

研究报告

D301 树脂固定化假丝酵母脂肪酶

王燕华, 朱凯, 刘辉, 韩萍芳, 韦萍

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要: 本研究选择 7 种吸附和离子交换树脂进行了假丝酵母脂肪酶(*Candida sp.* lipase)的固定化试验, 通过测定固定化后各脂肪酶的酶活, 筛选出固定化效果较好的弱碱性阴离子交换树脂 D301; 并通过扫描电镜将 D301 与脂肪酶 Novozym 435 的表面形貌做比较, 进一步选定 D301 树脂作为载体, 并对其采用戊二醛交联固定化, 研究并优化了其固定化条件。结果表明, 5%戊二醛溶液的加入量为 8 mL, 处理时间为 5 h, 酶液浓度为 1.0 g/L, 磷酸缓冲盐溶液 pH 6.0, 固定化处理 10 h 效果最好, 获得的固定化酶活力可达 35 U/mg, 酶的固定化效率约为 3.5 U/(mg·h)。

关键词: D301, 树脂, 固定化, 假丝酵母脂肪酶

Immobilization of *Candida sp.* lipase on resin D301

Yanhua Wang, Kai Zhu, Hui Liu, Pingfang Han, and Ping Wei

Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: We immobilized *Candida sp.* lipase onto seven kinds of industrial adsorption and ion exchange resins. By determining the activity of each immobilized enzyme, the weakly basic anionic exchange resin of D301 showed the best results for the immobilization of *Candida sp.* lipase. Comparing the scanning electron micrographs of D301 with Novozym 435 (immobilized *Candida antarctica* lipase B from Novo Nordisk Corp.), we selected D301 as a carrier for the immobilization of *Candida sp.* lipase. And we pretreated the resin D301 with the bifunctional agent glutaraldehyde and crosslinked it with *Candida sp.* lipase. The optimal conditions for the immobilization of *Candida sp.* lipase were as follows: 8 mL of the amount of 5% glutaraldehyde solution, five hours of the time pretreated D301 with glutaraldehyde, 1.0 g/L the concentration of *Candida sp.* lipase used, pH of the phosphate buffered, 6.0 and 10 hours of time for immobilization, respectively. The activity of immobilized enzyme was over 35 U/mg and the efficiency of immobilization was around 3.5 U/(mg·h).

Keywords: D301, resins, immobilization, *Candida sp.* lipase

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一类特殊的酰基水解酶,能够在油-水界面上催化酯水解、酯合成、酯交换、内酯合成、多肽合成、高聚物合成及立体异构体拆分等化学反应,在制药、试剂、食品加工、生物能源等方面有着很大的应用潜力,是目前被广泛研究的一种酶催化剂^[1-3]。由于游离酶不易回收,

很难重复利用,限制了其大规模应用。若将脂肪酶固定化于水不溶性载体上,可望重复使用和改善在有机溶剂中的活性^[4-6]。脂肪酶的固定有多种方法,主要包括吸附法、共价法、包埋法及交联法等。其中吸附法是一种古老而简单的方法,这种方法的优点是成本低,操作简单,固定化条件温和,载体能

Received: September 22, 2009; **Accepted:** November 16, 2009

Supported by: Innovation Fund for Doctoral Theses and Nanjing University of Technology (No. BSCX200811).

Corresponding author: Pingfang Han. Tel: +86-25-83172097; Fax: +86-25-83172083; E-mail: hpf@njut.edu.cn

南京工业大学博士生创新基金(No. BSCX200811)资助。

再生, 固定化酶活力高, 且固定的脂肪酶在有机介质中有着比在水相中更好的稳定性, 因此吸附法是固定脂肪酶的一种重要的方法^[7-12]。树脂是一类表面疏水性载体, 具有较大的孔径和比表面积, 理化性质稳定, 可通过氢键和疏水作用力与酶分子结合, 对酶分子的结构影响较小, 又可提高其催化活性, 同时树脂还具有价格较低的优点, 故非常适用于脂肪酶的固定化^[13]。

本研究以常见的工业用大孔吸附树脂与离子交换树脂为载体固定化假丝酵母脂肪酶, 并对其固定化条件进行了探讨, 为工业化经济高效地应用固定化脂肪酶提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 固定化载体及其预处理

选择 7 种工业应用广泛的吸附和离子交换树脂: D301、D113、AB-8、D3520、D4020、D290、D280, 购自南开大学化工厂。其中 D301 为大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂, D113 为大孔弱酸性丙烯酸系阳离子交换树脂, AB-8、D3520 和 D4020 为大孔吸附树脂, D290 和 D280 为大孔强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂。

大孔吸附树脂: 采用乙醇、丙酮、蒸馏水交替处理, 最后用蒸馏水冲洗至中性备用^[14]; 阳离子交换树脂: 将树脂用水洗至流出清水后, 用 2%~4% NaOH 浸泡 4~8 h 后用水洗至中性, 再用 5% 盐酸浸泡 4~8 h, 用水洗至 pH 6, 待用; 阴离子交换树脂: 将树脂用水洗至流出清水后, 用 5% 盐酸浸泡 4~8 h 后, 用水洗至 pH 6, 再用 2%~4% NaOH 浸泡 4~8 h, 用水洗至 pH 7~9, 待用。

1.2 药品与试剂

假丝酵母脂肪酶(*Candida* sp. lipase), 北京化工大学生命科学与技术学院谭天伟教授惠赠; 固定化脂肪酶 Novozym 435, 购自诺维信公司; 5% 戊二醛为生化试剂, Na₂HPO₄、KH₂PO₄ 均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 设备

752 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司); 电动搅拌器(常州国华电器有限公司)。

1.4 脂肪酶的固定化

采用单因素对比试验分别进行载体选择、5% 戊二醛溶液的加入量、酶液浓度、pH 环境和反应时间等条件的优化试验。

称取一定量脂肪酶粉溶解于 100 mL 设定 pH 值的磷酸缓冲液中, 并倒入 250 mL 具塞三角烧瓶中, 再加入设定量的载体, 在 5°C~8°C 低温冷却液循环泵中, 搅拌器搅拌反应 24 h。过滤, 测定上清液的蛋白质含量。抽滤分离固体和上清液, 并用同种缓冲液清洗该固定化酶, 自然风干, 收集后保存待用。

1.5 分析方法

1.5.1 脂肪酶蛋白含量的测定

按照 Bradford 法^[15]进行测定, 以牛血清白蛋白为标准。

1.5.2 游离酶及固定化酶水解活力的测定

均采用水解 pNPP 法^[16]测定。1 个酶活单位定义为: 在试验条件下, 每分钟分解对硝基苯酚酯释放 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量。

酶的固定化率按下式计算:

固定化率 = 固定化酶的总活力 / (加入游离酶的总活力 - 上清液游离酶的活力) × 100%。

酶的相对活力按下式计算:

相对活力 = 固定化酶的总活力 / 等量游离酶的总活力 × 100%。

1.5.3 游离酶及固定化酶热稳定性的测定

分别取一定量的固定化酶和游离酶在不同温度下保温数小时后, 于 40°C 进行催化对硝基苯酚酯裂解生成对硝基苯酚的反应, 在确定时间内测定产物的生成量, 进而确定两者的热稳定性。

2 结果与分析

2.1 树脂载体的选择

不同载体的固定化效果如表 1 所示。由表 1 可知, 不同载体的固定化效果差别明显, 其中, D301 为弱碱性阴离子交换树脂, 功能基为 -N(CH₃)₂; AB-8 为弱极性大孔吸附树脂。D301 树脂的固定化率和固定化酶活力均表现突出。初步选定固定化效果良好的 D301 离子交换树脂, 并对其表征。

2.2 D301 树脂的表征

商品脂肪酶 Novozym 435 是目前应用最为广泛的固定化脂肪酶, 它以聚丙烯酸大孔树脂作为固定化载体, 本研究以其作为参照物, 将 D301 载体的扫描电镜图与之对比, 进一步直观地了解该大孔树脂的表面形貌。

D301 树脂与脂肪酶 Novozym 435(固载于聚丙烯酸大孔树脂上)扫描电镜照片见图 1、图 2。由图可见, D301 树脂与脂肪酶 Novozym 435 两者的外观整体均呈球形, 经放大可以看到与脂肪酶 Novozym 435 相似, 外表面都是相对光滑的。

将 D301 树脂的剖面图与脂肪酶 Novozym 435 的进行对比, 见图 3。由图可见, D301 树脂的剖面图与脂肪酶 Novozym 435 的类似, 内部存在大量纵横交错的孔隙, 这有利于酶分子向孔中扩散, 在一定程度上可以加速吸附速度。

由图 4 可以看出, D301 树脂和 Novozym 435 吸附等温线对应的是第 IV 型的吸附等温线: 在较低的相对压力下发生的是单分子层吸附, 然后是多层吸附, 到达一定压力时产生一个突跃, 然后是外表面吸附。由于吸附和脱附不完全可逆, 造成在第 IV 型等温线上出现吸附和脱附等温线发生不重合产生滞后环,

表 1 不同树脂的脂肪酶固定化比较

Table1 Effect of various resins on lipase immobilization

Resins	D301	D113	AB-8	D3520	D4020	D290	D280
Enzyme loading (%)	2.37	1.52	1.91	1.68	1.83	1.47	1.38
Activity (U/mg ⁻¹)	21.4	11.1	17.0	12.3	13.9	10.1	9.5

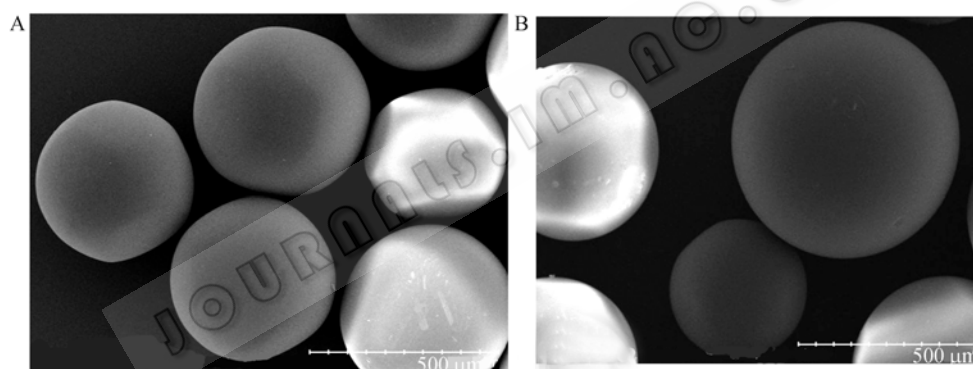


图1 放大100倍的外观图 (A)D301树脂; (B)脂肪酶Novozym 435

Fig. 1 Scanning electron micrographs (100×). (A) D301. (B)Novozym 435.

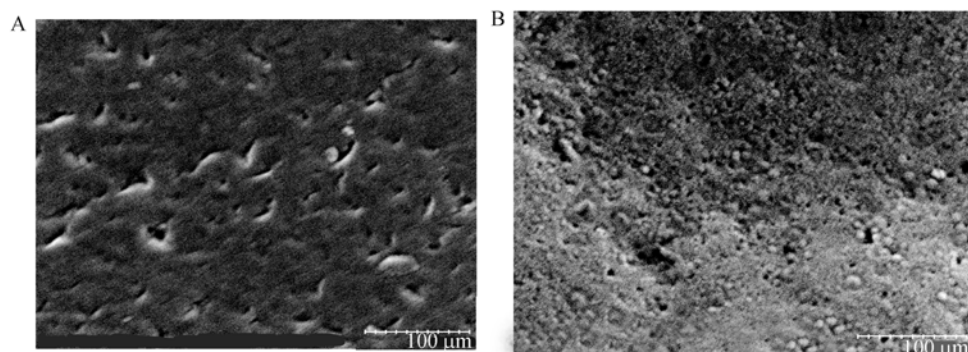


图2 放大30 000倍的表面图 (A)D301树脂; (B)脂肪酶Novozym 435

Fig. 2 Scanning electron micrographs (30 000×). (A) D301. (B) Novozym 435.

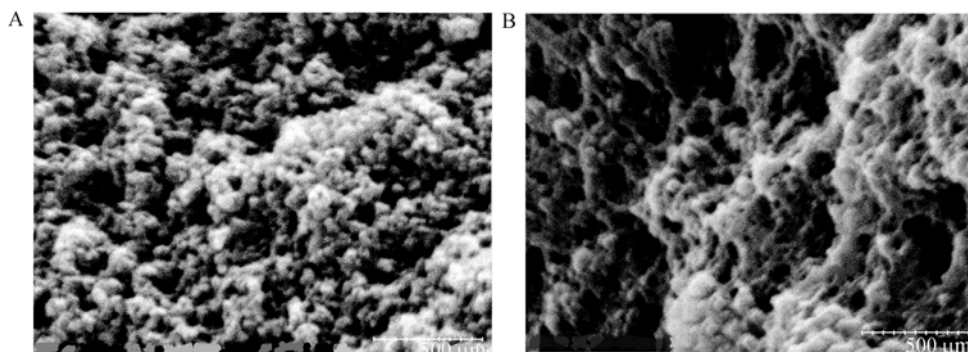


图3 放大30 000倍的剖面图 (A)D301树脂; (B)脂肪酶Novozym 435

Fig. 3 Scanning electron micrographs (30 000×). (A) D301. (B)Novozym 435.

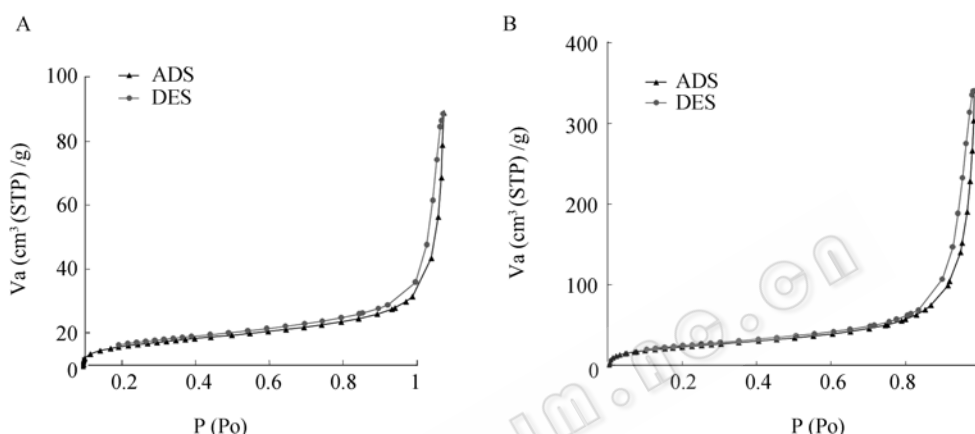


图4 等温吸附-脱附 (A) D301树脂; (B)脂肪酶Novozym 435

Fig. 4 N_2 adsorption-desorption isotherms of D301 (A) and Novozym 435 (B).

D301 树脂和 Novozym 435 滞后环的形状都属于 H3 型, 也就是载体孔道形状与尺寸呈现不均匀的规格, 这就为脂肪酶的固定化及采用交联法提供了可能。

综上, 本研究选定 D301 离子交换树脂, 进行戊二醛交联处理, 并研究其最适固定化条件。

2.3 戊二醛处理条件的优化

2.3.1 戊二醛加入量对固定化效果的影响

固定其他条件, 载体用 5% 戊二醛处理, 改变戊二醛加入量, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 固定化酶活力在加入 8 mL 戊二醛时达到最大, 而加入量增大时较低。这是因为双功能试剂戊二醛既可以与载体和酶蛋白上的氨基结合, 使酶固定化, 又可以与载体相互间结合使载体上功能基团失去作用。由于戊二醛的作用, 载体与固定化的酶分子之间加入了戊二醛短臂, 酶分子作用的空间自由度增加, 底物和产物的扩散限制作用减小, 制备的酶活性提高, 但当戊二醛加入量较多时由于树脂功能基团的失活,

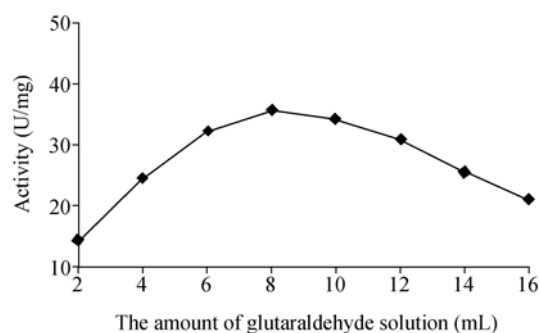


图5 戊二醛加入量对酶固定化的影响

Fig. 5 Effect of the amount of glutaraldehyde solution on lipase immobilization.

结合的酶量降低, 导致固定化酶活力降低。因此, 表现为加入 8 mL 戊二醛处理时酶活力较高而加入较多量时活力降低。

综上所述, 在本研究条件下加入 8 mL 5% 戊二醛溶液处理时效果较好。

2.3.2 戊二醛处理时间对固定化效果的影响

固定其他条件, 改变戊二醛处理时间进行固定

化处理, 结果如图 6 所示。在加入戊二醛处理 5 h 后, 固定化酶的活性其后无太大变化, 这显示在本研究条件下戊二醛的作用 5 h 已基本反应完全。

2.4 酶处理条件对固定化效果的影响

2.4.1 pH 对固定化效果的影响

固定其他条件, 改变磷酸缓冲盐溶液的 pH 值进行固定化试验, 结果如图 7 所示。在 pH 6.0 处理时, 固定化酶活性最大, 效果最好, 偏酸和偏碱性环境效果均不好, 故本试验选用 pH 6.0 的磷酸缓冲盐溶液处理。

2.4.2 酶液浓度对固定化效果的影响

固定其他条件, 改变酶液的浓度进行固定化试验, 结果如图 8 所示。图 8 随着酶液浓度的增加, 固定化酶活性增加, 酶液浓度在 0.5~1.0 g/L 时酶活性增加迅速, 而在 1.0~2.5 g/L 范围内酶活性增加缓慢, 这是由于随着加酶量的增加, 固定化载体上结合的酶分子增加, 酶活性迅速提高, 当达到一定程度时, 结合的酶分子过多会造成酶作用的空间位阻加大, 从而酶活性的增加相对减缓, 可见并非加酶量越多, 酶活越高。从固定化酶活性与经济角度考虑, 选择酶液浓度为 1.0 g/L。

2.4.3 时间对固定化效果的影响

固定其他条件, 改变时间进行固定化试验, 结果如图 9 所示。由图 9 可以看出, 固定化酶活性随着时间的延长而增加, 作用 10 h 达到最大值, 其后无太大变化, 趋于平衡。

2.5 固定化酶与游离酶的热稳定性

在 50°C 下分别加热游离酶和固定化酶 0~6 h, 然后迅速降温至 40°C, 测定酶的残余活力。结果见图 10。游离酶在 50°C 下保温 6 h 后, 几乎无活力; 固定化酶在 50°C 下保温 6 h, 相对活力仍然保持在 60% 以上, 可见脂肪酶的热稳定性经固定化后大为提高。

3 结论

选择有代表性的 7 种大孔吸附和离子交换树脂进行比较试验, 并对效果较好的离子交换树脂用戊二醛进行交联固定化, 研究其固定化条件, 得到如下结果: 弱碱性阴离子交换树脂 D301 对 *Candida* sp. lipase 的固定化效果较好; 5% 戊二醛溶液的加入量为 8 mL、处理时间 5 h、酶液浓度为 1.0 g/L、磷酸

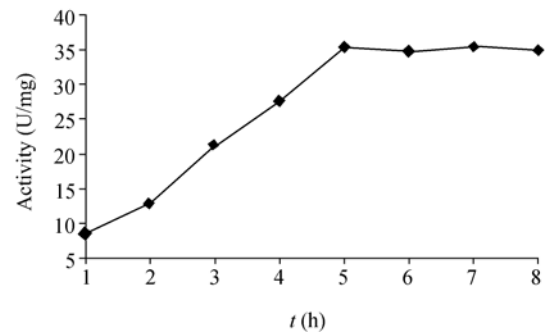


图6 处理时间对酶固定化的影响

Fig. 6 Effect of processing time on lipase immobilization.

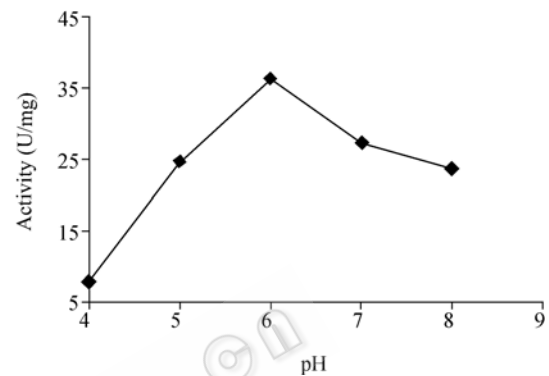


图7 pH值对酶固定化的影响

Fig. 7 Effect of pH on lipase immobilization.

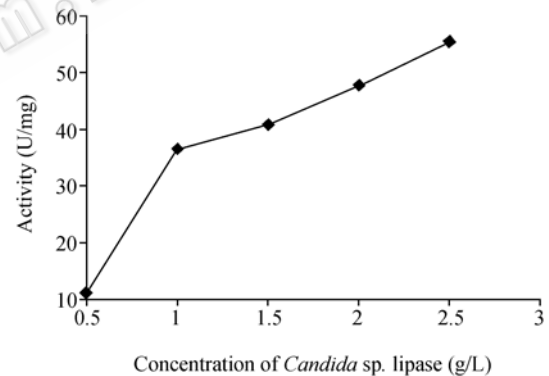


图8 酶液浓度对酶固定化的影响

Fig. 8 Effect of the concentration of *Candida* sp. lipase on lipase immobilization.

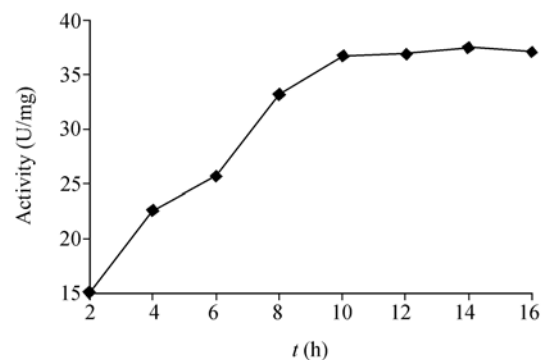


图9 时间对酶固定化的影响

Fig. 9 Effect of time on lipase immobilization.

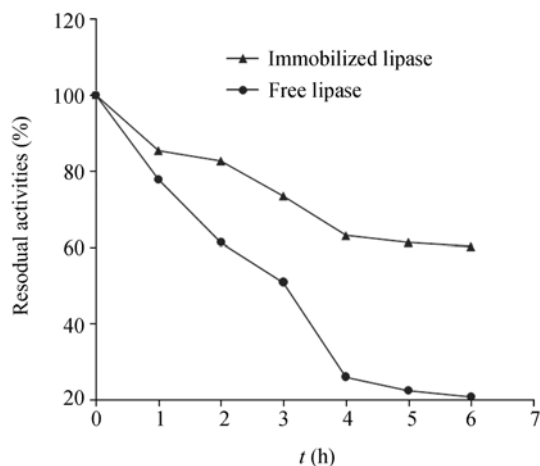


图10 固定化酶和游离酶的热稳定性

Fig. 10 Thermal stability of free and immobilized lipase.

缓冲盐溶液 pH 6.0、固定化处理 10 h 时, 效果最好, 获得的固定化酶活力可达 35 U/mg, 比游离酶的酶活(约为 10 U/mg)提高了两倍多, 酶的固定化效率约为 3.5 U/(mg·h)。因此以 D301 树脂为载体固定化假丝酵母脂肪酶是可行的, 而且树脂材料既常见又经济, 这就大大降低了固定化成本, 为广泛应用树脂固定化假丝酵母脂肪酶提供了可能。

REFERENCES

- [1] Zeng SH, Yang JK, Yan YJ. Studies on stability of immobilized lipase and its application. *Chin J Bioproc Eng*, 2007, **5**(1): 45–49.
曾淑华, 杨江科, 闫云君. 固定化脂肪酶性质及其应用研究. *生物加工过程*, 2007, **5**(1): 45–49.
- [2] Liu XX. Review of the method about lipase immobilization. *J Hebei Normal Univ (Nat Sci Ed)*, 2001, **25**(3): 370–373.
刘新喜. 脂肪酶固定化方法的研究进展. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 2001, **25**(3): 370–373.
- [3] Sivozhelzev V, Bruzzese D, Pastorino L, et al. Increase of catalytic activity of lipase towards olive oil by langmuir-film immobilization of lipase. *Enzyme Microb Technol*, 2009, **44**: 72–76.
- [4] Cai HJ, Fu DY, Wang MY, et al. Investigation of immobilized lipase onto macroporous carrier. *Chin J Proc Eng*, 2007, **7**(4): 773–777.
蔡宏举, 付大雁, 王满意, 等. 大孔载体固定化脂肪酶. *过程工程学报*, 2007, **7**(4): 773–777.
- [5] Zeng SH, Yang JK, Xu L, et al. Lipase immobilization and its stability analysis. *Biotechnol*, 2006, **16**(4): 54–57.
曾淑华, 杨江科, 徐莉, 等. 脂肪酶固定化及其稳定性研究. *生物技术*, 2006, **16**(4): 54–57.
- [6] Ghiaci M, Aghaei H, Soleimanian S, et al. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Appl Clay Sci*, 2009, **43**: 289–295.
- [7] Cui J, Wu JP, Yang LR, et al. Study on the immobilization of lipase. *Chem React Eng Technol*, 2005, **21**(1): 43–48.
崔娟, 吴坚平, 杨立荣. 脂肪酶固定化研究和应用. *化学反应工程与工艺*, 2005, **21**(1): 43–48.
- [8] Wang ZG, Wan LS, Liu ZM, et al. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, **56**: 189–195.
- [9] Cruz JC, Pfromm PH, Rezac ME. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on fumed silica. *Proc Biochem*, 2009, **44**: 62–69.
- [10] Chen JL, Qi JC, Cao YZ, et al. Research progress of immobilized enzyme. *Chem Bioeng*, 2006, **23**(2): 7–9.
陈建龙, 祁建城, 曹仪植, 等. 固定化酶研究进展. *化学与生物工程*, 2006, **23**(2): 7–9.
- [11] Gao SL, Wang YJ, Wang T, et al. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Biores Technol*, 2009, **100**: 996–999.
- [12] Cao GM, Sheng M, Gao GD. Studies on the immobilization of lipase and the properties of the immobilized lipase. *Biotechnol*, 1997, **7**(3): 14–17.
曹国民, 盛梅, 高广达. 脂肪酶的固定化及其性质研究. *生物技术*, 1997, **7**(3): 14–17.
- [13] Gao HJ, Wang WF, Xia XL, et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* and its application to resolution of 2-octanol. *Fine Chem*, 2008, **25**(4): 338–341.
高红娟, 王卫飞, 夏小乐, 等. CALB 脂肪酶的固定化及其拆分 2-辛醇的研究. *精细化工*, 2008, **25**(4): 338–341.
- [14] Ai ZL, Jiang ZQ, Li LT, et al. Immobilization of xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 using resin D380. *Food Ferm Ind*, 2004, **30**(2): 10–14.
艾志录, 江正强, 李里特, 等. 大孔树脂 D380 固定化橄榄绿链霉菌 E-86 来源木聚糖酶的研究. *食品与发酵工业*, 2004, **30**(2): 10–14.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **76**: 248–254.
- [16] Ihara F, Ageyama Y, Hirata M, et al. Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species. *J Biol Chem*, 1991, **266**(27): 18135–18140.