

脂肪酶固定化技术的研究进展

张闻修¹, 刘丽波^{1,*}, 李 春^{1,*}, 刘 宁^{1,2}, 李思捷¹

(1. 东北农业大学食品学院, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 国家乳业工程技术研究中心, 黑龙江省乳品工业技术开发中心, 黑龙江哈尔滨 150028)

摘要: 脂肪酶是一种羧酸酯水解酶, 被广泛应用于食品、制药、洗涤剂和化妆品工业上。而酶的固定化是在催化过程中提高酶的稳定性和重复利用性的一种技术。本文综述了脂肪酶的固定化以及固定化脂肪酶的酶学性质的研究进展。

关键词: 脂肪酶, 固定化, 吸附, 包埋, 交联, 共价结合

Research progress in immobilized lipase technology

ZHANG Wen-xiu¹, LIU Li-bo^{1,*}, LI Chun^{1,*}, LIU Ning^{1,2}, LI Si-jie¹

(1. College of Food Sciences, Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. National Dairy Engineering & Technical Research Center, Heilongjiang Dairy Industry Technical Development Center, Harbin 150028, China)

Abstract: Lipases are carboxylic ester hydrolases which have been widely used in food, pharmaceuticals, detergents and cosmetics industry. The lipase immobilization is a technology which is developed to improve lipase stability and reusability. The immobilization of lipase and enzymology properties research progress of immobilized lipase were summarized in this paper.

Key words: lipase; immobilized; adsorption; entrapment; cross-linking; covalent binding

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)22-0339-04

脂肪酶是一种羧酸酯水解酶, 能够作用于酰基甘油, 起到释放脂肪酸和甘油的作用^[1]。作为重要的工业用酶广泛应用于食品、制革、饲料、洗涤及油脂化工等领域^[2]。但因脂肪酶昂贵的价格, 以及在回收利用及稳定上的困难使其在工业应用上受到限制。而固定化可以很好的解决这一问题。

酶的固定化就是在催化过程中提高酶的稳定性和重复利用性的一种技术。经固定化后, 脂肪酶具有稳定性高、连续性好、回收方便、易于控制、可反复使用、成本降低等优点^[3], 为大规模的工业应用提供了技术上和经济上的支持。因此酶的固定化技术研究已成为酶应用领域的一个重要研究方向。本文围绕脂肪酶的固定化方法及固定后酶学性质的研究方面进行初步的探讨。

1 脂肪酶的来源

脂肪酶在动植物的各种组织及多种微生物中普遍存在。大多数脂肪酶对不同的底物会表现出不同的特异性, 有超过65种的微生物都能够培养出脂肪酶, 已有多重微生物脂肪酶获得纯化。其中脂肪酶的产生菌中有较深研究的主要有根霉、曲霉、假丝酵母、青霉、毛霉、须霉、假单孢菌、色杆菌等及在医学上有关的金黄色葡萄球菌、钩端螺旋体、粉刺状杆

菌等^[4]。

不同来源的脂肪酶通常具有不同的特异性, 在固定时也有不同的固定化工艺要求。产气肠杆菌脂肪酶及米黑毛霉脂肪酶均可吸附固定在二氧化硅载体上, 在以正丁醇、正己烷等为反应介质催化油脂与乙醇的酯化反应中, 酯化率可达94%。而米曲霉脂肪酶则适于包埋固定于硅胶中, 催化油脂与甲醇反应的酯化率也大于90%。荧光假单胞菌脂肪酶可固定于纤维素薄膜上, 米黑根毛霉脂肪酶可固定于阴离子交换树脂上, 其酯化率均能达到92%。假丝南极酵母脂肪酶固定在丙烯酸树脂上得到的固定化酶的酯化率则能达到96%^[5]。表1列出了几种常用微生物脂肪酶的最适条件, 可作为固定化工艺条件的参考。

表1 微生物脂肪酶种类及其最适条件

Table 1 Types of microbial lipases and their optimum conditions

微生物脂肪酶	最适条件	
	温度(°C)	pH
黑曲霉	25	5.6
白地霉	40	5.0~7.0
假丝酵母	37	6.5
核黄菌	40	8.0~8.5
根霉菌	37	3.5
荧光假单胞菌	41	6.0~9.0
青霉菌	35	7.0
色素细菌	70	6.5

收稿日期: 2013-05-22 * 通讯联系人

作者简介: 张闻修(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学。

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划(2011BAD09B0304)。

2 脂肪酶的固定化方法

对于固定化方法的研究已经进行了几十年,到如今,固定化方法大致可分为两大类,即物理方法和化学方法。物理方法包括吸附和包埋;化学方法包括交联和共价结合。这些固定化方法已被广泛应用到酶稳定性的提高中。如Adriano等^[6]使用不同的固定化方法来固定来自卡门柏青霉的脂肪酶,包括吸附、共价结合及有机溶剂处理等,以获得适于商业使用的脂肪酶。还有将假丝酵母脂肪酶采用物理吸附、交联及共价结合等方法固定在介孔氧化硅上的研究^[7]。各固定方法具有其各自的优缺点,下面就不同固定化方法做一下详细归纳。

2.1 吸附

吸附是通过微小的力将酶吸附到载体表面的作用,比如通过范德华力、疏水作用力及分散力。吸附法是酶固定中最常用的方法,许多有机和无机的载体材料均能用此法固定,如聚丙烯、二氧化钛、硅藻土、大孔树脂、活性炭等。Dong Huaping等^[8]以有机膨润土固定猪胰脂肪酶,固定化酶的水解活性得到提高,固定酶的催化效率也更高。而Robison等^[9]将脂肪酶固定在三种成本较低的蒙脱土载体上,得到固定酶的酯化活性最高为1403U/g。说明吸附固定具有固定条件简单温和、价格低廉且不需要化学添加剂等优点,所得到的固定酶活性也更高。

虽然吸附法对酶的催化活性影响小,但酶和载体之间的连接力较弱,当催化条件比较苛刻时,酶容易从载体上脱落下来,会影响催化效果,污染催化反应产物,也不利于酶的回收再利用。有实验进行了D301树脂吸附和吸附-交联固定脂肪酶的研究^[10],发现吸附交联得到酶活性为35U/mg,而单是吸附固定的酶活性仅为21.4U/mg,这可能就是由于吸附固定的酶发生脱落,使催化时的相对活性降低。

2.2 包埋

酶的包埋是将脂肪酶捕获到聚合物内部空隙或微囊中的方法。卡拉胶、海藻酸钠凝胶等是使用包埋法的主要材料^[11]。有很多以海藻酸钠为载体,包埋固定假丝酵母脂肪酶的研究。一些薄膜材料也可用此法固定,如将脂肪酶包埋固定在六种不同处理的薄膜上,比较各薄膜固定化效果^[12]。另外一些复合载体材料也可用包埋法固定,Okada等^[13]研究了包埋法固定假丝酵母脂肪酶的方法,他们将脂肪酶包埋在壳聚糖-海藻酸盐-CaCl₂复合载体中,固定化酶表现出了更好的稳定性。总的来说,包埋法的固定条件也比较温和,对酶的影响较小,固定酶的活性比较高。

凝胶溶胶包埋法是一种特异的、简单有效的固定酶的方法,能够加强酶的热稳定性,操作稳定性及延长使用寿命。Tomin等^[14]就采用凝胶溶胶的包埋方法将假单胞菌脂肪酶固定在硅藻土中,酶的稳定性得到改善。但包埋也有不足,由于包埋材料的特殊结构使传质易受到限制,因此只有在底物分子量较小时脂肪酶才会发生作用。同时,包埋固定的酶与载体间连接力也较弱,酶容易从载体上脱落,影响酶活性。

2.3 交联

交联指的是通过酶分子之间或酶分子和载体之间的交联耦合作用而形成一个三维网状结构的方法。通过定义描述就可以看出交联固定化酶较稳定,因为蛋白与载体间的相互作用力较强。关于交联方法的应用,Erdemir等^[15]分别使用了三种戊二醛派生物作为交联剂,对脂肪酶进行交联固定,三种交联剂均起到提高酶稳定性作用。也有将脂肪酶以戊二醛为交联剂进行交联法固定的研究,以解决吸附的酶容易浸出的问题^[16]。

交联法的反应条件通常较剧烈,就使酶的活性相对较低。因此交联法通常与其他方法同时使用,以获得较好的固定效果。Wang等^[17]先将假丝酵母脂肪酶通过过滤的方法固定在聚丙烯超滤薄膜上,然后通过戊二醛溶液进行交联。结果显示,超滤和交联结合能大大提高反应速率及酶的使用寿命。另外交联法也可与吸附法共同使用。刘春雷等^[18]就采用X-5大孔树脂和戊二醛进行吸附交联固定脂肪酶,得到的固定化酶活力回收率为62.4%,表现出良好的活力及稳定性。可以发现,交联法在脂肪酶稳定性提高方面起到很大的作用,但是对酶活性影响较大,不太适用于提高酶活性。

2.4 共价结合

共价结合是先将载体上引进一个活泼基团,然后此活泼基团再与酶分子上的某一基团反应形成共价键的方法。这就可以看出,共价固定的酶,酶与载体间的相互作用力较强,在反应中比较稳定。Chang等^[19]使用共价法将脂肪酶固定在聚γ-谷氨酸上,并通过响应面分析来优化固定化工艺条件,得到的最高酶活为1196U/mg蛋白,活性较高,固定酶的稳定性也更好。

共价结合方法也常常与其他方法联合使用,以提高固定化效果。Gloria等^[20]通过共价方法将三种不同脂肪酶先固定在溴化氰活性琼脂糖上,又采用吸附方法将酶固定在疏水性载体辛基琼脂糖上,得到固定酶的活性和选择性较好。也有先采用沉淀聚合方法制备出磁性高分子纳米微球,后通过共价结合来固定脂肪酶的研究^[21],所得固定化酶具有很好的稳定性。虽然共价结合方法得到的固定化酶稳定性很好,但因其制备条件的苛刻,使得固定过程中酶容易失活,而且一些交联剂也是有毒的,不适于食品中的应用。

表2 几种固定方法的比较

Table 2 Comparison of different immobilization methods

性质	吸附	包埋	交联	共价结合
固定酶制备	简单	困难	困难	困难
酶与载体结合力	弱	强	强	强
酶活力	高	高	中	中
底物专一性	不变	不变	有变化	有变化
固定酶的再生	可能	不可能	不可能	不可能
固定化费用	低	低	中	高

3 固定化技术对脂肪酶性质的影响

3.1 对脂肪酶催化活性的影响

大多数的脂肪酶在固定化后其催化活性会降低,这是因为在固定化时,酶分子的空间构象及活性

中心都可能会有所变化,而载体的存在也会阻碍酶的活性中心与反应底物的接触,种种原因可能导致固定化酶的催化活性比游离酶稍低^[22]。曹国民等^[23]以WA20树脂为载体来固定化脂肪酶,游离酶活为300IU/g,而固定后酶活约为165IU/g,只是游离酶活性的55%,有明显的降低。这可能就是因为树脂的存在影响了酶与底物的接触,进而导致固定酶活性的降低。一般情况下,交联法及共价法固定酶的活性会降低的更多。

3.2 对脂肪酶稳定性的影响

通过近年来的研究发现,大多数的脂肪酶在经过固定化后其稳定性都会有所提高。究其原因可能是因为固定化后酶与载体之间或酶分子之间的连接更紧密,能够防止酶分子的变性,同时也抑制了分子的自降解反应^[24]。稳定性的提高主要表现为热稳定性、有机溶剂耐受性、pH稳定性、操作稳定性及贮存稳定性等。金杰等^[25]以二氧化硅纳米材料为载体,采用吸附法对脂肪酶进行固定化。经固定后,脂肪酶的热稳定性比游离酶有了很大的提高,在70℃以下能保持70%以上的酶活力。也有将胞外脂肪酶吸附固定在聚苯乙烯-二乙基聚丙烯载体上的研究^[26],得到的固定化酶对非离子洗涤剂、高温、酸性及中性pH和有机溶剂等条件的耐受性均较游离酶高,表现出更好的稳定性。

稳定性的提高使得脂肪酶在反应中的催化作用发挥的更好,反应后也更易从产物中分离出来。操作稳定性的提高,让固定酶的重复利用成为可能,这也在一定程度上降低了催化反应的成本。

3.3 对脂肪酶最适条件的影响

脂肪酶的最适条件主要包括最适作用温度及最适pH。大多数脂肪酶在固定化后最适温度都会有所升高,这可能与反应的活化能有关,活化能高的反应需在较高的反应温度下其催化效果才会好。Metin等^[27]将假丝酵母脂肪酶固定在环氧基聚合物上,得到游离酶和固定化酶的最适温度分别是35、45℃,固定化酶的最适温度升高了10℃。就是因为固定后脂肪酶的活化能会相对变高,需要温度较高时才会发挥其最佳催化作用。

而脂肪酶最适pH的变化主要是因为固定化对酶分子的表面电荷性质产生了影响,使最适pH发生了偏移,一般来说,固定化后脂肪酶会具有更宽泛的pH耐受范围。如产黄青酶脂肪酶在固定化后,其pH耐受范围从6.5~7.5拓宽成了6.5~8.0^[28],表明固定化后明显增加了酶在中性及碱性区域范围的稳定性,对偏碱性的反应条件催化效果变得更好。

3.4 对米氏动力学常数的影响

米氏动力学常数(K_m)是评价固定化酶活性的一种指标,能够反映出固定化对酶催化活性的影响。因为酶促反应中与酶结合的主要是底物分子,因此,研究酶促反应动力学就首先要阐明反应速度与底物浓度之间的关系,而米氏常数恰能反映这种关系,其一般含义为 K_m 为 $v=1/2V_{max}$ 时,即反应速度等于最大速度1/2时的底物浓度^[24]。

固定化酶的米氏常数会随载体的带电性而发生变化。酶固定于电中性载体时,由于载体的影响会使酶和底物间的亲和力发生变化,从而使表观米氏常数较游离酶的米氏常数有显著升高;而当底物与具有带相反电荷的载体结合后,表观米氏常数则往往会减小^[29]。此外,溶剂中离子强度也对米氏动力学常数有影响,当离子强度升高时,使载体周围的静电梯度逐渐缩小甚至消失,从而影响米氏常数的变化。

4 结论与展望

用固定化酶来进行生物催化已经成为一个热点研究方向,并在制备无污染又经济的能源方面展示出极大的潜力。近年来,酶的固定化技术也在迅速发展,现在,已经研究了各种不同的酶分别固定于不同载体上的方法。固定化方法也在不断地改进完善,在传统方法的基础上,新的固定化技术也需要不断地被开发。更高活性,更好的稳定性及更低成本的固定酶制备技术仍需要不断地去探索和发展。可以预见的是,如果制备固定化酶的成本大大降低了,那么酶的催化应用前景将会变得更加广阔。那么以后固定化酶将会代替化学催化剂,成为催化生化反应的最主要物质。

参考文献

- [1] Rajesh e m, Arthe r, Rajendran r, et al. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters[J]. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2010, 9(7): 1177-1189.
- [2] 刘海洲, 吴小飞, 牛佰慧, 等. 脂肪酶在食品工业中的应用与研究进展[J]. 粮食加工, 2008, 33(5): 55-57.
- [3] 郭立泉, 王红宇. 酶的固定化技术的研究进展[J]. 吉林工商学院学报, 2008, 24(5): 83-87.
- [4] 陈秀林. 脂肪酶固定化的研究概况[J]. 海峡药学, 2007, 19(12): 114-116.
- [5] Ognjanovic n, Bezbradica d, Knezevic j z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solventfree system: Process optimization and the immobilized system stability[J]. Bioresource Technol, 2009, 100(21): 5146-5154.
- [6] Adriano a m, Larissa f, Carvalho a k f, et al. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by different strategies[J]. Enzyme Research, 2011: 1-8.
- [7] Yu Weihua, Fang Mei, Tong Dongshen, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium[J]. Biochemical Engineering, 2013(70): 97-105.
- [8] Dong Huaping, Li Jianfa, Li Yimin, et al. Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite[J]. Chemical Engineering, 2012, 181-182: 590-596.
- [9] Robison p s, Dallago r l, Penna f g, et al. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012(1): 290-294.
- [10] 王燕华, 朱凯, 刘辉, 等. D301树脂固定化假丝酵母脂肪酶[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 2036-2041.

- [11] 王君,曹稳,房星星. 脂肪酶固定化载体材料研究进展[J]. 粮食与油脂,2007(7):14-16.
- [12] Li Weina,Chen Biqiang,Tan Tianwei. Comparative study of the properties of lipase immobilized on nonwoven fabric membranes by six methods[J]. Process Biochemistry,2011(46): 1358-1365.
- [13] Okada t, Mprissey m t. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by immobilized *Candida rugosa* lipase[J]. Food Science,2008,73(3):146-150.
- [14] Tomin a,Weiser d,Hellner g,et al. Fine-tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxysilane precursor systems[J]. Process Biochemistry,2011(46):52-58.
- [15] Erdemir s,Sahin o,Uyanik a,et al. Effect of the glutaraldehyde derivatives of Calix[n]arene as cross-linker reagents on lipase immobilization[J]. Incl Phenom Macrocycl Chem,2009(64): 273-282.
- [16] Gao Siliang,Wang Yujun,Diao Xiang,et al. Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15[J]. Bioresource Technology,2010,101:3830-3837.
- [17] Wang Yujun,Xu Jian,Luo Guangsheng,et al. Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface[J]. Bioresource Technology,2008(99):2299-2303.
- [18] 刘春雷,于殿宇,屈岩峰,等. 吸附-交联法固定化脂肪酶的研究[J]. 食品工业科技,2008(6):104-106.
- [19] Chang s w,Shaw j f,Yang k h,et al. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM[J]. Bioresource Technology,2008,99:2800-2805.
- [20] Gloria f l, Betancor l, Carrascosa a v, et al. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: release of omega-3 fatty acids from fish oil[J]. American Oil Chemistry Society,2012,89:97-102.
- [21] 殷伟庆,张丽. 含锰磁性聚丙烯酰胺-丙烯酸共聚纳米粒子固定脂肪酶的研究[J]. 稀有金属快报,2008,27(6):32-36.
- [22] 刘志勤,宋笛. 脂肪酶固定化及固定化脂肪酶的应用研究进展[J]. 农场品加工·学刊,2012,5:89-92.
- [23] 曹国民,盛梅,高广达. 脂肪酶的固定化及其性质研究[J]. 生物技术,1997,7(3):14-17.
- [24] 李晔. 酶的固定化及其应用[J]. 分子催化,2008,22(1): 86-95.
- [25] 金杰,杨艳红,吴克,等. 二氧化硅纳米材料固定中性脂肪酶的条件优化及其特性[J]. 生物工程学报,2008,25(12): 2003-2007.
- [26] Roberta b, Luciane d a, Augusto s, et al. Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) lipase by adsorption in a packed-bed reactor by response surface methodology[J]. Enzyme Research,2012:1-12.
- [27] Metin a. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Candida Rugosa* lipase onto hydrophobic group carrying polymeric support[J]. The Polymer Society of Korea,2012(13):1026-1033.
- [28] Shafei m s, Allam r f. Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum* [J]. Malaysian Journal of Microbiology,2010,6(2):196-202.
- [29] 崔娟. 用于有机相中催化反应的脂肪酶固定化[D]. 杭州: 浙江大学,2004.

(上接第338页)

- for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*[J]. Journal of Microbiological Methods,2009,78(3):265-270.
- [25] Martínez-Blanch J F,Sánchez G,Garay E,et al. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR [J]. European Food Research and Technology,2011,232(6): 951-955.
- [26] Day T,Tatani S,Notermans S,et al. A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin [J]. Journal of Applied Microbiology,1994,77(1):9-13.
- [27] 何晓华,史贤明. 扩增内标及其在食源性致病菌PCR检测中的应用[J]. 微生物学报,2010,50(2):141-147.
- [28] Wang X,Zhu C,Xu X,et al. Real-Time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples[J]. Food Control,2012,25(1):144-149.
- [29] Halm A, Wagner M, Köfer J, et al. Novel real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in clostridial myonecrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology,2010,48(4):1093-1098.
- [30] Nocker A, Camper A K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide[J]. Applied and Environmental Microbiology,2006,72(3):1997-2004.
- [31] Soejima T,Schlitt-Dittrich F,Yoshida S. Rapid detection of viable bacteria by nested polymerase chain reaction via long DNA amplification after ethidium monoazide treatment [J]. Analytical Biochemistry,2011,418(2):286-294.
- [32] Nocker A, Cheung C Y, Camper A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. Journal of Microbiological Methods,2006,67(2):310-320.
- [33] Nocker A,Mazza A,Masson L,et al. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology[J]. Journal of Microbiological Methods,2009,76(3):253-261.
- [34] Cattani F, Ferreira C, Oliveira S. The detection of viable vegetative cells of *Bacillus sporothermodurans* using propidium monoazide with semi-nested PCR[J]. Food Microbiology,2013,34(1):196-201.
- [35] Rawsthorne H,Dock C,Jaykus L. PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores[J]. Applied and Environmental Microbiology,2009,75(9):2936-2939.