

文章编号:1671-6833(2018)04-0030-06

Fe₃O₄ 磁性壳聚糖微球固定化脂肪酶研究

韩秀丽^{1,2},谷鹏举¹,方书起^{1,2},陈俊英^{1,2}

(1. 郑州大学 化工与能源学院,河南 郑州 450001; 2. 生物质炼制技术与装备河南省工程实验室,河南 郑州 450001)

摘 要: 研究了磁性壳聚糖微球固定化脂肪酶,旨在增加脂肪酶的重复利用率. 利用悬浮交联法制备出粒径为 40~60 μm 的磁性壳聚糖微球,微球经接枝、叠氮化修饰后用于固定化脂肪酶. 通过响应面法考察反应条件对固定化酶的影响,得出最优固定条件:酶浓度 4 mg/mL,反应时间 8.4 h,反应温度 39.3 ℃,pH 值为 7.0. 结果表明,最优条件下载体微球实际载酶量为 64.4 mg/g,与预测值相接近,证明该方法可以用于固定化脂肪酶.

关键词: 磁性壳聚糖微球;叠氮化;脂肪酶

中图分类号: TQ032.41 文献标志码: A doi:10.13705/j.issn.1671-6833.2018.01.014

0 引言

脂肪酶(lipase)全称三酰基甘油水解酶,是一类特殊的酰基水解酶,可在油水界面处催化酯水解、醇解、酯合成、酯交换等有机反应,是目前应用最为广泛的一种酶^[1]. 在其反应过程中具有反应条件温和、耗能低、产物质量高、副反应少、对环境无污染等优点,可用于油脂加工^[2]、乳品制造^[3]、食品添加剂合成^[4]和生生物柴油^[5]等. 然而脂肪酶在应用中的一些问题限制了其使用,如寿命短、游离酶在有机相中不溶解、回收率低、产物与酶的分离困难、价格昂贵^[6]等. 为了解决上述问题,酶的固定化技术应运而生. 壳聚糖是固定化酶的良好材料,分子中存在着丰富的羟基与氨基使其易于进行化学修饰. 酶固定化方法主要有包埋法、吸附法、交联法和共价法. Aybastier 等^[7]利用共价法固定化脂肪酶于微孔苯乙烯-二乙烯苯聚戊二醛共聚物载体上,重复利用 10 批次后仅有 12% 的酶活损失. 磁性纳米颗粒的引入,使得固定化酶的回收更加简便,Khoobi 等^[8]通过物理吸附和共价连接固定化脂肪酶于磁性纳米颗粒上,重复 12 批次后仍具有 80% 的活性. 固定化的酶分子具有一定的游动性,更易与底物接触,使酶活性得到提高. 笔者采用叠氮化方法^[9]对接枝后的磁

性壳聚糖进行修饰,得到叠氮化壳聚糖微球,并利用叠氮化磁性壳聚糖微球来固定化脂肪酶,以催化三丁酸甘油酯水解为催化活性的考察依据,利用响应面分析法优化固定化脂肪酶的工艺条件. 固定化酶过程示意图如图 1 所示.

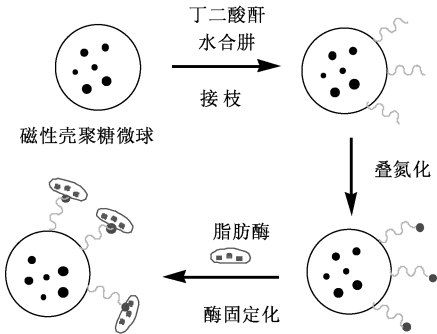


图 1 固定化酶过程示意图

Fig.1 Schematic diagram of immobilized enzyme

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

壳聚糖,脱乙酰度 ≥95%,阿拉丁 C105799; 纳米 Fe₃O₄, 纯度 99.5%, 20 nm, 阿拉丁 I109514;丁二酸酐,纯度 99%,阿拉丁 S104823; 4-二甲氨基吡啶,纯度 99%,阿拉丁 D109207;水合肼 80%,天津市天力化学试剂有限公司;猪胰

收稿日期:2017-05-13;修订日期:2017-09-21

基金项目:河南省科技攻关项目(162102210002);河南省教育厅科学技术研究重点资助项目(14A530005)

作者简介:韩秀丽(1966—),女,河南内黄人,郑州大学教授,博士,主要从事可再生能源和环境污染治理方面研究,

E-mail: xlhan@zzu.edu.cn.

腺脂肪酶 L3126,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;其他试剂,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器

分析天平 AL-204,梅特勒-托利多有限公司;离心机 TGL-16C,上海安亭科学仪器厂;恒温振荡箱 HZ-9311K,太仓华利达实验室设备有限公司;粒度分析仪 BT-9300S,丹东百特仪器有限公司;冷冻干燥机 LGJ-18B,北京四环科学仪器厂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 磁性壳聚糖微球的合成

将 0.6 g 壳聚糖与 0.4 g Fe₃O₄ 溶解于冰乙酸溶液中,超声搅拌。依次将超声后的溶液、导热油和 Span-80 加入到特制锥形瓶中,40 ℃ 在恒温振荡箱中高速振荡 0.5 h。滴加戊二醛进行交联反应 1.5 h,然后滴加 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液至有固体颗粒浮现,继续反应 1 h,产物用正己烷和去离子水冲洗^[10-11]。

1.2.2 磁性壳聚糖微球改性

精确称量 0.10 g 的磁性壳聚糖微球加入到溶有 0.6 g 丁二酸酐和 0.5 g 4-二甲氨基吡啶的吡啶溶液中,45 ℃ 条件下搅拌反应 8 h,结束后用无水乙醇冲洗干净^[12],干燥后,置于 25 mL 甲醇和 12 mL 水合肼的混合液中,50 ℃ 条件下搅拌反应 10 h,反应结束后用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液冲洗干净,再加入到 1 mol/L 的 NaNO₂ 溶液中,反应 1 h 后滴加 0.1 mol/L 的 HCl 溶液,继续反应 0.5 h 用去离子水冲洗^[13]。

1.2.3 脂肪酶的固定化

将改性后的磁性壳聚糖微球置于 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液配制的脂肪酶溶液中,在不同温度下于恒温振荡箱中反应一段时间。固定化结束后用磷酸盐缓冲溶液冲洗固定化酶微球 3 ~ 4 次,在真空冷冻干燥箱中干燥,并在 4 ℃ 条件下保存备用。

1.3 分析方法

1.3.1 载体微球粒径的表征

将制备的磁性壳聚糖微球真空干燥至恒重,取适量于 BT-9300S 激光粒度分析仪中测量其粒径分布。在显微镜下 400 倍放大观察其形貌。

1.3.2 载酶量的检测

将一定量的脂肪酶干粉溶解于 0.5 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中,在 4 ℃ 条件下搅拌孵化

30 min,再将粗酶液用高速离心机在 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清液:酶溶液,采用考马斯亮蓝法^[14]计算载酶量。

1.3.3 酶活性的检测

取定量的酶加入到 10 mL pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中,滴加 1 mL 的三丁酸甘油酯,在 37.5 ℃ 下震荡反应 10 min,立即加入 10 mL 无水乙醇,再滴加两滴酚酞试剂,充分搅拌后用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定到溶液变为粉红为止,记录下 NaOH 溶液消耗量。做空白实验重复上述步骤,但不加酶。计算出酶活性:

$$U = \frac{0.17 \cdot (V_1 - V_0) \cdot 10^3}{m \cdot 10}, \quad (1)$$

式中:V₁ 为滴定结束后 NaOH 消耗量,mL;V₀ 为空白对照组 NaOH 的消耗量,mL;m 为固定化的酶质量,mg。

定义:在特定条件下,每分钟内产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 微球粒径表征

通过 BT-9300S 激光粒度测量仪测定磁性壳聚糖微球的粒径分布,结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出,粒径分布主要集中在 40 ~ 60 μm,在其他粒径区域分布的微球数量明显小于此区域。在显微镜下观察到,载体颗粒基本呈球形分布,如图 3 所示。

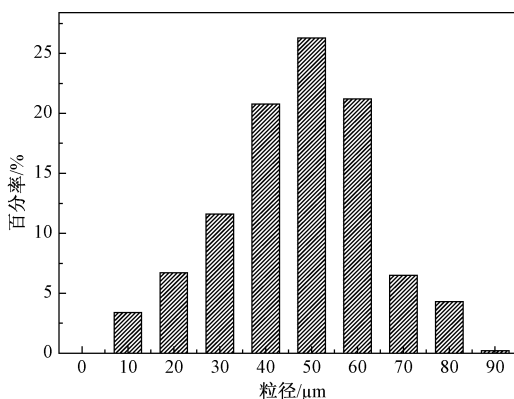


图2 粒径分布图

Fig.2 Distribution of particle size

2.2 响应面实验设计

通过 Design-expert 软件中的 BBD 对实验进行设计,以酶浓度(A)、反应时间(B)、反应温度(C)和 pH 值(D)为考察因素,确定了四因素三水平的 29 个实验组合,以载酶量(Y₁)为响应值,考察酶负载的最优化工艺条件结果见表 1。

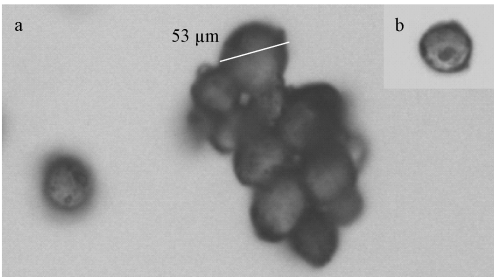


图3 400 倍显微镜下载体颗粒形貌

Fig.3 400 times the particle morphology of the microscope

2.3 对载酶量的分析

利用 Design Expert 8.0 软件对响应面设计中的响应值进行分析,得出载酶量与各考察因素之间关系式,其回归方程为:

$$Y_1 = 60.52 + 12.02A + 14.67B + 1.61C + 0.52D + 4.2AB + 1.47AC + 0.25AD - 0.10BC - 0.25BD - 0.20CD - 13.93A^2 - 13.09B^2 - 8.05C^2 - 8.71D^2.$$
 (2)

对方程(2)求偏导,得出最优的酶固定化工艺条件:酶浓度为 4 mg/mL,反应时间为 8.4 h,反应温度为 39.3 ℃,pH 值为 7.0,酶负载量预测值为 68.6 mg/g.在优化条件下,将磁性壳聚糖微球用于固定化脂肪酶,得到的酶负载量为 64.4 mg/g.

模型的方差分析如表 2 所示, P 值是无显著影响的概率, $P < 0.05$ 视为模型是显著的.该模型 P 值如图 4 所示. $P < 0.000 1$ 表示模型拟合效果非常显著.从显著程度上分析各因素对载酶量的影响,影响载酶量大小的因素顺序为:反应时间 > 酶浓度 > 反应温度 > pH 值;两种因素的交互影响立体图从图 4 中也可看出,在交互

表 1 响应面试验设计和结果

Tab.1 The design and results of response surface analysis

次数	酶浓度 /(mg· mL ⁻¹)	反应时 间/h	反应温 度/℃	pH 值	载酶量 /(mg· g ⁻¹)
1	-1(1)	-1(1)	0(37.5)	0(7)	12.7
2	1(5)	-1(1)	0(37.5)	0(7)	26.4
3	-1(1)	1(10)	0(37.5)	0(7)	32.8
4	1(5)	1(10)	0(37.5)	0(7)	63.3
5	0(3)	0(5.5)	-1(25)	-1(4)	42.3
6	0(3)	0(5.5)	1(50)	-1(4)	45.3
7	0(3)	0(5.5)	-1(25)	1(10)	43.2
8	0(3)	0(5.5)	1(50)	1(10)	45.4
9	-1(1)	0(5.5)	0(37.5)	-1(4)	23.8
10	1(5)	0(5.5)	0(37.5)	-1(4)	49.2
11	-1(1)	0(5.5)	0(37.5)	1(10)	26.9
12	1(5)	0(5.5)	0(37.5)	1(10)	51.3
13	0(3)	-1(1)	-1(25)	0(7)	22.3
14	0(3)	1(10)	-1(25)	0(7)	53.1
15	0(3)	-1(1)	1(50)	0(7)	25.7
16	0(3)	1(10)	1(50)	0(7)	56.1
17	-1(1)	0(5.5)	-1(25)	0(7)	25.3
18	1(5)	0(5.5)	-1(25)	0(7)	47.5
19	-1(1)	0(5.5)	1(50)	0(7)	26.2
20	1(5)	0(5.5)	1(50)	0(7)	54.3
21	0(3)	-1(1)	0(37.5)	-1(4)	23.8
22	0(3)	1(10)	0(37.5)	-1(4)	53.2
23	0(3)	-1(1)	0(37.5)	1(10)	24.3
24	0(3)	1(10)	0(37.5)	1(10)	52.7
25	0(3)	0(5.5)	0(37.5)	0(7)	58.8
26	0(3)	0(5.5)	0(37.5)	0(7)	61.1
27	0(3)	0(5.5)	0(37.5)	0(7)	61.6
28	0(3)	0(5.5)	0(37.5)	0(7)	60.9
29	0(3)	0(5.5)	0(37.5)	0(7)	60.2

注:括号内为实际值;括号前为水平值.

表 2 回归模型的方差分析

Tab.2 Analysis of variance for selected factorial model

方差来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	6 628.37	14	473.45	355.53	<0.000 1	非常显著
A	1 735.21	1	1 735.00	1 303.00	<0.000 1	
B	2 581.33	1	2 581.33	1 938.37	<0.000 1	
C	31.04	1	31.04	23.31	0.000 3	
D	3.20	1	3.20	2.41	0.143 2	
AB	70.56	1	70.56	52.98	<0.000 1	
AC	8.70	1	8.70	6.53	0.022 8	
AD	0.25	1	0.25	0.19	0.671 4	
BC	0.04	1	0.04	0.03	0.864 9	
BD	0.25	1	0.25	0.19	0.671 4	
CD	0.16	1	0.16	0.12	0.734 0	
失拟项	13.94	10	1.39	1.18	0.472 0	不显著
残差	18.64	14	1.33	—	—	

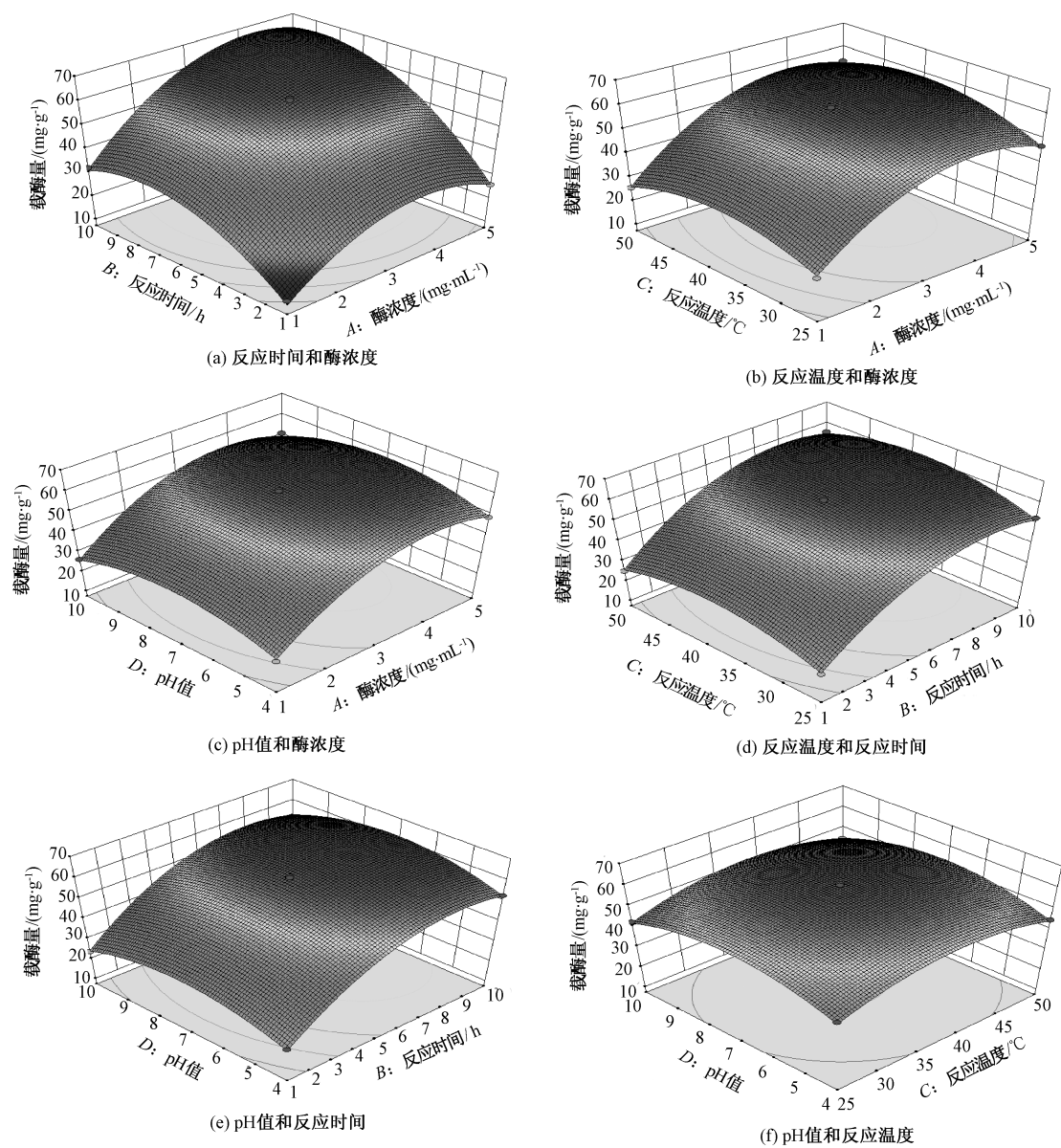


图4 交互作用的响应面立体图

Fig.4 Response surface(3D) and contour plots of operating factors

项中酶浓度(A)和反应时间(B)、酶浓度(A)和反应温度(C)对酶负载量影响的交互作用较为明显. 回归模型的可信度也可用复相关系数检验拟合程度,如表3中模型的复相关系数为0.997 2,表明模型与实验效果具有较好的相关性;变异系数为2.7%,表明实验操作具有较高的可靠性.

表3 模型可信度分析结果

参数	数值
平均数	42.4
复相关系数 R^2	0.997 2
校正后的 R^2	0.994 4
变异系数/%	2.7
信噪比	64.3

2.4 交互作用分析

酶浓度与其他3种因素相比,是影响酶负载量的最重要因素,从表2可以看出,酶浓度与反应时间的交互影响 F 值为52.98,酶浓度与反应温度的交互影响 F 值为6.53,与其他几种因素的 F 值相比较都较大,两者 P 值分别为: <0.000 1、0.022 8,说明酶浓度与反应时间和反应温度对结果的交互影响较显著.

从图4(a)可看出,当酶浓度一定时,酶的负载量随着反应时间的延长而持续增大. 反应时间一定时,脂肪酶固定量随着脂肪酶浓度增加而快速增加,而当脂肪酶初始浓度大于3.3 mg/mL时,脂肪酶固定量随脂肪酶浓度增加而缓慢增加. 这主要与载体表面能和脂肪酶结合的活性基团数

量有关. 当脂肪酶浓度低于 3.3 mg/mL 时, 脂肪酶的量少于载体表面的活性基团, 因此酶的负载量随着浓度的增大而迅速增大; 当脂肪酶浓度高于 3.3 mg/mL 时, 脂肪酶的量高于载体表面的活性基团的量, 使得载酶量趋于饱和.

从图 4(b) 中可看出, 当酶浓度一定时, 反应温度对酶负载的影响并不大, 只是在很小的范围内先增大后减小, 这是因为随着反应温度的升高, 减少了酶扩散的限制作用, 使酶分子能够更快地与载体发生作用, 加快固定进程. 当反应温度一定时, 载酶量随着酶浓度的增大先增大后减小.

2.5 重复性检测

按照得到的最优化条件酶浓度 4 mg/mL, 反应时间 8.4 h, 反应温度 39.3 °C, pH 值为 7.0, 对制备出的叠氮化磁性壳聚糖进行 5 次脂肪酶固定化重复实验, 测其载酶量平均值为 64.4 mg/mL, 与理论预测值相接近, 说明该模型可用于固定化酶实验. 对制得的固定化脂肪酶进行重复性实验, 即重复测定酶活实验(按照 1.3.3 中酶活测定方法), 反应完成后采用外加磁场的方法将固定化酶吸附到反应容器底部, 与反应液分离后再加入乙醇溶液测定酶活, 并以第一次测定的酶活作为初始酶活(100%). 固定化脂肪酶与反应液分离后用磷酸盐缓冲溶液冲洗 3 次, 再进行重复测定. 实验测得重复 5 次后酶活性为初始活性的 75% 左右, 如图 5 所示.

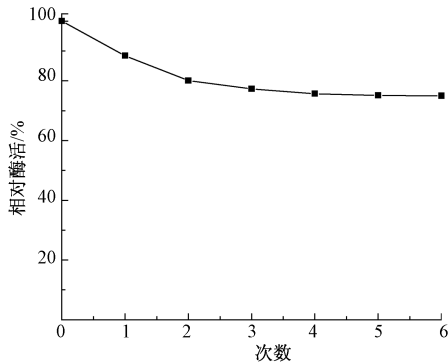


图 5 固定化脂肪酶重复性检测

Fig.5 Repeatability test of immobilized lipase

3 结论

(1) 合成了具有磁性的壳聚糖微球并对微球进行化学修饰, 引入叠氮基团交联脂肪酶, 制备出回收简便的磁性壳聚糖微球固定化脂肪酶.

(2) 利用响应面分析法对实验条件进行优化, 得出最优化的酶负载工艺条件, 为脂肪酶的固定化研究找到一条新路径.

参考文献:

[1] 曹茜, 冯凤琴. 微生物脂肪酶的研究进展及其在食品中的应用[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 136-143.

[2] LIU T, ZHAO Y, WANG X, et al. A novel oriented immobilized lipase on magnetic nanoparticles in reverse micelles system and its application in the enrichment of polyunsaturated fatty acids [J]. Bioresource technology, 2013, 132(7): 99-102.

[3] 薛海晓. 脂肪酶与脂肪酸对羊乳膈味影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院农产品加工研究所, 2014.

[4] 戴清源, 朱秀灵. 非水相中脂肪酶催化合成糖酯类食品添加剂的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 385-389.

[5] BABAKI M, YOUSEFI M, HABIBI Z, et al. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t-butanol and blue silica gel contents [J]. Renewable energy, 2016, 91: 196-206.

[6] POWELL L W. Developments in immobilized enzyme technology[J]. Biotechnol and genetic engineering review, 1984, 2(1): 409.

[7] AYBASTIER Ö, DEMIR C. Optimization of immobilization conditions of thermomyces lanuginosus lipase on styrenedivinylbenzene copolymer using response surface methodology[J]. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 2010, 63(3/4): 170-178.

[8] KHOobi M, MOTEVALIZADEHS F, ASADGOL Z, et al. Polyethyleneiminemodified superpara -magnetic Fe3O4 nanoparticles for lipase immobilization: characterization and application[J]. Materials chemistry and physics, 2015, 15(1): 77-86.

[9] HICKE H G, BOHME P, BECKER M, et al. Immobilization of enzymes onto modified polyacrylonitrile membranes: Application of the acyl azide method [J]. Journal of applied polymer science, 1996, 60(8): 1147-1161.

[10] 覃晓. 磁性壳聚糖微球的制备及其对血管紧张素转化酶抑制肽的吸附研究[D]. 南宁: 广西大学化学化工学院, 2014.

[11] 周敬豪. 磁性壳聚糖微球的制备及其分离降血压肽的研究[D]. 南宁: 广西大学化学化工学院, 2013.

[12] 张猛. 载药栓塞微球的制备及控释性能研究[D]. 无锡: 江南大学化学与材料工程学院, 2014.

[13] 王书香, 武金霞, 张迎贺, 等. 功能基化聚丙烯酸甲酯固定化青霉素酰化酶[J]. 功能高分子学报, 2000, 13(4): 389-393.

[14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing

the principle of protein-dye binding [J]. Analytical

biochemistry, 1976,25 (1): 248 – 254.

Study on Immobilization of Lipase with Fe₃O₄ Magnetic Chitosan Microspheres

HAN Xiuli^{1,2}, GU Pengju¹, FANG Shuqi^{1,2}, CHEN Junying^{1,2}

(1. School of Chemical And Energy Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Biomass Refining Technology and Equipment Engineering Laboratory of Henan Province Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to increase the utilization rate of lipase, the immobilization of lipase by azidation magnetic chitosan was investigated. The magnetic chitosan microspheres with particle size of 40 ~ 60 μm were prepared by suspension crosslinking method. The microspheres were modified by grafting and azide. Response surface methodology was used to investigate the effect of reaction conditions on the immobilized enzyme, and the optimum conditions for lipase immobilization were concentration of enzyme 4 mg/mL, reaction time 8.4 h, reaction temperature 39.3 °C and the pH 7.0. In the optimum conditions, the immobilized enzyme amount of magnetic chitosan microspheres was 64.4 mg/g, with the actual value showing a good fit to the predicted value. The results suggested that this method could be used to immobilized lipase.

Key words: magnetic chitosan microsphere;azidation;lipase

(上接第 11 页)

Study on Stress of Overhead Steel Core Aluminum Wire Strand Considering the Effect of Temperature Field

ZHANG Meng, ZHANG Yuying, ZHAO Guifeng, XIAO Yu

(School of Civil Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: An accurate understanding of the stress distribution of each layer of ACSR in the temperature field can provide theoretical basis for the safety design and fatigue analysis of overhead conductors. Based on the properties of ACSR materials and its collaborative deformation characteristics, the relationship between stress and temperature of wire strands is studied by theoretical analysis and finite element simulation. And the effects of average temperature and radial temperature difference on the stress of outermost aluminum strands were analyzed. The results showed that when the radial temperature difference was not considered, the stress of aluminum strand decreased with the increase of temperature. While the stress of steel core increases with the increase of temperature; when the radial temperature difference was considered, the outer aluminum strand stress increased with the increase of temperature difference, and steel core aluminum strand internal stress decreased with the increase of temperature difference. When the temperature reached 20°C, the outer layer of aluminum stress increased about 49%.

Key words: steel core aluminum wire; finite element; temperature field; radial temperature difference; layered stress