

# Lipozyme TL 100L脂肪酶的 固定化及其性质研究

朱珊珊, 邵佩霞, 王永华\*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:**比较了8种大孔树脂对脂肪酶 Lipozyme TL 100L 的固定化效果, 选取树脂 AB-8 为该酶最佳的固定化载体, 并对固定化条件进行了优化, 得到 AB-8 固定化脂肪酶的最佳 pH 为 9.0, 最佳吸附量为 54.5mg/g 树脂, 最佳含水量为 6%~7%。固定化脂肪酶的 pH 稳定性、热稳定性、操作稳定性和贮存稳定性均有一定程度的提高。

**关键词:**脂肪酶, 固定化, 大孔树脂, 优化, 稳定性

## Study on immobilization of Lipase TL 100L and its properties

ZHU Shan-shan, SHAO Pei-xia, WANG Yong-hua\*

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

**Abstract:** Eight kinds of macroporous resin were used on immobilizing lipase Lipozyme TL 100L. Resin AB-8 was the best carrier, and the immobilization conditions were optimized. The best immobilization pH was 9.0, the best adsorption capacity was 54.5mg/g resin, and the best water content was 6% to 7%. The pH stability, thermal stability, operational stability and storage stability of immobilized lipase were all improved.

**Key words:** lipase; immobilization; macroporous resin; optimization; stability

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup>5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0097-04

脂肪酶 (EC3.1.1.3) 广泛存在于动、植物和微生物中, 除了能够催化甘油酯类化合物的水解和合成之外, 还可以用于催化酯交换反应、生物表面活性剂的合成、多肽合成、聚合物的合成和药物的合成等。因而脂肪酶及其改性制剂在食品与营养、日用化学工业、油脂化学品工业、农业化学工业、造纸工业、洗涤和生物表面活性剂的合成, 以及药物合成等许多领域得到广泛应用<sup>[1]</sup>。酶的固定化是用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内, 使之仍能进行其特有的催化反应, 并可回收及重复使用的一类技术。按其性质分主要有四种, 即包埋法、交联法、吸附法及共价法<sup>[2]</sup>。固定化酶与水溶性酶相比, 具有下列优点: 酶的使用效率高, 成本低, 专一性强; 底物与酶易分离, 有利于精制, 提高产品质量, 可增加产物的收得率; 酶可以反复使用; 在大多数情况下, 能提高酶的稳定性, 延长酶的使用期和保存期; 具有一定的机

械强度, 可以用搅拌或装柱的形式作用于底物溶液, 便于酶催化反应的连续化和自动化操作。20 世纪 60 年代兴起的固定化酶技术为这些问题的解决提供了有效的手段, 从而成为酶工程领域中最为活跃的研究方向之一。而由于脂肪酶的广泛应用, 脂肪酶的固定化一直是酶工程领域的研究热点之一<sup>[3-5]</sup>。本研究选用对酶活影响较小、可重复利用、操作简单、易工业化生产的吸附法来固定化脂肪酶。主要研究选用了不同树脂对脂肪酶 Lipozyme TL 100L 进行固定化, 对固定化 pH、吸附量和含水量进行了单因素优化, 得到了最佳的固定化条件; 考察了固定化脂肪酶的热稳定性、pH 稳定性、操作稳定性和贮藏稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

脂肪酶 Lipozyme TL 100L 诺维信公司; H 系列树脂 华东理工大学树脂厂; AB-8、D4020、NKA-9、D380、D152 树脂 南开大学树脂厂; 考马斯亮蓝

收稿日期: 2009-07-13 \* 通讯联系人

作者简介: 朱珊珊 (1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

对络离子的吸附性能 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2009, 37(4): 130-133.

[14] 段丽红, 郭祀远, 杨晋青. 超声波辅助羟丙基壳聚糖的合成 [J]. 现代食品科技, 2008, 24(9): 873-875.

[15] 韦进宝, 吴锋. 环境监测手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 39-41.

[16] 刘利城. 分析化学实验 [M]. 郑州大学出版社, 2007: 70-72.

表1 不同载体的物化特性及固定化脂肪酶的效果

树脂型号	极性	比表面积 (m <sup>2</sup> /g)	孔径 (nm)	蛋白吸附量 (mg/g)	蛋白吸附率 (%)	酶活 (U)
HZ-803	非极性	550~600	~6	11.52	54.00	1652
HZ-802	非极性	450~550	~10	6.10	28.59	1427
HZ-841	弱极性	500~600	~9	13.76	64.51	3210
AB-8	弱极性	480~520	13~14	17.69	82.93	4837
D4020	非极性	540~580	10~10.5	18.33	85.93	4943
NKA-9	极性	250~290	15.5~16.5	17.32	81.20	4803
D152	弱酸性阳离子交换树脂	-	-	0.34	1.59	0
D380	弱碱性阴离子交换树脂	-	-	0.75	0.03	96

G-250 阿拉丁试剂公司;牛血清蛋白 上海伯奥生物科技有限公司;磷酸、月桂酸 天津福晨化学试剂厂,分析纯;乙醇 广州拓艺贸易有限公司,化学纯;正己烷、正丙醇 广州化学试剂厂,分析纯。

7250 紫外分光光度计 上海分析仪器厂;SHA-C 水浴恒温振荡器 江苏金坛荣华仪器制造有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;ZKXF-1 真空干燥箱 济南三泉中石实验仪器有限公司;PHSJ-4A 数字 pH 计 上海雷磁仪器厂;HQ60 漩涡混合器 江苏海门其林易用仪器厂;800B 离心机 上海安亭科学仪器厂;HP-5890 气相色谱仪 美国惠普公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 载体树脂的预处理 称取 100g 树脂置于 500mL 烧杯中,加入 95% 乙醇 300mL 浸泡 24h 后抽滤,并用去离子水洗至没有乙醇。树脂依次用 300mL 的 5% HCl 和 5% NaOH 溶液浸泡 3h 后抽滤,并用去离子水洗至中性。树脂用 0.033mol/L 的 pH7.7 磷酸盐缓冲液浸泡,每 4h 抽滤一次,检测滤液的 pH,并加入新的磷酸盐缓冲液浸泡,直至滤液的 pH 与缓冲液一致。

1.2.2 固定化脂肪酶的制备 将脂肪酶 Lipozyme TL 100L、缓冲液和处理后的树脂按照一定比例混匀,30℃ 水浴摇床 180r/min 振荡吸附 8h,抽滤分离载体和上清液,并用同种缓冲液清洗固定化酶。将洗净后的固定化酶于 35℃ 真空干燥,4℃ 冰箱保存待用。

1.2.3 载体树脂的蛋白吸附量测定 蛋白质含量测定采用 Bradford 法(考马斯亮蓝染色法)<sup>[6]</sup>。吸附量的计算公式如下:

$$\text{蛋白吸附率 } W = \frac{(X_1 - X_2) \times 100\%}{X_1}$$

$$\text{单位树脂的蛋白吸附量 } X = \frac{X_1 - X_2}{W_1}$$

式中:  $X_1$ : 吸附前酶液的蛋白含量(mg);  $X_2$ : 吸附后酶液的蛋白含量(mg);  $W_1$ : 加入树脂的量(g)。

### 1.2.4 固定化脂肪酶酯化活力的测定

1.2.4.1 底物的制备 在具塞三角瓶中分别加入 1-丙醇、月桂酸和水,其中 1-丙醇:月桂酸 = 1:1 (mol/mol),加水量为底物总量的 3%,将其混匀,60℃ 水浴保存。

1.2.4.2 酯化活力的测定 在具塞锥形瓶中加入 0.03g 固定化酶和底物 10.73g,立即置于水浴振荡器中(温度  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ , 180r/min) 反应 20min,取 5 $\mu\text{L}$  上

清液,加入 995 $\mu\text{L}$  正己烷,混匀,进行气相色谱分析。酶活定义为:在上述条件下,每分钟生成 1 $\mu\text{mol}$  月桂酸丙酯所需的酶量为 1 个活力单位,用 U 表示。比酶活(U/mg)定义为:单位酶蛋白所含的酶活。

1.2.4.3 气相色谱检测条件 色谱柱 OV351(15m  $\times$  0.10mm  $\times$  0.10 $\mu\text{m}$ );载气  $\text{N}_2$ ,流量 1.1mL/min,压力 0.5MPa;燃气  $\text{H}_2$ ,流量 38mL/min,压力 0.25MPa;分流比 30:1;进样量 1 $\mu\text{L}$ ;进样口温度 250 $^\circ\text{C}$ ,检测器温度 300 $^\circ\text{C}$ ;程序温度 180 $^\circ\text{C}$  维持 15min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化载体的筛选

选择了 8 种不同性质的大孔树脂作为载体进行脂肪酶的固定化,其中吸附树脂有: HZ-803、HZ-802、HZ-841、AB-8、D4020、NKA-9;离子交换树脂有:弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂 D380,弱酸性丙烯酸系阳离子交换树脂 D152。研究了加酶量 1mL/g 树脂(酶蛋白含量为 21.33mg/mL),固定化 pH9.0,室温振荡吸附,真空 35 $^\circ\text{C}$  下干燥 4h 后各树脂的固定化效果,得各树脂的吸附曲线如图 1 所示。

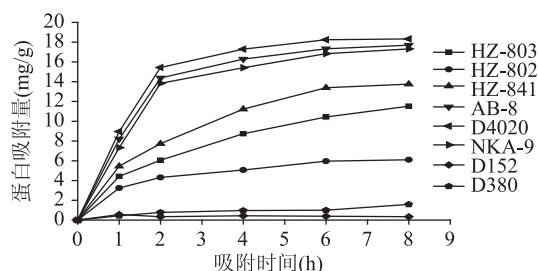


图1 不同树脂的吸附曲线

从图 1 可以看出,吸附 2h 内,树脂的吸附效率较高,随时间延长,吸附曲线逐渐平缓;吸附 8h 后,树脂对酶蛋白的吸附基本处于饱和状态。在上述树脂中,大孔吸附树脂 AB-8、D4020、NKA-9 对 Lipozyme TL 100L 酶的吸附效果较好,大孔离子交换树脂 D380 和 D152 的吸附能力最差。

大孔树脂可以借助氢键,范德华力或者功能基团将酶分子固定化,树脂的物理化学性质是影响固定化能力和催化效率的重要因素<sup>[7-8]</sup>。各种树脂的物化特性和固定化效果如表 1 所示。

从表 1 可以看出,大孔吸附树脂对 100L 脂肪酶的固定化效果明显高于离子交换树脂,离子交换树脂 D380 和 D152 对 100L 脂肪酶的蛋白吸附量均小于 1mg/g。吸附树脂 HZ-803、HZ-802 和 HZ-841 的蛋白吸附率和固定化酶活也较低,固定化效果不够

理想;AB-8、D4020、NKA-9 的固定化效果相差不大,但 D4020 和 NKA-9 易遭有机溶剂正己烷的腐蚀,不利于酶的回收利用。综合考虑,选择 AB-8 为最佳的脂肪酶固定化载体。

## 2.2 树脂 AB-8 固定化脂肪酶 Lipozyme TL 100L 的条件优化

2.2.1 最佳固定化 pH 的确定 研究了固定化 pH 分别为 4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.8,反应体系加水 0.32g,加酶量 50mg/g 树脂,吸附时间 8h,真空 35℃ 下干燥 4h 后,各固定化酶的酶活情况,结果如图 2 所示。

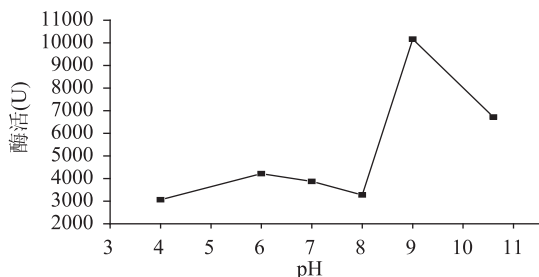


图2 固定化 pH 对酶活的影响

从图 2 中可以看出,最适固定化 pH 为 9.0。随着 pH 的上升,酶活的变化趋势是先缓慢升高,在 pH 为 6.0 处,处于小高峰,随后酶活下降,在 pH 为 9.0 时,酶活力达到最高,是其他 pH 条件下酶活的 2~3 倍;然后随着 pH 的上升,酶活再次下降。这是由于只有在特定的 pH 下,酶分子上的活性基团才能处于最佳的离子状态,使催化活力最高。

酶分子能够记住进入固定化前所在缓冲液的 pH 状态,这种“记忆”pH 改变了酶分子所处的微环境,影响到酶分子相关功能基的解离,进而影响了酶的催化活性<sup>[9]</sup>。这种“记忆”pH 的影响已经被许多研究者证实:曾淑华等人研究得固定化酶最适 pH 较游离酶向碱性方向移动了 0.5 个单位;崔娟的研究也证明了固定化后的脂肪酶较游离酶最适 pH 发生了变化。

2.2.2 最佳吸附量的确定 研究了吸附量为 17.8、28.6、32.4、43.0、54.5、66.2、76.7、87.4mg/g 树脂,反应体系中加水 0.32g,固定化 pH 为 9.0,吸附时间 8h,真空 35℃ 下干燥 4h 后,各固定化酶的催化活力变化情况,结果如图 3 所示。

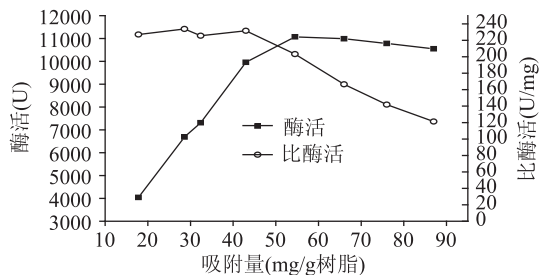


图3 载体吸附量对酶活和比酶活的影响

从图 3 可以看出,酶活的变化趋势是:随着吸附量的升高,酶活逐渐增大;当吸附量为 54.5mg/g 树脂时,酶活达到最高值 11000U/g;然后随着吸附量增大,酶活缓慢下降。吸附量小于 43.0mg/g 时,比酶活变化不大,然后随着吸附量增大,比酶活有所下降。吸附量对酶活的影响主要表现在两个方面:一方面,吸附量较小时,载体使酶更加分散,增大它与底物接

触的比表面积,提高反应效率,同时可以固定酶的构象,使其不易变性失活,对酶反应有促进作用;另一方面,吸附量过高时,空间位阻增大,影响酶活性中心对底物的定位和接近,对酶活性产生一定的抑制作用,从而导致酶活和比酶活下降<sup>[10]</sup>。从图 3 可知,树脂 AB-8 的最佳吸附量为酶活最大时的吸附量 54.5mg/g 树脂。

2.2.3 最佳含水量的确定 将吸附量为 54.5mg/g 树脂,固定化 pH 为 9.0,吸附时间 8h 的固定化酶在真空 35℃ 下干燥不同时间,得到不同水分含量的固定化酶,研究它们的催化活力,结果如图 4 所示。

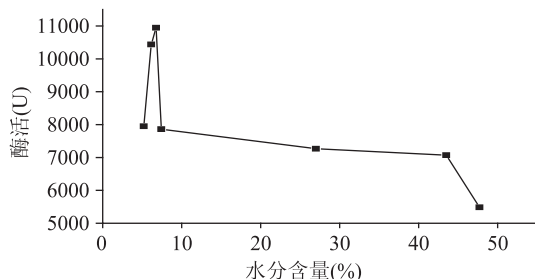


图4 水分含量对酶活的影响

从图 4 可以看出,水分含量在 6%~7% 时酶活最高,水分含量太高或太低,都会使酶的催化能力降低。水对于酶的催化作用是必须的,因为水直接或间接参与了酶天然构象中所有的非共价相互作用(氢键、静电作用、疏水作用力和范德华力)。适量的水可以充当酶分子的“润滑剂”,使酶分子的柔性增大,维持酶的催化活性构象。当水分含量过少时,不足以打开酶分子的带电基团,极性基团之间形成非活性封闭结构,因此酶活较低;相反,水分含量过高时,虽然保证了维持活性结构必需水的存在,但在酯化反应中,多余水的存在改变了反应的平衡点,使反应朝水解方向进行,致使酶活降低。

## 2.3 树脂 AB-8 固定化脂肪酶 Lipozyme TL 100L 的性质研究

2.3.1 固定化酶热稳定性的研究 将相同条件下固定化的脂肪酶分别在 35、50、60、70、80、90℃ 条件下处理 120min,然后测定酶活,定义未经热处理的酶活为 100%,酶活变化情况如图 5 所示。

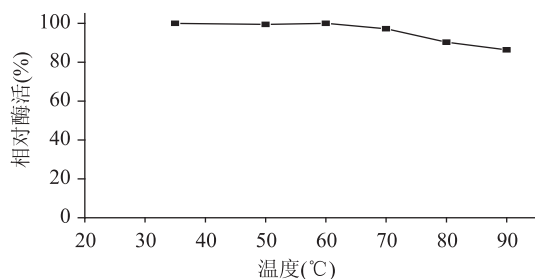


图5 固定化酶的热稳定性

从图 5 可以看出,随着处理温度的升高,酶活呈下降趋势,原因是温度升高,导致酶蛋白变性失活,酶活下降。AB-8 固定化酶在 90℃ 处理 120min 之后,酶活下降至初始酶活的 86.35%。固定化前,游离酶的适宜温度为 20~50℃,60℃ 催化反应酶活下降为初始酶活的 64% 左右。可见固定化后酶的热稳定性得到很大

提高,这对于高温催化油脂反应有很大帮助。

2.3.2 固定化酶 pH 稳定性的研究 将相同条件下固定化的脂肪酶在分别在 pH 为 4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液中处理 120min,然后检测酶活,定义未经处理的酶活为 100%,酶活变化情况如图 6 所示。

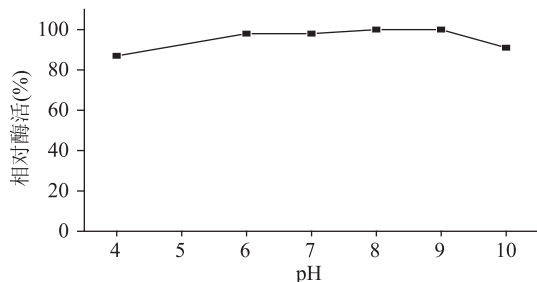


图6 固定化酶的pH稳定性

从图6可以看出,处理用缓冲液 pH 在 6~9 的范围内,酶活几乎不发生变化,缓冲液 pH = 10 时,仍能保持初始酶活的 87.6%。而游离酶在最适条件下反应,在 pH = 10 时,酶活已下降至初始酶活的 20% 以下,这表明固定化后酶的 pH 耐受性有显著提高。

2.3.3 固定化酶操作稳定性的研究 酶的固定化是为了提高酶的重复利用率,降低生产成本,因此,固定化酶的重复利用性能(操作稳定性)是反映固定化效果的重要指标。本文研究了循环 5 次用 AB-8 固定化酶催化月桂酸丙酯合成的酶活变化情况,定义第一批使用的固定化酶酶活为 100%,结果如图 7 所示。

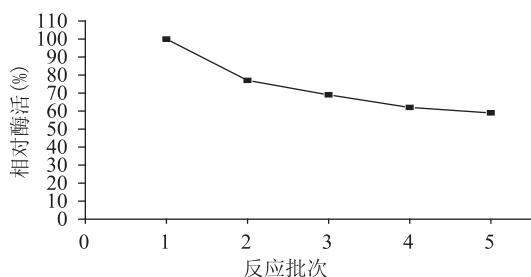


图7 固定化酶的操作稳定性

从图7可以看出,随着使用批次的增加,酶活降低,在使用 5 次后,酶活降为初始酶活的 58.4%。

2.3.4 固定化酶贮存稳定性的研究 酶的贮存稳定性直接影响其应用时间和便利程度,酶的固定化增加了酶的操作稳定性,相应地酶的贮存稳定性也需要有一定程度的改善,这样才能从根本上增加酶的工业可利用性。因此,有必要考察固定化酶的贮存稳定性。

将固定化酶于 4℃ 的环境中放置,每隔 1d 测一次酶活,固定化酶酶活随储存时间的变化如图 8 所示。从图 8 可以看出,随贮存时间的延长,酶活呈下降趋势,保存 10d 后,酶活下降至初始酶活的 71.2%。

### 3 结论

本研究针对脂肪酶 Lipozyme TL 100L,筛选了适当的固定化载体及方法,并考察了固定化过程中各因素对固定化效果的影响,确定了最优的固定化条件,在此基础上考察了固定化脂肪酶的各项基本性能。

实验结果显示,在不同的固定化树脂中,树脂 AB-8 具有较好的固定化能力。因此,本文选择

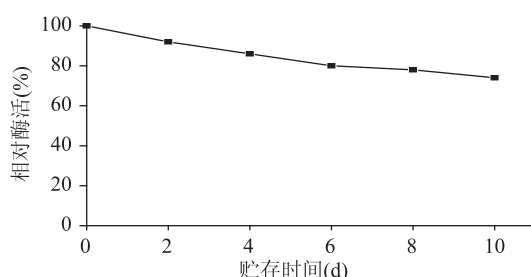


图8 固定化酶的贮存稳定性

AB-8为固定化载体进行了详细考察,考察了 pH、吸附量和酶的水分含量对酶活的影响,发现 AB-8 固定化 100L 脂肪酶的最佳 pH 为 9.0,最佳吸附量为 54.5mg/g 树脂,最佳含水量为 6%~7%。

在固定化酶性质的研究中,考察了 AB-8 固定化脂肪酶的 pH 稳定性、热稳定性、操作稳定性和贮存稳定性,发现上述四个指标都有一定程度的提高。固定化后脂肪酶的最适 pH 范围由 8.0 扩展至 6~9; 90℃ 热处理 120min 后,酶活力仍能保持 87.6%; 固定化酶循环使用 5 次,活力下降至初始活力的 58.4%; 固定化酶 4℃ 下储存 10d 后,其活力为原来的 71.2%。综上所述,树脂 AB-8 固定化脂肪酶 Lipozyme TL 100L 具有良好的性能,以上研究为固定化脂肪酶的工业生产和研究提供了理论和应用基础。

### 参考文献

- [1] 颜兴和,王栋,徐岩.根霉脂肪酶的研究进展[J].工业微生物,2005,35(3):45-49.
- [2] 李彦锋,李军荣,伏莲娣.固定化酶的制备及应用[J].高分子通报,2001(2):13-17.
- [3] Yemul O, Imae T. Covalent-bonded immobilization of lipase on polyphenylene sulfide dendrimers and their hydrolysis ability [J]. Biomacromolecules, 2005, 6(5): 2809-2814.
- [4] Tomes R, Pessela B, Fuentes M, et al. Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports [J]. J Biotechnol, 2005, 120(4): 396-401.
- [5] Herring CD, Raffaele M, Allen TE, et al. Immobilization of Escherichia coli RNA polymerase and location of binding sites by use of chromatin immunoprecipitation and microarrays [J]. J Bacteriol, 2005, 187(17): 6166-6174.
- [6] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding [J]. Analyst Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [7] 陈志锋,吴虹,宗敏华.固定化脂肪酶催化高酸废油脂酯交换生产生物柴油[J].催化学报,2006,27(2):146-150.
- [8] 高阳,谭天伟,聂开立,等.大孔树脂固定化脂肪酶在微水相中催化合成生物柴油的研究[J].生物工程学报,2006,22(1):114-118.
- [9] Bradford M. Anal Biochem [M]. 1976, 72: 248-254.
- [10] A Lopez-lopez, Mc Lopez-Sabater, C Campoy-Folgozo, et al. Fatty acid and Sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and infant formulas [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2002, 56: 1242-1254.