

壳聚糖固定化海洋微生物 YS2071 脂肪酶 及其酶学性质*

张 权^{1,2} 盛 军¹ 刘均忠¹ 郑鸿飞¹ 孙 谧^{1①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 采用壳聚糖为载体,优化了海洋微生物 YS2071 脂肪酶的壳聚糖固定化条件。结果显示,在壳聚糖浓度为 2% (m/v)、氢氧化钠浓度为 12% (m/v)、乙酸浓度为 1% (v/v)、戊二醛浓度为 0.25% (v/v)、与戊二醛交联的时间为 12 h 及添加 2 ml (1120 U)的游离脂肪酶时,固定化脂肪酶的活力最高,其活力回收率达到 69.4%。对游离脂肪酶与固定化脂肪酶的酶学性质进行比较,结果显示,游离脂肪酶的最适反应温度为 40℃,而固定化脂肪酶的最适反应温度为 45℃,固定化脂肪酶的温度稳定性明显优于游离脂肪酶。最适反应 pH 均为 8.0,脂肪酶经过固定化之后,酸碱耐受性增大。重复利用 10 次的固定化脂肪酶的酶活力保留率仍高于 65%。固定化脂肪酶贮藏半衰期为 96 d,而游离脂肪酶的贮藏半衰期是 33 d。固定化脂肪酶与游离脂肪酶的酶活力保留率在不同有机试剂中表现出不同的稳定性。

关键词 壳聚糖;海洋微生物脂肪酶;固定化;酶学性质

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0100-07

脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)是一类特殊的酯键水解酶,作用于羧酸酯的酯键,能够水解甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯,并称为三酰甘油酰基水解酶(Jaeger *et al*, 2002)。脂肪酶因其多功能性,在工业、农业以及医学等领域具有广泛的用途,应用于食品、医药、皮革、纺织、精细化工等工业生产中(王庭等, 2010; 刘海洲等, 2008; 宋欣等, 1999; 姚庆龙等, 2006; 王智等, 2003)。但是,游离脂肪酶的温度稳定性、酸碱耐受性以及有机试剂中的稳定性较差。在工业生产应用中,游离的脂肪酶无法与产物分离,同时不能回收利用。因此,采用壳聚糖固定化脂肪酶,不仅保证酶的高效性,还可以克服游离脂肪酶的一些缺点(Chua *et al*, 2004)。

壳聚糖是一类生物界中来源广泛且具有生物相容性、易降解、无毒的一种天然生物高分子多糖,溶

液有良好的成胶性,是一种性能优良的固定化载体(王金瑾等, 2009; Krajewska, 2004; Taqieddin *et al*, 2004)。本研究选取壳聚糖为固定化脂肪酶的载体,对固定化的条件进行了优化,同时对固定化脂肪酶的酶学性质进行研究,为以后脂肪酶的应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂及主要仪器

脂肪酶为从黄海中筛选的一株海洋细菌 YS2071 所产。壳聚糖、对硝基苯基月桂酸酯(4-Nitrophenyl dodecanoate)购自 Sigma, 异丙醇、考马斯亮蓝 G-250、Triton X-100、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、戊二醛购自国药集团化学试剂有限公司。日本岛津 Shimadzu UV2550 全波长扫描分光光度计, FA 1204B 电子分析天平,

* 国际科技合作与交流专项(2014DFG30890)、国家自然科学基金-联合基金(U1406402-5)和青岛市科技计划(13-4-1-57-nsh)共同资助。张 权, E-mail: zqcy89@163.com

① 通讯作者: 孙 谧, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-08, 收修改稿日期: 2014-07-01

Thermo 481 摇床, DC-2006 低温恒温槽。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶活力的测定 游离酶活力的测定参照(Hatzinikolaou *et al*, 1999; 李忠磊等, 2012; 段晓琛等, 2013)的方法并加以改进。反应体系为: A 液, 称取 0.0834 g 对硝基苯基月桂酸酯, 40℃水浴条件下溶解在 10 ml 的异丙醇中, 并使用异丙醇定容到 25 ml。B 液, 准确称取 4.00 g 的 Triton X-100 溶于 800 ml pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中, 最终定容到 1 L。4℃下冷藏 A、B 液。取 1.5 ml B 液与 100 μl 的 A 液, 振荡混匀后, 40℃水浴预热 2 min, 加入 100 μl 脂肪酶酶液(空白对照使用等量灭活的酶液), 继续水浴 6 min, 取出反应液, 加入对等的 1.7 ml 的无水乙醇终止反应, 410 nm 处测定其吸光值。每分钟催化底物水解生成 1 μmol 的脂肪酸所需的酶量定义为 1 单位的酶活力(U)。

固定化酶测活方法: 用 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液代替酶液, 加入固定化酶, 按照游离酶活力测定方法测定, 空白对照使用等量的灭活固定化酶的载体。

固定化酶活力回收率的计算

$$\text{固定化酶活力回收率}\% = \frac{\text{固定化酶的总活力}}{\text{加入酶的总活力}} \times 100\%$$

1.2.2 蛋白含量的测定 采用 Bradford(1976)测定方法测定蛋白含量。固定化实验之前发酵液蛋白含量的测定: 取 1 ml 发酵液与 4 ml 的考马斯亮蓝, 振荡混匀, 室温静置 2 min, 595 nm 处测定其吸光值。固定化之后测定清液中蛋白含量, 方法同前。以牛血清蛋白作为标准物, 制作标准曲线, 回归系数 $R^2=0.997$ 。

蛋白吸附率的计算

$$\text{蛋白吸附率}\% = \frac{\text{固定化之前总蛋白含量} - \text{固定化之后清液中蛋白含量}}{\text{固定化之前总蛋白含量}} \times 100\%$$

1.2.3 壳聚糖交联吸附法 根据 Chang 等(2005)、段晓琛等(2013)、张艳等(2010)的方法先交联再吸附, 配制 1% (v/v) 的乙酸溶液溶解壳聚糖, 常温下磁力搅拌 30 min, 超声脱气 10 min, 使用注射器逐滴加入到 10% 的 NaOH (m/v) 溶液中, 20 r/min 磁力搅拌, 防止形成壳聚糖小球而粘在一起, 常温静置 1 h, 用蒸馏水反复冲洗直到小球的表面 pH 为中性。将小球浸泡于终浓度为 0.25% 的戊二醛(v/v)溶液中, 80 r/min 振荡 3 h, 使壳聚糖小球和戊二醛充分交联。取出小球, 再次使用蒸馏水反复冲洗 10 次, 除去表面残存的戊二醛, 得到交联好的壳聚糖小球。取一定量的脂肪酶溶液浸泡壳聚糖小球 12 h, 进行充分的吸附交联。第 2 天用蒸馏水冲洗吸附交联脂肪酶的壳聚糖小球, 去

除未能牢固结合的游离酶, 置于冰箱中保藏。

1.2.4 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的酶学性质比较

结合 Veeraragavan 等(1990)、乔红群等(1998)、Kumar 等(2005)、Benjamin 等(2001)的研究内容, 主要对固定化脂肪酶的操作稳定性、在部分有机试剂中的稳定性、固定化脂肪酶和游离酶的贮藏稳定性、最适 pH、pH 稳定性、最适反应温度、热稳定性进行探究。

操作稳定性: $t_{1/2} = 0.693 t / 2.303 \lg (E_0/E)$

式中, $t_{1/2}$ 为固定化酶半衰期; t 为贮藏时间; E_0 为初始酶活力; E 为贮藏 t 后的酶活力。

最适反应温度: 按照 1.2.1 脂肪酶活力测定方法, 游离脂肪酶的发酶液和固定化脂肪酶分别置于不同温度(0–70℃)下, 每 10℃测定其酶活力, 得到最适温度后, 测定最适温度±5℃的酶活, 定义酶活力最高组的酶活力为 100%, 计算其他各温度下游离酶和固定化脂肪酶的相对活力。

热稳定性: 将游离脂肪酶的发酶液和固定化脂肪酶置于 20–70℃(间隔 10℃)下保温 60 min, 测定其酶活力, 以酶活力最高组的酶活力为 100%, 比较不同温度下游离酶和固定化酶的残余酶活力。

最适反应 pH: 在 pH 3–12 的缓冲液中测定游离脂肪酶和固定化脂肪酶的最适 pH。缓冲溶液: 50 mmol/L 柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0–5.0), 50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 6.0–8.0), 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0–10.0), 50 mmol/L 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液(pH 11.0), 50 mmol/L 的 KCl-NaOH (pH 12.0)。

用 50 mmol/L 不同 pH(3–12)的缓冲液和 Triton X-100 配制的 B 液, 根据 1.2.1 酶活力的测定方法, 40℃下测定其活性。得到最适 pH 后, 测定最适 pH±0.5 的酶活力, 以酶活力最高组的酶活力为 100%, 计算其他 pH 下游离酶和固定化脂肪酶的相对活力。

pH 稳定性: 在 50 mmol/L 不同 pH(3–12)的缓冲液体系中常温下保存 4 h, 测定酶活力, 以活力最高组的酶活力为 100%, 计算不同 pH 缓冲液保存之后的游离酶和固定化脂肪酶的活力保留率。

在有机试剂中的稳定性: 取 4 ml 有机试剂处理游离酶和固定化微球, 4℃冰箱中保存 6 h, 测定游离酶和固定化脂肪酶的酶活力, 空白组以 4 ml 的去离子水代替。以空白组的酶活力为 100%, 比较不同有机试剂处理后的酶活力残余量。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖固定化脂肪酶条件的优化

2.1.1 壳聚糖浓度对脂肪酶固定化的影响 实验

发现,壳聚糖的浓度为0.5%和1%时,形成的壳聚糖微球较不规则且极易碎裂,壳聚糖浓度高于4%时,壳聚糖溶液的黏度高,不易成球,故最终实验在1.5%–3.5%之间进行,结果如图1所示,酶的活力回收率随着壳聚糖浓度增大而增大,在壳聚糖浓度为2%时,酶的活力回收率最高为71.57%。因此,壳聚糖浓度选定为2%。

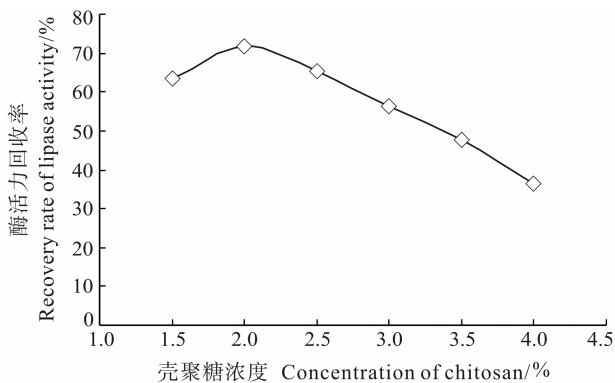


图1 壳聚糖浓度对脂肪酶固定化效果的影响

Fig.1 Effects of the chitosan concentration on the lipase immobilization

2.1.2 乙酸浓度对脂肪酶固定化的影响 乙酸浓度为0.25%时,溶液的黏度较低,无法形成大表面积的壳聚糖微球,故选择0.5%–3%的乙酸进行实验,结果如图2所示,乙酸浓度对脂肪酶的固定化的影响较小,1%乙酸的条件下得到最大的酶活力回收率,为74.3%。

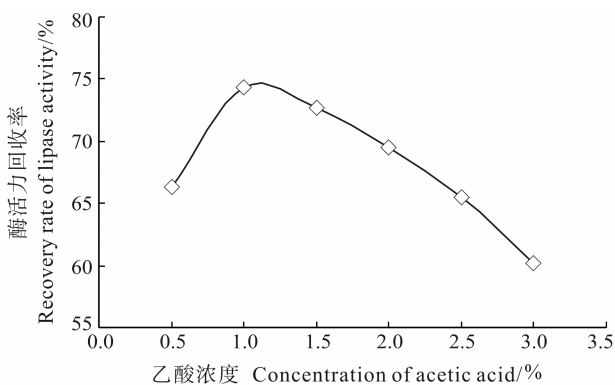


图2 乙酸浓度对脂肪酶固定化的影响

Fig.2 Effects of the acetic acid concentration on the lipase immobilization

2.1.3 戊二醛浓度对脂肪酶固定化的影响 实验结果如图3所示,当戊二醛浓度低于0.75%时,固定化脂肪酶活力回收率高;当戊二醛浓度0.25%时,有最高的酶活力回收率,为75.66%;而当戊二醛浓度大于1%时,固定化脂肪酶活力回收率较低。说明高

浓度的戊二醛一方面会使脂肪酶的构象发生变化进而活性降低,另一方面脂肪酶和壳聚糖的结合位点更加紧密,产生空间结构障碍造成脂肪酶活力的减小。

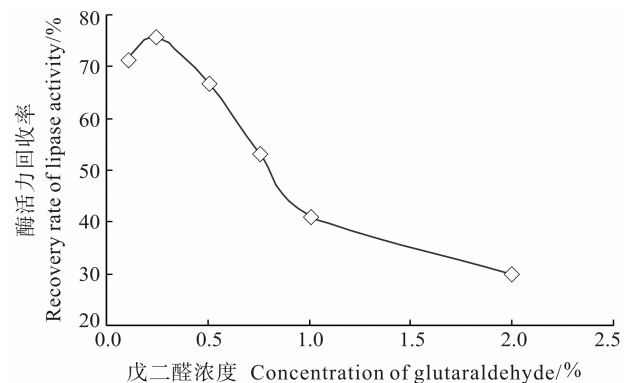


图3 戊二醛浓度对脂肪酶固定化影响

Fig.3 Effects of the glutaraldehyde concentration on the lipase immobilization

2.1.4 氢氧化钠浓度对脂肪酶固定化的影响 壳聚糖液滴加到氢氧化钠溶液中,可以形成表面光滑的微球,且微球的强度较好,不易碎裂。过低浓度的氢氧化钠溶液不能起到很好的硬化作用,但是过高浓度又会造成污染、不利于洗至中性,对酶活力有影响。实验选择4%、8%、12%、16%、20%、24%的氢氧化钠溶液(m/v),结果如图4所示,氢氧化钠溶液的浓度对酶活力回收率影响相对较小,在12%条件下脂肪酶有最大酶活力回收率,为77.1%。

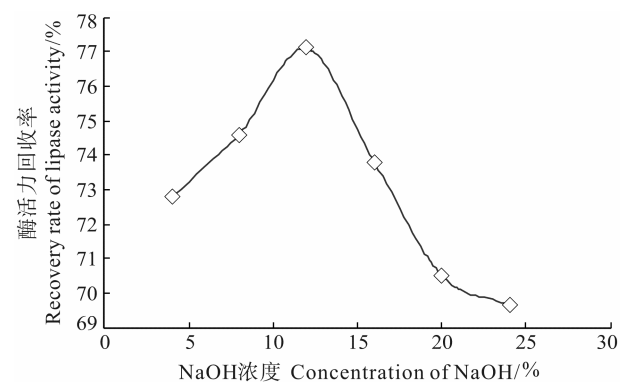


图4 氢氧化钠浓度对脂肪酶固定化的影响

Fig.4 Effects of NaOH concentration on the lipase immobilization

2.1.5 与戊二醛的交联时间对脂肪酶固定化的影响

根据上面实验所得到的最优条件,将壳聚糖微球与游离酶发酵液置于4℃冰箱中交联吸附3–18 h(间隔3 h)。由图5可知,脂肪酶的活力回收率随交联时间的增加而增大,当交联时间达到12 h时,酶活力回收率趋于最大,之后变化很小。

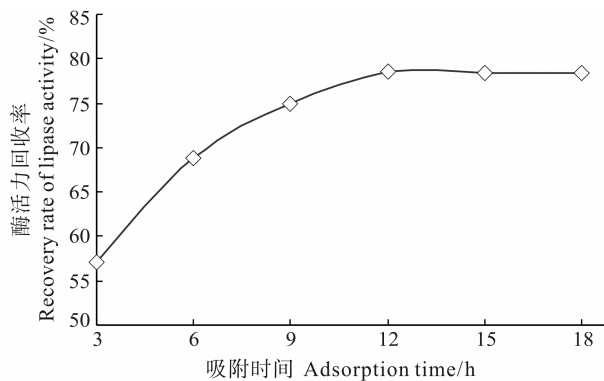


图 5 吸附交联时间对脂肪酶固定化的影响
Fig.5 Effects of the adsorption time on the lipase immobilization

2.1.6 加酶量对脂肪酶固定化的影响 由图 6 可知, 固定化脂肪酶的酶活力回收率与加入游离酶的酶活力呈负相关, 固定化脂肪酶的活力随游离酶溶液增多而增大, 加入 2 ml (1120 U) 的游离脂肪酶时, 固定化酶的酶活力达到最大, 且其酶活力回收率达到 69.4%。

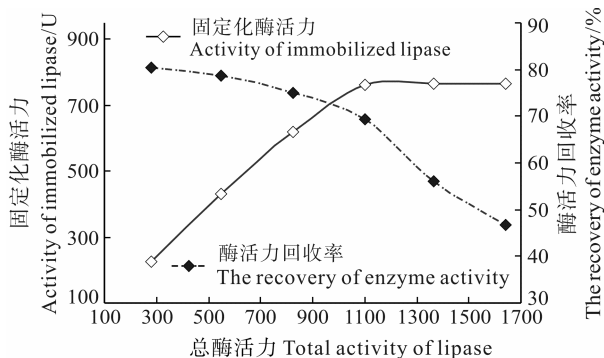


图 6 加酶量对脂肪酶固定化的影响
Fig.6 Effects of the enzyme addition on the lipase immobilization

2.2 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的酶学性质比较

2.2.1 固定化脂肪酶的操作稳定性 结果如图 7 所示, 重复利用 10 次的固定化小球的酶活力保留率仍然高于 65%, 且微球较规则, 没有发生碎裂的情况, 离心之后即可回收, 说明壳聚糖固定化脂肪酶具有较好的活力回收率、操作稳定性较好且易于回收重复利用。

2.2.2 固定化脂肪酶与游离脂肪酶的贮藏稳定性比较 将游离脂肪酶和固定化脂肪酶均于 4℃ 下放置, 每间隔 5 d 测定 1 次游离脂肪酶和固定化脂肪酶的酶活, 探索游离脂肪酶和固定化酶的贮藏稳定性, 实验结果见图 8, 固定化脂肪酶在 4℃ 下放置 30 d 后, 酶活力仍保留了 80.2%, 而游离酶 30 d 后只有起初活力的 52.4%。由半衰期计算公式可得, 固定化脂肪酶贮藏半衰期为 96 d, 而游离脂肪酶的贮藏半衰期是 33 d。

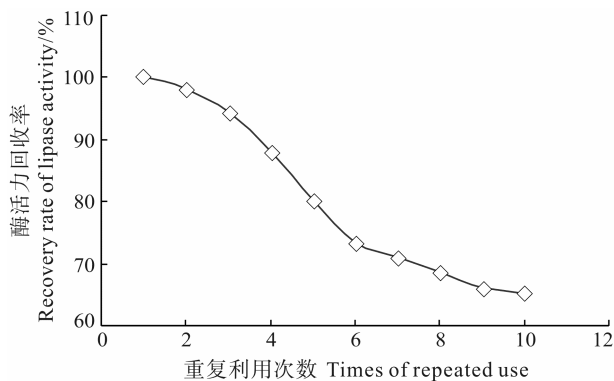


图 7 固定化脂肪酶的操作稳定性
Fig.7 The stability of the immobilized lipase

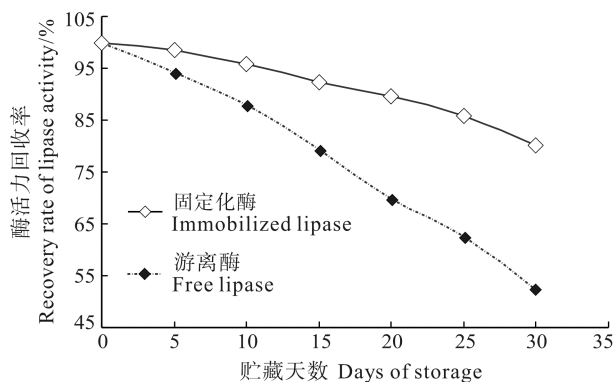


图 8 固定化脂肪酶的贮藏稳定性
Fig.8 The storage of the immobilized lipase

由此得出, 壳聚糖固定化脂肪酶的贮藏期更长, 更利于酶的保存。

2.2.3 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适反应温度

由图 9 可知, 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适温度分别为 40℃ 和 45℃, 在 10~30℃ 之间游离脂肪酶的活力相对较高, 而固定化酶在低温下显示较弱的催化能力, 说明游离脂肪酶在低温条件下酶活力受温度影

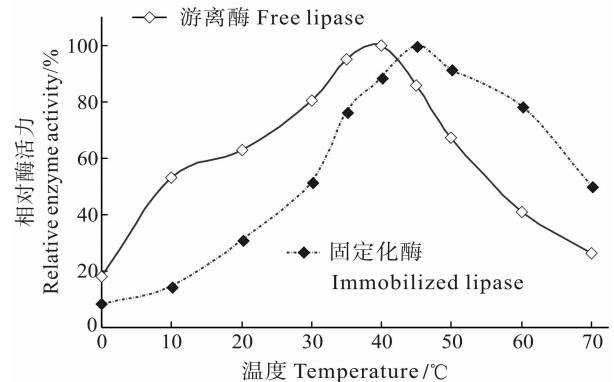


图 9 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适反应温度
Fig.9 The optimal temperature of the free and immobilized lipase

响较小,而固定化脂肪酶受温度影响较大。随着温度的升高,酶与底物的结合速度变快,40℃时游离酶活力最高,而后酶活力迅速下降;固定化脂肪酶在45℃时表现出最高酶活力,在45–60℃酶活力缓慢下降,70℃时酶活力下降较为严重,但是仍然高于游离酶的酶活力。

2.2.4 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的温度稳定性

结果见图10,在20–40℃之间保存1h后,游离脂肪酶和固定化脂肪酶均有较为稳定的残留活性,40℃时游离脂肪酶和固定化脂肪酶的酶活保留率分别为76.33%和85.01%,但是游离脂肪酶在温度高于50℃处理1h之后,酶活力下降明显,在70℃条件下,游离脂肪酶的酶活力保留率仅为10.5%,而固定化脂肪酶在70℃处理后酶活力保留率仍然高达42.54%。说明经过壳聚糖固定化之后,酶的热稳定性得到了很大提高,这是由于酶和交联了戊二醛的壳聚糖载体之间发生了相互作用使得固定化酶的热稳定性得到了很大提高,反之,游离酶由于缺少作用力容易在高温条件下失活。

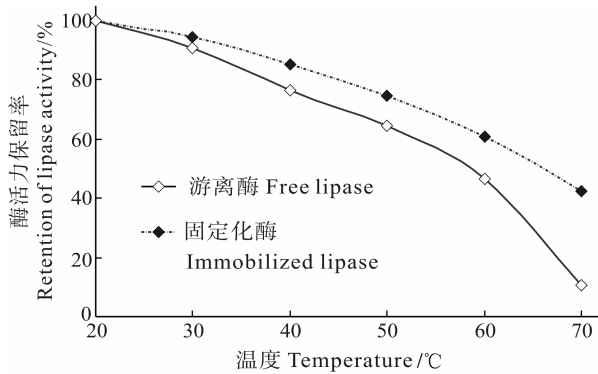


图10 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的温度稳定性
Fig.10 The temperature stability of the free and immobilized lipase

2.2.5 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适作用 pH

游离脂肪酶和固定化脂肪酶最高酶活力的 pH 均为 8.0 (图 11), 说明游离酶与壳聚糖固定化过程对脂肪酶的最适作用 pH 没有太大影响。当 pH 小于 4.0 时, 游离脂肪酶基本失活; 随着 pH 增大, 游离酶的酶活力也增大; 当 pH 达到 8.0 时, 有最高酶活; 酶活力随着 pH 再次增大而呈现下降的趋势, 游离酶在碱性条件下酶活力比酸性条件要高。经过固定化之后, 固定化脂肪酶的耐酸碱性得到提高, 固定化脂肪酶在 pH 5.0 时酶活力保留率达到 37.48%, 在 pH 为 12.0 的条件下, 固定化脂肪酶的酶活力保留率也达到了 35.97%。

2.2.6 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的 pH 稳定性

在 pH 3–12 的缓冲液中, 分别保存固定化脂肪酶

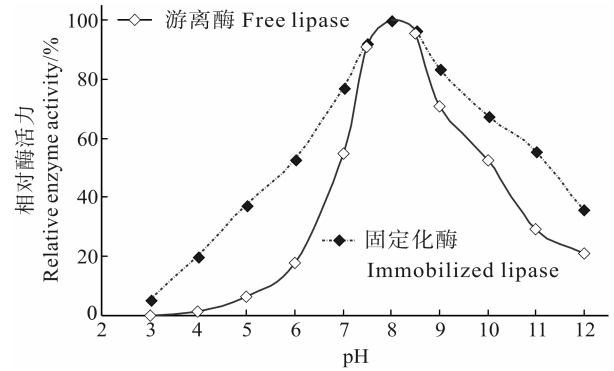


图11 游离脂肪酶和固定化脂肪酶的最适 pH
Fig.11 The optimal pH for the free and immobilized lipase

和游离脂肪酶 4 h 之后, 测定其酶活力。结果见图 12, 在 pH 为 9 时, 游离脂肪酶和固定化脂肪酶有最高的酶活力稳定性, 固定化脂肪酶的酸碱耐受性均优于游离酶, 在 pH 7–10 之间, 游离脂肪酶和固定化脂肪酶活力在处理 4 h 之后, 能够稳定在 80% 以上, 固定化脂肪酶在酸性和碱性较强的溶液中仍能保留 35% 以上的酶活力。经过酶和壳聚糖载体的结合, 提高了酶的酸碱耐受性。

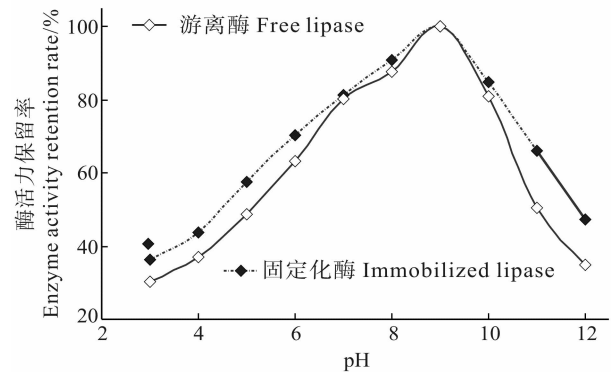


图12 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的 pH 稳定性
Fig.12 The pH stability of the free and immobilized lipase

2.2.7 固定化脂肪酶和游离脂肪酶在有机试剂中的稳定性

将固定化脂肪酶和游离脂肪酶在有机试剂中处理之后, 结果见图 13。固定化之后脂肪酶在不同有机试剂中发生了一些性质上的改变, 在叔丁醇中, 固定化脂肪酶的酶活力保留率较高; 在异丙醇溶液和正丁烷溶液中, 游离酶反而显示出较高的酶活力保留率。这对脂肪酶的应用提供了数据基础, 有助于选择反应体系。

3 结论

选取壳聚糖为固定化的载体, 采用交联吸附法固定化海洋微生物脂肪酶, 根据固定化脂肪酶的活力回

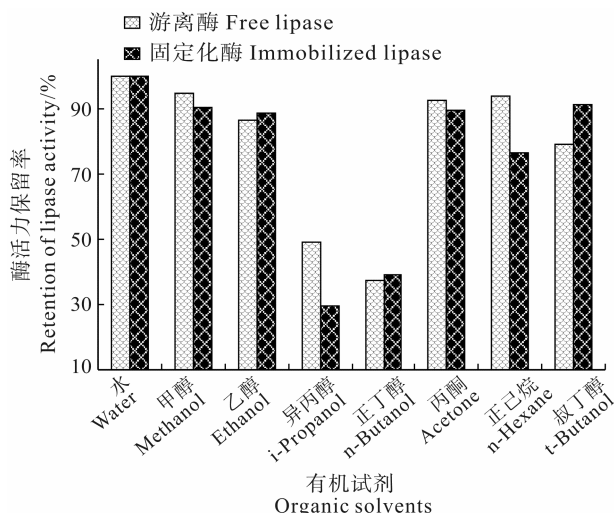


图 13 在有机试剂中游离脂肪酶和固定化脂肪酶的稳定性

Fig.13 The stability in organic solvents of the free and immobilized lipase

收率和蛋白吸附量等指标来检测固定化的效果。壳聚糖的浓度为 2% (m/v)、乙酸浓度为 1% (v/v)、戊二醛的浓度为 0.25% (v/v)、氢氧化钠的浓度为 12% (m/v)、吸附交联时间为 12 h、加入 2 ml (1120 U) 的脂肪酶时, 固定化脂肪酶有最大酶活力, 且酶活力回收率达到 69.4%。固定化脂肪酶的酸碱耐受性、在不同温度和在有有机试剂中的稳定性均大大提高, 固定化脂肪酶贮藏半衰期为 96 d, 而游离脂肪酶的贮藏半衰期是 33 d, 并且固定化脂肪酶重复使用 10 次之后, 酶活力保留率仍高达 65% 以上。

参 考 文 献

- 王金瑾, 赵哈. 壳聚糖固定脂肪酶的方法研究. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2009, 11(6): 53-55
- 王庭, 秦刚. 脂肪酶及其在食品工业中的应用. 肉类研究, 2010(1): 72-74
- 王智, 苟小军, 曹淑桂. 脂肪酶在生物化工中的应用. 成都大学学报(自然科学版), 2003, 22(1): 1-8
- 乔红群, 徐虹, 付闪雷. 脂肪酶产生菌的筛选及其酶性质. 南京化工大学学报, 1998, 20(1): 15-19

- 刘海洲, 吴小飞, 牛佰慧. 脂肪酶在食品工业中的应用与研究进展. 西部粮油科技, 2008, 33(5): 55-57
- 李忠磊, 王跃军, 盛军, 等. Bohaisea-9145 海洋耶氏酵母碱性脂肪酶基因的克隆、异源表达和重组酶酶学性质. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 230-236
- 宋欣, 曲音波. 有机相中脂肪酶催化作用的应用. 微生物学通报, 1999, 26(4): 296-299
- 张艳, 郑媛, 王海英, 等. 不同载体固定化海洋微生物酯酶 ETM-b 的性能比较. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 110-116
- 段晓琛, 盛军, 徐甲坤, 等. 海洋脂肪酶 ADM47601 固定化方法的研究. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1311-1317
- 姚庆龙, 高传福. 碱性脂肪酶在驴马皮制革中的应用研究. 中国皮革, 2006, 35(9): 4-5
- Benjamin S, Pandey A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. Braz Arch Biotechnol, 2001, 44: 213-221
- Chang M, Juang R. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. Enzyme Microb Tech, 2005, 36(1): 75-82
- Chua LS, Mohamad RS. Immobilized lipase-catalyzed resolution of (R, S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. J Mol Catal B: Enzym, 2004, 28: 111-119
- Hatzinikolaou DG, Kourentzi E, Stamatis H. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. J Biosci Bioengineer, 1999, 8(1): 53-56
- Jaeger K, Eggert T. Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13(4): 390-397
- Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. Enzyme Microb Tech, 2004, 35: 126-139
- Kumar S, Kikon K, Upadhyay A. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Express Purif, 2005, 41(1): 38-44
- Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. Biomaterials, 2004, 25(10): 1937-1945
- Veeraragavan K, Colpitts T, Gibbs BF. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. Biochim Biophys Acta, 1990, 1044(1): 26-33

(编辑 冯小花)

Chitosan Immobilization of Lipase from Marine Microorganism YS2071 and Its Enzyme Characteristics

ZHANG Quan^{1,2}, SHENG Jun¹, LIU Junzhong¹, ZHENG Hongfei¹, SUN Mi¹^①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Lipase (EC 3.1.1.3) is one of hydrolases that specifically catalyzes the hydrolysis of triglyceride. It plays an important role in the food improvement, the health care, and the environment protection. The lipase of our interest here is produced by a marine microorganism YS2071 and has high enzymatic capability. Chitosan is a type of biological sources which possesses good biocompatibility and biodegradation. It is a natural, biological, and macromolecular polysaccharide, the solution of which is a non-toxic and functional gel. Therefore, chitosan is an excellent immobilization carrier. The separation and recycling of materials have been a challenge in the industrial production process. In this study we aimed to solve this problem by immobilizing YS2071 lipase on a chitosan microsphere. The properties of the immobilized lipase was compared to the free lipase to verify the immobilization method. The activity of the immobilized enzyme reached the maximum when the conditions were as below: 2% chitosan (*m/v*), 1% acetic acid concentration (*v/v*), 0.25% glutaraldehyde concentration (*v/v*), 12% sodium hydroxide concentration (*m/v*), crosslinking time 12 h, and 2 ml (1120 U) enzyme. The recovered activity of the immobilized lipase was 69.4%. The optimal temperature for the functions of the free lipase and the immobilized lipase was 40°C and 45°C respectively. The optimal pH for both the free lipase and the immobilized lipase was 8.0. It was also showed that immobilization obviously increased the stability of the temperature and pH. After 10-time reuse the recovered enzyme activity was still higher than 65%. The storage half-life of the immobilized lipase was 96 days while it was only 33 days for the free lipase. The free lipase and the immobilized lipase exhibited distinct stabilities in different organic reagents. These results suggested that the immobilized lipase might have great values in the industrial process.

Key words Chitosan; Marine microorganism lipase; Immobilization; Enzyme characters

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn