

单分散磁性纳米粒子固定化猪胰脂肪酶的研究*

朱 浩 侯 晨 李彦锋**

(兰州大学 功能有机分子化学国家重点实验室 化学化工学院 生物化工及环境技术研究所 兰州 730000)

摘 要 借助溶热法制备了一种亲水及生物相容良好的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,用 γ -氨丙基三乙氧基硅烷直接对所得磁性粒子表面改性,然后用戊二醛偶联法制得了固定化猪胰脂肪酶.表征研究显示,所得磁性粒子粒径约 200 nm,具有良好的单分散性和磁响应性.考察了戊二醛浓度、给酶量和反应时间对脂肪酶固定化过程的影响,并通过游离酶与固定化酶的比较研究了所得固定化酶的性质.所得固定化猪胰脂肪酶呈现出优异的热稳定性和重复使用性,重复使用 10 次后酶促活力依然保持在 90% 以上.

关键词 Fe_3O_4 , 单分散, 溶热法, 固定化, 脂肪酶

脂肪酶(Lipase, EC 3. 1. 1. 3)在动、植物和微生物中普遍存在,是一类特殊的酰基水解酶,可催化脂水解、脂合成、酯交换、氨解等反应,催化条件温和,副产物少且具有专一性^[1~3],在生物工程^[4]、食品工业^[5]、医药和精细化工^[6]等领域有广泛的应用前景.基于自由酶的稳定性差、难以分离回收、价格昂贵等不足,固定化酶技术得到了长足的发展^[7],脂肪酶固定化研究得到众多学者的关注,也引起了作者的兴趣^[3,8].

自从 1973 年 Robinson 等第一次将磁性材料作为固定化酶的载体以来^[9],磁性材料因其无毒、稳定、耐受性好、易分离等优点,作为固定化酶的载体广受关注^[10~14].目前,用于固定化酶的磁性载体粒径大多低于 30 nm,由于磁性粒子的小尺寸效应和静电引力等作用,容易产生团聚现象,需要通过聚合物等对其进行外层包覆或表面改性.包覆及表面改性虽然可以提升载体的单分散性能、增加载体表面的活性官能团,但同时降低了载体的磁响应性,使得分离效果往往难以达到预期.同时,包覆和表面改性过程又会增加载体制备的成本与时间,对固定化酶的广泛应用造成一定困难.

本文采用溶热法^[15]合成了一种单晶结构、亲水和生物相容良好的磁性纳米微球,所得磁性粒子经 γ -氨丙基三乙氧基硅烷表面改性,应用透射电子显微镜(TEM)、振动样品磁强计(VSM)及元素分析仪等进行了表征研究.然后,借助戊二醛的

偶联作用实现了猪胰脂肪酶的固定化,采用聚乙烯醇乳化橄榄油法(Yamada-Machida 改进法)^[16~18]测定了所得固定化脂肪酶及其自由酶的活力,并采用 Bradford 法^[19]测定了合并滤液与洗液中的蛋白含量,探讨及优化了的脂肪酶的固定化条件,考察了所得固定化酶的热稳定性和重复使用性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乙二醇(PEG6000),戊二醛(50% V/V),天津天泰精细化学品有限公司;氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),醋酸钠(NaAc),国药集团化学试剂有限公司; γ -氨丙基三乙氧基硅烷(APTS),武大有机硅新材料有限公司;猪胰脂肪酶(PPL, Type II, 177.3 U/mg 蛋白),牛血清白蛋白(BSA),Sigma 化学试剂公司;磷酸盐缓冲溶液(由 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 组成缓冲体系),自制;其他试剂均为分析纯试剂.

透射电子显微镜(TEM),Hitachi H-600 型;Element-VarioEL 元素分析仪;振动样品磁强计(VSM),LAKESHORE-7304 型;精密 pH 计,上海精密科学仪器有限公司 PHS-3C 型.

1.2 实验方法

1.2.1 单分散磁性纳米粒子的制备及直接氨基功能化

单分散磁性纳米粒子按文献[15]制备,用

* 庆祝卓仁禧院士 80 华诞专稿;2011-04-14 收稿,2011-05-19 修稿;国家自然科学基金(基金号 21074049)和国家基础科学人才培养基金(基金号 J1010067)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: liyf@lzu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11112

APTS 对制得的磁球直接表面功能化. 1.0 g 磁性纳米粒子置于甲苯中超声分散 30 min, 在氮气保护下滴加 5 mL APTS, 搅拌回流 24 h, 产物磁分离后用乙醇洗涤 3 次, 真空干燥至恒重. 根据元素分析测得载体的氮含量, 计算可得载体氨基含量为 0.83 mmol/g.

1.2.2 固定化酶的制备

制得的 Fe_3O_4 粒子经改性表面富含氨基, 以戊二醛为双功能试剂, 将 PPL 负载到 Fe_3O_4 -APTS 载体上. 具体方法如下: 将适量载体超声分散到一定量的磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH = 7.0) 中, 加入一定量的戊二醛溶液, 室温下搅拌 4 h, 磁分离载体, 蒸馏水多次洗涤; 将产物加入到含一定量脂肪酶的磷酸缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH = 7.0) 中, 室温下搅拌数小时后磁分离, 用一定量的磷酸缓冲溶液洗涤所得的固定化酶. 滤液和洗液合并, 测定酶残留活力及蛋白含量, 所得固定化酶 4℃ 下保存.

1.2.3 脂肪酶活力和蛋白含量的测定

脂肪酶活力采用聚乙烯醇乳化橄榄油法 (Yamada-Machida 改进法)^[16~18] 测定, 合并的滤液和洗液中的蛋白含量采用 Bradford 法^[19] 测定. 酶活用以下公式计算:

$$\text{酶活性 } U(\text{U/g}) = \frac{(B - H) \times 10 \times c_1}{c_2 \times V \times c_3 \times 0.6}$$

式中, B 为滴定空白样的盐酸量 (mL), H 为滴定酶促反应后的盐酸量 (mL), 10 为 10 个单位释放 1 μmol 脂肪酸, c_1 为标准盐酸的浓度 (mol/L), c_2 为酶溶液的浓度 (g/mL), V 为所加酶液的体积 (mL), c_3 为标准 NaOH 溶液的浓度 (mol/L), 0.6 为 0.6 mL 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液相当于 1 μmol 脂肪酸.

活力回收 = (固定化酶的活力/加入酶液的活力) $\times 100\%$

相对活力 = (每组中所测活力值/该组中最高活力值) $\times 100\%$

固定到载体上的酶蛋白量可以用下面的公式计算:

$$\text{酶蛋白结合量}(\text{mg/g}) = [(c_i - c_f)V]/W$$

式中 c_i 和 c_f 分别为反应体系中起始和反应后的酶浓度 (mg/mL), V 为反应液的体积 (mL), W 为载体的质量 (g), 所得的数据均为 3 次测定值的平均值.

1.2.4 固定化酶性质的测定

热稳定性测定是称取一定量的游离酶和固定化酶于 50 mL 磷酸盐缓冲溶液中 (0.1 mol/L, pH = 7.0), 50℃ 水浴下保持 210 min, 每隔 0.5 h 测定酶促活力并计算相对活力.

重复使用性测定是将一定量的固定化酶催化水解橄榄油乳化液后磁分离, 并重复多次催化反应, 计算相对活力.

2 结果与讨论

2.1 磁性纳米粒子的制备与表征

磁性纳米粒子采用溶热法制备. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 在乙二醇溶剂中超声分散, 在表面活性剂聚乙二醇和醋酸钠的稳定作用下, 高压釜内 200℃ 反应 8 h, 制得 Fe_3O_4 磁性纳米粒子. 通过透射电镜 (TEM) 研究了磁性纳米粒子的形貌和粒径, 透射电镜照片见图 1. 从图 1 可以看出, 磁性纳米粒子平均粒径约 200 nm, 具有良好的单分散性. 该方法制备的磁性纳米粒子具备完善的单晶结构, 比磁饱和强度达到 83.7 emug⁻¹, 是一种优质的磁性载体材料.

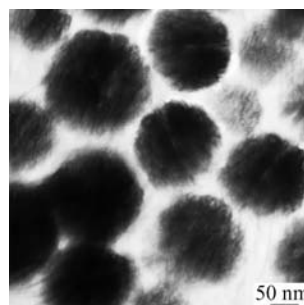


Fig. 1 TEM micrograph of monodisperse magnetic nanoparticles

2.2 固定化酶的制备

影响脂肪酶固定化的因素主要有戊二醛浓度、给酶量、反应时间、反应温度及溶液 pH 值, 其中前 3 个因素对固定化过程的影响较为突出. 本实验选用 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L), 反应温度为 30℃, 加入的载体量为 0.5 g.

2.2.1 戊二醛浓度对酶固定化的影响

戊二醛作为双功能试剂, 可以偶联载体表面的氨基和脂肪酶. 图 2 为不同戊二醛浓度下固定化酶测定的相对酶活. 从图中可以看出, 随着戊二醛浓度的增大, 制得的固定化酶活力逐渐增大, 当戊二醛浓度达到 5.0% (V/V) 或更高时, 酶活达到最大值并基本不再发生变化. 这是因为戊二醛浓

度达到 5.0% (V/V) 以后,载体表面氨基和酶与戊二醛的偶联达到饱和,所以继续增大戊二醛浓度,固定化酶的活力也不会继续增加. 因此最佳戊二醛浓度为 5.0% (V/V).

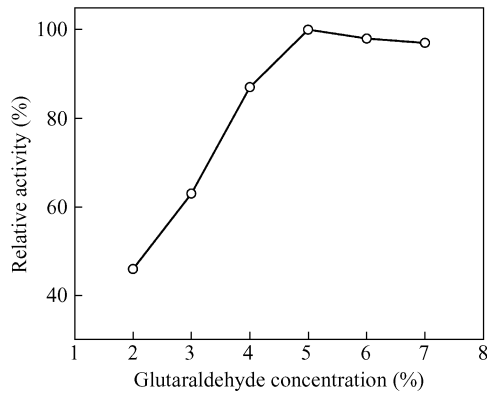


Fig. 2 Effect of glutaraldehyde concentration on the relative activity of immobilized PPL
Incubated in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH = 7.0) at 30℃

2.2.2 给酶量对酶固定化的影响

图 3 为不同给酶量下固定化酶测定的相对酶活. 载体与戊二醛偶联后,表面具有大量的活性醛

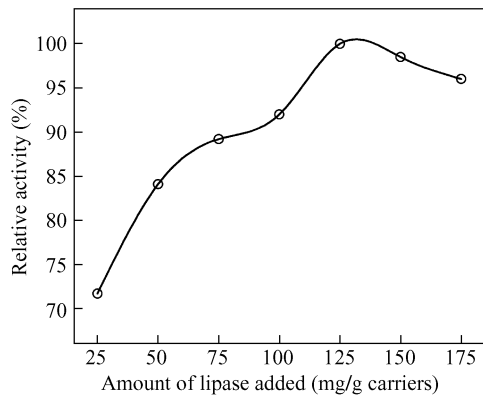


Fig. 3 Effect of amount of lipase added on the relative activity of immobilized PPL
Incubated in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH = 7.0) at 30℃

基,可以共价结合脂肪酶分子. 在载体活性位点未饱和之前,增大给酶量,可以提高载体固定化酶的效率,固定化酶的活力随给酶量增大而增大;当载体活性位点饱和之后,继续增大给酶量对固定化酶效率没有影响,因此酶活也不再继续增加. 从图中可以看出,最佳的给酶量为 125 mg/g 载体.

2.2.3 反应时间对酶固定化的影响

图 4 为不同反应时间下固定化酶测定的相对酶活. 如图所示,随着反应时间的增长,固定化酶的活力逐渐增大,至 6 h 后基本不变,且略有减小. 这是因为延长反应时间有利于酶分子的偶联,6 h 后达到饱和,继续延长反应时间反而会因为过度偶联导致酶失活. 因此最佳固定化酶反应时间为 6 h.

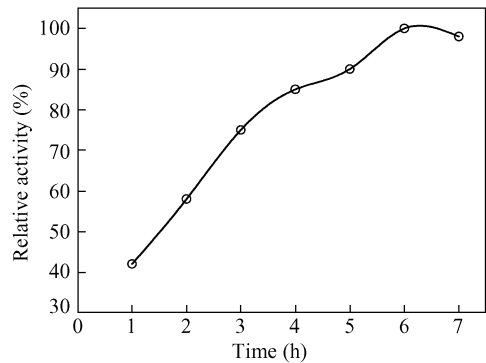


Fig. 4 Effect of reaction time on the relative activity of immobilized PPL
Incubated in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH = 7.0) at 30℃

2.2.4 Fe₃O₄-APTS 载体固定化脂肪酶的制备

根据以上优化的条件,以 Fe₃O₄-APTS 为载体,对猪胰脂肪酶进行固定化,并测定酶蛋白结合量和活力回收,结果见表 1. 实验结果表明,在最优化条件下,Fe₃O₄-APTS 载体固定化酶的酶蛋白含量和活力回收分别可达 120 mg/g 和 54.8%.

Table 1 Optimal immobilization conditions and amount of protein bounded

pH	Temperature	Time	Glutaraldehyde	Lipase amount added	Bound protein	Activity yield
7.0	30℃	6 h	5.0% (V/V)	125 (mg/g)	120 (mg/g)	54.8%

2.3 固定化酶的性质

2.3.1 游离酶和固定化酶的热稳定性

将自由酶和固定化酶置于 50℃ 水浴中,加入底物及缓冲溶液后,每隔 0.5 h 取样并测定其催化酶活,结果见图 5. 从图 5 可以看出,对于自由酶,随着反应时间增长,其相对活力迅速降低,速

度远大于固定化酶,经过约 2.5 h 后,其相对活力趋近于零,几乎完全失活. 固定化酶在反应时间少于 30 min 时,活力几乎没有下降;反应时间在 30 ~ 120 min 之间,相对活力保持在 90% 左右;反应 210 min 后,相对活力仍保持在 80% 以上. 由此可见,固定化酶相对自由酶显示出优异的热稳定性.

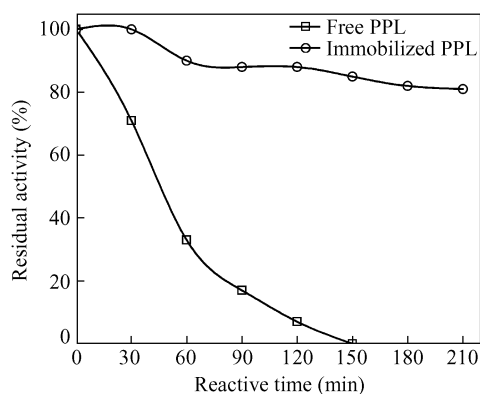


Fig. 5 Thermal stability of free and immobilized PPL. Incubated in 0.1 mol/L phosphate buffer with pH = 7.0 at 50°C for different time

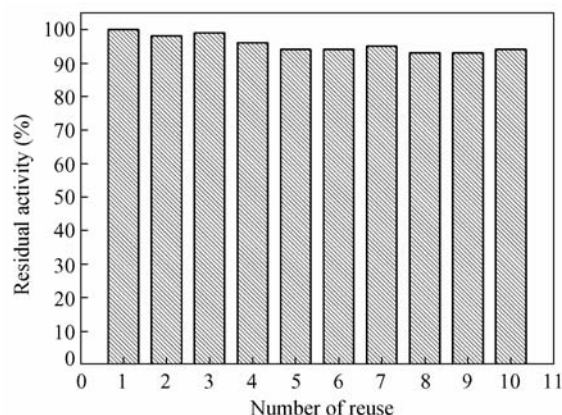


Fig. 6 Reuse of immobilized PPL for hydrolyzing olive oil

2.3.2 固定化酶的重复使用性

大部分酶在固定化以后,其使用和保存时间显著延长,因此重复使用性是固定化酶在应用方面的一项重要指标.图6为 Fe_3O_4 -APTS载体固定化脂肪酶的重复使用性能.从图6中可知,通过催化水解橄榄油来测定固定化酶的相对活力,经过10次循环实验后,制得的固定化酶保留活力仍为其初始活力的90%以上,表现出良好的稳定性和重复使用性能.

3 结论

根据以上实验结果可以看出,采用溶热法制备的磁性纳米粒子具有良好的单分散性和磁响应性,用来固定化猪胰脂肪酶,酶蛋白含量和活力回收分别可达120 mg/g和54.8%.固定化酶的热稳定性出色,循环使用10次酶活仍保持90%以上.本研究提供了一种简单高效,绿色经济的固定化酶方法,有望在酶固定化工程中得到广泛应用.有关该固定化脂肪酶对芳基丙酸类药物的手性拆分仍在进一步研究当中.

REFERENCES

- Luo Guimin (罗贵民). Enzyme Engineering (酶工程). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2003. 1 ~ 14
- Yang Yong (杨勇), Li Yanfeng (李彦锋), Bai Yongxiao (拜永孝), Yi Liuxiang (易柳香), Xia Chungu (夏春谷). Chinese Journal of Chemistry (化学通报), 2007, (4): 257 ~ 263
- Bai Y X, Li Y F, Yang Y, Yi L X. Process Biochem, 2006, 41 (4): 770 ~ 777
- Travascio P, Zito E, Protaccio M, Diano N, Grano V, Di Martino S, Bertolini T, Rossi S, Mita D G. Biotechnol Prog, 2002, 18 (5): 975 ~ 985
- Torres C F, Hill C G Jr. Ind Eng Chem Res, 2004, 43 (14): 3714 ~ 3722
- Sivalingam G, Madras G. Biomacromolecules, 2004, 5 (2): 603 ~ 609
- Chibata I. Immobilized Enzymes. New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley and Sons, 1978. 1 ~ 284
- Bai Y X, Li Y F, Yang Y, Yi L X. J Biotechnology, 2006, 125 (4): 574 ~ 582
- Robinson P J, Dunnill P, Lilly M D. Biotechnol Bioeng, 1973, 15 (3): 603 ~ 606
- Dyal A, Loos K, Noto M, Chang S W, Spagnoli C, Shafi K V P M, Ulman A, Cowman M, Gross R A. J Am Chem Soc, 2003, 125 (7): 1684 ~ 1685
- Liao M H, Chen D H. Biotechnol Lett, 2001, 23 (20): 1723 ~ 1727
- Peniche H, Osorio A, Acosta N, A de la Campa, C Peniche. J Appl Polym Sci, 2005, 98 (2): 651 ~ 657
- Xue Ping (薛屏), Liu Haifeng (刘海峰). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2007, (1): 64 ~ 69
- Lei L, Bai Y X, Li Y F, Yi L X, Yang Y, Xia C G. J Magn Magn Mater, 2009, 321 (1): 252 ~ 258
- Deng H, Li X L, Peng Q, Wang X, Chen J P, Li Y D. Angew Chem Int Ed, 2005, 44 (18): 2782 ~ 2785
- Yamada K, Machida H. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1962, 36: S. 858
- Kyoitsu S. Int Biochem Union, 1963, S: 7 ~ 11
- Watanabe N, Yasude O, Yasuji M, Koichi Y. Agric Biol Chem, 1977, (41): 1353 ~ 1358

19 Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72(1-2): 248 ~ 254

STUDY ON LIPASE IMMOBILIZATION ON MONODISPERSE MAGNETIC NANOPARTICLES

ZHU Hao, HOU Chen, LI Yanfeng

(State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Institute of Biochemical Engineering & Environmental Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract A simple, effective, green and economic approach of lipase immobilization is provided in this article. Single-crystal, hydrophilic, biocompatible Fe_3O_4 magnetic nanoparticles as good carriers were prepared *via* a solvothermal reduction method. Microsphere diameters were observed to be about 200 nm by transmission electron microscopy (TEM). Superior monodispersity was demonstrated, and saturation magnetization was found to be 83.7 emug^{-1} . The resulting products were modified directly with γ -aminopropyltriethoxysilane (APTS). Porcine pancreas lipase (PPL) was covalently immobilized on the obtained particles using glutaraldehyde as a coupling reagent. The enzymatic activities of free and immobilized PPL were measured by titration of fatty acid which came from the hydrolysis of olive oil and the amount of protein was determined by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The factors related with the activity of the immobilized lipase on prior carriers, such as the pH value of the immobilized reaction, the concentration of glutaraldehyde and the amount of enzyme were investigated. The immobilized lipase exhibited excellent thermal stability and reusability in comparison with free enzyme. High activity recovery (54.8%) of the immobilized lipase was achieved and the amount of protein was up to 120 mg/g. This immobilized lipase can be reused 10 times with the enzymatic activity remained above 90%.

Keywords Fe_3O_4 , Monodisperse, Solvothermal reduction, Immobilization, Lipase