

# 树脂固定化海洋脂肪酶 ADM47601 的研究

孙国龙<sup>1,2</sup>, 马子宾<sup>2</sup>, 郝建华<sup>2</sup>, 盛 军<sup>2</sup>, 孙 谧<sup>2</sup>

(1. 大连海洋大学 食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

**摘要:** 以海洋脂肪酶 ADM47601 为研究对象, 以树脂为载体, 进行了固定化酶的研究。筛选了 21 种树脂, 确定 D316 型阴离子交换树脂为载体。通过正交试验得到了固定化的最佳条件, 每克载体加脂肪酶 10 000 U, pH7.5, 25℃, 150 r/min, 固定化时间 3 h, 固定化酶活力回收率可达 65.53%±1.06%。固定化脂肪酶最适作用 pH 为 7.5, 在 pH6.0~9.0 的范围内能够保持 85% 的活力。最适作用温度 40℃, 在 50℃ 下贮存 1 h 后依然保持 66% 的活力。25℃ 保存半衰期为 55 d, 操作 8 次仍然能维持 60% 以上的活性, 且在多种有机试剂中能够稳定的保持活性。固定化脂肪酶  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为  $4.86 \times 10^{-5}$  mol/L 和  $1.31 \times 10^{-5}$  mol/(L·min), 对底物亲和性较好。

**关键词:** 脂肪酶; 树脂; 固定化; 酶学性质

中图分类号: Q814 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)04-0057-08

DOI: 10.11759/hyxx20160717001

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)又称三酰基甘油水解酶, 是催化脂肪水解的一类特殊酰基水解酶的总称。能够在油水界面上催化酯水解、酯合成、酯交换、立体异构体拆分等化学反应, 在食品加工、试剂、纺织、生物能源、制药等方面有很大的应用潜力<sup>[1-2]</sup>, 是一种广泛应用的酶制剂。高活性的脂肪酶已经有大量的报道<sup>[3-5]</sup>, 但是游离的脂肪酶不易回收, 得不到重复利用, 因此其价值大打折扣, 限制了工业大规模的应用。如果将高活性的脂肪酶固定在水不溶的载体上, 便可以重复利用, 并且改善其在有机试剂中的活性<sup>[6]</sup>。脂肪酶的固定化有广泛报道<sup>[7-9]</sup>, 固定化方法较为常见的有吸附法, 包埋法, 交联法, 共价结合法<sup>[10-11]</sup>。其中吸附法是一种传统且操作简洁的方法, 这种方法固定化条件温和, 成本低廉, 载体能再生, 操作简单, 固定化酶活力高, 因此吸附法是固定化脂肪酶的一种重要方法。树脂是一类表面疏水性载体, 理化性质稳定, 具有较大的孔径和比表面积, 可以通过氢键和疏水作用力与酶分子结合, 因此对酶的结构影响小, 同时树脂价格低廉, 故非常适合用于脂肪酶的固定化<sup>[12]</sup>。

本研究以海洋脂肪酶 ADM47601 为研究对象, 该脂肪酶来源于海洋微生物菌株 Bohaisea-9145, 是一种低温海洋脂肪酶, 对于中长链的酯类底物有较强的水解作用, 在低温环境中能够保持较好的活性, 同时作用 pH 和温度范围较广, 显示出良好的酶学特

性及应用潜力<sup>[13]</sup>。故本研究以工业常用阴离子交换树脂 D316 为载体对脂肪酶 ADM47601 固定化, 并对固定化条件进行探索, 进而研究了固定化酶性质, 为工业化经济高效地应用提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与仪器

海洋脂肪酶 ADM47601, 由黄海水产研究所酶工程实验室自行研制。乙醇, 丙酮, 氢氧化钠, 盐酸, 氯化钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, TritonX-100, 异丙醇, 均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。对硝基苯基月桂酸酯(4-Nitrophenyl dodecanoate), 分析纯, 购自 SIGMA 公司。各类树脂购自山东鲁抗立科药业有限公司。

SHIMADZU UV2550 紫外可见光分光光度计,

收稿日期: 2016-07-17; 修回日期: 2016-09-14

基金项目: 国家自然科学基金-联合基金(U1406402-5); 国际科技合作与交流专项(2014DFG30890); 国家实验室-鳌山科技计划(2015ASKJ02-06) [Foundation: National Science Foundation-Shandong province Joint Fund (U1406402-5); International Science and Technology Cooperation and Exchanges (2014DFG30890); The Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]

作者简介: 孙国龙(1988-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物酶工程研究, E-mail: lee29001@sina.com; 孙谧, 通信作者, 研究员, 博士生导师, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

全温摇床(太仓实验设备厂), ORION Model 818 pH计, LKB2219 恒温水浴箱, 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司), 真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 载体树脂及其预处理

选择 21 种工业应用广泛的树脂, 阴离子交换树脂: D380、D316、D345、D941、D900、WDA, 阳离子交换树脂: DK110、D113、110、D152、001×7、SPJ、LKC150, 大孔吸附树脂: D3520、NKA、CAD-40、DM18、DM1180、CD-180、AB-8、S-8。

阴离子交换树脂: 将树脂用 70%乙醇浸泡 24 h 后抽滤, 水洗至流出清水, 用 5%盐酸浸泡 6 h 后抽滤, 水洗至 pH7.0, 再用 5%NaOH 浸泡 6 h 后抽滤, 水洗至 pH7.0, 备用; 阳离子交换树脂: 将树脂用 70%乙醇浸泡 24 h 后抽滤, 水洗至流出清水, 用 5%NaOH 浸泡 6 h 后抽滤, 水洗至 pH7.0, 再用 5%盐酸浸泡 6 h 后抽滤, 水洗至 pH7.0, 备用; 大孔吸附树脂: 采用乙醇、丙酮、去离子水交替处理 3 h 后抽滤, 水洗至 pH7.0, 备用<sup>[14]</sup>。

### 1.2.2 脂肪酶的固定化

首先采用单因素对比实验法, 分别进行载体树脂选择, 加酶量, 温度, 时间, pH 的优化实验。称取一定量的脂肪酶 ADM47601 溶解于 10 mL 一定 pH 值的磷酸缓冲液中, 并倒入 100 mL 三角瓶中, 加入一定量的载体树脂, 于 10~50℃, 震荡 1~8 h。抽滤分离上清液和固定化酶, 同种缓冲液清洗固定化酶后, 真空冷冻干燥 8 h, 4℃密封保存备用。然后根据单因素实验结果进行正交试验和方差分析, 确定最佳固定化条件。

### 1.2.3 酶学性质测定方法

固定化酶酶学性质测定以对硝基苯基月桂酸酯为底物, 通过改变反应体系的某一条件(pH、温度等), 来测定不同条件对固定化酶水解底物的影响, 同时其他的反应条件不变。稳定性测定时, 将固定化酶置于不同的环境中 1 h, 再测定其活性。催化反应动力学, 运用双倒数作图法(Lineweaver-Burk), 以  $1/[S]$  为横坐标,  $1/V$  为纵坐标作图, 计算可得  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 脂肪酶活力测定

pNPP 法<sup>[15]</sup>, 游离酶的测定按照 Hatzinikolaou 的方法略作修改。将 3 mL 含 0.25% TritonX-100 的磷酸

钠盐缓冲液(pH8.0)与 0.2 mL 含 0.6 mmol 的对硝基苯基月桂酸酯-异丙醇溶液混匀预热后, 加入 0.2 mL 脂肪酶液, 35℃ 反应 6 min, 加入 4 mL 乙醇终止反应, 在 410 nm 下测定其吸光值。使用等量煮沸灭活的酶液作为空白对照。将 1 min 内催化底物水解生成 1 μmol 脂肪酸所需的酶用量定义为 1 单位酶活力(U)。

脂肪酶在适宜的条件下, 可以将底物对硝基苯基月桂酸酯等摩尔水解为呈黄色物质对硝基酚, 对硝基酚在 410 nm 处有特定吸收, 故通过测定产物对硝基酚的含量即可得到标准曲线:  $Y=0.0146X+0.0237$ ,  $R^2=0.9982$ , 其中  $Y$  为样品 410 nm 吸光度,  $X$  为对硝基酚的含量。

固定化酶活力测定, 称取一定量干燥的固定化酶代替游离酶加入反应体系, 其余按照游离酶测定方法测定, 以固定化载体作为空白对照。将 1 min 内催化底物水解生成 1 μmol 脂肪酸所需的酶用量定义为 1 个酶活力单位(U)。

$$\text{固定化酶活力} = \frac{X \times V \times 1000 \times N}{M \times t}$$

式中  $X$ : 产物对硝基酚的含量(g/L);  $V$ : 反应体积(mL);  $N$ : 稀释倍数;  $M$ : 对硝基酚的摩尔质量;  $t$ : 反应时间(min)。

### 1.3.2 脂肪酶活力回收率

$$\text{固定化酶活力回收率}(\%) = \frac{\text{固定化酶活力}}{\text{加入脂肪酶的总活力}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化载体的选择

不同固定化载体的物理化学性质是影响酶催化能力的重要因素, 在相同的固定化条件下(载体 3 g, 脂肪酶 30 000 U, 20℃, 100 r/min, pH7.0, 5 h)各树脂载体固定化效果见表 1。

由表可见离子交换型树脂比大孔吸附型树脂效果好, 而阴离子交换树脂的固定化效果优于阳离子交换树脂。D316 为弱碱性阴离子交换树脂, 结构骨架为丙烯酸系。D316 型树脂作为载体, 固定化的效果最好, 可能原因是 D316 型树脂表面的弱极性使脂肪酶与非极性的底物油脂分子存在较强作用力, 酶蛋白进行催化时酶分子与底物的相互作用得以增强。另外其树脂颗粒细小, 从而使比表面积增大, 单位面积内能够与底物有更大的作用面积。因此, 选取 D316 型树脂作为脂肪酶的固定化载体。

表 1 不同树脂载体的固定化效果

Tab.1 The effect of different resins on immobilization

树脂型号	固定化酶活力(U)	酶活力回收率(%)	树脂类型
D316	17 100	57.1	阴离子交换
D380	11 200	37.3	阴离子交换
D345	9 000	30	阴离子交换
D941	13 200	44	阴离子交换
D900	9 500	31.7	阴离子交换
WDA	14 200	47.3	阴离子交换
DK110	3 900	13	阳离子交换
D113	8 100	27	阳离子交换
D152	7 900	26.3	阳离子交换
110	9 600	32	阳离子交换
001×7	9 900	33	阳离子交换
SPJ	2 300	7.7	阳离子交换
LKC150	1 700	5.7	阳离子交换
NKA	1 600	5.3	大孔吸附
D3520	1 500	5	大孔吸附
CAD-40	4 200	14	大孔吸附
CD-180	3 300	11	大孔吸附
DM18	4 600	15.3	大孔吸附
DM1180	3 200	10.7	大孔吸附
AB-8	1 100	3.7	大孔吸附
S-8	1 600	5.3	大孔吸附

## 2.2 固定化条件优化

### 2.2.1 加酶量对固定化影响

相同固定化条件下(载体 3 g, 20°C, 100 r/min, pH7.0, 5 h), 不同加酶量(10 000, 20 000, 30 000, 40 000, 50 000 U)固定化效果见图 1。在加酶量为 30 000 U 时, 随着加酶量的增加, 固定化酶活力基本不再提升, 显然此时已经达到最大载酶量, 因此加酶量选择 30 000 U。

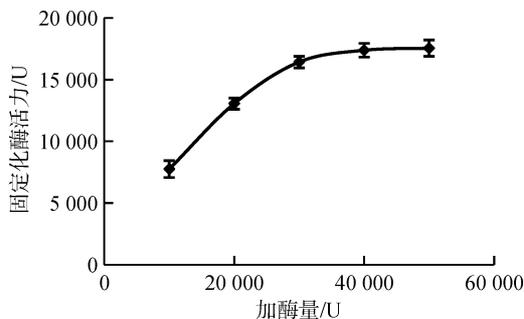


图 1 加酶量对固定化效果的影响

Fig. 1 The effect of enzyme amount on immobilization

### 2.2.2 温度对固定化影响

在相同的固定化条件下(载体 3 g, 脂肪酶 30 000 U, 100 r/min, pH7.0, 5 h), 不同温度(10, 20, 30, 40, 50°C)固定化效果见图 2。在 20°C 和 30°C 时结果比较接近, 因此加入 25°C 的情况。在 20~30°C 范围内固定化效果较好。

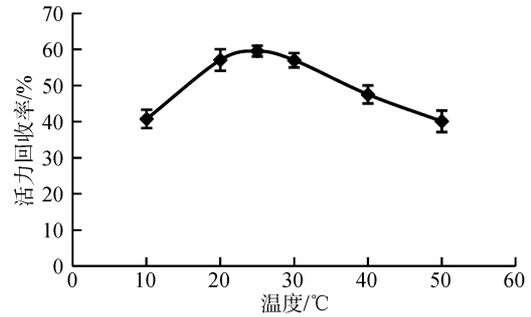


图 2 温度对固定化效果的影响

Fig. 2 The effect of temperature on immobilization

### 2.2.3 时间对固定化影响

在相同的固定化条件下(载体 3 g, 脂肪酶 30 000 U, 25°C, 100 r/min, pH7.0), 不同时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h)固定化效果见图 3。可以看出, 3 h 后固定化酶活力不再增加, 因此将固定化时间定为 3 h。

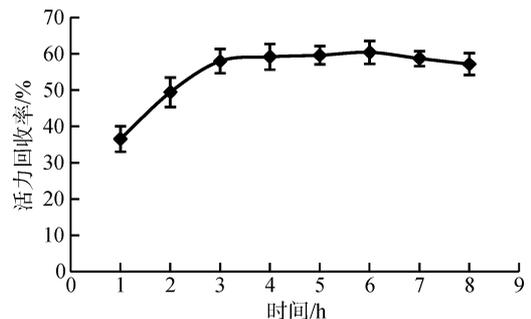


图 3 时间对固定化效果的影响

Fig. 3 The effect of time on immobilization

### 2.2.4 转速对固定化影响

在相同的固定化条件下(载体 3 g, 脂肪酶 30 000 U, 25°C, pH7.0, 3 h), 不同转速(50, 100, 150, 200, 250 r/min)固定化效果见图 4。在高于 100 r/min 后转速对固定化效果影响不大, 高于 200 r/min 后可能转速太大, 导致树脂小球不同程度的破损, 使固定化酶活力下降。

### 2.2.5 pH 对固定化影响

在相同的固定化条件下(载体 3 g, 脂肪酶 30000 U, 25°C, 100 r/min, 3 h), 不同 pH(6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)固定化效果见图 5。在中性偏碱的条件下固定化酶活力较高。

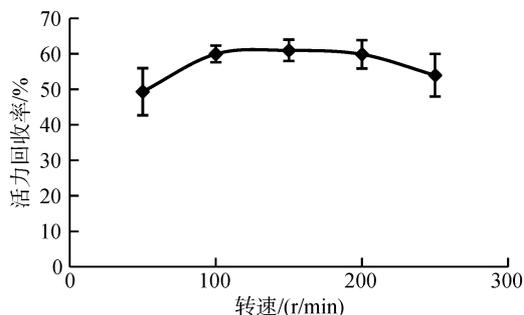


图 4 转速对固定化效果的影响

Fig. 4 The effect of rotation speed on immobilization

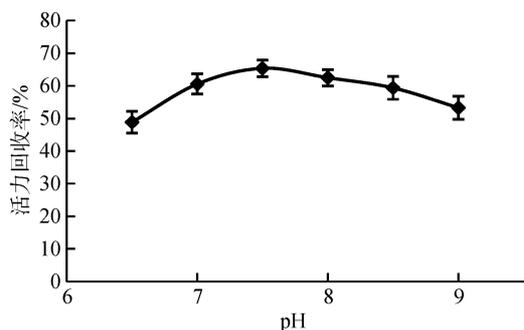


图 5 pH 对固定化效果的影响

Fig. 5 The effect of pH on immobilization

### 2.2.6 正交实验与分析

根据单因素实验结果可知,影响固定化效果的条件有 pH、温度、转速、时间及加酶量等因素,其中时间和加酶量对固定化的影响清晰明了,对实验

结果的影响稳定,故不带入正交试验,因此选定主要影响因素为 pH(A)、温度(B)和转速(C),其他操作参数固定不变,选择  $L_9(3^4)$  正交表安排正交试验,结果见表 2。

由正交试验结果和方差分析(表 3)可知,9 组正交试验的最优条件为  $A_2B_2C_3$ ,即 pH 为 7.5,温度 25℃,转速 150 r/min。各因素对结果的影响次序为:  $C>A>B$ ,即转速为固定化的主要影响因素,pH 次之,温度对固定化影响最小。按照最优条件进行验证实验,酶活力回收率为  $65.53\% \pm 1.06\%$ ,证明正交试验得出的结果合理可行。

## 2.3 固定化酶的性质

### 2.3.1 固定化酶的最适 pH 和 pH 稳定性

在 pH5.0~9.0 的条件下,测定固定化脂肪酶和游离酶的活性,固定化最适 pH 实验中设定最适 pH 活力为 100%,计算其他 pH 条件下的相对酶活。图 6 显示固定化酶的最适 pH 为 7.5,相较于游离酶减小了 0.5。在 pH 稳定性实验中,设定 pH8.0 的酶活力为 100%,计算其他 pH 条件下的相对酶活。如图 7 所示,固定化酶和游离酶在贮存 1 h 后,均在 pH 为 8 时稳定性最高。同时可以看出在不同 pH 时,固定化酶的耐受性都比游离酶好。固定化酶在 pH6.0~9.0 内其活力均保持在 85%以上,游离酶只在 pH7.0~9.0 内能够保持 85%以上。

表 2 固定化正交试验结果

Tab. 2 Results of orthogonal test for immobilization

实验号	A	B	C	D	酶活力回收率(%)
	pH	温度(°C)	转速(r/min)	空列	
1	1(7)	1(20)	1(50)	1	46.98
2	1	2(25)	2(100)	2	59.57
3	1	3(30)	3(150)	3	58.56
4	2(7.5)	1	2	3	61.03
5	2	2	3	1	64.21
6	2	3	1	2	50.25
7	3(8)	1	3	2	59.06
8	3	2	1	3	50.54
9	3	3	2	1	58.12
K1	55.07	55.69	49.26	56.44	
K2	58.05	58.11	59.57	56.29	
K3	55.91	55.68	60.64	56.74	
R	3.43	2.43	11.38	0.45	

注:表中括号内数字表示相应列的影响因素指标,例如 A 列括号内的 7 代表 pH 为 7

表 3 方差分析  
Tab. 3 Analysis of variance

来源	偏差平方和 s	自由度 f	F 值	F 临界值	显著性
A	11.76	2	5.88	4.46	*
B	6.64	2	3.32	4.46	
C	129.50	2	64.75	4.46	**
空	1.82	2	0.91	4.46	

注:  $P < 0.05$ , \*表示显著, \*\*表示高度显著

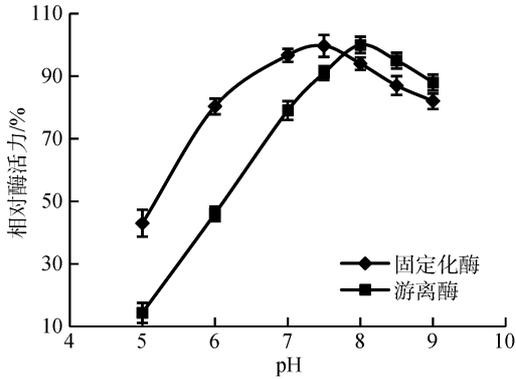


图 6 固定化酶的最适 pH

Fig. 6 The optimal pH of immobilized enzyme

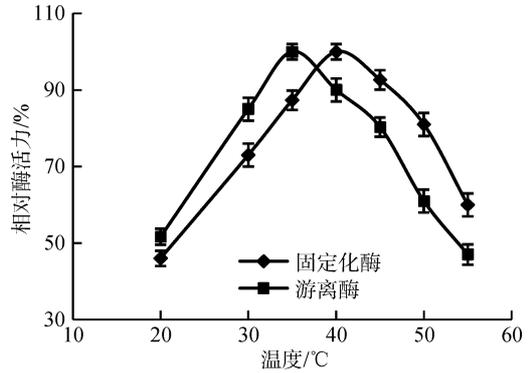


图 8 固定化酶的最适温度

Fig. 8 The optimal temperature of immobilized enzyme

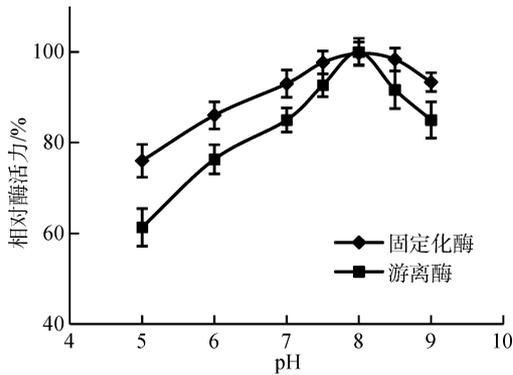


图 7 固定化酶的 pH 稳定性

Fig. 7 The pH stability of immobilized enzyme

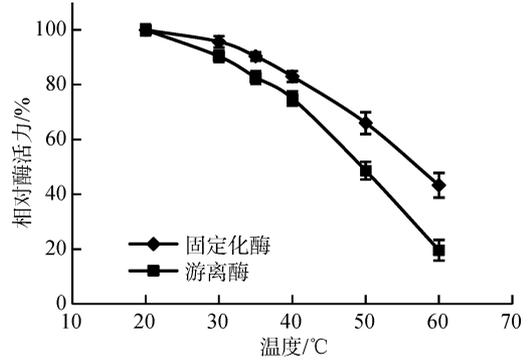


图 9 固定化酶的温度稳定性

Fig. 9 The temperature stability of immobilized enzyme

### 2.3.2 固定化酶的最适温度和温度稳定性

在 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C 的条件下, 测定固定化酶和游离酶的活性, 固定化最适温度实验中设定其对应的酶活力为 100%, 计算其他温度条件下的相对酶活。图 8 显示固定化酶的最适温度为 40°C, 而游离酶为 35°C。在温度稳定性实验中, 设定 20°C 对应的酶活力为 100%, 计算其他温度条件下的相对酶活。如图 9 所示, 固定化酶和游离酶在不同温度贮存 1 h 后, 固定化酶的活力都要比游离酶高。由此可见, 固定化脂肪酶在低温下有较高的活性, 且可以保持较高的稳定性。

### 2.3.3 固定化酶的贮藏稳定性和操作稳定性

将 D316 型树脂固定化脂肪酶和游离酶分别于 25°C 的环境中贮存, 每隔 5 d 取样测定活力。从图 10 中发现, 固定化酶在贮藏 25 d 后依旧能够保持 73% 的活性, 游离酶 25 d 后可以保持 60% 的活性。按照半衰期计算公式可知, 固定化酶贮藏半衰期为 55 d, 游离酶为 34 d。

以对硝基苯基月桂酸酯为底物, 重复测定固定化酶的活力, 结果如图 11 所示, 按照半衰期计算公式可以得到固定化酶操作半衰期为 11 次。

### 2.3.4 常用有机试剂对固定化酶的影响

将固定化脂肪酶在水、甲醇、乙醇、丙酮、异

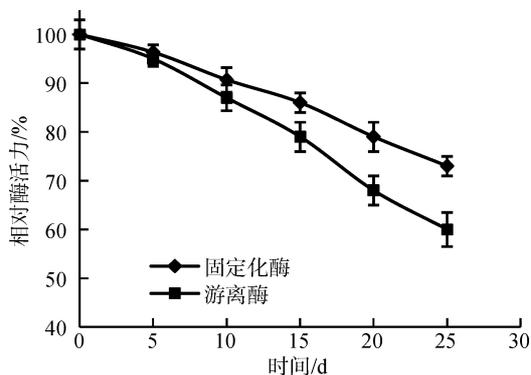


图 10 固定化酶的贮藏稳定性

Fig. 10 The storage stability of immobilized enzyme

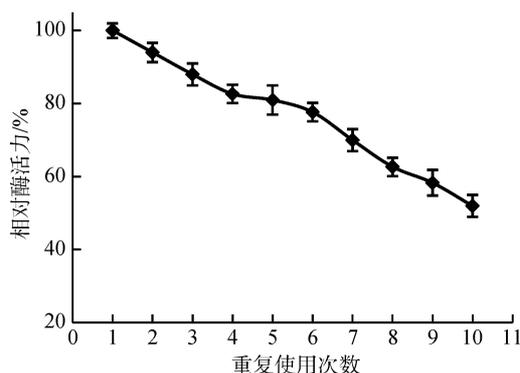


图 11 固定化酶的操作稳定性

Fig. 11 The operational stability of immobilized enzyme

丙醇、叔丁醇、正己烷、正丁醇中贮存 1 h 后分别测定其活力。图 12 表明，固定化酶在正己烷中活力最高为 95%，在叔丁醇中能够保持 92% 以上的活力。游离酶在叔丁醇中活力最高为 84%，在正己烷中也能保持 79% 的活力。在不同有机试剂中，固定化酶的活力均比游离酶的高。

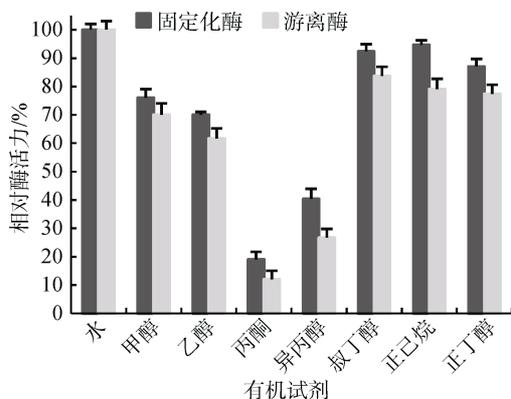


图 12 有机试剂对固定化酶的影响

Fig. 12 The effect of organic reagents on immobilized enzyme

### 2.3.5 固定化脂肪酶催化反应动力学

根据图 13 得到的回归方程，经过计算可知固定化脂肪酶  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为  $4.86 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  和  $1.31 \times 10^{-5} \text{ mol/(L}\cdot\text{min)}$ ，同样方法测的游离酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为  $3.75 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  和  $1.39 \times 10^{-5} \text{ mol/(L}\cdot\text{min)}$ 。从结果看，固定化后脂肪酶在底物亲和力上相对游离酶有所下降，可能由于固定化处理后，酶蛋白与载体结合，对酶的活性中心产生部分影响，在立体空间上形成位阻，影响酶活性中心的扩散和作用，使酶的催化速率产生降低的情况。

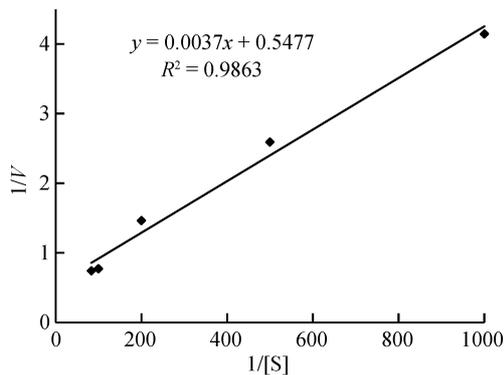


图 13 固定化酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

Fig. 13 The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of immobilized lipase

## 3 讨论与结语

经过固定化处理的脂肪酶最大的特点是能够多次利用，增加利用的效率，同时其他的性质也会发生相应的变化，例如作用温度、作用 pH、对金属离子及有机试剂的敏感度等，这些表现的性质变化原因来自于脂肪酶分子与载体(如树脂)颗粒的相互作用。有些酶分子会与载体通过共价键结合，这种结合比较紧密，但酶活性相抵；有些酶分子能够通过氢键或疏水作用力与载体吸附，这种情况固定化酶的活力得到保证，但酶分子与载体联系不紧密，重复利用性不如共价结合的方式。无论哪种方法通常情况下，一般相较于游离酶，固定化酶的  $V_{max}$  值会减小、 $K_m$  值会增大，这是由于酶分子的活性中心若被部分掩埋于载体中，结果必然使活性下降、酶与作用底物的亲和力降低。因此，保证固定化酶的低活力损失是固定化处理的关键，在此基础上提高其重复使用次数和不同环境下固定化酶的稳定性决定了固定化效果的好坏。

本研究针对实验室前期研究得到海洋脂肪酶

ADM47601<sup>[13, 16-17]</sup>, 筛选了 6 种阴离子交换树脂、7 种阳离子交换树脂、8 种大孔吸附树脂共 21 种树脂对脂肪酶进行了固定化, 选择效果最好的 D316 阴离子交换树脂, 通过正交实验进一步研究了 D316 型树脂固定化的最佳条件为每克载体加酶量 10 000 U, pH7.5, 25℃, 150 r/min, 固定化 3 h。此时固定化酶活力回收率最高, 达到 65.53%±1.06%。且研究了固定化脂肪酶的酶学性质, 其最适作用 pH 为 7.5, 在 pH6.0~9.0 的范围内能够保持 85% 的活力。最适作用温度为 40℃, 在 50℃ 下贮存 1 h 后依然保持 66% 的活力。室温保存半衰期为 55 d, 操作 8 次仍然能维持 60% 的活性, 且在多种有机试剂中能够稳定的保持活性。固定化脂肪酶  $K_m$  和  $V_{max}$  值分别为  $4.86 \times 10^{-5}$  mol/L 和  $1.31 \times 10^{-5}$  mol/(L·min), 对底物亲和性较好。得到的固定化脂肪酶相比游离酶有着广泛的 pH 和温度适应性, 且具有较高的有机溶剂适应性, 为工业扩大化应用奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64: 763-781.
- [2] Hasan F, Shah A, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipase: A comprehensive review [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 782-789.
- [3] Dinh T Q, Schmidt-Dannert C, Schmid R D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase[J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 28: 102-110.
- [4] Santosh O R, Virginia A V, Eva N K, et al. Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71: 463-472.
- [5] Layla F, Ignacio P V, Alberto Z, et al. High-level expression and characterization of *Galactomycesgeotrichum* (BT107) lipase I in *Pichiapastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 49: 256-264.
- [6] Neerupma N, Rajvinder S, Jagdeep K. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp.: The effect of process parameters on immobilization of enzyme [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2006, 9(5): 559-565.
- [7] Cao G M, Sheng M, Gao G D. Studies on the immobilization of lipase and the properties of the immobilized lipase[J]. *Biotechnology*, 1997, 7(3): 14-17.
- [8] Wang Z G, Wan L S, Liu Z M. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview [J]. *Journal of molecular catalysis B-enzymatic*, 2009, 56: 189-195.
- [9] Cruz J C, Pfromm P H, Rezac M E. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on fumed silica [J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 62-69.
- [10] Tanriseven A. A novel method for the immobilization of  $\beta$ -galactosidase[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38: 27-30.
- [11] Liu X, Guan Y, Shen R. Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads [J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 822: 91-97.
- [12] 朱珊珊, 邵佩霞, 王永华. Lipozyme TL 100L 脂肪酶的固定化及其性质研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 5(31): 97-100.  
Zhu Shanshan, Shao Peixia, Wang yonghua. Study on immobilization of Lipase TL 100L and its properties [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 5(31): 97-100.
- [13] 段晓琛, 盛军, 徐甲坤, 等. 海洋脂肪酶 ADM47601 固定化方法的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(5): 1311-1317.  
Duan Xiaochen, Sheng Jun, Xu Jiaokun, et al. Research on the Immobilization of Lipase ADM47601 [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(5): 1311-1317.
- [14] 王燕华, 朱凯, 刘辉, 等. D301 树脂固定化假丝酵母脂肪酶[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 2036-2041.  
Wang Yanhua, Zhu Kai, Liu Hui, et al. Immobilization of *Candida* sp. Lipase on resin D301 [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(12): 2036-2041.
- [15] Hatzinikolaou D G, Kourentzi E, Stamatis H, et al. A novel lipolytic activity of *Rhodotorulaglutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 8: 53-56.
- [16] 邵铁娟, 孙谧, 郑家生, 等. Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(6): 789-793.  
Shao Tiejuan, Sun Mi, Zheng Jiasheng, et al. Study on Low-temperature Alkaline Lipase from Bohaisea-9145 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(6): 789-793.
- [17] Jun Sheng, Fang Wang, HaiYing Wang, et al. Cloning, characterization and expression of a novel lipase gene from marine psychrotrophic *Yarrowialipolytic*[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62: 1071-1077.

## Research on immobilization of lipase ADM47601 from marine microorganisms by resin

SUN Guo-long<sup>1, 2</sup>, MA Zi-bin<sup>2</sup>, HAO Jian-hua<sup>2</sup>, SHENG Jun<sup>2</sup>, SUN Mi<sup>2</sup>

(1. College of food science and engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

**Received:** Jul.17, 2016

**Key words:** Lipase; Resin; Immobilization; Enzymatic property

**Abstract:** The effect of different resins on immobilizing lipase ADM47601 was investigated in this study. A total of 21 types of resins were screened, and the anion-exchange resin D316 demonstrated the best immobilization. After the orthogonal test, the recovery ratio of enzyme activity reached up to  $65.53\% \pm 1.06\%$  under optimal conditions: 10000U lipase per 1g resin, pH7.5, 25°C, 150r/min and 3 h for immobilization. The optimal pH of immobilized lipase was 7.5, and it exhibited 85% of the maximum activity in the range of pH6.0–9.0. The optimal temperature was 40°C, and the activity was maintained at 66% after 1 h of storage at 50°C. At 25°C, the half-life was 55 days and the residual activity was still higher than 60% after utilizing the lipase 8 times. The immobilized lipase can maintain activity in various organic reagents, and its  $K_m$  and  $V_{max}$  values were  $4.86 \times 10^{-5}$ mol/L and  $1.31 \times 10^{-5}$ mol/(L·min), respectively, indicating high affinity to the substrate.

(本文编辑: 康亦兼)