

# 功能基化聚丙烯酸甲酯固定化 氨基酰化酶的研究

李民勤 何炳林

(南开大学高分子化学研究所, 天津 300071)

以功能基化聚丙烯酸甲酯为载体制备固定化氨基酰化酶时, 载体制备时的交联度, 致孔剂用量和混合致孔剂比例均会影响酶的固定化效率。结果表明 25% 交联度和 100% 致孔剂用量制备的载体最佳。用此载体固定化氨基酰化酶可提高酶对高底物浓度、离子强度、温度、pH、有机溶剂和蛋白质变性剂的耐受能力。用固定化酶柱式反应器连续拆分N-乙酰基-DL-苯丙氨酸, 使用一个月仍可保留90%的酶活力。

**关键词** 功能基化聚丙烯酸甲酯; 氨基酰化酶; 固定化酶

L-氨基酸在食品、医药、工业和农业等方面的应用越来越广泛, 近年来对L-氨基酸的需求量不断增加。目前工业上生产L-氨基酸的方法是微生物发酵法和化学合成法。化学合成法生产出的氨基酸是外消旋混合物, 需进行光学拆分。其中利用氨基酰化酶(Aminoacylase E.C.3.5.1.14)的酶学方法是制备L-氨基酸的一种好方法<sup>[1]</sup>。

米曲霉氨基酰化酶的固定化最早由Tosa等人开始研究<sup>[2]</sup>, 后又进行了许多这方面的研究工作<sup>[3-8]</sup>。我们用功能基化聚丙烯酸甲酯作为氨基酰化酶的载体, 研究了影响固定化氨基酰化酶效果的一些因素和固定化氨基酰化酶的一些性质。

## 材料与 方法

### (一) 试剂及仪器

二乙烯苯(纯度约46.55%), 丙烯酸甲酯和过氧化苯甲酰均由南开大学化工厂提供。米曲霉菌种3042由天津第三调料厂提供。721分光光度计为上海第二仪器厂制造。

### (二) 实验方法

1. 氨基酰化酶的制备: 1 kg米曲霉固体培养物加0.05mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)6000ml, 室温下搅拌2h后用纱布除去部分残渣。4℃下冷冻离心收集上清液, 用40%—70%饱和度硫酸铵沉淀蛋白。离心后用磷酸缓冲液溶解, 经过Sephadex G25柱脱盐得到氨基酰化酶溶液, 活力为500u/ml。

2. 酶活力测定: 氨基酰化酶活力测定按照Chibata等人的茚三酮显色法<sup>[1]</sup>, 底物为0.033mol/L N-乙酰基-DL蛋氨酸。

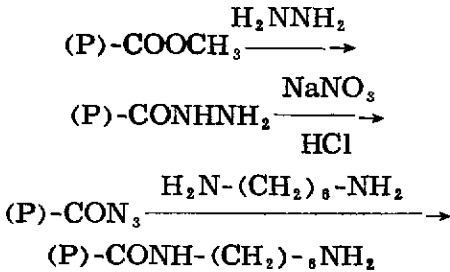
活力单位定义为: 37℃下, 1h内酶催化底物水解释放出1μmol L-氨基酸所需酶量为1单位。

3. 蛋白质的定量分析: 蛋白质含量的测定按照Bradford的方法进行<sup>[9]</sup>。

4. 载体的合成: 含一定交联剂、致孔剂和1% BPO的丙烯酸甲酯溶液悬浮于含20%NaCl和0.5%明胶的水相中(油相:水相=1:3), 调节搅拌速度以控制球体的大小, 升温聚合。用开水洗涤后, 在沙氏提取器中用无水乙醇提取10h。自然晾干后, 收集40—60目的树脂。

本文于1992年1月8日收到。

聚丙烯酸甲酯的功能基化: 取上述树脂 2g 按照下面的反应式和 Mitz<sup>[10]</sup>方法进行功能基化。



#### 5. 固定化酶及固定化酶柱的制备:

称取 0.05g 制备好的载体, 室温下用磷酸缓冲液平衡 4h。倾出上清液, 加入 1.2ml 氨基酰化酶, 振荡吸附 24h 后吸出液体, 用磷酸缓冲液洗涤至无蛋白止。

将 0.3g 固定化酶装入带恒温夹套的柱子中 (0.4 × 14cm), 底物从柱子顶端注入。

## 结果与讨论

### (一) 载体结构对固定化酶活力的影响

适合于酶的固定化的载体必须具有合适的孔径和较大的孔容。载体的孔径和孔容是由交联度, 致孔剂种类和用量所控制的, 它们对固定化氨基酰化酶活力的影响

分别见表 1、表 2 和表 3。

表 1 交联度对固定化酶活力的影响

Table 1 Effect of degree of cross-linking on activity of immobilized enzyme

Sample number	Degree of cross-linking (%)	Enzyme adsorbed (u/g)	Protein adsorbed (mg/g)	Activity of immobilized enzyme (u/g)
1	10	3742	12.7	29.6
2	15	6302	29.8	1327
3	20	10726	41.5	2382
4	25	9226	47.0	2654
5	30	6950	50.5	1955
6	35	7946	52.5	1256

表 2 致孔剂用量对固定化酶活力的影响

Table 2 Effect of amount of porogenic agent on activity of immobilized enzyme

Sample number	Amount of porogenic agent (%)	Enzyme adsorbed (u/g)	Protein adsorbed (mg/g)	Activity of immobilized enzyme (u/g)
1	25	1973	16.1	41.5
2	50	3000	33.4	895
3	75	7013	39.6	1813
4	100	9226	47.0	2654
5	125	4786	37.2	1511
6	150	3886	44.5	770

表 3 混合致孔剂对固定化酶活力的影响

Table 3 Effect of mixed porogenic agent on activity of immobilized enzyme

Sample number	Mixed porogenic agent			Enzyme adsorbed (u/g)	Protein adsorbed (mg/g)	Activity of immobilized enzyme (u/g)
	Gasoline (%)	Toluene (%)	2-Ethyl-butanol (%)			
1	100	0	0	5069	43.2	1931
2	90	10	/	8119	50.6	2465
3	80	20	/	6444	44.8	1970
4	70	30	/	5861	47.4	1926
5	60	40	/	3931	38.9	800
6	50	50	/	3031	35.5	705
7	40	60	/	2083	33.6	622
8	30	70	/	1214	25.9	314
9	95	/	5	6098	45.4	1724
10	90	/	10	5086	46.4	1481
11	85	/	15	5213	38.6	1375
12	80	/	20	4834	36.7	1191
13	70	/	30	2114	25.7	391

由表 1 和表 2 可知, 在 25% 的交联度和 100% 致孔剂用量时能获得较高的固定化酶活力。由表 3 可知, 当非极性致孔剂汽油中加入少量具有一定极性的甲苯时, 固定化酶活力有所提高, 加入更高比例的甲苯, 固定化酶活力下降; 而在汽油中加入极性更大的 2-乙基丁醇时, 固定化酶活力很快下降。

**(二) 固定化氨基酰化酶的性质**

1. 底物浓度的影响: 由图 1 可知, 自然酶当底物浓度超过 0.04mol/L 时, 溶液中氨基酰化酶出现底物抑制; 固定化氨基酰化酶活力却随着底物浓度增加而增加, 没有出现底物抑制。因此, 固定化酶可在较高底物浓度下进行 DL-氨基酸的拆分, 提高了反应效率。

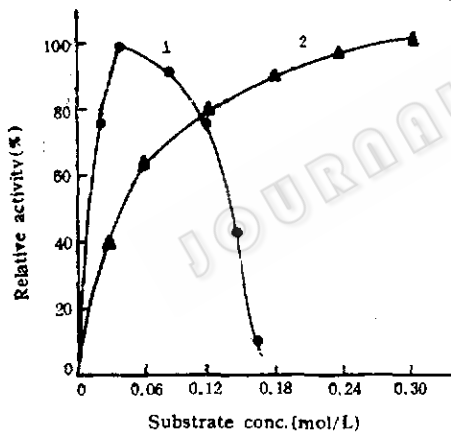


图 1 底物浓度对氨基酰化酶溶液酶及固定化酶的影响

Fig 1 Effect of substrate concentration on soluble and immobilized enzyme  
1. Soluble enzyme;  
2. Immobilized enzyme

2. 离子浓度的影响: 在底物溶液中添加不同浓度的缓冲液调节底物溶液中的离子浓度, 并测定这些离子浓度下的氨基酰化酶溶液酶和固定化酶活力, 其结果如图 2。

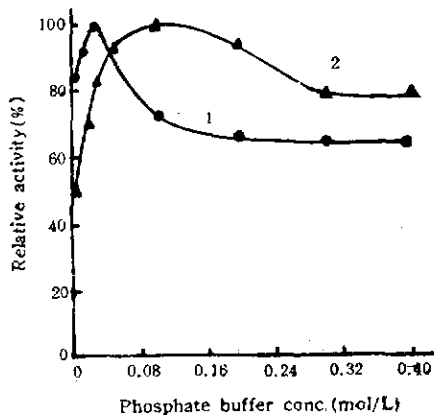


图 2 离子浓度对氨基酰化酶溶液酶及固定化酶的影响

Fig.2 Effect of ionic concentration on soluble and immobilized enzyme  
1. Soluble enzyme;  
2. Immobilized enzyme

从图中可知, 无论是溶液酶还是固定化酶, 其活力都受到离子浓度的影响。氨基酰化酶固定化以后受载体微环境影响, 最适磷酸缓冲液浓度可以提高。

3. 温度的影响: 由图 3 可知, 氨基酰化酶固定化以后最适温度显著提高, 这说明载体与酶结合后, 对酶有稳定作用。

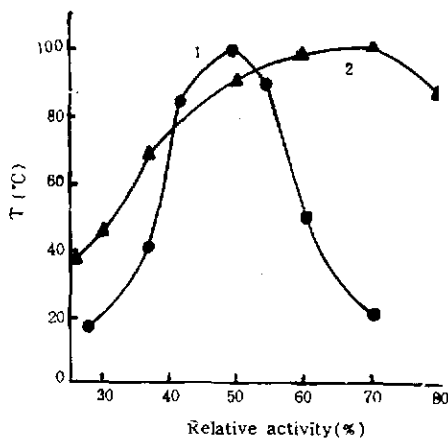


图 3 温度对氨基酰化酶溶液酶及固定化酶的影响

Fig3. Effect of temperature on soluble and immobilized enzyme  
1. Soluble enzyme;  
2. Immobilized enzyme

把溶液酶和固定化酶在不同温度下保温 30min 后冷却至室温，然后在 37℃ 测定活力，并计算出酶活力保留率，其结果如图 4，从图中可知，氨基酰化酶固定化以后热稳定性明显提高。

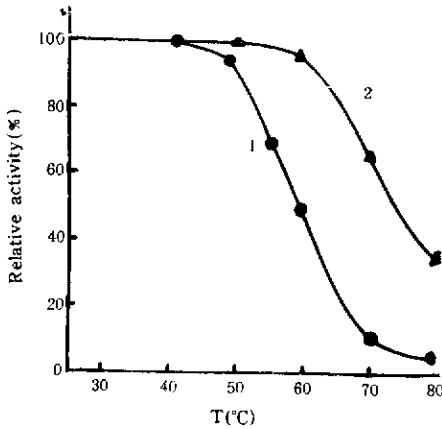


图 4 不同温度下的活力保留率

Fig.4 Retained activity at different temperature

- 1. Soluble enzyme
- 2. Immobilized enzyme

4. pH 的影响：从图 5 可知，氨基酰化酶固定化以后最适 pH 向酸性方向移动了 0.9 个 pH 单位。

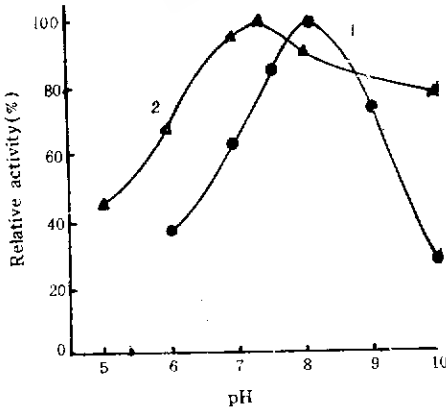


图 5 pH 对氨基酰化酶溶液酶及固定化酶的影响

Fig.5 Effect of pH on soluble and immobilized enzyme

- 1. Soluble enzyme,
- 2. Immobilized enzyme

5. 有机溶剂的影响：在底物溶液中加入不同浓度的乙醇或丙酮，测定固定化酶活力，其结果如图 6。

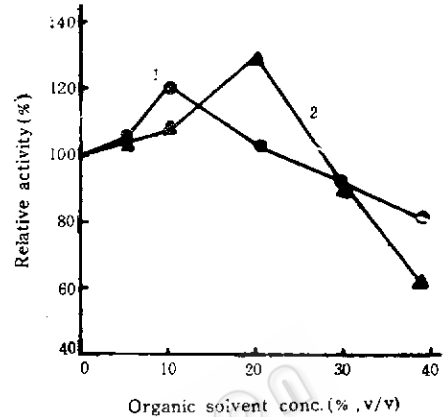


图 6 有机溶剂对固定化氨基酰化酶的影响

Fig.6 Effect of organic solvents on immobilized aminoacylase

- 1. Acetone, 2. Ethanol

6. 蛋白变性剂的影响：用不同浓度的蛋白变性剂处理氨基酰化酶 30 min 后充分洗涤，测定其活力，其结果如图 7。

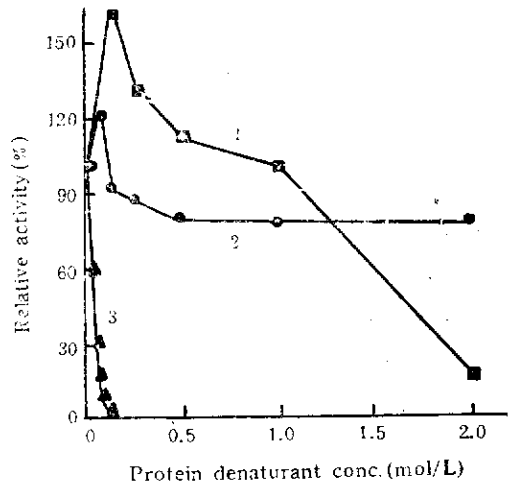


图 7 蛋白变性剂对固定化氨基酰化酶的影响

Fig.7 Effect of protein denaturants on immobilized aminoacylase

- 1. Guanidine, 2. urea, 3. SDS

### (三) 固定化酶柱对 N-乙酰基-DL-苯丙氨酸的连续拆分

用恒流泵把底物从柱顶端注入, 保持

流速10ml/h., 连续拆分0.05mol/L的N-乙酰基-DL-苯丙氨酸1个月, 固定化酶活力仍保留90%。

### 参 考 文 献

- [1] Chibata, I. et al., *Methods in Enzymol.* (Mosbach, K., ed.) Academic Press, New York, Vol. 44, p.748, 1976.
- [2] Sato, T. et al., *Enzymologia*, 31:214, 1966.
- [3] Mori, T. et al., *Enzymologia*, 43:213, 1972.
- [4] Yugari, Y. et al., *Enzyme Eng.* 4:233, 1978.
- [5] Watanabe, T. et al., *Biotech., Bioeng.* 21(3):477, 1979.
- [6] He, B.L. et al., *Biomater., Artif. Cells, Artif. Organs*, 15(4):709, 1987-1988.
- [7] He, B.L. et al., *Biomater., Artif. Cells, Artif. Organs*, 18(3):375, 1990.
- [8] He, B.L. et al., *Reactive Polymers*, 17(3):344, 1992.
- [9] Bradford, M.M., *Analytical Biochemistry*, 71:248, 1976.
- [10] Mitz, M. A. and Summaria, L. J., *Nature (London)*, 189:576, 1961.

## Studies on Immobilization of Aminoacylase on Functionalized Polymethyl Acrylate

Li Minqin He Binglin

(Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Functionalized polymethyl acrylate was used for immobilization of aminoacylase from *Aspergillus oryzae*. Effects of degree of cross-linking, amount of porogenic agent and mixed porogenic agents on the activity of immobilized aminoacylase were investigated. The results showed the activity of immobilized aminoacylase was the highest when the carrier was 25% cross-linking and 100% porogenic agent. Effects of substrate concentration, ionic concentration, temperature and pH on immobilized aminoacylase were compared with those on soluble aminoacylase and effects of some organic solvents and protein denaturants on immobilized aminoacylase were investigated. A column reactor packed with immobilized aminoacylase was used to resolve continuously N-acyl-DL-phenylalanine for a month, and 90% activity of immobilized aminoacylase was retained.

**Key words** Functionalized polymethyl acrylate; aminoacylase; immobilized enzyme