

超声波对固定化酶活性的影响 *

陈小丽

黄卓烈

丘泰球

(华南农业大学生命科学学院 广州 510642) (华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

2001年9月6日收到

摘要 本文介绍了超声波对固定化酶的影响,同时对作用过程中的影响因素进行了阐述,并探讨了超声波影响固定化酶的可能机理。

关键词 超声波, 固定化酶, 酶活性

Effect of ultrasound on activities of immobilized enzymes

CHEN Xiaoli HUANG Zhuolie

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

QIU Taiqiu

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract This paper reviews the effects of ultrasound on immobilized enzymes. It discusses both the affecting factors and the mechanism of ultrasound action.

Key words Ultrasound, Immobilized enzymes, Enzyme activities

1 引言

超声波是物质介质中的一种弹性机械波。作为一种物理能量形式,它在生物工程领域的应用日益受到重视,尤其在应用于酶方面研究较多。用超声波破碎细胞进而提取细胞内酶的研究由来已久。早期研究发现较高强度超声会导致酶失活。而近年来的研究^[1,2]则表明,适当强度的超声不会使酶失活,并可提高酶产率。同时,许多研究^[3-5]也发现,适当强度超声处理可促进酶的生物催化活性。

固定化酶是酶制剂中的一种新剂型。它是

用物理或化学的方法,将酶分子束缚在载体上,使其既保持酶的天然活性,又便于与反应液分离,可以重复使用。固定化酶技术自60年代问世以来,由于克服了溶液酶的酶性脆弱、易失活、寿命短、后处理困难和不能重复使用等缺点,日益受到各国学者瞩目。但固定化酶也存在反应特性改变、酶活性降低等问题,因此,人们正在探讨改善固定化酶传质阻力的方法,以促进固定化酶在工业生产上的应用。将超声波的能量应用于固定化酶而改善其催化动力学的研究,是刚刚起步的一个新领域,有关资料积累不多。本文试就超声波对固定化酶的

* 国家自然科学基金(10074016)和广东省教育厅资助项目

影响研究情况作一综合评述。

改变就不会太大。

2 超声波对固定化酶活性的影响

用超声波处理时,固定化酶的适应性强,酶失活少。有关超声可以激活固定化酶的研究已有报道。1981年 Ishimori et al^[6]发现,利用超声处理固定化葡萄糖氧化酶时,活性表现出来,而当停止超声处理时,活性则消失。用20kHz声场处理固定于琼脂胶上的 α -胰凝乳蛋白酶(以酪蛋白作底物),活性提高2倍^[7]。用7MHz超声波辐照固定于多孔聚苯乙烯上的 α -淀粉酶时,酶活力也有提高^[8]。用频率0.88kHz、声强0.05-1W/cm²的声波对肌酸激酶、乳酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸激酶所催化的反应进行多次,结果对反应速率均没有明显直接影响。但将酶固定化以后,超声波处理使固定化酶反应速率明显增加^[9]。高大维等研究表明^[10],在固定化糖化酶催化水解淀粉时施加一定超声场,使固定化酶的表现米氏常数降低从而提高酶的活力,而不改变其pH及温度特性。对固定化菊糖酶的研究^[11]表明,20kHz、20W超声波可促进该酶的催化作用。对促进经超声波作用发酵后生产的菊糖酶的作用更为明显,以蔗糖为底物的酶活力提高了60%;以菊糖为底物反应中,超声波使水解效率提高了70%。超声作用下,菊糖酶水解菊糖时,酶的最适作用pH和最适作用温度基本不变,但Lineweave-Burk曲线产生偏移, V^{-1} 和 Cs^{-1} 不呈线性关系,不能求得最大反应速度 V_m 和米氏常数 K_m 值。固定化脂肪酶(Lipozyme^{IM})催化有机溶剂中脂肪酸的酯化反应中,超声促进作用也十分明显^[12]。

种种研究结果表明,适宜的超声波处理固定化酶,可以在一定程度上提高酶活性。但超声波对酶活性的改善依不同的酶而有不同。某些酶可能对超声波的作用较为敏感,在一定的超声波作用下,就会改变酶活性。而另一些酶可能就不太敏感,用超声波处理时,其活力的

3 超声波作用于固定化酶的影响因素

3.1 超声波功率的影响

P.Schmidt等^[13]研究固定化葡糖糖化酶时,在7.6MHz超声频率下,分别采用1-5kW/cm²强度的超声波,发现酶催化效率的增加是与声强成比例的。宗敏华^[14]等研究超声辐射对酶的变性作用时发现,无论介质的性质如何,随着超声功率的增大,Lipozyme^{IM}的失活率增大。刘耘等^[15]研究表明,在低强度的超声辐照下,随着功率的增大,Lipozyme^{IM}逐渐被激活,经功率为96W、频率为20kHz的超声辐照40min后,Lipozyme^{IM}的相对酶活力为111.5%,而进一步提高超声功率,酶活急剧下降,超声功率增至120W时,酶活仅为辐照前酶活的62%,因而,激活Lipozyme^{IM}的适宜超声功率为96W。林影等^[11]研究超声波对固定化菊糖酶影响时,以不同强度(0-35W)超声波作用,发现超声波对酶催化反应有促进作用,其中20W的超声波作用效果最明显。

由此可见,超声波的功率强度对酶活性有较重要的影响。适当强度的超声波可以使酶活力的表现达到最佳状态。相反,不适当强度的超声波处理不但不会增强酶活力,甚至可以降低酶的活力。当然,超声波对不同的酶有不同的作用效果,因而不同的酶对超声波功率的要求是不同的。

3.2 超声连续辐照时间对酶活的影响

刘耘等^[15]研究表明,对有机相中Lipozyme^{IM}进行超声辐照处理时(蔗糖为底物),酶活力随着连续超声辐照时间的延长而大幅度提高。其他条件相同情况下,将120s/30s和30s/30s(均为辐射时间/间歇时间)两种作用方式进行比较表明,在120s/30s的形式下,相对酶活力高达247.7%。而在适宜的超声功率下,总超声时间对酶活力影响甚少。

3.3 超声介质的特性对固定化酶活性的影响

一般酶都在水溶液中催化反应,但很多酶还能在非水溶剂中催化反应。研究结果揭示,超声能量对处于不同溶剂中的酶分子的作用效果是有差别的。宗敏华等^[14]研究表明,Lipozyme^{IM}在不同介质中经超声辐照处理不同时间后,活性不同;他们发现,溶剂的疏水性越强,酶抗超声辐射变性作用的能力越强。在正己烷中,处理对酶活影响甚小,处理时间小于20min,几乎未出现酶的失活;处理40min后,活力损失仅11.8%。在水相中,超声辐照处理使酶迅速失活,处理10min后,酶的失活率为58.4%,处理40min后,酶失活率高达93.3%。在四氢呋喃中,酶对超声辐射变性作用的抗性介于正己烷和水之间。刘耘等^[15]研究表明,超声介质中水的含量对Lipozyme^{IM}活力影响很大。在脱水四氢呋喃中,超声辐照60min,酶活力损失24.6%,到含水量10%时,酶活力仅存4.8%。一般来说,酶在不同的溶剂系统中有不同的活力表现。超声波对在不同溶剂系统中的酶分子的催化特性有不同的影响效果,这是很容易理解的。

3.4 固定化酶颗粒大小和反应系统的影响

林影等^[11]研究超声波对固定化菊糖酶作用的影响时,以纯菊糖为底物,选择不同直径范围的固定化酶颗粒反应,发现随着固定化酶颗粒的增大,超声波的促进作用增大。他们还发现静止反应的超声波作用比振荡反应的作用效果更加显著。

3.5 底物和载体颗粒大小对超声作用效果的影响

P.Schmidt等^[13]和林影等^[11]都发现随着底物相对分子质量增大,超声波对固定化酶促进作用增大。P.Schmidt等采用底物流动系统反应,发现底物流速越大,酶促反应速度越小。他们还发现超声波对酶的影响跟载体颗粒有关,但并不呈线性关系。

4 超声波影响固定化酶活性的机理

P.Schmidt等^[13]认为超声波引起固定化

酶活力增强的可能机理是,活力在固体载体表面附近的总体积中的运输过程中增加,活力在固体载体表面附近的总体积中的运输过程中增加,并提出以下事实进行支持: 1. 超声效果随着分子量增加而增大。小分子物质比大分子更容易穿过固体基质,因而受声场影响较小。2. 超声效果随流速增加而减小。随着底物溶液流经载体颗粒速度增加,每一颗粒周围的静止层尺寸变小,底物扩散加快,因而超声效率降低。3. 超声效率大小与载体颗粒大小有关。但由于随着颗粒直径增加,扩散限制也增加,因而颗粒最大时超声增加效应不一定最大。4. 超声效应增加是频率平方的函数。

高大维等^[10]认为可能的机理是,在适当的超声场条件下,由于超声波的空穴和高频振荡作用,反应溶液中的底物和产物分子在超声波的驱使下,以较高的频率振动,固定化酶与底物和反应物的接触次数大大增加,同时产物释放也加快,从而使得固定化糖化酶的表观米氏常数减少,反应速率增加,而在一定条件下超声波对酶的微细结构活性部位影响不大,表现为酶的最适作用pH和温度不变。

林影^[11]等认为,超声波对酶催化反应的促进机理中,超声波对促进反应物质的扩散和传输起主导作用,它对改善固定化酶对大分子物质传输阻碍有着很大的应用前景。

另外,也有人认为超声提高固定化酶酶活力的机理是超声促进底物透入载体或主要是声流的作用。

可见,对于超声波影响酶促反应的机理,不同的作者有不同的理解和解释。也许在不同的条件下有不同的作用效果,或者说超声波对固定化酶活性的影响是各种机理影响的综合效果。因此,要对其作用机理作出更加合理的解释,还要进行更加深入的研究。

5 结语

适宜的超声辐照可提高固定化酶活力,而对酶的最适作用PH、最适作用温度无影响。

超声波作用于固定化酶的效果受超声强度、连续超声时间、超声介质、底物、固定化酶颗粒、载体颗粒、反应系统等多种因素影响。超声波在固定化酶中的应用,有些问题还不能解决。如高大维等研究超声波催化糖化酶水解淀粉时发现,酶活力在酶重复使用 8 次后有下降趋势,他们推测可能是超声波使酶在载体上的结合力受影响,但具体原因尚不清楚。对不同的酶来说,适宜的超声强度并不相同,因此要根据需要选择超声范围,这给研究和应用带来了一定的困难。固定化酶已成功地工业化了,如何利用超声波的促进传质作用,克服固定化技术中存在的传质障碍,以提高酶固定化技术在工业上的应用度,是亟待深入探讨的问题。

参 考 文 献

- 1 朱国辉,黄卓烈,丘泰球等.应用声学,2001,20(4): 45-47.
- 2 Tshimori Y, Karube I, Suzuki S. *Enzyme Microb. Technol.*, 1982, (4): 85-88.
- 3 Sakakibara M, Wang D, Akahashi R T. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, 18: 444-448.

- 4 Evgeni N, Vulfson D, Sarney B, et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13: 123-126.
- 5 Toba T, Hayasaka I, Taguchi S. *J. Sci. Food Agric.*, 1990, 52: 403-407.
- 6 Ishimori Y, Karube I, Suzuki S. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1981, 13(4): 197-201.
- 7 Ishimori Y, Karube I, Suzuki S. *J. Mol. Catal.*, 1981, 12(2): 253-259.
- 8 Rosenfeld E, Schmidt E. *Archives of Acoustics*, 1984, 9: 105.
- 9 Chetverikova E P, Pashovkin T N, Rosanova N A, et al. *Ultrasonics*, 1985, (7): 183-188.
- 10 高大维,陈满香等.华南理工大学学报(自科版),1994,22(1): 70-74.
- 11 林影,高大维,李国基等.华南理工大学学报(自科版),1997,25(9): 142-144.
- 12 邱树毅,姚汝华,宗敏华.生物工程进展,1999,19(3): 45-48.
- 13 Schmidt P, Rosenfeld E, Millner R, et al. *Ultrasonics*, 1987, 25: 295-299.
- 14 宗敏华,刘耘,尹顺义等.生物化学杂志,1995,11(6): 721-724.
- 15 刘耘,宗敏华,黄秋月等.中国生物化学与分子生物学报,1999,15(1): 151-153.

(上接第 39 页)

- 5 Benatar A. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1992, 46: 581-594.
- 6 Byon Sung K. *Polym. Eng. Sci.*, 1990, 30(3): 147-161.
- 7 Isayev A I. *Rubber Chem. Technol.*, 1995, 68(2): 267-276.
- 8 Pelofsky A H, EastBrunswick N J. Rubber reclamation using ultrasonic energy. United States Patent, 3725314. Apr.3, 1973.
- 9 奥田昌本,波多野保夫.超音波によるゴムの脱硫方法.公开特许公报,62121741.1987
- 10 Isayev A I. Continuous ultrasonic devulcanization of vulcanized elastomers. United States Patent, 5258413. Nov.2 1993.
- 11 Isayev A I, Jianhua Chen. Continuous ultrasonic devulcanization of vulcanized elastomers. United States Patent, Feb.8, 1994.

- 12 Tukacchinsky A, Schworm D, Isayev A I. *Chem. Technol.*, 1996, 69(1): 92-103.
- 13 Tapale M, Isayev A I. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1998, 70: 2007-2019.
- 14 Yushanov S P, Isayev A I, Chen J. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, 59(5): 803-815.
- 15 Yushanov S P, Isayev A I, Chen J. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, 59(5): 815-824.
- 16 Yushanov S P, Isayev A I, Levin V Y. *J. Polym. Sci. Phys. Ed.*, 1996, 34: 2409-2417.
- 17 Gonzalez-de los Santos, Eduardo A. *Rubber Chem. Technol.*, 1999, 72(5): 854-861
- 18 Roberson P R, Tim M. Method and Apparatus for Continuous devulcanization of rubber. United States Patent, 6059440. Aug.1, 2000
- 19 Borts Dinzbarg, Niles. Method and Apparatus for Continuous devulcanization of cross-linked elastomers. United States Patent, 5955035. Sep.21, 1999.