

亲水梳状环氧聚合物载体柔性固定化脂肪酶

曲伟光, 魏荣卿, 何冰芳, 刘晓宁*, 仲 玉, 陈新营

南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 210009

摘要: 以氯乙酰化聚苯乙烯微球载体为大分子引发剂, 以甲基丙烯酸缩水甘油酯和亲水性丙烯酰胺为共聚接枝单体, 以氯化亚铜及 2,2'-联吡啶为催化体系, 采用原子转移自由基聚合法接枝合成了具有柔性链的亲水梳状环氧聚合物载体 PS-acyl-P(AM-co-GMA), 并将其用于耐有机溶剂 YCJ01 脂肪酶的共价柔性固定化。结果表明, 固定化酶催化对硝基苯酚棕榈酸酯水解的最适温度为 45~55 °C, pH = 8.5, 此时酶活为 16.6 U/g; 在 80 °C 以下, pH = 5~10 时, 酶的活性稳定; 连续进行 7 次间歇操作, 固定化酶保留初始活性的 73.5%; 于 4 °C 保存 60 d, 酶活仍剩余 86.8%。经亲水梳状环氧载体柔性固定化后, 该脂肪酶对有机溶剂的耐受性有所提高。

关键词: 氯乙酰化聚苯乙烯; 原子转移自由基聚合; 梳状环氧聚合物; 耐有机溶剂脂肪酶; 柔性固定化

中图分类号: O643

文献标识码: A

收稿日期: 2011-07-17. 接受日期: 2011-09-07.

*通讯联系人. 电话: (025)58139911; 电子信箱: xiaoningliu@163.com

基金来源: 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2007AA02Z200 和 2007AA06A402).

Flexible Immobilization of Lipase on Hydrophilic and Comblike Polymer Support Containing Epoxy Group

QU Weiguang, WEI Rongqing, HE Bingfang, LIU Xiaoning*, ZHONG Yu, CHEN Xinying

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: A hydrophilic and comblike polymer support PS-acyl-P(acrylamide-co-glycidyl methacrylate) containing epoxy groups for flexible and covalent immobilization of lipase has been prepared by an atom transfer radical polymerization method. The grafting reaction of glycidyl methacrylate and hydrophilic acrylamide was initiated from the chloroacetyl groups on the styrene-divinylbenzene copolymer microspheres with CuCl and 2,2'-bipyridine complex as a catalyst. The apparent activity of lipase immobilized on PS-acyl-P(acrylamide-co-glycidyl methacrylate) was 16.6 U/g, and the optimal temperature and pH were 45–55 °C and 8.5 for hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate, respectively. The immobilized lipase was stable in the range of pH = 5–10 and at temperature below 80 °C. The operational stability for the immobilized lipase was tested for consecutive hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate. The result shows that the immobilized lipase has excellent operational stability. The residual activity of immobilized lipase was 73.5% after used 7 cycles. The activity of immobilized lipase remained 86.8% of the origin after storage at 4 °C for 60 d. Lipase got improved to varying degrees for organic solvent tolerance through immobilization on PS-acyl-P(acrylamide-co-glycidyl methacrylate).

Key words: chloroacetylated polystyrene; atom transfer radical polymerization; comblike polymer containing epoxy group; organic solvent-tolerant lipase; flexible immobilization

Received 17 July 2011. Accepted 7 September 2011.

*Corresponding author. Tel: +86-25-58139911; E-mail: xiaoningliu@163.com

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z200 and 2007AA06A402).

脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3, 甘油三酯酯水解酶) 能够在油-水界面催化酯合成、酯交换、酯水解或醇

解等反应, 是目前使用较为广泛的商品化酶^[1]. 然而, 由于游离的脂肪酶在高温、强酸、强碱和有机溶

剂等条件下, 容易丧失活性, 且存在不易回收、难以实现连续操作等缺点, 导致生产成本提高. 固定化酶可以克服游离酶的上述不足, 同时保持了其催化特性, 因此得到了广泛的应用^[2].

酶固定化技术的核心是载体材料的选择与制备. 目前, 酶固定化所用的载体多为聚合物, 如聚丙烯膜^[3], 聚丙烯酸酯类^[4]及无机高分子材料^[5]等. 其中亲水性高分子载体因具有较好的生物相容性, 可使得其最大化地与酶分子接触而固定更多的酶蛋白, 因而具有较为广阔的应用前景^[6~8]. “酶的柔性固定化”是指在固定化载体上接上一些足够长度的亲水分子链, 即“柔性链”, 然后再将酶键合到柔性链上^[9,10]. 该柔性链可使载体表面的刚性及疏水性得到改善而变得柔顺、亲水, 减少并缓解固定化过程中酶分子所受到的碰撞力, 维持酶蛋白的正常构象, 从而减少酶活的损失^[11]; 同时被固定的酶仍有较高的自由度, 可以较好地保留其游离态的均相催化活性. Gupta 等^[12]通过聚乙烯醇 (PVA) 改性聚丙烯膜, 再经醛基化后获得了柔性固定化载体, 并用于固定化脂肪酶. 结果表明, 该载体通过化学键合所固定的脂肪酶比聚丙烯膜吸附的脂肪酶具有更高的酶活力、稳定性及催化性能.

原子转移自由基聚合 (ATRP) 作为高效的可控自由基聚合 (CRP) 方法之一, 在过去十多年中取得了显著的发展. 典型的 ATRP 以有机卤化物 (R-X) 为引发剂, 以低价过渡金属化合物和配体为催化剂, 通过氧化-还原反应, 在活性种与休眠种之间建立可逆的动态平衡, 使反应体系中自由基浓度维持在一个较低的水平, 从而大大抑制了自由基的链转移及

链终止反应, 实现了对聚合反应的控制^[13,14].

本文采用氯乙酰化聚苯乙烯 (PS-acyl-Cl) 为引发剂, 以氯化亚铜 (CuCl) 及 2,2'-联吡啶 (Bpy) 为催化体系, 将含有反应性环氧基团的甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) 和亲水性丙烯酰胺 (AM) 两种单体, 利用 ATRP 法合成含亲水性柔性链的梳状环氧聚合物载体 (PS-acyl-P(AM-co-GMA)), 见图式 1), 并用于脂肪酶的柔性固定化.

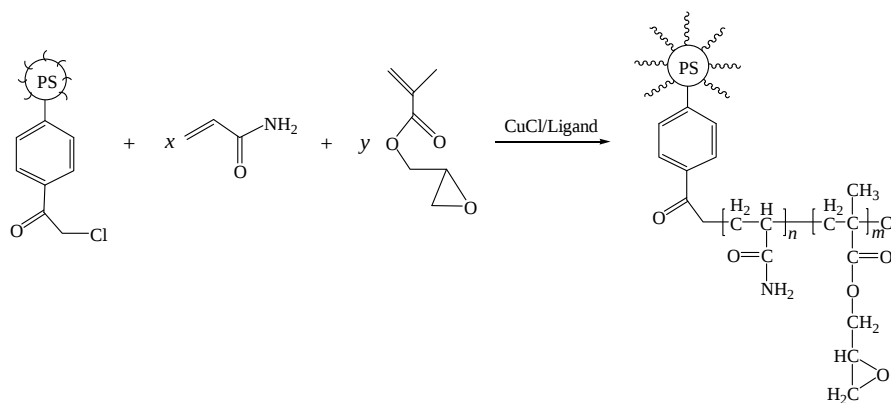
1 实验部分

1.1 梳状环氧聚合物载体的制备

梳状环氧聚合物载体参照文献^[15]制备. 将 PS-acyl-Cl (粒径为 200~260 μm , Cl 担载量为 4.63 mmol/g, 南京麦科菲高效分离载体有限公司), CuCl (经冰乙酸和乙醇反复泡洗, 低温真空烘干后 N_2 氛围下密封保存), Bpy (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), AM (化学纯, 国药集团化学试剂有限公司) 和 GMA (工业级, 上海元吉化工有限公司, 使用前减压蒸馏提纯) 按摩尔比 1:1:2:20:60 加入到配有磁力搅拌的圆底烧瓶中, 再加入 3 ml 的 N,N -二甲基甲酰胺 (DMF, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司). 密封, 抽真空, 通 N_2 , 反复 3 次后, 置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中反应 2 h. 反应结束后, 所得产物分别用 DMF 和水洗滤多次至中性, 再用甲醇 (分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司) 洗滤 3 次, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥至恒重, 即制得 PS-acyl-P (AM-co-GMA) 梳状环氧聚合物载体.

1.2 梳状环氧聚合物载体的表征

梳状环氧聚合物载体的红外吸收光谱 (FT-IR)



图式 1 AM 和 GMA 对 PS-acyl-Cl 的 ATRP 接枝聚合

Scheme 1. Grafting reaction of acrylamide (AM) and glycidyl methacrylate (GMA) onto PS-acyl-Cl surface.

由美国 Nicolet Nexus 870 型红外光谱仪测定. 扫描范围 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, KBr 压片, 并采用增重率及环氧值测定进一步予以表征. 其中环氧值由盐酸-丙酮滴定法进行测定^[16]. 增重率计算公式: $\Delta W = (W_2 - W_1) \times 100\% / W_1$. 式中 W_1 和 W_2 分别为反应前和反应后产物质量.

1.3 固定化酶的制备和性能评价

1.3.1 固定化酶的制备

称取 50 mg 梳状环氧聚合物载体于三角瓶中, 加入含有 200 μl 的 YCJ01 脂肪酶液 (酶活 140 U/ml, 蛋白含量 0.7 mg/ml, 本院发酵组提供) 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH = 7.0) 10 ml, 于一定温度下反应一段时间. 反应结束后, 滤去脂肪酶液, 用磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH = 7.0) 清洗固定化酶, 直到洗液中不含蛋白为止.

1.3.2 酶水解活力的测定

采用 pNPP 法测定脂肪酶的活性^[17]. A 液为 10.61 mmol/L 的 pNPP (对硝基苯酚棕榈酸酯, 美国 SIGMA 公司) 的异丙醇 (分析纯, 上海申博化工有限公司) 溶液, B 液为 0.1% (W/V) 阿拉伯树胶 (分析纯, 中国医药上海化学试剂公司) 和 0.6% (V/V) 的 Triton X-100 (分析纯, 中国医药上海化学试剂公司) 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH = 7.0), 底物溶液 C 液由 A 液和 B 液按体积比 1:9 混合制得.

将 50 mg 固定化酶或稀释 200 倍的游离酶 10 μl 加到配制好的底物溶液 (固定化酶所用底物溶液为 10 ml, 游离酶为 240 μl) 中, 于一定温度反应 10 min (游离酶酶活测定直接在酶标仪中反应) 后, 在 $\lambda = 410\text{ nm}$ 处利用酶标仪 (Power Wave XS 型, 美国 BIO-TECH 公司) 测定反应生成的对硝基苯酚 (pNP) 的量. 以每分钟产生 1 μmol 的 pNP 所需的酶量为一个酶活力 (U) 单位. 文中固定化酶的酶活以载体的干重计算.

1.3.3 蛋白含量的测定

蛋白含量的测定按照 Bradford 的方法进行^[18]. 以牛血清白蛋白 (分析纯, 生工生物工程 (上海) 有限公司) 为标准. 采用紫外-可见分光光度计 (UV-2800H 型, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司) 测定固定化后体系中总蛋白含量及清洗固定化酶洗液中蛋白含量, 从而算得固定化蛋白含量 (mg/g) = (加入总蛋白 - 固定化后体系蛋白量 - 清洗液蛋白量)/载

体质量.

1.3.4 酶的最适反应 pH 值和最适反应温度

最适反应 pH 值: 将游离酶或固定化酶加入到 pH = 6.5~10.0 底物溶液中, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 定义最高酶活为 100%.

最适反应温度: 将游离酶或固定化酶加入到 pH = 7.0 的底物溶液中, 于 35~60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 定义最高酶活为 100%.

1.3.5 固定化酶的 pH 值和热稳定性

pH 值稳定性: 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 将游离酶或固定化酶于 pH = 4.0~12.0 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 中保育 1 h 后测定酶活, 并定义最高酶活为 100%.

热稳定性: 将游离酶或固定化酶于不同温度的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH = 7.0) 中保育 1 h 后测定酶活, 并定义最高酶活为 100%.

1.3.6 固定化酶的操作稳定性及贮藏稳定性

操作稳定性: 将固定化酶加入到底物溶液中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡下进行水解反应 10 min 后测定其活性, 然后再用 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 清洗该固定化酶 3 次, 重新加入到新的反应液中, 进行下一次反应. 定义初始酶活为 100%.

贮藏稳定性: 将游离酶或固定化酶于磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH = 7.0) 中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放, 定时测定酶活, 直至 60 d.

1.3.7 亲水性有机溶剂对酶活的影响

将游离酶或固定化酶于 40% (V/V) 有机溶剂中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 保育 48 h 后测定酶活, 定义磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH = 7.0) 中保育的酶活为 100%.

2 结果与讨论

2.1 载体的表征结果

图 1 为 PS-acyl-Cl 和 PS-acyl-P(AM-co-GMA) 聚合物载体的 FT-IR 谱. 可以看出, 与 PS-acyl-Cl 相比, 后者出现酯羰基 1730 cm^{-1} 和环氧基 906 cm^{-1} 吸收峰^[19]. 由此可见, GMA 单体发生了接枝反应. 另外, 3440 和 3360 cm^{-1} 处吸收峰分别对应于酰胺中 N-H 的反对称和对称振动吸收, 1450 cm^{-1} 处为伯酰胺的强吸收峰^[20]. 结果表明, GMA 和 AM 都参与了接枝反应.

聚合物载体接枝后, 产物可获得 25 倍的高增重率, 说明接枝有效可信; 盐酸-丙酮滴定法测得该聚

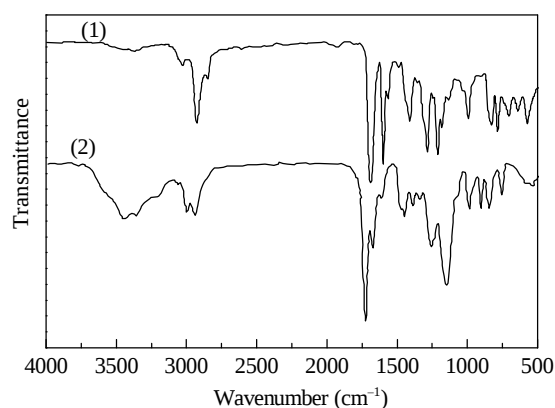


图 1 引发剂与载体的 FT-IR 谱

Fig. 1. FT-IR spectra of the initiator (1) and support (2).

合物载体环氧基含量为 4.90 mmol/g. 由此算得 AM 与 GMA 的平均链节数分别为 19.46 和 25.73, 平均总链节数为 45.19. 综上可见, 该聚合物载体有一定的链长, 可满足所设计的柔性链结构要求.

2.2 固定化温度和时间对酶活的影响

在固定化时间为 48 h 的条件下, 考察了固定化

温度对酶活的影响, 结果示于图 2(a). 由图可见, 随着固定化温度的升高, 蛋白载量逐渐升高, 而固定化酶活先升后降. 这说明虽然温度升高使得载体能够键合更多的蛋白, 但温度太高, 易引起部分游离酶失活. 因此, 较适固定化温度为 30 °C. 另外, 该酶活是在反应体系中振荡了 48 h 后所测, 说明该固定化酶有较好的稳定性.

在固定化温度为 30 °C 的条件下, 考察了固定化时间对酶活影响, 结果示于图 2(b). 由图可见, 随着时间的延长, 酶活及蛋白载量逐渐上升, 至 48 h 时酶活最高; 进一步延长时间, 两者升高不明显; 特别是超过 70 h 后, 酶活及蛋白载量都下降. 由此可见, 该固定化反应 48 h 较为合适.

2.3 酶最适反应 pH 值和最适反应温度

游离酶和固定化酶的最适反应 pH 值和最适反应温度示于图 3. 由图可见, 游离酶和固定化酶的催化反应最适 pH 值都是 8.5, 但后者对环境 pH 的敏感度略有降低, 而稳定性略有提高. 由图 3(b) 可知,

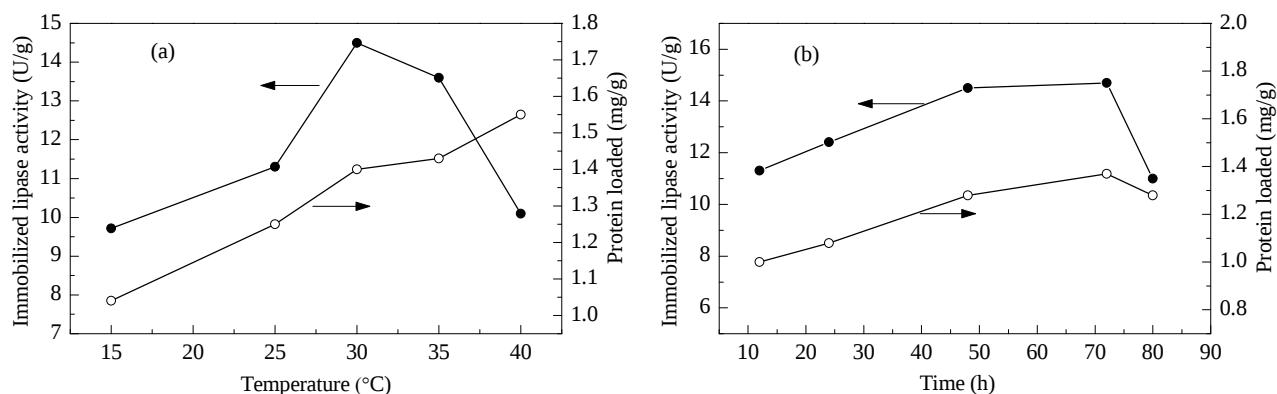


图 2 固定化温度和时间对酶活的影响

Fig. 2. The effect of immobilization temperature (a) and time (b) on lipase activity.

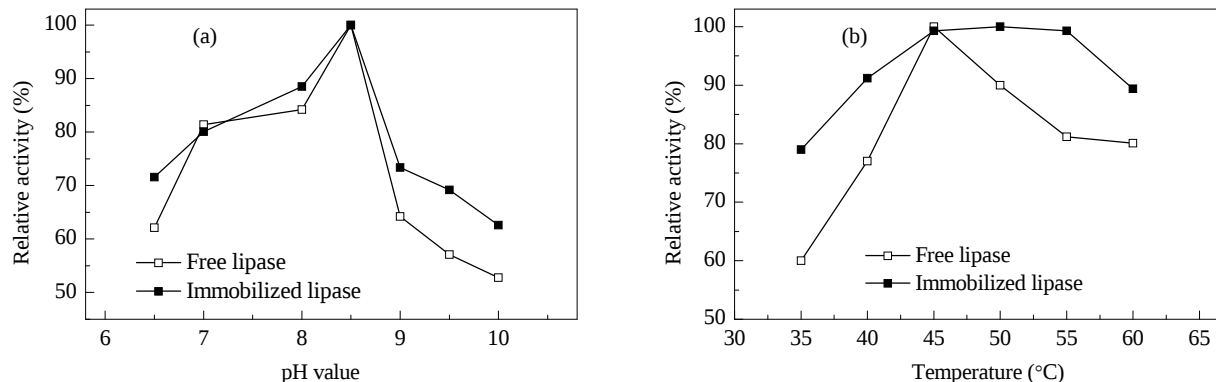


图 3 固定化酶和游离酶的最适反应 pH 值和最适反应温度

Fig. 3. Optimized pH value (a) and temperature (b) of immobilized and free lipase in reaction.

游离酶的催化反应最适温度为 45 °C, 而固定化酶的为 45~55 °C, 说明固定化酶催化温度最适范围变宽. 这可能是柔性载体与酶分子间形成的共价键不仅在固定化过程中维持了酶分子的构象, 使其受外界环境影响较小, 抑制了酶的失活, 而且也稳定了酶的构象, 从而提高了其热稳定性.

2.4 酶的 pH 和热稳定性

游离酶与固定化酶的 pH 稳定性结果示于图 4(a). 由图可见, pH < 7 或 > 7 时, 两者的酶活都逐渐下降, 但后者下降得缓慢. 当 pH = 4 时, 固定化酶和游离酶保留酶活分别为 78.2% 和 50%; 当 pH = 12 时, 两者分别为 69% 和 59.5%. 这说明脂肪酶经固定化后, pH 稳定性有所提高.

游离酶与固定化酶的热稳定性结果示于图 4(b). 由图可见, 固定化酶在 80 °C 条件下保育 1 h 后, 仍能保留 91.8% 的酶活; 而游离酶在 70 °C 保育 1 h 后, 保留酶活仅为 60.9%, 80 °C 时则已基本失活. 这是由于柔性载体在固定化过程中可维持酶分子的构象, 同时也可稳定酶的构象, 提高其耐热性.

2.5 固定化酶的操作稳定性及贮藏稳定性

固定化酶的操作稳定性与贮存稳定性在很大程度上反映了固定化载体的性能, 由固定化酶的操作稳定性的结果 (图 4(c)) 可知, 该固定化酶使用 5 次后, 保留酶活为 96.8%; 当使用 7 次后, 其酶活仍为初始酶活的 73.5%, 显示出较好的操作稳定性. 其中至第 6 次时, 酶活下降明显. 这可能是由于水解反应结束后, 固定化酶虽经磷酸盐缓冲液清洗, 但仍有

部分 pNP 残留在酶活性中心上或其附近区域, 随着使用次数增加, 活性中心区域的 pNP 残留量也随之增加, 当固定化酶第 5 次催化 pNPP 时, 残留的 pNP 量使得部分活性中心被掩盖而无法起到催化作用, 致使第 6 次反应的酶活显著下降.

将游离酶与固定化酶置于 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 中, 于 4 °C 冰箱中存放 30 d 时, 其保留酶活分别为 95.5% 和 95.6%, 两种酶活稳定性相同; 继续延长至 60 d 时, 两者分别降至 75.5% 和 86.8%. 可见, 该柔性梳状环氧聚合物载体固定化酶比游离酶具有更好贮藏稳定性.

2.6 亲水性有机溶剂对酶活的影响

亲水性有机溶剂对游离酶与固定化酶的影响列于表 1. 由表可见, 除甲醇和 DMSO 外, 游离酶酶活在所考察的有机溶剂中均有所下降, 而固定化酶的有机溶剂耐受性大都有所提高. 这可能是由于该脂肪酶因来源或结构而使得其本身对甲醇和 DMSO 耐受性较强, 酶活不仅未降低, 反而在甲醇体系中得到一定的激活; 当该脂肪酶经固定化后, 在甲醇和

表 1 亲水性有机溶剂对游离酶与固定化酶酶活的影响

Table 1 Effect of hydrophilic organic solvents on free and immobilized lipase

Solvent (40%, V/V)	Residual activity (%)	
	Free lipase	Immobilized lipase
Methanol	110.7	100.4
Ethanol	74.4	94.0
Acetone	81.4	97.0
DMF	64.6	98.0
Isopropanol	79.5	84.1
DMSO	103.3	94.7

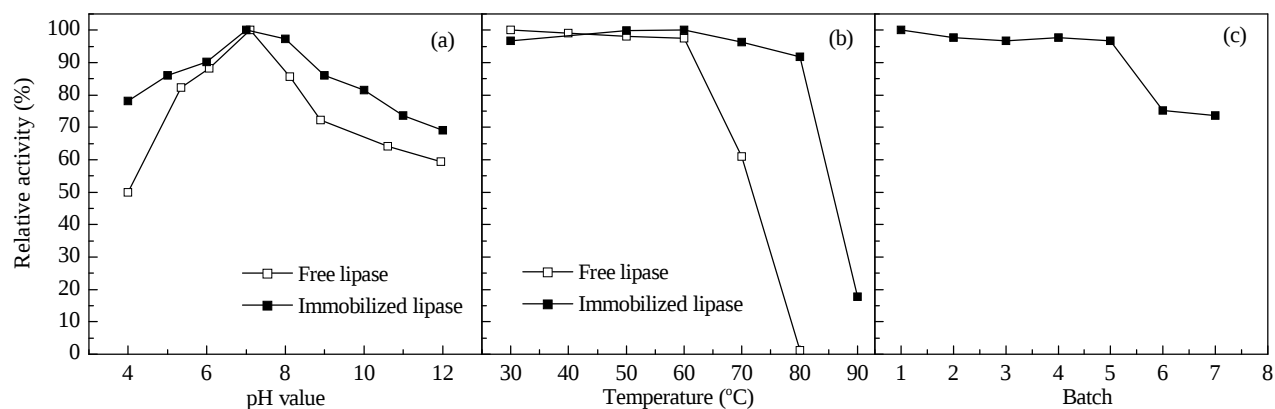


图 4 固定化酶的 pH 稳定性、热稳定性及操作稳定性

Fig. 4. pH stability (a), thermal stability (b), and operational stability (c) of immobilized lipase.

DMSO 中酶活下降不明显. 可能该脂肪酶经固定化作用后, 对酶活稳定性的正面影响较大, 而对酶的激活可能有一定的负面影响. 综合考虑, 固定化酶具有更高的稳定性.

3 结论

采用 ATRP 法合成的柔性亲水梳状环氧聚合物载体 PS-acyl-P(AM-co-GMA), 既存在可与酶键合的环氧基团, 又有亲水性的酰胺基团, 因而在固定化过程中有利于维持 YCJ01 脂肪酶蛋白的正常构象, 减少了酶的失活, 且比游离酶具有更高的稳定性.

参 考 文 献

- 1 Liu Ch H, Chang Sh J. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 1616
- 2 吴东亮, 赵巧玲, 郭杨龙, 王莹, 王筠松, 詹望成, 卢冠忠. 催化学报 (Wu D L, Zhao Q L, Guo Y L, Wang Y, Wang Y S, Zhan W Ch, Lu G Zh. *Chin J Catal*), 2010, **31**: 586
- 3 Bayramoglu G, Hazer B, Altintas B, Arica M Y. *Process Biochem*, 2011, **46**: 372
- 4 Vaidya B K, Ingavle G C, Ponrathnam S, Kulkarni B D, Nene S N. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 3623
- 5 Rodrigues D S, Mendes A A, Adriano W S, Goncalves L R B, Giordano R L C. *J Mol Catal B*, 2008, **51**: 100
- 6 Yi S S, Noh J M, Lee Y S. *J Mol Catal B*, 2009, **57**: 123
- 7 Yang Y, Bai Y X, Li Y F, Lin L, Cui Y J, Xia C J. *Process Biochem*, 2008, **43**: 1179
- 8 Kartal F, Akkaya A, Kilinc A. *J Mol Catal B*, 2009, **57**: 55
- 9 沈斌, 魏荣卿, 刘晓宁, 朱建星, 欧阳平凯. 化工学报 (Shen B, Wei R Q, Liu X N, Zhu J X, Ouyang P K. *J Chem Ind Eng (China)*), 2005, **56**: 1070
- 10 魏荣卿, 沈斌, 刘晓宁, 汪海萍, 王星宇, 欧阳平凯. 过程工程学报 (Wei R Q, Shen B, Liu X N, Wang H P, Wang X Y, Ouyang P K. *Chin J Process Eng*), 2005, **5**: 183
- 11 林思聪. 高分子通报 (Lin S C. *Polym Bull*), 1997, (1): 1
- 12 Gupta S, Kumar Y, Singh K, Bhattacharya A. *Polym Bull*, 2010, **64**: 141
- 13 Wang J Sh, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, 1995, **28**: 7572
- 14 Matyjaszewski K, Miller P J, Pyun J, Kickelbick G, Diamanti S. *Macromolecules*, 1999, **32**: 6526
- 15 张永峰, 刘晓宁, 魏荣卿, 黄恒. 化工学报 (Zhang Y F, Liu X N, Wei R Q, Huang H. *J Chem Ind Eng (China)*), 2009, **60**: 2621
- 16 李青山, 王雅珍, 周怀宁. 微型高分子化学实验. 北京: 化学工业出版社 (Li Q Sh, Wang Y Zh, Zhou H N. *Miniature Polymer Chemistry Experiment*. Beijing: Chem Ind Press), 2003. 180
- 17 Winkler U K, Stuckmann M. *J Bacteriol*, 1979, **138**: 663
- 18 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248
- 19 Tsarevsky N V, Bencherif S A, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, 2007, **40**: 4439
- 20 朱明华. 仪器分析. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社 (Zhu M H. *Instrumental Analysis*. 3rd Ed. Beijing: Higher Educ Press), 2000. 294