

基于聚乙烯醇/ Fe_2O_3 纳米颗粒的 纤维素酶固定化

廖红东, 袁丽, 童春义, 朱咏华, 李杜, 刘选明
(湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 长沙 410082)

摘要 以聚乙烯醇/ Fe_2O_3 磁性纳米颗粒为纤维素酶固定化载体, 通过反复冻融的方法成功地实现了纤维素酶固定化. 采用透射电镜、红外光谱仪、振动样品磁强计对固定化酶复合体进行了表征, 结果显示, 固定化酶复合体为大小约 $1\ \mu\text{m}$ 的微凝胶团, 内含 $10\ \text{nm}$ 左右的 Fe_2O_3 纳米颗粒. 研究影响固定化因素后发现, 当 pH 为 6, 固定化时间为 11 h, 纤维素酶/PVA 质量比为 4, PVA/Fe 质量比为 50 时, 固定化纤维素酶效果最好. 通过该方法固定后酶活回收率达 42%, 酶水解效率显著提高, 经过 5 次反应后的固定化酶相对酶活力保留 50% 以上. 因此, 基于聚乙烯醇/ Fe_2O_3 纳米颗粒的纤维素酶固定有利于酶的循环使用并显著提高酶的使用效率, 是一种有效固定化纤维素酶的新方法.

关键词 纤维素酶; 固定化; 聚乙烯醇; Fe_2O_3 纳米颗粒

中图分类号 Q595

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)08-1564-05

纤维素酶可用于将纤维素转化为可发酵糖, 进而生产燃料乙醇. 由于天然纤维素酶多为一次性直接使用, 使用成本高, 阻碍了该转化过程的工业化^[1]. 采用纤维素酶的固定化, 有利于酶的回收和再利用, 有望解决该酶生产应用的实际问题.

现有纤维素酶的固定方法多是通过双功能试剂将纤维素酶化学交联在固体载体上, 从而提高了纤维素酶的稳定性和重复使用率^[2,3]. 由于纤维素酶的底物是水不溶性的, 将纤维素酶直接化学交联在固体载体上不仅损害酶蛋白活性, 而且交联在固体载体上的纤维素酶难以与底物充分接触来发挥催化效率, 导致这种纤维素酶固定化方法在应用上受到限制. 水溶性载体与物理交联的方法有利于解决这些问题, Amritkar 等^[4]用水溶性载体固定脂肪酶, 使该固定化酶水解橄榄油能力比游离脂肪酶提高 4 倍; Carla 等^[5]用水溶性载体固定蛋白酶处理羊毛纤维表面, 取得较高的酶活力和重复使用性.

聚乙烯醇(PVA)是一种富含羟基的水溶性高分子化合物, 能与含羟基物质产生物理交联作用. 经过反复冻溶后, PVA 与富含羟基的纤维素酶(纤维素酶的中间部位含有相对密集的、带有羟基的丝氨酸和苏氨酸以及多糖)可形成柔性连接固定; 同时, PVA 丰富的羟基对纤维素酶也起着良好的稳定作用^[6]. 纤维素酶的水解效率常与纤维素酶的吸附和解吸附有关, 水溶性载体固定化纤维素酶在催化时常大量地被牢牢吸附在纤维素残基表面, 影响了固定化酶的效力和重复作用^[7]. Fe_2O_3 纳米颗粒具有高表面能等特性, 能较好地固定 PVA 和纤维素酶等高分子物质^[8]. 同时, 如果水溶性载体中含有 Fe_2O_3 纳米颗粒将有可能使固定化酶具有超顺磁性, 从而在磁场的作用下与纤维素残基分离^[9]. 针对上述固体载体使酶效率低下、水溶性载体又使纤维素酶与纤维素残基难以分离的难题, 本文采用 PVA/ Fe_2O_3 磁性纳米颗粒作为固定纤维素酶的载体, 通过反复冻融的方法, 在形成复合载体的同时利用物理交联作用将纤维素酶固定, 并对固定化酶的特点和固定化效果及一些影响因素进行分析, 以期提供一种固定化纤维素酶的新方法.

收稿日期: 2008-01-21.

基金项目: 湖南省农业生物纳米技术重大专项基金(批准号: 03NKY1001)和湖南省科技计划项目基金(批准号: 2007FT3103)资助.

联系人简介: 刘选明, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生化分析与分子生物学研究. E-mail: sw_xml@hnu.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

纤维素酶 R-10 购于北京鼎国生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; 化学试剂均为国产分析纯, PVA 为化学纯(聚合度 1750, 醇解度 98%); 水为超纯水.

NEXUS 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 仪器公司); 紫外-可见分光光度计 756P(上海光谱仪器有限公司); JEM-1230 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); Zetasizer 3000Hs 纳米粒度及电位分析仪(英国马尔文公司).

1.2 实验方法

1.2.1 Fe₂O₃ 纳米颗粒的制备 Fe₂O₃ 纳米颗粒的制备方法参见文献[10].

1.2.2 物理交联固定化纤维素酶 取一定量透析平衡的 Fe₂O₃ 纳米颗粒, 加入含质量分数 0.5% PVA 的 25 mg/mL 纤维素酶液中, 于 4 °C 下搅拌 10 h, 再于 -60 °C 快速冷冻. 冰上解冻, 反复冻融 2 次, 加入 NaCl(终浓度为 0.5 mol/L)沉降, 用磁铁吸附分离后, 用超纯水多次冲洗, 冷冻干燥, 于 4 °C 保存. 若用于纤维素酶的检测, 用 0.05 mol/L pH=4.5 的柠檬酸钠缓冲液分散溶解.

1.2.3 固定化酶物理性质表征 利用透射电镜和 zeta 电位仪对纳米颗粒和微凝胶的形貌和分布进行检测; 纤维素酶的物理交联状况通过红外光谱仪检测. 固定化酶的磁学性质通过振动样品磁强度计来检测.

1.2.4 酶活力的测定 参照文献[11]中的方法以滤纸酶活性来评价纤维素酶的活力. 酶活力单位的定义: 在 50 °C、pH=5.0 条件下, 1 h 分解滤纸产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位, 用 U/mg 表示. 固定化酶的酶活力为每毫克固定化的纤维素酶蛋白的滤纸酶活力.

酶活回收率 = (固定化酶的活力/具有相同酶量的游离酶的活力) × 100%.

1.2.5 蛋白含量的测定 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定溶液中的蛋白质含量, 其中磁性固定化酶蛋白含量为固定前溶液中蛋白量减去固定后溶液和洗涤液中蛋白含量.

1.2.6 Fe 含量的测定 Fe 含量的测定按照文献[12]方法进行, 用 $r = m(\text{PVA})/m(\text{Fe})$ 来表示 PVA 和 Fe₂O₃ 的质量比.

2 结果与讨论

2.1 固定化酶复合体表征

2.1.1 Fe₂O₃ 纳米颗粒和固定化酶复合体透射电镜表征 采用透射电镜(TEM)对 Fe₂O₃ 纳米颗粒及其固定化酶复合体进行表征. 图 1(A)显示所制备的 Fe₂O₃ 纳米颗粒分散性较好, 大小在 10 nm 左右, 表明所制备的 Fe₂O₃ 纳米颗粒将会具有超顺磁性. 从图 1(B)可以看出, 经过吸附和反复冻溶等处理后, Fe₂O₃ 纳米颗粒与 PVA、纤维素酶形成 1 μm 左右的类似凝胶团的固定化酶复合体, 这种微小凝胶团结构能使被固定化纤维素酶更具有柔性, 容易与纤维素接触而发挥效能.

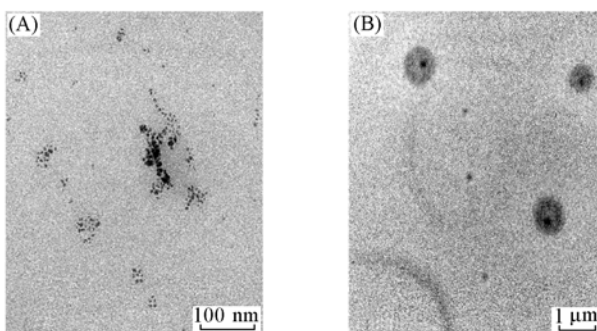


Fig. 1 TEM images of Fe₂O₃ nanoparticles(A) and immobilized cellulase complex(B)

2.1.2 固定化酶复合体的红外光谱

分析 对在柠檬酸缓冲液中分散的冻

融形成的固定化酶复合体进行了红外光谱分析. 由图 2 谱线 a 可见, 由于柠檬酸存在, 1674.5 和 1584 cm⁻¹呈现出 C=O 的伸缩振动峰. 在加入纤维素酶后(图 2 谱线 b), 由于酰胺基的影响, 在 1647.5 cm⁻¹处合并为更尖锐的峰^[13]. 由于 3458.0 cm⁻¹为 Fe₂O₃ 纳米粒子表面的—OH 伸缩振动吸收峰, 加入 PVA 和纤维素酶后, 由于纤维素酶中 N—H 键的影响, 3458.0 cm⁻¹处的吸收峰变宽, 强度减弱^[6],

表明经过反复冻融后 Fe_2O_3 纳米颗粒、PVA 和纤维素酶可以形成固定化酶复合体, 分离后的复合体含有纤维素酶活性也证实了这一点.

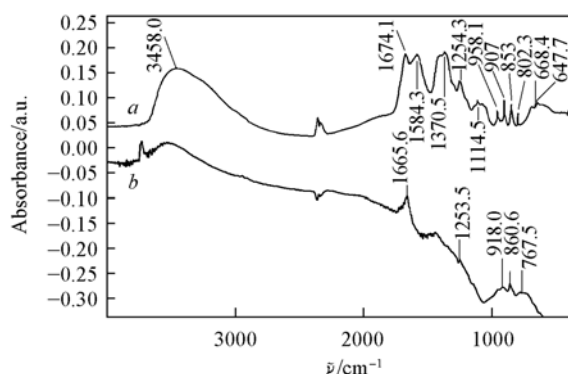


Fig. 2 IR spectra of Fe_2O_3 nanoparticle (a) and immobilized cellulase complex after cyclic freezing-thawing process (b) in citric acid buffer

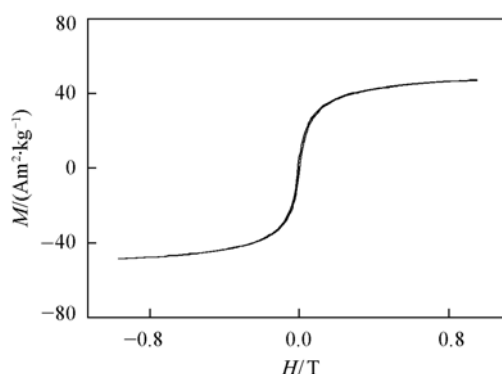


Fig. 3 Hysteresis loop of immobilized cellulase complex

Saturated magnetization strength: $47.55 \text{ Am}^2/\text{kg}$.

2.1.3 固定化纤维素酶复合体磁学性质分析 利用振动样品磁强计对固定化纤维素酶复合体进行磁学特性分析(图3). 磁滞回归线显示其饱和磁化强度分别为 $47.55 \text{ Am}^2/\text{kg}$, 矫顽力为 3184 A/m . 表明 Fe_2O_3 纳米颗粒给固定化酶复合体带来超顺磁性, 可在外加磁场作用下分离. 由于纤维素以单一的基元链进入隧道状的酶活性中心被纤维素酶降解, 因而纤维素酶对纤维的吸附与解吸作用非常重要^[14], 带有超顺磁性的固定化纤维素酶将有可能提高纤维素酶吸附和解吸附效率, 改善其酶活力.

2.2 固定化条件对固定化纤维素酶活力的影响

2.2.1 PVA 与纤维素酶的质量比对于固定化纤维素酶活力的影响 如图4(A)所示: 随着纤维素酶/PVA 质量比的逐步增加, 酶活回收率也逐渐增大; 当纤维素酶/PVA 质量比为4时(纤维素酶质量浓度为 20 mg/mL , PVA 质量分数为 0.5%), 酶活回收率达到最高, 酶效发挥最好. 在固定化酶复合体中, PVA 在纤维素酶和 Fe_2O_3 纳米颗粒之间起着类似一个桥梁和粘合剂的作用. 当纤维素酶/PVA 质量比为4时, 结合在固定化复合体表面的纤维素酶比例很可能最多, 因而滤纸酶活回收率达最高.

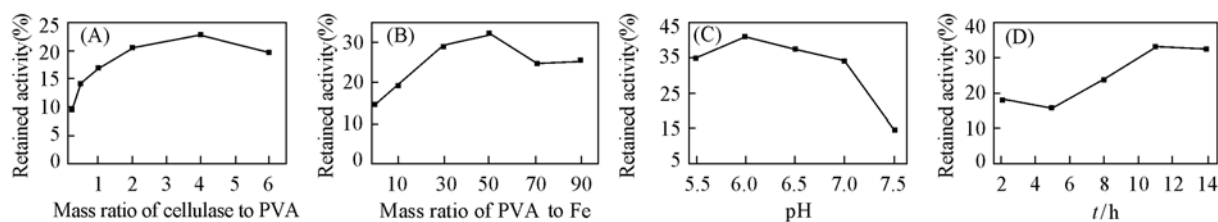


Fig. 4 Effects of mass ratio of PVA to cellulase(A), mass ratio of PVA to Fe(B), pH(C) and immobilized time(D) on the retained activity of immobilized cellulase

2.2.2 PVA 与 Fe_2O_3 纳米颗粒的质量比对固定化纤维素酶活力的影响 在水溶液体系中, 结合在 Fe_2O_3 纳米颗粒上的 PVA 层的厚度和方式与 PVA/ Fe_2O_3 纳米颗粒的质量比 r 有关^[11]. 对不同 r 值条件下固定化纤维素酶的酶活回收率进行研究, 结果显示, 当 $r=50$ 时酶活残留率最高[图4(B)], 表明在该条件下进行吸附冻融固定化纤维素酶效果最好. 此外, 当 $r=0$ 时, 固定在 Fe_2O_3 纳米颗粒上的酶活力回收率达 14.3% , 说明单独的 Fe_2O_3 纳米颗粒对纤维素酶也有较强的吸附固定作用.

2.2.3 pH 和固定化时间对固定化纤维素酶活力的影响 pH 对固定化纤维素酶酶活回收率的影响曲线[图4(C)]表明, Fe_2O_3 纳米粒子和纤维素酶表面电荷对结合过程有很大的影响. Fe_2O_3 纳米粒子在 pH 值为 4.5 时的柠檬酸缓冲液中带正电荷. 纤维素酶是一种酸性酶, 各组分的等电点范围为 $\text{pH} = 3.5 \sim 5.0$, 所以在 pH 大于 5.0 时, 纤维素酶呈现负电性. 合适的电荷性将使 Fe_2O_3 和纤维素酶更容易接近, 提高了固定化效果. 从图4(C)可以看出, 当 $\text{pH} = 6.0$ 时, 固定化纤维素酶的酶活回收率达到最高.

固定化时间对固定化纤维素酶酶活回收率的影响曲线[图4(D)]表明, 在固定化 11 h 后酶活回收

率基本达到最高, 随着时间的延长反而有轻微下降. 这可能是由于过长时间固定造成凝胶团的过大, 进而影响固定化酶的活力.

2.3 固定化对酶的效率和稳定性的影响

2.3.1 酶固定化后的活力特征 PVA 溶液在反复冻融条件下能够通过物理交联作用形成水凝胶^[15]. 磁纳米颗粒表面能有效地吸附水溶液中游离的 PVA 和纤维素酶高分子链, 经反复冻融, 使 PVA 和纤维素酶在磁纳米颗粒表面物理交联而被“固定”至 Fe_2O_3 纳米颗粒上形成含 Fe_2O_3 的 PVA 凝胶复合体. 该复合体在 $\text{pH} = 4.5$ 和 0.5 mol/L 柠檬酸缓冲液中能均匀分散, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下静止 2 h 能缓慢凝集, 振荡后又能再次均匀分散. 适当条件固定化前、后的蛋白含量的比较显示(表 1), 大约有 66.1% 酶蛋白被固定化, 固定化酶单位蛋白的滤纸酶活力为 0.801 U/mg , 为起始酶液滤纸酶活性的 63.5% , 即经过冻融固定后, 固定化酶活力回收率可达 42% . 固定化酶活力的损失可能是由于部分酶蛋白被包裹在凝胶内, 不能与纤维素充分接触而造成的.

Table 1 Content and specific activity of cellulase in pre-bound solution and immobilized cellulase

Method	Pre-bound solution	Supernatant and washing solution	Immobilized cellulase
Mass of cellulose/mg	12.5	4.24	8.26
Specific activity/ $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$	1.261	1.272	0.801

为了考察冻融对酶活力的影响, 比较了在质量分数为 0.5% 的 PVA 存在条件下, 反复冻融前后纤维素酶活力的差异, 结果显示冻融后酶活力为冻融前的 96.5% , 表明反复冻融方法对纤维素酶活力影响较小. 从固定后上清液和洗涤液的比酶活还可以看出, 冻溶法对未固定的游离纤维素酶单位蛋白酶活力基本没有影响, 完全可以用于下次固定, 提高固定效率.

2.3.2 对酶的水解效率的影响 纤维素水解曲线[图 5(A)]的走向说明了固定化纤维素酶能够保持在很长一段时期里催化纤维素的水解. 用相同单位的固定化酶和游离酶来催化纤维素的水解, 28 h 后固定化酶比游离酶更高效. 加入更高活力单位(0.24 U)的游离酶时(相当于固定化酶单位 0.1 U 的酶蛋白量), 游离酶最初的水解速率要大一些, 但是 28 h 后固定化酶的效率更高些. 纤维素酶的酶解效率曲线并不是线性的, 而是随着反应的进行, 由于产物抑制、热钝化、反应液中气液接触面上的酶失活等原因而下降. 与游离纤维素酶相比, 固定化酶可能对上述原因的全部或部分不敏感, 从而显示固定化酶的长时间高催化效率. 固定化酶呈现出的短时较低酶活力回收率可能是由于许多酶分子不能接触到纤维素的表面所致, 随着时间的加长, 被固定化了的酶分子与纤维素充分接触, 酶活力会大大增加, 体现出比游离酶更高的催化效率和稳定性.

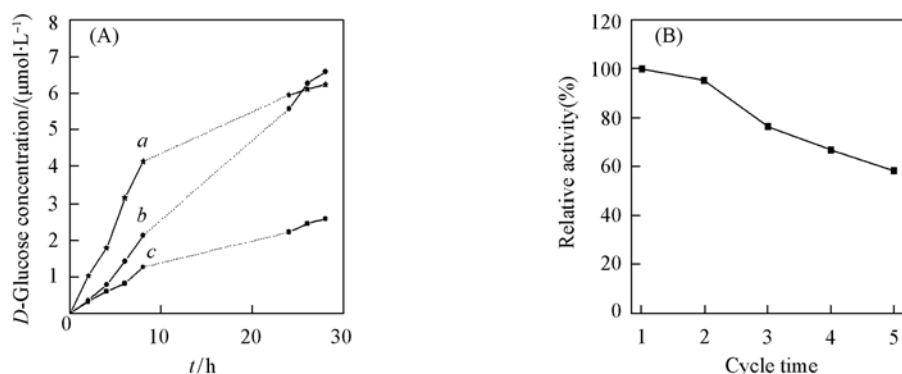


Fig. 5 Cellulose hydrolysis curves by free cellulase and immobilized cellulase(A) and the relative activity of immobilized in reused cycle(B)

a. 0.24 U free cellulase; b. 0.1 U immobilized cellulase; c. 0.1 U free cellulase.

2.3.3 固定化酶重复性 利用永磁铁分离反应后的固定化酶并进行多轮催化反应, 以第一轮反应固定化酶活力为参照, 检测每轮催化反应后固定化酶的相对酶活力. 结果显示[图 5(B)], 固定化酶在前两轮的相对酶活力降低幅度较小, 第 3 轮后逐渐增大. 相对酶活力的降低可能是纤维素酶和 PVA 在冻溶中产生的物理交联, 在多轮次、长时间、较高温度的催化条件下被打开, 从而使部分固定化的纤

纤维素酶解离、流失。此外,酶蛋白在反复催化过程中的失活也增加了酶活力的损失。但总体来说,经过5次反应后,固定化酶相对酶活力仍保留50%以上。常规的物理方法固定纤维素酶的重复性能力较低,5次重复使用后相对酶活力常在30%以下。采用电纺法用PVA固定化纤维素酶经过5次反应后,相对酶活力保持率为39%^[6]。即使采用脂质体化学交联法固定纤维素酶以微晶纤维为底物经过5次反应后,相对酶活力保持率也才能达到50%左右^[3],显示出以聚乙烯醇/Fe₂O₃磁性纳米颗粒为纤维素酶固定化载体比其它的固定化方法具有更高的重复使用性。

参 考 文 献

- [1] Kevin A. G., Lishan Z., Mark E., *et al.*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* [J], 2006, **10**: 141—146
- [2] Chengzhou L., Makoto Y., Kimitoshi F., *et al.*. *Bioresour. Technol.* [J], 2007, **98**(7): 1366—1372
- [3] Ayse D., Azmi T. . *J. Mol. Catal. B: Enzym.* [J], 2007, **459**(2): 10—14
- [4] Amritkar C., Lali A. . *Enzym. Microb. Technol.* [J], 2002, **30**: 19—25
- [5] Carla J. S., Qinghua Z., Jinsong S. . *Enzym. Microb. Technol.* [J], 2006, **39**: 634—640
- [6] Lili W., Xiaoyan Y., Jing S., *et al.*. *J. Membr. Sci.* [J], 2005, **25**(2): 167—173
- [7] Mcstlartree M., liogan C. M., Saddler J. N. . *Biotechnol. Bioeng.* [J], 1987, **30**: 558—564
- [8] Shu B., Zheng G., Wei L., *et al.*. *Food Chem.* [J], 2006, **96**(1): 1—7
- [9] Bernhard S., Tobias N., Katja S., *et al.*. *J. Magn. Magn. Mater.* [J], 2005, **293**: 411—418
- [10] van Ewijk G. A., Vroege G. J., Philipse A. P., *et al.*. *J. Magn. Magn. Mater.* [J], 1999, **20**(1—3): 31—33
- [11] Mirjam A. K., Marc J. E., Gert K., *et al.*. *Biotechnol. Bioeng.* [J], 2006, **93**(1): 56—63
- [12] CAI Bing-Xin(蔡炳新), CHEN Yi-Wen(陈贻文). *Basic Chemical Experiments(基础化学实验)* [M], Beijing: Science Press, 2001: 320—323
- [13] Kuptsov A. H., Zhizhin G. N. . *Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers* [M], Amsterdam: Elsevier, 1998: 71—72
- [14] Daniel J. C. . *Nature* [J], 2005, **6**: 850—861
- [15] WU Xu-Ye(武旭业), HUANG Shi-Wen(黄世文), ZHANG Jian-Tao(张建涛), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)* [J], 2004, **25**(2): 382—384

Immobilization of Cellulase Based on Polyvinyl Alcohol/Fe₂O₃ Nanoparticles

LIAO Hong-Dong, YUAN Li, TONG Chun-Yi, ZHU Yong-Hua, LI Du, LIU Xuan-Ming*

(*Bioenergy and Biomaterial Reseach Center, Institute of Life Science and Biotechnology, Hunan University, Changsha 410082, China*)

Abstract To improve the enzyme activity and reusability, a new soluble, easy separated carrier was made to immobilize cellulase. The immobilized cellulase based on polyvinyl alcohol/Fe₂O₃ nanoparticles was prepared with cyclic freezing thawing process. Analytic data from TEM, IR and VSM detection suggest that the average diameters of immobilized cellulase complexes were 1 μm, which contained about 10 nm Fe₂O₃ naoparticle. The factors affecting the activities of immobilized cellulase were researched. The activity retention of immobilized cellulase was achieved as 42% under the optimum conditions: pH = 6.0, mass ratio of cellulase to PVA is equal to 4, mass ratio of PVA to Fe is equal to 50, 11 h for immobilization. The immobilized cellulase exhibited greater efficiency than free one and retained 50% relative activity after five times of cycled reuse, which indicates that this novel method of immobilization could be propitious to cellulase reuse and efficiency improvement.

Keywords Cellulase; Immobilizatoin; Polyvinyl alcohol; Fe₂O₃ naoparticle

(Ed.: H, J, Z)