对于积累 72h,发酵时间大大缩短,酶的产率获得大幅提高。

当发酵液全部被取代时(由于聚氨酯吸收部分培养基加之实验损耗,60%取代时已把发酵液全部取代),菌体生长过于旺盛,导致生长条件急剧恶化,酶活不高。

考虑时间和产量的关系,实验取代 40~50mL。

2.2.2 替换时间:分别在发酵 60h(对数期末),66h(过渡期),72h(平稳期),替换发酵液 40mL,效果差别不大。考虑到 72h 替换时的酶活较高,批次发酵的实验于 72h 进行。

2.2.3 替换培养基组成:固定化细胞连续发酵去掉了菌体的生长过程,就产酶而言,重复发酵这一阶段的培养基需进一步优化。做 L_5^4 正交实验,获得补料最优组成:全脂豆粉 3%,花生油 0.5%(表 1)。

表 1 培养基优化正交实验

Table 1 Orthogonal test of culture medium

Soy flour	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	Peanut oil	Lipase activity(u/mL)
1%	0	0	0	103
1%	0.2%	0.2%	0.5%	68
1%	0.5%	0.5%	1%	60.5
2%	0	0.2%	1%	49.5
2%	0.2%	0.5%	0	66
2%	0.5%	0	0.5%	94.6
3%	0	0.5%	0.5%	122
3%	0.2%	0	1%	112.75
3%	0.5%	0.2%	0	82.5
35.72	12.3	36.78	20.62	
**	*	***	**	
3%	0	0	0.5%	

* temperature 26.5°C, 130r/min, replaced volume 40mL in 250mL flask.

2.2.4 重复批次发酵:

(1) 摇瓶实验:250mL 摇瓶,装液量 100mL,发酵 72h 后,无菌操作取出 40mL 发酵液,同时补入培养基 40mL,其组成为全脂豆粉 3%,花生油 0.5%(图 3)。

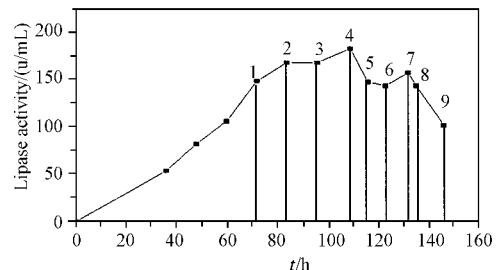


图 3 摇瓶重复批次发酵

Fig. 3 Repeated-batch experiment in flask

26.5°C, 130r/min, replaced volume 40mL;

replaced medium: soybean flour 3.0% (W/V), peanut oil 0.5% (V/V)

固定化菌体连续使用 140h,重复 9 批次。酶活不低于 100u/mL,达到相同发酵酶活所需发酵时间由 72h 缩短至 6~

12h。

计算单位时间产率 352u/h,是批次反应的 3 倍以上。时空产率 12.5u/(mL·h)是批次反应的 6 倍。同时培养基组成也大为简化。

(2)小罐实验:在摇瓶实验的基础上,对 5L 小罐重复批次发酵进行了研究(图 4)。

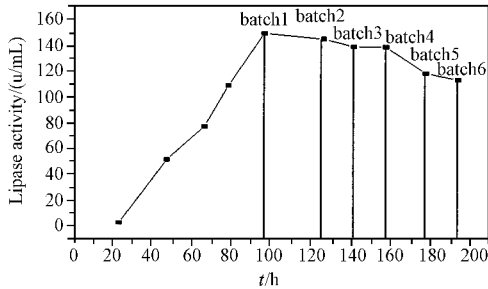


图 4 发酵罐重复批次发酵

Fig.4 Repeated-batch experiment in fermenter

26.5°C ;120r/min ;1vvm ;non-controlled pH ;replaced volume 1.2L ;
replaced medium :soybean flour 3.0%(W/V) ,peanut oil 0.5%(V/V)

固定化根霉细胞表现出良好的重复使用能力,发酵罐内重复发酵 6 批次。相对于摇瓶培养,获得与原发酵液相同的酶活所需的时间有所延长(18~24h),酶活也相对低,可能是发酵罐中的菌体密度偏低造成的。

3 结论

对少根根霉固定化载体进行了选择,聚氨酯为比较优良的固定化载体。对取代培养基进行了初步优化,确定培养基组成全脂豆粉 3%,花生油 0.5%。对固定化后的细胞连续重复批次发酵进行了研究,固定化菌体有良好的重复使用能力,5L 小罐可重复 6 批次,摇瓶可连续使用 140h,重复 9 批次,平均酶活达 150u/mL,酶的时空产率是批次反应的 6 倍。

Study on the Repeated Batch Fermentation of Lipase by Immobilized *Rhizopus*

YANG Xue-Hao TAN Tian-Wei*

(Department of Biochemical Engineering, College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract Repeated batch fermentation with *Rhizopus arrhizus* immobilized by polyurethane was optimized in details including the time to replace, the volume of the replaced medium and the optimal composition of the medium to replace. Immobilized cells showed stability for repeated use. Immobilized cells could be used for 9 batches, lasting 140h in flask and 6 batches in 5L fermenter when the substitute culture medium consisted of (%) :soybean flour 3.0, earthnut oil 0.5 and the liquid was replaced by 40%. The time for fermentation was reduced largely and the lipase productivity was 3~6 times as high as that in batch fermentation.

Key words lipase, immobilization, repeated-batch fermentation, *Rhizopus arrhizus*

REFERENCES(参考文献)

- [1] Shi QQ(施巧琴). Research of alkaline lipase. *Microbiology(微生物学通报)*, 1988, **8**(3):108-110
- [2] Xiao CL(肖春玲), Song X(宋欣), Qu YB(曲音波). Research of *Mucor* lipase. *Microbiology(微生物学通报)*, 1998, **25**(5):274-277
- [3] Macrae AR, Hammond RC. Present and future applications of lipase. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1985, **3**:193-217
- [4] Tan Tianwei, Zhang Mu, Wang Bingwu et al. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochem*, 2003, **39**:459-465
- [5] Qiao HQ(乔红群), Xu H(徐虹), Fu SL(付闪雷) et al. Selection of lipase production strains and the characteristic of lipase. *Journal of Nanjing University of Chemical Technology(南京化工大学学报)*, 1998, **20**(1):15-19
- [6] Xu Y(徐岩), Xie H X(谢红想), Wang D(王栋) et al. Fermentation Conditions of Lipase Production by *Rhizopus* Y-92. *Industrial Microbiology(工业微生物)*, 1999, **29**(1):6-10
- [7] Abel Hiol, Marie D Jonzo, Nathalie Rugani. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **26**:421-430
- [8] Zhang SX(张树政). *Enzyme Industry(酶制剂工业)*. 2nd ed, Beijing, Science Press(科学出版社), 1998
- [9] Ikram ul-Haq, Shumaila Idrees M, Ibrahim Rajoka. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 2002, **37**:637-641
- [10] Murat Elibil, Dursun Ozer. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 2002, **38**:367-372
- [11] Murat Elibil, Dursun Ozer. Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem*, 2000, **36**:219-233
- [12] Mc Neill, Gerald P, Shimizu. High-yield enzymic glycerolysis of fats and oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1991, **68**(1):1
- [13] Li XM(李学梅), Lin JF(林建平), Cen PL(岑沛霖). Immobilization of mildew. *Progress in Biotechnology(生物工程进展)*, 1999, **4**:32-36
- [14] Yin CH(尹春华), Xu JL(徐家立), Tan TW(谭天伟) et al. Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells and enzymatic Synthesis of monoglyceride. *Journal of Process Engineering(过程工程学报)*, 2002, **2**(6):534-538

Received :09-04-2003

This work was supported by Grant from State "863" Project(No.2002AA514030), the Tenth Five-year Key Program of the State Science and Technology(No.2001BA708B02-08), National Natural Science Foundation of China(No.2107600C).

* Corresponding author. Tel :86-10-64434778 ; Fax :86-10-64715443 ; E-mail :tantw@mail.buct.edu.cn

氨基化二氧化硅颗粒固定木瓜蛋白酶研究

程凡亮 陈伶俐 王 卫 刘琳琳 邓 乐*

(湖南师范大学生命科学学院,长沙 410081)

摘 要 采用正硅酸乙酯与 N(β-氨基)氨基丙基三乙氧基硅烷在油包水形成的微胶囊中同步水解的方法,一步法制备了氨基化的二氧化硅颗粒,得到的颗粒粒径在 0.3~0.5μm 之间,平均大小为 0.37μm,氨基含量和颗粒大小可控,氨基含量高达 5.6mmol/g。此颗粒经戊二醛处理后,采用共价法固定木瓜蛋白酶,固定化最适 pH6.5,最佳给酶量为 15mg/g 载体,固定化酶的最适反应温度为 70℃,最适反应 pH 为 6.5,固定化酶热稳定性、pH 耐受性、贮存稳定性都明显高于游离酶,表明此颗粒可作为一种优良的酶固定化载体。

关键词 二氧化硅颗粒,木瓜蛋白酶,酶固定

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0287-04

从 60 年代起,固定化酶技术的研究迅速发展,为了提高酶的使用效率,克服游离酶对热、酸、碱、有机溶剂等因素的不稳定性,人们对酶的固定化进行了广泛深入的研究,出现了许多固定化材料和方法^[1-4],但相比较而言,无机载体比有机载体更耐生物降解、有更高的热稳定性和更低的价格^[5]。多孔玻璃、多孔硅球、氧化铝及硅藻土是目前应用较为广泛的无机载体,但它们在用于固定化酶时需要经过强酸或强碱的活化,再在甲苯中长时间回流进行硅烷化,载体的制备过程繁琐,且氨基含量不高^[6,7],因此制备出更加高效、低成本、易于制备的新型固定化载体和新的固定化方法是众多科研工作者的目标。

木瓜蛋白酶是一种来源广泛的巯醇类植物蛋白酶,其活性位点由 Cys-25、His-159 和 Asp-158 组成。木瓜蛋白酶对蛋白质、短肽化合物、氨基酸酯以及酰胺等多类化合物的水解反应具有良好的催化活性,同时也可用于催化合成短肽和低聚氨基酸,在食品、轻纺、医学等领域有着广泛的应用。木瓜蛋白酶在酶动力学和结构学上都已得到深入的研究^[8,9],其在各种载体上的固定化在国内外也有广泛研究^[1-4],因此很适合作为评测酶固定化方法效率的模式酶。

本文在以上前人的基础上,分析比较现有固定化材料和方法,采用微乳液法,以氨水为催化剂,使正硅酸乙酯与 N-(β-氨基)氨基丙基三乙氧基硅烷在油包水形成的水相中同步水解,一步法制备了大小均匀的氨基化二氧化硅颗粒,经戊二醛处理,采用温和的共价法,以木瓜蛋白酶作为固定对象,研究了此种颗粒作为酶固定化载体的可行性,取得了满意的结果。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

木瓜蛋白酶(Sigma,2100u/g),N-(β-氨基)氨基丙基三乙氧基硅烷(AEAPS,sigma),甘氨酸(Sigma),戊二醛(25%,上海化学试剂公司),聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100,上海化学试剂公司),正硅酸乙酯(TEOS,上海五联化工厂),EDTA(BBI),盐酸半胱氨酸(BBI),正己醇、环己烷等其它试剂均为市售分析纯。

JSM-5600LV 型扫描电子显微镜(日本电子光学公司),UV751GD 型紫外可见分光光度计(上海分析仪器总厂),JY92-II 型超声细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所),85-2 型恒温磁力搅拌器(江苏)。

1.2 载体制备

采用何晓晓等人^[10]的方法,并加以改进。按照环己烷:Trion X-100:正己醇=4:1.15:1 的比例配成混合液,超声波振荡均匀,形成浑浊乳状液,磁力搅拌下,加入一定量的 0.05mol/L 的氨水,溶液变为透明,15min 后加入一定量的 TEOS,0.5h 后再加入一定量的 AEAPS,反应时间为 20h,反应完毕后加入丙酮破乳分离颗粒,加入无水乙醇洗涤颗粒,重复洗涤 5 次,烘箱干燥。载体中游离氨基含量的测定采用电位滴定法^[11]。

1.3 木瓜蛋白酶的固定化

取一定量的氨基化二氧化硅颗粒,分散于 PBS(0.1mol/L,pH8.0)中,超声分散,通氮 30min 驱氧,加入戊二醛至最终浓度为 5%,室温下磁力搅拌 2h,离心去上清,再用 0.01mol/L PBS 清洗 3 遍,去除残余戊二醛。将活化后的载体加入一定

量的木瓜蛋白酶溶液,室温下摇床振荡,离心去上清,加入一定量的甘氨酸封闭 30min,离心弃上清,以 PBS(0.01mol/L, pH7.0,含 0.001mol/L EDTA,0.05mol/L Cys)清洗 3 次,得固定化酶。

1.4 酶活测定

酶活测定采用福林-酚法^[12]。

固定化酶活力的测定:在固定化酶中加入 1mL 0.1mol/L 的 PBS(含 0.05mol/L Cys 和 0.01mol/L EDTA) 40℃ 预热,加入 1mL 40℃ 预热的 2% 酪蛋白溶液,40℃ 反应 10min,加入 10% 三氯乙酸 2mL,摇匀静置 10min 后过滤,取滤液 1mL 加 5mL 0.4mol/L Na₂CO₃ 溶液及 1mL 福林-酚试剂 40℃ 显色 15min,测定 OD₆₈₀。

游离酶活力测定:将酶溶于 0.1mol/L PBS(含 0.05mol/L Cys 和 0.01mol/L EDTA),取 1mL 按上述方法测定游离酶活力。

固定化率 = (加入酶的总活力 - 上清酶的总活力) / 加入酶的总活力

酶活回收率 = 固定化酶的总活力 / 加入酶的总活力

2 结果与讨论

2.1 颗粒的形态与大小

图 1 所示为本文中制备的氨基化二氧化硅颗粒的扫描电子显微镜照片,颗粒大小均匀,为规则的球形,粒径在 0.3 ~ 0.5 μm 之间,平均大小约为 0.37 μm,粒度分布窄。

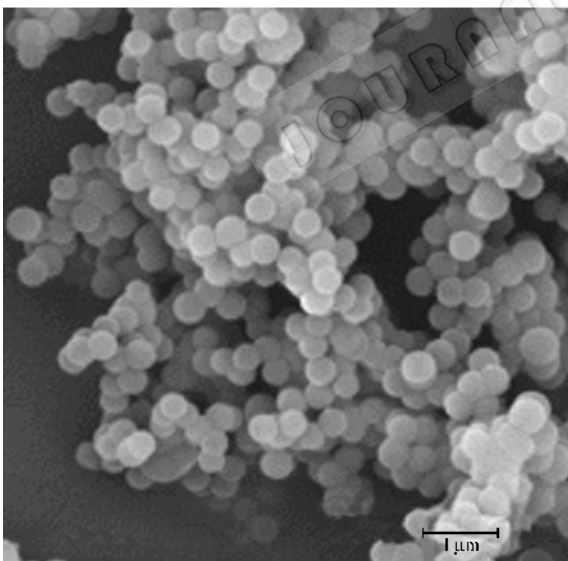


图 1 氨基化 SiO₂ 颗粒扫描电子显微镜照片(×20 000)

Fig.1 SEM photo of SiO₂ particles(×20 000)

2.2 载体的游离氨基含量

表 1 氨基化 SiO₂ 颗粒中游离氨基含量

Table 1 Free amine group content of SiO₂ particle

TEOS:AEAPS molar ratio	1:1	2:1	4:1
Amine group content/(mmol/g)	5.6184	4.9997	3.2210

采用了不同比例的 TEOS 和 AEAPS 制备了二氧化硅颗粒,颗粒中游离氨基含量见表 1。由表 1 可见,随 AEAPS:TEOS 比例的增高,颗粒中游离氨基含量也增大,在比例为 1:1 可达 5.6184mmol/L,这远高于传统的多孔玻璃和多孔硅球的氨基含量,在用作固定化酶载体时可以提供更多的固定位点,使其作为高效酶固定载体成为可能。而且此种颗粒的表面氨基含量可以在合成时通过改变 TEOS 和 AEAPS 的比例而进行控制,为这种载体适用于固定多种不同类型的酶打下了基础。在本实验中采用氨基含量 5.6mmol/g 的颗粒用于固定木瓜蛋白酶的载体。

2.3 固定化时间的影响

每 0.01g 载体中加入 1mL 的 10mg/mL 的木瓜蛋白酶溶液,不同时间测定上清蛋白的含量。从图 2 中可以看出,载体对酶的吸附量随固定化时间的延长而增加,6h 达到最大值,吸附量可达酶 270mg/g 载体,因此在以下的固定化实验中固定化时间均采用 6h。载体的最大载酶量较大,也说明该载体的活性基团含量较高。

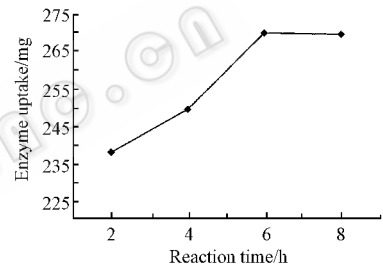


图 2 固定化时间对酶吸附量的影响

Fig.2 Effect of reaction time on enzyme uptake

2.4 pH 的影响

在不同 pH 值的 0.1mol/L PBS 中进行了木瓜蛋白酶的固定化反应,其相对活力如图 3 所示,当 pH = 6.5 时,固定化酶的活力达到最大值。戊二醛与氨基的反应随 pH 的增加而增加,但高 pH 对酶活性不利,固定化结合位点越多,酶活性越低。较低 pH 固定化时与酶的结合点少,酶活性高。

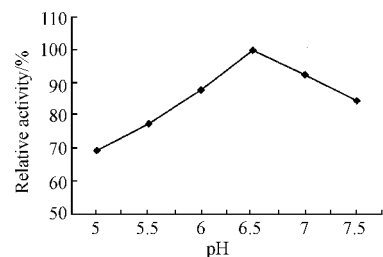


图 3 固定化反应介质 pH 值对酶活力的影响

Fig.3 Effect of reaction pH on the relative activity

2.5 给酶量的影响

从图 4 中可以看出,在给酶量为 5mg 和 10mg 时固定化率可达 100%,随着给酶量的增加,固定化率下降,当给酶量为 20mg 时,固定化率为 71.8%,与此相反,随着给酶量的增加,所得的固定化酶的相对活力逐渐增大,在给酶量 15mg 时为 88%。根据以上结果,在固定化酶的制备实验中,每次给

酶量为 15mg/g 载体,这样就能以较低的给酶量得到较高活力的固定化酶和较高的固定效率。

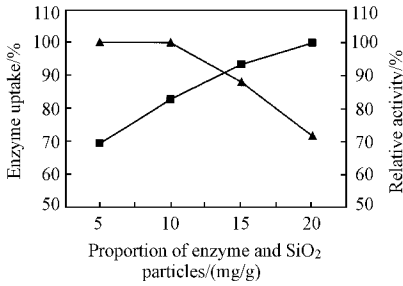


图4 给酶量与相对活力及固定化率的关系

Fig.4 Effect of the ratio of enzyme and carrier on the relative activity and enzyme uptake

▲— Enzyme uptake ; ■— Relative activity

2.6 固定化酶的最适反应温度

取游离酶和固定化酶,在 40~80℃ 范围内(温度间隔为 10℃),分别测定固定化酶和游离酶的活性。图 5 表明,固定化酶的最适温度比游离酶提高了 10℃,说明固定化酶的热稳定性较高,这可能是因为固定化过程稳定了酶分子的构象,因而使得固定化酶的临界变性温度提高。

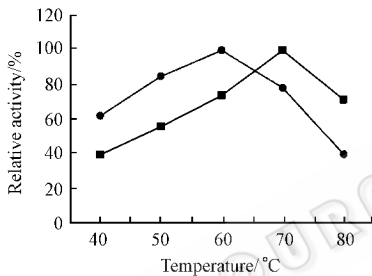


图5 酶活力与温度的关系

Fig.5 Effect of temperature on relative activity of soluble and immobilized enzyme

●— Soluble enzyme ; ■— Immobilized enzyme

2.7 pH 值对酶活力的影响

从图 6 可见,固定化酶的最适 pH 较游离酶低 0.5 个单位,且固定化酶的相对活力-pH 曲线要平缓得多,说明固定

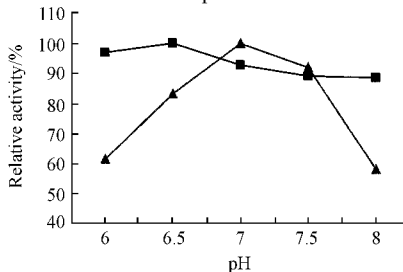


图6 pH 对酶活力的影响

Fig.6 Effect of pH on relative activity of soluble and immobilized enzyme

●— soluble enzyme ; ■— immobilized enzyme

化酶有更好的酸碱耐受性。这可能是此载体为带氨基的载体,是一种偏碱性的载体,使得载体表面的局部 pH 值发生变化,从而使得固定化酶的最适 pH 向酸性方向偏移,固定化后,稳定了酶分子的构象,使固定化酶的 pH 范围变宽。

2.8 储存稳定性

游离酶在冰箱(4℃)放置 2 周后,活力全部丧失,而固定化酶活力仍保持在 80% 以上,表明固定化酶的贮存稳定性能明显优于游离酶。

REFERENCES (参考文献)

- [1] He F(贺枫), Liu LJ(刘立建), Zhuo RX(卓仁禧). Immobilization of papain on porous silica beads: preparation and characterization. *Ion Exchange and Adsorption(离子交换与吸附)*, 1997, **13** (3) 290-294
- [2] Li YF, Jia FY, Li JR *et al.* Papain immobilization on a nitrilon fibre carrier containing primary amine groups. *Biotechnol Appl Biochem*, 2001, **33**: 29-34
- [3] Shakil A Khan, Jawaid Iqbal. Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, **32**: 89-94
- [4] Finley JW, Stanly WL, Watters GG *et al.* Removal of chill haze from beer with papain immobilized on chitin. *Process Biochemistry*, 1979, **14**(7): 12-13
- [5] Mody HM, Mody KH, Mairh OP *et al.* Catalytic activity of an immobilized α -amylase on mesoporous silicas. *India Journal of Chemistry*, 1999, **38**: 1200
- [6] Liu LJ(刘立建), Zhuo RX(卓仁禧). Activation and silanization of porous silica beads. *Ion Exchange and Adsorption(离子交换与吸附)*, 1995, **11**(6): 541-544
- [7] Wang HY(王海英), Lin H(林洪), Ye M(叶眉) *et al.* Study on immobilized papain and its application. *Journal of Ocean University of Qingdao(青岛海洋大学学报)*, 2001, **31**(5): 689-694
- [8] Liu S, Hanzlik RP. The contribution on intermolecular hydrogen bonding to the kinetic specificity of papain. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1158**: 264-272
- [9] Thierry Vernet, Daniel C. Tessier, Jean Chatellier *et al.* Structural and functional roles of asparagine-175 in the cysteine protease papain. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**: 16645-16652
- [10] He XX(何晓晓), Wang KM(王柯敏), Tan WH(谭蔚泓) *et al.* A novel gene carrier based on amino-modified silica nanoparticles. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 2002, **47**(18): 1365-1369
- [11] Handbook of Analytical Chemistry(化学分析手册), Beijing: Science Press, 1982, pp. 550-558
- [12] Guo Y(郭勇). Enzyme Engineering(酶工程). China Light Industry Press, 1994, pp. 314-316

Immobilization and Stabilization of Papain on SiO₂ Particles Containing Amine Groups

CHENG Fan-Liang CHEN Ling-Li WANG Wei LIU Lin-Lin DENG Le*

(College of Life Science ,Hunan Normal University ,Changsha 410081 ,China)

Abstract Numerous approaches and materials have been explored for preparation of immobilization enzymes because they have considerable advantages over enzyme in bulk solution. Among present enzyme carriers inorganic materials have lower cost and more stability than organic materials. But the present inorganic materials contain less active sites and have to undergo some complicated processes before binding enzyme. So it is necessary to explore a new kind of inorganic enzyme carrier. Papain, a well characterized thiol protease kinetically and structurally, is a suitable model to compare the efficiency of various immobilization procedures. SiO₂ particles containing amine groups were synthesized by synchronous hydrolysis of tetraethylorthosilicate (TEOS) and N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane (AEAPS) in W/O Microemulsion of Triton X-100/cyclohexane/ammonium hydroxide system. The obtained particles have a diameter range from 0.3 μm to 0.5 μm, and their average size is 0.37 μm and can be controlled by adjusting water to surfactant molar ratio and water to TEOS and AEAPS molar ratio. Compared with traditional porous silica beads, these particles contain much more amine groups and their amine group content can be easily changed in the process of synthesis. Papain was immobilized on the particles which were treated by glutaraldehyde with covalent method. The optimum immobilization conditions of enzyme were as follows: enzyme load was 15 mg/g carrier, pH was 6.5. The pH and temperature optima were 6.5 and 70 °C for immobilized enzyme. All above indicate this kind of particle can be a good enzyme immobilization carrier.

Key words SiO₂ particle, papain, enzyme immobilization

Received: 09-19-2003

* Corresponding author. Tel: 86-731-8872927; E-mail: Dengle@mail.hunnu.edu.cn

微生物生产辅酶 Q

辅酶 Q (CoQ) 作为酶的辅助因子,可用于治疗多种疾病。有重要价值。作为医药产品,有针剂型和口服型。CoQ 的结构与维生素 K 相近,能强化其他酶的作用效果,且是强力的抗氧化剂,有助于保护细胞不被破坏性的氧化作用所伤害。它对细胞中有“发动机”之称的线粒体及其正常功能也起关键性作用,如果线粒体中 CoQ 含量不足,则多种酶活力均明显下降。例如帕金森氏症患者的线粒体出现机能障碍即与 CoQ₁₀ 水平有关。美国研究人员将 CoQ₁₀ 用于该患者治疗,可使病症缓解,并能延缓 44% 线粒体得到增强,也无副作用,有望成为帕金森氏症的治疗用药。实际上,CoQ₁₀ 具有多种功能作用,它能改善心肌代谢和心输出量,抗心率失常和抗醛固酮,并可降低血压,临床上可作为心力衰竭、冠心病和高血压病的辅助治疗。此外,还可用于治疗原发性和继发性醛固酮增多症和慢性肝炎,对延缓人体衰老有一定作用。

目前国内外都在探究通过微生物途径扩大 CoQ₁₀ 的生产*。日本研究人员从胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) 获取 CoQ₁₀ 约 0.28 mg/g; 从诺维鲁斯假丝酵母 (*Candida novellus*) 产假丝酵母 (*C. utilis*) 压榨酵母中获得比胶红酵母略低的类似的 CoQ₁₀ 量,还有短梗霉 (*Aureobasidium* sp.) 丝孢酵母 (*Trichosporon* sp.) 也有生产 CoQ₁₀ 的能力。在细菌当中发现根癌农杆菌能产 CoQ₁₀ (0.26 mg/g) 经诱变后获得突变株,在最适通气条件下从发酵液中得到 CoQ₁₀ 84 mg/L,最高达 211 mg/L,细胞内累积 CoQ₁₀ 为 5.1 mg/L。某些根癌菌、原氨杆菌 (*Protoaminobacter* sp.) 均具有合成 CoQ₁₀ 的能力。用一种假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 发酵生产 CoQ₁₀, 可提高产量 10%, 但需要添加 0.03% ~ 0.07% 的非离子表面活性剂 (系一种油脂类), 其他一些细菌如缺陷假单胞菌、深红螺菌、球形假单胞菌以及沼泽红假单胞菌同样在加入非离子表面活性剂的情况下均可获得类似结果。所获发酵培养液的菌体含有 CoQ₁₀ 2100 μg/g, 而对照为 1500 μg/g, 因此,控制发酵过程中的通气、营养因素及表面活性剂对 CoQ₁₀ 的生产均有重要意义,用离子交换树脂可使产品回收率达 97%。在我国已开展这方面的研究,如重庆第三军医大学研究人员用某些光合细菌生产 CoQ₁₀ 取得了良好的效果,菌体内含量普遍较高,尤其是红螺菌科的细菌更是如此。用荚膜假单胞杆菌 (*Rhodospseudomonas capsulatus*) 培养 4 天,菌体 CoQ₁₀ 质量浓度从 15.213 mg/L 提高到 20.365 mg/L,产量提高约 33.87%, 但生产能力还需进一步提高。值得注意的是,日本利用光合细菌发酵生产 CoQ₁₀ 有一定优势,早已实现 CoQ₁₀ 的工业化生产。

总之,基于辅酶特别是辅酶 Q₁₀ 众多的功能作用和广泛的用途,可充分利用微生物本身的特定优势,结合现代生物技术有效应用、改造或构建新的菌种以提高 CoQ₁₀ 的生产能力,将为扩大 CoQ₁₀ 规模生产开辟新的途径。

(柯为 供稿)

* 获取 CoQ₁₀ 不仅来自动植物组织,更重要的来源是各种微生物。