

文章编号:1673-1689(2007)04-0097-04

离子交换树脂吸附法固定化脂肪酶的研究

虞英, 蒋惠亮

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以 D311 离子交换树脂为载体,通过离子交换吸附法对 Lipolase 100L 脂肪酶进行了固定化。采用考马斯亮蓝法测定了酶蛋白在离子交换树脂上的吸附率,考察并得到了酶固定化的最佳条件:在 pH 10 缓冲液下,加酶液量为每克预处理过的树脂加入 1.5 mL,吸附时间为 10 h,吸附温度为 35 ℃。所得固定化酶用于催化合成月桂酸月桂醇酯,在反应物质的量比为 1:1 时,水质量分数为 8%,在 50 mL 异辛烷有机溶剂中固定化酶用量为 200 mg,反应时间为 210 min,温度为 55 ℃ 的最佳条件下,酯化率可达 91.3%。

关键词: 脂肪酶;固定化;酶催化;酯化

中图分类号: Q 556

文献标识码: A

Study of Lipase Immobilization on the Exchange Resin by Adsorption

YU Ying, JIANG Hui-liang

(School of Chemistry and Materials Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The immobilization of lipase (Lipolase 100 L) with ion exchange resin by ion exchange adsorption was studied. The optimum conditions for enzyme immobilized as follow: 1.5 mL liquid lipase was added into one gram of pretreated resin, stirred for 10 hours at 35 ℃ in buffer of pH 10. The catalysis of such immobilized lipase was estimated in the esterification of lauric acid and lauryl alcohol. The result showed that the yield of the ester can reach at 91.3% when the ratio of lauric acid/lauryl alcohol was 0.2 : 0.2, the dosage of immobilized lipase was 200 mg in 50 mL isooctane at 8% water and at 55 ℃ after 210 min.

Key words: lipase; immobilization; enzymatic catalysis; esterification

近年来,随着绿色化学的兴起和对节能环保的重视,有机相酶催化在有机合成中的应用越来越受到人们的青睐。脂肪酶是一种重要的生物催化剂,在食品、皮革、医药和洗涤剂等诸多工业领域中均有广泛应用^[1-2]。利用脂肪酶在有机相催化的各种反应可以合成许多高附加值产品。李瑞等^[3]研究了有机相脂肪酶催化合成共轭亚油酸 β -谷甾醇酯

的工艺条件,用高效液相色谱测定脂肪酶催化合成甾醇酯的酯化率,最高可达 72.63%。赵庆节等^[4]在有机相中用大孔吸附树脂固定化脂肪酶拆分消旋萘普生,利用固定化脂肪酶在有机相中能有效地选择性催化 S-萘普生与正辛醇发生酯化反应,实现消旋萘普生的拆分。

酶催化反应具有条件温和、能耗低、催化效率

收稿日期:2006-07-02.

作者简介:虞英(1981-),女,浙江上虞人,化学与材料工程硕士研究生。

通讯作者:蒋惠亮(1956-),男,江苏无锡人,副教授,主要从事油脂化工研究。Email:hljiang-wx@yahoo.com.cn

高、质量好等优点。但由于脂肪酶是水溶性的,在有机相中只能得到分散,不易回收重复使用。将脂肪酶固定于离子交换树脂上,可克服这些缺点。此法处理条件温和,酶活力损失少,载体与酶分子的结合力较物理吸附法牢固^[3]。作者采用 D311 弱碱性阴离子交换树脂进行脂肪酶的固定化,并采用由此法得到的固定化酶为催化剂合成了月桂酸月桂醇酯。实验结果表明,吸附法固定脂肪酶方法简便,酶活损失少,催化效率高,便于回收利用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

脂肪酶 Lipolase 100 L: 诺维信公司惠赠; D311 离子交换树脂: 江苏苏青水处理工程集团有限公司惠赠。

1.2 实验仪器

SHZ-22 水浴恒温振荡器: 太仓市医疗器械厂产品; TU-901 双光束紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司产品; W201B 恒温水浴: 上海申顺生物科技有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 离子交换树脂的预处理 离子交换树脂先用蒸馏水浸泡胀润, 去杂, 然后用质量分数 4% NaOH 和 4% HCl 溶液交替在磁力搅拌器下搅拌浸泡 10 h, 并分别用蒸馏水冲洗至中性, 最后用 2 倍体积以上蒸馏水浸泡于 4℃ 冰箱中保存备用^[6]。

1.3.2 脂肪酶的固定化 称取 1.0 g 经预处理的树脂于 50 mL 三角烧瓶中, 加入含有一定量酶的缓冲液 5 mL, 控制温度恒定, 转速 110 r/min, 在恒温振荡器中吸附固定。固定完成后, 移取一定量的上清液, 测定酶的吸附率。抽滤, 用 5℃ 的去离子水洗涤, 得到固定化酶。

1.3.3 蛋白质质量分数的检测 考马斯亮蓝法^[7]测定蛋白质的质量分数。取一定量原酶稀释作标准曲线。

吸附率(%) = (加入的酶蛋白质质量 - 上清液中游离酶蛋白质质量) / 加入的酶蛋白质质量 × 100%

1.3.4 固定化酶的酯交换反应 在 100 mL 的三颈烧瓶中, 加入含有月桂酸 0.2 mol/L 和十二醇 0.2 mol/L 的有机溶剂 50 mL, 加入一定量的固定化酶, 一定的温度下, 搅拌开始反应。定时吸取 1 mL 反应液于锥形瓶中, 加入 5 mL (V(苯): V(乙醇) = 1: 4) 的溶液, 以酚酞作指示剂, 用 0.025 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定反应液中的酸值。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶的浓度与吸光值的线性关系

配制系列浓度的脂肪酶溶液, 采用考马斯亮蓝法测定其吸光值。以脂肪酶浓度为横坐标, 蛋白质的吸光值为纵坐标, 再用最小二乘法进行回归, 得标准曲线(见图 1)。所得直线方程为 $y = 0.0012x$ (线性相关系数 $R^2 = 0.9968$)。

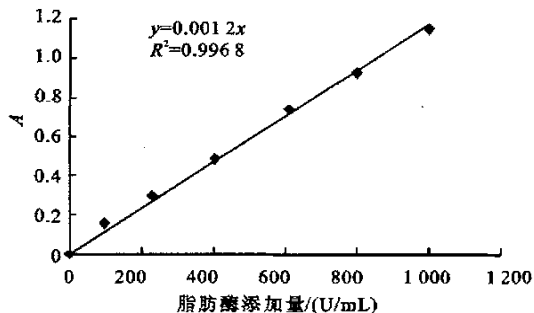


图 1 标准曲线

Fig. 1 The standard line

由图 1 可知在一定的浓度范围内, 脂肪酶的浓度与其在 595 nm 处的吸光值成良好的线性关系, 可用于测定未知溶液中游离脂肪酶的含量。

2.2 固定化条件的考察

2.2.1 酶液浓度对吸附率的影响 分别称取 8 份经预处理的树脂各 1.0 g 于 8 个 50 mL 锥形瓶中, 再分别加入不同浓度的酶液 5 mL 进行吸附固定。固定其他吸附条件: 吸附温度 30℃, 吸附时间 24 h, 振荡速度 110 r/min。缓冲液 pH 为 10.0。

由图 2 可以看出, 随着加酶量的增加, 由于一定量的离子交换树脂的交换能力是一定的, 一定的酶与离子交换树脂通过离子交换吸附后达到饱和, 所以吸附率开始下降, 最佳的酶液浓度为 5.0 mL。缓冲液中加入原酶液量为 1.5 mL, 此时的吸附率可达 98.26%。

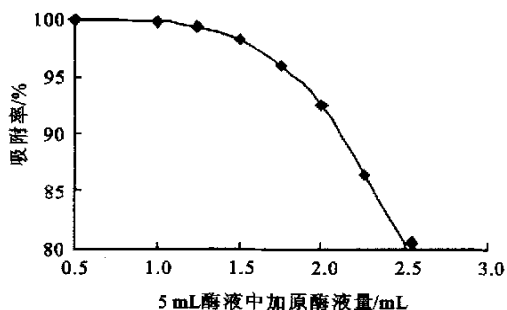


图 2 酶液浓度对吸附率的影响

Fig. 2 Effect of soluble lipase amount on immobilization

2.2.2 吸附时间对吸附率的影响 固定吸附条件为:每克树脂加入含酶液 1.5 mL 的缓冲液 5 mL, 吸附温度为 30 °C, 振荡速度为 110 r/min。改变不同的吸附时间进行酶的固定化, 考察吸附时间对吸附率的影响, 结果见图 3。

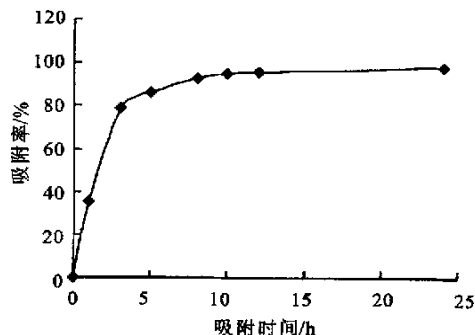


图3 吸附时间对吸附率的影响

Fig. 3 Effect of adsorption time on immobilization

图3显示最佳吸附时间为 10 h, 说明在酶的固定化中要达到吸附平衡需要较长的时间。这可能是因为酶是大分子, 具有较大的体积, 先吸附的酶对后续酶的吸附具有一定的空间位阻效应, 需要一系列的吸附—解吸过程来实现位置的重排才能达到最大吸附。

2.2.3 吸附温度的选择 恒定不同吸附温度进行吸附固定, 其他吸附条件为:每克树脂加入含酶 1.5 mL 的缓冲液 5 mL, 吸附时间为 24 h, 振荡速度为 110 r/min。结果见图 4。离子交换反应需要一定的活化能, 温度的升高有利于交换速度的提高, 温度也影响分子热运动的速度, 但温度过高又可导致蛋白质的变性而失活, 因此多种因素决定了温度对酶的固定化过程的影响较为复杂, 并存在一个最适温度范围。

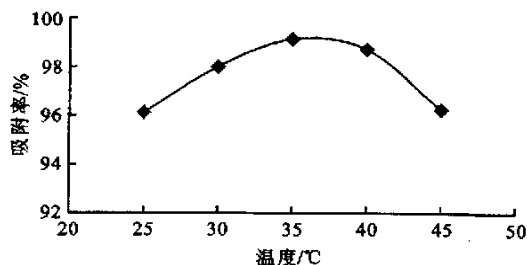


图4 温度对吸附的影响

Fig. 4 Effect of temperature on immobilization

由图4可知, 最佳吸附温度为 35 °C, 这是因为: 蛋白质的吸附是一个吸热过程, 在温度较低时, 酶不容易吸附到树脂上, 随着固定化温度的升高, 分子运动逐渐加剧, 载体对酶的吸附量有所提高, 但是由于蛋白质在较高的温度下容易变性失活, 所以

温度继续升高时, 吸附率反而下降。

2.3 固定化酶的催化性能

2.3.1 水质量分数对固定化酶催化反应的影响

在微水相酶反应中, 酶的催化活性存在一最佳水质量分数, 这些适量水充当润滑剂, 可使酶的柔性增大, 维持酶的最佳活性, 因而称为“必需水”。含水量低于最佳水质量分数时, 酶的构象过于“刚性”而无法表现催化活力; 如果水质量分数高于“必需水”, 酶的结构柔性过大, 也容易引起酶活性中心结构的变化, 引起酶的失活。图5为有机溶剂异辛烷中, 温度为 35 °C, 不同水质量分数的固定化酶催化酯化反应时的初速度。从图中可知, 当固定化酶水质量分数为 8% 时反应的初速度最高。当水质量分数大于 8% 时, 其催化酯化反应的初速度明显下降。

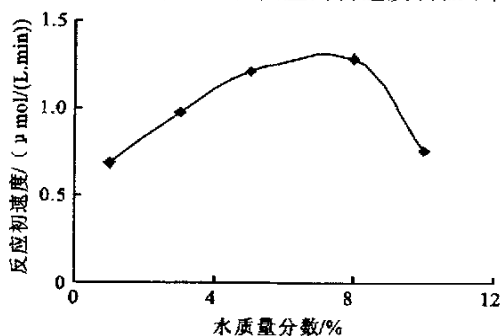


图5 水质量分数对催化反应初速度的影响

Fig. 5 Effect of water content of immobilized lipase on the initial velocity of reaction

2.3.2 加酶量对催化反应的影响 在反应物质的量比为 1:1 (mol) 的条件下, 分别加入不同量的含固定化酶的树脂, 其不同的催化效果见图 6。

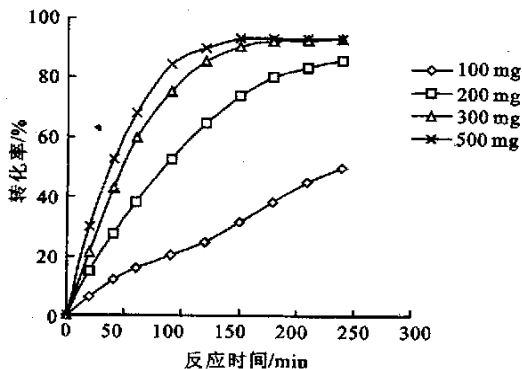


图6 加酶量对催化反应的影响

Fig. 6 Effect of immobilized lipase concentration on reaction

由图可知, 随着加入的固定化酶量的增加, 酯化反应的速度增大, 达到平衡的时间也缩短。当加入 500 mg 固定化酶时, 反应 150 min 就达到平衡, 此时转化率为 93.02%。

2.3.3 温度对酯化反应的影响 图7是不同温度下,酶催化酯化反应的转化率与时间的关系。从图中可知,在一定的范围内,温度对酶有一定的激活作用,能较大提高酶与底物的反应速度。Lipolase 100L的最适温度为30℃^[8],但实验结果表明经固定化后,在55℃时催化效果最好,说明该酶经固定化后其热稳定性有了一定的提高。但当温度达到75℃时,固定化酶因热失活作用,导致酶活力的降低。

3 结 语

D311离子交换树脂为载体,能对脂肪酶进行有效的固定化。固定化的最佳条件为在pH 10缓冲液下,加酶液量为每克预处理过的树脂加入1.5 mL原酶液,吸附时间为10 h,温度为35℃。得到的固定化酶催化合成月桂酸月桂醇酯,在加酶量4 mg/mL,最佳水质量分数8%,55℃的条件下酯化

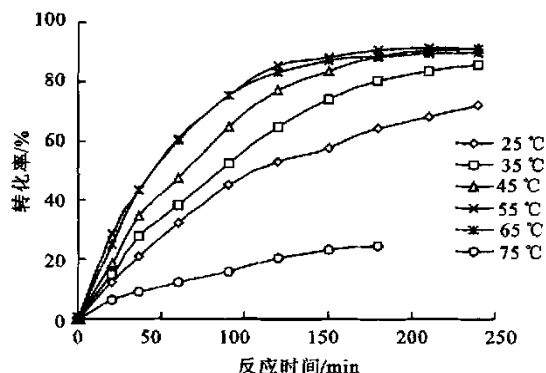


图7 温度对酶催化反应的影响

Fig. 7 Effect of temperature on reaction progress with immobilized lipase

反应催化效果最好,反应210 min转化率可达91.3%。

参考文献(References):

- [1] 许建军,张颖. 脂肪酶的应用研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2002, (4): 19-21.
XU Jian-jun, ZHANG Ying. Advances in application research of lipase[J]. *Jiangsu Food and Fermentation*, 2002, (4): 19-21. (in Chinese)
- [2] 李香春. 脂肪酶的研究进展[J]. 肉类工业, 2003, (4): 45-48.
LI Xiang-chun. Advances research of lipase[J]. *Meat Industry*, 2003, (4): 45-48. (in Chinese)
- [3] 李瑞, 张晓鸣. 有机相脂肪酶催化合成共轭亚油酸 β -谷甾醇酯的研究[J]. 中国油脂, 2006, 31(2): 56-59.
LI Rui, ZHANG Xiao-ming. Lipase-catalyzed synthesis of β -sitosterol ester with conjugated linoleic acid in organic solvent[J]. *China Oils and Fats*, 2006, 31(2): 56-59. (in Chinese)
- [4] 赵庆节, 余莹, 周文瑜等. 有机相中大孔吸附树脂固定化酶催化拆分消旋萘普生[J]. 华东理工大学学报, 2001, (8): 423-426.
ZHAO Qing-jie, YU Ying, ZHOU Wen-yu. Resolution of racemic naproxen catalyzed by lipase from candida cylindracea adsorbed on macroporous resin in organic media[J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 2001, (8): 423-426. (in Chinese)
- [5] 张艳, 江波, 陈超. 离子交换树脂固定果糖转移酶[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术, 2004, 23(4): 60-64.
ZHANG Yan, JIANG Bo, CHEN Chao. Immobilizing Fructosyltransferase with Ion-exchange Resin and the Optimal Conditions[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2004, 23(4): 60-64. (in Chinese)
- [6] 李再资. 生物化学工程基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [7] 钱庭宝. 离子交换剂应用技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1984.
- [8] 余冰宾. 生物化学试验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004.
- [9] 华章熙, 徐清. 洗涤剂酶应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.

(责任编辑: 朱明)