

氨基化大孔硅胶共价固定 *Pancreas porcine* 脂肪酶的研究

温小荣, 夏小乐, 杨海麟, 辛瑜

(江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 本研究以大孔硅胶为材料, 对其进行环氧基和氨基两步活化, 然后利用碳化二亚胺(EDC)将氨基化硅胶与 *Pancreas porcine* 脂肪酶(PPL)进行共价固定化。通过优化固定化条件, 在 EDC 与蛋白摩尔比为 50:1; 载体与粗酶质量比为 10:1, 固定化 pH 为 6.0, 固定化时间为 8 h 的条件下获得最大固定化酶酶活为 86.67 U/g, 远远高于未修饰硅胶物理吸附固定 PPL 所得固定化酶酶活(33.33 U/g)。此外, 本文还利用扫描电镜(SEM)和傅立叶变换光谱仪(FT-IR)对固定化前后硅胶进行了结构表征, 固定化后硅胶表面出现明显的丝状蛋白, 且固定化酶在 1543 cm^{-1} 处出现酰胺 II 带, 说明 PPL 成功共价固定于氨基化硅胶上。通过对所得固定化酶性质进行分析, 结果表明, 固定化酶最适反应 pH 向碱偏移一个单位, 最适反应温度提高了 5 $^{\circ}\text{C}$, 热稳定性明显提高。

关键词: 硅胶; *Pancreas porcine* 脂肪酶; 碳化二亚胺; 酶活

文章编号: 1673-9078(2013)10-2487-2491

Covalent Immobilization of *Pancreas Porcine* Lipase on Aminated Mesoporous Silica

WEN Xiao-rong, XIA Xiao-le, YANG Hai-lin, XIN Yu

(College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study mesoporous silica gel was activated by epoxy-group and amino-group for covalent immobilization of *pancreas porcine* lipase (PPL) using water-soluble carbodiimide. At the optimum conditions (molar ratio of EDC to protein 50:1, weight ratio of support to crude enzyme 10:1, pH 6.0 and immobilization time 8h), the maximum enzyme activity (86.67 U/g) was obtained, which was much higher than that of PPL immobilized onto silica gel without modification (33.33 U/g). The immobilization PPLs were also characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Many filiform substances were observed on the surface of enzyme-immobilized support. Moreover, the absorption peak at 1543 cm^{-1} (amide II) could be seen in the spectra of immobilized PPL, which confirmed that the PPL had been successfully immobilized onto the supports. In addition, the properties of immobilized PPL were studied. The optimum pH of the immobilized PPL was shifted to a more alkaline range, and the optimum temperature was determined to be 5 $^{\circ}\text{C}$ higher than that of free enzyme. Meanwhile, the thermal stability of modified PPL was significantly improved.

Keywords: silica gel; *Pancreas porcine* lipase; carbodiimide; enzyme activity

脂肪酶[EC 3.1.3.1]是目前应用最为广泛的酶种之一, 它可以催化甘三酯水解成甘二酯、单甘酯和脂肪酸^[1]。脂肪酶能在油水界面催化酯水解、醇解、酯合成、内酯合成、酯交换、多肽合成、立体异构体拆分等有机反应, 是目前催化剂研究热点之一。猪胰腺脂肪酶(*Pancreas porcine* lipase, PPL)是目前最便宜的商业化脂肪酶之一。尽管与其它微生物来源脂肪酶相

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2012402), 中国博士后面上资助项目(2013M531273)

通讯作者: 杨海麟(1971-), 男, 博士, 副教授, 主要从事发酵工程和分离纯化研究

比, *Pancreas porcine* 脂肪酶应用不是十分广泛, 但由于其在非水相酯化和转酯化反应中表现出较高的活性和稳定性, 加上其价格低的优越性^[2]。因此, 具有很大的工业化应用潜力。

当前, 限制脂肪酶应用最主要的因素有两个: 一是作为催化剂成本高, 二是在应用过程中易失活。酶的固定化指将酶束缚或限制于一定区域内, 但仍保留其催化特性并可回收和重复使用, 可有效解决以上问题。在过去的几十年中, 越来越多的载体用于酶的固定化, 在这些载体当中, 硅胶由于机械强度高、比表面积大以及价格便宜等特点备受研究者的青睐^[3]。用于固定化方法主要吸附法、共价结合法、包埋法以及

交联法。共价结合法的优势在于酶与载体之间的结合更为牢固,酶分子不易从载体上脱落下来,所制备的固定化酶具有良好的稳定性和重复使用性^[4]。

结合硅胶和共价结合的优势,本研究先对大孔硅胶进行活化,使其带上氨基基团,然后利用碳化二亚胺(EDC)将 *Pancreas porcine* 脂肪酶共价固定于带氨基的硅胶上,图1为固定化原理图。本文对固定化条件进行了优化,并采用扫描电镜(SEM)和傅立叶红外光谱技术(FT-IR)对固定化酶的结构进行了表征。最后,对所得固定化酶性质进行了初步研究。

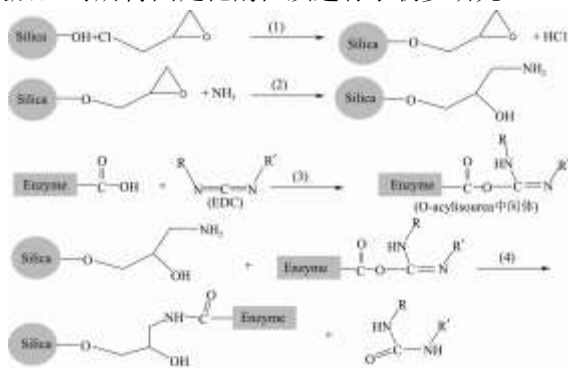


图1 PPL 固定化原理图

Fig.1 The schematic diagram of PPL immobilization

注: 1: 环氧基活化; 2: 氨基活化; 3: 中间体形成; 4: 酰胺键形成。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪胰腺脂肪酶: Sigma 公司; 碳化二亚胺(carbodiimide 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC): 购自 TCI; 大孔硅胶(40目): 青岛硕远化工有限公司; 琼脂糖: Pharmacia Biotech; Amberlite® IRC 76C (阳离子交换树脂): 陶氏化学公司; D840 (阴离子交换树脂): 浙江争光实业股份有限公司; 环氧氯丙烷、氨水、橄榄油: 国药化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

FJ20 高速分散均质机, 上海索印设备有限公司; FA1004-电子天平, 上海上天精密仪器有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 金坛市城车科辉仪器厂; 可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 扫描电子显微镜(Quanta 200 FEG), 美国 FEI 公司; 傅里叶变换光谱仪(Nicolet iS10); 美国 Nicolet 仪器公司。

1.3 实验方法

1.3.1 硅胶活化

50 g 大孔硅胶用大量去离子水清洗后置于 250 mL 活化液中(0.8 mol/L NaOH, 100 mL 二甲亚砜和 80 mL 环氧氯丙烷)。混合物在 40 °C, 170 r/min 摇床上反应 2.5 h。反应结束后, 用大量去离子水冲洗硅胶至砂芯漏斗底部流出液体 pH 为中性为止。经环氧基活化后的硅胶置于 150 mL 去离子水中, 然后再加入 150 mL 35% 氨水。混合物在 30 °C, 160 r/min 摇床上反应过夜。反应结束后, 用大量去离子水冲洗硅胶至砂芯漏斗底部流出液体 pH 为中性为止。

1.3.2 固定化反应

在 5 mL 离心管中加入活化后的硅胶、PPL、EDC 溶液以及 0.1 M 磷酸缓冲液。对于固定化条件优化, 分别控制不同的 EDC 浓度、载体与粗酶的质量比、反应 pH 以及固定化时间。对于未活化硅胶和琼脂糖物理吸附 PPL, 固定化条件除不加 EDC 外, 与以上一致; 对于 IRC 76C 和 D840, 吸附 pH 分别为 4.5 和 6.0。混合物在 4 °C 的层析柜中反应一定时间。反应结束后, 离心去上清, 用 0.6 mol/L NaCl 洗去非共价吸附后测定固定化酶酶活。酶活回收率的计算公式为:

$$R\% = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

注: R 为活性回收率(%), A 是固定化酶的酶活(U), A₀ 是固定化前加入体系中的总酶活(U)。

1.3.3 水解酶活测定

脂肪酶酶活测定方法是橄榄油乳化法, 具体参照文献^[5]。每一次实验至少重复三次, 最终结果求平均值, 并计算方差。

1.3.4 蛋白吸附量测定

蛋白测定采用考马斯亮蓝测定法^[6], 使用牛血清蛋白作为标品, 建立标准曲线。

1.3.5 扫描电镜(SEM)观测表面结构

采用扫描电镜对硅胶固定化前后表面进行观测, 样品先经过冷冻干燥脱水, 固定, 喷金处理后, 观测成像。

1.3.6 傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)

采用 KBr 压片法, 2 mg 冷冻干燥除水后样品, 加入 98 mg 干的 KBr 粉末, 碾磨充分后, 压片, 采集信号。信号为波数 4000 到 400 cm⁻¹ 的透光率。

1.4 数据分析

以上实验至少重复三次。对多次实验结果求平均值和标准偏差, 并用 origin 7.5 作图。

2 结果与分析

2.1 固定化条件优化

2.1.1 EDC 与蛋白摩尔比对酶活的影响

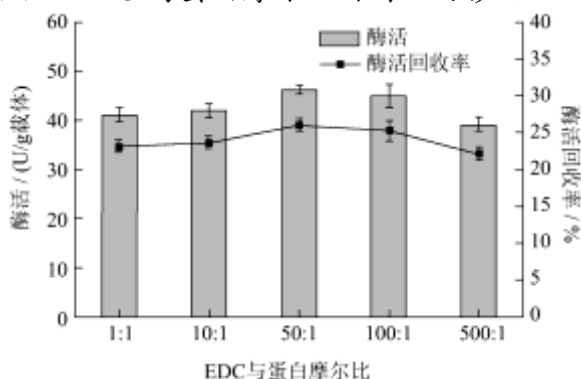


图2 EDC与蛋白摩尔比对酶活的影响

Fig.2 Effect of molar ratio of EDC to protein on immobilized enzyme activity

注:其它固定化条件:pH=7.0,载体与粗酶质量比为10:1,固定化时间8h。

由图2可知,当EDC与蛋白摩尔比为50:1时,固定化酶酶活达到最大为55.5 U/g载体。此时,继续增加EDC的量固定化酶酶活将降低。EDC作用原理为:EDC先对酶上的羧基(-COOH)进行亲核攻击,形成O-acylisourea中间体,该基团容易与氨基反应,从而将羧基和氨基偶联^[7]。当EDC浓度低时,随着EDC量增加时对酶羧基的亲核攻击速率增加,但EDC浓度过高时,将加剧酶与酶分子之间的交联,从而降低固定化酶的酶活。因此,后续研究采用EDC与蛋白的摩尔比为50:1。

2.1.2 最适载体与粗酶质量比

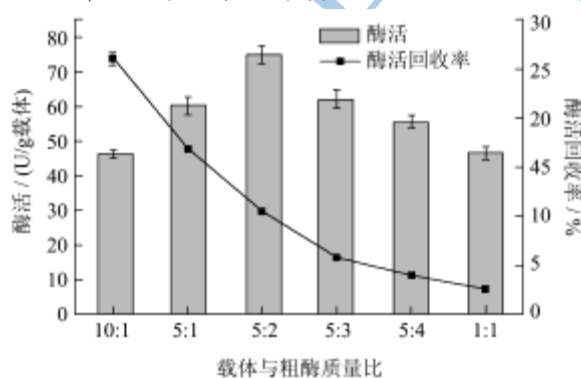


图3 最适载体与粗酶质量比

Fig.3 The optimum weight ratio of support to crude enzyme

注:其它固定化条件:EDC与蛋白摩尔比=50:1;pH=7.0;固定化时间8h。

酶加入量与固定化酶酶活和酶活回收率之间变化规律如图3所示。由图可知,随着酶加入量的增加,酶回收率逐渐降低,当酶与载体的质量比为1:1时,酶活回收率只有2.6%。而固定化酶的酶活呈钟罩型,

即酶活先增加后减小,在载体和酶质量比为5:2时达到最大,酶活为75.1 U/g载体,继续增加酶的加入量,酶活将减小。这是由于加酶量太多将会使固定化酶形成分子间位阻,这不仅堵塞了酶的活性位点,还将限制底物和产物的及时扩散。综合考虑酶活和酶活回收率,后续实验采用载体与粗酶质量比为10:1。

2.1.3 最适固定化 pH

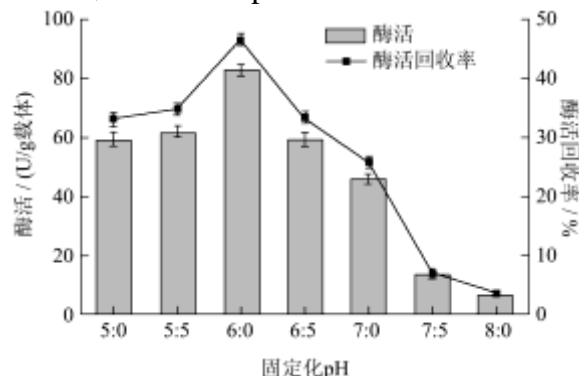


图4 固定化pH与酶活之间的关系

Fig.4 The relationship between pH and enzyme activity

注:其它固定化条件:EDC与蛋白摩尔比=50:1;载体与粗酶质量比=10:1;固定化时间8h。

pH是影响固定化反应的一个重要因素。由图4可知,pH为6.0时酶活和酶活回收率达到最大,分别为82.3 U/g和62.5%。事实上,pH影响固定化反应是多方面的。首先,EDC只能在相对酸性的环境中发挥作用,因为中间体的形成需要H⁺^[8]。其次,pH大小影响载体和酶分子的带电情况,而带电情况直接关系到载体和酶之间是吸引力还是排斥力。猪胰腺脂肪酶的等电点(pI)大约为5.5。所以,当pH大于5.5时PPL带负电,而氨基修饰后的硅胶在pH 5.0~8.0范围内带正电。因此在pH为6.0时酶与载体之间表现出吸引力,吸附量增加,酶活达到最大。

2.1.4 吸附时间对固定化的影响

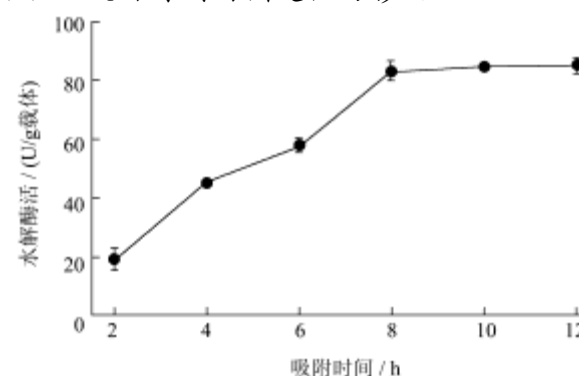


图5 不同吸附时间下酶活变化

Fig.5 Change of immobilized enzyme activity with different adsorption time

注:其它固定化条件,EDC与蛋白摩尔比=50:1;载体与粗

酶质量比=10:1; 固定化pH=6.0。

由图5可知, 随着固定化时间的增加, 固定化酶活性也随之增加, 并到8 h时酶活趋于稳定, 为86.67 U/g载体。时间继续增加, 一方面酶的吸附量会缓慢增大, 但另一方面, 随着时间的延长酶也会发生缓慢的失活。因此, 控制最佳固定化时间为8 h。

2.1.5 氨基化硅胶与其它载体固定化效果比较

表1 氨基化硅胶与其它载体固定化效果比较

Table 1 Comparison of immobilization effect between amination silica and other supports

载体	固定化方法	酶活/(U/g载体)	蛋白吸附量/(mg/g载体)	酶活回收率/%
氨基化硅胶	共价结合	86.67±4.90	20.18±1.71	46.10±2.61
硅胶	物理吸附	33.33±3.50	16.44±0.58	17.73±1.86
琼脂糖	物理吸附	27.33±1.23	19.66±1.89	14.54±0.65
D840	离子交换	13.33±2.60	47.17±3.65	7.09±1.38
IRC 76C	离子交换	12.00±1.54	35.06±2.23	6.38±0.82

为了说明氨基化硅胶共价吸附PPL的优越性, 本研究将氨基化硅胶与其它载体和固定化方法作了对比, 结果如表1所示。由表可以看出, 以氨基化硅胶为载体所得固定化酶活远远高于未进行表面修饰的硅胶以及其它载体, 酶活是未修饰硅胶的2.60倍, 是IRC 76C的7.22倍。从吸附量上看, 氨基化硅胶、硅胶、琼脂糖的吸附量相差不大。氨基化硅胶酶活高的原因可能是接了连接臂之后底物和产物更容易扩散, 所以, 反应速率加快, 酶活提高。D840和IRC 76C尽管蛋白吸附量很大, 但酶活很低, 可能是由于连接臂过长导致手臂易弯曲和折叠。

2.2 固定化酶结构表征

2.2.1 扫描电子显微镜 (SEM) 下的固定化酶

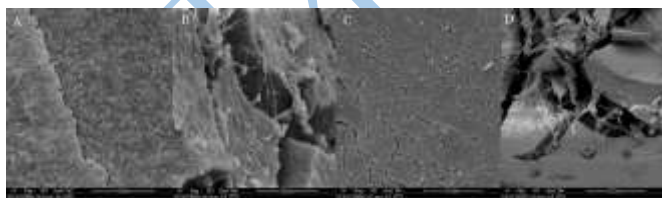


图6 固定化前后的载体SEM图

Fig. 6 SEM micrographs before and after immobilization

注: A、C为固定化前; B、D为固定化后; A、B为10 μm; C、D为20 μm。

为了观测硅胶在固定化前后表面的变化, 本研究对固定化前后载体进行了扫描电镜观察。由图5可以看出固定化前硅胶表面是相对光滑的(图6 A、C), 而固定化后的载体表面明显有丝状的蛋白(图6 B、D), 蛋白相互交联在一起, 像蜘蛛网一样吸附在载体表面,

表明PPL已经成功固定于硅胶上。此外, 硅胶在固定化后发生了破裂, 具有明显的裂痕。可能是因为硅胶是强吸水性的载体, 在长时间(8 h)的固定化过程中吸收大量的水分, 导致发生吸水涨破。

2.2.2 傅立叶变换红外光谱 (FT-IR)

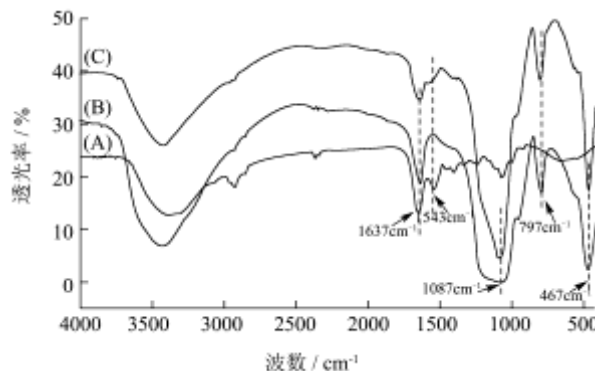


图7 傅立叶变换红外光谱图

Fig.7 FT-IR spectra of samples

注: A: 游离PPL; B: 固定化前硅胶; C: 固定化后硅胶。本研究利用了傅立叶红外光谱来验证固定化后是否有新的化学键的形成。如图7所示, 1087 cm⁻¹处峰属于 Si-O-Si 键的不对称伸缩振动, 而 797 和 467 cm⁻¹处的峰分别属于 Si-O-Si 键的对称和扭曲振动。1637 cm⁻¹(酰胺 I 带)处的峰属于 C=O 键的伸缩振动以及伯胺扭曲振动的重叠峰, 1543 cm⁻¹(酰胺 II 带)处的峰为 C-N 以及 N-H 键的扭曲振动^[9]。与固定化前的硅胶相比, 固定后的硅胶在 1543 cm⁻¹形成了新的峰, 说明在固定化后的硅胶上形成了酰胺键, 也即说明 PPL 已经成功共价吸附到硅胶上。

2.3 固定化酶性质研究

2.3.1 最适反应 pH

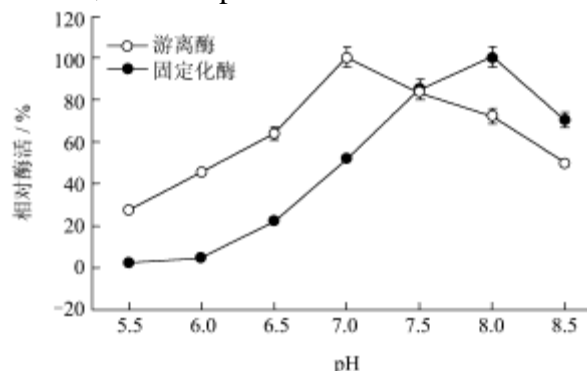


图8 固定化酶和游离酶最适反应pH

Fig.8 Optimum reaction pH of immobilized and free enzymes

酶的最适反应pH是酶催化反应过程中一个重要的参数, 因为它影响酶的稳定性和催化活性。从图8可以看出游离酶的最适pH为7.0, 而固定化酶的pH为8.0, 相对游离酶碱移了一个单位。由于带电载体对主体环境

中离子的吸引作用,导致固定化酶的载体微环境和主体环境 H^+ 和 OH^- 浓度是不一致的^[10]。从这个角度来讲,本研究氨基修饰的硅胶是带正电的,导致在载体微环境的 OH^- 浓度高于主体环境,固定化酶的最适pH应该酸移,与以上推论刚好相反。事实上,最适pH改变应该是酶构象改变、载体带电性以及酶种特性等多种因素综合的结果。类似的研究结果在其它文献中也有报道^[11]。

2.3.2 最适反应温度

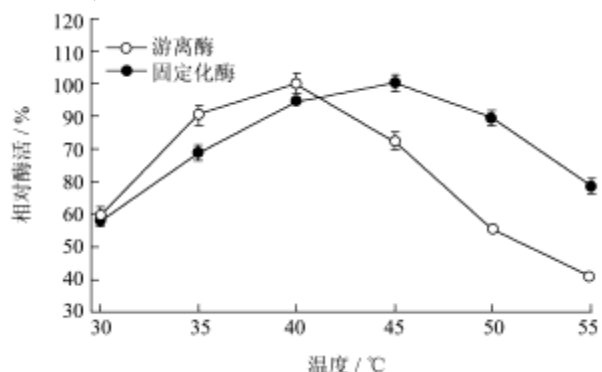


图9 固定化酶和游离酶最适反应温度

Fig.9 Optimum reaction temperature of immobilized and free enzymes

固定化酶和游离酶在不同的反应温度下相对活性变化如图9所示。游离酶和固定化酶的最适温度分别为40和45 °C,说明酶经固定之后耐热性提高。在50 °C下,固定化酶的相对酶活是90%,远远高于游离酶的55%。研究表明,固定化酶最适反应温度的增加是由于酶经共价固定之后,构象变得更加紧凑^[12]。共价吸附减少了固定化酶构象的变动,使固定化酶需要更高的温度来形成合适的构象以识别底物分子,因此,最适反应温度增加。

2.3.3 热稳定性变化

为了探索酶经固定化之后热稳定性是否提高,本研究考察了酶在45 °C下酶的失活速度,结果如图10所示。由图可知固定化酶的剩余酶活随时间变化曲线一直处于游离酶的上方,说明酶经固定化之后热稳定性明显提高。当处理时间为90 min时,固定化酶的剩余酶活为原来的35%,而游离酶仅剩11%。固定化能使热稳定性提高的原因是载体保护了酶的三级结构,降低酶因环境环境变化引起的失活速度。

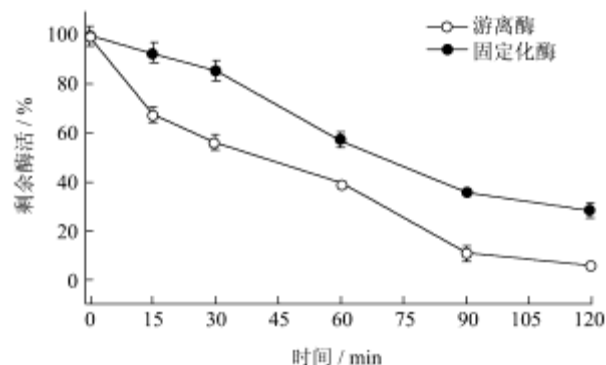


图10 游离酶和固定化酶在45 °C下处理不同时间剩余酶活变化

Fig.10 Residual activities of free and immobilized PPL after treatment with different time at 45 °C

3 结论

本文通过对硅胶进行表面改性获得带氨基的硅胶载体,并利用碳化二亚胺成功将Pancreas porcine 脂肪酶固定于修饰后载体,所得固定化酶用扫描电镜和傅立叶变换光谱仪进行了结构表征。通过优化固定化条件,获得固定化酶最大酶活为86.67 U/g,远远高于未修饰载体和其它载体的酶活。此外,固定化酶在碱性条件下反应速率增大,热稳定性明显提高。这些结果表明,利用氨基化载体共价吸附PPL是一种很好的固定化方法。

参考文献

- [1] Rodrigues R C, Femandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2010, 64(1-2): 1-22
- [2] Mendesa A A, Oliveirab P C, De Castro H F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2012, 78: 119-134
- [3] Park D, Haam S, Jang K, et al. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis [J]. *Process Biochem*, 2005, 40: 53-61
- [4] Kartala F, Janssen M H A, Hollmann F, et al. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2011, 71(3-4): 85-89
- [5] Watanabe N, Yasude O, Yasuji M, et al. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms: cultural conditions and some properties of crude enzymes [J]. *Agric Biol Chem*, 1997, 41: 1353-1358

- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [7] Chen Y, Xin Y, Yang H L, et al. Immobilization and stabilization of cholesterol oxidase on modified sepharose particles [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 56: 6-13
- [8] Papisov M I, Maksimenko A V, Torchilin V P. Optimization of reaction conditions during enzyme immobilization on soluble carboxyl-containing carriers [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1989, 7:11-16
- [9] Serefoglou E, Litina K, Goumis D, et al. Smectite Clays as Solid Supports for Immobilization of β -Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biochemical Properties [J]. *Chem. mater*, 2008, 20(12): 4106-4115
- [10] Carrara C R, Rubiolo A C. Determination of catalytic parameters for free and immobilized b-galactosidase [J]. *Process Biochem*, 1996, 31: 243-248
- [11] Jiang D S, Long S Y, Huang J, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres [J]. *Biochem Eng J*, 2005, 25: 15-23
- [12] Lee D G, Ponvel K M, Kim M. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, 57(1-4): 62-66