

海洋脂肪酶 ADM47601 固定化方法的研究*

段晓琛^{1, 2, 3, 4} 盛 军^{2, 3, 4} 徐甲坤^{2, 3, 4} 郝建华^{2, 3, 4}
于建生⁵ 孙 谧^{2, 3, 4}

(1. 大连海洋大学食品学院 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
3. 青岛市海洋酶工程重点实验室 青岛 266071; 4. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;
5. 青岛科技大学化工学院 青岛 266042)

提要 采用海藻酸钠、壳聚糖、聚乙烯醇和明胶等材料, 进行对脂肪酶 ADM47601 的固定化研究。结果表明, 使用壳聚糖固定化脂肪酶, 在最优条件为 2% (W/V)壳聚糖, 10% NaOH, 1%乙酸, 0.25%戊二醛, 每克载体添加 840U 脂肪酶时, 最大固定化酶活力回收率为 87.06%。使用海藻酸钠-明胶固定化脂肪酶, 在最优固定化条件下, 最大固定化酶活力回收率为 54.45%。使用聚乙烯醇固定化脂肪酶, 在最优固定化条件下, 最大固定化酶活力回收率为 33.22%。使用海藻酸钠固定化脂肪酶, 在最优固定化条件下, 最大固定化酶活力回收率为 17.11%。对比四种不同固定化酶方法, 脂肪酶活力回收率高低顺序为: 壳聚糖吸附交联法>海藻酸钠明胶协同包埋法>聚乙烯醇-硼酸法>海藻酸钠包埋法。

关键词 海藻酸钠; 壳聚糖; 聚乙烯醇; 海洋脂肪酶; 固定化

中图分类号 Q936

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)又称三酰基甘油酯基水解酶, 是指能够催化脂肪水解的一类酶的总称。脂肪酶作用于脂肪的酯键, 不仅能够在水相中起到水解三羧酸甘油酯的作用, 还可以在有机相催化脂肪酸发生酯化反应。脂肪酶因其特殊的水解、转酯反应, 生成产物具有对映体选择性, 被广泛应用在食品加工、轻工纺织、医药保健等工业领域中, 用以食品的风味改良, 化工产品脱脂脱酸, 废水处理, 生产消旋药物等(Yuji *et al*, 2001; Shimada *et al*, 2002; Negishi *et al*, 2003; Lara *et al*, 2004)。本实验中使用的海洋微生物低温脂肪酶 ADM47601 来自于 *Yarrowia lipolytica* Bohaisea-9145, 具有良好酶学性质, 能够在较低温度下进行酶的催化反应, 对底物的配伍性好, 对中长链对硝基苯基酯类和甘油三酯类底物(C₁₀—C₁₂)具有良好的催化性能, 能够在较宽的条件下作用(李忠磊等, 2012), 通过固定化处理以期应用到更广

泛的领域当中。

酶的固定化有多种方法, 较为常用的包括吸附法、包埋法、交联法和共价结合法(Ateş *et al*, 1997; Gordon *et al*, 1997; Tanriseven *et al*, 2002; Jiang *et al*, 2009)。吸附法和包埋法通常利用传统材料, 具有简单易行的优点, 但是固定化效率较低; 交联法和共价结合法中会使用到新型合成载体, 虽然能够提高固定化效率, 却存在载体昂贵, 较难制备的缺陷(Magdalena *et al*, 1990; Barlett *et al*, 1993)。

对海洋低温脂肪酶 ADM47601 使用不同的方法进行固定化处理, 找到最为经济实用、操作稳定性强, 简单易行的方法对于酶工程的发展有着重要意义。本文采用了四种不同的方法对脂肪酶进行了固定化处理, 分别讨论了不同条件对固定化效率的影响, 通过比较找到了能够较好固定化海洋低温脂肪酶 ADM47601 的方法。

* 国家“863”项目, 2011AA090703 号; 国际科技合作与交流专项, 2011DFB30250 号; 中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费资助, 20603022013016 号; 青岛市科技计划项目, 12-1-4-12-(2)-jch 号; 中国水产科学研究院基本科研业务费资助, 2013A1002 号。段晓琛, E-mail: duanxiaochen@gmail.com

通讯作者: 孙谧, 研究员, 博士生导师, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-02-27, 收修改稿日期: 2013-05-21

1 材料与方 法

1.1 材料与主要试剂

脂肪酶 ADM47601, 由黄海水产研究所酶工程室自行研制。海藻酸钠, CaCl_2 , 明胶, 戊二醛, 壳聚糖, NaOH , 聚乙烯醇, 硼酸, Triton X-100, 异丙醇, 对硝基苯基月桂酸酯(4-Nitrophenyl dodecanoate), Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 。

SHIMADZU UV-2550 分光光度计, ORION Model 818 pH 计, LKB2219 恒温水浴箱, 5mL 医用注射器, HANPING 电子天平。

1.2 脂肪酶固定化方法

1.2.1 海藻酸钠包埋法(Tanriseven *et al.*, 2001; Won *et al.*, 2005) 使用一定浓度的海藻酸钠与一定量脂肪酶 ADM47601 溶液混合均匀, 使用注射器逐滴加入到含一定浓度 CaCl_2 的水溶液中, 待形成光滑小球后将包埋了脂肪酶的海藻酸钠- CaCl_2 的凝胶颗粒置 4°C 硬化数小时。硬化结束使用去离子水冲洗数次去除凝胶颗粒的表面离子, 沥干水分后置 4°C 保存备用。

1.2.2 海藻酸钠明胶协同包埋法(Naganagouda *et al.*, 2006; 薛庆海等, 2010) 将一定浓度的海藻酸钠、明胶与一定量游离脂肪酶 ADM47601 混合均匀, 将此混合液使用注射器逐滴加入含一定浓度的 CaCl_2 、戊二醛的混合固定液中, 待形成光滑的凝胶球后将固定化体系置于 4°C 环境下硬化一段时间。待硬化结束将海藻酸钠-明胶微球取出, 使用去离子水冲洗数次去除表面离子, 沥干水分后置 4°C 保存备用。

1.2.3 壳聚糖吸附交联法(李红等, 2000; Krajewska *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005) 采取先交联再吸附的方法, 将壳聚糖微球加入一定浓度的戊二醛溶液中进行交联, 震荡过夜。隔天将交联好的壳聚糖微球取出, 使用去离子水反复冲洗微球去除表面残留的戊二醛。将壳聚糖微球加入到一定量脂肪酶 ADM47601 溶液中进行吸附交联处理, 一段时间后取出固定好脂肪酶的壳聚糖微球, 使用去离子水多次冲洗以洗净微球表面结合不牢固的脂肪酶, 置 4°C 环境保存备用。

1.2.4 聚乙烯醇-硼酸包埋法(Dave *et al.*, 2006) 配制一定浓度的聚乙烯醇和海藻酸钠混合液, 充分搅拌至完全溶解。向溶液中加入一定量游离脂肪酶 ADM47601, 与其均匀混合后, 使用注射器将此混合液逐滴加入含 CaCl_2 的硼酸饱和溶液中, 置于 4°C 环境中固定化 12h。固定结束沥去水分, 依次使用蒸馏

水和磷酸缓冲液反复冲洗小球去除表面残留物质, 置 4°C 环境保存备用。

1.3 脂肪酶活力测定方法(p-NPP 法)

脂肪酶酶活的测定按照参照 p-NPP 法进行(Hatzinikolaou *et al.*, 1999)。将 1.5mL 含 0.25% TritonX-100 的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)与 100 μL 含 600 μmol 的对硝基苯基月桂酸酯-异丙醇溶液混匀预热后, 加入一定量脂肪酶, 在 410nm 下测定其吸光值。使用等量灭活的酶液作为空白对照。将 1min 内催化底物水解生成 1 μmol 脂肪酸所需的酶量定义为 1 单位酶活力(U)。固定化酶活力测定时, 以一定量固定化酶取代酶液加入反应体系, 按游离酶活力测定方法测定, 使用为固定酶的载体作为空白对照。

1.4 酶活回收率的计算

固定化酶活力回收率(%) = (固定化酶总活力/用于固定化酶的总活力) \times 100%

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠包埋法固定化条件的筛选

2.1.1 海藻酸钠浓度对固定化的影响 实验过程中发现, 低浓度海藻酸钠形成的微球强度不高, 受热后易分散溶解, 海藻酸钠浓度过高时又难以溶解, 故选取海藻酸钠浓度(W/V)为 1%、2%、3%、4%、5% 进行实验。使用 1mL 上述浓度海藻酸钠溶液与 800U 活力单位的脂肪酶溶液混合均匀, 使用注射器将此混合液缓慢的逐滴加入到 50mL 2%的 CaCl_2 溶液中, 待形成光滑小球后置 4°C 硬化数小时。硬化结束使用去离子水冲洗数次去除表面离子, 沥干水分后测定固定化回收率。当海藻酸钠浓度为 3%时酶活力回收率达到最大, 但此时回收率仅有 14.42%, 固定化效率并不高。

2.1.2 CaCl_2 浓度对固定化的影响 CaCl_2 浓度对形成凝胶球的强度也有很大影响, 在此选用 0.5%、1%、1.5%、2%、3%浓度的 CaCl_2 进行实验。实验发现, 随着 CaCl_2 浓度的增加, 海藻酸钠微球的强度是逐渐上升的。故按上述实验结果, 使用 1mL 浓度为 3%的海藻酸钠溶液, 与 800U 活力单位的脂肪酶溶液混合均匀后, 使用注射器分别加入到 0.5%—3%的 CaCl_2 溶液中进行固定化。在 CaCl_2 浓度为 1%时可以达到最高的固定化酶活回收率, 此时酶活力回收率略微提升至 15.31%但固定化效率仍不理想。

2.1.3 酶/载体比例对固定化的影响 在确定了 3%的最佳海藻酸钠和 1%的 CaCl_2 浓度后, 改变加酶

量以确定此固定化方法最大酶活力回收率。此比例代表向每毫升海藻酸钠添加的酶量, 固定化酶活力折算为每毫升海藻酸钠形成的凝胶所固定的酶活力。分别使用 120、240、360、480、600、720、840U/mL 海藻酸钠的比例加入游离脂肪酶。结果见表 1, 当每毫升海藻酸钠中添加 600U 脂肪酶时, 酶活力回收率能够达到最大值 17.11%。

表 1 海藻酸钠包埋法最优反应条件及酶活力回收率
Tab.1 Optimal reaction conditions of sodium alginate assay and the recovery of enzyme activity

海藻酸钠浓度	氯化钙浓度	酶/载体比例	酶活力回收率
3%	1%	600U/mL	17.11%

2.2 海藻酸钠-明胶法固定化条件的筛选

2.2.1 海藻酸钠浓度对固定化的影响 在不同海藻酸钠浓度下对脂肪酶进行固定化处理, 使用 0.5%、1%、1.5%、2%、3%、4%浓度的海藻酸钠与 3%明胶各 0.5mL 混合均匀并添加 800U 活力单位的脂肪酶溶液后, 通过注射器滴入含 1% CaCl_2 和 0.5%的戊二醛的 30mL 混合液中, 置于 4℃浸泡 2h, 将微球取出使用蒸馏水反复冲洗微球至表面无戊二醛残留, 沥干水分, 计算酶活力回收率。

随着海藻酸钠浓度的升高, 固定化酶活力回收率明显下降, 在质量浓度为 0.5%时固定化效果最好, 酶活力回收达到最大。这是因为海藻酸钠可以与 Ca^{2+} 反应形成凝胶, 随着海藻酸钠浓度增大, 凝胶密度增大, 凝胶孔径越小, 当海藻酸钠浓度较大时, 凝胶孔径较小, 影响了底物和产物的扩散, 限制了酶促反应的进行。当继续减小海藻酸钠浓度时, 由于浓度太低, 再也无法与 CaCl_2 溶液形成有稳定形态的凝胶产物, 故 0.5%为海藻酸钠的使用最低浓度。

2.2.2 明胶浓度对固定化的影响 在海藻酸钠浓度为 0.5%的条件下, 使用浓度为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%的明胶对脂肪酶进行固定化处理。预实验发现, 0.5%的海藻酸钠与低浓度明胶(1.5%)混合滴入氯化钙后不能形成坚固的凝胶小球; 将海藻酸钠浓度调整为 1.0%时, 与低浓度明胶可形成凝胶小球且形态及稳定性良好。故选取 1.0%的海藻酸钠作为固定化条件, 再次进行明胶浓度对固定化脂肪酶的影响试验。随着明胶浓度的降低, 固定化酶活力回收率越来越高, 当浓度等于 0.5%时, 虽然固定化酶活力回收率达到最高, 但凝胶形成的固定化小球稳定性较差, 难以贮藏, 当浓度低于 0.5%时

已不易成球。而明胶浓度为 1%时, 形成的凝胶拥有较好的强度和稳定性, 故选择 1%的海藻酸钠和 1%的明胶作为最适条件。

2.2.3 氯化钙浓度对固定化的影响 选取海藻酸钠和明胶的最优条件, 在不同氯化钙浓度下制备固定化酶, 测定酶活力, 计算酶活力回收率。实验中选用的 CaCl_2 浓度分别为 0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%。随着 CaCl_2 浓度的增加, 固定化酶活力上升, 固定化酶活力回收在 CaCl_2 浓度 0.5%时达到最大, 当 CaCl_2 浓度大于 0.5%时, 随其浓度的增加固定化酶活力回收率逐渐下降。在 CaCl_2 为 0.25%时形成的凝胶稳定性不好, 脂肪酶的包埋亦不充分, 这是由于海藻酸钠通过与 Ca^{2+} 的离子交换作用形成凝胶, 钙离子浓度过低会导致凝胶强度变弱, 形态不稳定, 此时固定化效率也较弱。形成当 CaCl_2 浓度增大后, 固定化酶活力回收下降, 可能是 Ca^{2+} 与脂肪酶作用所导致。

2.2.4 戊二醛浓度对固定化的影响 选取上述实验中确定的最优条件, 在不同戊二醛浓度下对酶进行固定化处理, 测定固定化酶活力, 计算酶活力回收率。选用的戊二醛浓度分别为 0%、0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%。酶活力回收率随着戊二醛浓度的升高先是迅速增加, 当使用浓度为 0.25%时活力回收达到最高, 然后随着浓度增加逐渐降低。出现此现象的原因可能是由于戊二醛浓度太低时, 醛基与明胶上氨基的结合不够, 凝胶孔径较大, 影响酶的包埋效。戊二醛浓度增大后, 过多的醛基可能与酶基团上的氨基反应产生酶分子内部的交联, 改变酶的空间结构和活性位点构象影响了脂肪酶的活性。

2.2.5 酶/载体比例对固定化的影响 在相同的固定化体系中, 通过不同的酶/载体比例改变酶/载体比例, 进行酶的固定化处理。此比例代表每毫升海藻酸钠-明胶混合液添加的酶量, 固定化酶活力折算为每毫升海藻酸钠-明胶混合液形成的凝胶所固定的酶活力。选用的没加入量分别为 120、240、360、480、600、720、840、960U/mL 混合液。测定酶活力并计算酶活力回收率, 结果如表 2 所示。可以看到, 当酶/载体比例达到 600U/mL 时有最高的酶活力回收率, 为 54.45%。在此之前, 随着给酶量的增加, 固定化酶活力保持上升趋势, 说明酶/载体比例小于 600U 时载体尚未达到饱和程度, 继续增大给酶量, 固定化酶活力还出现了一定幅度的上升, 但此时酶活力回收率开始下降, 在此时海藻酸钠明胶载体的载酶性能已经达到饱和。

表 2 海藻酸钠-明胶法最优反应条件及酶活力回收率
Tab.2 Optimal reaction conditions of alginate-gelatin assay and enzyme activity recovery

海藻酸钠浓度	明胶浓度	氯化钙浓度	戊二醛浓度	酶/载体	酶活力回收率
1%	1%	0.5%	0.25%	600U/mL	54.45%

2.3 壳聚糖吸附交联法固定化条件的筛选

2.3.1 壳聚糖浓度对固定化的影响 先使用 2% 的乙酸溶解壳聚糖配置不同浓度的壳聚糖溶液, 使用注射器将壳聚糖逐滴加入到 NaOH 浓度为 40% 的凝结液中, 形成壳聚糖微球, 置于室温硬化。硬化半小时后, 待微球具有较好的强度, 使用去离子水反复冲洗微球至中性, 使用 1% 的戊二醛溶液交联壳聚糖, 4h 后取出洗净, 加入 800U 活力单位游离脂肪酶进行吸附固定化。预实验中发现, 当壳聚糖浓度小于 1% 时, 与 NaOH 形成的凝胶微球强度较差, 易破裂。当浓度大于 4% 时, 由于粘度较大不易溶解同时也影响到凝胶成球效果。故选取壳聚糖浓度为 1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%。结果见图 1, 低浓度下, 随着壳聚糖浓度增高酶活力回收率也随之提高, 当壳聚糖浓度达到 2% 时有最高的酶活力回收率为 64.84%。当壳聚糖浓度继续增高, 酶活力回收率会有所下降。

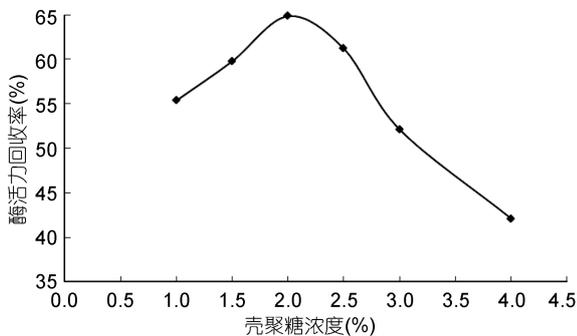


图 1 壳聚糖浓度对固定化效果的影响

Fig.1 The effect of chitosan concentration on immobilization

2.3.2 戊二醛浓度对固定化的影响 选用浓度为 2% 的壳聚糖制备凝胶球, 再使用不同浓度的戊二醛与其交联。首先选取了浓度为 1%、2.5%、5%、7.5%、10% 的戊二醛对脂肪酶进行固定化处理, 在确定固定化结果后补充了 0.25%、0.5%、0.75% 三个浓度, 结果如图 2 所示。实验发现, 使用低浓度的戊二醛对提高固定化效果作用明显, 当戊二醛浓度 2% 时, 固定化酶活力回收率可以保持在 40% 以上, 但是当戊二醛浓度降低到 1% 以下时, 固定化酶活力回收率上升显著, 当加入的戊二醛浓度为 0.25% 时, 酶活力回

收率最大能够达到 73.41%。这是因为相对高浓度的戊二醛在与酶蛋白上的氨基交联反应时太过剧烈, 改变了酶本身的构象造成酶活力的部分丧失。使用低浓度戊二醛能够使体系在交联过程中达到一个较好的平衡, 即能够大量交联游离酶蛋白又不至于损失酶活。

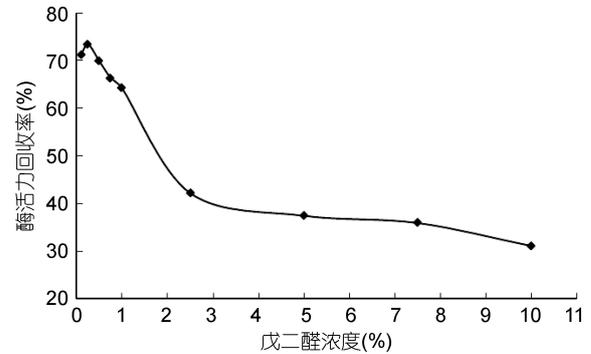


图 2 戊二醛浓度对固定化效果的影响

Fig.2 The effect of glutaraldehyde concentration on immobilization

2.3.3 乙酸浓度对固定化的影响 使用不同浓度的乙酸溶解壳聚糖, 然后滴加到凝结液中形成微球, 通过改变乙酸浓度探索乙酸对固定化酶的影响。使用的乙酸浓度分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%。结果如图 3 所示, 实验发现, 乙酸浓度的改变对最终固定化酶活力回收率影响较小, 几个条件下得到酶活力回收率, 最大差异仅为 10.11%。使用 1% 浓度溶解壳聚糖得到的最终固定化酶活力回收率最高, 为 74.32%。

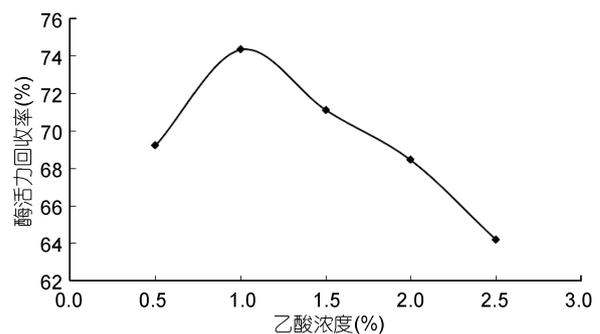


图 3 乙酸浓度对固定化效果的影响

Fig.3 The effect of acetic acid concentration on immobilization

2.3.4 NaOH 浓度对固定化的影响 壳聚糖在碱性条件下会迅速形成凝胶, 但使用过高浓度 NaOH 会有一些的危险性同时造成污染。实验中分别使用浓度为 5%、10%、20%、30%、40% 的 NaOH 凝结壳聚糖

制备微球用于固定化。结果见图 4, 当使用较低浓度 NaOH 制备壳聚糖凝胶微球时, 最终得到的酶活力回收率比使用高浓度 NaOH 制备微球得到的酶活力回收率要高。当 NaOH 浓度为 10% 时, 固定化酶活力回收率能够达到 79.74%。

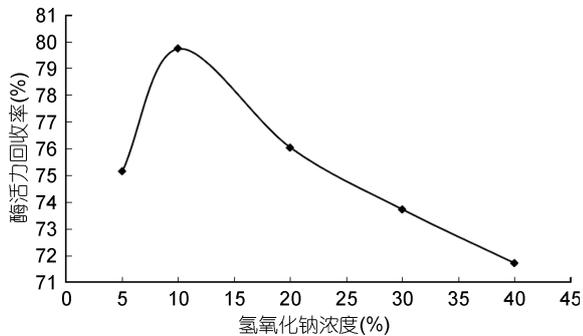


图 4 氢氧化钠浓度对固定化效果的影响

Fig.4 The effect of NaOH concentration on immobilization

2.3.5 酶/载体比例对固定化的影响 在相同的固定化体系中, 通过不同的酶/载体比例改变酶/载体比例, 进行酶的固定化处理, 测定酶活力并计算酶活力回收率, 结果如图 5 所示。

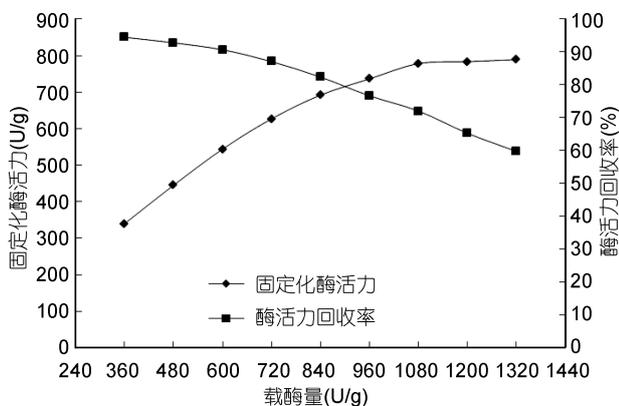


图 5 酶/载体比例对固定化效果的影响

Fig.5 The effect of enzyme/carriers ratio on immobilization

按上述条件制取壳聚糖微球后, 去除表面水分并称重, 经计算后按照 360、480、600、720、840、960、1080、1200、1320U/g 壳聚糖的比例向微球中添加游离酶, 充分吸附交联后测定酶活力及酶活回收率。表 3 的结果表明, 随着加酶量的不断上升, 壳聚糖固定化酶活力也是不断上升的, 但酶活力回收率却逐渐降低。在较低加酶量范围内, 酶活力回收率都保持在相当高的水平, 加酶量为 720U/g 时, 固定化酶活力为 626.83U/g, 酶活力回收率能够达到

87.06%。当加酶量达到 960U/g 时, 继续提高加酶量对固定化酶活力提升不再明显, 固定化酶活力约为 755U/mL 时基本趋于稳定, 载酶量达到最高, 酶活力回收率为 78.68%。

表 3 壳聚糖交联吸附法最优反应条件及酶活力回收率
Tab.3 Optimal reaction conditions of chitosan crosslinking assay and enzyme activity recovery

壳聚糖浓度	戊二醛浓度	乙酸浓度	氢氧化钠浓度	酶/载体比例	酶活力回收率
2%	0.25%	1%	10%	720U/g	87.06%

2.4 聚乙烯醇(PVA)-硼酸法固定化条件的筛选

2.4.1 聚乙烯醇浓度对固定化的影响

配制含 2% 海藻酸钠和一定浓度聚乙烯醇的混合溶液, 充分搅拌至完全溶解。向溶液中加入 800U 活力单位游离脂肪酶, 与其均匀混合后, 使用注射器将此混合液逐滴加入含 2% CaCl₂ 的硼酸饱和溶液中, 置于 4℃ 环境中固定化 12h。固定结束取出凝胶球, 依次使用蒸馏水和磷酸缓冲液反复冲洗小球去除表面残留物质, 沥干水分后测定酶活。选取的聚乙烯醇浓度为 1%、2.5%、5%、7.5%、10%。结果发现, 随着聚乙烯醇浓度的提高, 固定化酶活力回收率逐渐升高, 当聚乙烯醇浓度达到 7.5% 时, 固定化效率最高, 为 19.76%。上文中提到, 聚乙烯醇通过羟基与硼酸发生交联反应形成凝胶, 因为反应过程中使用的是饱和硼酸溶液, 故提高了聚乙烯醇浓度也相应地提高了其与硼酸的交联效率。当聚乙烯醇浓度大于 7.5% 时, 固定化酶活力回收率略有下降, 这可能是因为反应体系形成致密的网状结构阻碍了酶和底物间的扩散。

2.4.2 海藻酸钠浓度对固定化的影响

向反应体系中添加海藻酸钠和氯化钙起到了辅助形成凝胶的作用, 两种凝胶体系结合使用使包埋体系更加牢固。实验中向浓度为 7.5% 的聚乙烯醇中分别添加 1%、2%、3%、4%、5% 的海藻酸钠, 加热充分溶解并搅拌均匀后进行固定化酶的处理。添加海藻酸钠浓度为 2% 时酶活力回收率最大, 此时能够达到 24.89%。

2.4.3 氯化钙浓度对固定化的影响

氯化钙浓度主要是与体系中的海藻酸钠产生影响, 通过两者和聚乙烯醇-硼酸的交互作用形成复合凝胶。实验中向饱和硼酸溶液中添加 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3% 的氯化钙, 测定其固定化结果。结果表明, 当氯化钙浓度为 1.5% 时有酶的最大活力回收率 26.22%。

2.4.4 酶/载体比例对固定化酶的影响

在确定了包埋条件后, 针对所制备载体载酶能力进行实验讨

论, 分别按 120、240、360、480、600、720U/mL 聚乙烯醇海藻酸钠混合液的比例添加游离脂肪酶。此比例代表每毫升聚乙烯醇-海藻酸钠混合液添加的酶量, 固定化酶活力折算为每毫升聚乙烯醇-海藻酸钠混合液形成的凝胶所固定的酶活力, 结果见表 4。如图 6 所示, 随载酶量的增加, 低浓度下固定化酶活力回收率缓慢下降, 同时固定化酶活力显著提升, 载酶量为 360U/mL 时酶活力回收率为 33.22%, 此时固定化酶活力为 119.192U/mL。当载酶量继续上升, 固定化酶活力还会继续上升, 但酶活力回收率不断下降, 固定化酶活力达到 160.496U/mL 左右时趋于稳定。

表 4 聚乙烯醇-硼酸法最优反应条件及酶活力回收率
Tab.4 Optimal reaction conditions of PVA-borate assay and the recovery of enzyme activity

聚乙烯醇浓度	海藻酸钠浓度	氯化钙浓度	酶/载体比例	酶活力回收率
7.5%	2%	1.5%	360U/mL	33.22%

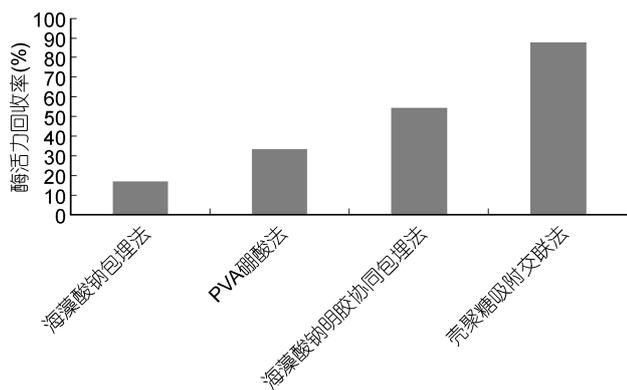


图 6 不同脂肪酶固定化方法的比较

Fig.6 Comparison of different ways to immobilize lipase

3 讨论与结语

本文中使用了四种不同方法对脂肪酶进行了固定化处理, 通过单因素试验得到了使用这些方法处理酶的最大固定化效果。

海藻酸钠包埋法的最优固定化条件为: 海藻酸钠浓度 3%, CaCl_2 浓度 1%, 每毫升海藻酸钠添加 600U 脂肪酶 ADM47601 时得到最大固定化酶活回收率 17.11%。使用这种方法得到固定化酶虽然机械强度较好, 但重复利用性不高。

海藻酸钠明胶协同包埋法的最优固定化条件为: 海藻酸钠浓度 1%, 明胶浓度 1%, CaCl_2 浓度 0.5%, 戊二醛浓度 0.25%, 每毫升海藻酸钠-明胶混合液添加 600U 脂肪酶时得到最大固定化酶活回收率 54.45%。

通过此种方法得到的固定化酶重复利用性较好, 但机械强度和温度稳定性较弱, 不易长时间贮藏。

壳聚糖吸附交联法的最优固定化条件为: 壳聚糖浓度 2%, 戊二醛浓度 0.25%, 乙酸浓度 1%, NaOH 浓度 10%, 交联 3h, 每克载体添加 720U 脂肪酶时得到最大固定化酶活力回收率 87.06%。通过此种方法得到的固定化酶重复利用性好, 机械强度高, 经过长时间贮藏仍然能够保持较高的脂肪酶活性, 是一种理想的固定化酶方法。

聚乙烯醇-硼酸法的最优固定化条件为: 聚乙烯醇浓度 7.5%, 海藻酸钠浓度 2%, CaCl_2 浓度 1.5%, 每毫升聚乙烯醇添加 360U 脂肪酶时得到最大固定化酶活力回收率 33.22%。使用这种方法固定化酶, 在制备载体时易发生聚乙烯醇聚结的情况, 操作不当易使载体互相粘附到一起, 难以分离使用。

综上所述, 对比四种不同固定化酶方法, 酶活力回收率为壳聚糖吸附交联法>海藻酸钠明胶协同包埋法>聚乙烯醇-硼酸法>海藻酸钠包埋法。使用壳聚糖对脂肪酶 ADM47601 进行固定化处理, 反应条件温和, 操作简单, 固定化脂肪酶回收效率高。

参 考 文 献

- 李 红, 王炜军, 徐凤彩等, 2000. 壳聚糖微球的制备及其固定化木瓜蛋白酶的研究. 华南农业大学学报, 21(2): 49—53
- 李志磊, 王跃军, 盛 军等, 2012. Bohaisea-9145 海洋耶氏酵母碱性脂肪酶基因的克隆、异源表达和重组酶学性质. 海洋与湖沼, 43(2): 230—236
- 薛庆海, 徐 梁, 沐万孟等, 2010. 海藻酸钠明胶及戊二醛协同固定化苜蓿脂氢过氧化物裂解酶. 食品与发酵工业, 36(12): 10—14
- Ateş S, Mehmetoğlu Ü, 1997. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. Process Biochemistry, 32(5): 433—436
- Barlett P N, Cooper J M, 1993. A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. Journal of Electroanalytical Chemistry, 362(1—2): 1—12
- Chang M, Juang R, 2005. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 36(1): 75—82
- Dave R, Madamwar D, 2006. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. Process Biochemistry, 41(4): 951—955
- Gordon F, Bickerstaff Jr, 1997. Immobilization of enzymes and cells. Methods in Biotechnology, 1: 1—11
- Hatzinikolaou D G, Kourentzi E, Stamatis H *et al*, 1999. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: Production,

- partial characterization and application in the synthesis of esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1): 53—56
- Jiang Yangyang, Chen Guo, Xia Hansong *et al*, 2009. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55(1—4): 103—109
- Krajewska B, 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2—3): 126—139
- Lara P V, Park E Y, 2004. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3—4): 270—277
- Magdalena Rucka, Bożena Turkiewicz, 1990. Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 12(1): 52—55
- Naganagouda K, Mulimani V H, 2006. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. *Process Biochemistry*, 41(8): 1903—1907
- Negishi S, Shirasawa S, Arai Y *et al*, 2003. Activation of powdered lipase by cluster water and the use of lipase powders for commercial esterification of food oils. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1): 66—70
- Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A *et al*, 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3—5): 133—142
- Tanriseven A, Doğan Ş, 2001. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36(11): 1081—1083
- Tanriseven A, Doğan Ş, 2002. A novel method for the immobilization of α -galactosidase. *Process Biochemistry*, 38(1): 27—30
- Won K, Kim S, Kim K *et al*, 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, 40(6): 2149—2154

RESEARCH ON THE IMMOBILIZATION OF LIPASE ADM47601

DUAN Xiao-Chen^{1, 2, 3, 4}, SHENG Jun^{2, 3, 4}, XU Jia-Kun^{2, 3, 4},
HAO Jian-Hua^{2, 3, 4}, YU Jian-Sheng⁵, SUN Mi^{2, 3, 4}

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian, 116023; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; 3. Qingdao Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Qingdao, 266071; 4. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao, 266071; 5. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, 266042)

Abstract We treated marine lipase ADM47601 with sodium alginate, mixture of sodium alginate and gelatin, chitosan, and polyvinyl alcohol to study the immobilization properties of the lipase. The results are: (1) immobilization with sodium alginate, at the optimal conditions of 3% sodium alginate, 1% CaCl₂, 600U/mL lipase addition, the maximum immobilized lipase activity recovery rate was 17.11%; (2) with the mixture of sodium alginate and gelatin, at 1% alginate, 0.5% CaCl₂, 0.25% glutaraldehyde, 600U/mL lipase addition, the maximum recovery rate was 54.45%; (3) with chitosan, at 2% chitosan, 10% NaOH, 1% acetic acid, 0.25% glutaraldehyde, 840U/g lipase addition, the maximum rate could reach 87.06%; and (4) with polyvinyl alcohol, at conditions of 7.5% polyvinyl alcohol, 2% sodium alginate, 1.5% CaCl₂, and 360U/mL lipase addition, the maximum rate was 33.22%. Therefore, among the four materials, chitosan is the best for the highest recovery, followed by sodium-alginate-gelatin mixture, polyvinyl alcohol, and sodium alginate.

Key words alginate; chitosan; polyvinyl alcohol; marine lipase; immobilize