

基于聚乙烯醇微球为载体固定化脂肪酶的研究

张晓慧¹ 蔡青青¹ 贾 佳² 尹 佳¹ 巩伯梁² 阮长顺¹ 潘浩波¹ 王剑英^{2*}

(1.中国科学院深圳先进技术研究院,深圳 518055;2.深圳市绿微康生物工程有限公司,深圳 518057)

摘 要 以具有广泛工业应用性和生物相容性的聚乙烯醇(PVA)为原料,利用 PVA 分子结构特点对其进行改性,进一步采用高速搅拌制备聚乙烯醇微球,采用扫描电镜表征其形貌。采用 1,1'-羰基二(1,2,3-三氮唑)将聚乙烯醇微球活化,以活化后的聚乙烯醇微球为载体固定化脂肪酶,并采用聚乙烯醇物理吸附脂肪酶为实验对照组。结果表明:聚乙烯醇微球粒径分布在 2~3 μm 之间,微球表面形态较为光滑。聚乙烯醇微球固定化脂肪酶可重复使用,重复 10 次酶催化水解反应,相对酶活仍维持在 70% 以上。固定化脂肪酶的最优催化水解反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,与游离酶相比降低了 10 $^{\circ}\text{C}$,最佳催化水解反应 pH 为 8,与游离酶最佳催化 pH 相比,催化反应条件更温和。

关键词 聚乙烯醇微球,脂肪酶固定化,酶活性

Preparation and characterization of immobilized lipase on PVA microsphere

Zhang Xiaohui¹ Cai Qingqing¹ Jia Jia² Yin Jia¹ Gong Boliang² Ruan Changshun¹
Pan Haobo¹ Wang Jianying²

(1.Shenzhen Institutes of Advanced Technology,Chinese Academy of Sciences,
Shenzhen 518055;2.Shenzhen Leveking Bio-technology Co.,Ltd.,Shenzhen 518057)

Abstract Polyvinyl alcohol(PVA) with good biocompatibility is widely used in industry.PVA was used as raw material to make PVA microsphere.PVA microsphere functionalized with ester imidazole groups was prepared with treatment by carbonyl diazole(CDI).SEM pictures showed that the surface of PVA microsphere was smooth,and had particle size of 2~3 μm .The lipase 03 (Leveking) immobilized on the activated PVA microsphere exhibited excellent stability and reusability.The enzymatic hydrolysis reaction was repeated for 10 times,and the relative enzyme activity remained above 70%.The optimal temperature of hydrolysis reaction catalyzed by immobilized lipase was 30 $^{\circ}\text{C}$, compared with the free enzyme decreased 10 $^{\circ}\text{C}$.The optimal pH changed from pH 9 of free enzyme to pH 8 of immobilized lipase.The results indicated that PVA microsphere immobilized lipase with more wild reaction conditions could be widely used in insudtry for the lower energy cost.

Key words poly (vinyl alcohol) microsphere,lipase immobilization,enzyme activity

脂肪酶是一类特殊的酰基水解酶,其在油-水界面上催化酯水解或醇解,生成脂肪酸、甘油等产物;在有机相中催化进行酶促合成或酯交换等反应^[1-4]。脂肪酶催化反应具有高度专一性、高活性、反应条件温和、环境友好等优点,具有良好的工业应用前景。但在实际工业生产中,游离脂肪酶存在着酶活性不稳定、难分离回收、重复利用性差和生产成本高的问题。而固定化脂肪酶能较好解决这些问题,并能进一步提高酶的活性和稳定性。

目前,酶的固定化方法主要有物理吸附法、共价

结合法、离子结合法、交联法和包埋法等。其中,物理吸附法应用较为广泛。物理吸附法是载体与酶之间通过物理吸附集合的一种固定化方法,包括无机材料如多孔玻璃、活性炭、硅藻土等,有机材料如大孔树脂、生物陶瓷等。但物理吸附法酶与载体作用力较弱,易造成酶与载体脱落。共价结合法是指酶蛋白分子的功能基团与载体表面基团之间以共价键结合形成固定化酶。其酶与载体结合牢固,具有良好的操作稳定性^[5]。其用于固定化的载体材料通常具有氨基、羧基、羟基或醛基等功能性基团。但以共

基金项目:广东省海洋经济创新发展区域示范专项项目(SZHY2013-B01-01)

作者简介:张晓慧(1989-),女,硕士研究生,研究助理,主要研究方向为海洋生物医用材料。

联系人:王剑英(1963-),男,高级工程师。

价结合法制备的固定化酶,通常由于反应条件激烈,易引起酶蛋白高级结构改变导致酶活降低。因此,寻求更高酶活、低成本及可重复操作性佳的固定化脂肪酶受到了越来越多的关注^[6-8]。

聚乙烯醇(PVA)是一种工业应用广泛的性能优异的高分子材料,具有良好的生物相容性和稳定性。采用简单温和的制备工艺制成粒径在 $2\sim 3\mu\text{m}$ 可控的PVA微球,然后以1,1'-羰基二(1,2,3-三氮唑)(又称N'-N-羰基二咪唑,简称CDI)为活化剂进行活化。PVA微球的羟基和CDI发生反应形成酯基咪唑结构,得到活化后的PVA微球,然后将活化后的PVA微球和酶进行反应,酶蛋白由于赖氨酸残基上含伯氨基,作为亲核试剂进攻活化后的载体,形成 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$ 的结合方式,使PVA微球和酶通过酰胺键进行共价结合,制备基于PVA微球固定化脂肪酶,简称为PVA-LI-II。以PVA微球纯物理吸附脂肪酶构建一组固定化酶作为对照组,简称为PVA-LI-I。

本研究选用一种新型的聚乙烯醇(PVA)微球为载体,在较温和的反应条件下进行脂肪酶的固定化研究,制备出一种高酶活、高稳定且成本较低廉的固定化脂肪酶。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

脂肪酶(Lipase, 35KDa),深圳市绿微康生物工程有限公司,于 4°C 保存;聚乙烯醇(PVA,重均分子量 $M_w=31000\sim 50000$,水解率 $87\%\sim 89\%$)、高碘酸钠(NaIO_4 , $\geq 99.8\%$)、1,1'-羰基二(1,2,3-三氮唑)(CDI, $\geq 90\%$),Sigma Aldrich公司;盐酸羟胺、乙二醇、NaOH、三丁酸甘油酯等均为分析纯;橄榄油(化学纯)。

高性能分散机(Digital ULTRA-TURRAX T25型),德国IKA公司;扫描电镜(SEM, Nova Nano SEM450型),美国FEI公司;全波长酶标仪(Multiskan GO型),美国赛默飞公司;冷冻干燥机(FD-1D-80型),北京博医康实验仪器有限公司;精密天平(BSA224S-CW型),赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S型),巩义市予华仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PVA微球的制备

PVA微球采用乳化交联法^[9-11]进行制备,具体操作条件为:将1g PVA加入至50mL蒸馏水中,

80°C 加热搅拌1h,加入 NaIO_4 , 80°C 避光氧化1h,冷却至室温,调节 $\text{pH}=2.5$,置于高性能分散机中高速搅拌3h,将调节 $\text{pH}=7.0$,置于分液漏斗中静置24h,蒸馏水洗涤3次,制得PVA微球,备用。

1.2.2 PVA微球的活化

取25mL上述PVA微球溶液,在室温搅拌下逐滴加入10mL含20mg CDI^[12-13]的丙酮溶液,继续搅拌反应12h,过滤、丙酮充分洗涤,其后置于 $\text{pH}=7$ 25mL 50mmol/L磷酸盐(PBS)缓冲液中, 4°C 下储存,备用。

1.2.3 PVA微球固定化脂肪酶

将5mL 10mg/mL脂肪酶溶液逐滴加入至25mL上述活化后的PVA微球溶液中^[14], 4°C 下搅拌24h后,分别用0.5mol/L NaCl溶液洗涤3次,0.5mol/L醋酸溶液洗涤3次,冷冻干燥,得到以PVA微球为载体的固定化脂肪酶(PVA-LI-II)。同时采用未经活化处理的PVA物理吸附脂肪酶为实验对照组(PVA-LI-I)。

1.3 表征与分析

分别称取2mL PVA-LI-I和PVA-LI-II,摇匀,用移液枪取 $50\mu\text{L}$,加入 $1950\mu\text{L}$ 蒸馏水,充分混合后取 $5\mu\text{L}$ 滴加至硅片上,静置12h后,制得的样品用于SEM表征。

1.4 PVA-LI-II的重复操作稳定性

根据橄榄油乳化法测定固定化脂肪酶的稳定性^[15],将5%(wt,质量分数,下同)橄榄油与2% PVA加入去离子水中,在均质机中以25000r/min的转速乳化5min。取10mg的上述游离酶或PVA-LI-I、PVA-LI-II加入到4mL橄榄油-PVA乳化液中,于 40°C 下进行催化水解反应15min(准确计时),反应结束后立即加入5mL乙醇中止反应。每次酶催化反应后用0.1mol/L NaOH滴定反应液,按式(1)计算酶的活性 $[\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})]$ 。

$$\text{酶活} = [(V_1 - V_2) \times 10^{-3} \times C] \times 10^6 / W \times t \quad (1)$$

式中, V_1 为酶催化反应后滴定的NaOH体积,mL; V_2 为无酶催化反应后的空白样消耗的NaOH体积,mL; C 为NaOH溶液的浓度,mol/L; W 为酶的质量,g; t 为反应时间,min。

酶活测定完毕后,将溶液转移到100mL注射器中,用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜将PVA-LI-II与反应液分离后,PBS缓冲液洗涤3次,回收固定化脂肪酶。以第一次测定的酶活性为100%,重复上述酶催化水解反应活性测定,直至10次,将每一次测定的催化酶活性记录,整理。

1.5 PVA-LI-Ⅱ在不同温度和 pH 条件下的酶活性测试

1.5.1 最佳催化水解反应温度测定

分别取等量的游离酶、PVA-LI-I 或 PVA-LI-Ⅱ用 pH=7 PBS 缓冲液配制酶液,于 20~80℃的恒温水浴摇床反应 15min。反应结束后按照 1.4 方法测定酶活。

1.5.2 最佳催化水解反应 pH 测定

分别取等量的游离酶、PVA-LI-I 或 PVA-LI-Ⅱ用 pH=4~10 PBS 冲液配制酶液,于 40℃恒温水浴摇床反应 15min。反应结束后按照 1.4 方法测定酶活。

2 结果与讨论

2.1 SEM 分析

取相同浓度的 PVA-LI-I 和 PVA-LI-Ⅱ固定化脂肪酶样品进行喷金,采用 SEM 对 PVA-LI-I 和 PVA-LI-Ⅱ的形貌进行观察,结果见图 1。

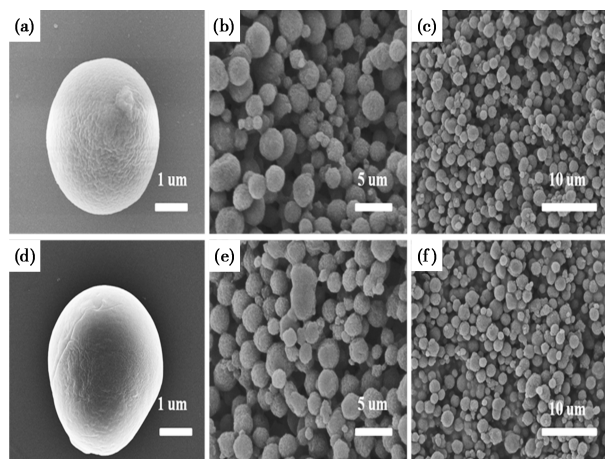


图1 不同放大倍数下 PVA-LI-I (a—c)及 PVA-LI-Ⅱ(d—f)的 SEM 图

由图可知,PVA-LI-I 及 PVA-LI-Ⅱ的粒径在 2~3μm 之间,粒径分布较均一,表面较为光滑。对比发现,PVA-LI-I 和 PVA-LI-Ⅱ的表面形貌及粒径尺寸并未改变,说明所采用的固定化反应条件温和,载体的形貌在活化及固定化中未发生变化。

2.2 可重复利用性分析

PVA-LI-I、PVA-LI-Ⅱ的可重复操作性测试结果见图 2。由图可知,随着反应次数的增加,酶活逐次降低。重复测试 10 次后,相对酶催化活性仍保持在 70% 以上,说明经过固定化后,PVA-LI-Ⅱ的稳定性较好。而 PVA-LI-I 重复使用至第 6 次,酶活逐步消失。

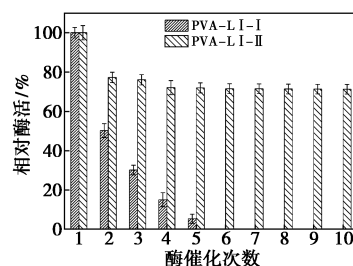


图2 PVA-LI-I 和 PVA-LI-Ⅱ的可重复操作性测试结果

2.3 催化水解反应温度和 pH 对试样酶活性的影响

催化水解反应温度和 pH 对试样酶活性的影响见图 3。由图 3(a)可知,游离酶和 PVA-LI-I 的最佳催化水解反应温度为 40℃。PVA-LI-Ⅱ的最佳催化水解反应温度为 30℃,降低了 10℃。固定化酶降低了酶蛋白对温度的敏感程度,在工业应用上可极大减少能源消耗。

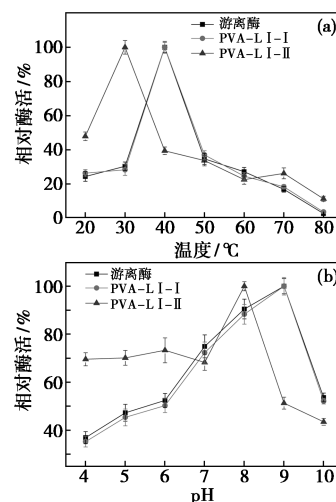


图3 催化水解反应温度(a)和 pH(b)对试样酶活性的影响

由图 3(b)可知,游离脂肪酶和 PVA-LI-I 具有类似的 pH 耐受性,其较优 pH 均为 9.0,说明此绿微康公司的脂肪酶为碱性脂肪酶。PVA-LI-Ⅱ的较优 pH=8.0,更适合应用于碱性较低的反应环境。PVA-LI-Ⅱ的较优 pH 条件迁移可能是因为固定化过程中酶的构象发生变化。同时也间接说明此固定化的过程并不是简单的物理吸附,而是共价结合。pH 会影响底物分子的解离状态,同时对酶的活性中心有关的解离产生影响。过低或过高的 pH 均会导致蛋白质空间结构发生变化而失活,导致脂肪酶活性下降。

3 结语

经活化后,PVA 微球能作为一种脂肪酶固定化

的新型载体,其主要以共价连接的方式固定酶。通过控制制备条件,得到粒径为 $2\sim 3\mu\text{m}$ 的均一微球。经超低温真空干燥后,制备用于固定化的 PVA 纳米微球。PVA 纳米微球以酰胺键与酶发生共价结合达到固定化的目的。与游离酶相比,PVA 微球固定化酶呈现出较好的可重复利用性,经 10 次重复的酶催化水解反应,其酶活依然维持在 70% 以上。通过研究固定化酶在不同温度和 pH 的酶活,发现此固定化酶较优酶催化条件更温和。与游离酶相比,此固定化酶的最佳催化温度降低了 10°C ,为 30°C ;最佳催化 pH 降低为 8,更加适宜于反应条件温和的酶催化反应。应用在实际工业生产中,固定化脂肪酶相对游离酶具有更佳的可重复利用性和更温和的操作条件,能显著降低脂肪酶催化反应的能源消耗和生产成本。因此,PVA 固定化脂肪酶 PVA-LI-II 可作为一种新型的低成本、高效率、低能耗的固定化酶。

参考文献

- [1] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology[review][J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13: 8.
- [2] Cardenas J A E, De Castro Alvarrez M S. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2001, 14: 111-123.
- [3] Osada K T K, Hatano M. Polyunsaturated fatty acid glyceride syntheses by microbial lipase[J]. J Am Oil Chem Soc, 1990, 67: 921-922.
- [4] Undurraga D M A, Eraso S. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil mid fraction[J]. Process Biochem, 2001, 26: 933-939.
- [5] Zaborsky O. Immobilised enzymes [M]. Cleveland: CRC Press, 1973.
- [6] Tan T, Lu J, Nie K, et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28 (5): 628-634.
- [7] Lu J, Deng L, Wang F, et al. Stability of immobilized candida sp. 99-125 lipase for biodiesel production[J]. Chem Eng Technol, 2012, 35(12): 2120-2124.
- [8] Idris A, Bukhari A. Immobilized candida antarctica lipase b: hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 550-563.
- [9] Orive G, Tam S K, Pedraz J L, et al. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy[J]. Biomaterials, 2006, 27(20): 3691-3700.
- [10] Kaity S, Isaac J, Ghosh A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly(vinyl alcohol) for controlled release drug delivery[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94(1): 456-467.
- [11] Kaity S, Ghosh A. Facile preparation of acrylamide grafted locust bean gum-poly(vinyl alcohol) interpenetrating polymer network microspheres for controlled oral drug delivery[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2016, 33: 1-12.
- [12] Jeon Y S, Rhim J W. Performance study on membrane capacitive deionization (MCDI) processes using the composite carbon electrodes coated by cation and anion exchange polymers based on PVA[J]. Polymer-Korea, 2017, 41(2): 351-360.
- [13] Gao L, Kong T F, Huo Y P. Dual thermoresponsive and pH-responsive poly(vinyl alcohol) derivatives: synthesis, phase transition study, and functional applications[J]. Macromolecules, 2016, 49(19): 7478-7489.
- [14] Sun X X, Xin Y R, Wang X H, et al. Functionalized acetoacetylated poly(vinyl alcohol) monoliths for enzyme immobilization: a phase separation method[J]. Colloid and Polymer Science, 2017, 295(10): 1827-1881.
- [15] Abramić M, Lešćić I, Korica T, et al. Purification and properties of extracellular lipase from streptomyces rimosus[J]. Enzym Microb Tech, 1999, 25(6): 522-529.
- 收稿日期: 2017-10-09
- =====
- (上接第 214 页)
- [12] Naghdi S, Jaleh B, Shahbazi N. Reversible wettability conversion of electrodeposited graphene oxide/titania nanocomposite coating: investigation of surface structures[J]. Applied Surface Science, 2016, 368: 409-416.
- [13] Bai N N, Li Q, Dong H Z, et al. A versatile approach for preparing self-recovering superhydrophobic coatings[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 293: 75-81.
- [14] Yadav K, Mehta B R, Lakshmi K V, et al. Tuning the wettability of indium oxide nanowires from superhydrophobic to nearly superhydrophilic: effect of oxygen-related defects[J]. Journal of Physical Chemistry C, 2015, 119: 16026-16032.
- [15] Yin Y J, Huang R H, Zhang W, et al. Superhydrophobic-superhydrophilic switchable wettability via TiO_2 photoinduction electrochemical deposition on cellulose substrate[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 289: 99-105.
- [16] Raimondo M, Blosi M, Caldarelli A, et al. Wetting behavior and remarkable durability of amphiphobic aluminum alloys surfaces in a wide range of environmental conditions[J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 258: 101-109.
- [17] Duan Z F, Zhao Z, Luo D, et al. A facial approach combining photosensitive sol-gel with self-assembly method to fabricate superhydrophobic TiO_2 films with patterned surface structure[J]. Applied Surface Science, 2016, 360: 1030-1035.
- 收稿日期: 2017-10-17
修稿日期: 2018-01-17