

聚乙烯亚胺改性聚丙烯腈中空膜固定脂肪酶

卢佳伟^{1,2}, 李由然^{1,2}, 石贵阳^{1,2*}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 聚丙烯腈是富腈基的高分子聚合物, 易修饰改性, 广泛应用于膜分离应用. 我们以聚丙烯腈中空膜为载体, 采用化学法交联聚乙烯亚胺并固定脂肪酶, 固定过程中引入海藻酸钠, 用 CaCl_2 进行后处理, 得到固定化脂肪酶 PAN-PEI-SA/E- CaCl_2 载酶量为 31.70 (mg enzyme)/(g support), 酶活为 50.20 U/(g support), 15 次重复使用可保留 58.77% 的酶活, 与游离酶相比耐酸性和耐温性有所提高, 相同条件下与 Nov 435 相比, 酶活更高, 这表明最终得到的固定化脂肪酶有良好的工业应用前景.

关键词: 聚丙烯腈; 表面改性; 酶固定化; 脂肪酶

中图分类号: Q819; O643.3

文献标志码: A

固定化酶技术通过将酶固定在载体上获得酶的催化特性, 并使酶能回收再利用, 因此被广泛应用于食品、医药等行业^[1-3]. 酶固定化载体有很多种, 如无机材料、生物大分子和高分子聚合物材料^[1-3], 其中, 高分子聚合物因比表面积大、成本低和易修饰改性被广泛应用^[1-2,4-6].

脂肪酶(EC 3.1.1.3, Lipase), 是一类特殊的酯链水解酶, 能催化多种反应, 如酯化、水解和聚合反应, 在食品工业中应用广泛, 但游离脂肪酶存在易失活、难回收的问题, 而固定化酶技术能改善脂肪酶的催化稳定性和重复利用性^[1-3].

聚丙烯腈由丙烯腈和丙烯酸甲酯共聚而成, 耐一般溶剂、不易水解、抗氧化、化学稳定性好, 耐微生物侵蚀, 具有优异的成膜性, 已被广泛应用于膜分离及酶固定化领域^[7-12]. 但聚丙烯腈富含腈性强的腈基, 分子链间作用力强, 链对称性差, 成膜后表面反应性差, 机械强度一般, 生物相容性差^[10,13], 因此为获得性能更好的酶固定化载体, 需对聚丙烯腈膜进行表面改性, 常用的改性方法有化学交联、复合涂层等^[14-15].

聚乙烯亚胺富含胺类基团, 可用于聚丙烯腈表

面改性^[16-17]以增强聚丙烯腈膜的表面反应活性. 我们在聚丙烯腈膜表面采用化学法交联聚乙烯亚胺后固定脂肪酶, 引入具有生物亲和性的海藻酸钠参与酶固定, 再以氯化钙后处理, 成功提高固定化脂肪酶的固定量和稳定性, 得到具有工业应用潜力的固定化脂肪酶.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脂肪酶(Lipase, 10 000 U/g), 购自昆明爱科特生物科技有限公司; 聚丙烯腈粉末(PAN, M_w 60 000~80 000), 购自上海金山石化公司; 聚乙烯亚胺(PEI, M_w 1800)、棕榈酸对硝基苯酯(*p*-NPP), 购自阿拉丁(上海)有限公司; 其他生化试剂均购自国药集团化学试剂有限公司.

往复式水浴恒温培养振荡器, 购自上海智城分析仪器制造有限公司; 紫外-可见光分光光度计 UV-1200, 购自上海美谱达仪器有限公司; 傅里叶变换红外光谱仪, 购自美国尼高力仪器公司.

1.2 实验方法

1.2.1 聚丙烯腈中空膜制备及化学交联聚乙烯亚胺

收稿日期: 2017-11-20; 修回日期: 2017-12-20.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31401674)(National Natural Science Foundation of China(No. 31401674)); “十三五”国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0401400)(The 13th Five-Year National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant(No. 2016YFD0401400)).

作者简介: 卢佳伟(1993-), 男, 在读硕士, 研究方向: 酶催化; E-mail: 857288085@qq.com(Lu Jia-wei(1993-), male, master degree candidate, research area: enzyme catalysis, E-mail: 857288085@qq.com)).

* 通讯联系人, E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn.

采用相转化法制备聚丙烯腈中空膜: 10 g 聚丙烯腈粉末与 5 mL 致孔剂聚乙二醇^[18]加入 55 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 混匀后 65 °C 密封反应 48 h, 形成棕黄色粘稠液体后取出, 室温冷却 12 h 除去气泡; 室温下将反应液在深度 0.1 mm 的玻璃板槽中铺开, 室温蒸发 90 s 后转移至凝固浴 (10% DMF/水溶液, 25 °C) 中 2 min 铸膜. 将膜裁剪成 20 cm² 待用. 取样烘干称重. 记为 PAN 膜.

取 PAN 膜, 置于 2 mol/L NaOH 溶液中, 60 °C 反应 90 min; 反应结束后转移至 1 mol/L HCl 溶液中, 质子化 4 h 后蒸馏水洗净, 最后投入到 PEI 水

溶液 (10 g/L) 中, 37 °C 过夜搅拌反应; 反应结束用蒸馏水洗净, 待用. 记为 PAN-PEI 膜.

1.2.2 固定脂肪酶 取 60 mg PAN-PEI 膜酸化后加到 10 mL 脂肪酶液 (0.6 mg/mL, pH 5.0) 中, 再加入 20 mg 海藻酸钠, 25 °C, 150 r/min, 固定 2 h. 得到固定化脂肪酶记为 PAN-PEI-SA/E.

固定后再分别用不同浓度的戊二醛 (25 °C, 静置 1.5 h)、环氧氯丙烷 (37 °C, 搅拌 1.5 h) 和 CaCl₂ (37 °C, 静置 1.5 h) 对固定化酶进行后处理. 得到固定化脂肪酶记为 PAN-PEI-SA/E-GA、PAN-PEI-SA/E-EPC、PAN-PEI-SA/E-CaCl₂.

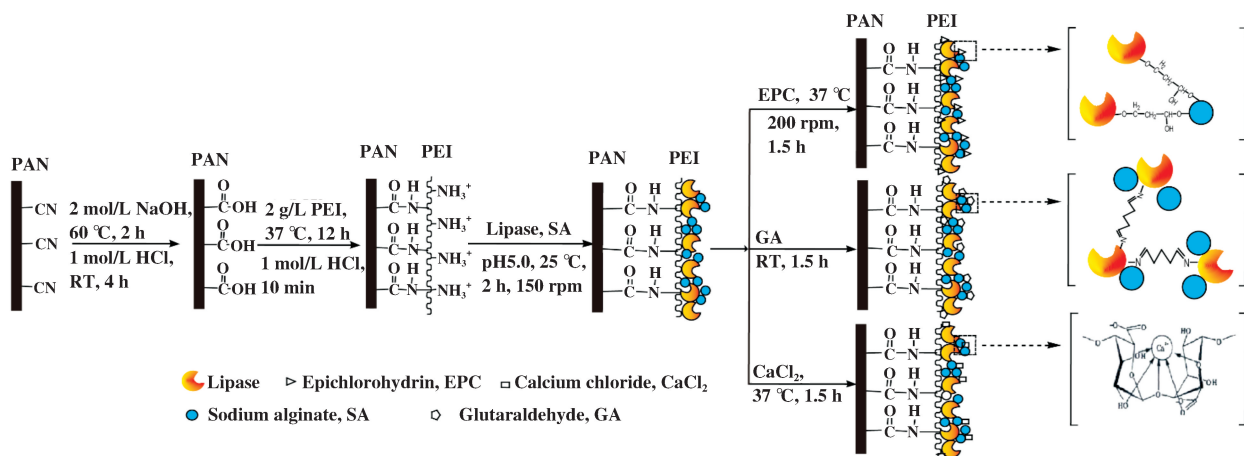


图 1 脂肪酶固定化流程示意图

Fig.1 Process of enzyme immobilization

1.2.3 蛋白含量测定 蛋白含量的测定参照 Bradford 法^[19]; 取 0.5 mL 待测样品加到 2.5 mL 考马斯亮蓝工作液中, 混匀后静置 5 min, 于 595 nm 处测吸光值, 根据蛋白浓度标准曲线 $y = 6.1312x + 0.0705$

(y 为 595 nm 处吸光值, x 为蛋白浓度 mg/mL, $R^2 = 0.9984$) 计算样品中酶量. 需做空白对照以排除 PEI 和海藻酸钠对测量结果的影响.

$$\text{载酶量 (Enzyme loading) (mg enzyme/g support)} = \frac{\text{used enzyme before immobilization} - \text{remaining enzyme after immobilization}}{\text{mass of support}}$$

1.2.4 脂肪酶酶活测定 脂肪酶酶活测定参照对硝基苯酚法^[20]; 玻璃试管中加 PBS 缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.0) 8 mL 和适量脂肪酶或固定化脂肪酶, 45 °C 水浴预热 5 min 后加入预热的棕榈酸对硝基苯酯 (100 mmol/L) 0.15 mL, 45 °C 恒温振荡反应 5 min 后, 取 1 mL 反应液加入到 2 倍体积的 Na₂CO₃ (1 mol/L) 中终止反应. 空白对照不加酶.

样品稀释适当倍数在 405 nm 处测吸光值, 根据对硝基苯酚浓度标准曲线 $y = 7.4801x + 0.056$ (y 为吸光值, x 为对硝基苯酚浓度 $\mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.998$) 计算酶活 U.

酶活定义: 在实验条件下, 每分钟催化生成 1 μmol 的对硝基苯酚所需要的酶量, 定义为一个酶活单位 (U).

$$\text{比酶活 (Specific activity) (U/mg)} = \frac{\text{enzyme activity}}{\text{mass of enzyme}}$$

$$\text{相对酶活 (Relative) (\%)} = \frac{\text{enzyme activity}}{\text{highest enzyme activity of same Group samples}} \times 100$$

1.2.5 聚丙烯腈中空膜结构表征 (1) 万能试验机测样品最大拉伸力: PAN 膜裁剪成条状, 调整仪器设置夹距 2 cm, 拉伸速度 20 mm/min, 预加张力 0 N, 测试 3 次, 取平均值. (2) 称重法计算膜孔隙率: 干燥的 PAN 膜质量为 m_1 ; 该膜浸没水中 12 h 后, 擦干表面水渍, 质量为 m_2 .

孔隙率(Porosity) =
$$\begin{aligned} & \frac{V_{\text{pore}}}{V_{\text{membrane appearance}}} \\ &= \frac{V_{\text{pore}}}{V_{\text{pore}} + V_{\text{membrane skeleton}}} \\ &= \frac{V_{\text{pore}}}{V_{\text{pore}} + \frac{m_1}{\rho_{\text{PAN}}}} \\ &= \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m_1 + \frac{m_1}{1.184}} \end{aligned}$$

其中: 聚丙烯腈膜密度 1.184 g/cm^3 ; $V_{\text{孔}}$ 由孔隙吸水量确定, 室温下, $V_{\text{孔}} = m_{\text{吸水}} = m_2 - m_1$.
(3) 样品经 KBr 压片后进行红外吸收扫描, 红外光谱分辨率为 0.4 cm^{-1} , 扫描速度为 $0.2 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$, 波数扫描范围 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$.
(4) 样品经表面喷金处理后以扫描电子显微镜对样品表面形态进行分析.

2 结果与讨论

2.1 聚丙烯腈中空膜结构表征及催化原理

由图 2 可知, 所有样品均在 $2\,242 \text{ cm}^{-1}$ 处出现腈基(CN)的伸缩振动吸收峰, $2\,940 \text{ cm}^{-1}$ 处出现 C—H 键的伸缩振动吸收峰, 在 $1\,730 \text{ cm}^{-1}$ 出现 C=O 的伸缩振动吸收峰, 这表明聚丙烯腈是由丙烯腈和丙烯酸甲酯共聚而成; 与 PAN 膜相比, 改性后 PAN-PEI 膜在 $1\,670 \text{ cm}^{-1}$ 出现较强的酰胺吸收

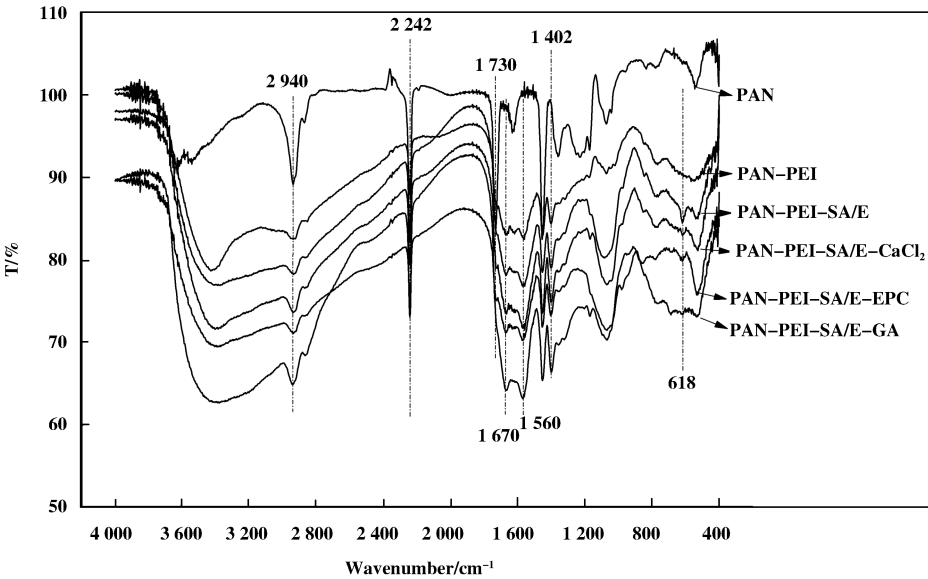


图 2 不同样品的红外波谱图

Fig.2 Infrared spectra of PAN、PAN-PEI、PAN-PEI-SA/E、PAN-PEI-SA/E-CaCl₂、PAN-PEI-SA/E-GA、PAN-PEI-SA/E-EPC

峰, 在 $1\,560 \text{ cm}^{-1}$ 处出现 $\text{CO}_2^- \text{—NH}_3^+$ 变形振动峰, $1\,402 \text{ cm}^{-1}$ 处出现 CO_2^- 不对称伸缩峰, 表明成功交联 PEI; 与 PAN-PEI 膜相比, 固定化脂肪酶 (PAN-PEI-SA/E、PAN-PEI-SA/E- CaCl_2 、PAN-PEI-SA/E-GA、PAN-PEI-SA/E-EPC) 的 4 个样品中, 在 618 cm^{-1} 出现脂肪酶特征峰^[20], 这表明脂肪酶被成功固定在载体表面.

结合表 1 和图 3, 随着改性和酶的固定, PAN 膜的最大拉伸力逐渐降低, 表明采用化学交联 PEI

表 1 最大拉伸力和孔隙率

Table 1 The tensile strength and porosity

	Tensile strength/(N)	Porosity
PAN	5.89	0.85
PAN-PEI	3.42	0.81
PAN-PEI-SA/E	3.38	0.71
PAN-PEI-SA/E- CaCl_2	3.21	0.57

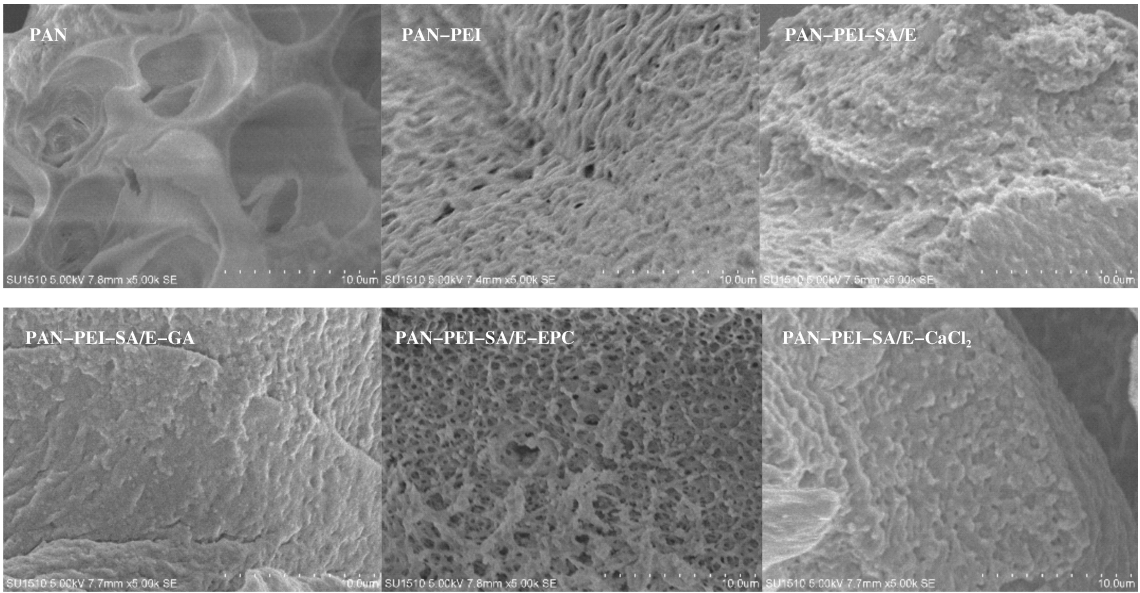


图 3 PAN 膜改性固定前后扫描电镜图

Fig.3 SEM images of PAN membrances before and after immobiliazation

的方法改性 PAN 膜时会对 PAN 膜结构造成破坏,但主要发生在碱水解和交联 PEI 时,而酶固定过程几乎不对膜的机械强度造成破坏. PAN 膜内部孔隙在交联 PEI 后发生变化,表面孔径逐渐变小,孔隙率逐渐降低,由 0.85 (PAN) 降低至 0.81 (PAN-PEI),PEI 层附着在空隙内,表明 PEI 交联成功;固定脂肪酶后 (PAN-PEI-SA/E) 膜孔隙被海藻酸钠和脂肪酶覆盖,但孔隙率降低至 0.71;进一步处理后 (PAN-PEI-SA/E-CaCl₂、PAN-PEI-SA/E-GA、PAN-PEI-SA/E-EPC) 载体表面海藻酸钠覆盖量减少,孔隙率则降至 0.57,但脂肪酶仍附着在表面.

脂肪酶的催化活性中心由丝氨酸、天冬氨酸和组氨酸组成,位于脂肪酶结构内部,其表面被相对疏水的氨基酸残基形成的螺旋状结构覆盖,这层“盖子”结构的外表面相对亲水,而面向内部的内表面相对疏水. 酶固定时,脂肪酶的相对亲水外表面更易与亲水的 PAN-PEI 膜及海藻酸钠发生相互作用,达到酶固定的目的;当疏水性酯类底物 (如 *p*-NPP) 经传质作用后通过载体的孔隙与固定的脂肪酶发生接触,脂肪酶“盖子”的疏水表面张开,底物与活性中心接触,实现脂肪酶水解酯类的作用. 如表 2,固定后游离脂肪酶的比酶活仅降低 0.26 U/mg,表明改性 PAN 膜几乎不会造成游离脂肪酶的损失;但固定化脂肪酶的比酶活只有

表 2 固定前后脂肪酶比酶活

Table 2 Specific Activity of Lipase before and after Immobilization

	Specific activity/(U/mg)
Lipase before immobilization	7.15
Lipase after immobilization	6.89
Immobilized Lipase	1.63

1.63 U/mg,这是由于部分固定在 PAN 膜上的脂肪酶失活^[1]和改性 PAN 膜表面传质阻力^[18]较大造成的.

2.2 PAN-PEI 改性及固定酶条件优化

PAN 膜固定脂肪酶时,为得到较优的固定效果,对化学交联反应条件和酶固定条件进行单因素条件优化.

2.2.1 PAN 碱水解条件及 PEI 交联浓度 结合图 4 和 5,随着碱水解时间增加,PAN 膜载体上 2 242 cm⁻¹处的 CN 伸缩振动峰逐渐减小,而 1 730 cm⁻¹处的 C = O 的伸缩振动峰逐渐增大,并且在 1 670 cm⁻¹出现酰胺吸收峰,这表明 PAN 膜与 NaOH 反应时间越长,腈基水解量越大,因为 PAN 与 NaOH 溶液在加热的条件下反应,腈基被不可逆地水解成羧酸盐/酰胺 (图 6). 但水解时间超过 1.5 h 后,PAN 膜的机械性能降低,表明膜结构开始被破坏,CN 峰大小基本保持不变.

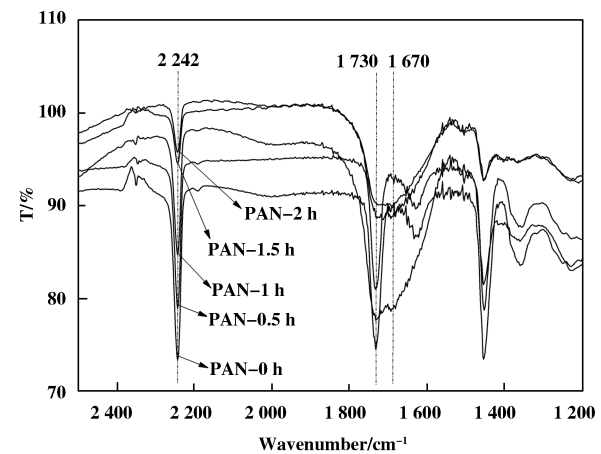


图 4 不同水解时间膜红外波谱

Fig.4 Infrared spectra of PAN by different alkaline hydrolysis time

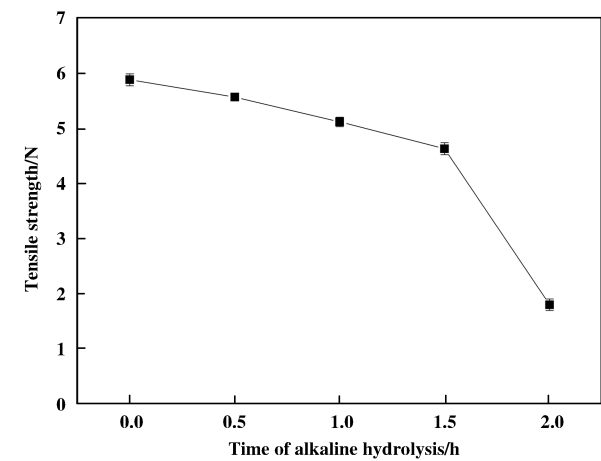


图 5 不同水解时间膜最大拉伸力

Fig.5 The tensile strength of PAN by different alkaline hydrolysis time

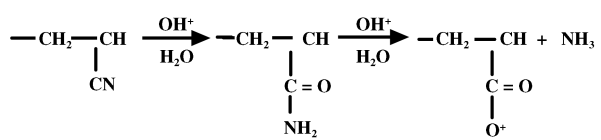


图 6 碱水解原理^[9]

Fig.6 Mechanism of alkaline hydrolysis

由此初步确定碱水解条件为：NaOH 浓度为 2 mol/L，碱水解温度为 60 ℃，碱水解时间为 90 min。

化学交联 PEI 时，PEI 浓度会对交联效果有影响，分别用不同浓度 PEI(0、2、6、10、20 g/L)与质子化后的 PAN 膜进行反应，考察 PEI 浓度对交

联效果的影响。

从图 7 可知，随着 PEI 浓度升高，固定的脂肪酶量和得到的酶活均不断升高，当 PEI 浓度为 10 g/L 时，PAN 膜固定的酶量和得到的酶活最大；但 PEI 浓度继续提高时，固定效果下降，这可能是因为高浓度的 PEI 在 PAN 膜表面发生物理聚集，形成一层不够牢固的聚集层，固定结束后固定的在聚集层的酶与 PEI 一起被洗脱，使得酶的固定量和固定化酶活降低。

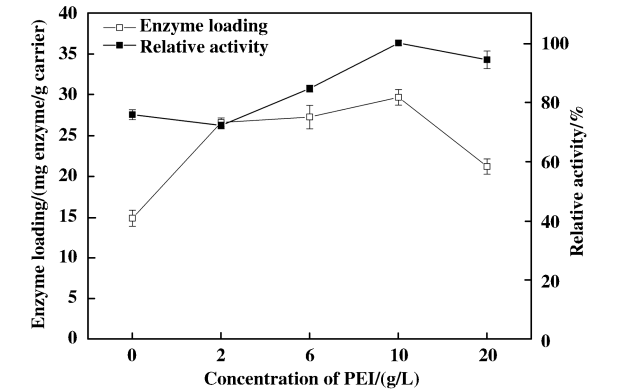


图 7 不同浓度 PEI 对 PAN-PEI 改性效果的影响

Fig.7 Effect of concentrations of PEI on modification of PAN films

2.2.2 海藻酸钠的选择及使用量的确定 实验发现，PAN-PEI 膜直接固定的脂肪酶易脱落，重复催化能力弱。为提高稳定性，在固定过程中分别用戊二醛(GA，终浓度 1%)、牛白蛋白(BSA，终浓度 0.2%)、聚乙烯亚胺(PEI，终浓度 1%)、环氧氯丙烷(EPC，终浓度 2%)、壳聚糖(CTS，终浓度 0.5%)、聚乙二醇 400(PEG，终浓度 1%)和海藻酸钠(SA，终浓度 0.5%)参与酶固定，考察得到的固定化酶稳定性。

从表 3 可知，加入不同试剂对固定结果有不同的影响。直接固定时，酶活力快速降低，7 次反应后酶活仅保留 35.81%，这是因为静电作用不牢固，酶分子掉落；加入 SA 时，7 次反应后能保留 65.45%的酶活，且与其他试剂(PEI、GA、BSA、EPC、PEG、CTS)相比，SA 能提高固定效果，原因是 SA 富羧基，能与荷正电的载体表面的氨基形成更密集的静电作用^[21]，将酶分子包裹在载体表面提高酶固定量，酶固定量由 29.7 (mg enzyme)/(g support)提高至 32.7 (mg enzyme)/(g support)，而且 SA 生物亲和性好，能为脂肪酶提供适宜的微环境。

表 3 不同试剂对连续反应酶活的影响

Table 3 Effects of different additives during immobilization

	Blank	PEI	GA	BSA	EPC	PEG	CTS	SA
1st Activity(U/(g support))	43.00	32.11	38.18	29.98	34.12	37.81	42.52	48.43
7th Activity(U/(g support))	15.39	13.29	9.10	18.89	10.87	23.43	28.65	31.42
Retain Activity(%)	35.81	41.38	23.84	63.02	31.85	61.96	67.38	65.45

从图 8 可知,随着 SA 浓度提高,固定的酶量和酶活均有所提高,当 SA 浓度达到 2 g/L 时,固定效果最佳;但 SA 浓度继续增大会对固定效果造成不利影响,这是因为高浓度的 SA 包裹在膜表面,不仅减少载体与酶的接触机会,降低酶固定量,还会增大已固定的酶与底物间的传质阻力,进而造成固定效果降低。

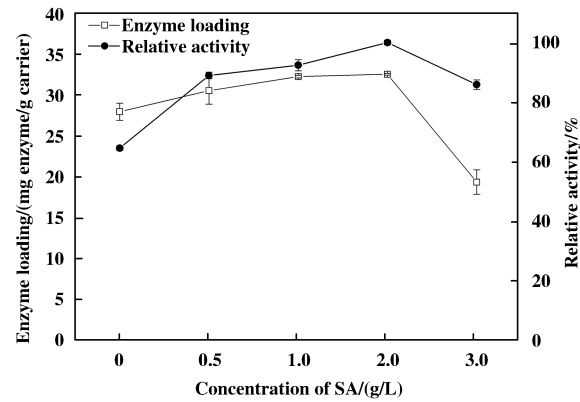


图 8 海藻酸钠浓度对固定效果的影响
Fig.8 Effects of concentrations of sodium alginate on immobilization

2.2.3 固定 pH 和时间的影响 在前一步实验基础上,分别用 pH 为 3、5、7、9、11 的缓冲液来固定酶,考察环境 pH 对固定效果的影响。

从图 9 可知,偏酸性条件下固定效果较优,当 pH 为 5 时固定酶量最大,当固定的 pH 为 7 时酶活力最大;但 pH>7 时固定效果逐渐变差. 原因可能有两个:一是酸性条件下膜表面 PEI 层带正电,易与酶分子发生静电作用,而碱性条件下,膜表面电荷性质发生变化,酶结合量降低;二是实验选择的脂肪酶偏好酸性. 由此选择在弱酸性条件下固定酶。

在前一步基础上,控制固定时间分别为 1、2、4、7、10、24 h,考察固定时间对固定效果的影响。

由图 10 可知,在 1~4 h 内酶固定量和酶活力变化不大,其中固定 2 h 时的酶固定量相对最大;

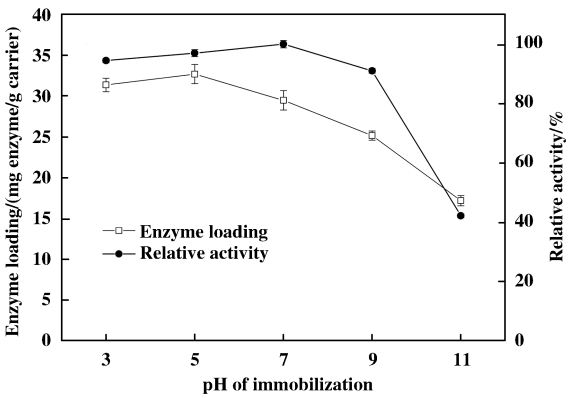


图 9 固定时 pH 对固定效果的影响
Fig.9 Effects of pH on immobilization

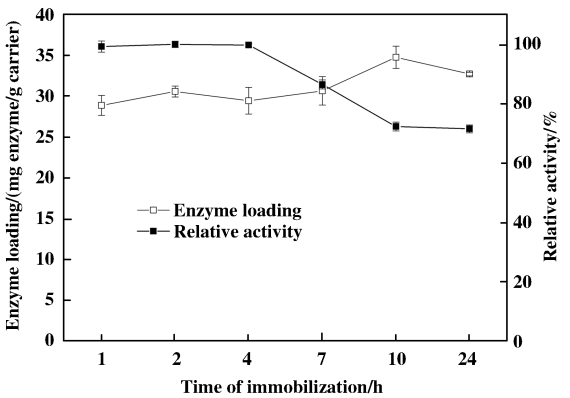


图 10 固定时间对固定效果的影响
Fig.10 Effects of time on immobilization

4~24 h 内,酶固定量增大,10 h 时达到最大值,但酶活力却下降,可见在长时间的固定过程中酶活会有损失,由此选择固定时间为 2 h。

2.2.4 最适改性及固定条件 根据单因素实验结果,选择 PAN 膜为载体,碱水解时间为 90 min, PEI 浓度为 10 g/L,固定条件:加酶量 6 mg、载体 60 mg、缓冲液 10 mL(pH 5.0),海藻酸钠 2 g/L,温度为 25 ℃、转速为 150 r/min、时间 2 h。

2.3 固定化酶的重复反应及存储稳定性

2.3.1 重复利用性 当 SA 参与固定时, 固定化酶的稳定性提高, 但仍然达不到要求, 为进一步增强固定化酶的稳定性, 分别用 GA、EPC 和 CaCl₂ 对固定化酶 PAN-PEI-SA/E 进行后处理.

从图 11 可知, 重复反应 15 次后 PAN-PEI 膜固定的酶酶活迅速降低, 仅保留初始的 20.86%, 尤其

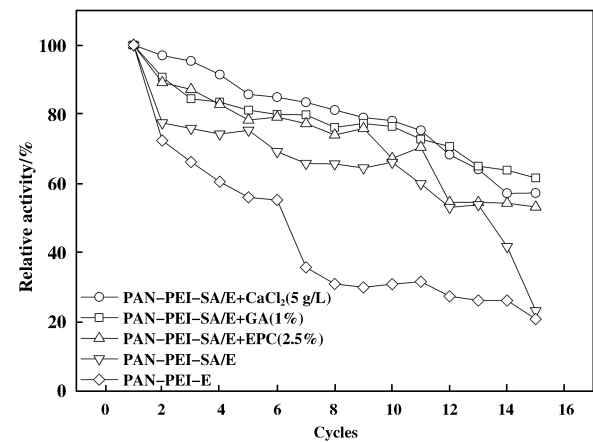


图 11 重复反应 15 次酶活保留情况

Fig.11 Enzyme activity retained after 15 reaction cycles by different post-treatment

在 6 次反应后保留酶活降至 40% 以下; 在 SA 参与固定后, 酶固定量和固定化酶稳定性均提高, 但 13

次反应后保留酶活快速降低, 由 53.92% 降至 23.14%; 固定化酶用 CaCl₂、GA、EPC 进行后处理, 虽然处理过程中有脂肪酶掉落, 但最终固定化酶稳定性明显提高, 其中 5 g/L CaCl₂/醋酸缓冲液 (pH 5.0)、1% GA/PBS 缓冲液 (pH 7.0) 和 2.5% EPC/醋酸缓冲液 (pH 5.0) 后处理的固定化酶的稳定性最佳, 15 次连续反应酶活保留率均达到 55%. 但由表 2 可知, GA 后处理时的剧烈的共价键合作用会造成酶活损失, 使 PAN-PEI-SA/E-GA 酶活低于 PAN-PEI-SA/E-CaCl₂ 和 PAN-PEI-SA/E-EPC, 且 GA 会对 PAN-PEI 膜结构造成破坏^[11]; EPC 酸性条件下 (pH 5.0) 的开环反应温和, 酶活损失小; CaCl₂ 中的 Ca²⁺ 会与包裹在 PAN 膜表面的 SA 中的羟基配位而形成凝胶层, 酶活力基本不损失, 且膜载酶量仅损失 2.32 (mg enzyme)/(g support), 而 EPC 处理后载酶量下降 5.42 (mg enzyme)/(g support), 但 EPC 和 CaCl₂ 处理时会减少表面多余 SA 的包裹量, 降低酶与底物间的传质阻力而提高酶活. 另外, 相同的实验条件下与商品化的固定化脂肪酶诺维信 435 (Nov 435) 相比 (表 4), 虽然 Nov 435 稳定性更好, 15 次反应后可保留 85% 以上的酶活力, 但其载酶量低, 在 15 次反应中 PAN-PEI-SA/E-CaCl₂ 和 PAN-PEI-SA/E-EPC 酶活均高于 Nov 435, 表明 PAN 膜固定的脂肪酶存在良好的应用前景.

表 4 不同后处理条件下的 15 次重复反应酶活保留情况

Table 4 Enzyme activity retained after 15 reaction cycles by different post-treatment

	1	2	3	4	5	6
1st Activity(U/(g support))	50.20	30.97	54.99	48.43	43.00	22.39
15th Actiity(U/(g support))	29.50	19.08	29.29	11.27	8.97	19.13
Retain Activity(%)	58.77	61.61	53.26	23.27	20.86	85.44

1; PAN-PEI-SA/E-CaCl₂; 2; PAN-PEI-SA/E-GA; 3; PAN-PEI-SA/E-EPC; 4; PAN-EPI-SA/E; 5; PAN-PEI-E; 6; Nov 435

2.3.2 存储条件对固定化酶的影响 在前一步实验的基础上, 分别将后处理后的固定化脂肪酶在 PBS(pH 7.0)、自来水、NaCl(1 mol/L)、二氯甲烷、乙醇、丙酮中保存 40 h, 考察不同存储条件对固定化酶的影响.

从图 12 可知, 储存 40 h 后固定化酶和游离酶在 PBS 缓冲液中酶活保留均较好; 在自来水中 PAN-PEI-SA/E-CaCl₂ 酶活保留最佳; 在 1 mol/L NaCl 溶液中储存时, PAN-PEI-SA/E-GA 有最好的酶活保留率; 用乙醇和丙酮储存时, 由于沉降作

用, 游离酶在溶液中没有检测到酶活, 而固定化酶则能检测到酶活; 在二氯甲烷中, PAN-PEI-SA/E-CaCl₂ 仍然有较优的酶活保留效果.

2.4 固定化酶和游离酶酶学性质研究

根据之前实验结果, 考察固定化脂肪酶 PAN-PEI-SA/E-CaCl₂ 酶学性质.

2.4.1 温度 分别在 30、40、50、60、70 ℃, pH 7.0 条件下, 测定 PAN-PEI-SA/E- CaCl₂ 酶活, 得出最适反应温度; 再在上述温度下保温 6 h 后再测定酶活, 考察温度对游离和固定脂肪酶酶活的影响.

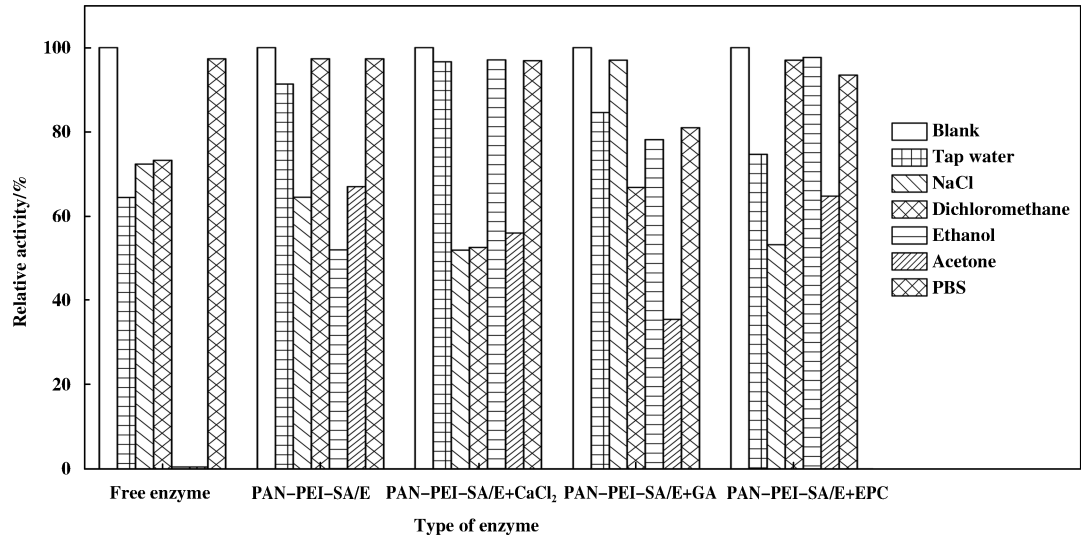


图 12 不同条件储存 40 h
Fig.12 Effects of different conditions of storage after 40 h

结合图 13 和 14，游离酶最适反应温度为 40℃，固定化脂肪的最适反应温度为 60℃。根据图 14，在不同温度下保温 6 h 后，30~40℃ 时游离酶和固定化酶均能较好的保留酶活，温度达到 50℃ 时游离酶开始有酶活的损失，固定化酶却没有损失；随着温度的提高，游离酶的酶活力快速降低，固定化酶酶活保留优于游离酶，表明固定化酶的温度耐受性提高。

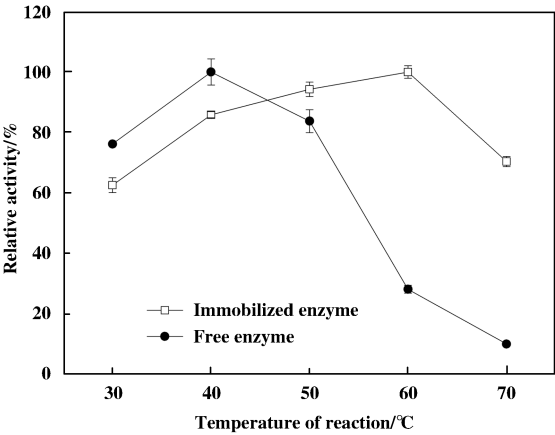


图 13 最适反应温度
Fig.13 The optimum reaction temperature of free and immobilized enzyme

2.4.2 pH 分别在 pH 3、5、6、7、8、9、11 的条件下，测定 PAN-PEI-SA/E- CaCl₂ 酶活，得出最适反应 pH；再在上述 pH 下，4℃ 保温 6 h 后再测定

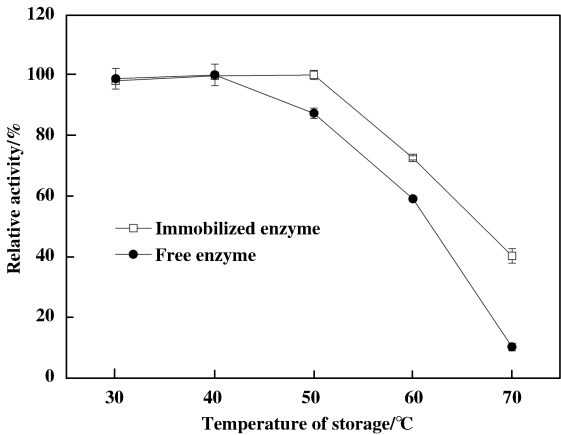


图 14 温度耐受性
Fig.14 The tolerance of temperature of free and immobilized enzyme

酶活，考察 pH 对游离和固定脂肪酶酶活的影响。

结合图 15 和 16，与游离酶相比，固定化酶的最适反应 pH 变为 7，耐弱酸性增强，在 pH=3 时，能保留 60% 以上的酶活力，而在 pH 升高时，酶活力降低，当 pH 升高到 9 以后，酶活快速降低，仅能保留 20% 的酶活力，耐酸性有提高。

2.4.3 金属离子及 EDTA 在 pH 7.0 下，考察 10 mmol/L 浓度的不同离子 (Fe³⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Co²⁺、Ba⁺ 和 EDTA) 对酶活力的影响。

从图 17 可知，Fe³⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、

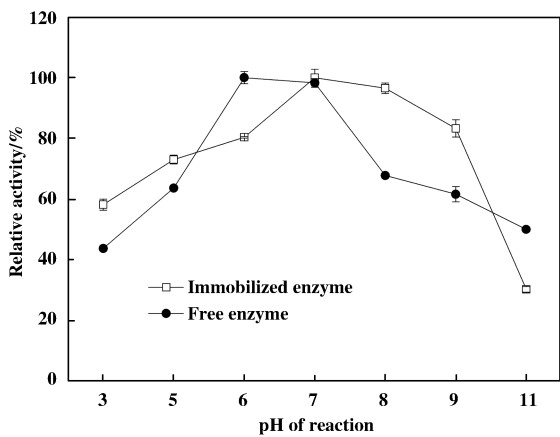


图 15 最适反应 pH

Fig.15 The optimum reaction pH of free and immobilized enzyme

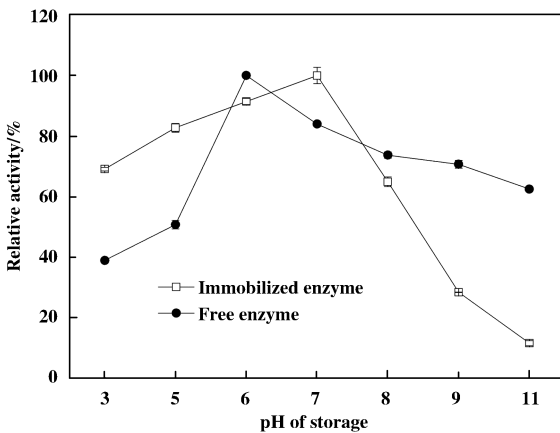


图 16 pH 耐受性

Fig.16 The tolerance of pH of free and immobilized enzyme

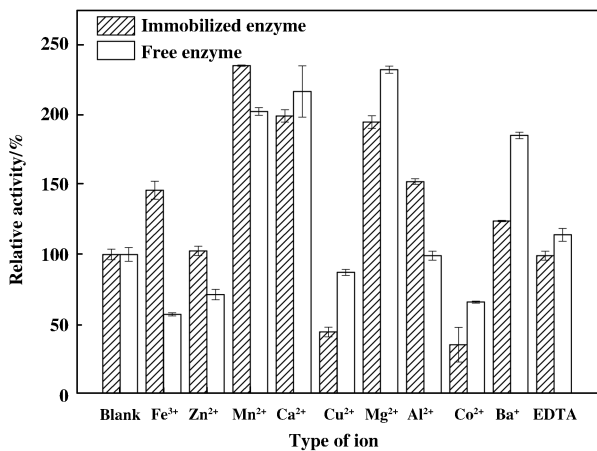


图 17 金属离子及 EDTA 对酶活性的影响

Fig.17 Effects of metal ion and EDTA on enzyme activity

Ba⁺对固定化酶起促进作用,其中 Mn²⁺促进作用最大,Cu²⁺和 Co²⁺对固定化酶有抑制作用,Co²⁺的抑制效果最明显;EDTA、Zn²⁺对酶活力基本没有影响;而游离酶中,Mn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Ba⁺可以促进酶活力提高,Fe³⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Co²⁺会抑制酶活力,Al³⁺和 EDTA 则基本不影响酶活力.综合比较,在选定的金属离子和 EDTA 中,多数金属离子对固定化酶的抑制作用要小于游离酶.

3 结论

通过化学法在聚丙烯腈膜上交联聚乙烯亚胺并固定脂肪酶,再通过引入海藻酸钠参与固定和氯化钙后处理的方法,获得耐酸性和耐温性均有所提高的固定化脂肪酶 PAN-PEI-SA/E-CaCl₂. 循环反应表明,15 次反应后,该固定化酶酶活保留率为 58.77%.该固定化酶的反应稳定性低于 Nov 435,但固定酶量和单位酶活更高,这为获得工业生产更高效稳定的固定化脂肪酶提供研究基础.但是载体准备时,相转化法制备聚丙烯腈中空膜易造成原料的浪费且载体传质阻力较大,后续的研究中优化制备工艺提高原料利用率并降低传质阻力,扩大应用前景.

参考文献:

[1] a. Sheldon R A, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(15): 6223-6235.
b. Liu Wen-fang (刘文芳), Wei Li-na (魏利娜). Research progress on carbonic anhydrase immobilization (碳酸酐酶固定化研究进展) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2016, **30**(2): 182-197.
c. Dou Bo-xin (窦博鑫), Xin Jia-ying (辛嘉英), Fan Hong-chen (范洪臣), et al. Functional self-assembly gold nanoparticle modified electrodes and application in the field of biosensors with enzyme immobilization (功能化金纳米修饰电极自组装及其在固定化酶生物传感器中应用) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2016, **30**(4): 391-400.
[2] Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation [J]. *Chem Soc Rev*, 2009, **38**(2): 453-468.
[3] Guo yong (郭勇). Enzyme engineering (酶工程) [M]. Science Press (科学出版社). 2009.
[4] Jain S, Chattopadhyay S, Jackeray R, et al. Surface modification of polyacrylonitrile fiber for immobilization of

- antibodies and detection of analyte [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, **654**(2): 103–110.
- [5] Chen S, Gao H, Chen J, *et al.* Surface Modification of polyacrylonitrile fibre by nitrile hydratase from corynebacterium nitrilophilus [J]. *Appl Biochem Biote*, 2014, **174**(6): 2058–2066.
- [6] Mei S, Xiao C, Hu X, *et al.* Hydrolysis modification of PVC/PAN/SiO₂ composite hollow fiber membrane [J]. *Desalination*, 2011, **280**(1/3): 378–383.
- [7] Ning Wei(宁伟). Studies on polymer surface photografting for amination(聚合物表面胺化接枝改性的研究)[D]. Master Dissertation of Beijing University of Chemical Technology(北京化工大学硕士论文). 2006.
- [8] Wang Qing-qing(王清清). Surface functionalization of PAN/O-MMT composite nanofibers and their performance in catalysis and adsorption(PAN/O-MMT 复合纳米纤维的表面功能化及其催化吸附性能研究)[D]. Doctoral Dissertation of Jiangnan University(江南大学博士论文). 2014.
- [9] Stoilova O, Manolova N, Gabrovska K, *et al.* Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes tailored for acetylcholinesterase Immobilization [J]. *J Bioac & Compat Poly*, 2010, **25**(1): 40–57.
- [10] Bode-Aluko C A, Perea O, Fatoba O, *et al.* Surface-modified polyacrylonitrile nanofibres as supports [J]. *Poly Bull*, 2017, **74**(6): 2431–2442.
- [11] Ren Yuan-lin(任元林), Liu Tian-tian(刘甜甜), Wang Ling-jie(王灵杰). Modification of polyacrylonitrile nanofibers and its application to adsorption of copper ions (PAN 纳米纤维的改性及其对铜离子的吸附性能) [J]. *J f Tianjin Poly Univer* (天津工业大学学报), 2015, **34**(6): 1–6.
- [12] Lou Qian-fang(娄倩芳). Immobilization of Trehalose Synthase(海藻糖合成酶的固定化研究)[D]. Master Dissertation of Jiangnan University(江南大学硕士论文). 2016.
- [13] Wang Ling-shu(万灵书), Huang Xiao-jun(黄小军), Xu Zhi-kang(徐志康). Modification and applications of polyacrylonitrile-based membranes: An overview(聚丙烯腈分离膜改性研究进展及其应用) [J]. *J Func Poly* (功能高分子学报), 2004, **17**(3): 527–534.
- [14] Amirilargani M, Sadrzadeh M, Sudhölter E J R, *et al.* Surface modification methods of organic solvent nanofiltration membranes [J]. *Chem Engineer J*, 2016, **289**(Supplement C): 562–582.
- [15] Kochkodan V, Hilal N. A comprehensive review on surface modified polymer membranes for biofouling mitigation [J]. *Desalination*, 2015, **356**(Supplement C): 187–207.
- [16] Wang Li(王力), Chen Zhao-wen(陈兆文), Zhang Qin(张琴), *et al.* Research on preparation of PAN-PEI fiber using in naval vessels and its properties of HCHO adsorption(舰艇用 PAN-PEI 纤维的制备及其吸附甲醛性能研究) [J]. *Ship Sci Technol*(舰船科学技术), 2016, **38**(3): 144–148.
- [17] Tao S, Jin Q, Liu Z. Polyethyleneimine-treated polyacrylonitrile membrane hemofilter for critically ill patients receiving anticoagulant-free prolonged intermittent renal replacement therapy: a single-center, prospective, self-controlled pilot study [J]. *Bmc Nephrology*, 2017, **18**(1): 208.
- [18] Panda S R, De S. Effects of polymer molecular weight, concentration, and role of polyethylene glycol as additive on polyacrylonitrile homopolymer membranes [J]. *Poly Engineer Sci*, 2014, **54**(10): 2375–2391.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analy Biochem*, 1976, **72**(s 1/2): 248–254.
- [20] Huang Yu-mei(黄宇美). Preparation, characterization and application of lipase immobilized onto novel magnetic cellulose nanocrystals(磁性纤维素纳米晶固定化脂肪酶的制备、表征及其应用)[D]. Master Dissertation of South China University of Technology(华南理工大学硕士论文). 2015.
- [21] Jiang Zhong-yi(姜忠义), Zhao Jing(赵静), Pan Fu-sheng(潘福生), *et al.* CN(中国专利) [P]. 104785121 A. 2015.

The Modification of Polyacrylonitrile Hollow Membrane by Polyethyleneimine to Immobilize Lipase

LU Jia-wei^{1,2}, LI You-ran^{1,2}, SHI Gui-yang^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wu xi, 214122, China;

2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University,
Wu xi 214122, China)

Abstract: Polyacrylonitrile is a nitrile-rich polymer and easy to be surface modified, and it has been widely applied in membrane separation. In this study, polyacrylonitrile hollow membrane was used as a support of enzyme immobilization by chemically cross-linking polyethyleneimine. Sodium alginate was added during immobilization, and the immobilized lipase was post-treated by CaCl_2 . The amount of loading enzyme of PAN-PEI-SA/E- CaCl_2 was 31.70 (mg enzyme)/ (g support) and the activity as 50.20 U/(g support). After 15 cycles of reactions, the immobilized enzyme retained 58.77% of initial enzyme activity, and showed an improvement of heat and acid resistance compared to free lipase. When it is compared to commercialized Nov 435 under same condition, PAN-PEI-SA/E- CaCl_2 has higher enzyme activity during 15 cycles of reactions. It shows the immobilized lipase with PAN after surface modification has industrial application prospects.

Key words: polyacrylonitrile; surface modification; enzyme immobilization; lipase