

吸附-交联固定化酶的制备及表征

赵康^{1,2}, 邸琴剑¹, 邓利^{1*}, 王芳¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029;
2. 中国图书进出口(集团)总公司, 北京 100020)

摘要:以树脂为载体, 京尼平为交联剂, 采用吸附-交联法制备了固定化脂肪酶(*Candida* sp. 99-125)。筛选了吸附和交联过程的最优固定化条件。利用扫描电子显微镜和原子力显微镜对制备的固定化酶进行了表征, 结果表明, 脂肪酶分子成功地固定在树脂上, 而且吸附后通过增加交联步骤能够有效增加固定在树脂上的脂肪酶分子的数量。另外, 红外结果也进一步验证了脂肪酶固定在树脂上。所制备的吸附-交联固定化酶具有良好的热稳定性和操作稳定性, 连续反应 50 批后, 转化率仍保留在 90% 以上, 稳定性良好, 酶活基本保持不变。

关键词:脂肪酶; 固定化; 吸附-交联; 京尼平; 表征

中图分类号: TQ225.24

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)12-0063-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2016.12.015

Synthesis and characterization of the immobilized lipase with adsorption and cross-linking

ZHAO Kang^{1,2}, DI Qin-jian¹, DENG Li^{1*}, WANG Fang¹

(1. Beijing Bioprocess Key Laboratory, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. China National Publications Import & Export (Group) Corporation, Beijing 100020, China)

Abstract: Immobilized lipase (*Candida* sp. 99-125) is prepared by adsorption-crosslinking method using resin as carrier and genipin as cross-linker. The optimal immobilization conditions for adsorption and crosslinking are screened. The immobilized enzyme is characterized by scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The results indicate that the lipase is successfully immobilized on the resin, and the amount of lipase immobilized on the resin is increased with the introduction of cross-linking process. The immobilized enzyme has good thermal stability and stability. After 50 batches of continuous reaction, the conversion remained over 90%, indicating that the enzyme activity remains basically unchanged.

Key words: lipase; immobilization; adsorption and cross-linking; genipin; characterization

脂肪酶(lipase, EC 3.1.1.3)是一类特殊的酰基水解酶,可以在油/水界面上催化各种有机反应,并且反应条件温和,具有高度的特异性,使得其在生物技术领域非常受欢迎,如可以用来合成催化酯化、水解、醇解等反应,生产多类化学品如功能性油脂、表面活性剂、食品添加剂等。但是游离酶在使用中对环境要求十分苛刻,容易失活,稳定性差,难以重复利用,同时昂贵的价格也限制了其在酶催化领域的应用^[1-3]。

通过将脂肪酶进行固定化可以有效改善这些不足。传统的固定化方法包括吸附法、包埋法、交联法和共价结合法,每种方法都有其各自的优点和缺陷^[4]。吸附法反应条件温和,能够最大程度地保留酶的活性,但是在实际应用中,吸附法固定化的脂肪酶由于酶与载体之间的作用力弱,随着反应的进行,

酶分子很容易从载体上脱落,使固定化酶的稳定性较差^[5-7]。而交联法是通过在酶分子间形成共价键来完成固定化,因此交联法的结合力强,稳定性高,可以多次重复使用^[8-10]。交联法中常用的交联剂是戊二醛,此交联剂毒性较高,对酶活的影响较大。针对上述问题,笔者以树脂为载体,结合吸附-交联固定化方法,选用生物相容性更好的京尼平作为交联剂,考察了固定化酶的制备条件,并对所制备的固定化酶进行多种表征,同时对固定化酶的热稳定性和操作稳定性进行了考察。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

实验主要原料:*Candida* sp. 99-125 脂肪酶,凯泰生物技术有限公司生产;树脂 D311,华溢新材料

收稿日期:2016-06-11

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(ZY1522)

作者简介:赵康(1984-),女,博士后,中级讲师,研究方向为生物化工,zhaokang0109@163.com;邓利(1971-),男,博士,教授,研究方向为生物柴油、生物基化学品、废弃油脂综合利用和加工,农林废弃生物资源高效利用,食品添加剂的生物制造,功能性油脂加工与改性等,通讯联系人,dengli@mail.buct.edu.cn。

生产;月桂酸、正辛醇、正己烷、磷酸二氢钠、氢氧化钠均为分析纯,北京化工厂生产;京尼平,临川之信生物科技有限公司生产。

实验主要仪器:3671000 型磁力搅拌器,德国 IKA 生产;TRACE 1300 型气相色谱仪,Thermo 公司生产;SHA-B 型恒温振荡培养箱,太仓市实验仪器厂生产;UV-2000 型紫外可见分光光度计;Multi-Mode-VIII 型扫描探针显微镜,Bruker 生产;S4700 型扫描电子显微镜,HITACHI 生产;3100 型傅里叶变换红外光谱仪,Varian 生产。

1.2 固定化脂肪酶

1.2.1 吸附过程

在 50 mL 锥形瓶中加入一定量的 D311 树脂及 5 mL 磷酸缓冲溶液,震荡使其分散均匀,再加入一定量的脂肪酶,充分混合后放入摇床中,在一定的温度、pH 下吸附不同时间,得到吸附固定化酶。用布氏漏斗将上述吸附好的反应体系进行抽滤,室温干燥后得到吸附固定化酶,进行酶活的测定。

1.2.2 交联过程

向上述吸附好的反应体系中加入不同浓度的京尼平作为交联剂,在不同的温度和时间下交联。用布氏漏斗抽滤,室温干燥得到吸附-交联固定化酶。固定化酶的制备过程如图 1 所示。

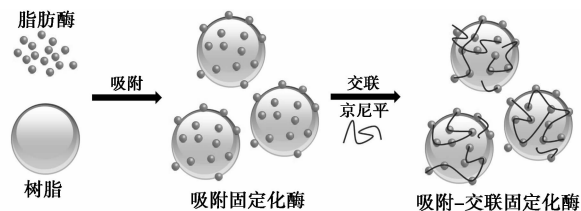


图 1 固定化酶的制备过程

1.3 酶活的测定

在 50 mL 锥形瓶中加入 316 μL 的正辛醇、0.2 g 月桂酸,然后溶解在 9.5 mL 的正己烷溶液中,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下预热 5 min,之后加入 0.25 g 制备的固定化脂肪酶,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床中反应 2 h,利用气相色谱分析酶催化合成的酯的浓度。

酯化酶活单位的定义:在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下每分钟催化产生 1 μmol 的酯的量定义为一个酶活单位(U)。

1.4 固定化脂肪酶的特征

1.4.1 扫描电子显微镜(SEM)分析

用扫描电子显微镜(SEM)观察树脂及不同固定化酶(吸附、吸附-交联)的形貌。将样品用刀片切开,观察内部截面,样品需喷金处理后用导电胶固

定于样品台上。

1.4.2 原子力显微镜(AFM)分析

待测树脂样品和不同固定化酶(吸附、吸附-交联)用刀片轻轻切开,选择相对平滑的截面,表面上的碎屑用洗耳球吹去,树脂和固定化酶样品用氰基丙烯酸乙酯黏合剂固定在 AFM 专用金属圆片上。

待测脂肪酶溶液的 AFM 表征:取 10 μL 酶溶液置于新鲜的云母片上,在室温下吸附 10 min,用 50 μL 的水冲洗,吹干,待测。利用原子力显微镜观测酶分子在空气中的形貌。

1.4.3 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析

待测样品和 KBr 充分研磨混合均匀,压片后进行红外光谱分析。

1.5 固定化酶的稳定性

1.5.1 热稳定性

把同样质量的固定化酶和游离酶放入 50 mL 的锥形瓶中,再将其分别在 30 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下反应 2 h,之后测定酯化酶活,以此来表征酶的热稳定性。

1.5.2 操作稳定性

具体操作见 1.3,反应完成之后将固定化酶与产物分离,重新进行上述过程,以此类推,以反应能有效进行的批次来表征固定化酶的操作稳定性。

2 结果与讨论

2.1 固定化酶的条件优化

吸附过程中脂肪酶的添加量会对固定化酶的酶活产生很大影响,温度升高会增加酶分子与载体的接触,而温度过高也会降低酶活和稳定性,另外,适宜的 pH 能使酶分子的活性中心处于一个最佳状态,有利于酶的催化。吸附时间直接关系到载体表面负载酶蛋白量的多少。随着时间增加,载体吸附的蛋白也会增多,酶活必然增加,但是当时间继续延长,会增加载体表面的空间位阻,导致酶活下降。交联过程中时间的长短直接决定交联的程度,温度又会决定交联剂的活性。京尼平作为一种新型生物大分子交联剂,对酶的作用较温和,虽然已经取得了广泛的应用^[11-13],但仍会影响酶活,其质量分数的大小对交联反应至关重要。因此,考察了吸附和交联过程中的各种影响因素,得到了吸附过程的最优条件为:脂肪酶的质量为 0.25 g,吸附温度为 35 $^{\circ}\text{C}$,pH 为 8.0,吸附时间为 4 h。交联过程的最优条件为:京尼平质量分数为 0.25%,交联时间为 4 h,交联温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

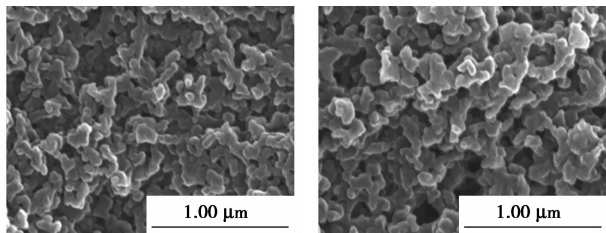
2.2 固定化脂肪酶的表现

2.2.1 扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM)

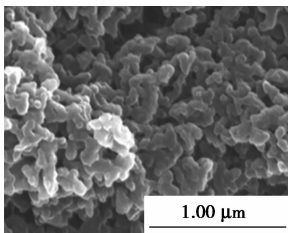
通过扫描电镜及原子力显微镜分别对固定化酶的形成过程以及内部结构特征进行观察和进一步分析,结果如图2、图3所示。由图2(a)可以看出,树脂内部孔道发达,有利于酶分子进入树脂内部并在树脂上吸附,也利于催化反应的发生。由图2(b)可以看出,酶分子和树脂吸附后,可以在树脂的截面上观察到一些小颗粒,这些颗粒应该是酶蛋白的聚集体。而且树脂的截面边缘有钝化的现象,与树脂相比更加粗糙,证明酶分子吸附在了树脂上。吸附虽然可以在很大程度上保留酶的活性,但是由于酶与载体之间的相互作用力较弱,在反应中容易脱落,使

固定化酶的酶活降低。通过增加交联反应,能使酶分子更加牢固地固定在载体表面,使其不易失活,提高稳定性。由图2(c)可以看出,吸附固定化酶进一步发生交联反应后,载体表面的颗粒数量明显增多,也就是固定在载体表面的酶蛋白的数量增多。由图3可以看出,原子力显微镜的实验结果也进一步证明脂肪酶分子大量的固定在了树脂上。吸附固定化后,脂肪酶分子均匀的分散在树脂内部,成单层吸附,避免了酶分子堆积引起酶失活,进一步发生交联反应后,树脂上脂肪酶的负载量明显增多。

为了进一步证明树脂截面上出现的小颗粒是脂肪酶分子,利用原子力显微镜对脂肪酶分子以及固定化酶在纳米尺度上进行研究,结果如图4所示。由图4(a)可以看出,脂肪酶分子的高度剖面图上单个脂肪酶分子的高度约为5nm左右,与文献[14]中的报道相符。吸附固定化后,树脂截面上出现大量的颗粒,这些颗粒的高度也都在5nm左右,直接证明脂肪酶分子吸附在了树脂上,如图4(b)所示。吸附后增加交联步骤,能够增加固定在树脂上的脂肪酶的数量,这些颗粒的高度也与脂肪酶的高度相符,如图4(c)所示。进一步证明SEM和AFM图中的颗粒为脂肪酶分子,并且成功地固定在树脂上。

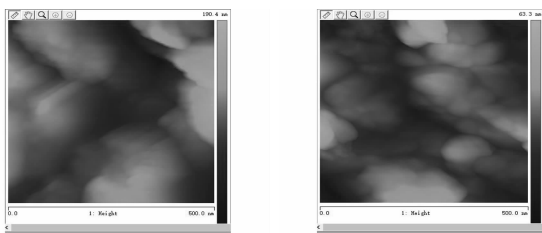


(a)树脂 (b)吸附固定化酶

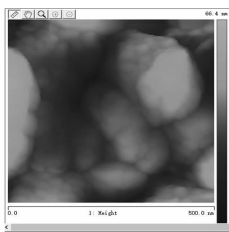


(c)吸附-交联固定化酶

图2 扫描电子显微镜图

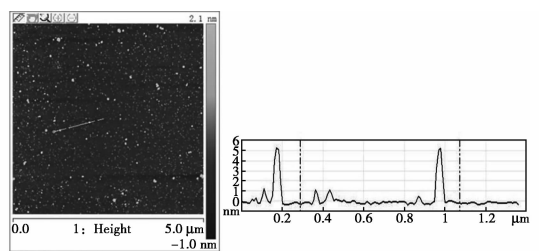


(a)树脂 (b)吸附固定化酶

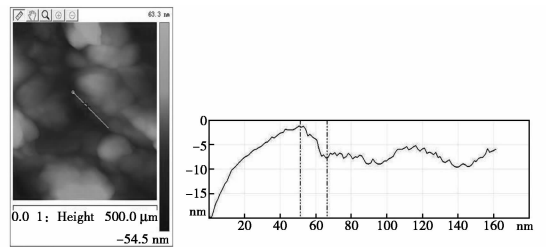


(c)吸附-交联固定化酶

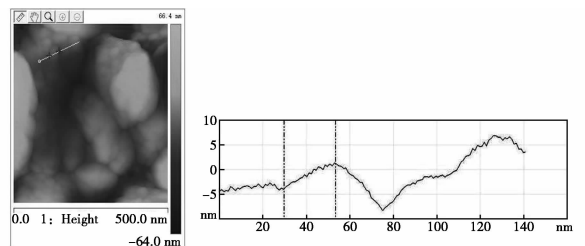
图3 原子力显微镜图



(a)脂肪酶



(b)吸附固定化酶



(c)吸附-交联固定化酶

图4 原子力显微镜图及对应的高度剖面图

2.2.2 红外光谱 (FTIR)

用京尼平作交联剂得到的吸附-交联固定化酶的红外谱图与树脂的谱图相比有明显变化,如图 5 所示。由图 5 可以看出,与树脂相比,固定化酶的红外谱图中 $3\ 357\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 456\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰明显减弱,表示固定化酶中 N—H 键减少,而 $1\ 020\ \text{cm}^{-1}$ 处峰的增强,表示固定化酶中 C—N 键增多。交联反应是酶分子之间的氨基发生交联,在这一过程中,伴随着 C—N 键的增多和 N—H 的减少。因此,红外结果也进一步证明脂肪酶分子固定在了树脂上,与预期的结果一致。

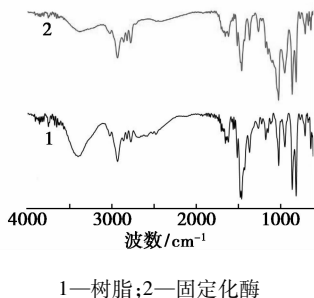
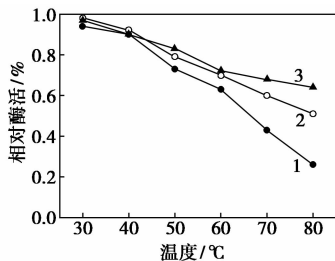


图 5 树脂和吸附-交联固定化酶的红外光谱

2.3 固定化脂肪酶的稳定性

2.3.1 热稳定性

脂肪酶的活性会随环境的变化而改变,尤其是温度。将游离酶与固定化酶(吸附、吸附-交联)分别在不同的温度下放置 2 h 后,测其酶活。与游离酶相比,吸附固定化酶和吸附-交联固定化酶的热稳定性都有所提高,而且吸附-交联固定化酶的热稳定性更好。在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 下保持 2 h,吸附-交联固定化酶的酶活还能保持在 64%,而吸附固定化酶的酶活已经降低为 51%,游离脂肪酶的酶活仅为 26%,如图 6 所示。吸附-交联固定化酶的热稳定性的提高,是由于京尼平的交联增加了酶分子之间的相互作用力,限制了酶分子的移动,从而能够更好地抵御外界环境的影响。

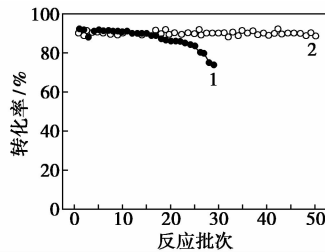


1—脂肪酶;2—吸附固定化酶;3—吸附-交联固定化酶

图 6 脂肪酶和固定化酶的热稳定性

2.3.2 操作稳定性

对于固定化酶来说,其重复使用性是一个很重要的指标,能够有效减少其在工业生产使用中的费用。由于月桂酸和正辛醇是脂肪酶的最适底物,以此来考察固定化酶的操作稳定性,结果如图 7 所示。由图 7 可以看出,吸附固定化酶和吸附-交联固定化酶在前 20 批反应的稳定性都很好。随着反应批次的增加,由于吸附固定化酶的脱落或失活,其转化率开始逐渐下降。而用京尼平交联得到的吸附-交联固定化酶在反应 50 批后仍然稳定性良好,转化率基本保持不变,维持在 90% 以上。因此,以树脂为载体,采用吸附-交联的方法制备的固定化酶能够多次重复使用并保持较高的活力,显著提高酶的稳定性,并且其稳定性明显优于吸附法制得的固定化酶,具有一定的工业应用价值。



1—吸附固定化酶;2—吸附-交联固定化酶

图 7 固定化酶的操作稳定性

3 结论

以树脂为载体,京尼平为交联剂,采用吸附-交联法对脂肪酶进行了固定化,优化了吸附和交联过程中的影响因素,包括酶量、温度、时间、pH 等固定化条件。借助扫描电子显微镜和原子力显微镜对制备的固定化酶的形貌进行了表征。结果表明,酶分子均匀地吸附在了树脂上,而且通过增加交联过程,能够增加酶分子固定在树脂上的数量。AFM 的高度剖面图也进一步证明了脂肪酶成功地固定在树脂上。另外,红外分析的结果也验证了脂肪酶被很好地固定在了树脂上。吸附-交联法制备的固定化酶的热稳定性和操作稳定性与游离脂肪酶、单纯吸附法固定化酶相比均有明显提高,具有一定的实际工业应用价值。

参考文献

[1] Ceni Giovana, Lerin Lindomar A, De Conto Juliana Faccin, *et al.* Optimization of 1-glycerol benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(2): 107-112.

匀。将 0.4 g 引发剂溶于 10 g 水中,滴加引发剂,考察不同引发剂对聚季铵盐产率的影响,结果如表 1 所示。

表 1 引发剂对产率的影响

引发剂	产率/%	外观
过硫酸铵	85.7	黏稠,略微显黄色
过硫酸钾	82.3	黏稠,略微显黄色
Va-044	91.7	黏稠,透明
V50	89.3	黏稠,透明

从表 1 可知,Va-044 的活性最好,产率最高。

2.2 反应温度对产率影响

将 20 g 丙烯酸、100 g 二甲基二烯丙基氯化铵加入到 250 mL 圆底烧瓶中,搅拌均匀。滴加 2 g 的引发剂,考察温度对产率的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可知,随着温度的升高,产率提高,温度达到 70℃时,产率最大,为 91.7%。这是因为水溶性的

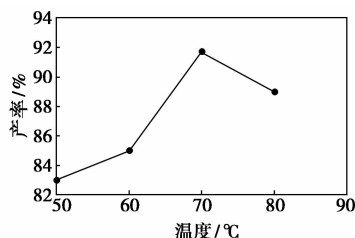


图 1 温度对产率的影响

偶氮引发剂在低温下不易产生自由基,随着温度的升高,产生自由基的速率增加,当达到 70℃后,产生自由基的速率几乎不再有大变化,因此产率不再有明显的变化。

2.3 引发剂质量分数对产率的影响

将 20 g 丙烯酸、100 g 二甲基二烯丙基氯化铵加入到 250 mL 圆底烧瓶中,搅拌均匀,反应温度为 70℃条件下,考察引发剂质量分数对产率的影响,结果如图 2 所示。

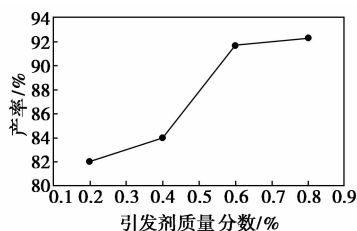


图 2 引发剂质量分数对产率的影响

由图 2 可知,随着引发剂质量分数的增加,产率增大,最后趋于稳定。这是因为随着引发剂质量分数的增大,产生更多的自由基活性基团,使得更多的单体有机会和主链反应。可是,当质量分数达到一定数量之后,更多的自由基相互之间反应,使得活性基团的数量趋于稳定,从而产率也不再有明显的变化。

(上接第 66 页)

- [2] Li Zhen, Wang Yulun, Li Jia, *et al.* Dual response surface-optimized synthesis of *L*-menthyl conjugated linoleate in solvent-free system by *Candida rugosa* lipase [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (4): 1305 - 1309.
- [3] Li Yan, Gao Fei, Wei Wei, *et al.* Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 66 (1): 182 - 189.
- [4] Jegannathan Kenthorai Raman, Abang Sariah, Poncelet Denis, *et al.* Production of biodiesel using immobilized lipase—a critical review [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, 28 (4): 253 - 264.
- [5] Khang Dongwoo, Kang Minji. Biomimetic component coating on 3D scaffolds using high bioactivity of mesoporous bioactive ceramics [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6: 2521 - 2531.
- [6] Sun Jiangna, Jiang Yanjun, Zhou Liya, *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium [J]. *New Biotechnology*, 2010, 27 (1): 53 - 58.
- [7] Serra Elías, Mayoral Ivaro, Sakamoto Yasuhiro, *et al.* Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials; Effect of textural and structural parameters [J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, 114 (1): 201 - 213.
- [8] Yang Jianjun, Ma Xiaoxun, Zhang Zisheng, *et al.* Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption-cross-linking methods; A comparative study [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28 (5): 644 - 650.
- [9] Cunha Aline G, Fernández-Lorente Gloria, Bevilacqua Juliana V, *et al.* Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase—a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 146 (1/2/3): 49 - 56.
- [10] Jones Paetrice O, Vasudevan Palligarnai T. Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32 (1): 103 - 106.
- [11] Tsai Tong-Rong, Tseng Ting-Yu, Chen Chieh-Fu, *et al.* Identification and determination of geniposide contained in *Gardenia jasminoides* and in two preparations of mixed traditional Chinese medicines [J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 961 (1): 83 - 88.
- [12] Chen Kuo-Yu, Liao Wei-Ju, Kuo Shyh-Ming, *et al.* Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10 (6): 1642 - 1649.
- [13] Silva Simone S, Motta Antonella, Rodrigues Márcia T, *et al.* Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9 (10): 2764 - 2774.
- [14] Bordes Florence, Barbe Sophie, Escalier Pierre, *et al.* Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase [J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99 (7): 2225 - 2234. ■