文章编号：1001－7631（2008）05－0455－06

纳米晶镁铝水滑石固定化脂肪酶性质研究

曾虹燕[1]　邓　欣[1,2]　廖凯波[1]　夏　葵[1]

（1. 湘潭大学化工学院生物技术研究所，湖南　湘潭　411105；
2 中国科学院西双版纳热带植物园，云南　昆明　650223）

摘要： 以阴离子型层状材料纳米晶镁铝水滑石为载体通过直接吸附对脂肪酶进行固定，考察了各因素对酶固定化的影响，优化了固定化条件。研究表明，脂肪酶的较优固定化条件为载体用量0.32 g/mL（720 U/mL 酶液），30～35 ℃，pH 值7.5，负载 6～7 h，制得的固定化酶表观酶活达 725 U/g。游离酶和固定化酶的水解活化能分别为5.45 kJ/mol 和16.31 kJ/mol，游离酶和固定化酶的表观失活活化能分别为20.28 kJ/mol 和29.02 kJ/mol，固定化酶较游离酶稳定。

关键词： 酶固定化；脂肪酶；镁铝水滑石；载体

中图分类号： O643；Q55　　**文献标识码：** A

脂肪酶是重要的工业用酶，能在油-水界面上催化酯水解、醇解、手性化合物的拆分、酯交换，以及酯、内酯、多肽和高分子聚合物等的合成反应，因而在食品、医药、皮革和化工等领域有着广泛的应用[1~3]。但游离酶在反应过程中易结块，不可重复使用，产品分离困难。将酶固定在载体上，可扩大其与底物的接触面积，有利于底物分子的扩散，提高酶的热力学稳定性，调节和控制酶的活性和选择性，有利于在有机溶剂中的反应，且易分离和重复使用[4]。脂肪酶的固定化方法大致分为四类：吸附法、共价法、交联法和包埋法。共价法和交联法的优点是酶与载体结合牢固，不易脱落，稳定性较高，但固定化操作较复杂，易造成酶失活。包埋法的酶稳定性高，固定化条件温和，保持酶的原有结构，但只适用小分子的底物和产物。采用吸附法时，酶与载体作用力较弱，酶易脱落，但载体选择范围较广，固定化操作过程简单，如果选择好载体，可大大提高其稳定性[5,6]。

纳米晶镁铝水滑石是一类具有广泛应用前景的无机层状材料。由于无机材料具有易得、成本低廉和无毒等特点，在固定化酶方面的应用越来越受到重视[7]。用纳米材料作为酶的载体，与传统的载体相比，具有良好的生物相容性，较大的比表面积和较小的颗粒直径，能有效提高载酶量，因具有很小的扩散限制而能在载溶液中稳定存在，且易于在其表面偶联特异性的配体，调控酶的结构和功能。纳米材料作为一种新型的酶固定化载体，已成功应用于多种酶的固定化[11]。目前，以纳米晶水滑石作载体固定化脂肪酶国内外还尚未有报道，本研究将重点以自制的纳米晶水滑石[8]作为固定化酶的载体，摸索出一套适宜的固定化脂肪酶方法，优化其固定化条件，并探讨脂肪酶米氏常数、水解活化能和失活活化能。

1　实验部分

1.1　固定化脂肪酶的制备

实验用面包酵母（*Saccharomyces cerevisiae* DX213，CCTCC NO：M207082）脂肪酶，实验室自产，酶活 980 U/g；纳米晶镁铝水滑石实验室自产[8]；其它试剂均为分析纯。

收稿日期： 2008-03-25；**修订日期：** 2008-08-07

作者简介： 邓　欣（1982－），男，硕士研究生；曾虹燕（1964－），教授，博士生导师，通讯联系人。E-mail：hyzeng@xtu.edu.cn

基金项目： 国家 863 项目（2003AA214061）

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

称取一定量酶粉，用浓度为0.1 mol/L，pH 值为8.0的磷酸盐缓冲液配成酶活为 720 U/mL 的酶液，向装有1.6 g 载体的三角瓶中加入 5 mL 配制好的酶液，在摇床上振荡一定时间使载体固定化脂肪酶；然后加 20 mL 冷丙酮，用布氏漏斗过滤，再用冷丙酮洗涤固定化脂肪酶，直至洗涤液不含脂肪酶，冷冻干燥，得固定化脂肪酶，4 ℃冰箱中保存。

1.2 游离酶和固定化酶水解活力的测定

采用经典橄榄油乳化法测定脂肪酶的酶活[9]。在 37 ℃反应 15 min，pH 值为7.5的缓冲液以每 1 min水解出 1 μmol 的脂肪酸的酶量为一个游离脂肪酶活力单位（U）。采用相同方法测定固定化脂肪酶活力（U/g 载体）。固定化酶或溶液酶的相对活力是指在同组实验中活力最高的为 100，与其它的溶液酶或固定化酶的活力与之相比，以百分数表示。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶固定化

2.1.1 不同载体上酶的固定化

以0.32 g/mL（酶液）的载体量于酶液中，pH 值7.5，30 ℃下吸附 6 h，考察不同载体的固定化脂肪酶酶活，结果见图 1。结果表明，纳米晶镁铝水滑石固定效果最好，固定化酶活为 725 U/g。这是因为实验采用典型的 CO_3^{2-} 镁铝水滑石（Mg 与 Al 物质的量比为4.0），层间距约0.76 nm，其层板结构及板间距适于酶分子进入[7]，使其对酶分子具有良好的亲和性，有利于保持酶活性。本研究选定纳米晶镁铝水滑石作为固定化脂肪酶载体。

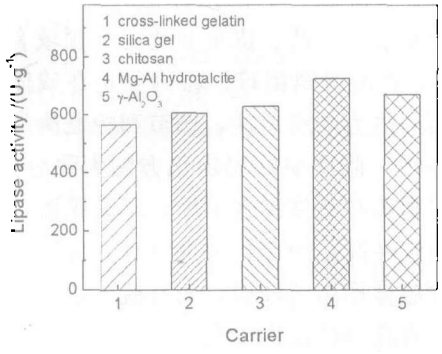

图 1 不同载体的固定化酶酶活
Fig. 1 Activity of immobilized lipases on different carriers

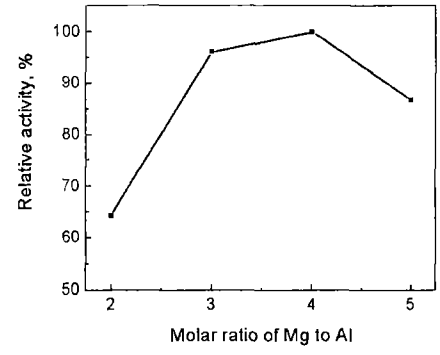

图 2 Mg 与 Al 比对脂肪酶固定化的影响
Fig. 2 Effects of molar ratio of Mg to Al on lipase immobilization

2.1.2 Mg 与 Al 比的影响

纳米晶镁铝水滑石载体的 Mg 与 Al 比越高，载体的碱性就越强，而脂肪酶的适宜环境呈弱碱性，故层板间适当的碱性对酶的活性是有利的。同时，Mg 与 Al 比越小，层板的 Al^{3+} 含量越大，层板电荷密度也越大，水滑石的相邻铝八面体增加，部分生成 $Al(OH)_3$，这种结构不利于酶活力的维持，故需选择 Mg 与 Al 比较为合适的水滑石作为固定化载体[7]，于是考察 Mg 与 Al 物质的量比对脂肪酶固定化的影响，结果见图 2。可知，Mg 与 Al 比为4.0时，固定化酶酶活最高，故实验选用 Mg 与 Al 为4.0的水滑石作为固定化酶的载体。

2.1.3 载体量对酶固定化的影响

载体量对固定化酶活性有较大影响，给酶量一定时，载体越少，载体结合酶越充分，对固定化有利；另一方面，随着载体负载酶量的增大，酶分子的空间位阻增大，使酶活性中心构象发生改变，同时底物与产物不能及时扩散，造成酶活性降低。为确定一个较合适的载体结合酶量，在 30 ℃，pH 值7.5的条件下，将 5 mL 脂肪酶上清液（酶活为 720 U/mL）中分别加入不同量的纳米晶镁铝水滑石固定 6 h，考察载体量对酶固定化的影响，结果见图 3。由图 3 可知，随着载体纳米晶镁铝水滑石量

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的增加，酶活迅速增大，当载体量为0.32 g/mL（酶液）时，固定化脂肪酶酶活最高，为 725 U/g，继续增加载体用量时，酶活又逐渐降低。

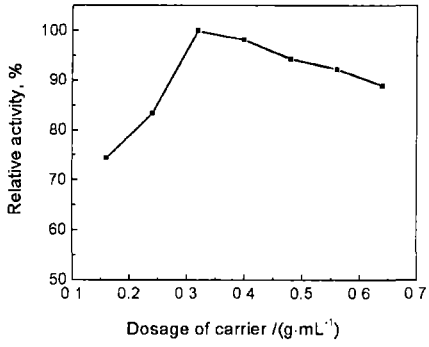

图 3　载体量对脂肪酶固定化的影响

Fig. 3　Effect of carrier dosage on lipase immobilization

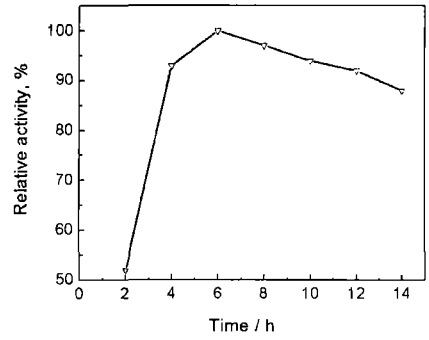

图 4　吸附时间对酶固定化的影响

Fig. 4　Effect of absorption time on lipase immobilization

2.1.4　吸附时间对酶固定化的影响

载体量为0.32 g/mL，在 30 ℃，pH 值7.5的条件下磁力搅拌，定时测定酶活，结果见图 4。在 2～4 h时，固体化酶活随时间迅速升高，随着吸附时间延长，固体化酶活缓慢升高，吸附时间进一步延长，载体酶活略有降低。因为固定化时间过长，载体吸附逐渐达到饱和，载体中的酶分子进入孔内，彼此间发生相互作用，使得孔道堵塞，反应物分子只能在孔口及外表面处与酶接触，有效反应界面减小，从而使载体酶活略有下降，但固定化时间过短，载体吸附不充分，酶的吸附量有限，且多集中于水滑石载体层板外部或孔口处，载体酶活及稳定性低，所以吸附时间为 6～7 h 较合适。

2.1.5　pH 值对酶固定化的影响

在酶固定化过程中，酶和载体置于缓冲液中，缓冲液的 pH 值可改变酶分子和固定化载体的离子化状态，而酶作为一种蛋白质，当溶液 pH 值超出一定范围时，其微观结构会发生变化[10]。在其他条件不变情况下，考察了 pH 值对酶固定化的影响，结果见图 5。当 pH 值为 5 时，所得固定化酶酶活比较低，主要是因为水滑石载体呈碱性。当 pH 值低于6.0时，会造成载体溶胀，载体层状结构被破坏，载体呈粘稠状[7]，从而影响了酶与底物的传递与传质。当 pH 值为7.5时，固定化酶酶活达最大值 725 U/g。随着 pH 值继续增大，载体的吸附酶量下降，因为溶液碱性较大时（pH 值大于8.5），酶部分失活，所以酶活性有所下降。故合适的固定化 pH 值为7.5。

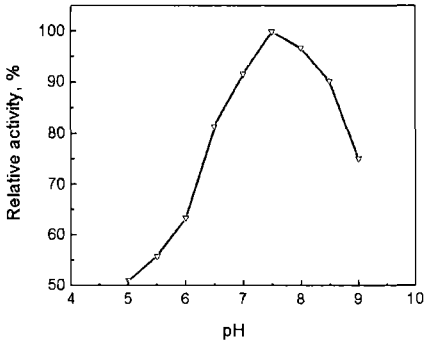

图 5　缓冲液 pH 值对酶固定化的影响

Fig. 5　Effect of buffer solution pH on lipase immobilization

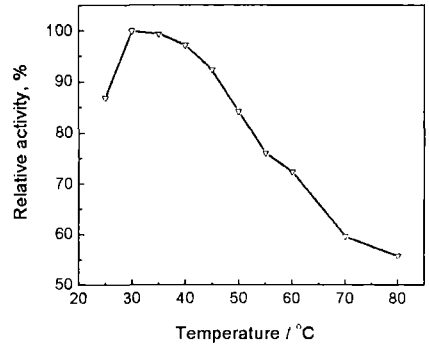

图 6　温度对酶固定化的影响

Fig. 6　Effect of temperature on lipase immobilization

2.1.6　温度对酶固定化的影响

温度影响分子热运动的速度，在相同的固定化条件下，它将直接影响酶吸附到载体上的效率，而且高温还可以导致蛋白质变性，甚至失活，因此酶在固定化时温度的选择十分重要。从图 6 可知，在

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

上述最优条件下，温度对固定化酶活性的影响很大。温度太低，载体与酶的结合率小，酶活较低，在温度低于 30 ℃时，酶活随温度升高而提高；在 30～35 ℃时，吸附作用最为明显，酶活性最高；温度超过 35 ℃后，酶活性呈下降趋势，尤其在 40 ℃以上，酶活性急剧降低，所以固定化温度以30～35 ℃为佳。

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 固定化酶最适 pH 值

在 40 ℃下，将固定化酶溶于不同 pH 值的缓冲液中，测定酶活力，结果见图 7。从图 7 知，在 pH 值为6.5～9.0时，固定化酶的相对酶活均在 80%以上，而游离酶在 pH 值为6.5～8.0时，相对酶活均在 80%以上，可见固定化酶保持较高酶活的 pH 值范围明显比游离酶 pH 值范围宽，说明酶固定化后的 pH 值耐受性大大增强。缓冲溶液 pH 值为8.0时，固定化酶活最高（为 725 U/g），而游离酶在 pH 值为7.5时，酶活最高（645 U/mL），比游离酶最适反应 pH 值提高0.5。主要是由于固定化酶以水滑石为阴离子型载体，所以分配效应将使载体内的 H^+ 的局部浓度高于总体浓度，从而导致固定化酶的活力的 pH 值曲线向碱性方向有所偏移。结果表明，固定化脂肪酶最适的 pH 值8.0。

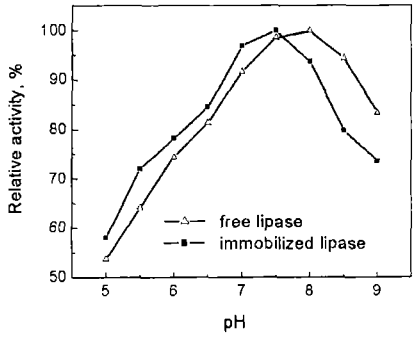

图 7 缓冲液 pH 值对脂肪酶活性的影响
Fig. 7 Effect of buffer solution pH on lipase activity

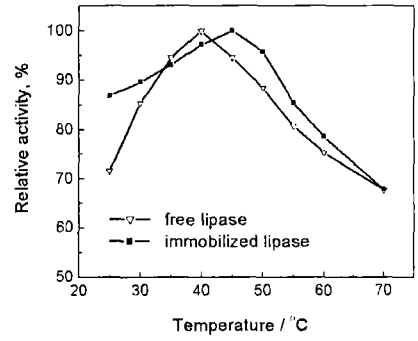

图 8 温度对脂肪酶活性的影响
Fig. 8 Effect of temperature on lipase activity

2.2.2 固定化酶最适温度

在 pH 值8.0环境中，将固定化酶置于不同温度下，测定固定化脂肪酶酶活，结果见图 8。从图 8 可知，温度在 25～55 ℃时，固定化酶相对酶活均在 85%以上，而游离酶在 30～50 ℃时，相对酶活均在 85%以上，固定化酶保持高酶活温度范围明显比游离酶 pH 值范围加宽，说明固定化酶的热稳定性大大增强；在温度低于 45 ℃时，固定化酶酶活随温度的升高缓慢升高，固定化酶的最适温度为 45 ℃，较游离脂肪酶最适温度提高了 5 ℃。其原因可能是酶蛋白固定在载体上，其构象会更加稳定，耐热性随之提高。实验表明，脂肪酶经纳米晶镁铝水滑石固定化后，对热的稳定性有明显的提高，有利于固定化酶在需较长时间高温的酶催化反应中应用。

2.2.3 固定化酶米氏常数

取不同浓度的橄榄油乳化液（[S] 为橄榄油浓度），分别加入固定化酶和游离酶，测定两种酶水解橄榄油的反应初速率（V_0），用 Lineweaver-Burk 法作双倒数图，结果见图 9。由图 9 求得固定化酶和游离酶的米氏常数 K_m 值分别为1.0 mg/mL 和3.186 mg/mL。K_m 值越小，其酶活性越高，反应速率越快。固定化酶 K_m 值较游离酶 K_m 值小，说明固定化酶与底物的亲和力较游离酶大，酶活性高。

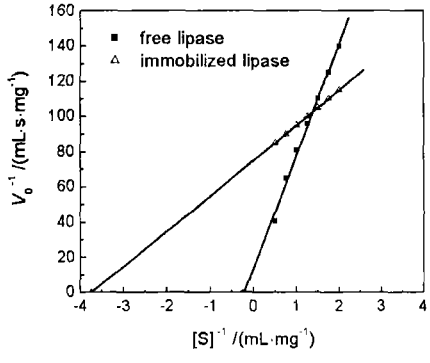

图 9 固定化酶和游离酶的米氏常数 K_m
Fig. 9 Michaelis constant of immobilized and free lipase

2.2.4 固定化酶表观活化能

从图 8 知，游离酶在 40 ℃时酶水解活力最高

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(650 U/mL)，固定化酶在 45 ℃时酶水解活力最高(725 U/g)，固定化酶和游离酶在温度超过 45 ℃时酶活显著降低。用图 8 中固定化酶和游离酶酶活数据以 Arrhenius 方程（$A = A_0\exp(-E_a/RT)$）作图，结果见图 10。根据图中直线的斜率计算出游离酶和固定化酶的水解活化能分别为5.45 kJ/mol和16.31 kJ/mol，游离酶和固定化酶的失活活化能分别为－20.28 kJ/mol 和－29.02 kJ/mol。可见游离酶对温度的敏感性比固定化酶大，脂肪酶固定化后其耐受性大大增强，且固定化酶稳定性高，游离酶较固定化酶易失活。

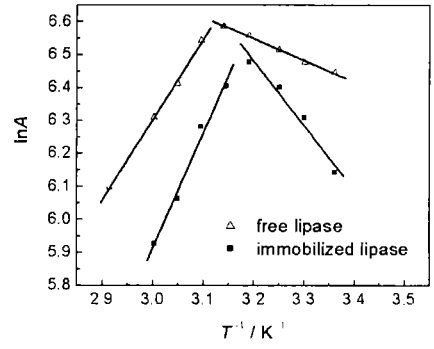

图 10　游离酶和固定化酶的 Arrhenius 关系
Fig. 10 The Arrhenius relatioships for free and immobilized lipase

3 结　论

a）在实验条件下纳米晶水滑石固定化脂肪酶的合适条件为载体量0.32 g/mL（酶液），pH 值 7.5，温度 30～35 ℃，吸附 6～7 h，在此条件下，固定化脂肪酶活为 725 U/g。

b）固定化酶与底物的亲合力较游离酶大，酶活性高。固定化酶和游离酶的米氏常数 K_m 值分别为1.0 mg/mL 和 3.186 mg/mL；游离酶和固定化酶表观水解活化能分别为 5.45 kJ/mol 和 16.31 kJ/mol；游离酶和固定化酶的表观失活活化能分别为－20.28 kJ/mol 和－29.02 kJ/mol，固定化酶较游离酶稳定。

参考文献：

1 Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, et al. Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17 (3－5): 133～142

2 陈志锋，吴　虹，宗敏华. 固定化脂肪酶催化高酸废油脂酯交换生产生物柴油. 催化学报，2006，27 (2)：146～150
Chen Zhifeng, Wu Hong, Zong Minhua. Transesterification of Waste Oil with High Acid Value to Biodiesel Catalyzed by Immobilized Lipase. Chinese Journal of Catalysis, 2006, 27 (2): 146～150

3 唐良华，夏黎明，苏　敏. 微生物脂肪酶分子改造研究进展. 生物技术，2003，13 (3)：42～44
Tang Lianghua, Xia Liming, Su Min. Progress in Research of Molecular Transformation of the Lipase. Biotechnology, 2003, 13 (3):42～44

4 Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, et al. Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flolp Flocculation Functional Domain. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (9): 4517～4522

5 刘新喜. 脂肪酶固定化方法的研究进展. 河北师范大学学报（自然科学版），2001，25 (3)：370～373
Liu Xinxi. Review of the Method about Lipase Immobilization. Journal of Hebei Normal Univesity (Natural Science), 2001, 25 (3):370～373

6 Kazuhiro B, Masaru K, Takeshi M. Whole Cell Biocatalyst for Biodiesel Fuel Production Utilizing *Rhizopus Oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles. Biochemical Engineering Journal, 2001, 8 (1): 39～43

7 籍　宏，王艳辉，马润宇. 水滑石固定化木瓜蛋白酶制备的研究. 北京化工大学学报（自然科学版），2004，31 (1)：26～29
Ji Hong, Wang Yanhui, Ma Runyu. Preparation of Immobilized Papain on LDHs. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2004, 31 (1): 26～29

8 邓　欣，曾虹燕，冯　震. 纳米晶镁铝水滑石制备机理及抗毒性研究. 功能材料，2007，45 (5)：965～971
Deng Xin, Zeng Hongyan, Feng Zhen. The Preparation Mechanism and Anti-Toxicity study on Nanocrystalline Mg-Al Hydrotalcite. Journal of Functional Materials, 2007, 45 (5): 965～971

9 Pawinee K, Suree P. Simple Assay Method for Lipase Activity and Analysis of Its Catalytic Hydrolysis Product in Water-Poor Media. Indian Journal of Chemistry, 1993, 32B: 88～89

10 高　贵，韩四平，王　智等. 硅藻土固定化脂肪酶. 吉林大学学报（理学版），2002，40 (3)：324～326

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

GaoGui, Han Siping, Wang Zhi, et al. Lipase Immobilized on Diatomite. Journal of Jilin University (Science Edition), 2002, 40 (3): 324～326

11 尹艳丽，王爱玲，曹 健等. 纳米载体固定化酶的研究. 现代化工，2007，27 (9)：67～70

Yin Yanli, Wang Ailing, Cao Jian, et al. Nanoparticles Carrier for Immobilized Enzymes. Modern Chemical Industry, 2007, 27 (9): 67～70

Properties of Immobilized Lipase on Nanocrystalline Mg-Al Hydrotalcite

Zeng Hongyan[1] Deng Xin[1,2] Liao Kaibo[1] Xia Kui[1]

(1. Biotechnology Institute, School of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China;
2. Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Kunming 650223, China)

Abstract: A method of immobilizing lipase was described anion nano-crystalline Mg-Al hydrotalcite with layer-shape and double hydroxides was used as a adsorbing carrier. The influence of several factors on the lipase immobilization was studied. The optimal conditions were as follows: carrier dosage 0.32 g/mL (720 U/mL enzyme solutions), pH 7.5 and incubating time 6—7 h at 30—35 ℃. The apparent activity of the immobilized lipase was 725 U/g. The apparent inactivation energy of free and immobilized lipase were 20.28 and 29.02 kJ/mol, respectively, so the stability of the immobilized lipase was higher than that of free lipase.

Key words: enzyme immobilization; lipase; magnesium-aluminium hydrotalcite; carrier

(上接第454页)

CFD Study on the Concentration Patterns in an Orifice-Baffled Oscillatory Flow Reactor

Yuan Cansheng Hu Xiaoping Wu Jia

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Numerical simulation study on the 3-dimensional concentration field of an orifice-conic-baffled oscillatory flow reactor (OFR) was carried out by employing finite volume method. Distribution pattern of tracer concentration under mode of injection in the cell center was investigated and concentration field transition under different oscillatory conditions was also researched. The results showed that the movement of tracers was caused by the control in turn of mainstream and secondary flow region which was constituted by vortices. Define concentration variance C of a cell as criterion of mixing efficiency and the results come that C was a result cooperated by mixing in the cell and mixing between cells. Parameter C was used to symbolize mixing effect and it showed higher Oscillatory Reynolds Number, higher mixing efficiency. The statistic results indicated that the second order exponential function, which was based on two-pattern transfer model consisted of long distance mixing and short turbulent dispersion, could be successfully used to fit the change of concentration variance with time.

Key words: oscillatory flow reactor; concentration field; numerical simulation; injection dispersion

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net