

磁性纳米粒子的制备及脂肪酶的固定化

刘薇, 白姝, 孙彦

(天津大学化工学院生物化工系, 天津 300072)

摘要:建立了以纳米级磁性粒子为载体固定化脂肪酶的方法,优化了脂肪酶的固定化条件,考察了固定化酶的性质.制备的磁性载体平均粒径 20 nm,具有超顺磁性,分散和再分散效果好.固定化酶的最适吸附时间为 60 min,酶用量:载体量为 1:1,固定化酶的酶活达到 718 U/g.结果表明,经纳米磁性粒子固定化后,脂肪酶得到活化,固定化酶比活为游离酶的 1.8 倍.同时,固定化脂肪酶的 pH 稳定性显著提高.

关键词: 纳米磁性载体; 脂肪酶; 固定化

中图分类号: Q550

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2004)04-0362-05

1 前言

用于固定化酶的载体的种类很多,磁性物质作为一种绿色材料^[1]是近年来研究较多的材料.1973年,Robinson等^[2]第一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^[3-5].但是作为固定化的磁性载体一般为聚合物,制备过程复杂,粒径较大.磁性粒子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,它可在有机溶剂中催化酯的合成^[6],并易于用磁场从反应混合物中回收.本研究直接将月桂酸修饰的 Fe₃O₄ 作为固定化脂肪酶的载体,制备的载体为纳米级粒子,研究其作为酶固定化载体的性能.

2 实验

2.1 材料

脂肪酶(Type VII from *Candida rugosa*), BSA 和碳化二亚胺(CH₂N₂)均购自美国 Sigma 公司,月桂酸(化学纯)为天津科密欧化学试剂开发中心产品,其他均为国产分析纯试剂.

2.2 纳米磁性载体的制备

为引入固定化酶的活性基团,采用月桂酸为分散介质,用改进的共沉淀法^[7]制备 Fe₃O₄ 粒子.反应在带夹套不锈钢反应器(高 16 cm,内径 10 cm,外径 15 cm)中进行,循环水升温到 50°C,加入 FeCl₃、FeSO₄ 溶液与适量月桂酸,搅拌转速 1300 r/min.缓慢滴加浓氨水,搅拌 30 min 后,磁场分离获得沉淀物,以 0.5%(φ)氨水洗涤沉淀,再加入月桂酸(10 g/L)于 80°C 下加热 30 min 提高其稳定性.用稀盐酸将 Fe₃O₄ 磁性粒子洗至弱酸性,以保证与粒子结合的月桂酸以酸的形式存在.再用去离子水反复洗净残留的月桂酸和无机盐,真空冷冻干燥,常温保存备用.

2.3 酶的固定化

载体与脂肪酶的结合采用化学共价法.将 100 mg 磁性粒子加到 2.5 ml 的缓冲液 A(3 mmol/L

收稿日期: 2003-09-15, 修回日期: 2003-11-27

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 20025617)

作者简介: 刘薇(1979-),女,天津市,硕士研究生,生物化学工程专业;孙彦,通讯联系人.

磷酸缓冲溶液, pH 6.0)中, 然后加入 0.5 ml 溶于缓冲液 A 中的碳化二亚胺溶液(0.025 g/ml), 超声分散. 再加入 2 ml 溶于缓冲液 A 中的脂肪酶溶液, 4°C 恒温, 超声波作用下反应一定时间后, 利用永久磁铁收集固定化脂肪酶粒子. 上清液用于蛋白分析, 固定化脂肪酶粒子先用缓冲液 A 冲洗, 再用缓冲液 B(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)冲洗. 真空冷冻干燥得粉末状固定化酶, -20°C 保存备用.

2.4 酶活和蛋白质浓度的测定

采用橄榄油乳化法测定脂肪酶的活性^[8], 并根据实验要求作了调整. 蛋白质浓度采用 Bradford 法^[9]测定.

3 结果与讨论

3.1 载体磁性分析

利用透射电镜观察载体粒子, 透射电镜照片见图 1. 从图可以看出, 载体粒子平均大小在 20 nm 左右. 研究表明^[10]粒径小于 25 nm 的颗粒具备超顺磁性. 本工作利用特斯拉计(ST-I Tesla meter)测定载体和固定化酶表面的磁场强度为 0 T. 因此, 本实验方法制备的磁性粒子具有超顺磁性.

为考察纳米磁性粒子的磁分离性能, 测定了浓度为 15 mg/ml 的固定化酶磁性粒子在深 6 cm 的缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)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 15 倍, 在正己烷中, 磁沉降速度是重力沉降的 200 倍. 此外, 由于载体具有一定的疏水性, 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略低. 因此, 利用磁性载体的固定化脂肪酶, 在有机溶剂中同时具有良好的分散性和方便回收的优点.

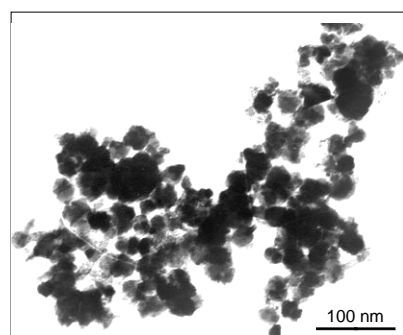


图 1 载体颗粒透射电镜照片
Fig.1 Micrograph of the magnetite carrier (TEM)

表 1 固定化酶粒子重力沉降和磁沉降的比较
Table 1 Comparison of sedimentary time of the magnetic nanoparticles in gravitational and magnetic field (25°C)

Solvent	Buffer	<i>n</i> -Hexane
Sedimentary time in gravitational field (min)	6.0	120
Sedimentary time in magnetic field (min, 0.4 T)	0.4	0.6

Note: Reaction time 60 min, initial lipase concentration 50 mg/ml, pH 7.0.

3.2 月桂酸对载体及固定化酶的影响

研究发现, 月桂酸对载体及固定化酶的影响主要表现在三个方面, 即对载体粒子分散性、载体与酶共价键合和酶活性的影响. 当制备过程加入月桂酸时, 生成的磁性粒子细致均匀, 肉眼看不到颗粒物; 若不加入月桂酸, Fe₃O₄ 颗粒肉眼可见, 而且会聚集生成大的结块. 因此, 月桂酸在磁性粒子的制备过程中发挥着分散剂的作用. Fe₃O₄ 和月桂酸都是极性物质, 当它们彼此靠近时, 月桂酸羧基氧的孤对电子与 Fe 的空轨道形成配位键, 从而月桂酸结合到 Fe₃O₄ 表面. 月桂酸的长碳链在 Fe₃O₄ 表面发挥空间位阻作用, 月桂酸的这种分散作用与一般的表面活性剂不同^[11,12], 空间位阻作用增大了粒子间的斥力, 提高了磁性粒子在介质中的稳定性. 而且从固定化酶重复利用的实验

中可以发现,载体经月桂酸处理的固定化酶,在相应反应体系中,经超声处理后,分散效果很好.

为考察月桂酸对载体与脂肪酶结合的影响,分别采用加与不加月桂酸两种方法来制备载体 Fe_3O_4 . 结果表明,如果在载体制备过程中不加入月桂酸,所得载体固定化效果很差,载体上的酶活接近于 0. 在载体制备过程中加入月桂酸后,所得载体固定化酶的酶活有显著提高,达到 718 U/g. 因此不加月桂酸得到的载体不能键合脂肪酶.

以碳化二亚胺为活化剂的共价结合需要载体表面具备羧基,而加入月桂酸为载体提供了充足的羧基. 因此,在载体制备过程中,是否加入月桂酸直接影响脂肪酶与载体的共价结合.

在固定化反应时间 60 min、酶用量:载体为 1:1 及 pH 7.0 条件下,制备的固定化酶比活为游离酶的 1.8 倍,固定化酶的活力表现率(固定化酶总活性/初始酶总活性与残余酶总活性之差^[13])为 125.6%. 一般来说,在固定化过程中很难避免酶的损失,而采用共价结合法固定化酶时,常常引起酶蛋白高级结构的变化,活性回收较低. 采用月桂酸处理固定化载体后,月桂酸的疏水性会与脂肪酶结构中 α 螺旋疏水性的侧链发生疏水作用,而酶的这个疏水性侧链覆盖着酶的活性中心,月桂酸与脂肪酶的这种疏水性相互作用会改变覆盖在酶活性中心的“帽子^[14]”结构,出现界面活化现象,使酶分子的活性得到提高.

3.3 固定化反应时间和给酶量对固定化酶的影响

在 pH 7.0、酶用量:载体量为 1:1 时,考察了反应时间对脂肪酶固定化的影响. 如图 2 所示,随着吸附时间的延长,固定化酶的活性逐渐增大,在 60 min 达到最大值,随后开始减小;残余酶活在 60 min 以内迅速下降,60 min 后下降程度趋于平缓. 在反应的开始阶段,脂肪酶逐渐结合到载体上,固定化酶活力会随着吸附酶量的增加而增加,但超过一定时间后,酶活性就会受到损伤而下降,因此反应时间存在一个最佳值. 实验结果表明,超声作用 60 min 后反应就基本完成,而再延长操作时间会使酶失活,导致总酶活减小,无论是固定化酶的活性还是残余酶活都随着时间的延长而减小. 所以,吸附时间确定为 60 min.

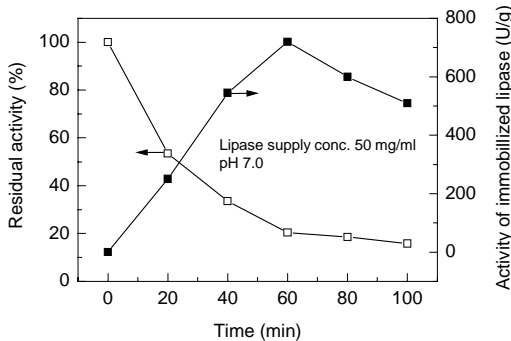


图 2 固定化吸附时间曲线

Fig. 2 Effect of reaction time on the activity of immobilized lipase and residual activity

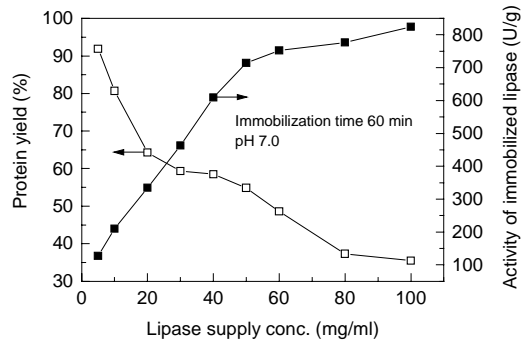


图 3 固定化反应中给酶量的优化

Fig. 3 Optimization of enzyme loading on the immobilized lipase and protein yield

载体上偶联的酶量直接影响固定化酶的活性. 在 pH 7.0、反应时间 60 min 条件下,固定载体用量 100 mg,改变初始酶液的浓度制备固定化酶,结果如图 3 所示. 其中总蛋白质回收率为固定化酶的蛋白质含量与总蛋白质含量的比值,而固定化酶的蛋白质含量通过总蛋白质含量与上清液(未固定的)蛋白质含量的差来确定. 从图可以看出,随着加酶量的增大,固定化酶的活性也随之上

升,当酶浓度达到 50 mg/ml 时,固定化酶的活性增加趋于平缓,总蛋白质回收率则随着酶浓度的增加而下降.这可能是由于加酶量过大时,大量的酶覆盖在载体表面,使酶分子聚集,从而影响固定化酶的表现活性.综合考虑两种因素,认为酶用量:载体量为 1:1 为宜(即图中初始酶浓度 50 mg/ml),此时的总蛋白质回收率为 54.8%,酶活回收率为 97.2%.

3.4 pH 值对酶活性和稳定性的影响

首先在 pH 4.0~10.0 的条件下比较了固定化酶与游离酶的活性,结果见图 4.为了考察单位质量酶蛋白在固定化操作前后活性的变化,将固定化酶的最高比活定义为 100% 结果如图 4 所示.游离酶和固定化酶的最适 pH 值均为 7.0,但固定化酶的比活是游离酶的 1.8 倍.由于 Fe_3O_4 是惰性载体,其本身不带有电荷,因此对酶的电离没有影响,从而也就不会影响酶的最适 pH 值.

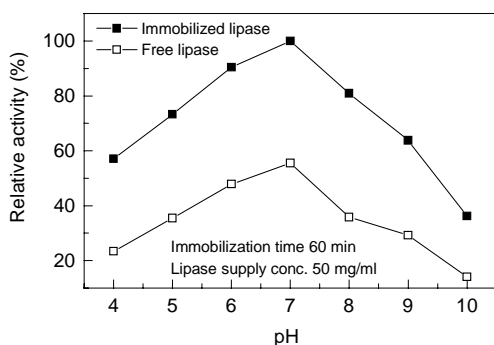


图 4 pH 对固定化酶及游离酶活性影响

Fig.4 Effect of pH on the activity of immobilized and free lipases

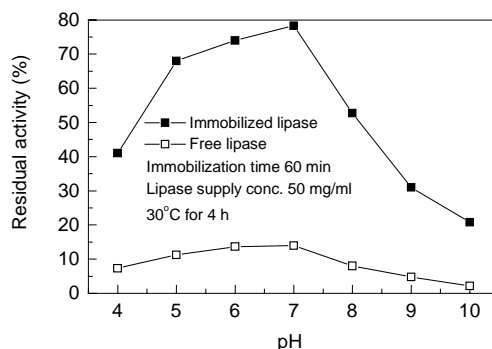


图 5 固定化酶及游离酶 pH 稳定性比较

Fig.5 pH stability of immobilized and free lipases

为研究酶的 pH 稳定性,将固定化酶与游离酶置于不同 pH 值的缓冲液中,在 30°C 保温 4 h 后测定酶活,将酶的活性分别与图 4 中固定化酶和游离酶在 pH 7.0 时的最高值作比较,所得结果见图 5.可以看出,在 pH 5~7 的范围内,固定化酶活性保持在 70%~80%,而游离酶活性只有原酶活性的 25%,表明脂肪酶经固定化处理后的 pH 稳定性得到显著提高.

4 结论

采用共沉淀法制备了纳米磁性粒子,经月桂酸处理后,获得平均粒径 20 nm、具有超顺磁性的疏水性载体.确定了固定化脂肪酶的固定化反应条件为固定化反应时间 60 min,酶用量:载体量 1:1 及 pH 7.0.固定化脂肪酶的比活达到游离酶的 1.8 倍,且 pH 稳定性显著提高.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:

- [1] 刘会洲,何鸣鸿.绿色化学与生态化工的研究内涵[J].化工冶金,1999,20(4):405-409.
- [2] Robinson P J, Dunnill P, Lilly M D. Properties of Magnetic Supports in Relation to Immobilized Enzyme Reactors [J]. Biotechnol. Bioeng., 1973, 15: 603-607.
- [3] 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.
- [4] 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.

- [5] 佟晓冬, 孙彦. 核壳型钕铁硼琼脂糖载体的制备及其膨胀床特性 [J]. 过程工程学报, 2002, 2(3): 199–203.
- [6] 谢渝春, 刘会洲, 陈家镛. 有机相中的酶促拆分过程 [J]. 化学进展, 1997, 9: 292–299.
- [7] 宫月平, 刘会洲, 安振涛, 等. 超顺磁性聚合物微球及其制造方法 [P]. 中国专利: CN 1253147, 2000–05–17.
- [8] Pawinee K, Suree P. Simple Assay Method for Lipase Activity and Analysis of Its Catalytic Hydrolysis Product in Water-poor Media [J]. Indian J. Chem., 1993, 32B: 88–89.
- [9] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248–254.
- [10] Guo Z, Bai S, Sun Y. Preparation and Characterization of Immobilized Lipase on Magnetic Hydrophobic Microspheres [J]. Enzyme Microb. Technol., 2003, 32: 776–782.
- [11] 孙彦. 生物分离工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1998. 183–185.
- [12] Liu H Z, Yang W, Chen J. Effects of Surfactants on Emulsification and Secondary Structure of Lysozyme in Aqueous Solutions [J]. Biochem. Eng. J., 1998, 2: 187–196.
- [13] 朱祥瑞, 徐俊良. 家蚕丝素固定化 α -淀粉酶的制备及其理化特性 [J]. 浙江大学学报, 2002, 28: 64–69.
- [14] Brady L, Brzozowski A M, Derewenda Z S, et al. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase [J]. Nature, 1990, 343: 767–770.

Preparation of Magnetic Nanoparticles and Its Application to Enzyme Immobilization

LIU Wei, BAI Shu, SUN Yan

(Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Lauric acid-stabilized magnetic nanoparticles were prepared and used for enzyme immobilization. The Fe_3O_4 magnetic nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy and magnetic measurements. The observations indicated that the particles were superparamagnetic. Magnetic sedimentation of the nanoparticles was achieved within 0.6 min in organic solution, 200 times faster than the gravitational sedimentation. Lauric acid provided a hydrophobic interface to the immobilized lipase, and the conformational changes induced by interacting with the hydrophobic interface yielded an “open structure” of the lipase. CRL was immobilized to the magnetic carrier with a specific activity of 718 U/g, 1.8 times higher than the free lipase containing the same protein quantity. The pH dependencies of the immobilized and free lipases were investigated and the optimum pH for them were determined. Moreover, activity amelioration and stability of the immobilized lipase for the hydrolysis of olive oil was observed.

Key words: magnetic nanoparticles; lipase; immobilization