

交联酶聚集体与仿生硅化技术结合制备固定化脂肪酶

姜艳军^{1,2}, 王旗¹, 王温琴¹, 周丽亚¹, 高静^{1,*}

¹河北工业大学化工学院, 天津 300130

²中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

摘要: 将交联酶聚集体 (CLEAs) 与仿生硅化技术相结合, 制备了交联脂肪酶 *Candida* sp. 99-125 杂化生物催化剂。以京尼平为交联剂, 在最佳条件下制得的脂肪酶 CLEAs 的酶活达 771 U/g, 回收率达 75%; 保护剂聚乙烯亚胺 (PEI) 与 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶共沉淀制备 P/CLEAs, 其酶活达 897 U/g, 回收率约 88%; 利用 PEI 的诱导作用, 在 P/CLEAs 表面形成氧化硅涂层, 制得的脂肪酶 CLEAs (Coated-CLEAs) 显示出良好的稳定性, 特别是其抗蛋白酶水解能力、有机溶剂耐受能力、重复使用性能等方面明显提高。

关键词: 交联酶聚集体; 仿生硅化; 假丝酵母脂肪酶 *Candida* sp. 99-125; 京尼平; 固定化酶

中图分类号: O643 **文献标识码:** A

收稿日期: 2011-11-21. 接受日期: 2012-01-10.

*通讯联系人. 电话/传真: (022)60204293; 电子信箱: jgao@hebut.edu.cn

基金来源: 国家自然科学基金青年基金 (21006020); 河北省自然科学基金 (B2010000035, B2011202095); 河北省高等学校科学技术研究重点项目 (ZD2010118); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目 (11965150D); 生化工程国家重点实验室开放课题。

Preparation of Immobilized Lipase through Combination of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Biomimetic Silicification

JIANG Yanjun^{1,2}, WANG Qi¹, WANG Wenqin¹, ZHOU Liya¹, GAO Jing^{1,*}

¹School of Chemical Engineering Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China

²National Key Laboratory of biochemical Engineering Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: The hybrid biocatalyst was prepared by the combination of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) and biomimetic silicification, where the lipase *Candida* sp. 99-125 was used as model enzyme. The preparation conditions of lipase-CLEAs were optimized and the resulting activity of 771 U/g was obtained. Under the optimum conditions, 75% of the activity recovery was obtained. P/CLEAs was prepared by coprecipitation of lipase with polyethylene-imine (PEI), and the resulting activity was 897 U/g. The activity recovery of P/CLEAs was about 88%. The silica coating was formed on the outside surface of P/CLEAs via the induction of PEI. The resulting Coated-CLEAs showed high reusability. The stability of the Coated-CLEAs, including the resistance to trypsin and organic solvents, was also significantly improved.

Key words: cross-linked enzyme aggregate; biomimetic silicification; lipase *Candida* sp. 99-125; genipin; immobilized enzyme

Received 21 November 2011. Accepted 10 January 2012.

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-60204293; E-mail: jgao@hebut.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21006020), the Natural Science Foundation of Hebei Province (B2010000035, B2011202095), the Science and Technology Research Key Project of Higher School in Hebei Province (ZD2010118) and the Application Basic Research Plan Key Basic Research Project of Hebei Province (11965150D). This work was also supported by the Open Funding Project of the National Key Laboratory of Biochemical Engineering (China).

脂肪酶 (Lipase, EC3.1.1.3) 是一类重要的酰基水解酶, 常用来催化酯的水解或醇解、酯合成及酯交换反应, 还可用来催化高聚物和多肽的合成以及手性化合物的拆分等反应^[1-3]. 由于其催化活性高、专一性好、反应条件温和、能耗低、无污染, 已广泛应用于医药、化妆品、清洁剂、食品工业、油脂生产、皮革制造业及环境治理等很多领域^[4-6]. 固定化酶不仅可提高酶的稳定性, 有利于酶的回收和重复利用, 实现连续自动化生产, 降低酶催化成本, 还可有效避免游离酶的自聚与分解, 增强反应的可控性和适用性^[7,8]. 这对降低生产成本, 提高生产效率具有重要意义. 因此, 固定化酶一直是酶工程领域的研究热点之一.

交联酶聚集体 (CLEAs) 是 Sheldon 课题组^[9]提出的一种无载体固定化酶技术, 具有对酶纯度要求低、无需载体、单位体积活性高、空间效率高、操作简便等优点; 已表现出良好的应用前景^[10,11]. Shah 等^[10]的研究表明, 在 CLEAs 的制备过程中添加保护剂如牛血清白蛋白 (BSA) 可提高 CLEAs 的活性. 因 BSA 分子中含有大量氨基, 可与戊二醛反应, 当交联发生时, BSA 和酶分子同时竞争戊二醛分子; 控制 BSA 浓度在一定范围内可避免戊二醛与酶过度交联造成的酶活损失. 然而, CLEAs 本身存在机械强度较差, 在反复使用过程中易破碎, 造成酶泄露、回收困难等问题^[12,13]. 为了提高 CLEAs 的机械强度和操作稳定性, Kim 等^[14]和 Wang 等^[15]采用介孔和大孔材料固载化 CLEAs, 在提高机械强度的同时, 有效地改善了 CLEAs 的性质, 使其热稳定性、储存稳定性和操作稳定性等明显提高; Wilson 等^[16]和 Sangeetha 等^[17]将 CLEAs 包埋于有机或无机凝胶中以提高 CLEAs 的机械强度、活性和稳定性. 但这些固载化 CLEAs 的方法存在如下缺点: (1) 由于大量惰性载体的存在, 严重降低了单位体积内酶的浓度, 载体固定化引起的扩散限制效应、空间位阻、分配效应等对酶催化特性的影响很大; (2) 固载化材料 (如介孔氧化硅) 制备及表面功能化修饰过程较复杂, 固定化成本较高, 因而在一定程度上限制了固载化 CLEAs 的应用. 因此, 在不影响或很少影响 CLEAs 单位体积酶浓度的前提下, 寻找廉价、高效和可提高 CLEAs 机械强度和操作稳定性的方法显得十分必要.

因此, 本文在制备 CLEAs 过程中引入聚乙烯亚胺 (PEI) 作为保护剂, 以防止酶活性位点被过度交联; 同时, 依靠 PEI 可诱导仿生硅化的功能^[18], 在 CLEAs 上沉积纳米级氧化硅涂层, 以提高 CLEAs 的机械强度和操作稳定性.

1 实验部分

1.1 固定化酶的制备

取 5 ml 粗酶 (*Candida sp.* 99-125, 北京凯泰新世纪生物技术有限公司) 原液 (30 mg/ml) 于 50 ml 具塞锥形瓶中, 加入一定量的沉淀剂, 振荡 20 min 后, 使其充分沉淀, 得到酶聚集体; 离心除去上清液, 再加入一定量的京尼平 ($\geq 98\%$, 临川之信生物科技有限公司) 溶液 (0.25%, pH = 8.0) 进行交联, 低温下离心 (5 °C, 1000 r/min, 10 min), 弃上清液, 蒸馏水淋洗沉淀 2~3 次, 真空冷冻干燥 24 h, 得到 CLEAs, 于 4 °C 储存备用.

将 5 ml 粗酶原液 (30 mg/ml) 和一定量的 PEI (20 mg/ml) 于 50 ml 具塞锥形瓶中充分混匀, 加入一定量的沉淀剂, 振荡一定时间后, 使其充分沉淀, 离心得沉淀即为酶聚集体; 在酶聚集体中加入一定量的京尼平溶液 (0.25%), 反应一定时间以使其充分交联, 离心 (5 °C, 1000 r/min, 10 min) 除去上清液, 蒸馏水淋洗沉淀 2~3 次 (此交联酶聚集体记为 P/CLEAs); 在沉淀中加入一定量的硅前驱体水解液 (正硅酸甲酯 (TMOS) 水解液, 0.05 mol/L, pH = 7.0), 振荡, 离心, 蒸馏水淋洗沉淀 2~3 次, 真空冷冻干燥 24 h, 得到 Coated-CLEAs, 4 °C 下储存, 备用.

1.2 脂肪酶水解活性的测定

游离酶和固定化酶的活性均采用改进的橄榄油 (天津市科锐思精细化工有限公司) 乳化法进行测定. 在 40 °C, pH = 8.0 条件下, 1 min 催化产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量定义为 1 个活力单位 (U).

酶活回收率 R 按下式计算: $R = 100\% \times A_i/A_f$, $A_f = A_T \times D$. 式中, A_i 和 A_f 分别为固定化酶的实际酶活力和理论酶活力, A_T 为固定时使用的游离酶总活力, D 为吸附率.

1.3 脂肪酶酯化活性的测定

采用油酸与甲醇酯化反应来评价固定化脂肪酶的催化活性. 取 200 mg 固定化酶于 50 ml 锥形瓶中, 加入 1 g 油酸, 0.1704 g 甲醇 (酸/醇摩尔比为

2/3), 5 ml 正己烷及 1 g 分子筛 (为除反应体系中的水分), 密封好后, 置于 40 °C, 150 r/min 的恒温水浴振荡器中反应 8 h. 反应结束后取样, 通过测定反应前后体系的酸值(S)来计算反应的转化率(R), 以此表征固定化酶的活性. $S = MVc/m$, $R = 100\% \times (S_0 - S_i)/S_0$. 式中, M 为 KOH 的摩尔质量 (g/mol), V 为样品所消耗 KOH 标准溶液的体积 (ml), c 为 KOH 标准溶液浓度 (mol/L), m 为待测样品质量 (g); S_0 和 S_i 分别为酯化反应前后体系的酸值 (mg/g).

2 结果与讨论

2.1 固定化酶条件的优化

2.1.1 沉淀剂的选取

于 5 ml 酶原液 (12.09 U/ml, pH = 7.0) 中分别加入以下沉淀剂 (15 ml): 硫酸铵溶液 (50%, 75% 与饱和)、丙酮、甲醇、乙醇、正丙醇和异丙醇 (AR, 天津市江天化工技术有限公司), 于 20 °C, 100 r/min 的恒温水浴摇床振荡 20 min, 离心, 弃上清液, 沉淀即为酶聚集体. 测定酶聚集体的水解活性, 结果示于图 1. 可以看出, 以硫酸铵为沉淀剂时, 酶聚集体可保持较高的活性, 丙酮和异丙醇次之, 甲醇、乙醇和正丙醇对酶活的影响最大. 实验还发现, 加入丙酮后, 立即产生颗粒形态均匀的沉淀; 加入的硫酸铵浓度越高, 酶聚集体沉淀量越大; 加入甲醇、乙醇稍后生成沉淀, 上清液呈乳白色; 加入正丙醇后, 形成细小均匀的沉淀, 上清液澄清透明; 异丙醇加入出现大团结块现象, 上清液澄清透明. 这是由于有机

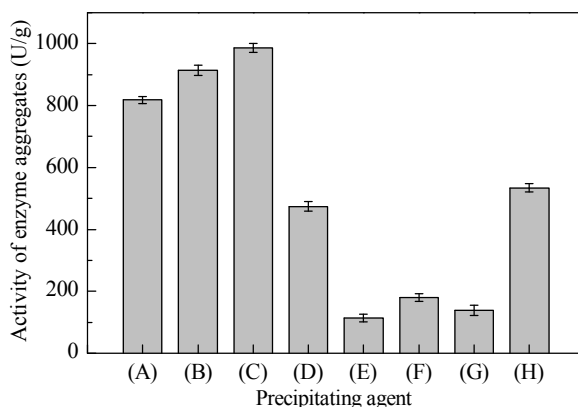


图 1 沉淀剂对酶聚集体活性的影响

Fig. 1. Effect of precipitating agents on the activity of enzyme aggregates. (A) 50% ammonium sulfate solution; (B) 75% ammonium sulfate solution; (C) saturated ammonium sulfate solution; (D) acetone (E) methanol; (F) ethanol; (G) *n*-propanol; (H) isopropanol.

溶剂的加入使得水溶液的介电常数降低, 引起蛋白质分子间静电引力 (库仑力) 增大, 从而导致蛋白质分子凝集和沉淀. 同时, 有机溶剂的加入释放出大量的稀释热, 对酶活有所影响. 几种有机溶剂沉淀剂效果不理想可归结为沉淀效率不高或导致酶变性失活, 即破坏酶分子的构象造成酶失活. 对于硫酸铵溶液而言, 高浓度的硫酸铵使游离酶立即沉淀完全, 酶的活性中心瞬时被锁定在高酶活状态, 在一定程度上避免了酶活的剧烈损失. 同时, 活性中心被包围在聚集体中, 不易受到沉淀剂的进一步破坏, 使酶活得以保持. 若硫酸铵的浓度较低, 体系含水量大, 酶沉淀速度慢, 致使大量游离酶的活性中心暴露于沉淀剂中而遭到破坏. 即使形成聚集体, 这些变性的活性中心也不会恢复到高酶活的状态. 另外, 低浓度的沉淀剂导致酶蛋白回收率低, 也是酶活力回收率低的一个原因. 因此, 以饱和硫酸铵为沉淀剂较为适宜.

2.1.2 沉淀 pH 值和温度的影响

采用不同 pH 值 (3.0~10.0) 的磷酸缓冲液配制粗酶溶液 (30 mg/ml), 在 20 °C 下制备 CLEAs 并测定酶活回收率, 结果示于图 2. 由图可见, 当 pH = 8.0 时, 所得 CLEAs 的酶活回收率较高 (约为 75%). 这可解释为该酶的适宜 pH 值为 8, 在此条件下制备的 CLEAs, 酶的活性中心瞬时被锁定在高酶活状态, 有利于酶活发挥. 因此, 后续实验均选用 pH = 8.0 的缓冲液.

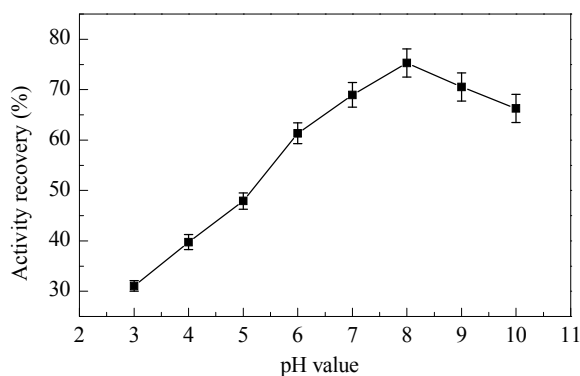


图 2 pH 值对 CLEAs 酶活回收率的影响

Fig. 2. Effect of pH values on the activity recovery of CLEAs. CLEAs—cross-linked enzyme aggregates.

本文还分别考察了不同温度 (0~50 °C) 下制备的 CLEAs 的酶活回收率. 发现 CLEAs 的活力随着

沉淀温度的升高而降低; 当温度高于 20 °C 时, 酶活下降明显. 综合考虑酶活力与操作的简易性, 选取 20 °C 为沉淀温度.

2.1.3 交联剂浓度和交联时间的影响

考察了不同浓度的京尼平溶液 (0.075%~0.5%) 交联不同时间 (1~7 h) 时制得的 CLEAs 的活性. 结果发现, 随着京尼平浓度的增加和交联时间的延长, CLEAs 的酶活先升高后降低. 这是由于随交联剂浓度的增加和交联时间的延长, 酶活性中心的氨基与京尼平发生过度交联, 导致酶活下降^[19-21]. 另外, 过度交联也会增加了脂肪酶的空间位阻^[19,20], 不利于酶活性的发挥. 结果显示, 选用 0.25% 的京尼平交联 5 h 获得的固定化酶活性回收率最高 (75% 左右).

2.1.4 PEI 量对 CLEAs 活性的影响

在固定化酶制备过程中添加保护剂可使酶的活性位点及构象不被破坏^[10]. 本文以 PEI 为保护剂, 考察其对 CLEAs 活性的影响, 结果示于图 3. 由图可见, 经交联后, 酶活均有所下降; 不同的是, 没有添加 PEI 的脂肪酶聚集体经交联后, 活性降低了 235 U/g, 而加入适量的 PEI (2.0 ml) 后, 仅下降了 90 U/g, 说明 PEI 的存在抑制了交联过程中交联剂对酶的损伤. 这是由于 PEI 中的氨基参与交联反应, 减少了交联剂对酶活性位点的直接交联机会, 使 P/CLEAs 保持了较高活性^[22]. 但是, PEI 溶液为碱性, 用量过多会明显提高体系的 pH 值, 导致部分酶活损失, 故酶聚集体活性随着 PEI 量的增加而降低. 当 PEI 的添加量为 2 ml 时, P/CLEAs 的活性最高

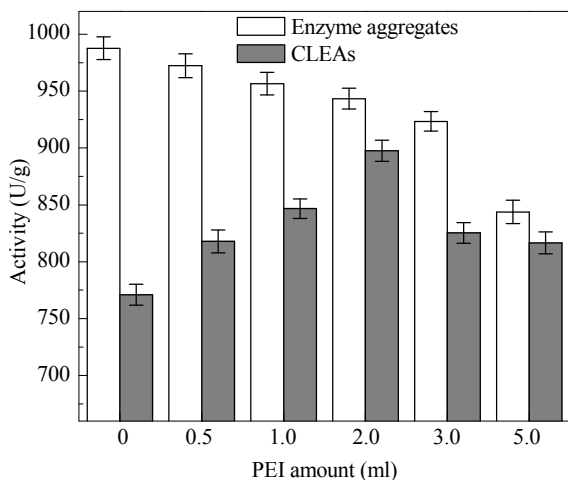


图 3 PEI 添加量对 CLEAs 活性的影响

Fig. 3. Effect of the PEI amount on the activity of CLEAs.

(897 U/g); 继续增加 PEI 用量, CLEAs 酶活下降.

2.1.5 仿生硅化对 CLEAs 活性的影响

图 4 为游离脂肪酶、CLEAs、P/CLEAs 和 Coated-CLEAs 的酶活比较. 可以看出, P/CLEAs (酶活回收率可达 88%) 比 CLEAs (酶活回收率为 75%) 和 Coated-CLEAs (回收率为 71%) 的活性高. 这是由于 PEI 的添加虽然有效地保护了酶的活性位点, 但 P/CLEAs 表面形成的纳米 SiO₂ 壳层对底物扩散起到限制作用, 同时使得单位质量固定化酶的酶浓度降低, 所以 Coated-CLEAs 比酶活降低.

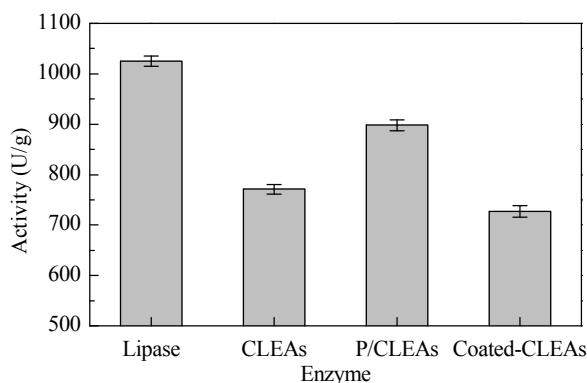


图 4 固定化酶及游离酶的酶活比较

Fig. 4. The activity of different immobilized lipases and free lipase. P/CLEAs—prepared by coprecipitation of lipase with polyethylenimine (PEI); Coated-CLEAs—CLEAs coated by silica.

2.2 不同固定化酶的性能考察

2.2.1 最适温度

图 5 为温度对固定化酶和游离酶活的影响. 可以看出, 游离脂肪酶和 CLEAs 的最适温度分别为 40 和 30 °C, 而 P/CLEAs 与 Coated-CLEAs 的仍为

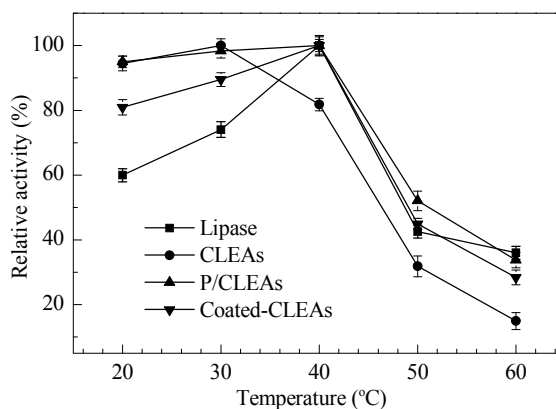


图 5 固定化酶和游离酶的最适反应温度

Fig. 5. Optimum reaction temperature of immobilized lipase and free lipase.

40 °C. 这可能是由于 PEI 与脂肪酶共沉淀后, PEI 与酶分子竞争参与交联, 起到保护酶分子构象的作用, 使固定化前后酶分子本身基本不发生变化, 以致使最适温度不变。

2.2.2 溶剂稳定性和抗蛋白酶水解能力

为了考察固定化酶对常用有机溶剂的耐受性能, 本文分别将固定化酶于 5 ml 正己烷和石油醚中浸泡 1~8 h 后, 测定其水解酶活, 结果示于图 6(a)。可以看出, 随着浸泡时间的延长, 固定化酶的活性下降。在正己烷中浸泡 8 h 后, P/CLEAs 和 Coated-CLEAs 的酶活保留率分别为 71% 和 77%, 而 CLEAs 的仅为 66%; 在石油醚中浸泡 8 h 后, P/CLEAs 和 Coated-CLEAs 的酶活分别为 79% 和 83%, 而 CLEAs 酶活保留率仅为 67%。可见, P/CLEAs, 尤其是 Coated-CLEAs 的溶剂耐受力比 CLEAs 强, 表明氧化硅涂层对提高固定化酶的有机溶剂耐受性效果非常明显。这十分有利于固定化脂

肪酶在非水相酶催化反应。

取游离脂肪酶溶液和固定化酶悬浮液各 3 ml, 分别加入 0.2 ml 胰蛋白酶溶液 (5 g/L), 于 37 °C 保温 10~240 min 后, 测定其残存酶活, 结果示于图 6(b)。由图可见, 随着时间的延长, 游离酶与固定化酶活力均降低; 至 240 min 时, Coated-CLEAs 保留了 53% 的酶活, 而游离脂肪酶仅保留了 37%。由此可见, Coated-CLEAs 抵抗胰蛋白酶水解的能力更强。这可能是由于交联酶聚集体表面的氧化硅涂层阻碍了胰蛋白酶对脂肪酶的降解, 提高了固定化酶抗蛋白酶的水解能力。

2.2.3 酶的重复使用性能

考察了 CLEAs, P/CLEAs 和 Coated-CLEAs 在酯化反应中的重复使用性。即每次催化完成后, 回收固定化酶, 用于下一次反应; 把第一次使用时酶活定义为 100%, 结果示于图 7。可以看出, Coated-CLEAs 的重复使用性高于 P/CLEAs, 而 CLEAs 的最差。这是由于重复操作导致酶分子自身变性与脱落造成的; 而氧化硅涂层的保护使得 Coated-CLEAs 具有较好的重复操作性能, 循环使用 7 次后, 酶活仍保持为 81%, 有利于脂肪酶的连续批次反应。

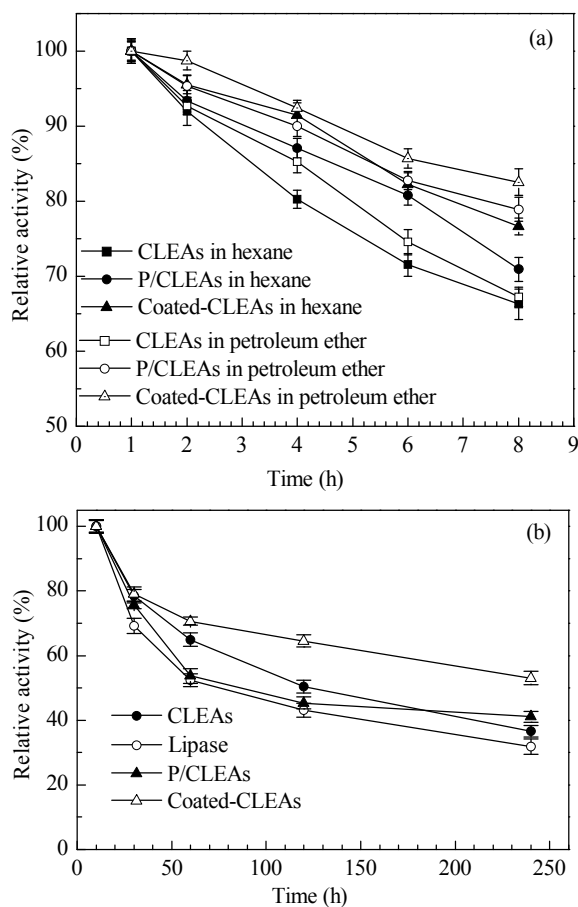


图 6 不同脂肪酶对溶剂的稳定性和对胰蛋白酶的耐受性
Fig. 6. Resistance of different lipases to organic solvents (a) and trypsin (b).

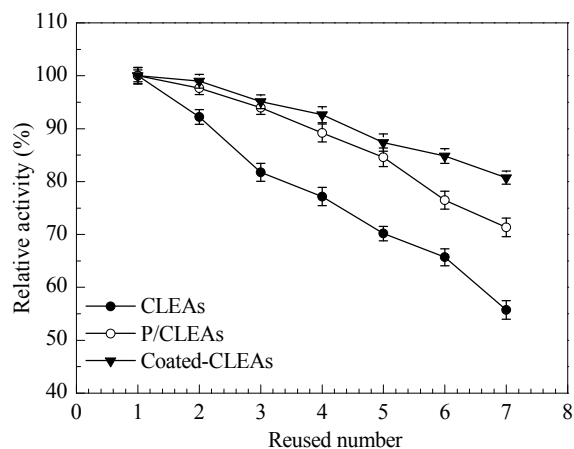


图 7 固定化酶催化酯化反应的重复使用性能
Fig. 7. Reusability of the immobilized lipase.

3 结论

在优化 CLEAs 制备条件的基础上, 首次引入仿生硅化技术来制备氧化硅-CLEAs 杂化生物催化剂。结果发现, PEI 在保护酶的同时, 还能诱导硅前驱体在 CLEAs 表面形成纳米氧化硅涂层, 进一步提高固定化酶的稳定性, 尤其是在对抗蛋白酶水解、耐受有

机溶剂、重复利用及防止酶泄漏方面,表现出较好的效果. 本文可为新型固定化酶设计与制备提供新的理论与方法,进一步促进固定化酶在工业催化领域的应用,还可为多酶 CLEAs 及多酶杂化生物催化剂的理性构建奠定基础.

参 考 文 献

- 1 Ceni G, Lerin L A, De Conto J F, Brancher C V, De Silva P C, Toniazzo G, Treichel H, De Oliverira D, Oliveira J V, Oestreicher E G, Antunes O A C. *Enzyme Microb Technol*, 2010, **46**: 107
- 2 Li Z, Wang Y L, Li J, Li J, Wang P, Wei W, Gao Y, Fu C Y, Dong W Q. *Bioresource Technol*, 2010, **101**: 1305
- 3 Singh M, Singh R S, Banerjee U C. *Process Biochem*, 2010, **45**: 25
- 4 Hung T C, Giridhar R, Chiou S H, Wu W T. *J Mol Catal B*, 2003, **26**: 69
- 5 Li Y, Gao F, Wei W, Qu J B, Ma G H, Zhou W Q. *J Mol Catal B*, 2010, **66**: 182
- 6 Vaidya B K, Ingavle G C, Ponrathnam S, Kulkarni B D, Nene S N. *Bioresource Technol*, 2008, **99**: 3623
- 7 Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernandez-Lafuente R, Huet J, Guisan J M. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**: 486
- 8 Persson M, Mladenoska I, Wehtje E, Adler Crentz P. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**: 833
- 9 Cao L, Van Rantwijk F, Sheldon R A. *Org Lett*, 2000, **2**: 1361
- 10 王梦凡, 齐葳, 苏荣欣, 何志敏. 化学进展 (Wang M F, Qi W, Su R X, He Zh M. *Progr Chem*), 2010, **22**: 173
- 11 Pan J, Kong X D, Li C X, Ye Q, Xu J H, Imanaka T. *J Mol Catal B*, 2011, **68**: 256
- 12 Roessl U, Nahálka J, Nidetzky B. *Biotechnol Lett*, 2010, **32**: 341
- 13 Schoevaart W R K, Van Langen L M, Vanden Dool R T M, Boumans J W L. WO 2006 046 865. 2006
- 14 Kim M I, Kim J, Lee J, Jia H, Na H B, Youn J K, Kwak J H, Dohnalkova A, Grate J W, Wang P, Hyeon T, Park H G, Chang H N. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **96**: 210
- 15 Wang M F, Qi W, Yu Q X, Su R X, He Z M. *Biochem Eng J*, 2010, **52**: 168
- 16 Wilson L, Illanes A, Pessela B C C, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán J M. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **86**: 558
- 17 Sangeetha K, Abraham T E. *Int J Biol Macromol*, 2008, **43**: 314
- 18 Neville F, Broderick M J F, Gibson T, Millner P A. *Langmuir*, 2011, **27**: 279
- 19 Alonso N, Lopez-Gallego F, Betancor L, Hidalgo A, Mateo C, Guisan J M, Fernández-Lafuente R. *J Mol Catal B*, 2005, **35**: 57
- 20 Moehlenbrock M J, Toby T K, Waheed A, Minter S D J. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**: 6288
- 21 Jones P O, Vasudevan P T. *Biotechnol Lett*, 2010, **32**: 103
- 22 López-Serrano P, Cao L, Van Rantwijk F, Sheldon R A. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1379