

海藻酸钙凝胶包埋乳酸氧化酶 催化 DL 乳酸生产丙酮酸

王 艳* 姚莉丽 周 林 代 珊

(中南大学化学化工学院 长沙 410083)

摘 要 研究了用海藻酸钠包埋、戊二醛交联法固定耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium Smegmatis*) 生成乳酸氧化酶的最佳条件, 比较了原酶与固定化酶的酶学性质。将 1 mL 酶液和 1 mL 质量分数为 3% 的海藻酸钠溶液的混合液, 用注射器滴加到 20 mL 0.2 mol/L 的 CaCl_2 溶液中, 25 °C 静置固化 2 h 后, 过滤洗涤, 将固体转移至 20 mL 质量分数为 0.2% 戊二醛溶液中 37 °C 交联 2 h 后, 过滤、洗涤和干燥得到球状固定化酶。固定化酶的活力回收率为 39.8%。酶学性质研究表明, 此固定化酶的热稳定性较好, 游离酶在 65 °C 保温 1 h 酶蛋白完全变性失活, 而固定化酶在 65 °C 保温 1 h 仍可保持 86% 的酶活力; 其最适酶促反应温度可由 37 °C 升至 55 °C, 最适反应 $\text{pH}=7.4$ 保持不变; 在不加保护剂的条件下, 4 °C 放置 50 d 后游离酶仅保持 40% 以上的酶活力, 而固定化酶能保持 80% 以上的酶活力。该固定化乳酸氧化酶用于催化氧化 DL 乳酸生产丙酮酸, 3 h 后丙酮酸产率可达 75%, 连续循环使用 5 次固定化酶活力仍保持 85%。

关键词 海藻酸钠, 固定化, 乳酸氧化酶, 生物催化

中图分类号: O629.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2008)04-0489-05

乳酸氧化酶 (EC1.1.3.2) 能催化 DL 乳酸氧化成丙酮酸。丙酮酸是一种重要的医药中间体和化工原料。丙酮酸的生产方法主要有化学合成法、发酵法和生物催化法。化学合成法制备过程不易控制, 原料成本较高, 废物不易处理; 发酵法生产丙酮酸往往转化效率较低, 丙酮酸在糖代谢中处于最具活力的中间点, 在细胞中很容易转化为其它化合物, 因此很难累积; 而乳酸氧化酶催化 DL 乳酸生产丙酮酸则克服了上述 2 种方法的诸多缺点, 且 DL 乳酸和丙酮酸的价格相差约 20 倍, 采用乳酸氧化酶催化 DL 乳酸生产丙酮酸成为当前的研究热点之一^[1,2]。与游离酶相比固定化酶具有稳定性更高, 可分离回收重复使用和生产成本低等一系列优点。国内外关于乳酸氧化酶的固定化方法多采用共价结合法将乳酸氧化酶固定在某一载体上制备成乳酸氧化酶酶膜, 应用于酶电极和生物传感器领域^[3~9]。本文首次采用海藻酸钠包埋, 戊二醛交联的方法固定化耻垢分枝杆菌乳酸氧化酶, 优化了固定化工艺条件, 研究了固定化酶的部分酶学性质, 并初步探讨了其在催化 DL 乳酸生产丙酮酸中的应用。

1 实验部分

1.1 乳酸氧化酶的制备及其酶活测定方法

将耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium Smegmatis* AS1.0562 购自中科院微生物研究所) 进行增菌诱导培养后, 超声波细胞破壁、冷冻高速离心获得乳酸氧化酶粗酶液, 再经质量分数为 30% ~ 70% 饱和度的硫酸铵分级沉淀及透析脱盐后, 用 Sephadex G-150 柱层析, 得到实验用酶液, 初步纯化后酶活由 88.6 U/mL 上升至 147.0 U/mL。

参考文献 [10] 对游离乳酸氧化酶进行活力测定, 在试管中加入 $\text{pH}=7.4$ 磷酸盐缓冲液 0.5 mL, 20 mmol/L DL 乳酸溶液 0.2 mL, 酶液 0.3 mL (空白管不加), 37 °C 水浴保温 10 min 然后加入 1 mmol/L 2,4-二硝基苯肼 0.5 mL, 37 °C 水浴保温 20 min 后, 加入 0.04 mol/L NaOH 溶液 5 mL 终止反

2007-04-26 收稿, 2007-06-26 修回

通讯联系人: 王艳, 女, 副教授; E-mail: wy.csu@mail.csu.edu.cn 研究方向: 生物化工、药物分析

应(空白管此时补加 0.3 mL 酶液),在波长 520 nm 比色,通过标准曲线计算酶活力^[11]。规定 1 mL 催化 DL 乳酸生成 1 mmol 丙酮酸的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2 乳酸氧化酶的固定化

将 1 mL 酶活力为 147.0 U/mL 的酶液和 1 mL 质量分数为 4% 的海藻酸钠溶液混合后,用注射器滴到 20 mL 0.2 mol/L 的 CaCl_2 溶液中,25 °C 静置固化 2 h 过滤洗涤,加入到 20 mL 质量分数为 0.2% 的戊二醛溶液中 25 °C 交联 2 h 过滤、洗涤和干燥后得到颗粒状固定化酶。

以 0.1 g 固定化乳酸氧化酶取代游离酶,按游离酶的活力测定方法测定固定化乳酸氧化酶的活力。酶的活力回收率是指固定化酶活力与用于固定化的溶液酶活力之比(%)。固定化酶的相对活力是指单因素条件下测得各组固定化酶活力与该条件下固定化酶的最高活力之比(%)。

1.3 固定化酶包埋率的测定

构成蛋白质的某些氨基酸(如色氨酸、苯丙氨酸等)在紫外区具有吸收峰,通过对乳酸氧化酶磷酸缓冲溶液的全波长扫描发现其最大吸收峰在 260 nm。将固定化酶颗粒用 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸缓冲溶液泡 12 h 以上,剧烈搅拌破坏颗粒,离心分离,取上层清液测其在 260 nm 处的吸光度,而用于固定化的游离酶按相同比例稀释后测其在 260 nm 处的吸光度,二者之比即为海藻酸钙凝胶包埋的蛋白质的含量。

1.4 固定化乳酸氧化酶催化 DL 乳酸生产丙酮酸

取一定量的固定化乳酸氧化酶,加入 5 mL $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液,2 mL 20 mmol/L DL 乳酸溶液,55 °C 恒温水浴,振荡速度 120 r/min 每隔 20 min 取样,采用紫外分光光度法测定 320 nm 吸光度计算丙酮酸浓度^[12]。每次反应后,将固定化酶过滤洗涤,重复操作 5 个批次。考察固定化酶的循环使用稳定性。

2 结果与讨论

2.1 乳酸氧化酶固定化条件的优化

选择对实验影响较大的 6 个因素即:海藻酸钠浓度,氯化钙浓度,固定化时间,戊二醛浓度,交联温度及交联时间。每个因素设 5 个水平,按正交设计表 $\text{L}_{25}(5^6)$ 安排实验,进行 25 次实验的结果可以看出,第 12 组实验制备的固定化酶的活力为 55.7 U/mL 明显高于其他 24 组,活力回收率达到 37.8%。通过极差分析(R)得到影响因素显著性的顺序为: ω (海藻酸钠)/% > 固定化时间/h > κ (氯化钙)/% > ω (戊二醛)/% > 交联温度/°C > 交联时间/h 通过比较 k 值选出优化水平组合,而此条件恰好不包含在已做过的 25 次实验中,按此条件进行确认试验,测得固定化酶酶活为 58.5 U/mL,固定化酶的活力回收率为 39.8%。综合以上结果得固定化最佳条件为:质量分数为 3% 海藻酸钠,0.2 mol/L 氯化钙,固定化时间 2 h 质量分数为 0.2% 戊二醛,交联温度 37 °C,交联时间 2 h 其中,包埋剂海藻酸钠浓度和固定化时间的影响最为显著。

实验发现,海藻酸钠浓度偏低时,酶泄漏严重,清洗酶珠时,酶损失较多,酶活力下降;海藻酸钠浓度偏高时,微环境效应和扩散阻力对反应影响很大,且不易操作,很难将酶液从注射器中挤出。因此,选用质量分数为 3% 的海藻酸钠对酶进行固定化较为适宜。 CaCl_2 浓度小于 0.1 mol/L 时,造粒效果不理想,颗粒状固定化乳酸氧化酶机械强度偏小,抽滤时容易塌陷变形,乳酸氧化酶包埋不完全; CaCl_2 浓度过大时,高浓度的 Ca^{2+} 对乳酸氧化酶活性有抑制作用。戊二醛作为一种双功能交联剂,可以使海藻酸钠分子发生交联,同时也能使酶交联在载体上,能够增强海藻酸钠的机械强度和固定化酶的稳定性。戊二醛浓度过低,会使载体与乳酸氧化酶结合不稳定,进而影响酶的重复利用,相反,戊二醛浓度过高,酶分子活性基团被戊二醛过多修饰会使乳酸氧化酶部分变性,进而影响酶的活力;当固定化时间为 2 h 时,固定化酶活力最高,固定化时间过短或过长,固定化酶活力均有不同程度的下降。固定化酶的活性受到 2 个方面的综合影响,一方面随着固定化时间的延长,乳酸氧化酶固化越来越充分,酶在海藻酸钙凝胶中包埋得更牢固,有利于固定化酶活力的提高;另一方面,随着固定化时间的延长, Ca^{2+} 对固定化酶的抑制作用加剧,使酶活力下降,通过正交实验得到的最适固定化条件比较合理。在最佳固定化工艺条件下对乳

酸氧化酶进行固定化,测得酶在海藻酸钙中的包埋率为 46%。

2 2 固定化酶的性能

2 2 1 固定化酶的热稳定性 将固定化酶和游离酶在不同温度下保温 1 h测酶活力。图 1结果表明,酶经固定化后,热稳定性显著提高,游离酶在 65 ℃保温 1 h酶蛋白基本上完全变性失活,而固定化酶在 65 ℃保温 1 h仍可保持 86%的酶活力。这可能是由于酶与载体的结合影响了酶的稳定性,乳酸氧化酶经海藻酸钠包埋和戊二醛交联后,酶蛋白被固定在凝胶中,分子整体运动受到限制,阻挡了不利因素对酶的作用,增加了酶构型的牢固程度。

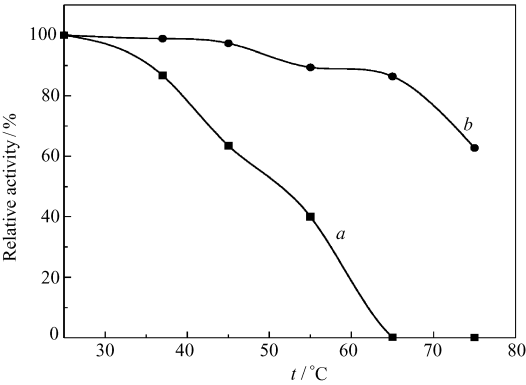


图 1 固定化酶的热稳定性图

Fig 1 Thermal stability of immobilized enzyme
a solution enzyme b immobilization enzyme

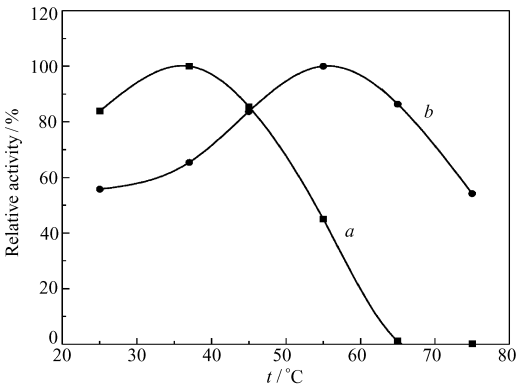


图 2 固定化酶的最适反应温度

Fig 2 Optimal reaction temperature of
immobilized enzyme
a solution enzyme b immobilization enzyme

2 2 2 固定化酶的最适反应温度 在 25 ~ 75 ℃温度下用固定化酶和游离酶催化 DL-乳酸产丙酮酸,其结果见图 2。游离酶的最适反应温度为 37 ℃,而固定化酶的最适反应温度上升至 55 ℃,乳酸氧化酶经固定化后最适反应温度的提高不仅能提高反应速度,同时可以防止外界微生物的污染,有利于酶的工业化应用。

2 2 3 固定化酶的最适反应 pH 固定化酶和游离酶在不同 pH值 (5.8、6.2、6.6、7.0、7.4、7.8、8.0)的磷酸盐缓冲液中反应后,测酶活力。结果如图 3所示,酶经固定化后,最高活性 pH值和游离酶的相同 (pH=7.4)。

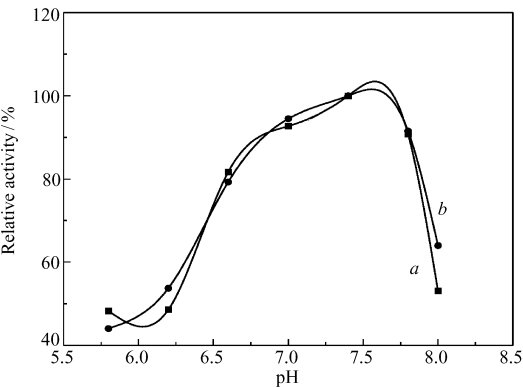


图 3 固定化酶的最适反应 pH

Fig 3 Optimal reaction pH of immobilized enzyme
a solution enzyme b immobilization enzyme

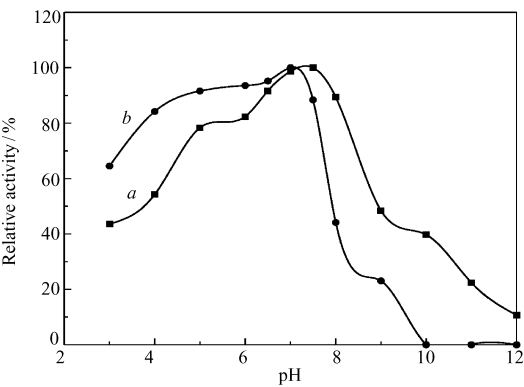


图 4 固定化酶的 pH稳定性

Fig 4 pH stability of immobilized enzyme
a solution enzyme b immobilization enzyme

2 2 4 固定化酶的 pH值稳定性 将固定化酶和游离酶置于不同 pH值 (3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的缓冲液中 37 ℃静置 1 h后,测定剩余酶活力。由图 4可以看出,游离

酶的 pH 值稳定范围为 6.5~8.0 固定化后稳定 pH 值为 5.0~7.5 pH 值稳定性范围变宽且向酸性方向移动。可能因为固定化酶颗粒在偏碱性环境中容易溶胀溶解,包埋的乳酸氧化酶发生泄漏,酶活力迅速降低。因此,海藻酸钠作为固定化酶的包埋载体其耐碱性能有待改进。

2.2.5 固定化酶的贮存稳定性 在不加任何保护剂的条件下,以 1 mL 游离酶固定化所得的固体颗粒与 1 mL 游离酶比较,将固定化酶和游离酶 4℃放置 50 d 后游离酶活力下降近 60%,而固定化酶活力下降<20%。固定化酶的贮存稳定性优于游离酶。

2.3 固定化乳酸氧化酶的应用

取 1 g 固定化乳酸氧化酶,按实验方法操作,将每次所取转化液样品用 NaOH 溶液调 pH=11.0 在波长 320 nm 处测定试样的吸光度,由标准曲线计算出试样中丙酮酸的质量浓度^[12],折算成丙酮酸产率。结果如图 5 所示,转化时间为 3 h 时,丙酮酸产率最高达 75%。每次反应后,将固定化酶过滤洗涤,反复使用 5 个批次后,固定化酶活力仍保持在 85%,显示了良好的操作稳定性。

采用 Ca²⁺ 固化海藻酸钠包埋、戊二醛交联的方法固定了耻垢分枝杆菌乳酸氧化酶,优化了固定化工艺条件。固定后的酶其耐热稳定性显著提高,相对游离酶在 65℃1 h 完全失活,固定化酶在 65℃1 h 仍保持 86% 的酶活力;其最适酶促反应温度由 37℃升至 55℃。该固定化乳酸氧化酶催化氧化 DL 乳酸生产丙酮酸,反应 3 h 丙酮酸的产率可达 75%,固定化酶的循环使用操作 5 次仍保持 85% 的酶活力,显示了良好的稳定性。乳酸氧化酶催化 DL 乳酸生产丙酮酸,不需外源辅酶,可降低成本,产物丙酮酸易于从生产中分离,有较好的应用前景。

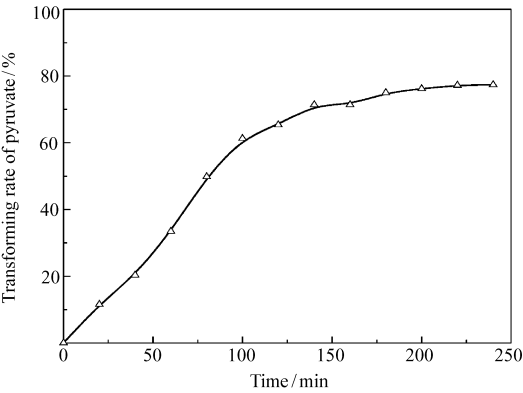


图 5 固定化酶催化 DL 乳酸生产丙酮酸
Fig 5 Transfer DL lactate to pyruvate catalyzed with immobilized enzyme

参 考 文 献

1 Gu J S Xu P Qu Y B J Mol Catal B Enzymatic J, 2002 18(4-6): 299
2 Gu J S Wang Y X Jiao Q Biochem Eng J J, 2005 22(2): 89
3 Hiroki Kanieko Hirotsuka Minagawa Jiro Shinada Biotechnol Lett J, 2005 27(22): 1 777
4 Suman S Singhal Rahul Shama Amit L Malhotra B D Pundir C S Sensors and Actuators B Chem J, 2005 107(2): 768
5 Stein Erich W McShane Michael J Transactions on Nanobiosci J, 2003 2(3): 133
6 Lillis B Grogan C Beme Y H Lane W A Sensors and Actuators B J, 2000 68(1): 109
7 Gulsev Aydin Serdar S Celebi Haluk Ozyoruk Atilla Yildiz Sensors and Actuators B J, 2002 87(1): 8
8 XNG Ke-Li(邢克礼), LIU Yan-Fan(刘延范), YN Li-Zhi(尹立志), Chem Sensors(化学传感器) J, 2005 25(4): 48
9 DENG Jian(邓健), LIAO Li-Fu(廖力夫), YUAN Ya-Li(袁亚莉), XIAO Dan(肖丹), Chinese J Anal Lab(分析实验室) J, 2002 21(6): 64
10 LI JianWu(李建武) Chief Editor(主编), Principle and Method of Biochemistry Experiment(生物化学实验原理和方法) [M], Beijing(北京): HK University Press(北京大学出版社), 1997 313 351
11 XU Ping(许平), MA CuiQing(马翠卿), QIQingSheng(祁庆生), SHEN Ya-Ling(沈亚领), QU Yin-Bo(曲音波), Acta Microbiol Sinica(微生物学报) J, 1999 32(2): 137
12 LOU LangWang(楼良旺), GAO Nian-Fa(高年发), Chinese J Anal Lab(分析实验室) J, 2005 24(4): 1

Preparation of Pyruvate from DL-Lactate by Immobilized Lactate Oxidase on Calcium Alginate

WANG Yan*, YAO LiLi, ZHOU Lin, DAI Shan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083)

Abstract The optimum conditions of immobilized Lactate Oxidase with sodium alginate and cross linked with glutaraldehyde was studied. The Lactate Oxidase was compared with its immobilized enzyme in some properties. Enzyme of 1 mL and 1 mL of 3% sodium alginate were mixed and the mixture was added dropwise into 20 mL of a 0.2 mol/L CaCl_2 solution to solidify for 2 h at 25 °C. Then the precipitate was cross linked in the solution of 20 mL of 0.2% glutaraldehyde for 2 h at 37 °C. After filtration and drying, the immobilized enzyme beads were obtained with a activity recovery of 39.8% for the total enzyme added. The thermal stability of the immobilized enzyme was tested. The free enzyme lost all its activity when heated at 65 °C for 1 h but the immobilized enzyme still kept 86% of the original activity. The optimal reaction temperature of the immobilized enzyme was 55 °C compared to 37 °C of free Lactate Oxidase; the optimal reaction pH of the immobilized enzyme was 7.4 as the same as that of the free enzyme. Stored at 4 °C for 50 days without any protection by reagent, the free enzyme only kept 40% of the original activity but the immobilized enzyme still retained 80% of the original activity. The calcified preparation of pyruvate from DL-Lactate by immobilized Lactate Oxidase, the yield could reach 75% after 3 h and the immobilized enzyme maintained 85% of the activity after having been reused 5 times.

Keywords sodium alginate; immobilization; Lactate Oxidase; biocatalysis