

## 荧光标记脂肪酶的固定化及其稳定性

徐佳音<sup>1</sup>, 张驰<sup>1</sup>, 宋锡瑾<sup>1</sup>, 王杰<sup>2</sup>

1 浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州 310027

2 浙江大学化学系, 杭州 310027

**摘要:** 将标记有荧光探针 FITC (异硫氰基荧光素) 的脂肪酶固定化, 通过测定活性和荧光光谱, 探究各种因素对固定化后荧光标记脂肪酶性质的影响, 并分析活性、构象和荧光光谱三者之间的联系。研究结果表明: 在固定化脂肪酶过程中, 聚乙二醇 400 二丙烯酸酯能形成合理的网格结构, 使酶活较高; 配体诱导酶的催化构象, 使酶活性提高到未诱导酶的 2 倍以上; 配体抽提能使脂肪酶活性中心得到释放从而提高催化活力。固定化脂肪酶的稳定性大大提高, 在 90℃、强酸强碱下固定化酶仍保有原酶 70%、60% 以上的活性; 用盐酸胍、脲等溶解变性剂浸泡 15 d 后, 酶活性仍然可以保持初始活性的 70% 以上。荧光光谱能较好地反映脂肪酶的活性和构象变化, 最适 pH 和温度下脂肪酶的荧光强度最低, 在溶解变性剂中, 荧光强度随时间延长而逐渐降低, 这表明不同条件下脂肪酶构象经历的去折叠过程不同。

**关键词:** 脂肪酶, 固定化, 稳定性, 荧光光谱, 构象

## Immobilization of lipase labeled with fluorescent probe and its stability

Jiayin Xu<sup>1</sup>, Chi Zhang<sup>1</sup>, Xijin Song<sup>1</sup>, and Jie Wang<sup>2</sup>

1 Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

2 Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

**Abstract:** The lipase labeled with the fluorescein isothiocyanate (FITC) was immobilized on the derivatives of the polyethylene glycol. The article discussed the effect of factors on the characters of lipase and analyzed the relationships among the activity of lipase, conformation, and fluorescence spectrum while the activity and the fluorescence spectrum of immobilized lipase were determined. The results demonstrated that polyethylene glycol 400-diacrylate could form appropriate network to improve the activity of enzyme. Adding ligand induced the lipase's catalytic conformation to increase the activity twice more than before. The active centre of lipase could be released by the extraction of ligand thus increasing the activity. After immobilization, the stability of labeled lipase improved greatly: immobilized lipases retained more than 70% and 60% of initial activity under conditions of 90°C and strong acid or alkali, respectively. After immersing immobilized lipases into guanidine hydrochloride or urea for 15 days, the lipases retained upwards of 70% activity. The fluorescence spectrum could obviously reflect the changes of the activity and conformation of lipase. The fluorescence intensity was the minimum in the optimal pH and temperature. In the denaturing agent it declined as time passed. These results indicated that the unfolded processes of immobilized lipases are different under different conditions.

**Keywords:** lipase, immobilization, stability, fluorescence spectrum, conformation

**Received:** August 19, 2009; **Accepted:** November 19, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 20276067).

**Corresponding author:** Xijin Song. Tel: +86-571-87951224; E-mail: xjsong@zju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20276067) 资助。

脂肪酶 (Lipase E.C.3.1.1.3) 是一类特殊的酯键水解酶, 它能在油水界面上催化酯水解、酯合成、酯交换及立体异构体拆分等有机合成反应, 因此工业用途广泛, 是目前被重点研究的生物催化剂。为了改善生物催化剂使用稳定性差、易失活、适应反应介质能力弱等缺点, 常将脂肪酶固定化后使用。但这种工作多注重于工艺本身<sup>[1-3]</sup>, 对脂肪酶固定化后微环境构象变化研究甚少。荧光光谱法是一种根据蛋白质荧光发射光谱特定部位的荧光强度得到荧光图谱, 进而直观地获得蛋白质结构变化信息的方法<sup>[4]</sup>。荧光光谱还可同时提供激发光谱、发射光谱、荧光强度等许多物理参数用于蛋白质结构分析和定量测定<sup>[5-6]</sup>。本研究将荧光探针异硫氰基荧光素 (FITC)<sup>[7-8]</sup> 标记到脂肪酶上, 然后通过交联聚合固定化脂肪酶。通过测定酶活性和荧光光谱, 探究 pH 值、温度和变性剂对固定化后荧光标记脂肪酶性质的影响, 获得固定化后微环境变化对脂肪酶影响的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

F-4500 荧光分光光度计, 购于日本 Hitachi 公司; pH S-3B 型 pH 计, 购于上海雷磁仪器厂; 紫外光聚合设备, 自制, 波长 365 nm; 球形索式抽提器; 半透膜, 购于华东医药, 截留分子量 8000~12000 Da, 直径 34 mm。

脂肪酶 (EC3.1.1.3, CRL), 购于 Sigma 公司, 用 pH 7.43 的磷酸盐缓冲液配制成 2 mg/mL, 置于 4℃ 的冰箱中保存; FITC, 购于 Sigma 公司; 聚乙二醇 200 二丙烯酸酯、聚乙二醇 400 二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯 (TMPTA), 购于天津天骄化工有限公司, 工业级; 月桂酸、氢氧化钠、乙醇、丙酮、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、琥珀酸二辛酯磺酸钠 (AOT)、橄榄油、聚乙烯醇为国产分析纯或化学纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 脂肪酶的荧光标记

按文献[9]的方法, 将荧光探针 FITC 加入到脂肪酶液 (按 1.2.4 法测得酶液的活力为 0.89 U/mL, 考马斯亮蓝法<sup>[10]</sup>测得蛋白含量为 0.48 mg/mL) 中,

采用半透膜搅拌透析除去多余的 FITC, 最后取出透析袋中的荧光标记脂肪酶液待用。

#### 1.2.2 脂肪酶的固定化

分别称取 45 g 聚乙二醇 200 二丙烯酸酯和聚乙二醇 400 二丙烯酸酯, 编号分别为 Poly-200、Poly-400, 各加入 3 g 月桂酸, 待加热溶解后逐滴滴加 FITC 荧光标记酶液 9 mL, 随后加入 3.5 mL AOT, 直到混合液成为均一的 W/O 乳化体系为止。然后根据前期实验获得的单体和交联剂的最佳配比量<sup>[1]</sup>, 加入 22.5 g 交联剂 TMPTA。向上述 2 个混合物中分别加入 0.675 g 光引发剂安息香甲醚, 待溶解后放入紫外光聚合装置下聚合 45 s。聚合完成后, 依次用水和 95% 乙醇清洗表面, 除去未反应完全的原料后, 放入温度为 37℃、真空度为 0.09 MPa 的真空干燥箱干燥, 得 2 种脂肪酶聚合物 (LP): FITC 标记 LP-200、FITC 标记 LP-400。此外, 不加月桂酸的固定化酶聚合物 (其余配比不变) 作为空白对照。

#### 1.2.3 配体的洗脱

研磨干燥好的荧光标记脂肪酶聚合物, 并用 40~60 目方孔的标准检验筛分级。用滤纸包好研磨后的聚合物颗粒, 把它放入球形索式抽提器中, 用石油醚 (沸程 60℃~90℃) 为溶剂进行抽提, 连续抽提 15 h。抽提完毕后放入真空干燥箱, 在 37℃、真空度为 0.09 MPa 条件下干燥。

作为对照, 取部分研磨后的粉末直接保存, 不进行配体的洗脱。

#### 1.2.4 脂肪酶活性测定

配制 150 mL 质量分数为 2% 的聚乙烯醇溶液, 加入 50 mL 橄榄油后高速搅拌, 乳化。取 4 mL 乳化液与 5 mL、pH 7.5 的磷酸缓冲液混合后置于 37℃ 水浴中保温 5 min, 接着加入 1 g 脂肪酶聚合物, 反应 15 min 后立即取出迅速加入 15 mL、乙醇/丙酮 (1:1, V/V) 终止反应, 滴加酚酞指示剂 3 滴, 用 0.05 mol/L NaOH 滴定至溶液变为粉红色为止, 以不加酶的溶液作为空白对照。酶活以在上述条件每分钟生成 1 μmol 脂肪酸需要的酶量为 1 个活性单位 (U)。

#### 1.2.5 荧光光谱测定

采用 F-4500 型荧光光度仪测定荧光光谱, 荧光

光谱条件: 激发波长为 489 nm, 激发狭缝为 2.5 nm, 发射狭缝为 1 nm, 测定温度为 25℃, 预保温 15 min, 检测 510~550 nm 的荧光发射光谱。

### 1.2.6 荧光标记 LP 稳定性研究

取一定量的 LP-200 和 LP-400, 分别在 37℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 的烘箱中放置 1 h 后取出, 按 1.2.4 和 1.2.5 的方法测定其酶活和荧光光谱, 考察荧光标记 LP 的温度稳定性。

取一定量的 LP-200 和 LP-400, 分别放入 pH 值为 3.2、4.7、7.4、8.7、11 的溶液中 1 h, 然后过滤、真空干燥 (温度 37℃、真空度 0.09 MPa), 测定荧光标记 LP 的活性和荧光光谱, 考察荧光标记 LP 的 pH 稳定性。

取 LP-200、LP-400 分别放入 5 mol/L 的盐酸胍和 8 mol/L 的脲溶液中, 分别放置 2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、15 d, 然后过滤、真空干燥 (温度 37℃、真空度 0.09 MPa), 考察溶解变性剂对荧光标记 LP 的活性和荧光光谱的影响。

### 1.2.7 载体荧光数据的处理

计算固定化后酶蛋白在变性过程中的相对构象变化量  $f$ 、相对活性变化量  $a$  以及相对构活比  $r$ , 公式如下<sup>[11-13]</sup>:

$$f = (F_N - F) / F_N \quad (1)$$

$$a = (A_N - A) / A_N \quad (2)$$

$$r = f / a \quad (3)$$

其中,  $F_N$  和  $A_N$  代表酶蛋白最大活性下的荧光值和最大活性值,  $F$  和  $A$  代表不同变性条件下的实时荧光值和活性值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同聚合单体对荧光标记 LP 的影响

在脂肪酶固定化过程中, 分别使用 Poly-200 和 Poly-400 作为聚合单体的, 最后得到的脂肪酶聚合物分别为 LP-200 和 LP-400, 其对应的荧光标记的活性见表 1。从中可以看出: 经荧光探针标记的脂肪酶, LP-400 的活性要高于 LP-200; 原因是 Poly-400 的单体链长, 在固定化过程中产生的网格较大, 所以在反应过程中, 传质阻力较小, 有一定的优势, 因此 Poly-400 的效果比 Poly-200 的好。

图 1 是连接上 FITC 后的不同聚合单体对 LP 的影响的荧光光谱图。可以看出, 在相同的条件下, LP-400 的荧光强度要略高于 LP-200, 这是由于以下原因: LP-400 所包裹脂肪酶形成的构象变化利于其活性的表达, 其构象相对 LP-200 所包裹的构象更舒展, 使得其荧光强度变大。

### 2.2 配体诱导对荧光标记 LP 的影响

在荧光标记脂肪酶的固定化过程中加入月桂酸配体进行诱导, 以此对比未加配体的情况, 其结果如表 1 所示, 诱导之后的 LP 经过配体洗脱后, 其活性普遍是未诱导的 LP 活性的 2 倍以上。其原因如下: 脂肪酶活性中心上存在一个“盖子”结构, 该结构使酶的活性中心与分子表面相隔开; 用配体进行诱导之后, 酶的构象发生变化, “盖子”被打开, 含活性部位的疏水基团易暴露在分子表面, 这是底物易与活性中心接触的催化构象; 其后进行的交联聚合能够捕抓这一催化构象, 因此宏观表现为配体诱导后酶的活性更大。

表 1 不同单体的 FITC 标记的 LP 活性

Table 1 Activity of FITC labeled LP with different polymer monomers

Lipase polymer	Non-ligand (U/g)	Ligand un-extracted (U/g)	Ligand extracted (U/g)
LP-200	0.63	0.21	1.75
LP-400	1.12	0.29	2.73

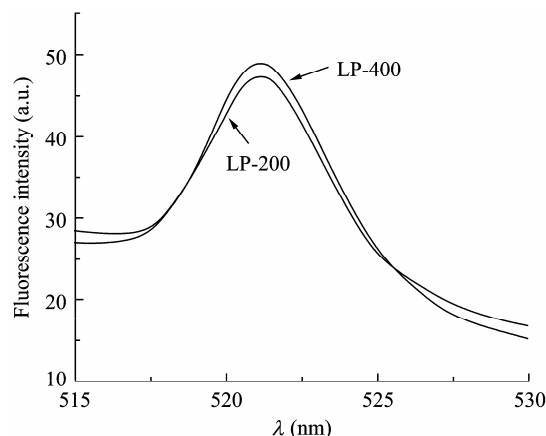


图 1 不同 LP 在 489 nm 激发下的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectrum of different LP in the excitation wavelength of 489 nm.

图 2 是荧光标记 LP 的荧光光谱图,从中可以发现经过配体诱导的荧光光谱强度要大于未诱导的 LP, 同时在 LP-400 的光谱中两者的差异性相对于 LP-200 较大。此结果也与脂肪酶的“盖子”开合状态相关: 当存在配体诱导时, 脂肪酶的“盖子”结构打开, 构象舒展, 其标记在隐蔽处的荧光探针也开始接收到激发光进而产生发射光, 因此荧光强度变强; 而由于 LP-400 所采用的聚合单体在脂肪酶的固定化上相对于 LP-200 较成功<sup>[1]</sup>, 因此其“盖子”打开的程度相对也较大, 总体上的构象变化也较大, 所以表现在荧光光谱上是 LP-400 未加配体和加配体的荧光光谱产生了更为明显的差距。

### 2.3 配体抽提对荧光标记 LP 的影响

表 1 中显示了配体的抽提情况对荧光标记 LP 的影响, 结果表明: 经抽提后的 LP 活性远远大于未抽提 LP 的活性。加入的配体为脂肪酶的底物类似物, 故脂肪酶与配体的结合部位是酶的活性中心, 不进行配体的抽提, 脂肪酶的活性将会降低。

图 2 显示了 LP 未经抽提和已抽提配体的荧光光谱, 从这图中可以发现, 两者的荧光光谱都比较接近, 说明两者在构象上较为相似。从理论上来说, 抽提的过程并不会破坏脂肪酶在载体中稳定的构象, 因此其未抽提的构象应该与抽提的构象完全相似, 但是结果却与理论不完全相同, 其原因是: 配体与脂肪酶的连接位点为脂肪酶的活性部位, 但由

于配体连接上的脂肪酶已经进行了荧光标记, 因此配体可能会遮挡一小部分位于活性部位附近的荧光探针, 最终导致未抽提配体的荧光光谱略小于已抽提配体的 LP。

### 2.4 温度对荧光标记 LP 的影响

固定化后的荧光标记脂肪酶能克服耐热性差的缺点, 提高酶的稳定性。研究发现, 温度从 37℃ 升高到 50℃ 时, 固定化脂肪酶的活性随温度升高逐渐增大, 50℃ 时脂肪酶的活性最大, 比游离脂肪酶的最适温度高了 13℃。但当温度继续升高时, FITC 荧光标记的 LP-400 和 LP-200 酶活都降低。对比液体中的酶活变化情况<sup>[9]</sup>, 可以发现固定化酶在 90℃ 仍然具有 70% 左右的活性, 而游离酶在 70℃ 下已完全失活, 说明固定化后的脂肪酶的热稳定性大大提高, 结果表明: 聚合单体和酶分子之间的非共价作用不但可以很好地维持酶活性构象, 而且聚合单体和一些氨基酸残基基团的作用力也很有可能增加这些残基的热稳定性。另外, 不同的温度条件下, FITC 荧光标记的 LP-200 和 LP-400 的活性变化非常相近, 因为 LP-200 和 LP-400 中聚乙二醇性质相差较小, 使酶活的变化规律类似。

图 3 中的荧光光谱图显示了在不同温度下固定化后的脂肪酶的固体荧光光谱图, 对比两图发现, LP-400 和 LP-200 的 37℃ 和 50℃ 的荧光曲线类似, 而与 60℃ 至 90℃ 的荧光曲线存在明显区别; 同时酶

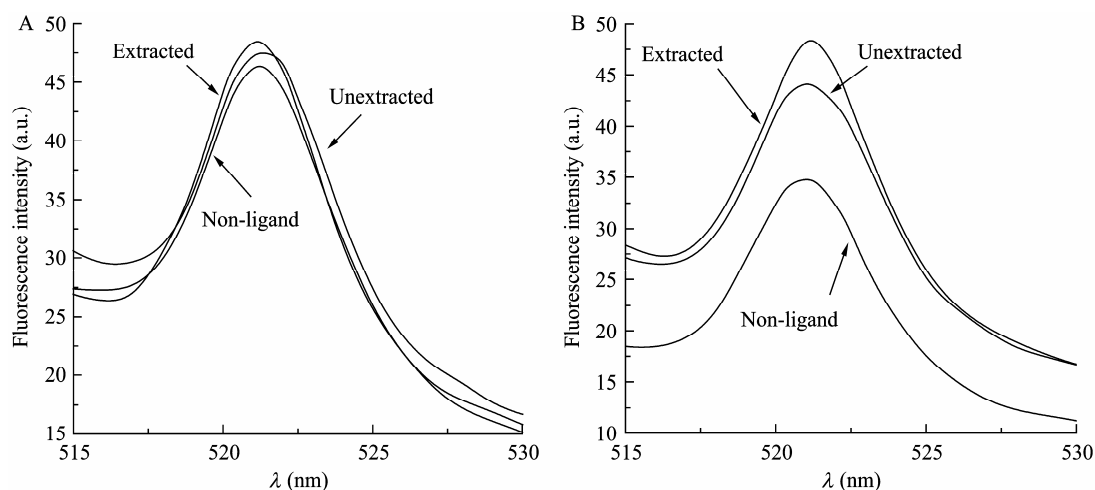


图 2 LP-200 (A) 和 LP-400 (B) 在 489 nm 激发下的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectrum of LP-200(A) and LP-400(B) in the excitation wavelength of 489 nm.

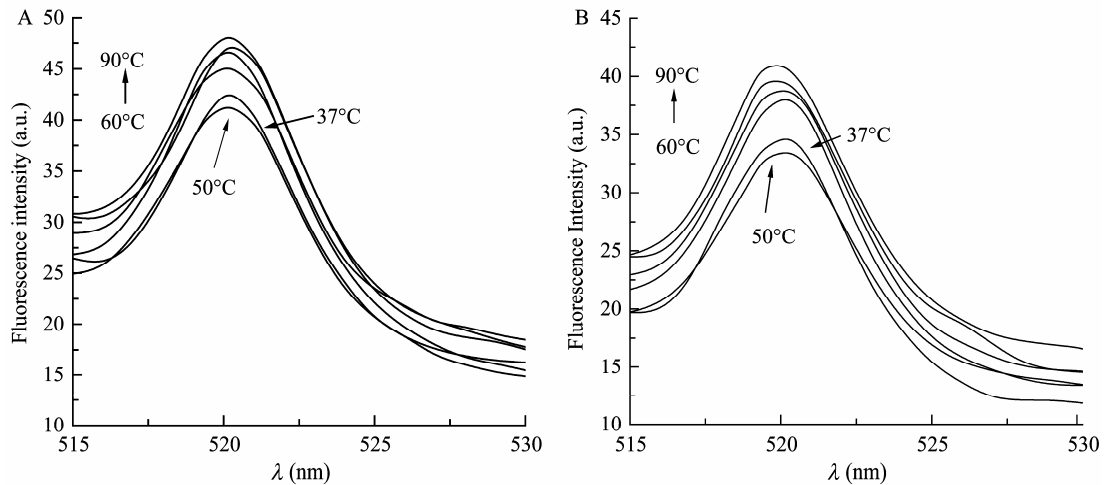


图3 FITC 荧光标记的 LP-200 (A) 和 LP-400 (B) 在不同温度下的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectrum of FITC labeled LP-200(A) and LP-400(B) at different temperature.

活曲线也反映出 37℃ 与 50℃ 的活性较接近, 而 60℃ 之后活性大幅度下降。37℃ 至 50℃ 时脂肪酶的构象保持在最佳状态, 活性高; 随着温度增加到 60℃ 及以上, 活性中心由于整体构象的过于舒展而被破坏, 活性表达能力逐步降低。

对不同温度条件下的荧光光谱图和活性按照公式 (1-3) 处理后得到相关数据, 如表 2 所示。相对构活比  $r$  是相对构象变量  $f$  和相对活性变化量  $a$  的比值, 其反映了酶构象变化的程度对活性变化的影响, 该数值越高说明尽管酶整体构象改变较大, 但活性中心处的构象改变较小, 即构象变化位点的重点不在活性中心处, 酶的活性变化不大。当同一物质在同一变性条件下, 该理论值应该是一个稳定的常数, 但是考虑到实际情况的复杂性,  $r$  值会有所波动, 但是波动幅度越小越好, 波动越小说明荧光光谱反映的构象变化越真实越精确。从表 2 中可以得到: 在不同温度条件下, FITC 荧光标记的 LP-200 的  $r$  值为 0.52 左右, FITC 荧光标记的 LP-400 的  $r$  值为 0.65, 表明在不同的温度下, FITC 荧光标记的 LP-200 构象的变化对酶活力影响较小。

## 2.5 pH 值对荧光标记 LP 的影响

脂肪酶经过固定化后, 它的最适 pH 仍然为 7.4, 但是耐酸耐碱性大幅度提高, 即使到了较为极端的 pH 值 (pH 3.2 和 pH 11.0), 也能始终保持 60% 以上的活性, 体现出了固定化后的优势。经过 FITC 标记后的 LP-200 和 LP-400 的活性下降规律基本相同, 都

是随着酸碱强度的增大, 酶活性逐步降低。

图 4 中的荧光光谱图表明在最适 pH 7.4 时脂肪酶的荧光强度最低, 随着酸性和碱性的增加, 荧光强度不断增强。与温度对脂肪酶的作用机理相同, 最适 pH 条件下脂肪酶结构紧凑, FITC 的荧光被掩盖, 因此荧光强度最低; 偏离最适 pH 越远, 酶结构逐渐舒展, 荧光强度增大, 同时活性降低。

对不同 pH 值条件下的荧光光谱图和活性图按照公式处理后得到相关数据, 如表 3 所示。从表中

表2 FITC 荧光标记的 LP-200 和 LP-400 在不同温度下的处理数据

Table 2 Data of FITC labeled LP-200 and LP-400 at different temperatures

Temperature (°C)		37	60	70	80	90
LP-200	$f$	0.037	0.096	0.123	0.146	0.170
	$a$	0.070	0.180	0.240	0.280	0.320
	$r$	0.529	0.533	0.512	0.521	0.531
LP-400	$f$	0.045	0.136	0.152	0.197	0.242
	$a$	0.070	0.210	0.250	0.280	0.330
	$r$	0.643	0.648	0.638	0.654	0.663

表3 FITC 荧光标记的 LP-200 和 LP-400 在不同 pH 值下的处理数据

Table 3 Data of FITC labeled LP-200 and LP-400 at different pH

pH		3.2	4.7	8.7	11
LP-200	$f$	0.147	0.088	0.112	0.206
	$a$	0.280	0.190	0.220	0.390
	$r$	0.525	0.462	0.511	0.528
LP-400	$f$	0.172	0.082	0.146	0.206
	$a$	0.280	0.140	0.230	0.340
	$r$	0.615	0.586	0.635	0.605

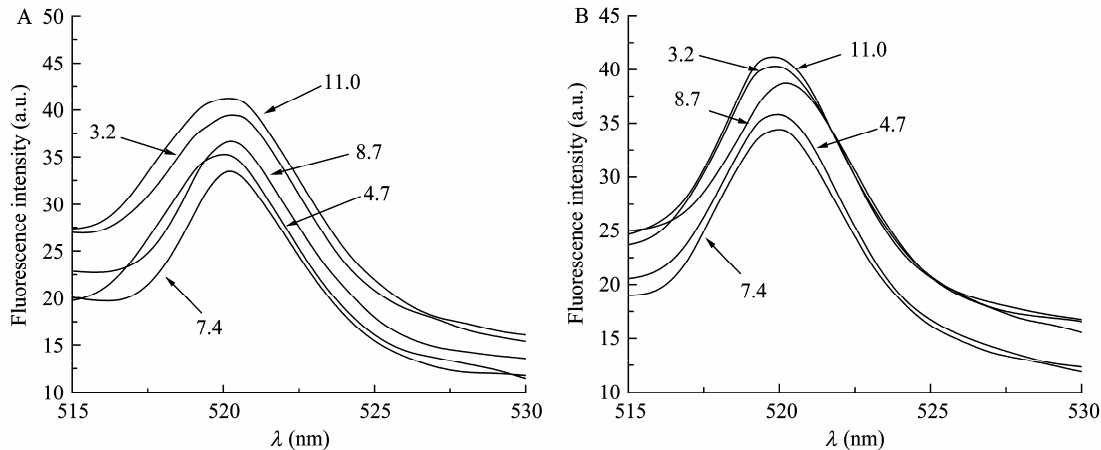


图 4 FITC 荧光标记的 LP-200 (A) 和 LP-400 (B) 在不同 pH 值下的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectrum of FITC labeled LP-200(A) and LP-400(B) at different pH.

可以得到：在非最适 pH 条件下，FITC 荧光标记的 LP-200 的  $r$  值为 0.5 左右，FITC 荧光标记的 LP-400 的  $r$  值为 0.6，表明 FITC 荧光标记的 LP-200 在 pH 条件下构象的变化程度对酶活影响较小。同时将在不同温度条件下的荧光标记 LP 的  $r$  值和 pH 值变性条件下的  $r$  值比较，在荧光探针标记和同种聚合单体下的 LP 的  $r$  值比较接近，存在较好的重复性。

2.6 溶解变性剂对荧光标记 LP 的影响

荧光标记 LP 在 5 mol/L 盐酸胍或 8 mol/L 脲的作用下，随着时间的推移，酶活逐渐降低，但是降低趋势逐渐减小，10 d 后酶活趋于稳定。对比游离脂肪酶的变性实验，荧光标记的游离脂肪酶在盐酸胍或脲的作用下 2 h 后就完全失活，而经过固定化后，15 d 后活性仍然有 70% 以上，显示出了固定化后酶的良好稳定性。对比两种聚合单体 Poly-200 和 Poly-400，可以发现：经过 Poly-400 固定化的脂肪酶在溶解变性剂的作用下，在前几天的活性保持率要略高于 Poly-200 的情况，但是等到活性稳定后，其活性值与后者差距不大。

图 5、6 中的荧光光谱图显示了荧光标记 LP 在盐酸胍和脲的作用下的荧光光谱变化，其变化趋势同活性基本相同，都是前期变化幅度大，后期基本稳定。但是其荧光强度的变化趋势与之前的温度、pH 值变性的固体荧光光谱恰好相反，其原因应是由于变性过程中构象去折叠所经历的过程不同导致的。

对在溶解变性剂作用下的荧光光谱图和活性曲线按照公式处理后得到相关数据，如表 4、5 所示。从表中可以得到：在 5 mol/L 盐酸胍或 8 mol/L 脲作用下，FITC 标记的 LP-200、LP-400 的  $r$  值在 0.95~1.20 之间，都非常接近。这表明 LP 在两种变性剂中的构象变化对活性产生影响的过程非常相似，间接表明了 5 mol/L 盐酸胍和 8 mol/L 脲具有非常一致的构象变性作用。

表 4 FITC 荧光标记的 LP-200 和 LP-400 在 5 mol/L 盐酸胍作用下的处理数据

Table 4 Data of FITC labeled LP-200 and LP-400 in the 5 mol/L guanidine hydrochloride

	$t$ (d)	2	4	6	8	10	15
LP-200	$f$	0.100	0.170	0.220	0.250	0.280	0.290
	$a$	0.090	0.150	0.190	0.220	0.240	0.250
	$r$	1.11	1.13	1.16	1.14	1.17	1.16
LP-400	$f$	0.076	0.136	0.178	0.200	0.244	0.266
	$a$	0.080	0.140	0.180	0.210	0.240	0.250
	$r$	0.950	0.971	0.989	0.952	1.02	1.06

表 5 FITC 荧光标记的 LP-200 和 LP-400 在 8 mol/L 脲作用下的处理数据

Table 5 Data of FITC labeled LP-200 and LP-400 in the 8 mol/L urea

	$t$ (d)	2	4	6	8	10	15
LP-200	$f$	0.132	0.181	0.243	0.261	0.292	0.302
	$a$	0.120	0.160	0.210	0.230	0.250	0.260
	$r$	1.08	1.12	1.14	1.13	1.16	1.15
LP-400	$f$	0.097	0.152	0.217	0.250	0.261	0.272
	$a$	0.100	0.150	0.190	0.240	0.260	0.280
	$r$	0.970	1.01	1.14	1.04	1.01	0.971

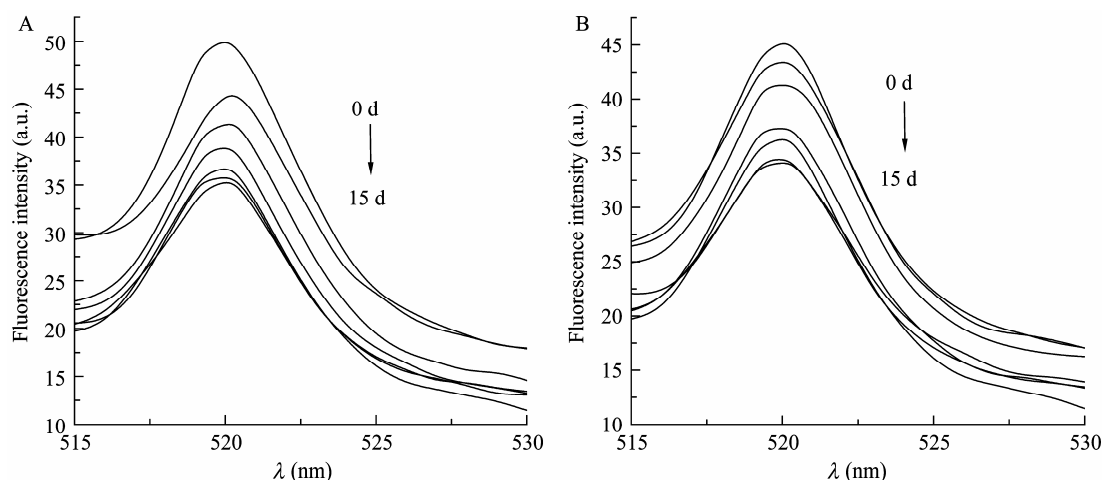


图 5 FITC 荧光标记的 LP-200 (A) 和 LP-400 (B) 在 5 mol/L 盐酸胍作用下的荧光光谱

Fig. 5 Effect of 5 mol/L guanidine hydrochloride on the fluorescence spectrum of FITC labeled LP-200(A) and LP-400(B).

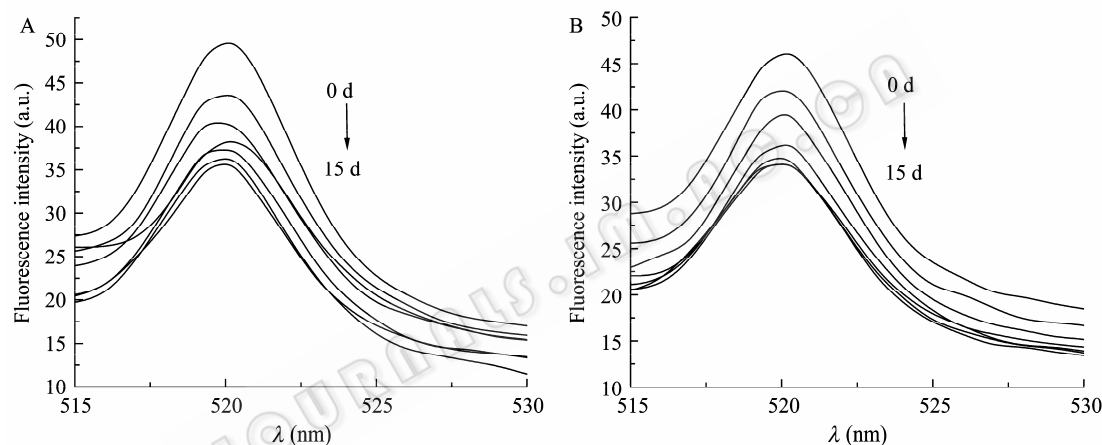


图 6 FITC 荧光标记的 LP-200 (A) 和 LP-400 (B) 在 8 mol/L 脲作用下的荧光光谱

Fig. 6 Effect of 8 mol/L urea on the fluorescence spectrum of FITC labeled LP-200(A) and LP-400(B).

### 3 结论

采用聚乙二醇 200 二丙烯酸酯和聚乙二醇 400 二丙烯酸酯两种单体对标记有 FITC 的脂肪酶进行固定化, 结果表明由于后者主链较长, 在载体化过程中产生的网格较大, 使得形成的脂肪酶构象更舒展, 荧光强度更大, 酶活更高。

用月桂酸作为配体对脂肪酶进行诱导后再进行固定化, 诱导之后的 LP 活性普遍是未诱导的 LP 活性的 2 倍以上。说明配体能够诱导酶处于催化构象从而更适合活性的表达, 然而不对配体抽提会导致脂肪酶活性中心被配体占据, 降低酶对目标底物的催化活性。

对固定化酶的稳定性研究发现, 酶的最适温度

为 50℃, 比游离脂肪酶的最适温度高了 13℃, 且在 90℃ 时仍保持有原酶 70% 的活性; 耐酸碱性大幅度提高, 即使到了较为极端的 pH 值下, 也能始终保持 60% 以上的活性。最适 pH 或温度条件下脂肪酶的荧光强度最低, 随变性过程的进行, 酶构象逐渐舒展, 荧光强度逐渐增大, 活力逐渐降低。固定化脂肪酶在盐酸胍和脲溶解变性剂中, 15 d 后活性仍然有 70% 以上。但溶解变性剂对脂肪酶的变性作用机理与温度、pH 不同, 因为变性过程中荧光强度的变化趋势恰好相反。

### REFERENCES

- [1] Gong W, Song XJ, Wang J. Study on lipase conformation recording and its stability. *J Zhejiang Univ (Eng Sci)*, 2006,

- 40(5): 841–844.  
龚伟, 宋锡瑾, 王杰. 脂肪酶构象刻录及稳定性研究. 浙江大学学报 (工学版), 2006, 40(5): 841–844.
- [2] Zeng SH, Yang JK, Yan YJ. Studies on stability of immobilized lipase and its application. *Chin J Bioproc Eng*, 2007, 5(1): 45–49.  
曾淑华, 杨江科, 闫云君. 固定化脂肪酶性质及其应用研究. 生物加工过程, 2007, 5(1): 45–49.
- [3] Fishman A, Cogan U. Bio-imprinting of lipases with fatty acids. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 22(3/4): 193–202.
- [4] Jiao M, Lang Y, Li HT, *et al.* Studies on the unfolding of catalase induced by urea and guanidine hydrochloride. *Acta Chim Sin*, 2003, 61(9): 1362–1368.  
焦铭, 梁毅, 李洪涛, 等. 脲和盐酸胍诱导过氧化氢酶去折叠的研究. 化学学报, 2003, 61(9): 1362–1368.
- [5] Wang SY, Xu XL, Liu QL, *et al.* The application of fluorescence spectroscopy in the study on protein conformation. *Progress Chem*, 2001, 13(4): 257–260.  
王守业, 徐小龙, 刘清亮, 等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用. 化学进展, 2001, 13(4): 257–260.
- [6] Xu TK, Li N, Shen XH, *et al.* Interaction of surface active fluorescence probes and bovine serum albumin. *Spectrosc Spectral Anal*, 2005, 25(9): 1443–1445.  
徐同宽, 李娜, 沈兴海, 等. 表面活性荧光探针分子与牛血清蛋白的相互作用. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(9): 1443–1445.
- [7] Schnaible V, Przybylski M. Identification of fluorescein-5'-isothiocyanate-modification sites in proteins by electrospray-ionization mass spectrometry. *Bioconjugate Chem*, 1999, 10(5): 861–866.
- [8] Lin SH, Faller LD. Preparation of Na, K-ATPase specifically modified on the anti-fluorescein antibody-inaccessible site by fluorescein 5'-isothiocyanate. *Anal Biochem*, 2000, 287(2): 303–312.
- [9] Zhang C, Song XJ, Wang J, *et al.* Stability and fluorescence spectra of lipase labeled with FITC. *Chin J Appl Chem*, 2008, 25(12): 1381–1384.  
张弛, 宋锡瑾, 王杰, 等. FITC标记脂肪酶的稳定性和荧光光谱. 应用化学, 2008, 25(12): 1381–1384.
- [10] Li JW, Yu RY, Yuan MX, *et al.* Principle and Method of Biochemical Experiment. Beijing: Beijing University Press, 1994: 174.  
李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994: 174.
- [11] Ye MQ, Yi TY, Li HP, *et al.* Study on thermal and thermal chemical denaturation of bovine immunoglobulin G. *Acta Chim Sin*, 2005, 63(22): 2047–2054.  
叶茂青, 易同寅, 李华屏, 等. 牛血清IgG热化学变性和热变性的研究. 化学学报, 2005, 63(22): 2047–2054.
- [12] Moosavi-Movahedi AA, Nazari K. Denaturation of horseradish peroxidase with urea and guanidine hydrochloride. *Int J Biol Macromol*, 1995, 17(1): 43–47.
- [13] Farruggia B, Pico GA. Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin. *Int J Biol Macromol*, 1999, 26(5): 317–323.