

三组分大孔树脂的合成及其在脂肪酶固定中的应用

段洪东, 刘文涛, 孟霞, 王兴建, 张娟

(山东轻工业学院 化学与制药工程学院, 山东 济南 250353)

摘要:以甲苯和正庚烷为致孔剂,采用悬浮聚合法合成了三组分甲基丙烯酸缩水甘油酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯-丙烯酸丁酯(GMA-EGDMA-BA)环氧基大孔树脂,并应用于脂肪酶的固定。结果表明,加入第三单体丙烯酸丁酯后,同 GMA-EGDMA 相比较,GMA-EGDMA-BA 树脂的孔径变大,其固定化酶量提高约 1 倍(达 20 mg/g);同游离酶相比较,固定化酶对温度和 pH 值的适应性有所提高,其活性恢复达到 83.3% 以上。

关键词:三组分树脂;固定化脂肪酶;温度;活性恢复

中图分类号:O632.52

文献标志码:A

文章编号:1672-3767(2012)03-0090-05

Synthesis of Macroporous Terpolymers and Its Application in Immobilization of Lipase

DUAN Hongdong, LIU Wentao, MENG Xia, WANG Xingjian, ZHANG Juan

(School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Shandong Polytechnic University, Jinan, Shandong 250353, China)

Abstract: The macroporous terpolymers with epoxy groups including the glycidyl methacrylate (GMA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and butyl methacrylate (BA) were synthesized by suspension polymerization method, taking the toluene and n-heptane as porogen, and meanwhile, the terpolymers were used for immobilization of lipase. The results showed that after adding the third monomer butyl methacrylate, the lipase binding capacity of GMA-EGDMA-BA was 20 mg protein/g (polymer), twice as much compared with GMA-EGDMA and the pore size of poly (GMA-EGDMA-BA) was enlarged. The immobilization of lipase gave more than 83.3% of active recovery and showed a broader pH and higher temperature stability.

Key words: terpolymers; immobilization of lipase; temperature; active recovery

脂肪酶是一种重要的生物催化剂,有很高的工业应用价值。在化学合成方面,脂肪酶可以合成和水解多种酯类。但由于对使用环境的要求非常苛刻且很难回收利用,大大限制了脂肪酶在工业中的应用。为了提高脂肪酶的应用性能,进行了大量脂肪酶固定化研究^[1-5],发现树脂的极性对固定化酶量有很大的影响。Gross 等^[6]发现,当树脂的极性小时,可以提高树脂对脂肪酶的吸附量;Blanco 等^[7]发现,辛基修饰的介孔分子筛非常有利于脂肪酶的固定化。因此合成含有疏水基团的树脂,可以提高树脂对脂肪酶的固定量。

本研究合成了含有疏水基团的甲基丙烯酸缩水甘油酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯-丙烯酸丁酯(glycidyl methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate-butyl methacrylate, GMA-EGDMA-BA)环氧基大孔树脂,并将其应用于脂肪酶的固定;比较了 GMA-EGDMA-BA 和 GMA-EGDMA 两种树脂的固定化酶量大小,及 GMA-EGDMA-BA 固定化酶和自由酶对温度和 pH 值的稳定性差异。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甲基丙烯酸缩水甘油酯和二甲基丙烯酸乙二醇酯(工业级,山东鲁抗立科药物化学有限公司提供),丙烯

收稿日期:2012-03-26

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2011BM011)

作者简介:段洪东(1967—),男,山东聊城人,教授,博士,主要从事精细化学品的研究工作。E-mail: hdduan67@gmail.com

酸丁酯(天大化学试剂厂),10 万 U/g 的脂肪酶,橄榄油(阿拉丁试剂),考马斯亮蓝 G250(国药集团化学试剂有限公司)、聚乙烯吡咯烷酮 K90、吡啶、甲苯、正庚烷、聚乙烯醇等均为分析纯。

DF-101s 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司),SHA-B 恒温振荡器(国华企业),LDL-4 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),752 N 紫外可见分光光度计(凌光),Quanta 200 环境扫描电子显微镜(FEI 公司),IRPrestige-21 傅立叶变换红外光谱仪(岛津公司)。

1.2 树脂的合成

1.2.1 GMA-EGDMA-BA 树脂的合成

在 250 mL 四口瓶中加入 100 mL 去离子水为溶剂,1%的聚乙烯吡咯烷酮为分散剂,油水比为 7 : 1,EGDMA、GMA 和 BA 所构成的单体相的摩尔比为 55 : 40 : 5,甲苯和正庚烷为致孔剂、二者体积比为 4 : 1,水浴升温至 50 °C,保持 1 h,然后 70 °C 反应 4 h,最后在 80 °C 保温 3 h。反应结束后,待体系冷却至 40 °C 左右时,抽滤,然后将树脂分散于一定量的丙酮中缓慢磁力搅拌(重复三次),每次 20 min,最后用大量去离子水冲洗,40 °C 下真空干燥 24 h。

1.2.2 GMA-EGDMA 树脂的合成

GMA-EGDMA 的树脂的合成步骤同上面相同。其中,GMA 和 EGDMA 的摩尔比为 4 : 6。

1.3 树脂的性能检测

1.3.1 树脂溶胀性能测试

将树脂在水、甲醇、甲苯、正庚烷中进行溶胀,溶胀率为

$$W = \frac{S - S_0}{S_0} \times 100\%$$

其中, S 和 S_0 分别为树脂溶胀后和溶胀前的质量,g。

1.3.2 树脂组成的测试

采用红外光谱仪测试树脂的组成。在红外灯照射下,取少量样品和干燥的 KBr 粉末一起混匀研细,然后压制成透明的薄片,测量波数范围为 400 ~ 4 000 cm^{-1} 的红外图谱。

1.3.3 树脂表面结构的测试

采用环境扫描电镜测试树脂的表面结构。取少量样品加乙醇后置于试管中超声振荡使其充分分散于玻片上,然后喷金,晾干后用环境扫描电镜观察粒子的表面结构。

1.4 固定化酶的制备

1.4.1 脂肪酶溶液的配制

称取一定量的酶粉,将其溶解于 0.1 mol/L 的 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中配成 5 mg/mL 的酶溶液,在 2 000 r/min 的转速下离心 10 min,取上清液,4 °C 下储存使用。

1.4.2 固定化酶的制备

取 1 g 树脂(湿)加入到 100 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 上述脂肪酶溶液和 40 mL pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液,在 37 °C 恒温振荡器中,以 150 r/min 固定 24 h。固定完后,抽滤并用 50 mL 缓冲溶液清洗树脂。

1.5 固定化酶量的测试

采用 Bardford 方法测试脂肪酶的浓度,标准曲线采用牛血清蛋白绘制。

取 0.5 mL 固定化前、固定化后和用于冲洗固定化酶后的树脂的酶溶液,加入 0.5 mL pH = 7.0 的缓冲溶液和 5.0 mL 的显色剂,在 595 nm 测试吸光光度值,同标准曲线对比,从而得到固定化酶量。固定化酶量由下式计算:

$$I = \frac{A - B - C}{m} (\text{mg/g})$$

其中: A 、 B 分别为固定化前、固定化后的酶含量,mg; C 是冲洗固定化酶树脂的酶含量,mg; m 为树脂的质量,g。

1.6 酶活性的测定

1.6.1 乳化液的制备

将 40 g 聚乙烯醇溶于去离子水中,定容至 1 000 mL;取 200 mL 配置好的聚乙烯醇溶液,然后加入 50 mL 橄榄油,在 2 500 r/min 的转速下乳化 0.5 h(4 °C 下储存)。

1.6.2 酶活性的测定

采用比色法检测酶的活性^[8],配置 5% 的硫酸铜溶液,然后用吡啶调节 pH 值至 6.10~6.15,作为油酸的显色剂,测定酶的活性。

2 结果与讨论

2.1 树脂的结构

图 1 为 GMA-EGDMA-BA(A)树脂和 GMA-EGDMA(B)树脂放大 12 000 倍后的电镜照片,可以看出,GMA-EGDMA-BA 树脂的孔径比 GMA-EGDMA 树脂的大,但是 GMA-EGDMA 的孔径分布更均匀一些。根据大孔树脂的成型原理,孔径大小与相分离的早晚有关:相分离发生的早,孔径大;相分离发生的晚,孔径小。加入第三单体 BA 后,降低了树脂在致孔剂中的溶解性,使相分离时间提前,所以可以形成较大的孔径。

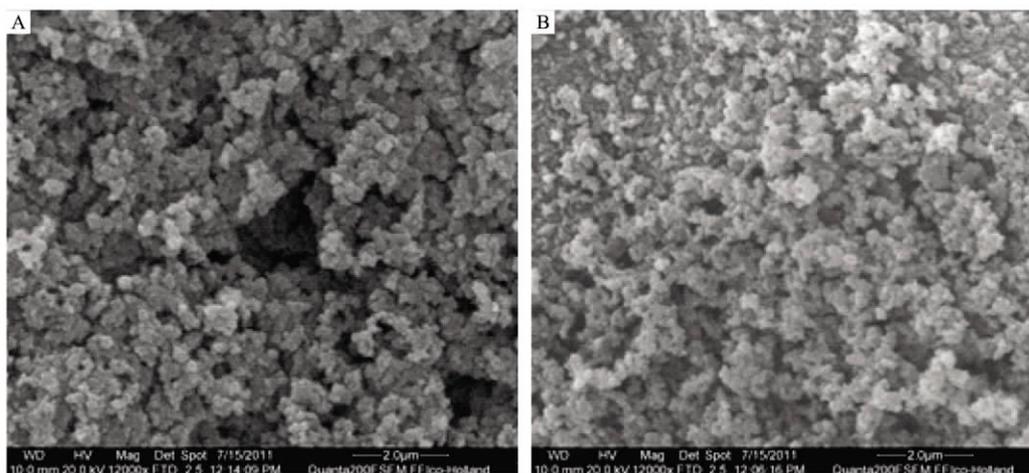


图 1 GMA-EGDMA-BA(A)树脂和 GMA-EGDMA(B)树脂电镜照片

Fig. 1 SEM photographs of the GMA-EGDMA-BA (A) carrier and the GMA-EGDMA (B) carrier

2.2 树脂溶胀性能检测

图 2 列出树脂在水、甲醇、甲苯和正庚烷等不同极性溶剂中的溶胀度。可以看出,在高极性溶剂水和甲醇中,GMA-EGDMA-BA 树脂的溶胀度比 GMA-EGDMA 树脂的溶胀度小,这是因为极性较小的 BA 单体的引入代替了一部分极性较大的 EGDMA 单体,使树脂的极性基团数目减少,从而溶胀度减小。相反,在甲苯和正庚烷等极性较小的溶剂中,GMA-EGDMA-BA 树脂的溶胀度比 GMA-EGDMA 树脂的溶胀度大。这是由于 BA 的加入,引入了丁基,增加了非极性基团的数目,使得树脂的极性下降,所以 GMA-EGDMA-BA 树脂在极性较小的溶剂中的溶胀度比 GMA-EGDMA 树脂的溶胀度大。

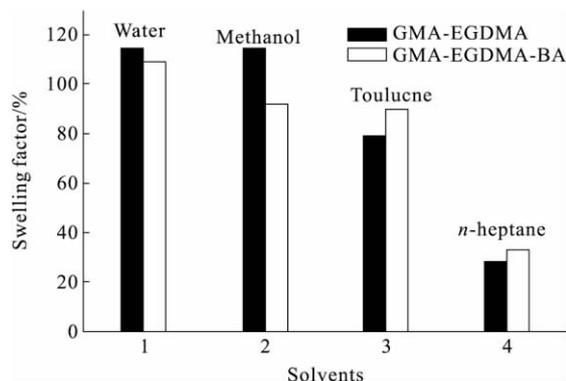


图 2 GMA-EGDMA-BA 和 GMA-EGDMA 树脂的溶胀性能柱状图

Fig. 2 Swelling ability of GMA-EGDMA-BA and GMA-EGDMA carriers in different agents

2.3 第三单体对固定化脂肪酶的影响

表 1 列出了 GMA-EGDMA 和 GMA-EGDMA-BA 两种树脂对脂肪酶的固定化量和活性恢复,以及自由酶的活性恢复。可以看出,GMA-EGDMA-BA 的固定化酶量是 GMA-EGDMA 的两倍,为 20 mg/g 湿树脂,活性恢复也有较大的提高,达到 83.3%。结合 2.1

的结果,说明 BA 的加入,树脂孔径增大,本身极性减小,使固定化酶量和活性恢复有较大的提高。

2.4 固定化酶的使用条件

图 3 为自由酶和 GMA-EGDMA-BA 固定化酶不同温度下的活性恢复,可以看出,二者的最佳使用温度均为 35 °C,在 45 °C 以下二者的活性恢复相差不多;当温度升高到 50 °C 以上时,自由酶的活性下降很快,而固定化酶的活性下降较慢,说明脂肪酶经 GMA-EGDMA-BA 树脂固定化后,热稳定性得到提高。

图 4 为在最佳温度 35 °C 下,不同 pH 值缓冲溶液中自由酶和固定化酶的活性恢复。从图中可以看出,二者的最佳 pH 值基本相同,但自由酶的活性随 pH 值的变化较大,而固定化酶在值 pH 为 5.5~8.5 时其活性恢复高达 90%,说明脂肪酶经 GMA-EGDMA-BA 树脂固定化后,对 pH 的稳定性得到极大地提升。

表 1 GMA-EGDMA-BA 和 GMA-EGDMA 固定化酶量和活性恢复表
Tab.1 Influence of the third monomer on loading and activity recovery of lipase

树脂	固定化酶量(mg 酶/g 湿树脂)	活性(U/mg 酶)
自由酶	—	95.3
GMA-EGDMA-BA	20.0	79.4
GMA-EGDMA	9.8	70.2

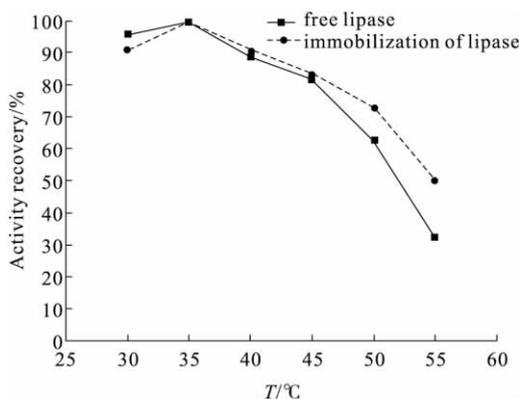


图 3 温度对自由酶和固定化酶活性的影响曲线图
Fig. 3 Influence of temperature on activity recovery of free and immobilized lipases

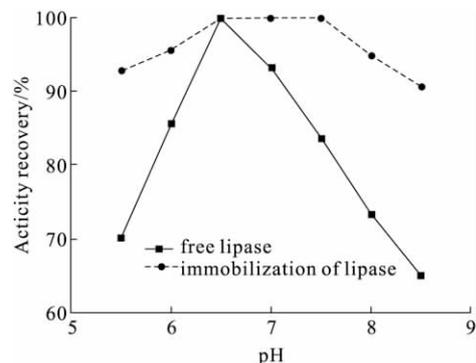


图 4 pH 对自由酶和固定化酶活性的影响曲线图
Fig. 4 Influence of pH on activity recovery of free and immobilized lipases

3 结论

采用悬浮聚合方法合成了三组分甲基丙烯酸缩水甘油酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯-丙烯酸丁酯(GMA-EGDMA-BA)环氧基大孔树脂,并对其进行了表征,结果表明加入第三单体 BA 后,固定化酶 GMA-EGDMA-BA 树脂极性变小,孔径变大,对温度和 pH 值的适应性均得到提高,其活性恢复达到 83.3% 以上,更利于脂肪酶的固定。

参考文献:

- [1] 拜永孝,李彦锋,马应霞,等. 固定化酶技术及其应用[J]. 化学通报,2005,68:1-6.
BAI Yongxiao, LI Yanfeng, MA Yingxia, et al. Technologies of immobilized enzymes and their applications[J]. Chemistry Online, 2005, 68: 1-6.
- [2] GULAY B, YASEMIN K, ADIL D, et al. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix[J]. Journal of Food Engineering, 2002, 52: 367-374.
- [3] GULAY B, BULENT K, ARICA M Y. Immobilization of candida rugosa lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HE-

- MA-EGDMA) microspheres[J]. Food Chemistry, 2005, 92: 261-268.
- [4] INDU B, RAJINDER P, GULAM N Q, et al. Lipase enzyme immobilization on synthetic beaded macroporous copolymers for kinetic resolution of chiral drugs intermediates[J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 321-330.
- [5] BHALCHANDRA K V, GANESH C I, PONRATHNAM S, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 3623-3629.
- [6] BO C, MILLER M E, RICHARD A G. Effects of porous poly-styrene resin parameters on *Candida antarctica* lipase adsorption, distribution, and polyester synthesis activity[J]. Langmuir, 2007, 23: 6467-6474.
- [7] BLANCO R M, TERREROS P, MUNOZ N, et al. Ethanolim proves lipase immobilization on a hydrophobic support[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 47: 13-20.
- [8] 江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(8): 72-75.
JIANG Huifang, WANG Yaqin, LIU Chunguo. Comparison and improvement of three determination methods for lipase activity[J]. Chemistry & Bioengineering, 2007, 24(8): 72-75.
-

“能源与环境材料”研究专栏征稿

征稿范围:

- | | |
|---------------|---------------|
| ◇ 煤的清洁利用 | ◇ 海洋能利用及相关材料 |
| ◇ 氢能及燃料电池材料 | ◇ 风能利用与相关材料 |
| ◇ 太阳能与电池材料 | ◇ 新型储能材料 |
| ◇ 光催化材料 | ◇ 生物能源 |
| ◇ 环境资源与环境材料化学 | ◇ 新型可再生能源开发利用 |

欢迎相关领域专家学者和工程技术人员踊跃投稿, 来稿请注明“能源与环境材料”研究专栏。稿件通过专家评审后优先发表, 并实行优稿优酬。

投稿平台: http://xuebao.sdust.edu.cn/index_z.asp

电子邮箱: zkchem@sdust.edu.cn, sdustzkb@163.com

联系电话: 0532-86057859

山东科技大学学报(自然科学版)编辑部