

交联酶晶体制备及其稳定性的研究*

潘力 林炜铁 姚汝华

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

关键词 *Candida rugosa* 脂肪酶, 交联酶晶体, 稳定性

分类号 Q599 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)03-0401-03

酶制剂已经广泛应用在化学工艺、医学、农业、食品工业和化学分析等各个领域,但酶的明显弱点是稳定性差,特别是应用于有机合成的酶还要耐受有机溶剂的变性作用等,所以酶的稳定性研究越来越引起重视。

脂肪酶由于其在疏水环境的特殊催化作用,被广泛应用于有机合成中。本研究所采用 *Candida rugosa* 脂肪酶(CRL)是目前应用最为广泛的脂肪酶,它不仅在水和有机介质催化酯、酸、醇的拆分,而且还能催化转酯、酰化、脱酰化等立体异构化反应和酯的水解。但是目前 CRL 的商业化产品是含有多种水解酶的混合物,其立体异构的专一性低,而纯化的 CRL 的立体异构的专一性提高,但是操作稳定性差。本文采用酶结晶技术与化学交联技术相结合的方法,制备出一种新型实用的交联酶晶体催化剂,并对它的温度、pH 和在有机溶液中的稳定性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Candida rugosa 脂肪酶购自 Sigma 公司,离子交换层析介质 DEAE-Sephadex A-50 购自 Pharmacia 公司,2-甲基-2,4-戊二醇、戊二醛、甘油三乙酸酯等试剂均为进口分装。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶的纯化与结晶:将脂肪酶溶于 5 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.0,并在 4℃ 1 2000 × g 离心 20 min,取上清液上 DEAE-Sephadex A-50 离子层析柱,用 0%~75% 的氯化钠洗脱,并脱盐、浓缩^[1]。酶蛋白的结晶采用气相扩散法^[2],2-甲基-2,4-戊二醇作沉淀剂,制备的酶蛋白微晶体大小均一。

1.2.2 脂肪酶交联酶晶体的制备:采用戊二醛对酶晶体进行交联,控制戊二醛浓度、pH 值、温度等交联条件,以磁力搅拌器进行搅拌,并用大量蒸馏水冲洗、离心来中止交联^[3]。

1.2.3 脂肪酶活力的测定:F.I.P 测定法。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶结晶条件的筛选

脂肪酶经离子交换层析、脱盐、浓缩,酶液的蛋白浓度为 24.67 mg/mL,酶活力为 1976 μmol/(min·mg)。本研究采用透析平衡法、气相扩散法等方法进行脂肪酶结晶,在结晶条件的粗筛时,透析平衡法根本无法制备出脂肪酶微晶体,而气相平衡法是通过沉淀剂和挥发剂共同挥发,与脂肪酶的溶液平衡,使溶液中脂肪酶蛋白缓慢达到过饱和状态,通过镜检发现有微量的微晶体产生。本研究对气相平衡法

* 国家自然科学基金项目(No.297767021)。

收稿日期:1998-04-06,修回日期:1999-04-01。

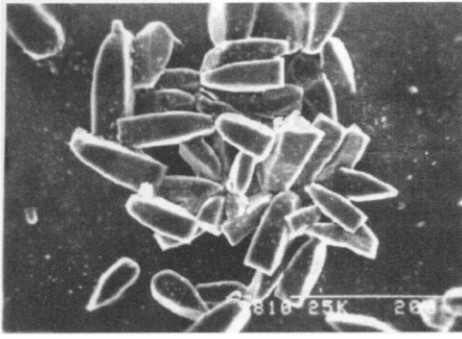


图1 *Candida rugosa* 脂肪酶晶体电子显微镜图

构是必要的。目前许多双功能试剂被用于化学交联,戊二醛是其中应用最为普遍的一种。

2.2.1 戊二醛的浓度:分别以总浓度 0.25%~2.5% 的交联剂进行试验,在交联过程中酶晶体相对于整个反应体系蛋白浓度为 34 mg/mL (图2)。如图2所示,戊二醛浓度为 1% 时合适。当戊二醛浓度小于 1% 时,制备的交联酶晶体放置缓冲液中过夜,部分酶晶体溶解,导致交联酶晶体的活力损失。

2.2.2 交联反应的 pH:在不同的 pH 条件下,戊二醛浓度为 1% 交联 60min 的结果如表 1。

由表 1 看出,在较低 pH 条件下进行交联时,对酶活力有一定影响,而在较高 pH 条件下交联时酶活力不受损失。

2.2.3 交联反应的时间和温度:参考固定化酶的交联时间,一般控制在 30~90 min。结果表明,在戊二醛浓度 1%、交联时间控制在 60 min,交联酶晶体的机械强度较好,对酶活影响不明显,但交联时间短,交联酶晶体在缓冲液中会发生溶解,导致酶活损失。

本研究分别在 28℃ (室温)、40℃、60℃ 进行交联酶晶体的实验结果看出在试验范围内交联温度对酶活影响不大。

2.3 脂肪酶交联酶晶体对温度、pH 的稳定性

将脂肪酶交联酶晶体置于 pH7.0 缓冲液中,在不同温度下处理 1 h,然后按常规测定酶活,交联酶晶体在 60℃ 以下稳定。在考察其对 pH 值的稳定性时,置于不同 pH 值的缓冲液,温度 40℃,处理 1 h 测定其酶活,交联脂肪酶晶体在 pH4~9 的范围内保持稳定。可见交联酶晶体有较好的稳定性。

表 1 交联时 pH 对交联酶晶体活力的影响

pH	Activity/ $\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$
4.0	1652
4.5	1746
5.0	1823
5.5	1838
6.0	1861
7.0	1885

的沉淀剂,2-甲基-2,4-戊二醇+2-丙醇、PEG(4000,6000,8000)+2-丙醇等作了对比,2-甲基-2,4-戊二醇+2-丙醇作为脂肪酶结晶的沉淀剂效果较好,结晶时间短,晶体粒子大,可满足交联酶晶体制备的要求,又可解除反应中的扩散限制。

在 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH5.0~7.0 条件下,沉淀剂 2-甲基-2,4-戊二醇浓度从 30%~90% 之间都有酶晶体生成,其中在 pH5.0~5.5、沉淀剂浓度 40% 的条件下,酶晶体生成量大,酶晶体粒子的大小均一,约在 $30\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$ 左右,如图 1。

2.2 脂肪酶晶体的交联条件

分子交联在不同于结晶介质的环境中保持晶体结

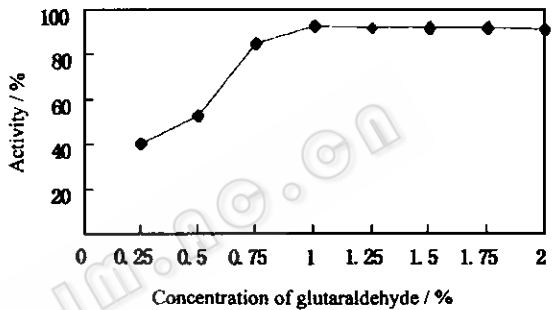


图2 戊二醛浓度对脂肪酶交联酶晶体活性的影响

2.4 脂肪酶交联酶晶体在有机溶液中的稳定性

将脂肪酶交联酶晶体置于 50% 的四氢呋喃和二甲基亚砜有机溶液中,25℃,放置一定时间对交联酶晶体进行活力测定(如图 3)。而液态脂肪酶在 50% 四氢呋喃中的半衰期为 2 h,在 50% 二甲基亚砜中的半衰期为 18h。如图 3 所示,交联脂肪酶晶体在这两

种 50% 的水溶性有机溶液中 5 d, 酶活损失较小。

交联酶晶体催化剂稳定性增加的原因主要是物质的晶体状态和酶分子的化学键交联的结果。在晶体晶格中, 蛋白质浓度接近理论极限, 大量蛋白之间发生反应。当一个蛋白从溶液环境转变成晶体环境蛋白质分子中静电反应和疏水反应数量增加, 从而明显增强了蛋白质的稳定性(对热、变性质、聚集和解离)^[4]。通过戊二醛或其它交联剂对蛋白质分子内交联可能导致蛋白质抗热性的增加, 虽然现在对其机理了解较少, 但交联度优化程度显示其依赖蛋白质特性和晶体形式^[3]。

目前较流行的稳定化方法是酶固定化方法, 原理上是由于酶与载体的互补表面提供多点连从而把它的自然构象固定下来, 酶的固定化应用范围较广, 但是它自身并不能保证酶的稳定性, 而且产生新的问题——其酶的载容量低, 在典型的固定化制备中其酶量仅占 5% 的重量百分比, 所以固定化酶的单位重量酶的比活较低, 在合成反应中很少获得较高的反应速率^[3]。而交联酶晶体不需要载体, 其比活力高于固定化酶, 作为有机合成的生物催化剂有着广阔的前景。

3 结 论

Candida rugosa 脂肪酶采用气相扩散法进行结晶, 沉淀剂为 2-甲基-2, 4-戊二醇 + 2-丙醇, 2-甲基-2, 4-戊二醇浓度在 40% 之间制备的酶晶体量大、晶体粒子尺寸大小均一约 30 μm × 60 μm 。

本研究采用戊二醛交联脂肪酶晶体, 对其交联条件进行优化, 其最佳条件为: 酶蛋白浓度 34 mg/mL 时, 戊二醛 1%、pH7.0、交联时间 60 min 和温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 。研究还确认交联酶晶体在 60 $^{\circ}\text{C}$ 以下、pH4~9 范围时, 交联酶晶体稳定。而且, 交联酶晶体在 50% 的四氢呋喃、丙酮、二甲基亚砜有机溶液中放置 5 d 后, 其酶活力未见损失。

参 考 文 献

- [1] Sol Montero, Alicia Blanco *et al.* *Enzyme Microb. Tech.*, 1993, 15(3):239~247.
- [2] P. Grochulski, L. Yunge *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1993, 268:12843~12847.
- [3] N. L. St. Clair., M. A. Navia. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114:7314~7316.
- [4] Nazaer Khalaf, Chandrika. P. Qovardhan *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:5494~5495.

Studies on the Preparation of Cross-linked Crystals of Lipase from *Candida rugosa*

Pan Li Lin Weitie Yao Ruhua

(South China Univ. of Tech. Guangzhou 510641)

Abstract The cross-linked crystal of enzyme is a new kind of biocatalyst. This paper dealt with that crystals of lipase from *Candida rugosa* were obtained with vapor diffusion balance and cross-linked with 1% glutaraldehyde. It not only maintains the characteristics of enzyme but also improve the stability of enzyme. No loss of activity of cross-linked crystal lipase was in miscible organic solvents after five days.

Key words *Candida rugosa* lipase, cross-linked crystal of enzyme, stability

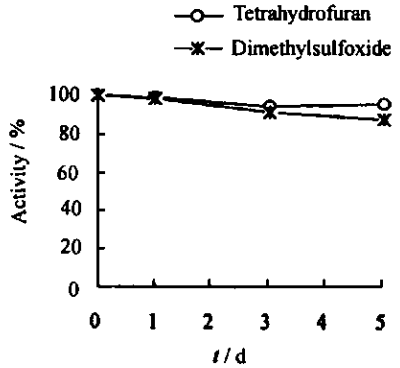


图3 *Candida rugosa* 脂肪酶交联酶晶体在有机溶液中的稳定性