

二氧化硅纳米材料固定中性脂肪酶的条件优化及其特性

金杰¹, 杨艳红², 吴克¹, 王华林², 刘斌¹, 俞志敏¹

1 合肥学院应用酶学与工程重点实验室 城市固废处理与资源化利用安徽省工程技术研究中心, 合肥 230022

2 合肥工业大学化学工程学院, 合肥 230009

摘要: 以二氧化硅纳米材料为载体, 采用吸附法对脂肪酶进行固定化, 研究了不同条件对固定化脂肪酶的催化活性的影响, 得到最佳的固定化条件: 给酶量为 28 300 U/g, 固定化温度为 45°C, pH 值为 7.5, 时间为 10 h, 此时固定化酶的活力约为 3867 U/g 载体。固定化酶的最适反应温度为 45°C, 比游离酶的反应温度高 5°C, 最适 pH 下降到 5.5, 低于游离酶的反应 pH (pH 7)。固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性较游离酶有了很大的提高, 其在 70°C 以下能保持 70% 以上的酶活力, 而游离酶在 50°C 下残余酶活力仅为 30%。在 pH 5~8 的范围内, 固定化酶的酶活力能保持 50% 以上, 而游离酶只能保持 20% 左右。用固定化的中性脂肪酶催化不同的油品, 即大豆油、菜籽油及泔水油生产生物柴油, 菜籽油的酯化率最高。

关键词: 二氧化硅纳米材料, 固定化, 脂肪酶, 生物柴油

Optimize conditions and activities for neutrophil lipase immobilized by nano-silica dioxide

Jie Jin¹, Yanhong Yang², Ke Wu¹, Hualin Wang², Bin Liu¹, and Zhimin Yu¹

1 Key Laboratory of Applied Enzymology & Engineering, the Engineering Technology Research Center for Municipal Solid Waste and Resource Application of Anhui Province, Hefei University, Hefei 230022, China

2 School of Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230039, China

Abstract: We used adsorption method to immobilize the lipase by using nano-silica dioxide as the carrier. And we also studied different immobilization conditions effects on the catalytic activity. We got optimize immobilization conditions which were as follow the lipase quantity of 28 300 U/g, temperature of 45°C, pH of 7.5 and treated for 10 h. Under these conditions the immobilized lipase activity yield 3867 U/g carrier. The best reactive temperature for immobilized lipase was 45°C and higher than 5°C for free enzyme, and the optimal pH dropped to 5.5 compared that of free enzyme (pH 7.0). The immobilized lipase stability for thermal and pH are improved than free lipase. When temperature was below 70°C the immobilized enzyme activity was over 70% than initial activity. The free lipase activity just kept original 30% at 50°C. When pH was 5~8, the immobilized lipase activity was still more than 50% and the free lipase only remained 20%. When we used the immobilized neutrophil lipase catalyzing different oil to produce biodiesel such as soybean oil, rapeseed oil and waste oil, the esterification rate of rapeseed oil was the highest.

Keywords: nano-silica dioxide, immobilization, lipase, biodiesel

Received: October 9, 2009; **Accepted:** November 13, 2009

Supported by: Scientific and Technological Project of Anhui Province (No. 07010202077).

Corresponding author: Ke Wu. Tel: +86-551-2158448; E-mail: wuke@hfu.edu.cn.

安徽省科技厅重点攻关项目(No. 07010202077)资助。

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一种非特异性酶^[1],其在脂肪酸和甘油的工业生产方面有着巨大潜力^[2]。72 h内,每当量油中 15 个单位的脂肪酶可以水解95%~98%的动物脂、椰子油和橄榄油^[2]。在商业和基础酶学方面,固定化是酶经济再利用的关键步骤。

用于生物柴油生产的固定化酶,其制备方法通常有以下几种,即吸附法、共价法、包埋法及交联法。这些方法都被应用在生物柴油的固定化酶的制备上。其中吸附法是一种古老、适用的方法,这种方法的优点是成本低、操作简单、固定化条件温和、载体能再生、固定酶活力高。在脂肪酶的固定化方法中,吸附法研究得较多。作为固定化的载体有很多,包括无机载体和有机载体。其中,聚丙烯酰胺共聚纳米粒子^[3]、聚(N-乙烯-2-吡咯烷酮-2-羟乙基丙烯酸甲酯)水凝胶^[4]、TiO₂ 醋酸纤维素凝胶纤维^[5]和空心纤维薄膜^[6]作为新型载体运用于固定化酶的制备。虽然在无机载体材料上吸附和截留酶是酶固定化中比较适用的技术,但是却会受到蛋白质解吸以及扩散限制^[7-8],而功能化二氧化硅上的纳米微孔具有优良的酶的固定化性能^[9]。因此,由二氧化硅材料改性而具有较大的比表面积和表面活性的群体,更适合制备固定化酶的载体。这些载体非常适用于酶的吸附,吸附的蛋白质的量大且稳定^[10]。另一方面,纳米粒子由于独特的尺寸和物理性质,比如具有小粒径效应、表面效应及界面效应,因此具有比表面积大等诸多优点。基于上述所有因素,二氧化硅纳米材料非常适用于酶的固定化。

生物柴油是由可再生的动植物油脂与短链醇(甲醇或乙醇)经酯化反应制得的脂肪酸酯(甲酯或乙酯)。它具有低硫量、低芳烃含量、极好的润滑性、可再生性和环境友好等优点^[11-13],是一种优质的清洁燃料,是石化柴油最理想、最有发展前途的替代燃料。生产生物柴油时,有机相中的固定化酶的载体的稳定性非常重要。通常情况下,无机材料在有机相中具有更好的稳定性,如硅藻土^[14]。同时,也有研究利用 SiO₂ 纳米材料^[15]、改性硅胶^[16]、溶胶-凝胶^[17]等作为固定化酶固定化的载体。但是,到目前为止利用 SiO₂ 纳米材料制备固定化脂肪酶的研究较为少见。

本研究以自制的二氧化硅纳米材料作为固定化

载体,用简单的物理吸附法固定脂肪酶,研究了固定化反应条件对固定化酶的催化活性和载体吸附蛋白量的影响,筛选得到最佳的固定化反应条件,并且对固定化酶的性质与游离酶进行对比和分析。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料及设备

脂肪酶,由合肥学院应用酶学与工程重点实验室提供,平均酶活力为 1850 U/g。

水浴恒温振荡器 SHA-C,购自江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;循环水式多用真空泵 SHB-III,购自郑州长城科工贸有限公司;数显多功能搅拌器 HJ-5,购自常州国华电器有限公司;冷冻干燥机 FD5512,购自 ilShin lab Co., Ltd。

1.2 实验方法

1.2.1 载体的制备

目前,制备二氧化硅纳米材料的方法很多,其中,大多使用溶胶-凝胶法。本实验以氨水作为催化剂水解正硅酸乙酯(TEOS)制备二氧化硅纳米材料。恒温 25°C 下,定量的正硅酸乙酯与无水乙醇在 500 r/min 的转速下搅拌 3 min 后,加入氨水,并在 750 r/min 的转速下搅拌 3 min,然后在转速为 500 r/min 下搅拌 15~18 h,将得到的溶液装入离心管中,用无水乙醇洗涤 3 次,倒出上清液,得到的固体晾干后即 200 nm 二氧化硅纳米材料。

1.2.2 脂肪酶的固定化

取定量的自制的二氧化硅纳米材料加入定量的酶液中,恒温水浴搅拌一定时间后,冷冻干燥,再用磷酸缓冲液(pH 7.5, 0.05 mol/L)抽滤或离心,最后冷冻干燥。所得固定化酶放于 4°C 冰箱中保存。

1.2.3 脂肪酶水解活力的测定

采用橄榄油水解法^[18]测定脂肪酶的活性:在 40°C、pH 7.5 的条件下以每分钟催化脂肪水解产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量为一个单位酶活力(U=μmol/(min·g))。

1.2.4 酶的最适温度和热稳定性

最适温度的测定:将固定化酶和游离酶分别置于不同的温度下,测定其活力(pH 控制在 7.5)。

热稳定性的比较:将固定化酶和游离酶在不同温

度下保育 1 h, 在 40°C、磷酸缓冲液(pH 7.5, 0.05 mol/L)中测定酶活, 定义未经处理酶的酶活力为 100%。

1.2.5 酶的最适 pH 和 pH 稳定性

最适 pH 测定: 在 40°C 下, 改变缓冲液的 pH, 在不同的 pH 条件下测定固定化酶和游离酶的活力。

pH 稳定性的比较: 将固定化酶和游离酶在 4°C、不同的 pH 下保育 1 h, 在 40°C、磷酸缓冲液(pH 7.5, 0.05 mol/L)中测定酶活, 定义未经处理酶的酶活为 100%。

1.2.6 酶促酯交换合成生物柴油

在 3 个 500 mL 具塞的两口圆底烧瓶中, 加入适量正己烷、甲醇和一定量的固定化酶, 并分别加入 10 g 大豆油、菜籽油、泔水油, 在 42°C 下, 搅拌反应 8 h。

2 实验结果与讨论

2.1 二氧化硅纳米材料固定化脂肪酶条件的研究

2.1.1 固定化载体承载量

当固定化载体相对较少时, 可能由于每个载体分子表面吸附的蛋白量相对过多, 造成酶分子相互聚集成团, 酶分子的活性中心有可能被遮盖, 所以二氧化硅纳米材料吸附的蛋白量多少, 是影响酶的催化活性的因素。从图 1 可见, 在一定的二氧化硅纳米材料中, 随着酶液的量相对增加, 二氧化硅纳米材料吸附的蛋白量逐渐升高; 当酶液超过一定量时, 固定化酶的催化活力逐渐降低。本实验中, 载体二氧化硅纳米材料的酶活承载量为 28 300 U/g, 固定化酶的酶活为 3867 U/g。

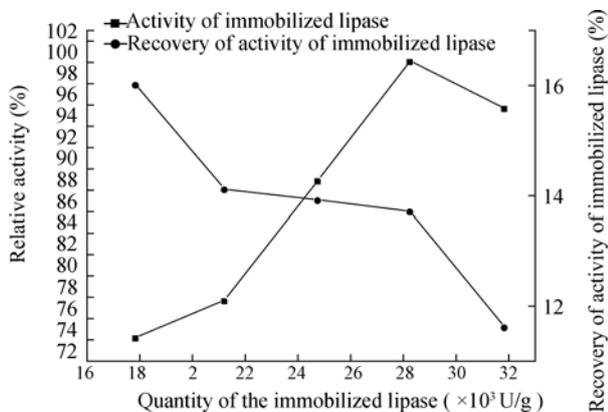


图 1 固定化酶承载量的影响
Fig. 1 Effect of quantity on lipase immobilization.

2.1.2 温度对酶固定化的影响

在相同的固定化时间内, 温度将直接影响酶吸附到载体上的效率, 但是高温会导致蛋白质变性, 甚至失活。因此酶在固定化时温度的选择十分重要。实验结果表明, 随着固定化温度的升高, 载体的蛋白质吸附量有所增高。但是由于高温会导致蛋白质变性, 因此尽管二氧化硅纳米材料对蛋白质的吸附量增加, 酶活力反而急剧下降。如图 2 所示, 固定化酶的酶活在 45°C 时达到最大值, 然后开始下降。因此, 本实验中, 最佳的固定化温度范围为 45°C。

2.1.3 时间对酶固定化的影响

时间的长短对固定化脂肪酶催化活力和载体吸附蛋白量也产生影响。在 pH 7.5, 固定化温度为 45°C, 固定化载体承载量为 28 300 U/g 的条件下考察固定化时间对固定化酶活力的影响。如图 3 所示,

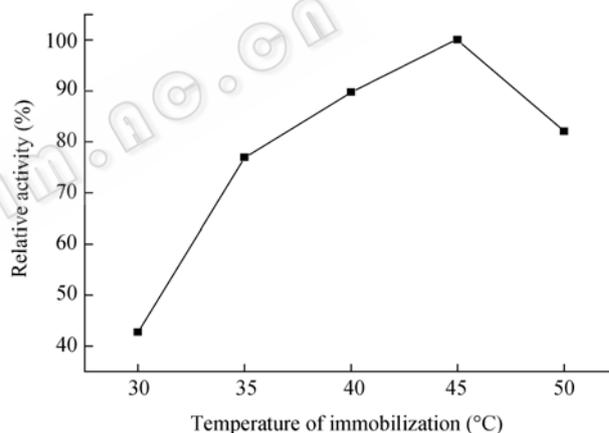


图 2 固定化温度对酶固定化的影响
Fig. 2 Effect of temperature on lipase immobilization.

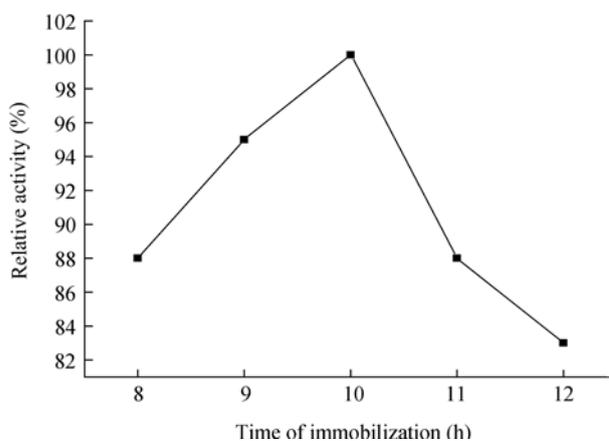


图 3 固定化时间对酶固定化的影响
Fig. 3 Effect of time on lipase immobilization.

固定化酶的活力在 10 h 达到最大, 随后开始减少。因此二氧化硅纳米材料固定化该脂肪酶的时间选择在 10 h 比较合适。

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 酶的最适反应温度

在 30°C~70°C 的范围内研究了固定化酶和游离酶的最适反应温度, 定义固定化酶和游离酶的最高比活力为 100%, 如图 4 所示。结果表明, 固定化酶的最适反应温度为 45°C, 而游离酶的最适反应温度为 40°C, 在最适反应温度之后, 随着温度的升高固定化酶的比活力下降速率明显小于游离酶比活力的下降速率, 当达到 70°C 时, 游离酶的比活力下降到 25%, 而固定化酶仍能保持 65%, 这表明酶经过固定化后有更广泛的温度使用范围。

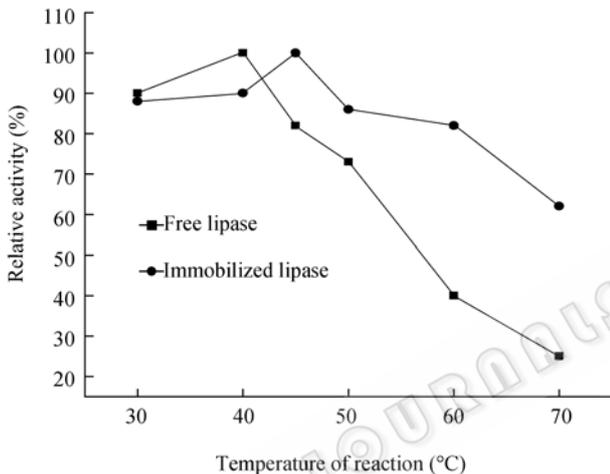


图 4 酶的最适反应温度

Fig. 4 Optimum reaction temperature of immobilized and free lipase.

2.2.2 酶的热稳定性

在 30°C~70°C 范围内比较了固定化酶和游离酶的热稳定性, 结果如图 5 所示。图 5 表明固定化酶在 70°C 以下能保持 70% 以上的酶活, 而游离酶在 45°C 以上酶活力急剧下降, 50°C 下残余酶活约为 30%, 这表明经过固定化后酶的热稳定性得到了很大的提高。

2.2.3 酶的最适 pH

在 pH 5~8 的范围内比较了固定化酶和游离酶的 pH 稳定性, 定义固定化酶和游离酶的最高比活力为 100%, 结果见图 6。从图 6 可看出, 固定化酶的最适反应 pH 值比游离酶向酸性方向移动了 1.5 个单位。这种现象可能与固定化酶的固定化载体有关。

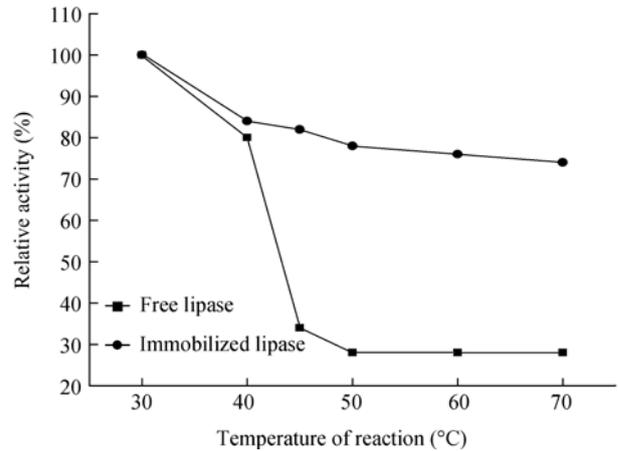


图 5 酶的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of immobilized and free lipase.

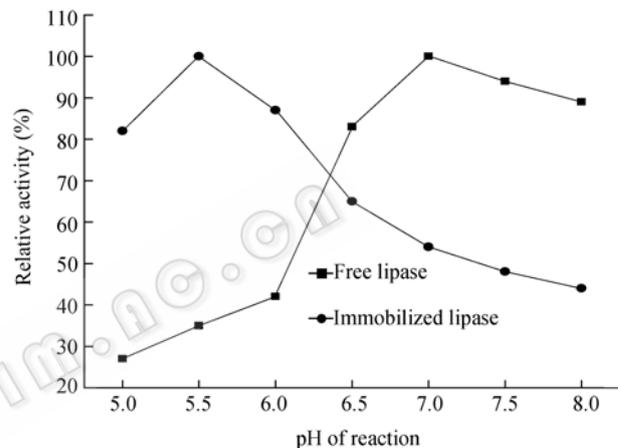


图 6 酶的最适反应 pH

Fig. 6 Optimum reaction pH of immobilized and free lipase.

2.2.4 酶的 pH 稳定性研究

在 pH 5~8 的范围内比较了固定化酶和游离酶的 pH 稳定性, 结果见图 7。从图 7 可看出, 游离酶在 pH 7~8 的范围内较稳定, 而固定化酶在 pH 5~6 的范围内较稳定。在 pH 5~8 的范围内, 固定化酶的活力能保持约 50% 以上的酶活, 而游离酶却只能保持约 20% 以上的酶活, 这表明酶经过固定化后稳定性得到一定程度的提高。

2.3 二氧化硅纳米材料固定化中性脂肪酶的应用

在生物柴油合成反应中, 使用不同的原料, 会有明显不同的酯转化率。本实验在醇油摩尔比为 1:3、60% (基于油的重量) 的固定化脂肪酶、60% (基于油的重量) 正己烷作为溶剂、42°C 反应 8 h 的体系中, 考察了以泔水油、菜籽油、大豆油为原料的酯合成的反应情况。

由图 8 可知, 以酯化率为指标时, 脂肪酶酯化反应中, 菜籽油的酯化率最高, 而泔水油最低。这是

因为泔水油中酸值较高, 杂质较多, 影响了酯化率, 而相对于泔水油来说, 菜籽油、大豆油的成分较纯, 因此同等条件下, 酯化率较高。

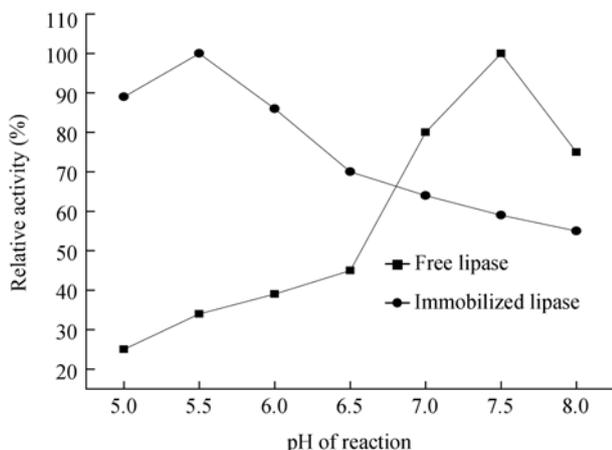


图 7 酶的pH稳定性

Fig. 7 pH-stability of immobilized and free lipase.

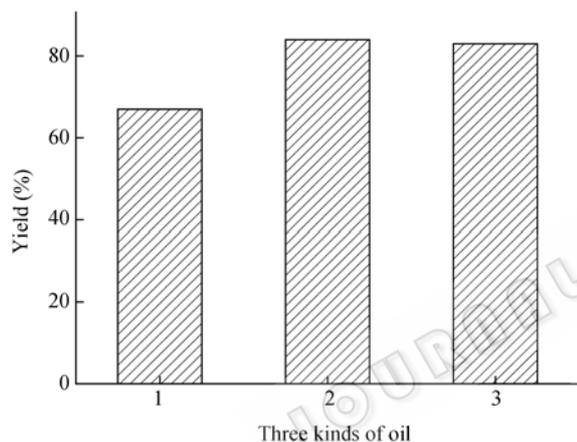


图 8 三种不同油的固定化脂肪酶的酯化试验

Fig. 8 Esterification rate of three kinds of oil. 1: waste oil; 2: rapeseed oil; 3: soybean oil.

3 结论

通过对脂肪酶固定化条件的研究, 得出最佳固定化条件为: 载体承载量为 28 300 U/g, 温度 45°C, pH 值 7.5, 固定化 10 h, 此时固定化酶的活力约为 3867 U/g。固定化酶的最适反应温度和最适反应 pH 都较游离酶发生了改变, 如游离酶的反应温度为 40°C, 而固定化酶上升至 45°C; 游离酶的反应 pH 为 7, 而固定化酶下降到 5.5。固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性也都比游离酶有了更大的提高。用二氧化硅纳米材料固定的中性脂肪酶催化不同的油品生产生物柴油, 其中催化菜籽油生产生物柴油较好。

REFERENCES

- [1] Benzonana G, Esposito S. On the positional and chain specificities of *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta*, 1971, **231**: 15–22.
- [2] Linfield WM, O'Brien DJ, Serota S, *et al.* Lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. *J Am Oil Chem Soc*, 1984, **61**: 1067–1071.
- [3] Wang YJ, Jiang HL. Study on the immobilization of lipase by polyacrylamide nanoparticles. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
王燕佳, 蒋惠亮. 聚丙烯酰胺类共聚纳米粒子固定脂肪酶的研究. 无锡: 江南大学, 2008.
- [4] Basri M, Wong CC, Ahmad MB, *et al.* Immobilization of lipase on poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel for the synthesis of butyl oleate. *J Am Oil Chem Soc*, 1999, **76**: 571–577.
- [5] Ikeda Y, Kurokawa Y. Synthesis of geranyl acetate by lipase entrap-immobilized in cellulose acetate-TiO₂ gel fiber. *J Am Oil Chem Soc*, 2001, **78**: 1099–1103.
- [6] Goto M, Kawakita H, Uezu K, *et al.* Esterification of lauric acid using lipase immobilized in the micropores of a hollow-fiber membrane. *J Am Oil Chem Soc*, 2006, **83**: 209–213.
- [7] Faber K, editor. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 5rd ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1997: 345.
- [8] Subramanian A, Kennel SJ, Oden PI, *et al.* Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports. *Enzyme Microb Technol*, 1999, **24**: 26–34.
- [9] Lei C, Shin YS, Liu J, *et al.* Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 11242–11243.
- [10] Park D, Haam S, Jang K, *et al.* Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carrier using single and coimmobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Proc Biochem*, 2005, **40**: 53–61.
- [11] Srivastava A, Prasad R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew Sustain Energy Rev*, 2000, **4**: 111–133.
- [12] Van Gerpen J. Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol*, 2005, **86**: 1097–1107.
- [13] Canakci M, Van Gerpen J. Biodiesel production via acid catalysis. *Trans ASAE*, 1999, **42**: 1203–1210.
- [14] Heizir F, Pedro C, Cleide MF, *et al.* Immobilization of porcine pancreatic lipase on celite for application in the synthesis of butyl butyrate in a nonaqueous system. *J Am Oil Chem Soc*, 1999, **76**: 147–152.
- [15] Bai YX, Li YF, Yang Y, *et al.* Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO₂ spheres. *Proc Biochem*, 2006, **41**: 770–777.
- [16] Hsu AF, Jones K, Marmer WN, *et al.* Production of alkyl ester from tallow and grease using lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel. *J Am Oil Chem Soc*, 2001, **78**: 585–588.
- [17] Nouredini H, Gao XJ. Characterization of sol-gel immobilized lipase. *J Sol-Gel Sci Technol*, 2007, **41**: 31–41.
- [18] Watanabe N, Yasude O, Yasuji M, *et al.* Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms: cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric Biol Chem*, 1977, **41**: 1353–1358.