

改性壳聚糖固定化脂肪酶的研究

Immobilization of Lipase by Chemical Modified of Chitosan

胡文静, 谭天伟, 王芳*, 高阳

HU Wen-Jing, TAN Tian-Wei, WANG Fang* and GAO Yang

北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical and Technology, Beijing 100029, China

摘 要 以化学改性后的壳聚糖为载体固定假丝酵母 99-125 脂肪酶,研究了不同的活化剂对壳聚糖表面羟基基团的活化程度,以及活化后壳聚糖为载体采用不同固定化方法对假丝酵母脂肪酶固定效果的影响。结果表明 1-乙基-3-(3-甲基氨基)丙基碳二亚胺可有效的活化壳聚糖表面羟基,活化后的壳聚糖表面氨基与戊二醛偶联后形成的壳聚糖为良好的脂肪酶固定化载体,其固定脂肪酶的水解活力可高达 86.8U/g。此外,还对影响固定化进程中的各种因素进行了研究,确定最优条件,比较了固定化前后酶的热稳定性、有机溶剂稳定性及最适反应温度。并考察了该固定化脂肪酶催化合成棕榈酸十六酯的操作稳定性,结果表明,连续反应 16 批之后棕榈酸十六酯的转化率仍能达到 85% 以上。

关键词 固定化, 脂肪酶, 壳聚糖, 棕榈酸十六酯

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0667-05

Abstract Lipase (EC3.1.1.3) from *Candida* sp. 99-125 was immobilized on chitosan by chemical covalence. Lipase was first immobilized to chitosan beads by activating its hydroxyl groups with carbodiimide followed by cross-linking more lipase to the amino groups with glutaraldehyde. In this article, different factors that influenced the immobilization were investigated, and the optimum conditions were ascertained. Comparative studies of organic solvent and thermal stability between free lipase and immobilized lipase were conducted. Immobilization enhanced the lipase stability against changes of temperature and organic solvent. Immobilization lipase can be reused in the synthesis system of palmitate hexadecyl. Operational stability tests indicated that the immobilized lipase occurs after 16 consecutive batches, the conversion rate remained 85%. Such results revealed good potential for recycling under esterification system.

Key words immobilize, lipase, chitosan, palmitate hexadecyl

脂肪酶(Lipase EC3.1.1.3)是一类特殊的酰基水解酶,作为一种生物催化剂,可在油-水界面上催

化酯水解或醇解、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有机合成反应,

Received: December 4, 2006; Accepted: January 12, 2007.

This work was supported by the grants from the National High Tech Research and Development (863) Program(No. 2002AA514030), the National Natural Science Foundation of China(No. 20176002), the National Research Project for the Tenth Five-year Plan(No. 2004BA411B05, 2004BA71B08-02) and the Commission Project by Sinope(No.202059).

* Corresponding author. Tel :+ 86-10-64434815 ; E-mail : Wangfang@mail.buct.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2002AA514030), 国家自然科学基金(No. 20176002), 国家“十五”攻关项目(No. 2004BA411B05, 2004BA71B08-02)及中石化(No. 202059)资助项目。

是目前用途最广泛的酶催化剂之一。游离脂肪酶在有机溶剂中存在易聚集成团,极不稳定,使用寿命短,不易分离的缺陷。通过使用不同的方法固定化酶则可以解决以上的问题^[1,2]。

壳聚糖是一种生物相容性好、易生物降解、无毒的天然高分子生物材料,由于其分子中存在着丰富的羟基和氨基使其易于进行化学反应并具有许多独特的性能^[2-4]。本文在前人研究的基础上寻求一种方法简单、可适用于工业化放大的、生物相容性好的脂肪酶固定化载体和工艺,为此选择壳聚糖为载体,并对其改性处理。在以往的研究中常常使用环氧氯丙烷、三氯-均-三嗪、对甲基苯磺酰氯等酯化试剂对载体的羟基基团进行改性,但是这些功能试剂对脂肪酶有一定的毒性,而且操作条件复杂,会导致酶的失活,因此本文选择对脂肪酶无毒作用的碳二亚胺类物质活化壳聚糖的羟基基团,以及价格低廉的双功能试剂戊二醛与壳聚糖的氨基基团交联,对壳聚糖进行改性以增加脂肪酶的结合位点,从而提高脂肪酶的操作稳定性。本文还就影响固定化进程的活化剂的用量、活化时间、戊二醛的用量、交联时间以及固定化的 pH 值等因素进行了优化实验;对固定化前后脂肪酶的最适温度、热稳定性及在不同有机溶剂中的稳定性进行了研究;并观察了固定化后脂肪酶在棕榈酸十六酯的合成体系中的操作稳定性。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 98\%$,分子量 1.05×10^6)、1-乙基-3-(3-甲基氨基)丙基碳二亚胺(EDC·HCl)(纯度 $\geq 98\%$,瑞士进口)、戊二醛、橄榄油(化学纯)、聚乙烯醇、丙酮、四氢呋喃、四氯化碳、正己烷、正庚烷、石油醚、十六酸、十六醇、乙醇,均为分析纯,北京化学试剂公司;假丝酵母 99-125 脂肪酶,实验室自行发酵,水解活力为 8000IU/g,比活力为 196.64IU/mg Pr。

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖颗粒的制备 取一定量的壳聚糖溶于 1% 的乙酸溶液中,静置 1h,充分溶解,形成胶状溶液,用针形注射器滴加到凝结剂(1mol/L NaOH)中形成球形颗粒,注射器的针头距离凝结剂液面 5cm,速度 50~60 滴/min。水洗至中性,干燥备用。

1.2.2 固定化方法 取壳聚糖颗粒 0.1g,按照以下

方法进行固定。固定化条件:戊二醛(0.05%,V/V) 5mL,1-乙基-3-(3-甲基氨基)丙基碳二亚胺(以下均称 EDC)(0.4 mg/mL)(pH6.0) 5mL,pH7.4,酶液(0.4%,W/V),室温,水浴磁力搅拌。

方法 1 加入戊二醛交联 1h,用去离子水淋洗载体,再加入酶液 10mL 固定 2h,用去离子水淋洗,室温干燥。

方法 2 加入 EDC 活化载体 30min,加入酶液 10mL 固定 2h,用去离子水淋洗,室温干燥。

方法 3 将 EDC 与戊二醛与载体混合,活化与交联同时进行反应 1h,加入酶液 20mL 固定 1h,用去离子水淋洗,室温干燥。

方法 4 先使用戊二醛与载体交联 1h,用去离子水淋洗,加入酶液 10mL 固定 1h,再加入 EDC 活化 30min,加入酶液 10mL,固定化 1h,用去离子水淋洗,室温干燥。

方法 5 先使用 EDC 活化 30min,加入酶液 10mL 固定 1h,再加入戊二醛交联 1h,加入酶液 10mL,固定化 1h,用去离子水淋洗,室温干燥。

1.2.3 水解活力的测定 采用经典的橄榄油乳化法^[7]。在 pH 为 8.0,温度 40℃ 条件下,每分钟催化产生 1 μ mol 脂肪酸所需的酶量为 1 个酶活单位(IU)。游离酶的比活力为每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位(IU/mg Pr)。

1.2.4 蛋白的测定 按照 Bradford 的方法^[8],以牛血清蛋白作为标准蛋白进行测定。酶固定化效率按下式计算:固定化效率=(初始酶粉或酶液总蛋白-残液的总蛋白)/初始酶粉或酶液总蛋白 $\times 100\%$ ^[9]。

1.2.5 棕榈酸十六酯的合成 基本反应体系为 50mL 据塞锥形瓶中,加入十六酸和十六醇(酸醇摩尔比为 1:1.3),一定量的固定化脂肪酶,以 5mL 石油醚作溶剂,40℃ 密闭振荡反应 4h,摇床转速为 180r/min。反应剩余的酸以 0.1mol/L 的 NaOH 滴定,以 10% 酚酞做指示剂。

2 结果与讨论

2.1 固定化载体的活化

使用不同的活化剂活化壳聚糖表面的羟基组分,再用戊二醛将酶与载体交联进行固定化。当固定化条件为:壳聚糖载体 0.1g,0.05% 戊二醛 5mL,pH7.4,0.4%(W/V)酶液 20mL,室温,水浴恒温摇床可得到表 1 的结果。

表 1 不同活化剂活化载体后固定化酶活力的比较

Table 1 Comparison of immobilized lipase activities using different activation reagent

Activated reagent	Hydrolysis activity (IU/g support)	Degree of immobilization/%	Specific activity of lipase after EDC activation(IU/mg Pr)
Epichlorohydrin	14.67	30.8	193.01
EDC. HCl	74.55	64.72	127.76
4-toluene sulfonyl chloride	2.96	9.6	67.27

由表 1 可以看出,1-乙基-3-(3-甲基氨基)丙基碳二亚胺活化壳聚糖载体所得到的固定化酶的水解活性高,而且对固定化前后的脂肪酶的比活力影响不大,这是因为碳二亚胺使载体羟基直接耦联形成一种不稳定的酰基过渡态中间体,经过 EDC 活化前后的红外谱图见图 3,而后又与脂肪酶 N 末端的 α -残基相结合,该反应过程条件温和,因此对酶的活性的影响很小。而其他两种活化剂反应条件剧烈,对酶有一定的毒性,故酶活力较低。

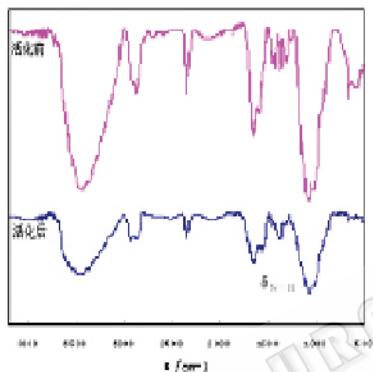


图 1 EDC 活化前后载体的红外谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of chitosan before and after EDC activation

通过活化前后的红外谱图可以看出 2449cm^{-1} 的 -OH 峰有所减弱,而 2932cm^{-1} 处 $-\text{CH}_2$ 的反对称伸缩振动有所加强,在经 EDC 活化后 1559cm^{-1} 处出现了 N-H 的面内变形振动峰,说明壳聚糖在活化后引入了亚胺基团。

2.2 固定化方法的选择

表 2 是使用 1.2.2 五种不同的方法固定化脂肪酶活力的比较。

表 2 不同方法固定化脂肪酶

Table 2 Yields of degree of immobilization and activity of three different immobilization protocols

	Hydrolysis activity (IU/g support)	Degree of immobilization/%
Method I	24.55	39.9
Method II	21.58	11.6
Method III	24.8	39.2
Method IV	74.4	66.72
Method V	86.8	67.8

从表 2 可以看出,单独使用戊二醛交联或者 EDC 活化载体后进行酶的固定化其固定化活力均较低,但对载体既活化又交联会后,则情况发生了很大的改观,说明活化交联后载体形成多个与脂肪酶的结合位点,载体经过 EDC 及戊二醛的作用后,可发生共价结合的位点增多,因此结合的脂肪酶可能性增多,方法 3 的活力低是因为 EDC 不稳定,在与戊二醛混合的过程中,形成了戊二醛与载体争夺 $\text{C}=\text{N}$ 的局面,导致活化剂不能有效的活化载体,固定的脂肪酶量减少;方法 4 相对方法 5 活力低是因为少量的残留戊二醛使部分失活的酶蛋白连接到载体上,占据了活性蛋白的结合位置;方法 5 先加入 EDC 活化载体,残留的 EDC 由于不稳定而失去作用,对酶的活力没有影响,所以在以后的研究中采用方法 5 来固定脂肪酶。

2.3 固定化条件对脂肪酶活力的影响

图 2 为固定化条件对固定化酶活力及固定化效率的影响,按照方法 5 的方法在相应因素的变化范围内进行固定化,得到的固定化酶测定水解活力及固定化效率,由图可知当 0.1g 载体的活 EDC 的量为 20mg ,活化时间为 20min ,交联剂浓度为 0.15% ,交联时间为 60min , pH 为 7.4 时,固定化酶的活力最大。

由图可见,一般地固定化效率与固定化酶的活力的变化趋势一致,但是在优化交联剂用量的过程中,固定化效率随着交联剂用量的增大而增大,这是因为当戊二醛浓度为 0.15% 时,载体表面的氨基组分得到充分的交联,从而酶与载体得到最大的结合量。当戊二醛浓度超过一定量时,该体系的戊二醛过量,残留的戊二醛分子与载体抢夺酶分子,使部分酶的非活性氨基酸残基与戊二醛反应,影响载体的固定化效率,另外也会造成已固定上的酶蛋白与戊二醛反应,使酶失去活性中心。该图的固定化效率曲线表明,载体结合的蛋白一直呈上升趋势,但是当浓度过大时,部分蛋白已经失活,所以水解活力降低。

当 pH 值为 7.4 时,固定化脂肪酶的活力最高

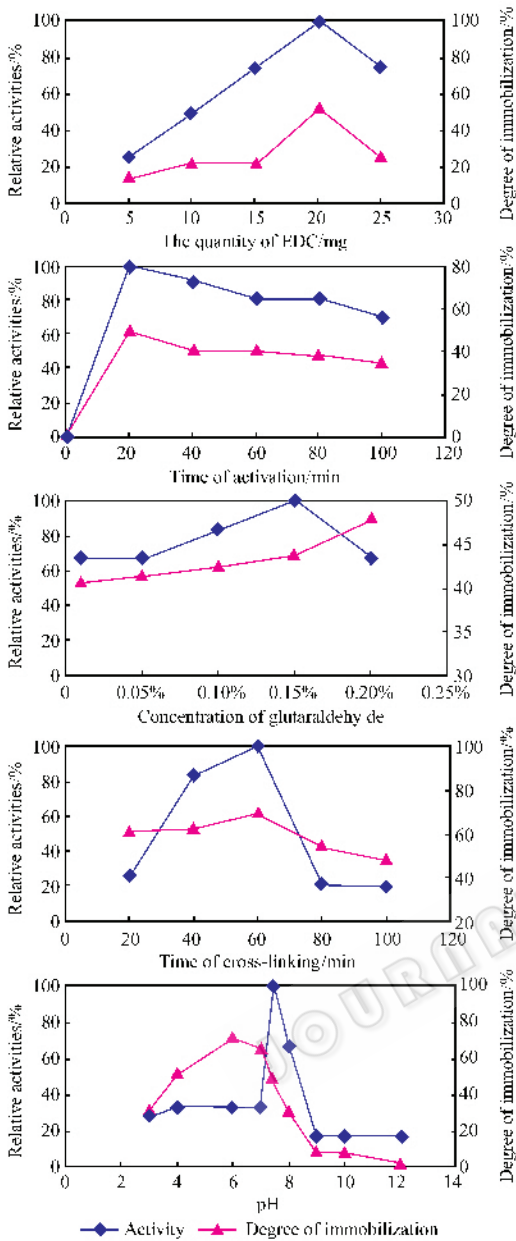


图2 固定化条件对脂肪酶活力及固定化效率的影响
Fig. 2 Effect of the immobilization conditions on hydrolysis activity for immobilized lipase and degree of immobilization

即 7.4 为固定化酶的最适 pH 值。当体系偏酸性时, 蛋白结合率最大, 因为该脂肪酶的等电点在 6 左右, 故在 pH 值为 6 时固定化效率最高, 但是该点并非固定化酶反应的最佳 pH 值。在 pH 值超过 8 以后酶活及固定化效率均大幅下降。这与 Wisdom 等的结论相一致, 可能是干燥过程中酶周围环境的 pH 值上升, 发生了碱催化的 β -消除反应^[10], 破坏了酶的活性中心而使酶失活。

2.4 反应温度对固定化酶活力的影响

研究了 25 ~ 70℃ 测定游离酶与固定化脂肪酶

的水解活力, 如图 10。

由图 3 可以看出, 固定化脂肪酶在 50℃ 时活力最高, 游离酶在 40℃ 时活力最高, 随着温度的升高, 游离酶与固定化酶活力都相对的下降, 但是当温度为 60℃ 时, 游离酶的活力降为原来的 10%, 而固定化酶在 70℃ 时活力仍能保持原来的 40%, 表明该固定化后脂肪酶催化反应温度的适应程度增加。

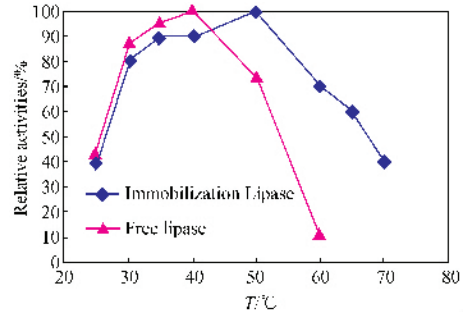


图3 游离酶与固定化脂肪酶反应最适温度的比较
Fig. 3 Effect of optimum temperature on hydrolysis activities of free lipase and immobilized lipase

2.5 固定化酶的热稳定性

将游离酶与固定化酶置于不同的温度下(10 ~ 60℃)育温 1h, 分别测定酶活力结果如图 4 所示。随着温度的上升, 游离酶与固定化酶的活性都呈现递减的趋势, 当温度为 50℃ 时, 游离酶的活性降为原来的 4.76%, 而固定化酶的活力保持初始活力的 80%。由此表明该固定化脂肪酶的热稳定性明显高于游离酶。

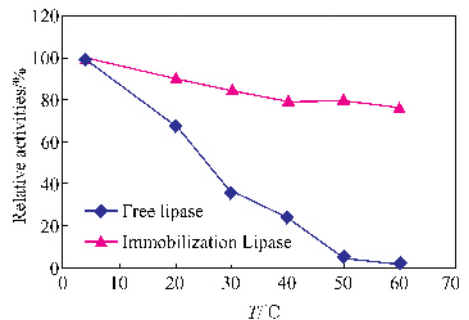


图4 游离酶及固定化脂肪酶的热稳定性的比较
Fig. 4 Effect of temperature on stability for free and immobilized lipase

2.6 固定化酶在有机溶剂中的稳定性

将酶置于不同的有机溶剂中 1h 后, 测定游离酶与固定化酶的活性, 选用的有机溶剂为: 丙酮、四氢呋喃、四氯化碳、正己烷、正庚烷, 各有机溶剂的 logP 值见表 3, 比较结果见图 5。

由图 5 可以看出在 logP 较大的有机溶剂中, 固定化酶与游离酶都表现了较大的活性。这是由于极

表3 不同有机溶剂的 logP 值
Table 3 LogP of different organic solvent

Organic solvent	Acetone	Tetrahydrofuran	Carbon tetrachloride	<i>n</i> -hexane	<i>n</i> -heptane
lgP	-0.25	0.49	3	3.5	4.5

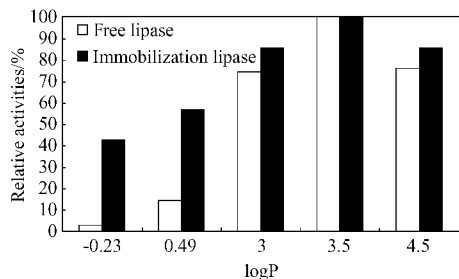


图5 游离酶与固定化脂肪酶在不同有机溶剂中的稳定性的比较

Fig. 5 Effect of organic solvent on hydrolysis activities of free and immobilized lipase

性越高与酶争夺水的能力越强,而一定的必须水是酶活力存在的必须条件^[11],所以随着极性的增大,固定化酶与游离酶的活性都降低。在丙酮中,游离酶的活力为在正己烷的活性的3%,而固定化酶为在正己烷的活性的42%,这说明固定后载体对酶活性中心起到了有效的保护作用,固定化后的脂肪酶在不同极性有机溶剂中有很好的稳定性。

2.7 固定化脂肪酶的操作稳定性

将固定后的假丝酵母99-125脂肪酶用于催化合成棕榈酸十六酯反应的批次实验,以观察其使用寿命。图6是固定化酶和游离酶操作稳定性对比图,通过简单的过滤将酶从反应体系中分离出来,以继续下一批次的反应。由图可知反应进行16批之后,固定化酶催化的棕榈酸十六酯的转化率仍能保持85%以上,而游离酶在反应4批之后基本失活,说明该固定化脂肪酶较游离酶具有优良的操作稳定性。

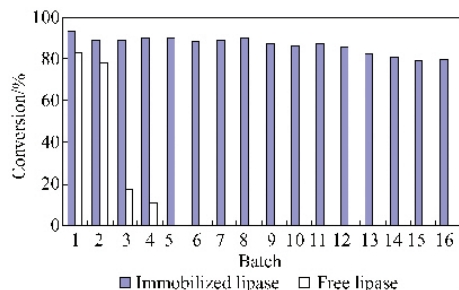


图6 固定化脂肪酶的操作稳定性

Fig. 6 The operational stability of immobilized lipase

3 结论

研究表明,改性后的壳聚糖是固定化假丝酵母

脂肪酶的优质载体。1-乙基-3-(3-甲基氨基)丙基碳二亚胺活化壳聚糖的羟基,与一定量的戊二醛交联形成多位点壳聚糖,亚胺基团及联结的醛基可与酶结合,使脂肪酶稳定而牢固的结合到改性后的载体上。当碳二亚胺的量为20mg/0.1g壳聚糖,活化时间为20min,戊二醛浓度为0.15%,交联时间为1h, pH7.4为最佳的固定化条件;制得的固定化酶与游离酶相比,最适温度的范围拓宽,热稳定性与有机溶剂的稳定性都有较大的提高,操作稳定性良好,该固定化酶有效地解决了游离酶不易回收利用的难题,为固定化酶进一步工业应用打下良好的基础,对于棕榈酸十六酯的生物合成具有很大的应用潜力。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Peng LF(彭立凤), Liu XX(刘欣喜), Tan TW(谭天伟), et al. Modification of polymer membranes for lipase immobilization and application of lipase-membrane bioreactors. *Membrane Science and Technology*(膜科学与技术), 2001, 21(2): 44-49.
- [2] Qian JM(钱军民), Zhang X(张兴), Lu R(吕飞), et al. Recent progress of material used as enzyme immobilized carriers. *New Chemical Materials*(化工新型材料) 2002, 30(10): 21-24.
- [3] Yuan LX(袁履冰), Gao ZX(高占先), Chen HB(陈宏博), et al. *Organic Chemistry*. Beijing: Higher Education Press, 1999, pp. 459.
- [4] Xiao ZH(肖正华), Zhang H(张惠静), Zhang M(张梦军), et al. Application of chitosan in immobilization of enzyme. *Southwest National Defence Medicine*(西南国防医药), 2005, 15(3): 339-341.
- [5] Zhang YJ(张彦军), Tian F(田丰), Chen SQ(陈世谦). Preparation and application of enzyme immobilized on chitosan. *Bulletin of The Academy of Military Medical Sciences*(军事医学科学院院刊) 2002, 26(3): 225-227.
- [6] Yuan QS(袁勤生), Zhao J(赵建). *Enzymes and Enzyme Engineering*. Shanghai: East China University of Science and Technology Press(华东理工大学出版社) 2005, pp. 226-227.
- [7] Wanabe N, Ota Y, Mino Y, et al. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms-cultural conditions and properties of crude enzymes. *Agric Biol Chem*, 1977, 41: 1353-1358.
- [8] Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein the principle of protein dye binding. *Anal Biochemistry*, 1976, 72: 248-255.
- [9] Gao Y(高阳), Tan TW(谭天伟), Nie KL(聂开立), et al. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2006, 22(1): 114-118.
- [10] Wisdom RA, Rosa MF, Aries Barrus MR. Enzymic enteresterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bio-engineering*, 1987, 29(9): 1081-1085.
- [11] Song BX(宋宝东), Xing AH(邢爱华), Wu JC(吴金川), et al. Surfactant-coated immobilized lipase as a catalyst for esterification reaction in organic solvents. *Chemical Engineering*(化学工程), 2004, 32(5): 50-52.