

大孔疏水载体的制备及其在脂肪酶固定化中的应用

付大雁 蔡宏举 周鑫 秦培勇 谭天伟*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 以苯乙烯(St)为功能单体,二乙烯基苯(DVB)为交联剂,采用固液联合致孔的方式,制备了疏水多孔载体。将多孔载体用于脂肪酶 *Candida* sp. 99-125 的固定化,得 780 U/g 的固定化活力。固定化使酶在 30 ~ 50 ℃ 范围内热稳定性得到了明显的提高,最适反应温度提高了 5 ℃,在 pH 6.0 ~ 9.0 范围内酶的相对活力有所提高,最适 pH 不变仍为 8.0。固定化酶单次催化油酸和十六醇的酯化率达 98%,其操作稳定性好,连续间歇操作 15 批,酯化率仍可达到 50%。

关键词: 大孔载体; 脂肪酶; 固定化

中图分类号: Q814.2

引言

脂肪酶不仅能水解脂肪生产甘油和脂肪酸,也可以逆向催化脂肪酸和醇的酯合成反应。基于这个特点,脂肪酶已被广泛应用于有机相中催化酯交换和酯合成。游离酶不易回收,难以重复使用,工业上一般采用酶的固定化形式对酶加以利用。酶的固定化常用方法为吸附、交联、共价结合以及物理包埋等,固定化的材料也多种多样,如碳酸钙^[1]、合成的聚合物^[2-3]及膜^[4]等。由于酶更易于固定在孔内,目前酶固定化材料主要集中于多孔粉体。

载体的孔径对酶的固定化有影响,其中大孔有利于酶进入孔道内固定,Pandy 等^[5]的实验证明 15 nm 的大孔 MCF 比 3 nm 孔径的 MCM-41 在酶的固定化方面更具优势,表明孔内固定化酶有利于提高单位载体的固载量。脂肪酶具有较强的疏水性,选择疏水性载体有利于其固定化。Blanco 等^[6]发现丁基修饰的介孔分子筛非常有利于 *Candida antarctica* 脂肪酶的固定化,但酶的水溶液比较难于渗透到多孔疏水介质内部。因此,具有大孔疏水性的载体在脂肪酶的固定化方面会具有优势。

本文以苯乙烯为单体,二乙烯基苯为聚合交联剂,采用固液联合致孔方式,通过本体聚合制备了具有双孔结构的大孔载体,用于脂肪酶的固定化。比较了固定化酶和游离酶的最适温度、pH 及热稳定性,并将固定化酶用于酯合成反应,考察了其操作稳定性。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

假丝酵母(*Candida* sp. 99-125)脂肪酶,酶活约 13000 U/g,实验室自制^[7];苯乙烯(St),纯度大于 98%,美国 Acros 公司;二乙烯基苯(DVB),质量分数 56%,淄博嘉龙化工科技有限公司;纳米碳酸钙(粒径范围小于 80 nm),广东嘉维化工实业有限公司;其他试剂均为分析纯。

StereoScan-250-MK3 扫描电镜, Cambridge; Poro-simeter PASCAL 140&240 压汞仪, Thermo Electron 公司;全波长酶标仪, Thermo Labsystems; GC-2010 气相色谱, 日本岛津。

1.2 固定化酶的制备

量取 St 5 mL, DVB 2 mL, 甲苯和正庚烷各 3.5 mL, 称取 7 g 纳米碳酸钙微粒和上述液体一起放于 50 mL 的三角瓶中,反复超声混合 15 min 后,放于 65 ℃ 恒温水浴中反应 12 h。所得固体经粉碎后,筛分收集 0.35 ~ 0.45 mm 粒径的颗粒,用乙醇抽提 24 h,然后用适量的 0.1 mol/L HCl 于常温下除去碳酸钙微粒,用去离子水冲洗至中性后,密封湿态保存。

称取一定量的酶粉,用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲

收稿日期: 2010-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(20636010); 国家“863”计划(2007AA100404); 国家“973”计划(2007CB714304)

第一作者: 女, 1980 年生, 博士生

* 通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

液(pH 8.0)配成 10 mg/mL 的酶液。向装 200 mg 载体的三角瓶中加入 15 mL 配制好的酶液,室温下,在摇床中反应 2 h,滤去酶液,用磷酸缓冲液清洗固定化酶,直到洗液中不含蛋白质为止。该固定化酶放于 4 ℃ 冰箱中保存。

1.3 固定化酶催化酯合成反应

在 50 mL 的锥形瓶中加入 3 mL 的正己烷,4 mmol 油酸和 4 mmol 十六醇,同时加入 200 mg 固定化酶,300 mg 变色硅胶以吸收反应产生的水。反应在 40 ℃、150 r/min 的摇床中进行。

1.4 分析测试

1.4.1 蛋白质量浓度的测定

蛋白质量浓度的测定按照 Bradford 的方法进行,以牛血清白蛋白为标准。

1.4.2 酶水解活力的测定

采用橄榄油水解法^[8]测定:40 ℃ 下,每 min 水解底物产生 1 μmol 脂肪酸为一个活力单位。在同组实验中以水解活力最高值为 100% 相对活力进行数据处理。

1.4.3 酯化率的测定

反应后通过气相色谱法测定转化率,色谱柱为 DB-1ht 柱(30 m \times 0.25 mm;J&W Scientific,USA),高纯氮做载气,二阶程序升温,氢火焰离子检测器,具体参数见文献^[9]。产物组成的质量分数用归一法进行分析。

2 结果和讨论

2.1 大孔载体的结构表征

从自制载体的 SEM 照片(图 1)上可观察到载体具有多孔结构,有贯通式的孔、大孔和超大孔。固液联合致孔的特点是:液体致孔剂主要生成大孔,固体致孔剂与反应相不溶,并且部分颗粒因为表面自由能大而形成团聚,导致介质形成大孔和超大孔结构^[10-11]。液体致孔剂的用量越大,合成载体的比表面积越大,一般来讲,载体提供越多的表面与酶接触,酶的固载量可能越大。

对固定化效果最好的载体进行孔径(D)分布测试,如图 2 所示。载体的孔径主要分布于 2 个区域,载体 100 ~ 300 nm 的孔区占总孔体积的 62.3%,直径 2 ~ 6 μm 的孔区占总孔体积的 20.1%,总孔隙率为 57.4%,比表面积 95.2 m^2/g 。

2.2 脂肪酶固定化条件考察

图 3 显示出了液体制孔剂对于载体比表面积,

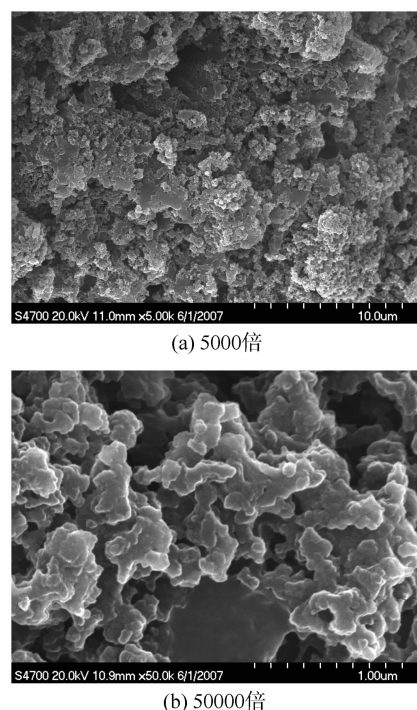


图 1 载体的扫描电镜照片

Fig. 1 Surface features of the support observed by SEM

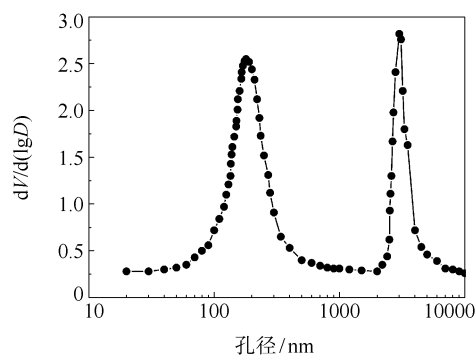


图 2 大孔疏水载体的孔径分布

Fig. 2 Pore size distribution of the hydrophobic support

以及对固定化酶活力的影响。固定固体致孔剂与反应液相比比例 1:2 (g/mL) 的条件下,增加液体致孔剂,比表面积增加,但固定化酶活力呈先升后降的趋势。这可能是当液体致孔剂的比例过高时,载体的大孔和超大孔减少,酶不容易渗透到疏水微孔内部,固定化效率反而下降了。

脂肪酶固定化的优化条件见表 1。固定化应在酶相对比较稳定的条件下进行,以保持酶的天然活性。脂肪酶对 pH 和温度都比较敏感,首先对这两个条件进行优化,固定化时间为 2 h,投酶量与湿载体质量比为 1:1。在 pH8.0 的条件下酶的稳定性较好,固定化效果也好。温度对酶固定化的影响很大,

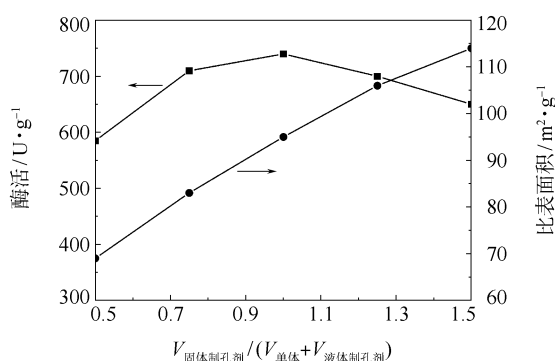


图3 液体致孔剂对固定化酶的影响

Fig. 3 Effect of liquid porogen on the activity of immobilized lipase

低温有利于酶活力的保持,但过低的温度也不利于传质及酶与载体的结合,在 25 ~ 30 ℃ 固定化脂肪酶,酶的固定化效果较好。另外对投酶量和固定化时间进行优化,通过实验确定加酶质量与载体质量比为 1:1、固定化 150 min 酶的固定化效果最好,可获得 780 U/g 的固定化酶。

表1 脂肪酶固定化的优化条件

Table 1 Optimal conditions for lipase immobilization

参数	确定优化条件
载体类型	聚 (St-DVB)
交联度/%	40
$V_{\text{液体致孔剂}}/m_{\text{固定致孔剂}}$	1:1
$w_{\text{水}}/\%$	60
酶收率/%	55
固载蛋白量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	10
固定活力/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	780
最适固定化 pH	8.0
最适固定化时间/min	150
最适固定化温度/℃	25 ~ 30

本课题组^[12]采用比表面积 29.6 m²/g 亲水大孔载体固定相同批次的脂肪酶,固定化酶活力为 441 U/g 载体,固载蛋白为 6 mg/g 载体。而本文所用载体的比表面积为 95.2 m²/g,固定化活力为 780 U/g 载体,固载蛋白量为 10 mg/g 载体。与亲水载体相比,单位质量疏水载体的固定化活力高出 77%,但单位比表面积固定化活力低 45%,两种载体对酶的活力影响相似,单位固定化的蛋白表现出的水解活力相差不多,疏水载体略高为 78 U/mg 蛋白。

2.3 固定化对脂肪酶活力和稳定性的影响

2.3.1 反应温度和热稳定性

由图 4 可见,固定化酶的最适温度比游离酶提

高了 5 ℃。温度低于 40 ℃,游离酶活力相对高;温度超过 40 ℃,固定化酶活力相对较高。原因可能是低温下底物与固定化酶之间的传质受到载体的限制,而高温下酶的稳定性是影响酶活力的主要原因。这就意味着固定化后脂肪酶的热稳定性得到了提高,这也在酶的热稳定性实验中得到证实,见图 5。游离酶和固定化酶在各温度下浴温 1 h 后,测量脂肪酶的相对活力。游离酶不稳定,温度高于 30 ℃,酶的失活很严重;而固定化明显的提高了酶的稳定性,固定化酶 45 ℃ 浴温 1 h,仍可保持 50% 以上的活力,而游离酶已完全失去活力。

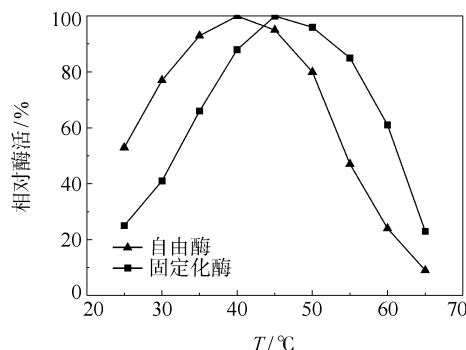


图4 温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activities of lipase preparations

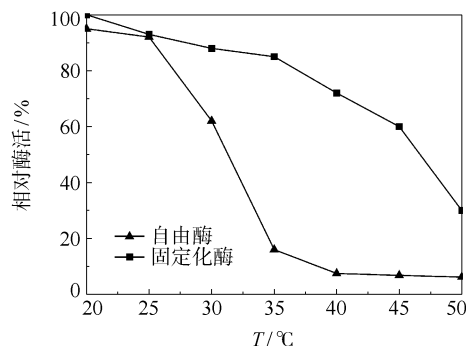


图5 脂肪酶的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of lipase preparations

2.3.2 反应 pH

不同 pH 下测定游离酶和固定化酶活力,结果见图 6。游离酶对 pH 敏感,只在 1 个很窄的范围内活性较高,最适 pH 为 8.0;固定化酶的最适 pH 值仍为 8.0,但其在 pH 6.0 ~ 9.0 的范围相对活力提高。

2.4 固定化酶的操作稳定性

在正己烷中催化油酸和十六醇合成反应中,固定化酶的催化活力很高,单次催化的酯化率为 98%。为了考察固定化酶的操作稳定性,在相同的

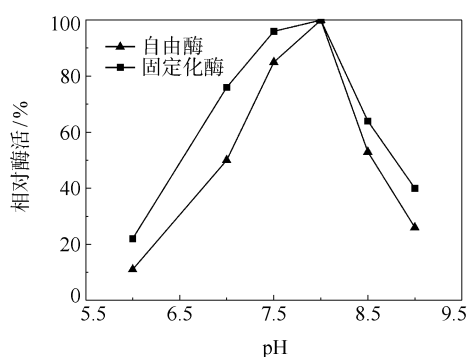


图 6 pH 对脂肪酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on activities of lipase preparations

反应条件下,反应结束后回收固定化酶,在正己烷中洗涤后,重新加入到新的反应液中进行下次反应。图 7 的实验结果表明固定化酶在催化油酸十六醇酯的合成反应中,间歇反应 15 批次,酯化率仍可达 50%,这说明了固定化酶具有较好的操作稳定性。

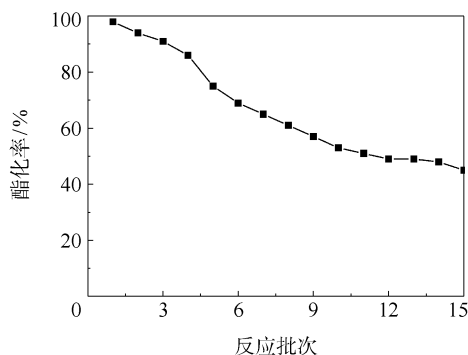


图 7 固定化酶的操作稳定性

Fig. 7 The operational stability of immobilized lipase

3 结论

以固液联合致孔的方式自制的大孔载体,成功地用于解脂假丝酵母脂肪酶的固定,对固定化条件进行优化,得到了 780 U/g 的固定化活力。固定化使脂肪酶的最适温度提高了 5℃,热稳定性有所提高,pH 的敏感性降低。固定化酶可高效催化油酸和十六醇酯合成反应,重复使用 15 批,仍保持有较高的活力。

参考文献:

- [1] Chamgui H, Miled N, Karra-chaïbouni M, et al. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO_3 : A comparative study [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 37: 34–41.
- [2] Bryjak J, Trochimczuk A W. Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 573–578.
- [3] Howdle S M, Jerábek K, Leocorbo V, et al. Reversibly collapsible macroporous poly (styrene-divinylbenzene) resins [J]. Polymer, 2000, 41: 7273–7277.
- [4] Wang Y J, Hu Y, Xu J, et al. Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen [J]. Journal of Membrane Science, 2007, 293: 133–141.
- [5] Pandya P H, Jasra R V, Newalkar B L, et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2005, 77: 67–77.
- [6] Blanco R M, Terreros P, Muñoz N, et al. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 47: 13–20.
- [7] Fu D Y, Yu M R, Tan T W, et al. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp. 99-125 [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56: 115–121.
- [8] Yu M R, Qin S W, Tan T W. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* [J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 384–391.
- [9] 高阳, 谭天伟, 聂开立, 等. 大孔树脂固定化脂肪酶及在微水相中催化合成生物柴油的研究 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(1): 114–118.
Gao Y, Tan T W, Nie K L, et al. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(1): 114–118. (in Chinese)
- [10] 施扬, 白姝, 孙彦. 新型双孔蛋白质离子交换剂的制备及性能研究 [J]. 离子交换与吸附, 2002, 18(2): 8–16.
Shi Y, Bai S, Sun Y. Studies on synthesis and properties of a novel biporous ion-exchanger for protein adsorption [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2002, 18(2): 8–16. (in Chinese)
- [11] 吴蕾, 甘一如, 孙彦. 新型固液双重致孔球形离子交换剂的制备及其性能研究 [J]. 高分子学报, 2003(5): 661–666.
Wu L, Gan Y R, Sun Y. Preparation and characterization of a novel biporous spherical ion-exchanger for protein adsorption [J]. Acta Polymerica Sinica, 2003(5): 661–666. (in Chinese)

- [12] 蔡宏举,付大雁,王满意,等. 大孔载体固定化脂肪酶[J]. 过程工程学报,2007,7(4):773-777.
Cai H J, Fu D Y, Wang M Y, et al. Investigation of im-

mobilized lipase onto macroporous carrier[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2007,7(4):773-777. (in Chinese)

Preparation of a macroporous hydrophobic poly(styrene-divinylbenzene) support and its application in lipase immobilization

FU DaYan CAI HongJu ZHOU Xin QIN PeiYong TAN TianWei

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

Abstract: A macroporous hydrophobic poly(styrene-divinylbenzene) support has been prepared using a multiple porogen and used for the immobilization of *Candida* sp. 99-125 lipase. The conditions of the lipase immobilization on the support were optimized and an optimum activity (780 U/g) was obtained. After immobilization, the thermal stability of the lipase was increased in the temperature range 30 – 50 °C, and its stability in the pH range 6.0 – 9.0 was also increased. The optimum temperature after immobilization was increased by 5 °C. The enzyme preparation had increased relative activity at pH 6.0 – 9.0 and a maximum activity at pH 8.0. The esterification reaction of cetyl alcohol and oleic acid was efficiently catalyzed by the enzyme preparation with the yield of ester being 98%. Operational stability tests indicated that the ester yield was still as high as 50% after 15 batch cycles.

Key words: macropore support; lipase; immobilization