文章编号:1673-1689(2008)06-0098-05

新型磁性纳米粒子固定脂肪酶的研究

王燕佳[1]， 蒋惠亮*[1]， 方银军[2]， 任国晓[2]
(1. 江南大学 化学与材料工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 浙江赞宇科技有限公司,浙江 杭州 310009)

摘 要: 用无皂乳液聚合制备了 P(AM-*co*-St)-Gb(Ⅲ)磁性高分子纳米微球,在此基础上通过共价键合固定脂肪酶。结果表明: 固定脂肪酶后的磁性纳米微球具有优异的磁分离能力;钆离子对固定化酶有明显的激活作用,当钆离子质量分数为 1.4%时,偶联率和活力回收率分别提高 88%和 71%;脂肪酶被固定化后其 pH 值稳定性、操作稳定性均比自由酶明显提高。

关键词: 磁性纳米粒子;钆; 固定; 脂肪酶
中图分类号:TS 201.2+5 **文献标识码**: A

Study on the Immobilization of Lipase with Novel Magnetic Nanoparticles

WANG Yan-jia[1], JIANG Hui-liang*[1], FANG Yin-jun[2], REN Guo-xiao[2]
(1. School of Chemistry and Materials Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Zhejiang Zanyu Technology Co., LTD, Hangzhou 310009, China)

Abstract: Based on the P(AM-*co*-St)-Gb(Ⅲ) magnetic nanoparticles by emulsifier free, emulsion, lipase was immobilized on this nanoparticles with covalent linkage. It was found that immobilized lipase magnetic nanoparticles possessed excellent ability of magnetic separation. Gd(III) could activate the immobilized lipase, when the weight ratio of Gd(III) is 1.4%, the coupled yield and activity of the immobilized Lipase was increased by 88 % and 71 %, respectively. As compared with free lipase, the pH and stabilities of immobilized lipase were increased remarkly.

Key words: magnetic nanoparticles; Gb(III); immobilization; lipase

目前用于固定化酶的载体种类很多,磁性物质作为一种绿色材料是近年来研究较多的材料[1-3]。1973 年 Robinson[4] 等首次将磁性物质作为酶固定化的载体,此后,磁性载体越来越多地应用于细胞和酶的固定化[5-6]。然而由于脂肪酶的价格和稳定性等问题的存在,其应用仍然面临许多困难。采用磁性微球固定化脂肪酶,将会大大提高酶的稳定性,且可以稳定地分散在水溶液和有机溶剂中,分散于有机溶剂中的磁性粒子吸附的脂肪酶显示出较高酶活性。当把脂肪酶制成这种结合体时,它可

收稿日期:2007-08-11.
基金项目:浙江省科技攻关项目(021101047).
作者简介: 王燕佳(1983-),女,江苏无锡人,化学与材料工程硕士研究生.
* **通讯联系人**:蒋惠亮(1956-),男,江苏无锡人,副教授,主要从事油脂化工研究. Email:huiliangjiang@yahoo.com

万方数据

在有机溶剂中催化酯的合成，并且利用磁场很简便地把酶从含有胶体物质或不溶物的反应液中回收并重复使用[7]。作者通过无皂乳液聚合方法，首次制得 P(AM-co-St)-Gb(Ⅲ) 磁性纳米微球，在此基础上加入脂肪酶与其作用。由于这种纳米材料既保留了脂肪酶的活性，又继承了镧系元素优异的磁性能，有望拓宽该固定化脂肪酶的应用领域[8]。因此，进行磁性微球固定脂肪酶的研究，无论在理论上还是在实际应用上都具有较为重要的意义。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器

丙烯酰胺：化学纯，中国医药(集团)上海化学试剂公司生产，用氯仿进行两次重结晶纯化；脂肪酶 Lipolase：100 L，诺维信公司惠赠；$GdCl_3$：分析纯，上海跃龙化工有限公司生产，直接使用；无水乙醇：分析纯，上海振兴化工一厂生产，蒸馏提纯后使用；苯乙烯：分析纯，中国医药(集团)上海化学试剂公司生产，减压蒸馏后使用；过硫酸钾：分析纯，国药集团化学试剂有限公司生产，重结晶提纯后使用。扫描电镜：Quanta-200 型荷兰 FEI 公司制造。

1.2　磁性纳米粒子的合成

纳米微球的合成参照文献[9]方法进行，反应产物在 Agilent 1100 series 凝胶色谱仪测得其数均分子量为 3.55×10^4 g/mol，相对分子质量分布为 1.15. 将微球分散液用高速离心机离心沉淀，并用去离子水反复洗涤。将洗涤后的微球分散液置于 −60～−70 ℃的冷冻干燥机中，冷冻干燥 2～3 d，得到絮状固体粉末。按文献[10－11]制得磁性纳米粒子(P(AM-co-St)-Gb(III))。

1.3　脂肪酶在纳米微球表面的共价固定化

称取 1.0 g 磁性纳米微球粉末于 50 mL 的三角烧瓶中，加入含有一定量酶的缓冲液 5 mL，35 ℃条件下振荡(120 r/min) 反应 30 h，离心直到上清液中酶的偶联率大于 95%，抽滤，用 5 ℃的去离子水洗涤，得到固定化酶。

1.4　脂肪酶偶联率和活力的测定

取一定量原酶稀释作标准曲线，考马斯亮蓝法测定蛋白质的含量。

偶联率[12]＝((加入的酶蛋白量－上清液中游离酶蛋白量)/加入的酶蛋白量)×100%。

按文献[13]所述的方法操作。酶活定义：在反应条件下，每分钟水解产生 1 μmol 脂肪酸的酶量定义为一个脂肪酶国际单位。活力回收＝(固定化酶的总活力/加入酶的总活力)×100%。

2　结果与讨论

2.1　扫描电镜分析

通过扫描电镜(SEM)观察纳米颗粒固定脂肪酶前后的形态和大小。

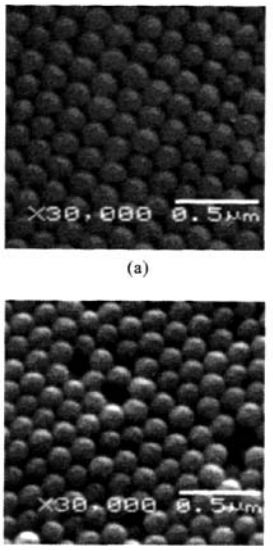


图 1　磁性纳米粒子(a)和固定脂肪酶磁性纳米粒子(b)扫描电镜图

Fig. 1　The SEM micrograph of magnetic nanoparticles and immobilized lipase nanoparticles

图 1 为磁性纳米粒子固定脂肪酶前后的 SEM 照片。从图 1 可以看出，无皂乳液聚合法制备的颗粒粒径分布较均匀，粒径为 100 nm 左右。固定脂肪酶后，颗粒的形貌没有大的改变，平均粒径变化也不明显。这表明脂肪酶的固定过程没有使颗粒发生明显的粒径和形貌的改变。这是因为酶的固定化只发生在颗粒表面[2]。

2.2　纳米粒子磁性分析

为考察纳米磁性粒子的磁分离性能，实验测定了质量分数为 1.4%时的固定化酶磁性粒子在深 10 cm 的缓冲液和正己烷中的沉降时间，结果列于表 1。可以看出，无论是在缓冲液还是在正己烷中，纳米磁性粒子在磁场下的沉降速度都远高于重力场下的沉降速度。在缓冲液中，磁沉降速度是重力沉降的 10 倍；在正己烷中，磁沉降速度是重力沉降的 40 倍。此外，由于苯乙烯参与共聚使得纳米粒子具有一定的疏水性，在有机溶剂中的分散性较好，故在有机溶剂中的沉降速度比在水溶液中低。因此，利用磁性纳米粒子固定后的脂肪酶，在有机溶剂中

万方数据

同时具有良好的分散性和方便回收的优点。

表1 固定化酶纳米粒子重力沉降和磁沉降的比较(25 ℃)

Tab. 1 Comparison of sedimentary time of the magnetic nanoparticles in gravitational and magnetic field (25 ℃)

溶剂/mL	时间/min	
	重力场沉降时间	磁场中沉降时间(0.5T)
缓冲液	15	1.5
正己烷	200	5

2.3 纳米微球粒径对固定化酶的偶联率和活力回收的影响

高分子微球直径对固定化酶的偶联率和活力回收的影响见图2。

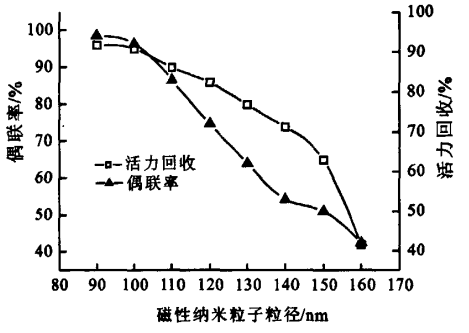


图2 磁性纳米微球粒径对固定化脂肪酶偶联率和活力回收的影响

Fig. 2 Effect of diameter on the coupled yield and activity of the immobilized lipase

从图2可以看出,随着微球直径的增加,固定化酶的偶联率逐渐减小,活力回收也逐渐减小。这可能是由于随着微球尺寸的增大,其比表面积减小,单位质量的微球给脂肪酶提供的负载场所减少,酶的附着机会减小,以致于酶的偶联率减小;同时,固定化酶催化底物的过程中,酶与底物的接触机会也大大减小,最终导致固定化酶的活力回收大为降低。

2.4 钆的质量分数对固定化酶的偶联率和活力回收的影响

钆的质量分数对固定化酶的偶联率和活力回收的影响见图3。

从图3可以看出,钆离子对固定化酶偶联率和活力回收提高有着明显的促进作用。随着纳米微球表面钆质量分数的增加,固定化酶的偶联率和活力回收皆出现了先增大后减小的变化趋势,在钆质量分数为1.4%时,偶联率最大达到了95.5%。这可能是因为钆与脂肪酶分子表面氨基具有配位的作用,以及纳米微球特异的小尺寸效应,导致了钆离子对酶分子的强烈定向吸附效应[14]。当钆离子质量分数较低时随着钆质量分数的增加,微球表面钆离子的数目增多,吸附效应更加明显,脂肪酶与微球接触并共价连接的机会增加,以致于酶的偶联率增加;当钆离子质量分数达到一定水平后,随着微球表面钆离子数目的继续增多,微球表面可供脂肪酶附着并连接的面积减少,最终导致固定化酶的偶联率下降。类似地固定化酶的活力回收在钆质量分数为1.4%时,最大值为74%,这可能也是由于过多的钆离子阻挡了底物与脂肪酶接触的机会,以致于活力回收先增大后减小。从图3还可以看出,钆离子能大大提高固定化酶的偶联率和活力回收。当脂肪酶直接连接在高分子微球表面时,固定化酶的偶联率和活力回收仅为51%和42%,而当微球表面钆纳米粒子质量分数为1.4%时,固定化酶的偶联率和活力回收为96%和74%,分别比原来提高了88%和71%,可见钆离子对固定化酶有明显的激活作用[7]。这可能是因为钆离子与脂肪酶分子结合后,改变了酶的构象并最终形成了稳定的活性构象。

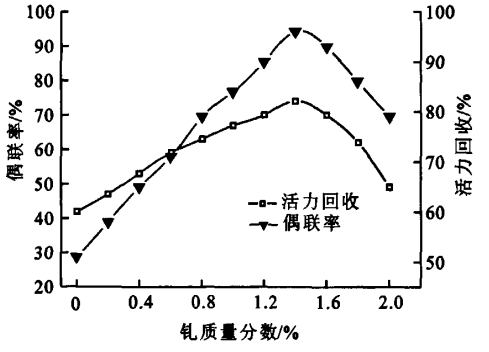


图3 钆的质量分数对固定化酶的偶联率和活力回收的影响

Fig. 3 Effect of of Gd(III) on the coupled yield and activity of the immobilized lipase

2.5 给酶量对固定化酶偶联率和活力回收的影响

给酶量对固定化酶偶联率和活力回收的影响见图4。

从图4中可以看出,当给酶量为80 mg/g时,酶的偶联率仍高达59%,这可能是由于纳米微球的小尺寸效应及钆与脂肪酶中氨基的络合作用,增加了酶与微球的联接机会,从而增大了单位微球表面的载酶量。但是随着微球表面酶分子数量的增多,脂肪酶分子之间的距离减小,从而导致相互作用力

万方数据

增大,以致于影响酶的构象,导致酶的活力下降;同时偶联率下降也是导致固定化酶活力回收下降的原因之一[2]。

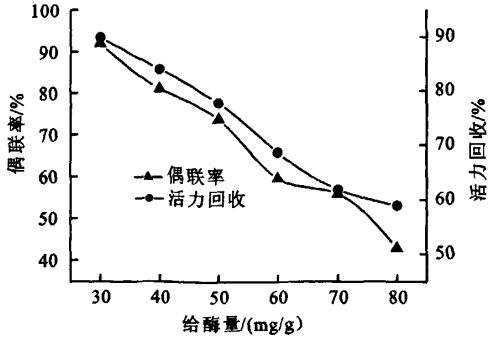
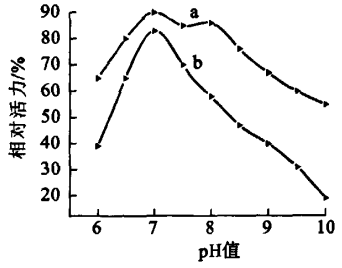


图 4　给酶量对固定化酶偶联率和活力回收的影响

Fig. 4　Effect of the load of enzyme on the coupled yield and activity of the immobilized lipase

2.6　pH 值对酶活性的影响

在 pH 值 6.0～10.0 的条件下比较了固定化酶与游离酶的相对活性,结果见图 5。



a:固定化酶; b:自由酶

图 5　pH 值对固定化酶、自由酶活性的影响

Fig. 5　Effect of pH on the activity of immobilized lipase and free lipase

固定化酶在 pH 值 6～10 范围内均保持较高的活性,与之相比自由酶在这个范围内,其活性均较低。这说明脂肪酶被固定化后,其耐酸耐碱性明显增强。这可能与固定化能使酶的构象更加稳定有关[2]。

2.7　固定化酶的操作稳定性

用磁性固定化脂肪酶连续催化底物 5 次,每次回收在 0.5 T 磁场下进行。其活力保持情况见图 6。

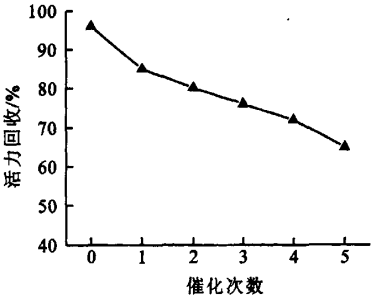


图 6　固定化酶的操作稳定性

Fig. 6　The operation stabilities of immobilized lipase

图 6 表明,固定化脂肪酶连续催化底物 5 次后,其酶活力仍保持 65%,这说明固定化脂肪酶具有较高的操作稳定性。但由于微球粒径较小,受磁场力较弱,反应液粘度较大,回收过程中会损失一部分,所以连续催化过程中,其活力降低较快。如果增加磁场力,延长回收时间,其活力回收情况将更为理想。

3　结　语

通过无皂乳液聚合法制备了磁性高分子纳米微球,并将脂肪酶共价连接在微球表面。初步研究了微球直径、钆的质量分数等因素对固定化酶活力的影响。结果显示随着微球直径减小,固定化酶的偶联率和活力回收逐渐增加。固定脂肪酶后的磁性纳米微球具有优异的磁分离能力。钆离子对固定化酶有明显的激活作用,当钆离子质量分数为 1.4%时,偶联率和活力回收分别提高 88 %和 71 %。脂肪酶被固定化后其 pH 值稳定性、操作稳定性均比自由酶明显提高。固定化后的脂肪酶回收便捷,在有机介质中的分散性好,其在有机介质中的应用有待进一步研究。

参考文献(References):

[1] Huanga S H, Liao M H, and Chen D H. Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention[J]. **Sep Purif Technol**,2006, 51(2):113－117.

[2] Liu X Q, Guan Y P, Shen R, et al. Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads[J]. **J Chromatogr B**, 2005, 822:91－97.

[3] Guo Z, Bai S, Sun Y, Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres[J]. **Enzyme Microb Tech**, 2003, 32:776－782.

[4] Robinson P J, Dunnill P, Lilly M D. Properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors[J]. **Bio-**

万方数据

technol Bioeng, 1973, 15: 603－607.

[5] Arica M Y, Yavuz H, Patir S, et al. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(Methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor[J]. **J Mol Catal B: Enzyme**, 2000(11): 127－138.

[6] Liu C, Honda H, Ohshima A, et al. Development of chitosan magnetite aggregates containing nitrosomonas europaea cells for nitrification enhancement[J]. **J Biosci Bioeng**, 2000, 89: 420－425.

[7] 钱斯日古楞,王红英.磁性淀粉微球固定化脂肪酶的研究[J].食品科学, 2004, 25: 47－50.
QIAN Siriguleng, WANG Hong-ying. Investigation of immobilized lipase onto magnetic starchy microspheres[J]. **Food Science**, 2004, 25: 47-50. (in Chinese)

[8] Yin W Q, Jiang L, Wang Y J, et al. Tb(III)-modified properties of thermosensitive core-shell microspheres[J]. **J Polym Sci Pol Phys**, 2006, 44: 3121－312.

[9] 殷伟庆,陈明清,陆天虹,等. Tb(Ⅲ)与PNIPAM接枝核壳纳米微球相互作用的研究[J].化学学报. 2006,64:2127－2131.
YIN Wei-Qing, CHEN Ming-Qing, LU Tian-Hong, et al. Study on the interaction between Tb(Ⅲ) and PNIPAM grafted core-shell nanoparticles[J]. **Acta Chimica Sinica**, 2006,64:2127－2131. (in Chinese)

[10] Yin W Q, Chen M Q, Lu T H. Properties of complex of Tb(III) and poly(N-isopropylacrylamide)-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-styrene) core-shell nanoparticles [J]. **J Alloy Compd**, 2007, 432:18－21.

[11] Wang Y J, Jiang H L. Eu(III) modifies the properties of poly(N-isopropylacrylamide)[J]. **Materials Lett**, 2007,61,2779－2782.

[12] 虞英,蒋惠亮. 离子交换树脂吸附法固定化脂肪酶的研究[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(4):97－100.
YU Ying, JIANG Hui-liang. Study of lipase immobilization on the exchange resin by adsorption[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007,26(4):97－100. (in Chinese)

[13] 李建武,余瑞元.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:311－312.

[14] 徐鑫煤, 陈英文, 沈树宝.壳聚糖固定化酶和细胞研究新进展[J].化工科技, 2006, 14: 54－57.
XU Xin-mei, CHEN Yin-wen, SHEN Shu-bao. Application of chitosan materials for enzyme and cell immobilization[J]. **Science & Technology in Chemical Industry**, 2006, 14: 54－57. (in Chinese)

(责任编辑:杨 萌)

“2008食品与生物技术博士生学术论坛”在江南大学举行

“2008食品与生物技术博士生学术论坛”于2008年10月24－26号在江南大学举行。本次论坛由国务院学位委员会办公室、教育部学位管理与研究生教育司主办,江南大学承办。在为期三天的活动中,近600名来自两岸四地和美国、英国、加拿大、荷兰等国40余所高校的食品、生物专业的博士生以及国内外著名专家就食品与生物技术领域内的前沿学术问题进行广泛的交流和深入的探讨。

食品与生物技术博士生学术论坛是全国博士生论坛的重要组成部分。此次论坛以“食品与生物技术领域内的新趋势、新起点、新发现、新超越”为主题,下设六个分论坛,涉及“食品化学与生物化学”、“食品营养与安全”、“食品加工新技术”、“食品生物技术”、“工业微生物和发酵技术”、“功能因子微生物创造技术”等方面,旨在为国内外食品及生物技术领域的研究生提供高起点、大范围、深层次、多领域、最前沿的学术交流平台,营造浓厚的创新研究学术氛围,丰富广大博士生的知识,促进优秀知识成果的交流,拓宽博士生的学术视野,活跃博士生的学术热情,启发博士生的科学思维。

此次学术论坛活动中,我刊编辑部向所有与会代表赠送了《食品与生物技术学报》样刊,同时与部分与会代表就如何进一步提高《食品与生物技术学报》的学术影响进行了广泛地交流。

万方数据