

环氧交联剂和氨基载体固定化海洋假丝酵母脂肪酶*

朱衡^{1,2,3} 张继福⁴ 张云¹ 胡云峰^{1,3**}

(1 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广州 510301 2 中国科学院大学 北京 100049)

3 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) 广州 511458 4 广东省中医院 广州 510120)

摘要 游离酶经过固定化后,稳定性和环境耐受性得到提高,在食品、医药、化工、环境和皮革等领域可以很好的提高酶的利用率并降低生产成本,具有极大的应用潜力。新型交联剂在固定化酶工艺的应用极大推进了固定化酶研究的深入。借助新型交联剂聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDGE),利用氨基载体 LX-1000HA 固定化海洋假丝酵母脂肪酶,结合单因素和正交试验优化得到交联及固定化条件为:交联温度 30℃,交联 2h,交联剂浓度 0.75%,pH7.0,加酶量 800U,载体量 0.5g,固定化 2h,固定化温度 45℃。根据上述最佳固定化工艺,制备得到固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 在最适条件下测得酶活达到 160.81U/g,约为此前制备的固定化酶 LX-1000HA-GA-CRL(由 LX-1000HA 和戊二醛交联脂肪酶得到)和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL(由短链氨基载体 LX-1000EA 和 PEGDGE 交联脂肪酶得到)酶活的 2 倍,发现固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 的最适反应温度相比于游离酶提高 15℃;在 70℃ 的环境中 3h 后酶活仍存留 70%;循环使用 6 次后残留 65% 左右的酶活;酸碱耐受性和储存稳定性也表现良好,4℃ 保存 30 天后剩余约 70% 的初始酶活。同时,将制备的固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 与游离酶、固定化酶 LX-1000HA-GA-CRL、固定化酶 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 进行了比较,发现固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 在温度耐受性和重复使用性等方面具有更好的使用效果。

关键词 聚乙二醇缩水甘油醚 氨基载体 脂肪酶 固定化 酶学性质

中图分类号 Q814.2

酶作为绿色高效催化剂一直以来受到科研人员的重视^[1]。但是天然酶的工业应用受到很多限制,如高成本、条件苛刻性和不可回收等。为提高生物酶的结构稳定性、环境适应性,使生物酶更好的发挥作用,酶的固定化技术发挥至关重要的作用,也是当今酶催化工程领域的研究热点^[2]。脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3)是当今市场上不可缺少的工业酶。脂肪酶催化酯水

解、合成、交换反应,不需要辅因子,没有副产物产生,催化机制也探究的比较清晰^[3],于界面活化并催化反应,通常表现出精细的立体选择性、化学选择性和区域选择性^[4]。因此脂肪酶可以应用于油脂改性、合成芳香酯类化合物^[5]、合成生物柴油^[6]、处理皮革^[7]、整治污水^[8]、提高饲料利用率^[9]和化学拆分^[10]等。

固定化方法主要分为物理法和化学法。固定化脂肪酶的优秀性能主要取决于合适的固定化载体和有效的固定化方法^[11],固定化载体独特的亲疏水界面有利于打开脂肪酶的盖子。目前对固定化脂肪酶的方法和载体的研究越来越多,众多研究者将目光转向了新型载体的探索,基于物理固定化原理衍生出一系列新的载体类型,如金属有机骨架^[12]、微孔聚合物膜^[13]、壳聚

收稿日期:2019-12-18 修回日期:2020-02-07

* 广东省自然科学基金(2018A030313151)、广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目(A201701C12)、中国科学院“科学”号高端用户项目(KEXUE2018G05)、中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404)、南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0406)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:yunfeng.hu@scsio.ac.cn

糖-海藻酸钠微球^[14]、碳纳米管^[15]、 Fe_3O_4 磁性载体^[16]和介孔二氧化硅^[17]等。虽然已报道的新型固定载体或新方法在固定化效果方面更有优势,但是新载体制备的过程更加复杂,成本更加高昂,就使得固定化酶的应用成本居高不下^[18]。同时,物理方法制备的固定化酶依赖吸附和包埋的弱相互作用,缺点就是容易脱落,如果被吸附的酶堵塞了孔的末端,就会限制酶的负载^[19],不利于固定化酶的稳定性。

此外,交联方法将酶连接在表面,降低了底物与酶的反应阻力,连接牢靠;但是交联固定化过程中酶的失活和扩散限制也可能影响酶的催化性能。而在交联固定化过程中,交联剂对酶的损害程度至关重要,传统交联剂戊二醛对酶的毒害性很大,往往在固定化过程中会损失较多酶活。探索新型交联剂成为推动固定化技术发展的新领域,科研人员利用 N,N' -羰基二咪唑 (CDI)^[20]、 N,N' -二异丙基碳二亚胺 (DIC)、1,4-phenylenediisothiocyanate (PDC)、1,3-phenylenediisothiocyanate (MDC)^[21]、京尼平^[22] 和三羟甲基磷^[23] 等进行固定化。另有研究发现,双环氧试剂聚乙二醇二缩水甘油醚^[24] 可以作为交联剂固定化抗坏血酸氧化酶于生物传感器,用于饮料中的抗坏血酸的检测,也可以固定化辣根过氧化物酶和腐胺氧化酶于石墨电极用于食品样品中腐胺的检测^[25]。

利用脂肪酶进行油脂水解具有温和和低耗、产品优质和效率高等优点,能够实现酶法水解油脂的重要手段就是固定化脂肪酶。但是固定化脂肪酶目前面临许多问题:其一是固定化方法都有其优缺点。例如,吸附

法的特异性较弱,非目标酶的吸附会降低催化能力和负载力。杨建军等^[26] 制备的固定化脂肪酶的酶活有 67.2 U/g,实验中发现吸附法固定化脂肪酶在反应过程中酶的脱落是造成其酶活性大大下降的一个直接原因。其二,固定化脂肪酶的制备流程复杂。Cirillo 等^[27] 利用制备的新型聚合载体用于固定化脂肪酶,载体制备阶段就需要花费 3~4 天且流程复杂,由于耗费的时间和高昂的试剂成本等因素制约,新型载体固定化脂肪酶在工业生产中的应用短期内无法实现^[28]。其三是载体材料各有优劣势,需要考虑载体的大小、形状、机械强度、亲疏水性和官能团种类等因素,如何按照预期选择合适载体成为困难^[29]。除了上述因素外,结合实际生产应用进行载体材料的选择,还要考虑载体和酶的来源、经济因素、反应器构造和目标酶的特性等。今后寻找低成本易制备的载体仍然是脂肪酶固定化的发展趋势^[30]。

双环氧试剂可以开环与氨基反应,在氨基载体和脂肪酶之间形成稳定共价键,达到固定化的目的(图 1)。本实验使用的是已经工业化量产的氨基树脂 LX-1000HA,其颗粒均匀、强度高、重复性好。针对氨基载体 LX-1000HA 从三种环氧试剂(聚乙二醇二缩水甘油醚、乙二醇二缩水甘油醚、新戊二醇二缩水甘油醚)中筛选出聚乙二醇二缩水甘油醚 (PEGDGE),用于交联固定化海洋假丝酵母脂肪酶;经过优化固定化条件后,对固定化脂肪酶和游离脂肪酶进行酶学性质的表征与比较,为脂肪酶实际工业应用奠定了工作基础。

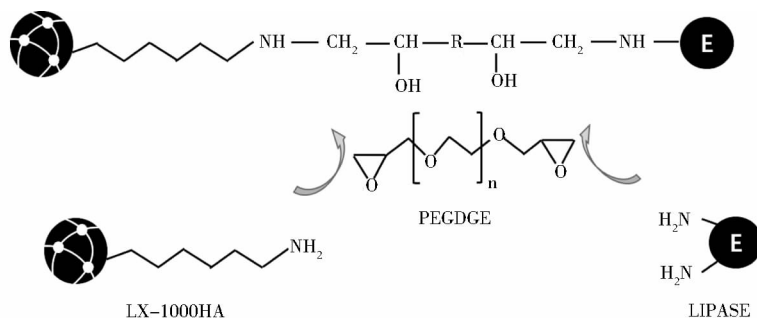


图 1 LX-1000HA 固定化 LIPASE 过程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the immobilization of lipase using LX-1000HA

1 材料与方法

1.1 材料

固定化所需材料:

载体:LX-1000HA 购买于西安蓝晓生物科技有限

公司。参数:粒度 0.15~0.3mm;含水量:55.83%;伯胺功能团容量:0.8mmol/g,使用前 30℃ 干燥。

粗酶粉:海洋假丝酵母脂肪酶购买于上海鼓臣生物技术有限公司。参数: CAS, 9001-62-1, Assay \geq 50 000U/g;分子量:67 000Da;利用磷酸缓冲液溶解酶

粉,离心保留上清液得 2mg/ml 粗酶液。

交联剂:上海麦克林试剂公司提供聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDGE, CAS:39443-66-8;纯度:99%;分子量:约 400)。

缓冲液:Generay Biotech 提供磷酸氢二钠、磷酸二氢钠;0.1mol/L 磷酸缓冲液:精确称量所需磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,利用容量瓶定容。

酶活测定所需材料:

底物:橄榄油采购于上海麦克林试剂公司;聚乙烯醇采购于天津大茂化学试剂厂;聚乙烯醇:橄榄油=3:1,超声混匀。

显色剂:无水醋酸铜、吡啶订购于上海麦克林试剂公司;5%无水醋酸铜显色剂:纯净水溶解,利用吡啶调节 pH 到 6.1。

萃取剂:异辛烷采购于天津大茂化学试剂厂,无水乙醇购买于广东光华科技股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 LX-1000HA 固定化海洋脂肪酶 载体活化:湿载体 LX-1000HA 于 30℃ 烘干备用,添加交联剂聚乙二醇二缩水甘油醚于摇床振荡处理载体,去除残留的交联剂。

脂肪酶固定化:粗酶液加入到活化后的载体,摇床振荡固定化,用缓冲液进行冲洗,抽滤,去除残留酶液,测定酶活。

酶活测定方法:采用改进的铜皂分光光度法^[31-36]测定酶活。酶活定义 U:一定条件下,每分钟内催化底物生成 1μmol 脂肪酸所需要的酶量。

标准曲线: $y = -0.0062x - 0.0055$ 。 $R^2 = 0.9998$ 。

(1) 酶液酶活力(U/ml) = $\frac{Cv}{Vt}$ 。

式中, C 为脂肪酸的浓度(根据吸光度代入标曲计算得出)(μmol/ml); v 为脂肪酸/异辛烷溶液的体积 7.5(ml); V 为酶液的用量 0.25(ml); t 为作用时间 15(min)。

(2) 固定化酶的酶活力(U/g) = $\frac{Cv}{mt}$ 。

式中, C 为脂肪酸的浓度(根据吸光度代入标曲计算得出)(μmol/ml); v 为脂肪酸/异辛烷溶液的体积 7.5(ml); m 为固定化酶的用量 0.1(g); t 为作用时间 15(min)。

酶活回收率计算方法:固定化酶活力回收率(%) = [固定化酶总活力/(用于固定化酶的总活力 - 固定

化后残余酶活力)] × 100%

1.2.2 单因素实验优化脂肪酶交联和固定化条件

(1) 筛选环氧交联剂。筛选环氧试剂:聚乙二醇二缩水甘油醚、乙二醇二缩水甘油醚和新戊二醇二缩水甘油醚,每种交联剂设置 0.1%、0.35%、0.5% 浓度梯度进行三次重复实验,以酶活为筛选标准,筛选环氧试剂。其余条件:交联和固定化温度均为 25℃,交联 1h,固定化 2h,载体量 1.00g, pH7.0。

(2) pH。设定三组平行,在交联和固定化温度均为 25℃、交联剂体积分数 0.75%、交联 1h、固定化 2h、载体量 1.00g 的条件下,探究不同的缓冲液 pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)对固定化酶活性的影响。

(3) 交联剂浓度。设定三组平行,在交联和固定化温度 25℃、pH7.0、交联 1h、固定化 2h、载体量 1.00g 条件下,探究不同浓度交联剂(0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%)对固定化酶活性的影响。

(4) 交联温度。设定三组平行,在固定化温度 25℃、pH7.0、交联剂体积分数 0.75%、交联 1h、固定化 2h、载体量 1.00g 条件下,探究不同交联温度(25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃)对固定化酶活性的影响。

(5) 载体量。设定三组平行,在交联温度 30℃ 和固定化温度 25℃、pH7.0、交联剂体积分数 0.75%、交联 1h、固定化 2h 条件下,探究不同载体量(0.50g、0.75g、1.00g、1.25g、1.50g)对固定化酶活性的影响。

(6) 固定化温度。设定三组平行,在交联温度 30℃、pH7.0、交联剂体积分数 0.75%、交联 1h、固定化 2h、载体量 0.50g 条件下,探究不同固定化温度(25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃)对固定化酶活性的影响。

(7) 交联时间。设定三组平行,在交联温度 30℃、pH7.0、固定化温度 50℃、交联剂体积分数 0.75%、固定化 2h、载体量 0.50g 条件下,探究不同交联时间(1h、2h、3h、4h、5h)对固定化酶活性的影响。

(8) 固定化时间。设定三组平行,在交联温度 30℃、pH7.0、固定化温度 50℃、交联剂体积分数 0.75%、交联时间 2h、载体量 0.50g 条件下,探究不同固定化时间(1h、2h、3h、4h、5h)对固定化酶活性的影响。

1.2.3 正交试验确定固定化条件 经过单因素试验确定交联条件(交联剂浓度 0.75%、交联温度 30℃、交联时间 2h),利用正交试验对固定化条件(载体量、pH、温度、时间)进行优化,各因素下选取三个水平进行正

交试验以确定固定化条件,试验设计如表 1 所示。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Orthogonal experimental factor level table

水平	因素			
	A(载体量)(g)	B(pH)	C(温度)(℃)	D(时间)(h)
1	1.00	7	50	1
2	1.25	8	55	2
3	1.50	9	60	3

1.2.4 游离酶和固定化酶酶学性质的表征及比较

(1)最适反应温度。按照最佳条件制备的固定化酶,pH7.0,设置 35~60℃(间隔 5℃)反应温度,反应 15min 测定固定化酶和游离酶的酶活。

(2)最适反应 pH。改变体系的反应 pH,设置 pH 5.0~9.0(间隔 1.0)磷酸缓冲液的反应条件,在最适反应温度下反应 15min 测定固定化酶和游离酶的酶活。

(3)酸碱稳定性。游离酶:利用 pH5.0~9.0 的磷酸缓冲液配制酶液,4℃保存 3h;固定化酶:称取适量固定化酶,利用 pH5.0~9.0 的磷酸缓冲液浸泡 3h,分别在最适条件下测酶活。

(4)热稳定性。将 1ml 游离酶与 0.3g 固定化酶分别在 40~70℃(间隔 5℃)水浴条件下放置 3h 后,分别以最适反应条件测定酶活。

(5)操作稳定性。取 0.1g 的固定化酶,保持反应条件相同(反应 pH 为 8.0,反应温度为 55℃),连续不间断地进行 6 次水解反应,测酶活,以第 1 次样品活力为 100%。

(6)储存稳定性。将制备好的固定化酶和游离酶液,保存于 4℃,在 1 个月内测定其酶活,以第 1 天的酶活为 100%。

酶学性质参数均重复测定三组确定最终结果。并游离酶、固定化酶 LX-1000HA-GA-CRL 和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 进行酶学性质比较。

2 结果与分析

2.1 单因素试验确定固定化酶交联及固定化条件

2.1.1 筛选环氧交联剂 筛选了三种双环氧试剂,比较其三者 0.1%、0.35%、0.5% 的浓度梯度下制备的固定化酶的酶活。由图 2a 可见,该三者都可以辅助氨基载体 LX-1000HA 交联固定化海洋假丝酵母脂肪酶,并且聚乙二醇二缩水甘油醚的固定化效果最佳。故后续单因素试验选择聚乙二醇二缩水甘油醚为双环氧交

联剂进行脂肪酶的固定化。

2.1.2 pH 对固定化效果的影响 设置 pH 范围为 5.0~9.0,研究 pH 对固定化酶酶活的影响。由图 2b 可知,在所设置的 pH 范围内,固定化酶活呈现先升后降的趋势,在 pH 为 7.0 时达到最优酶活,因此后续单因素实验选取 pH7.0 为固定化 pH。同时,选取 pH6.0、pH7.0、pH8.0 为正交试验中 pH 因素下的三个水平。

2.1.3 交联剂浓度对固定化效果的影响 设置交联剂浓度范围为 0.25%~1.25%,研究交联剂浓度对固定化酶酶活的影响。由图 2c 可知,在所设置的交联剂浓度范围内,固定化酶活呈现先升后降的趋势,综合考虑固定化酶活和酶活,回收率在交联剂浓度为 0.75% 时达到最高酶活,因此交联条件中的交联剂浓度选择 0.75%。

2.1.4 交联温度对固定化效果的影响 设置交联温度范围为 25~50℃,研究交联温度对固定化酶酶活的影响。由图 2d 可知,在所设置的交联温度范围内,固定化酶酶活和酶活回收率呈现先升后降的趋势,在 30℃ 达到最佳酶活,因此交联条件中的交联温度选取 30℃。

2.1.5 载体量对固定化效果的影响 设置载体量范围为 0.5~1.5g,研究载体量对固定化酶酶活的影响。由图 2e 可知,在所设置的载体量范围内,固定化酶活及酶活回收率呈现上升后下降的趋势,在 0.75g 呈现出最佳酶活,后续单因素试验选取 0.75g 为最适载体量。同时,选取 0.5g、0.75g、1g 为正交试验中载体量因素下的三个水平。

2.1.6 固定化温度对固定化效果的影响 设置固定化温度范围为 25~60℃,研究固定化温度对固定化酶酶活的影响。由图 2f 可知,在所设置的固定化温度范围中,固定化酶活和酶活回收率大致呈现先升后降的趋势,在 50℃ 达到最佳酶活,因此后续单因素试验中,选择 50℃ 为固定化温度。同时,选取 40℃、45℃、50℃ 作为正交试验中固定化温度因素下的三个水平。

2.1.7 交联时间对固定化效果的影响 设置交联时间范围为 1~5h,研究交联时间对固定化酶酶活的影响。由图 2g 可知,在所设置的交联时间范围内,固定化酶酶活和酶活回收率呈现出一致的趋势,在 2h 时达到最高酶活和回收率,因此在交联条件中,交联时间选取 2h。

2.1.8 固定化时间对固定化效果的影响 设置固定化时间范围为 1~5h,研究固定化时间对固定化酶酶活的影响。由图 2h 可知,在设置的固定化时间范围内,固定化酶活及酶活回收率呈现先升高后降低的趋势,

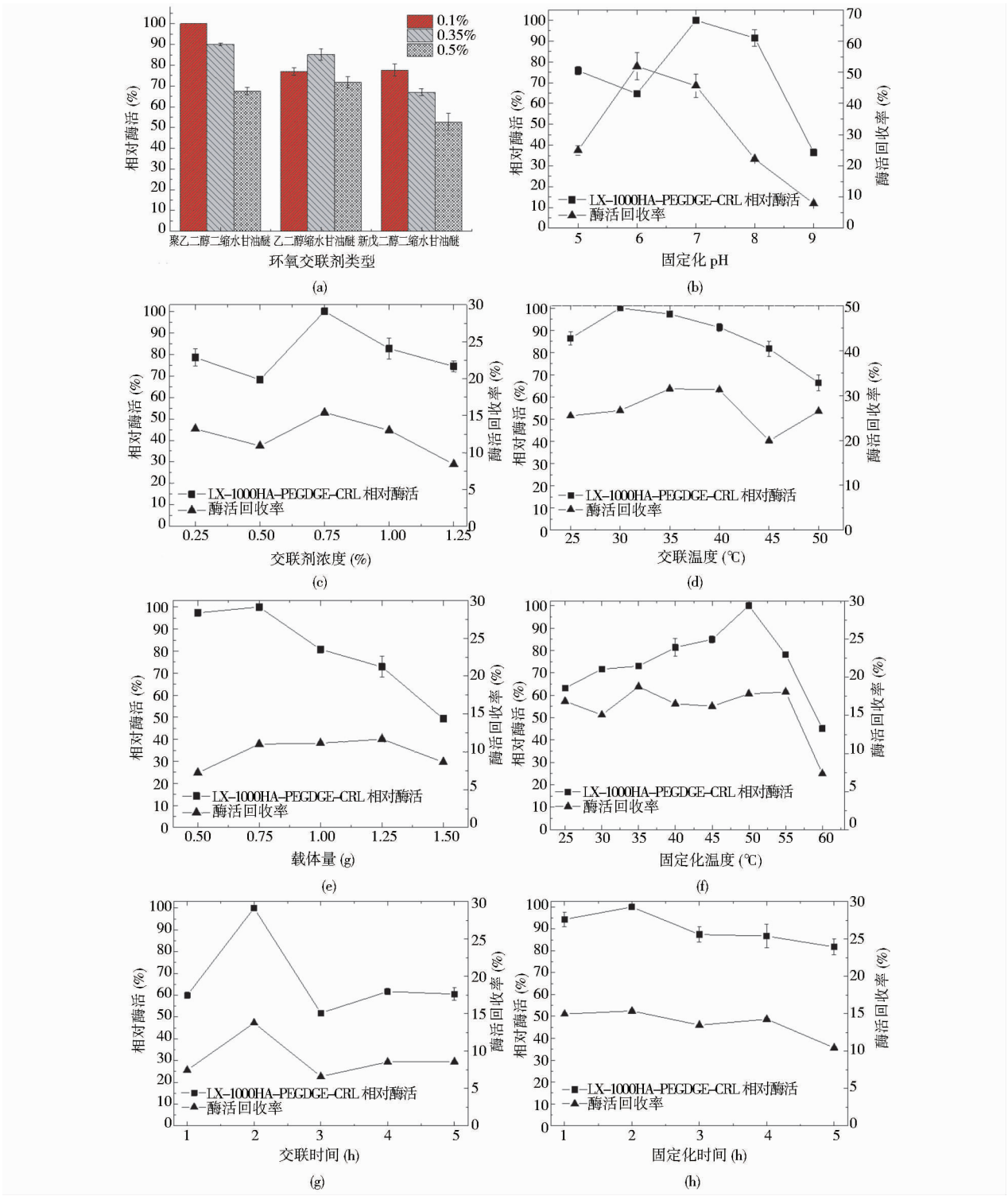


图 2 单因素试验确定交联及固定化条件

Fig. 2 Cross-linking and immobilization conditions were determined by single-factor experiments

(a) Screening crosslinking agent (b) The effect of pH on the activity of immobilized enzymes (c) The effect of the concentration of the crosslinking agent on the activity of the immobilized enzyme (d) The effect of cross-linking temperature on the activity of the immobilized enzyme (e) The effect of carrier volume on the enzyme activity of the immobilized enzyme (f) The effect of immobilization temperature on the enzyme activity of the immobilized enzyme (g) The effect of crosslinking time on the activity of the immobilized enzyme (h) The effect of immobilization time on the activity of immobilized enzyme

在 2h 达到最高酶活和酶活回收率。因此选取 1h、2h、3h 作为正交试验中固定化时间因素下的三个水平。

2.2 正交试验确定固定化条件

在交联条件为 0.75% 交联剂浓度、交联温度 30℃、交联时间 2h 的前提下,对固定化时间、固定化温度、载体量、pH 四个因素进行正交试验。利用表 3 所示的计算过程以及分析表 2 中绝对酶活可知,最佳固定化条

件为:载体量 0.50g、pH 7.0、固定化温度 45℃、固定化时间 2h;对比各因素对固定化影响的效果进行排序:载体量 > pH > 温度 > 固定化时间,可见,载体量影响最大,其次为固定化环境 pH,固定化时间影响最小。在最适条件下制备的固定化脂肪酶,最适条件测定酶活达到 160.81U/g,约为 LX-1000HA-GA-CRL 和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 固定化酶酶活的 2 倍。

表 2 脂肪酶固定化条件优化正交试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal experiments for lipase immobilized condition optimization

序号	载体量(g)	pH	温度(℃)	时间(h)	绝对酶活(U/g)	相对酶活(%)	酶活回收率(%)
1	0.50	6	40	1	52.80	50.12	5.40
2	0.50	7	45	2	105.38	100.00	11.83
3	0.50	8	50	3	74.27	70.51	4.87
4	0.75	6	45	3	43.68	41.47	4.66
5	0.75	7	50	1	60.24	57.19	8.83
6	0.75	8	40	2	40.30	38.25	4.45
7	1.00	6	50	2	47.63	45.22	6.60
8	1.00	7	40	3	46.26	43.93	8.33
9	1.00	8	45	1	37.34	35.41	5.00
K_1	232.45	144.11	139.35	150.38			
K_2	144.22	211.88	186.40	193.31			
K_3	131.24	151.91	182.15	164.22			
R	101.21	67.77	47.04	42.93			

表 3 计算过程

Table 3 Calculation process

影响因素	A(载体量)	B(pH)	C(温度)	D(时间)
K_1	$U(1+2+3)$	$U(1+4+7)$	$U(1+6+8)$	$U(1+5+9)$
K_2	$U(4+5+6)$	$U(2+5+8)$	$U(2+4+9)$	$U(2+6+7)$
K_3	$U(7+8+9)$	$U(3+6+9)$	$U(3+5+7)$	$U(3+4+8)$
R	A 因素下 $U_{\max}-U_{\min}$	B 因素下 $U_{\max}-U_{\min}$	C 因素下 $U_{\max}-U_{\min}$	D 因素下 $U_{\max}-U_{\min}$

Note:R. The effect of each factor on the immobilized enzyme activity was measured. The larger the value, the greater the influence of the factor on the immobilized enzyme activity

2.3 酶学性质的表征及比较

2.3.1 最适反应温度 由图 3a 可知,游离酶和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 最适反应温度为 40℃,本工作中的固定化脂肪酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 以及前期工作中制备的 LX-1000HA-GA-CRL 的最适反应温度(55℃),相比于游离酶和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 提高了 15℃,可以在较高温度下催化反应。这可能是因为脂肪酶经过氨基载体固定化后能够抵挡热的冲击,载体为脂肪酶提供了良好的保护作用;同时氨基载体

的不同对所制备的固定化酶的最适反应温度有很大的影响,基于链长较长的氨基载体 LX-1000HA 的固定化酶的最适反应温度明显提高。

2.3.2 最适反应 pH 由图 3b 可知,游离酶最适反应 pH 为 7.0,而固定化脂肪酶 LX-1000EA-PEGDGE-CRL、LX-1000HA-GA-CRL 以及本工作中制备的 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 的最适反应环境 pH 为 8.0,最适反应 pH 向碱性范围偏移。这可能是由于氨基载体连接脂肪酶后改变了酶的表面电荷状态,使酶的反应微环境产生

变化,因此固定化酶在碱性环境具有更好的催化能力^[37-38]。

2.3.3 温度耐受性 由图 3c 可知,在 40 ~ 70℃ 的水浴锅中孵育 3h 后,在 40 ~ 55℃ 区间内,固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 与游离酶液、LX-1000EA-PEGDGE-CRL 和 LX-1000HA-GA-CRL 三者的酶活随温度变化不大。但是在 55℃ 后 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 固定化酶和其余三者的差距越来越大,在 55 ~ 70℃ 区间内, LX-1000HA-PEGDGE-CRL 固定化酶表现良好,70℃ 时仍保留 70% 左右的酶活,而其余三者酶活下降明显。可见,固定化后酶对温度的适应性提高明显,可能是由于载体提高了酶的机械强度,缓解了高温对酶的攻击,特别是本工作中所制备的固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 具有非常好的高温耐受性,可能是链长较长的氨基载体 LX-1000HA 以及 PEGDGE 交联法对所制备的固定化酶的温度耐受性有很好的提升作用。

2.3.4 酸碱稳定性 由图 3d 可知,在不同 pH 的缓冲液中孵育 3h 后,固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 在酸性环境中具有较好的耐受性,而 LX-1000HA-GA-CRL 则在碱性环境表现良好,表现出相反的酸碱耐受性。这表明 LX-1000HA 和 LX-1000EA 两种不同链长的氨基载体对固定化酶的酸碱稳定性影响较小,而所使用的交联剂 PEGDGE 和 GA 对所制备的固定化酶的酸碱稳定性有着极大地影响,可能是由于不同交联剂与氨基载体和酶所形成的化学键型不同,导致所制备的固定化酶的酸碱稳定性具有极大差异。

2.3.5 操作稳定性 由图 3e 可知,重复操作 6 次后,固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 仍保留 74% 左右的酶活,而且在第 1 次至第 3 次,酶活稳定且基本保持在 90% 左右,没有表现出下降的趋势。相比于游离酶只能使用一次,该方法所制备的固定酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL,在操作稳定性方面表现出极佳的使用效果。同时与另外两种固定化酶 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 和 LX-1000HA-GA-CRL 相比, LX-1000HA-PEGDGE-CRL 的操作稳定性也具有较大优势。通过对三种固定化脂肪酶的比较也可以发现,环氧交联剂 PEGDGE 交联制备的两种固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 在操作稳定性方面更优于戊二醛交联制备的固定化酶 LX-

1000HA-GA-CRL。

2.3.6 储存稳定性 由图 3f 可知,固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 在 4℃ 保存 30 天后,残余 70% 左右的酶活,而游离酶只剩余 40% 左右,可见固定化后使得脂肪酶的储存稳定性提高,更有利于实际生产中的保存,提高了脂肪酶的使用和保存稳定性。另外,固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL、LX-1000EA-PEGDGE-CRL 与 LX-1000HA-GA-CRL 均比游离酶的储存稳定性有不同程度的提高。其中环氧交联剂 PEGDGE 交联得到的两种固定化酶的储存稳定性表现相似,但是由于环氧交联剂在交联载体和酶之后,在储存的过程中仍对酶的活性和稳定性有损害,需要通过在氨基酸等溶液中孵育去除所制备的固定化酶中多余的环氧基团^[39]。

3 结 论

LX-1000HA 与 LX-1000EA 均为含有伯氨基基团的有机载体。载体中氨基的臂长对固定化酶的性质有着重要的影响。LX-1000HA 比 LX-1000EA 的臂长较长,但是两种氨基载体在粒度和伯胺基团容量方面的差异并不明显。LX-1000HA 和 LX-1000EA 等氨基载体可以与双环氧试剂和戊二醛等双功能交联剂通过化学反应,对工业酶进行固定化。双环氧交联剂与戊二醛是不同类型的双功能交联剂,双环氧试剂具有两个环氧基团,与载体和酶的氨基反应形成稳定的 C-N 键,而戊二醛通过两个醛基与载体和酶的氨基形成希夫碱。但是由于戊二醛的毒性,以及其发生的化学反应剧烈不可控、形成希夫碱稳定性较弱等缺点,以双环氧交联剂为代表的新型的双功能交联剂有待进一步开发和利用。

本实验借助新型双环氧交联剂聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDGE),使用氨基载体 LX-1000HA 进行固定化脂肪酶,结合单因素和正交试验优化得到交联及固定化条件为:交联温度为 30℃,交联 2h,交联剂浓度 0.75%、pH7.0,加酶量 800U,载体量 0.50g,固定化 2h,固定化温度 45℃。由此制备得到固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 在最适条件下测得酶活达到 160.81U/g。固定化酶的最适反应温度相比于游离酶提高 15℃,在 70℃ 的环境中 3h 后酶活仍存留 70%,循环使用 6 次后残留 65% 左右的酶活,酸碱耐受性和储存稳定性也表现良好,4℃ 保存 30 天后剩余约 70% 的初始酶活。

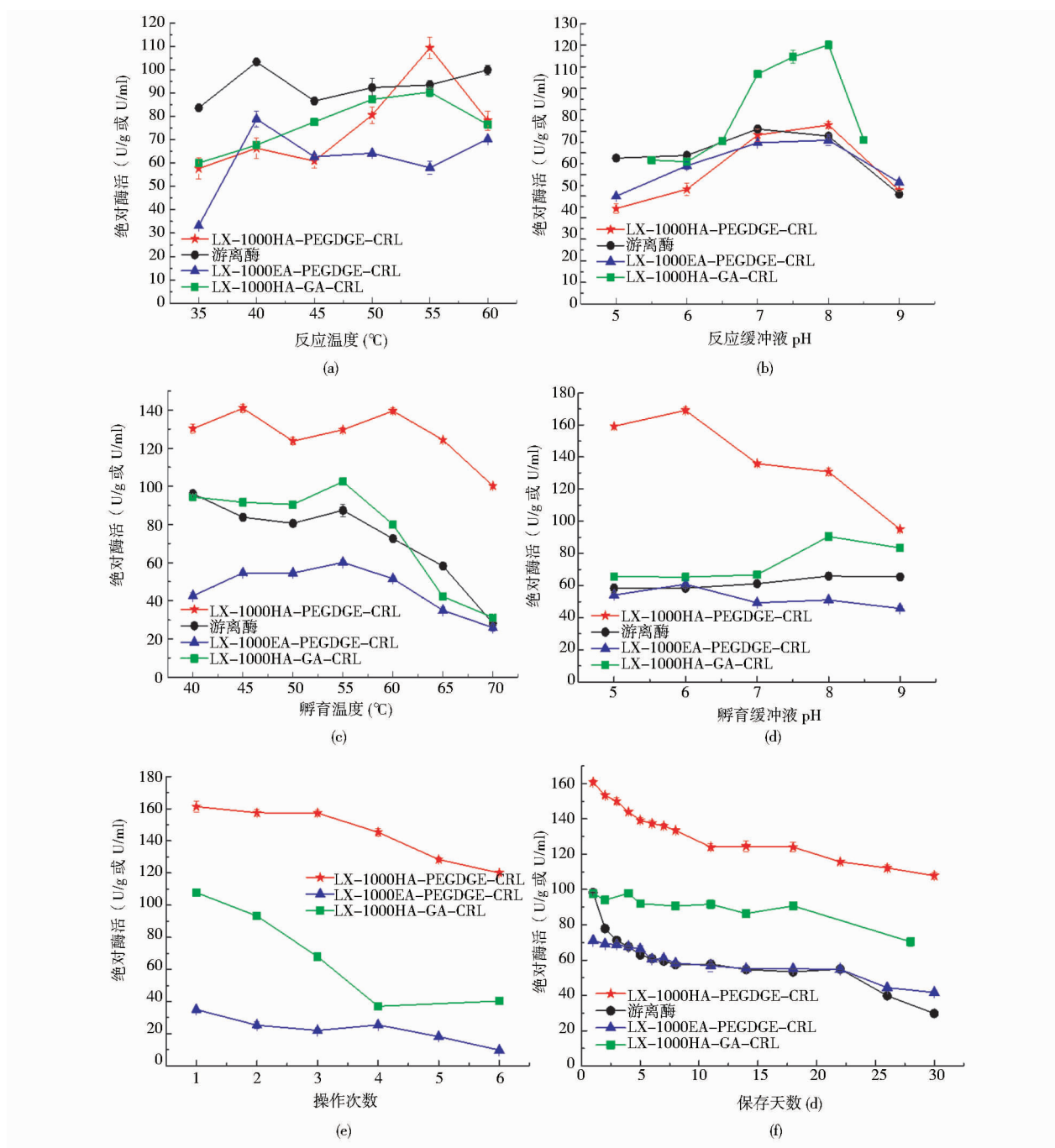


图3 固定化酶和游离酶的酶学性质比较

Fig. 3 Comparison of enzymatic properties between immobilized enzymes and free enzyme

(a) Comparison of the optimal reaction temperature between free enzyme and immobilized enzymes LX-1000HA-PEGDGE-CRL, LX-1000EA-PEGDGE-CRL, LX-1000HA-GA-CRL (b) Comparison of the optimal reaction pH between free enzyme and immobilized enzymes LX-1000HA-PEGDGE-CRL, LX-1000EA-PEGDGE-CRL, LX-1000HA-GA-CRL (c) Comparison of thermal stability between free enzyme and immobilized enzymes LX-1000HA-PEGDGE-CRL, LX-1000EA-PEGDGE-CRL, LX-1000HA-GA-CRL (d) Comparison of pH stability between free enzyme and immobilized enzymes LX-1000HA-PEGDGE-CRL, LX-1000EA-PEGDGE-CRL, LX-1000HA-GA-CRL (e) Comparison of the operation stability of immobilized enzymes LX-1000HA-PEGDGE-CRL, LX-1000EA-PEGDGE-CRL and LX-1000HA-GA-CRL on the catalytic capacity (f) Comparison of the storage stability of the free enzyme and immobilized enzymes LX-1000HA-PEGDGE-CRL, LX-1000EA-PEGDGE-CRL and LX-1000HA-GA-CRL

通过将本工作中制备的固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 与本课题组前期制备的固定化酶 LX-1000HA-GA-CRL^[40] 和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL^[41] 进行酶学性质的比较:环氧试剂在固定化过程中对酶活损失低于戊二醛,使用环氧试剂可以减少酶失活,制备的固定化酶活性高,耐热性提高,重复操作性好,更易保存,环氧试剂制备的固定化酶更能耐受酸性条件,这也拓宽了固定化酶的使用环境;对于载体链长因素对固定化的影响分析可以发现:长链的氨基树脂 LX-1000HA 所制备的固定化酶相比于短链制备的固定化酶,酶活性高,可以在高温 55℃ 发挥较好的催化能力,重复使用性更好。因此可以推断出交联剂和树脂的链长是影响固定化酶的重要因素。同时,本工作所制备的固定化脂肪酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 的酶活可达 160.81U/g,约为固定化脂肪酶 LX-1000HA-GA-CRL 和 LX-1000EA-PEGDGE-CRL 固定化酶酶活的 2 倍,具有更好的酶催化活性。

Reshmi 等^[42] 在研究中发现,利用脂肪酶的氨基与载体形成的共价键进行的固定化,可能降低构象的灵活性,使分子具有更高的活化能来重新变换成合适的构象以与底物结合。本实验利用氨基载体交联脂肪酶,正是利用酶的表面氨基,结果说明利用此方法制备的固定化酶确实保留了较好的催化能力。此外,本实验方法相比于徐然等^[43] 利用氨基硅胶交联戊二醛固定化的脂肪酶,在最适温度条件,重复使用性的表现更优异,这也凸显了环氧试剂的优势;本工作制备的固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 相比于张权等^[44] 利用戊二醛交联壳聚糖制备的固定化海洋脂肪酶, LX-1000HA-PEGDGE-CRL 最适反应温度更高,催化反应温度范围更广;相比于周蕊等^[45] 利用壳聚糖固定化海洋假丝酵母脂肪酶,本实验的 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 重复使用性表现更好,而且制备更加省时,可以较好的降低制备成本。同时本实验利用工业化有机载体相比于目前研究大热的新型载体,如磁性载体^[46]、介孔材料^[47] 和聚化物膜^[48-49] 等,其载体制备成本和时间成本远大于本实验所用的方法。本实验提供的方法最大的优势就是省时省力,方便快捷,也是最有可能应用到实际生产的方法。

本工作中首次基于新型的氨基载体和双环氧试剂制备的固定化酶 LX-1000HA-PEGDGE-CRL 具有显著的稳定性和耐受性,可以降低固定化脂肪酶成本,延长脂肪酶使用及保存寿命,在工业酶的固定化和药剂等

领域具有潜在的开发及利用价值。

参考文献

- [1] 陈秀琳. 脂肪酶固定化的研究概况. 海峡药学, 2007, 19(12): 114-116.
Chen X L. Overview of lipase immobilization. Strait Pharmaceutical Journal, 2007, 19(12): 114-116.
- [2] Patrick A. Immobilisation and application of lipases in organic media. Chem Soc Rev, 2013, 42(15): 6406-6436.
- [3] Cygler M, Schrag J D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. Elsevier, 1999, 1441(2-3): 205-214.
- [4] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology. Elsevier Ltd, 2002, 13(4): 390-397.
- [5] 魏雪, 孙丽超, 李淑英, 等. 脂肪酶的固定化及其在食品领域的应用. 生物技术通报, 2016, 32(11): 59-64.
Wei X, Sun L C, Li S Y, et al. Immobilization of lipase and its application in food industry. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(11): 59-64.
- [6] Guldhe A, Singh B, Mutanda T, et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. Elsevier Ltd, 2015, 41(jan.): 1447-1464.
- [7] Gandhi N N. Applications of lipase. Springer-Verlag, 1997, 74(6): 621-634.
- [8] Lima A C P, Cammarota M C, Gutarra M L E. Obtaining filamentous fungi and lipases from sewage treatment plant residue for fat degradation in anaerobic reactors. PEERJ, 2018, 6(e5368): 1-18.
- [9] 陈枫, 韦仕航. 微生物脂肪酶在动物饲料中的应用研究. 当代畜牧, 2014, 17: 84-85.
Chen F, Wei S H. Application of microbial lipase in animal feed. Contemporary Animal Husbandry, 2014, 17: 84-85.
- [10] 黄霜霜. 脂肪酶拆分手性药物布洛芬的工艺研究. 武汉: 华中科技大学, 2015.
Huang S S. Study on lipase-catalyzed resolution of chiral drug ibuprofen. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2015.
- [11] Carlsson N, Gustafsson H, Thoörn C, et al. Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective. Advances in Colloid and Interface Science, 2014, 205(2014): 339-360.
- [12] Nadar S S, Rathod V K. Encapsulation of lipase within metal-organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 108: 11-20.
- [13] Hilal N, Nigmatullin R, Alpatova A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. Journal of Membrane Science, 2004, 238(1): 131-141.

- [14] Zhang S, Shang W T, Yang X X, et al. Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of *p*-nitrophenol butyrate. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2013, 34(9): 2741-2746.
- [15] Feng W, Ji P J. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 889-895.
- [16] Xia J J, Zou B, Zhu G B, et al. Quick separation and enzymatic performance improvement of lipase by ionic liquid-modified Fe₃O₄ carrier immobilization. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 2018, 41(5): 739-748.
- [17] Zou B, Chu Y H, Xia J J, et al. Immobilization of lipase by ionic liquid-modified mesoporous SiO₂ adsorption and calcium alginate-embedding method. Appl Biochem Biotechnol, 2018, 185(3): 606-618.
- [18] Dicosimo R, McAuliffe J, Poulou A J, et al. Industrial use of immobilized enzymes. Chem Soc Rev, 2013, 42(15): 6437-6474.
- [19] Tran D N, Balkus K J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. ACS Catalysis, 2011, 1(8): 956-968.
- [20] Pulat M, Akalin G O. Preparation and characterization of gelatin hydrogel support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2013, 41(3): 145-151.
- [21] Aissaoui N, Landoulsi J, Bergaoui L, et al. Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: Influence of the crosslinking agent. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(6): 336-343.
- [22] 周清华. 组合固定化法增强交联脂肪酶聚集体稳定性的研究. 芜湖: 安徽工程大学, 2018.
- Zhou Q H. Enhanced the stability of cross-linked lipase aggregates by combined immobilization. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2018.
- [23] 卢大胜, 雍克岚, 陈旭, 等. 新型交联试剂三羟甲基磷固定 α -葡萄糖苷酶. 食品科学, 2005, 26(6): 61-64.
- Lu D S, Yong K L, Chen X, et al. Immobilization of α -glucosidase with a novel coupling reagent-tris(hydroxymethyl) phosphine. Food Science, 2005, 26(6): 61-64.
- [24] Csiffáry G, Fütő P, Adányi N, et al. Ascorbate oxidase-based amperometric biosensor for L-ascorbic acid determination in beverages. Food Technology and Biotechnology, 2016, 54(1): 31-35.
- [25] Boka B, Adanyi N, Szamos J. Putrescine biosensor based on putrescine oxidase from *Kocuria rosea*. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(5): 258-262.
- [26] 杨建军, 马晓迅, 王贵军. 大孔树脂吸附固定化脂肪酶机理研究. 西北大学学报(自然科学版), 2009, 39(2): 241-245.
- Yang J J, Ma X X, Wang G J. A study on mechanism of lipase immobilized with macroporous resins. Journal of Northwestern University (Natural Science Edition), 2009, 39(2): 241-245.
- [27] Cirillo G, Nicoletta F P, Curcio M, et al. Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. Elsevier B V, 2014, 83: 62-69.
- [28] 冯超, 蒋丽娟, 黎继烈, 等. 固定化脂肪酶研究进展. 食品工业科技, 2011, 32(2): 373-375, 378.
- Feng C, Jiang L J, Li J L, et al. Research progress of immobilized lipase. Food Industry Technology, 2011, 32(2): 373-375, 378.
- [29] 孟策, 戴小敏, 刘袖洞. 固定化脂肪酶的载体材料. 辽宁化工, 2018, 47(12): 1244-1249.
- Meng C, Dai X M, Liu X D. Carrier materials for lipase immobilization. Liaoning Chemical Industry, 2018, 47(12): 1244-1249.
- [30] 李阳, 韦伟, 曹茜, 等. 脂肪酶固定化新材料. 中国粮油学报, 2014, 29(7): 122-128.
- Li Y, Wei W, Cao Q, et al. New materials for immobilized lipase. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(7): 122-128.
- [31] 侯爱军, 徐冰斌, 梁亮, 等. 改进铜皂-分光光度法测定脂肪酶活力. 皮革科学与工程, 2011, 21(1): 22-27.
- Hou A J, Xu B B, Liang L, et al. A modified colorimetric assay of lipase activity using emulsified oliveoil as the substrate. Leather Science and Engineering, 2011, 21(1): 22-27.
- [32] Wang S G, Zhang W D, Li Z, et al. Lipase immobilized on the hydrophobic polytetrafluoroethylene membrane with nonwoven fabric and its application in intensifying synthesis of butyl oleate. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(7): 2015-2026.
- [33] Saisubramaniyan N, Krithika L, Dileena K P, et al. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry. Analytical Biochemistry, 2004, 330(1): 3-70.
- [34] Wang S G, Zheng D B, Yin L Y, et al. Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 107: 22-31.
- [35] Talukder M M R., Zaman M M, Hayashi Y, et al. Ultrasonication enhanced hydrolytic activity of lipase in water/isooctane two-phase systems. Biocatalysis and Biotransformation, 2006, 24(3): 194-289.
- [36] Zhang W D, Qing W H, Ren Z Q, et al. Lipase immobilized catalytically active membrane for synthesis of lauryl stearate in a pervaporation membrane reactor. Bioresource Technology, 2014, 172: 16-21.
- [37] Zheng G, Shu B, Yan S. Preparation and characterization of

- immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003,32(7):776-782.
- [38] Liu X Q, Guan Y P, Shen R, et al. Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. *Chromatography B*, 2005,822(1-2):91-97.
- [39] 徐珊,李任强,张继福,等. 孵育对环氧树脂固定化脂肪酶的稳定性研究. *华南农业大学学报*,2019,40(3):61-66.
- Xu S, Li R Q, Zhang J F, et al. Effect of incubation on the stabilization of lipase immobilized by epoxy resin. *Journal of South China Agricultural University*, 2019,40(3):61-66.
- [40] 朱衡,林海蛟,张继福,等. 氨基载体共价结合固定化海洋假丝酵母脂肪酶. *中国生物工程杂志*,2019,39(7):71-78.
- Zhu H, Lin H J, Zhang J F, et al. Covalent immobilization of marine *Candida rugosa* lipase using amino carrier. *China Biotechnology*, 2019,39(7):71-78.
- [41] 朱衡,张继福,张云,等. 聚乙二醇二缩水甘油醚交联氨基载体 LX-1000EA 固定化脂肪酶. *中国生物工程杂志*,2020,40(Z1):124-132.
- Zhu H, Zhang J F, Zhang Y, et al. Immobilization of lipase through cross-linking of polyethylene glycol diglycidyl ether with amino carrier LX-1000EA. *China Biotechnology*,2020,40(Z1):124-132.
- [42] Reshmi R, Sanjay G, Sugunan S. Immobilization of alpha-amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catal Commun*, 2007,8(3):393-399.
- [43] 徐然,韩生华,王立刚,等. 氨基硅胶固定脂肪酶的制备及其酶学性质研究. *山西大同大学学报*,2019,35(5):1-5.
- Xu R, Han S H, Wang L G, et al. Preparation and enzymatic properties of lipase immobilized on amino silica gel. *Journal of Shanxi Datong University*,2019,35(5):1-5.
- [44] 张权,盛军,刘均忠,等. 壳聚糖固定化海洋微生物 YS2071 脂肪酶及其酶学性质. *渔业科学进展*,2015,36(6):100-106.
- Zhang Q, Sheng J, Liu J Z, et al. Chitosan immobilization of lipase from marine microorganism YS2071 and its enzyme characteristics. *Progress in Fishery Sciences*, 2015,36(6):100-106.
- [45] 周蕊,邢炎华,王燕. 以壳聚糖-戊二醛为载体柔性固定假丝酵母脂肪酶 *Candida rugosa* lipase. *当代化工*,2019,48(8):1686-1689.
- Zhou R, Xing Y H, Wang Y. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by using chitosan-glutaraldehyde as support. *Contemporary Chemical Industry*,2019,48(8):1686-1689.
- [47] Kim M, Park J M, Um H J, et al. Immobilization of cross-linked lipase aggregates onto magnetic beads for enzymatic degradation of polycaprolactone. *Journal of Basic Microbiology*, 2010,50(3):218-226.
- [48] Zou B, Hu Y, Jiang L, et al. Mesoporous material SBA-15 modified by amino acid ionic liquid to immobilize lipase via ionic bonding and cross-linking method. *Ind Eng Chem Res*, 2013,52(8):2844-2851.
- [49] Vitola G, Büning D, Schumacher J, et al. Development of a novel immobilization method by using microgels to keep enzyme in hydrated microenvironment in porous hydrophobic membranes. *Macromolecular Bioscience*, 2017,17(5):1-12.

Immobilization of Marine Candida Lipase Using Novel Epoxy Cross-linker and Amino Carrier

ZHU Heng^{1,2,3} ZHANG Ji-fu⁴ ZHANG Yun¹ HU Yun-feng^{1,3}

(1 CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

(4 Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

Abstract After immobilization, the stability and environmental tolerance of the free enzyme were optimized, which can improve the utilization rate of enzymes and reduce the production costs in diverse fields such as food, medicine, chemical industry, environment and leather, and thus possesses great application potentials. The utilization of novel crosslinking agents in immobilized enzyme process has greatly advanced the study of immobilized enzymes. The optimized crosslinking and immobilization conditions were obtained by using

the new crosslinking agent polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDGE), which was immobilized with the amino carrier LX-1000HA, and by using single factor and orthogonal experiment optimization: crosslinking temperature 30℃, crosslinking time 2h, crosslinking agent concentration 0.75%, pH 7.0, enzyme amount 800U, carrier volume 0.5g, immobilized time 2h, immobilized temperature 45℃. Using the optimized immobilization process, the immobilized enzyme LX-1000HA-PEGDGE-CRL was prepared to achieve 160.81U/g which was about twice of the activities of immobilized enzyme LX-1000HA-GA-CRL(obtained by LX-1000HA and glutaraldehyde crosslinked lipase) and LX-1000EA-PEGDGE-CRL(obtained by short-chain amino carrier LX-1000EA and PEGDGE crosslinked lipase). The optimal reaction temperature of immobilized enzyme LX-1000HA-PEGDGE-CRL was found to be 15℃ higher than that of free enzyme; the immobilized enzyme could still remain 70% of its original activity after incubation at 70℃ for 3h; the immobilized enzyme could remain about 65% of its original activity after recycling for 6 times; the immobilized enzyme also behaved good tolerance to acid and alkali condition and good storage stability, the immobilized enzyme could remain about 70% of the initial enzyme activity after storage at 4℃ for 30 days. After the comparison of immobilized enzyme LX-1000HA-PEGDGE-CRL with free enzyme, immobilized enzyme LX-1000HA-GA-CRL and immobilized enzyme LX-1000EA-PEGDGE-CRL, the immobilized enzyme LX-1000HA-PEGDGE-CRL behaved better application effect in thermo-tolerance and reusability.

Key words Polyethylene glycol diglycidyl ether Amino-carrier Lipase Immobilization Enzymatic property

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按拼音首字母排列):

曹又佳 柴宝峰 陈 方 陈 振 陈忠斌 仇华吉 邓 宁 高钟镐 郭 宁 赫卫清
侯法建 侯 进 侯宗柳 胡 涛 黄永东 纪晓俊 鞠建松 乐卫东 梁前进 刘晋宇
卢大儒 栾国栋 马光辉 毛建平 孟 洁 潘洪玉 邱 飞 冉艳红 任宇红 施 一
苏志国 谭文杰 童一民 王金星 王 军 王 普 王文元 王义鹏 卫功元 吴 楠
熊智强 徐 勇 严景华 杨艳萍 姚 刚 张福萍 张京钟 张世宏 张学礼 张永清
钟 成 朱蕾蕾 庄英萍