

新型交联剂三羟甲基磷固定化脂肪酶的研究

梁欣欣, 魏东

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本试验研究了一种新型交联剂三羟甲基磷 (THP) 用于以纯棉浴巾为载体、聚乙烯亚胺 (PEI) 为吸附剂的固定化脂肪酶制备新方法。通过单因子实验获得了固定化条件为: 0.2 g 浴巾使用 0.5 mL PEI (浓度 3.37 mg/mL, pH 7.0)、2 mL THP (浓度为 0.10%, V/V)、固定化温度为 40 °C、交联时间为 20 min。制备的固定化脂肪酶催化正丁酸乙烯酯与戊醇酯交换反应, 1 h 底物转化率达 92.1%, 酶比活力达到 15.80 U/g 固定化酶。与戊二醛 (GA) 交联法制备的固定化酶相比, 本固定化酶具有良好的重复使用稳定性、温度稳定性和高比活力, 本试验采用的方法是一种低成本、实用性强的脂肪酶固定化新方法。

关键词: 脂肪酶; 固定化; 交联剂; 三羟甲基磷; 戊二醛

文章编号: 1673-9078(2012)1-47-51

Lipase Immobilization with a New Crosslinking Reagent Tris(hydroxymethyl)phosphine

LIANG Xin-xin, WEI Dong

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In the present work, tris(hydroxymethyl)phosphine (THP) was used as a new crosslinking reagent in lipase immobilization on cotton towel with adsorbent polyethylenimine (PEI). The optimal conditions of immobilization by single factors test were obtained as follows: 0.5 mL of PEI (3.37 mg/mL, pH 7.0) for each 0.2 g cotton towe, 2ml of THP [0.10% (V/V)], immobilization temperature 40 °C and crosslinking reaction time 20 min. THP-immobilized lipase can catalyze interesterification of vinyl butyric acid and pentanol. The conversion rate in 1h achieved 92.1%, and the activity of immobilized lipase was 15.80 U/g. Compared with the GA-immobilized lipase, THP-immobilized lipase had higher reusability, thermal stability and activity, indicating this is a low cost and practical newly method for lipase immobilization.

Key words: lipase; immobilization; crosslinking agent; THP; glutaraldehyde (GA)

脂肪酶 (Lipase, EC 3.1.1.3, 甘油酯水解酶) 作为生物催化剂, 具有反应条件温和、催化效率高、专一性强、污染低等优点^[1], 广泛应用于催化甘油三酯水解、醇解、酯化、酯交换等反应^[2], 在食品生物技术、生物医药和化学工业等领域具有广泛应用^[3]。脂肪酶的固定化, 是用固体材料将脂肪酶束缚或限制于一定区域内, 仍能进行其特有的催化反应, 并可回收重复使用的一类技术^[4,5]。在众多固定化方法中, 交联法最为常用, 使用最多的交联剂是戊二醛 (GA)^[6], 但戊二醛不仅有毒, 对身体健康不利^[7], 而且与氨基物质形成的 C=N 键易水解, 特别是在温度较高时^[8], 也使固定化过程中酶活损失严重^[9]。

三羟甲基磷 (THP) 是一种新型的交联剂^[10], 它

与氨基物质所形成的 P-CH₂-N 键不易水解, 可长期保存。三羟甲基磷是由四羟甲基氯化磷 (THPC) 与 KOH 制得的, 前者是一种工业制剂, 价格便宜。本文采用纯棉浴巾为载体^[11]、聚乙烯亚胺 (PEI) 为吸附剂^[12,13], 研究三羟甲基磷为交联剂在脂肪酶固定化中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

戊二醛 (Glutaraldehyde, GA, Grade II 25%)、聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 购自美国 Sigma 公司; 酯化用脂肪酶购自北京凯泰新世纪生物技术有限公司; 正丁酸乙烯酯 (Vinyl n-butyrate)、四羟甲基氯化磷 (Tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium Chloride, HTPC) 购自百灵威科技有限公司; 纯棉浴巾为市售; 无水乙酸钠、冰乙酸、盐酸、戊醇、正己烷、氢氧化钾均为分析纯试剂; 色谱纯乙腈为 Dikma 公司产品; Bradford 染色试剂购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

收稿日期: 2011-08-28

基金项目: 国家海洋局海洋可再生能源专项资金项目 (GHME2011SW04)

作者简介: 梁欣欣 (1984-), 硕士研究生, 研究方向为生物技术、生物化工

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 从事工业生物技术、生物能源

的研究和开发

1.2.1 三羟甲基磷 (THP) 的制备^[6,7]

THP 水溶液是由四羟甲基氯化磷与氢氧化钾按摩尔比 1:0.995 混合反应制得, 具体方法为: 取四羟甲基氯化磷溶于去离子水中, 相应质量的氢氧化钾溶于去离子水中, 室温磁力搅拌下将氢氧化钾水溶液缓缓加入到四羟甲基氯化磷溶液中, 反应结束, 制得三羟甲基磷水溶液, 需现用现配。

1.2.2 THP 为交联剂固定脂肪酶

0.2 g 纯棉浴巾吸附一定量 PEI 后, 加入用纯水配好的脂肪酶溶液, 恒温摇床上 260 rpm 摇一定时间, 直到白色浑浊消失。倒出上清液, 将吸附了 PEI 和酶的浴巾放入一定浓度的三羟甲基磷水溶液中交联一段时间, 再用缓冲液冲洗浴巾, 直到没有蛋白冲洗下来, 室温下干燥得固定化脂肪酶。

1.2.3 GA 为交联剂固定酯化用脂肪酶

0.2 g 纯棉浴巾吸附 0.5 mL 3.37 mg/mL (pH 7.0) PEI 后, 加入 5 mL 用纯水配好的脂肪酶溶液 0.25 mg/mL, 恒温摇床上 260 r/min 摇一定时间, 直到白色浑浊消失。倒出上清液, 将吸附了 PEI 和酶的浴巾放入 2 mL 0.26% (pH 8.0) GA 溶液中, 40 °C 下交联 50 min。交联完成后用醋酸缓冲液 (0.1 M, pH 5.0) 清洗三次, 室温下干燥得固定化酯化用脂肪酶。

1.2.4 固定化脂肪酶酯交换比活力的测定^[14]

采用分光光度法, 以固定化脂肪酶催化正丁酸乙酯与戊醇的酯交换比活力为评价指标。用正己烷作为溶剂配置正丁酸乙酯 (20 mmol/L) 和戊醇 (20 mmol/L) 为反应溶液。0.2 g 固定化酶放入 50 mL 具塞锥形瓶中, 并加入 10 mL 反应溶液, 用封口膜密封锥形瓶以防止有机溶液挥发。将锥形瓶放入恒温摇床, 45 °C、200 rpm 下反应 45 min 后, 用镊子将固定化酶取出结束反应。将反应溶液吸出, 用乙腈稀释 333 倍, 在紫外可见分光光度计 200 nm 波长下测定其吸光值 (1cm 石英比色杯, 乙腈为空白)。实验设三个平行样, 取平均值。

1 单位固定化酶比活力等于 1 克固定化酶 1 分钟转化 1 μ mol 的正丁酸乙酯。

$$S_N = [(C_N \times V \times 10^3 - \frac{A_N}{0.0086} \times 333 \times V) \div t] \div m$$

注: S_N -固定化酶的比活力 (U/g 固定化酶); C_N -底物溶液的初始浓度 (mmol/L); V -底物溶液的初始体积 (L); A_N -200nm 时的吸光值; t -反应时间 (min); m -固定化酶的质量 (g)。

1.2.5 脂肪酶溶液蛋白含量的测定

用 BioRad 公司的 Bradford 染色试剂 (catalog number 500-0006) 配制工作液。用 4 份去离子水稀释

1 份 Bradford 染色试剂, Whatman 1 号滤纸过滤。先绘制 BSA 标准曲线, 再检测溶液中蛋白含量。具体步骤: 将配制的脂肪酶溶液至少稀释 10 倍, 用 10 μ L 移液枪分别吸取 10 μ L 样品液于 96 孔板中, 然后用 12 通道移液器吸取过滤的染色试剂 190 μ L 加入到样品孔中, 用手轻微振荡均匀后, 在室温下放置 20 min, 然后用酶标仪 (SUNRISE-BASIC TECAN) 在 595 nm 波长下测定其吸光值。根据标准曲线计算酶溶液蛋白含量 (公式如下)。每个样品设置 4 个重复, 取平均值, 计算标准偏差。

$$M = (A_p - 0.3007) / 1.379$$

注: M -蛋白含量 (mg/mL); A_p -595nm 时的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 固定化条件对固定化脂肪酶酯交换比活力的影响

2.1.1 PEI 用量的影响

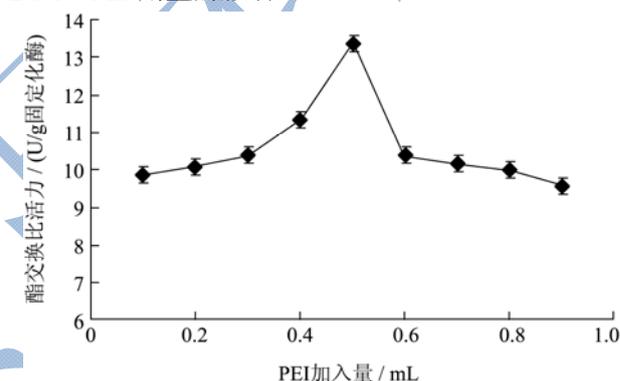


图1 PEI 用量对固定化脂肪酶酯交换比活力的影响

Fig.1 Effect of PEI dosage on the interesterification activity of immobilized lipase

高度分支带正电的 PEI 分子与带负电的物质形成静电复合物, 如蛋白质和核酸^[15-17]。一定浓度的脂肪酶溶液加入到吸附了 PEI 的浴巾上, PEI 与酶即会形成 PEI-酶聚集物。分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 的 PEI (3.37 mg/mL) 滴加在 0.2 g 浴巾上, 完全吸收后, 再分别加入 5 mL 0.25 mg/mL 脂肪酶溶液, 260 r/min 下震荡 20 min, 待溶液变澄清后倒出上清液, 取出浴巾放入 2 mL 0.1% 的 THP 溶液中, 室温下交联 30 min, 再用 0.1 M pH 5.0 的醋酸缓冲液清洗三次, 室温下干燥得固定化脂肪酶。由图 1 可知, 随着 PEI 用量的增加, 酯交换比活力呈先上升后下降的趋势。当 PEI 用量为 0.5 mL 时, 固定化酶比活力最高, 为 13.38 U/g 固定化酶。所以确定 PEI 用量为 0.5 mL。

2.1.2 交联剂 THP 浓度的影响

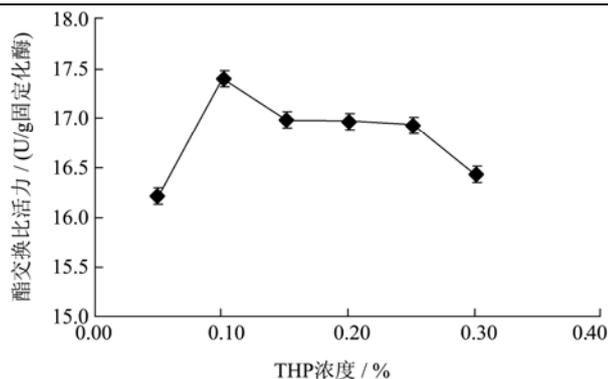


图2 THP 浓度对固定化脂肪酶酯交换比活力的影响

Fig.2 Effect of THP concentration on interesterification activity of immobilized lipase

吸取 0.5 mL 3.37 mg/mL PEI 溶液滴加在 0.2 g 浴巾上, 完全吸收后, 加入 5 mL 0.25 mg/mL 脂肪酶液进行吸附, 260 r/min 震荡 20 min, 待溶液变澄清后倒出上清液, 取出浴巾分别放入浓度 0.05%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50% 的 THP 溶液 2 mL 中, 室温下交联 30 min。交联完成后用 0.1 M pH 5.0 的醋酸缓冲液清洗三次, 室温下干燥得固定化脂肪酶, 测定酯交换比活力。由图 2 知, 随着 THP 浓度的增加, 固定化脂肪酶的酯交换比活力呈先上升后下降的趋势, 当 THP 浓度为 0.10% 时固定化酶比活力最高为 17.41 U/g 固定化酶。所以选用浓度为 0.10% 的 THP。

2.1.3 交联温度的影响

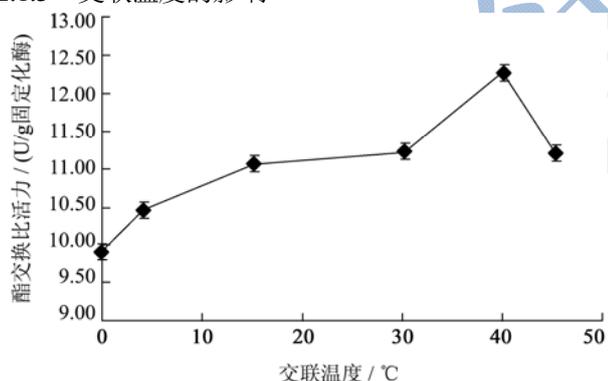


图3 交联温度对固定化脂肪酶酯交换比活力的影响

Fig.3 Effect of crosslinking temperature on interesterification activity of immobilized lipase

吸取 3.37 mg/mL 的 PEI 0.5 mL 滴加在 0.2 g 浴巾上, 完全吸收后, 分别加入 0.25 mg/mL 脂肪酶溶液 5 mL, 260 r/min 下震荡 20 min, 待溶液变澄清后倒出上清液, 取出浴巾放入 2 mL 0.1% THP 溶液中, 在不同温度下交联 30 min。交联完成后用 0.1 M pH 5.0 的醋酸缓冲液清洗三次, 室温下干燥得固定化脂肪酶。由图 3 可以看出, 随着交联温度的提高, 酯交换比活力呈先上升后下降的趋势, 交联温度为 40 °C 时固定化酶比活力最高, 为 12.25 U/g 固定化酶。所以确定

40 °C 为脂肪酶固定化交联温度。

2.1.4 交联时间的影响

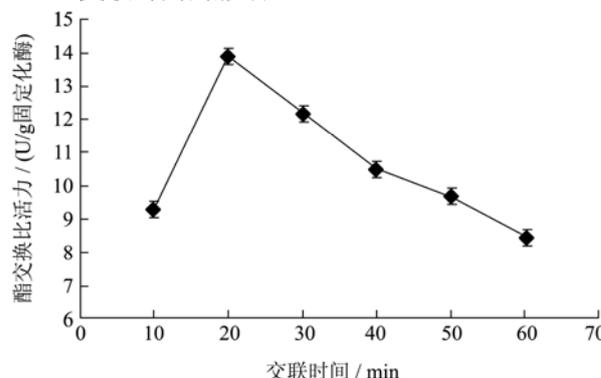


图4 交联时间对固定化脂肪酶酯交换比活力的影响

Fig.4 Effect of crosslinking time on interesterification activity of immobilized lipase

吸取 3.37 mg/mL 的 PEI 0.5 mL 滴加在 0.2 g 毛巾上, 完全吸收后, 分别加入 0.25 mg/mL 脂肪酶溶液 5 mL, 260 r/min 下震荡 20 min, 待溶液变澄清后倒出上清液, 取出浴巾放入 2 mL 0.10% 的 THP 溶液中, 40 °C 下交联不同时间。交联完成后用 0.1 M pH 5.0 的醋酸缓冲液清洗三次, 室温下干燥得固定化脂肪酶。由图 4 可以看出, 随着交联时间的延长, 酯交换比活力呈先上升后下降的趋势, 当交联时间为 20 min 时比活力最高, 为 14.05 U/g 固定化酶。所以交联时间选 20 min。

2.2 固定化脂肪酶的重复使用性比较

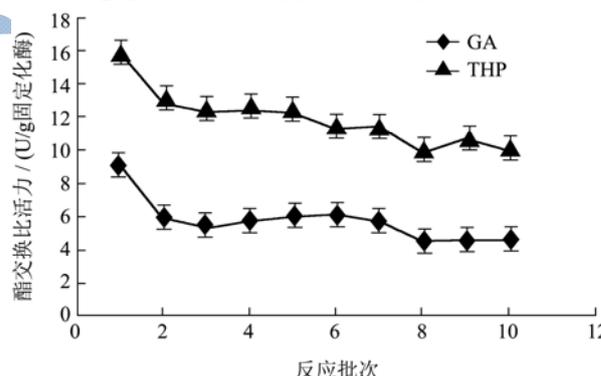


图5 两种交联剂制备的固定化脂肪酶的重复使用性

Fig.5 The reusability of two immobilized lipase prepared using two crosslinking reagents

以 THP (单因素优化条件) 或 GA 为交联剂分别制得固定化脂肪酶 0.2 g, 分别加入到 10 mL 含 20 mmol/L 正丁酸乙酯和 20 mmol/L 戊醇的正己烷中, 40 °C、200 r/min 反应 1 h, 测得酯交换比活力分别为 15.80 U/g 固定化酶和 9.10 U/g 固定化酶。取出固定化酶, 用少量正己烷洗涤, 沥干, 放入新的反应溶液中, 反应 1 h, 如此反复 10 次。每次所得的反应液用乙腈稀释 333 倍, 用紫外可见分光光度计在 200 nm 下测

其吸光度,计算出剩余的比活力。如图5所示,连续反应10次后,以THP为交联剂的固定化酶剩余比活力为63.41%,以GA为交联剂的固定化酶剩余比活力为50.80%,两者差异极显著($p < 0.05$)。由此可见,以THP为交联剂制得的固定化酶比以GA为交联剂制得的固定化酶具有较好的重复使用稳定性和较高比活力。

2.3 固定化脂肪酶温度稳定性比较

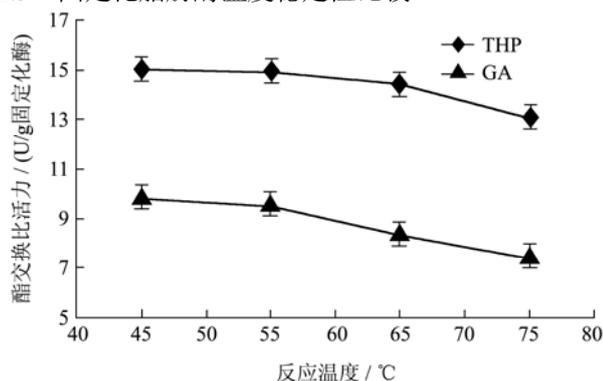


图6 两种交联剂制备的固定化脂肪酶的温度稳定性

Fig.6 The thermal stability of two immobilized lipase prepared using two crosslinking reagents

以THP(单因素优化条件)或GA为交联剂制得的固定化脂肪酶0.2g,加入到10mL含20mmol/L正丁酸乙烯酯和20mmol/L戊醇的正己烷中,分别放在45、55、65、75℃,200r/min恒温空气摇床中反应1h,用镊子将固定化酶取出结束反应,反应液用乙腈稀释333倍,用紫外分光光度计在200nm下测其吸光度,计算出剩余的比活力,结果见图6。与最佳反应温度45℃下固定化脂肪酶剩余比活力相比(分别为15.10U/g固定化酶和9.80U/g固定化酶。),65℃下反应1h后,以THP为交联剂制备的固定化脂肪酶剩余比活力为96.83%,以GA为交联剂制备的固定化脂肪酶剩余比活力为84.79%;75℃下反应1h,剩余比活力分别为87.12%和75.52%。由此可见,以THP为交联剂制得的固定化脂肪酶比以GA为交联剂所制得的固定化酶具有更高的温度稳定性。

THP早已应用于 α -葡萄糖苷酶、 β -呋喃果糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、酒精脱氢酶和耐热重组半乳糖苷酶的固定化,且都获得了较高的活性和稳定性。卢大胜等以THP为交联剂将 α -葡萄糖苷酶固定在壳聚糖上,酶活性OD值达到0.229,酶活力回收率达41.2%,是采用戊二醛为交联剂活性的9倍;另外其酸碱稳定性、耐有机溶剂性、热稳定性及贮存稳定性,与游离的酶和与戊二醛为交联剂固定的该酶相比都有很大提高^[10]。

Tzu-Chien Cheng等以戊二醛或三羟甲基磷为交

联剂将 β -呋喃果糖苷酶固定在壳聚糖,与游离酶和戊二醛固定的该酶相比,交联剂THP固定所得的固定化酶温度稳定性高,在37℃下连续反应12d剩余酶活为78%;以THP为交联剂所制得的固定化酶比以戊二醛为交联剂所制得的固定化酶具有较高的重复使用稳定性,在37℃下连续反应11d,剩余75%酶活^[8]。他们又以THP为交联剂将 β -半乳糖苷酶固定在壳聚糖上,将乳糖转化成低聚半乳糖,以THP为交联剂固定的 β -半乳糖苷酶与游离酶在55℃下于0.1mol/L pH为5.0的醋酸缓冲液中放置13d后,残留酶活分别为75%和25%^[9]。Fiona等人用THP作为交联剂制备固定化酒精脱氢酶,证明了其作为固定化酶交联剂较戊二醛的优越性^[6];Paul等人将THP应用在耐热重组半乳糖苷酶的固定化,酶活力回收率达90%以上,其酶活保留率和热稳定性均优于戊二醛的^[7]。本研究结果表明,在以纯棉浴巾为载体、聚乙烯亚胺(PEI)为酶吸附剂的脂肪酶固定化应用中,交联剂THP比交联剂GA所制备的固定化酶有较高的重复使用性、较高的温度稳定性和比活力。

3 结论

本研究以纯棉浴巾为载体,采用PEI吸附脂肪酶、新型交联剂三羟甲基磷(THP)交联制备固定化脂肪酶。通过单因素实验优化了PEI用量、THP溶液浓度、交联温度、交联时间等,证实了THP交联法制备的固定化脂肪酶与GA交联法相比,有更高的酯交换比活力、重复使用性和温度稳定性。因此,新型交联剂三羟甲基磷交联法是一种低成本、实用性的固定化脂肪酶制备新方法。

参考文献

- [1] Katchalski-katzir E. Immobilization enzyme-learning from past successes and failures [J]. Trends Biotechnol., 1993, 11: 471-478
- [2] Tianwei Tan, Jike Lu, et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review [J]. Biotechnology Advances, 2010, 28: 628-634
- [3] Sangpill Hwang, Kang-Taek Lee, Jin-Won Park, et al. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 17: 85-90
- [4] Lene Fjerbaek, Knud V Christensen, Birgir Norddahl. A Review of the current state of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(5): 1298-1315

- [5] 李丽丽,吴晖,吴苏喜,等.米糠固定化脂肪酶的制备及生化性质的研究[J].现代食品科技,2009,25(7):760-764
- [6] Fiona C Cochrane, Helen H Petach, William Henderson. Application of tris(hydroxymethyl) phosphine as a coupling agent for alcohol dehydrogenase immobilization [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 18: 373-378
- [7] Paul R Oswald, Rachel A Evans, William Henderson, et al. Properties of a thermostable glucosidase immobilized using tris (hydroxymethyl) phosphine as a highly effective coupling agent [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23: 14-19
- [8] Tzu-Chien Cheng, Kow-Jen Duan, et al, Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicas* on chitosan using tris(hydroxymethyl)phosphine or glutaraldehyde as a coupling agent [J]. Biotechnology Letters, 2005. 27: 335-338
- [9] Tzu-Chien Cheng, Kow-Jen Duan, et al. Technical Note Application of tris(hydroxymethyl)phosphine as a coupling agent for β -galactosidase immobilized on chitosan to produce galactooligosaccharides [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81: 233-236
- [10] Nedim Albayrak, Shang-Tian Yang. Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose [J]. Biotechnol. Prog., 2002, 18: 240-251
- [11] Amara M. Kerdjoudj H. Transfer of proton and chloride, nitrate, and sulfate anions through a commercial anion exchange membrane modified by polyethylenimine adsorption [J]. Talanta., 2003, 60: 991-1001
- [12] Andersson M M Hatti-Kaul. Stabilizing effect of chemical additives against Oxidation of lactate dehydrogenase [J]. Journal of Biotechnology, 1999, 72: 21-31
- [13] L Goujard, et al. A spectrophotometric interesterification - based assay for lipases in organic solvent [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 385: 161-167
- [14] Jendrisak J. The use of polyethyleneimine in protein purification [J]. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New Ser. 1987, 68 (Protein Purif.): 75-97
- [15] Dissing U, Mattiasson, B. Polyelectrolyte complexes as vehicles for affinity precipitation of proteins [J]. Biotechnol., 1996, 52: 1-10
- [16] Onda M, Ariga K, Kunitake T. Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyions [J]. Biosci. Bioeng., 1999, 87: 69-75