

离子交换树脂固定接枝脂肪酶

张汝壮¹, 周彦波^{1,2}, 朱明英³, 鲁军^{1,2}

1. 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237
2. 华东理工大学煤气化及能源化工教育部重点实验室, 上海 200237
3. 上海大学环境与化学工程学院, 上海 200072

摘要 酶法是制取生物柴油的一种新型方法, 而酶的重复利用率直接影响该法的运行成本。本文采用吸附法将碱性脂肪酶 L4 固定在 4 种不同树脂上, 对比了利用不同树脂和在不同酶液浓度条件下的固定化效果, 然后采用吸附-交联法将脂肪酶固定在树脂 DK110 上, 考查交联方式和交联剂浓度对酶固定化的影响以及固定化酶的重复使用稳定性。结果表明, 大孔型离子交换树脂 DK110 的固定化效果最好, 酶液浓度对脂肪酶固定化影响显著。交联方式对固定化效果有显著影响, 酶液先与戊二醛混合后加入树脂载体 (JL1) 所获得的酶活最大 (340U/g), 酶液、戊二醛与树脂载体同时混合 (JL2) 重复使用稳定性最好。该研究为固定酶法制取生物柴油奠定了基础。

关键词 脂肪酶固定化; 离子交换树脂; 吸附法; 交联方式; 生物柴油

中图分类号 Q814.2

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.h1.010

Lipase Immobilization Through Ion Exchange Resins

ZHANG Ruzhuang¹, ZHOU Yanbo^{1,2}, ZHU Mingying³, LU Jun^{1,2}

1. School of Resource & Environmental Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China
2. Key Laboratory of Coal Gasification and Energy Chemical Engineering of Ministry of Education, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China
3. School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, China

Abstract L4 lipase was immobilized on four kinds of resins by adsorption, involving ion exchange resins and macroporous resins. The influences of carriers and lipase concentrations on the adsorption amounts and activities of immobilized lipases were investigated. Then the L4 Lipase was immobilized on ion exchange resin (DK110) by a method so called adsorption and cross-linking, in which glutaraldehyde is used as the cross-linking agent. The influences of glutaraldehyde concentration and cross-linking methods on the lipase immobilization were also investigated. The results show that macroporous ion exchange resin (DK110) is proved to be the most suitable immobilization supporter; the activity of the immobilized lipase is 292U/g when the lipase concentration is controlled at 50mg/mL. Lipase concentrations and cross-linking methods have a great impact on the immobilization of lipase, either strengthen or weaken. Under the same conditions, lipases immobilized by adsorption and cross-linking treatment exhibit higher activities compared with the lipases immobilized by simple adsorption. Furthermore, lipases immobilized by JL1 exhibit the highest activities, which are 340U/g, and lipases immobilized by JL2 are very much stable in repeated usage, they remain 53% of the initial activity after six cycles. This research might lay the foundation for the further study on bio-diesel based on the immobilized lipases.

Keywords lipase immobilization; ion exchange resin; adsorption; cross-linking; biodiesel

0 引言

脂肪酶是一类能催化脂类水解、酯交换、酯合成、转酯化等反应的酶, 因其广泛的特异性和较高的选择性广泛应用于

油脂加工、食品、医药、日化等行业^[1], 其中废油脂酶法制取生物柴油就是脂肪酶的应用之一。生物柴油是由动植物油脂与短链醇(甲醇或乙醇)进行酯交换反应所制备的脂肪酸低碳

收稿日期: 2012-12-18; 修回日期: 2012-12-31

基金项目: 高等学校博士学科点专项基金项目(20100074120012); 华东理工大学基本科研业务费专项基金项目(WB1014046-3)

作者简介: 张汝壮, 博士研究生, 研究方向为水污染控制技术, 电子信箱: qdzrz123@126.com; 周彦波(通信作者), 副教授, 研究方向为水污染控制技术和能源转化, 电子信箱: yanbo_zhou@163.com

醇酯,具有可再生性、润滑性能好、燃烧充分等优点。由于酶法合成生物柴油具有制取简单,反应条件温和,不受废油脂中脂肪酸含量影响等优点,所以该方法是解决如今城市中废油脂问题有效途径之一,因此,脂肪酶的高效合理利用至关重要^[2]。

然而,脂肪酶应用过程中存在易结块、不易复回收、很难重用等问题,而且脂肪酶的价格较高,不利于推广应用。为了降低脂肪酶的使用成本,提高其稳定性和活力,许多研究者开展了固定化脂肪酶的研究^[3]。脂肪酶固定化技术中吸附法应用最为普遍,其中固定化载体的选择是其关键因素之一。目前,载体的研究主要集中在多孔和大孔材料上^[4],具有酸性或碱性基团的离子交换树脂就是其中之一,其具有吸附容量大、机械强度高、再生处理方便等优点,而且这种高分子聚合物在常温下十分稳定,使用过程中不会有任何物质释放出来,具有实际应用的价值^[5]。基于这种载体的离子交换吸附法是近年来逐渐发展起来的一项新技术,它主要通过离子交换作用、表面吸附或氢键等达到吸附目的。研究表明,戊二醛交联可以提高固定化酶的酶活和稳定性^[6],但是交联方式对酶固定化的影响却鲜有报道。

为了优化脂肪酶的固定化,本研究选用不同规格的树脂为载体,采用吸附法和吸附-交联法固定脂肪酶,通过对比所得固定酶的酶吸附量和酶活选出最佳载体,然后利用最佳载体考查酶液浓度、交联方式、交联剂浓度等因素对脂肪酶固定化的影响,最后考查所得固定酶的重复使用稳定性,并进行对比分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大孔吸附树脂 HZ801 和 HZ832、大孔离子交换树脂 DK110 和凝胶型离子交换树脂 JK110 来自华东理工大学华震科技有限公司,L4 碱性脂肪酶来自深圳市绿微康生物工程有限公司。磷酸、戊二醛、甘氨酸、考马斯亮蓝均为分析纯,橄榄油、聚乙烯醇(聚合度为 1750)和无水乙醇,为化学纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 吸附法固定化脂肪酶

称取一定量的酶粉溶解到磷酸缓冲溶液(pH=7.2)中,充分搅拌并离心,将酶液转移到容量瓶中,定容。移取 25mL 配置好的一定浓度的酶液于 100mL 锥形瓶中,并加入 1.5g 经过酸碱预处理过的树脂,放在恒温振荡器(30℃)上震荡 6h;取上清液测定酶蛋白含量;抽滤分离固定酶,并用 200mL 磷酸缓冲溶液(pH=7.2)冲洗固定酶。获得的固定酶 4℃条件下保存备用。利用不同树脂在不同浓度(0.2~10mg/mL)的酶液中进行脂肪酶的固定化,考查酶吸附量和酶活的变化情况。

1.2.2 吸附-交联法固定化脂肪酶

以直接吸附法(XF)作对比考查不同交联方式对酶固定

化的影响,4 种交联方式如下,JL1:交联剂先和酶液混合震荡 2h,再加树脂震荡 6h;JL2:交联剂、酶液和树脂同时混合震荡 6h;JL3:树脂和酶液先混合震荡 4h,最后加交联剂震荡 2h;JL4:交联剂先和树脂混合震荡 2h,然后抽滤清洗树脂,再加酶液震荡 6h。上述过程中,交联剂为戊二醛,浓度均控制在 0.5%;酶液浓度为 10mg/mL;其他条件同吸附法。

分别采用 JL1 和 JL2 两种交联方式考查交联剂浓度对固定化的影响。重复测定同一批次的固定化酶的酶活,期间不采取灭活措施,考查固定化酶重复使用稳定性。

1.2.3 酶吸附量测定

采用考马斯亮蓝法测定脂肪酶浓度:配制不同脂肪酶含量的标准系列,根据其在 595nm 波长处的吸光度和酶含量作标准曲线。利用标准曲线以及测定的吸光度计算上清液中酶含量。单位质量树脂的酶吸附量计算公式为

$$Q = \frac{(c_0 - c_s)V}{m} \quad (1)$$

其中, Q 为酶吸附量,mg/g; c_0 为酶液浓度,mg/mL; c_s 为固定后上清液酶浓度,mg/mL; V 为溶液体积,mL; m 为树脂质量,g。

1.2.4 酶活测定

采用改进的橄榄油乳化法,取两个锥形瓶(A 和 B),各加入橄榄油乳化液 4.0mL 和磷酸缓冲溶液 5.0mL,再向 A 瓶中加入乙醇 15.0mL,于 40℃恒温振荡器中预热 5min;各加入 0.5g 固定化酶,立即混匀计时,震荡 10min 后,向 B 瓶中加入 15.0mL 乙醇终止反应。将锥形瓶中的溶液全部转移到离心管中,用 5mL 缓冲溶液冲洗锥形瓶,以 2000r/min 的转速离心 3min,将上清液转移到锥形瓶中;滴加 3~5 滴酚酞指示剂,用 0.05mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定水解产生的游离脂肪酸,滴定至微红色,记录 NaOH 消耗量。

酶活计算公式为

$$X_1 = \frac{(V_1 - V_2) \times 5}{m} \quad (2)$$

其中, X_1 为样品酶活,U/g; V_1 为滴定样品消耗 NaOH 标准溶液的体积,mL; V_2 为滴定空白消耗 NaOH 标准溶液的体积,mL; m 为固定化酶的质量,g。

2 结果与讨论

2.1 载体的筛选

采用 4 种不同的树脂固定脂肪酶,结果如图 1 所示,离子交换型树脂 DK110 和 JK110 的酶吸附量明显低于吸附型树脂 HZ801 和 HZ832,但前两者的酶活明显高于后两者。原因可能是大孔吸附性树脂的吸附固定点主要在孔道内表面和外表面,表面积更大,酶吸附量更多,但过多的酶可能会导致内部孔道堵塞,底物无法进入,反应有效点少。

凝胶型树脂 JK110 的酶吸附量稍高于 DK110 的酶吸附量,原因是凝胶型树脂的交换容量稍大;当酶液浓度不大于 3mg/mL 时,JK110 所得固定酶酶活相对较高,而当酶液浓度继续增大后,DK110 所得固定酶酶活较高,可能是因为过高

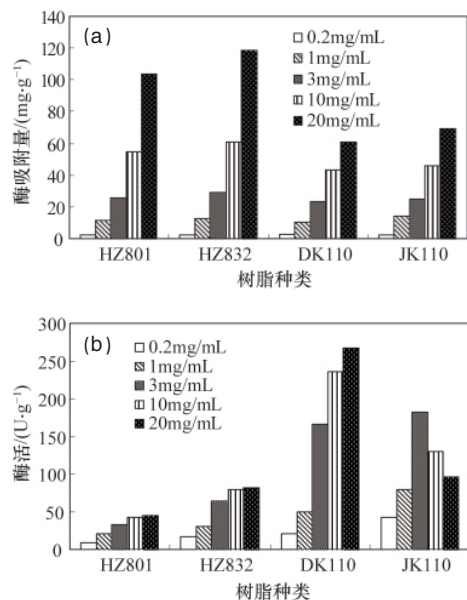


图1 不同固定化载体的酶吸附量(a)和获得的固定化酶酶活(b)
Fig. 1 Lipase adsorption on different carriers (a) and activities of immobilized lipase (b) with various lipase concentrations

的酶液浓度导致凝胶型树脂 JK110 的溶胀量过大,均相凝胶结构被破坏。

综上,对于大孔型阳离子树脂 DK110,尽管酶吸附量相对较低,但酶活明显高于其他树脂,在 20mg/mL 的浓度下所得固定酶的最大酶活为 268U/g。所以,选择 DK110 作为最优载体应用在后续的研究中。

2.2 酶液浓度对脂肪酶固定化的影响

在不同酶液浓度条件下,以 DK110 为载体进行固定化,得到的固定酶酶活和酶吸附量如图 2 所示。随着酶液浓度的增加,酶吸附量增加,固定酶酶活也相应增加,但是两者的增速变慢,酶活趋于定值。

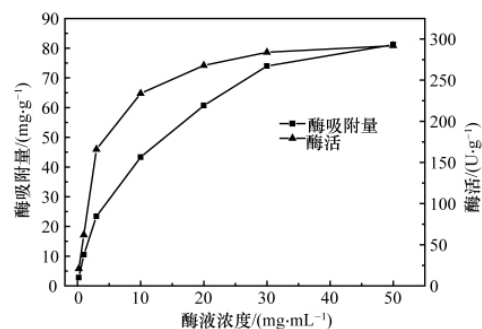


图2 酶液浓度对脂肪酶固定化的影响

Fig. 2 Effects of lipase concentration on immobilization

当酶液浓度大于 10mg/mL 时,固定酶酶活增速变慢。随着酶浓度的增加,酶分子聚集成团,这样的酶分子集群多会聚集在树脂的孔道口,同时孔道内部也会形成多层酶分子层,树脂孔道就越易被“堵塞”,导致底物无法进入,反应点只存在于外表面,反应有效点减少,进而导致酶活较低^[7]。综上,酶液浓度对脂肪酶固定化影响显著,在 50mg/mL 浓度下获得

的最大酶活为 292U/g,但是与 20mg/mL 时的酶活(268U/g)没有太大提高。

2.3 交联对脂肪酶固定化的影响

2.3.1 交联方式的影响

由图 3 可知,利用不同交联方式所获得的固定酶最大酶活分别为 340U/g (JL1)、283U/g (JL2)、267U/g (JL3)、6U/g (JL4),除 JL4 外,交联所获得的固定酶最大酶活均大于直接吸附 (XF) 所获得的最大酶活(236U/g)。不同交联方式对脂肪酶固定化的影响不同,或促进或削弱。

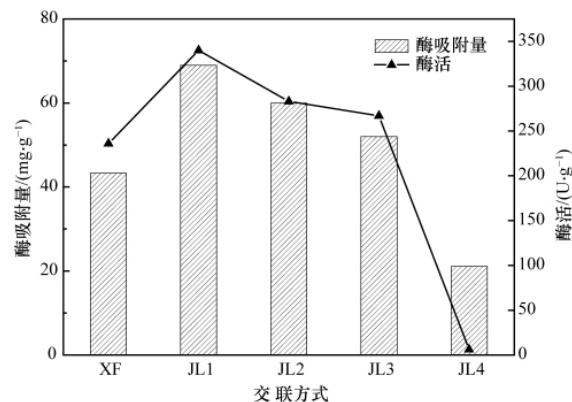


图3 交联方式对脂肪酶固定化的影响

Fig. 3 Effects of cross-linking method on lipase immobilization

溶液中加入戊二醛后,戊二醛首先会相互交联在一起,形成三聚体、四聚体、五聚体等,然后酶分子、树脂载体和戊二醛会彼此交叉连接起来。JL1 中交联剂首先和酶液混合,脂肪酶通过氨基和自由的戊二醛醛基交联结合在一起,形成戊二醛-酶聚合物。加入树脂后,部分聚合物进入树脂孔道内,大部分聚合物固定在树脂表面。由于表面聚合物长短不一,脂肪酶分子能够分层分布在树脂表面,反应位点相对较多,酶活最大;JL2 中交联剂、酶液和树脂同时混合,戊二醛-酶聚合物的量相对 JL1 较少,导致表面固定量少,酶吸附量和酶活相对较低;JL3 中交联主要是加固了脂肪酶分子与树脂之间的连接;JL4 中交联剂先和树脂混合,戊二醛聚合体可能会将树脂内部孔道堵死,同时会在树脂表面形成较大的聚合体,自由醛基相对减少,酶分子无法进入内部,表面固定的酶分子数量也较少,酶活最低^[8,9]。

2.3.2 交联剂浓度的影响

利用两种不同的交联方式(JL1 和 JL2)考查交联剂浓度对固定化的影响,如图 4 所示。对于 JL1,交联剂浓度小于 0.5%时,酶吸附量和酶活均快速增加;随交联剂浓度继续增加酶吸附量继续增加,但是酶活却有所降低,并保持恒定水平。对于 JL2,随交联剂浓度的增加,酶吸附量逐渐增加;酶活也逐渐增加,但是交联剂浓度为 0.5%时,酶活基本达到最大值。当交联剂浓度大于 0.5%后,酶吸附量继续增加,过多的酶导致孔道堵塞,最终导致酶活保持不变甚至降低。综上,最适的交联剂浓度应该控制在 0.5%。

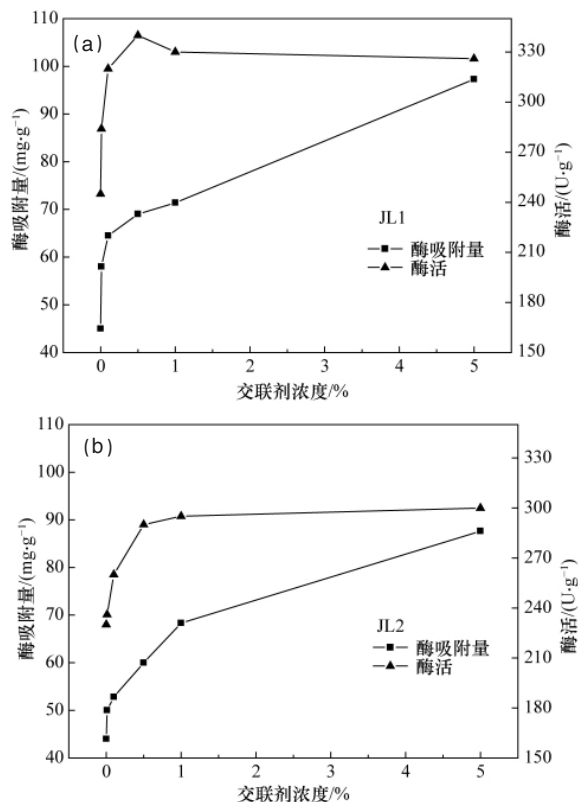


图4 交联剂浓度对脂肪酶固定化的影响(JL1(a)和JL2(b))

Fig. 4 Effects of glutaraldehyde concentrations on lipase immobilization (JL1(a) and JL2(b))

2.4 重复使用稳定性

为了考查吸附法和吸附-交联法所得固定酶的重复使用稳定性,连续测定直接吸附法(XF)和吸附-交联法(JL1和JL2)所得的固定化酶酶活,所得的酶活结果如图5所示。随着测定次数的增加,固定酶的酶活逐渐降低,原因是载体与酶之间的结合力减弱,酶从载体表面脱落,也可能是底物与酶活性部位的反复结合导致活性部位的变形,进而酶的催化效率降低^[2]。

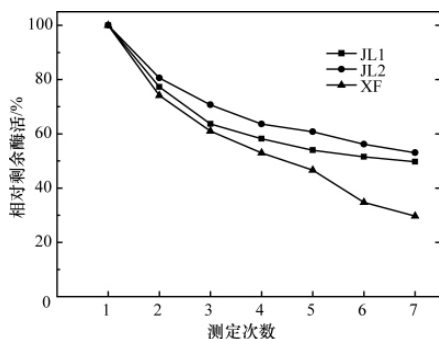


图5 固定化脂肪酶重复使用稳定性对比

Fig. 5 Comparisons between reuse stabilities of immobilized lipase achieved through both adsorption and adsorption followed by cross-linking

吸附-交联法(JL1和JL2)所获得的固定酶酶活下降幅度小于直接吸附法(XF)所得固定酶的下跌幅度,第7次测定时,前者的相对剩余酶活(53.0%和49.7%)明显高于后者的相对剩余酶活(29.6%)。这说明吸附-交联法能将脂肪酶固定的更加牢固,主要是由于戊二醛的加入酶不仅通过—COONH—酰胺共价键、—COONH₃⁺离子键、氢键及范德华力与树脂结合,而且酶借助戊二醛的交联作用相互交联在一块,形成相对稳定的网络结构,将酶固定的更加牢固^[7,8]。同时,戊二醛交联也可能会改变酶的分子结构,导致固定酶稳定性更好。

对比JL1和JL2得出:JL2的重复使用稳定性优于JL1,原因是JL1所得固定酶的外表面戊二醛-酶聚合物的数量比较多而且分子量比较大,在重复使用的过程中更容易脱落。

3 结论

(1) 离子交换树脂DK110能对L4脂肪酶进行有效的固定,酶液浓度为50mg/mL时获得的最大酶活为292U/g,主要是因为除氢键和范德华力之外,DK110还能够与酶分子形成酰胺共价键,其—COO⁻与酶分子的—NH₃⁺形成离子键。

(2) 由于交联剂的作用,吸附-交联法所获得的固定酶酶活更大,重复使用稳定性更好。通过JL1获得的固定酶酶活最大(340U/g),通过JL2获得的固定酶重复使用稳定性最好,第7次测定仍保留了53.0%的相对剩余酶活,两者各有优势。

参考文献 (References)

- [1] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
Luo Guimin. Enzyme engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [2] 谢峰, 聂开立, 鲁吉珂, 等. 废油脂酶法制取生物柴油[J]. 中国油脂, 2007, 32(10): 60-63.
Xie Feng, Nie Kaili, Lu Jike, et al. China Oils and Fats, 2007, 32(10): 60-63.
- [3] Arpana K, Kayastha A M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 69(1/2): 8-14.
- [4] Rahman M B A, Zaidan U H, Basri M, et al. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugosa* immobilized on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 50(1): 33-39.
- [5] 宋宝东, 宋丽, 庞春霞, 等. 树脂吸附法固定 *Candida rugosa* 脂肪酶[J]. 化学工程, 2009, 37(4): 8-10, 44.
Song Baodong, Song Li, Pang Chunxia, et al. Chemical Engineering, 2009, 37(4): 8-10, 44.
- [6] Romdhane I B B, Romdhane Z B, Gargouri A, et al. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68(3/4): 230-239.
- [7] Talbert J N, Goddard J M. Enzymes on material surfaces[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 93: 8-19.
- [8] Gao S L, Wang Y J, Diao X, et al. Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(11): 3830-3837.
- [9] Li B B, Chen Y, Chen X C, Liu D, et al. A novel immobilization method for nuclease P1 on macroporous absorbent resin with glutaraldehyde cross-linking and determination of its properties[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(4): 665-670.

(责任编辑 刘志远)