

## 固定化地衣芽孢杆菌胞外脂肪酶的制备

吴程雨, 叶 飘, 杨孝婷, 徐叶倩, 巩孝磊, 唐琦清, 赵辅昆, 潘建义, 陈 玮

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 脂肪酶是一类重要的水解酶, 广泛应用于食品、医药、化工等领域。脂肪酶通过固定化可以提高酶的使用效率。文章采用戊二醛共价连接法将来源于地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的胞外脂肪酶固定于氨基型载体 ZH-HA 之上, 将 1 g 载体置入 10 mL 酶液中反应 3 h 后固定化酶活力达到最高为 60 U/g 湿载体。经固定化后该酶的温度稳定性得到显著提升, 当反应温度为 45℃ 时最高酶活力达到 220 U/g 湿载体。同时, 固定化使酶在碱性条件下的稳定性得到提高, 最适反应 pH 值为 10。通过自制柱式反应器考察该酶工作稳定性, 经过 15 批连续水解反应, 固定化脂肪酶仍保持 90% 的活力, 展现出良好的稳定性。

**关键词:** 地衣芽孢杆菌; 脂肪酶; 固定化; ZH-HA

**中图分类号:** Q786 **文献标志码:** A

### 0 引 言

脂肪酶(三酰基甘油酯水解酶, EC 3. 1. 1. 3)<sup>[1]</sup>, 属于水解酶类家族, 除了水解作用, 脂肪酶还能催化其它多种生物转化反应, 如有机合成反应、酸解、氨解、酯化反应、酯交换反应及酯基转移反应等<sup>[2-3]</sup>。脂肪酶在自然界中广泛存在<sup>[4]</sup>, 不仅有参与新陈代谢的重要生理作用, 而且有很大的工业价值, 包括一些特殊有机物的合成, 脂肪和油类的水解, 食品工业发展中香料的改进以及化学分析等<sup>[5]</sup>。此外, 脂肪酶还可以催化动、植物油脂发生酯交换反应得到脂肪酸甲酯或乙酯类物质, 该类物质是生物柴油的重要组成部分, 它不含芳香烃, 对环境友好, 与普通燃油相比, 极大降低污染物的排放<sup>[6-8]</sup>, 且生物柴油属于可再生能源, 并且还具有润滑性能良好、燃烧充分、便于运输及使用安全等性能<sup>[9-10]</sup>。同时, 酶法合成生物柴油, 还能进一步合成其他一些高附加值的产品。因此, 脂肪酶在工业领域有很大的应用潜力。

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)脂肪酶

属于  $\alpha/\beta$  水解酶超家族<sup>[11]</sup>, 该酶为胞外脂肪酶, 分子量约为 20 kD, 易于通过细菌发酵生产, 在碱性的条件下(pH>9.5)催化活力较高, 具有一定的工业应用价值, 但是该酶也存在热稳定性较低的缺点, 制约其生产应用。

固定化是脂肪酶应用于工业生产的重要途径<sup>[12]</sup>, 固定化技术可提高酶的稳定性, 并能实现酶的长期反复使用, 从而降低生产成本。此外, 固定化载体的基团会影响反应体系的微环境, 从而改变游离酶的一些特性。有多种方法可以进行酶的固定化, 其中吸附法是最常见的方法之一, 该法具有操作简单, 条件温柔, 活力回收率高等特点, 然而吸附法往往因酶与载体的结合力较弱从而使得酶容易脱落。共价法固定化是另一种常见的方法, 可通过共价键将酶牢固地连接在载体之上。在脂肪酶固定化的研究中, 溴化氰活化多糖载体法、叠氮基团法、环氧基团法等已被使用, 然而这些方法都含有剧毒物质或者反应时间过长的等缺点。ZH-HA 是一种氨基型载体, 可以快速和醛基形成席夫碱(Schiff base)

收稿日期: 2014-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200110); 浙江省高校生物学重中之重(一级)学科开放基金项目(2012D11); 浙江理工大学科研启动基金项目(13042166-Y)

作者简介: 吴程雨(1990-), 男, 广西桂林人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和微生物发酵方面的研究。

通信作者: 陈 玮, E-mail: cw@zstu.edu.cn

使得酶分子表面氨基酸残基与载体形成牢固的共价连接,该法具有操作简单,条件温和等特点。在本研究中,笔者应用 ZH-HA 作为载体,将来源于地衣芽孢杆菌的脂肪酶固定化,同时也分析对比固定化酶与游离脂肪酶的基本性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)脂肪酶产自基因工程重组的枯草芽孢杆菌,由本实验发酵制备。对硝基苯棕榈酸酯(pNPP),脱氧胆酸钠,阿拉伯树胶均购自 Sigma Aldrich 公司。载体 ZH-HA 由香港 GeneRad Biotech Laboratory Ltd 提供。ZH-HA<sup>[13]</sup>是以甲基丙烯酸缩水甘油酯(Glycidyl methacrylate)为单体的高分子多孔聚合物,表面由环氧基团活化后再经过聚乙烯亚胺处理制得的氨基型载体,基团密度 105 mM/g 湿载体(含水量 55%~60%)。颗粒直径 150~300  $\mu\text{m}$ 。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 酶的固定化

取 1 g 载体,用浓度为 0.1 mol/L, pH 值为 8 的磷酸缓冲液洗涤 3 次后加入 10 mL 浓度为 2% 的戊二醛活化 1 h,之后用相同缓冲液充分洗涤载体。经活化后的载体按 1 g 对应 10 mL 的比例加入酶液,该酶液由重组枯草芽孢杆菌发酵所得,酶活力为 50 U/mL,混匀并置于摇床上,反应一定时间后弃去上清液,沉淀为固定化酶颗粒,用 PBS 充分洗涤。

### 1.3 酶活力测定

A 液:异丙醇溶液(含有浓度为 16.5 mmol/L 的对硝基苯棕榈酸酯(pNPP)),B 液:浓度为 50 mmol/L, pH 值为 8.5 的 PBS 溶液(含有 0.2% 的脱氧胆酸钠及 0.1% 的阿拉伯树胶)。在测定时,将 A 液与 B 液按 1:9 混合后取 900  $\mu\text{L}$  作为底物加入 100  $\mu\text{L}$  适当稀释的酶液,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后,快速加入 1 mL 95%乙醇终止反应,再用可见分光光度计读取 410 nm 处的吸光度值。在此反应条件下,对硝基苯酚的摩尔消光系数为 14 600 L/mol $\cdot\text{cm}^{-1}$ 。脂肪酶活力单位(U)定义为单位时间内(1 min)水解 pNPP 并释放出 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需的酶量。

固定化酶的活力测定方法与游离酶类似,称取一定量的固定化酶颗粒,加入 5 mL 经过预热底物溶液,并用小型台式电动机以 300 r/min 的转速进行搅拌,反应 4 min 后,加入 5 mL 无水乙醇中止反应,吸取反应上清液测定  $A_{410}$  吸光值。

### 1.4 工作稳定性

准确称取 20 mg 固定化酶颗粒装入带有保温夹套的柱式反应器中,加入 20 mL,45 $^{\circ}\text{C}$  预热的底物溶液,搅拌反应 10 min,加入 20 mL 乙醇终止后,取出反应液测定  $A_{410}$  吸光值。用相同缓冲溶液将反应器中的固定化酶颗粒反复洗涤几次,然后重复上述操作,继续进行下一批反应。

## 2 结果和讨论

### 2.1 脂肪酶的固定化

ZH-HA 是一种多孔型高分子聚合物,表面带有氨基基团,固定化之前先采用过量的戊二醛对其进行活化,即用戊二醛的一端醛基与其氨基形成席夫碱(Schiff base)连接。活化后载体所具有的醛基又可以和酶分子表面氨基酸残基的氨基形成席夫碱链接,从而将酶固定在载体表面及孔道内部。这个过程中酶在载体表面及孔道内部需经历一个扩散、吸附进而与载体活性基团间发生共价连接的过程<sup>[14-17]</sup>,因此需要确定最佳的固定化反应时间。

固定化酶反应时间如图 1 示,随着时间的积累,酶与载体结合,固定化酶活力呈现上升趋势,在 3 h 处达到顶峰为 60 U/g 湿载体,而继续延长时间固定化酶活力呈缓慢下降趋势。这是由于过长时间反应使得酶的多个基团与固定化载体间形成多组共价连接,导致蛋白质分子被过度束缚,影响了固定化酶活力。因此,从实验结果可以判断,当反应发生 3 h 之后,脂肪酶的和载体形成的连接处于一种最优状态,即可最大限度的负载分子蛋白,又避免过度的连接而导致酶活力的下降,在后期选择该时间点为固定化反应时间,并且在固定化反应结束后向体系中添加牛血清白蛋白至终浓度为 0.1 mg/mL,以封闭未与酶连接的醛基,从而使固定化酶处于最佳状态。

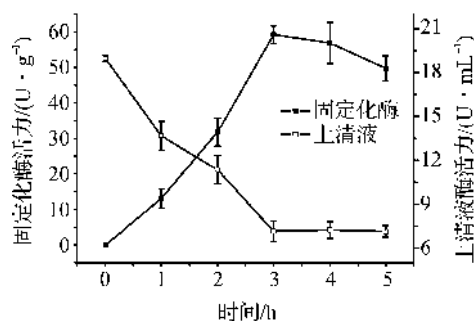


图1 反应时间对固定化的影响

### 2.2 游离酶与固定化酶最适反应 pH 值对比

pH 值对酶的活性有显著影响,酶分子活性部位往往是由空间上相邻的氨基酸侧链基团处于特定的

解离状态而形成相互作用,随着 pH 值的变化,会引起基团解离状态的改变,从而破坏酶活性部位的结构,因此酶通常只在一定 pH 值范围内表现出最佳活性。

本实验采用不同 pH 值缓冲溶液配置底物考察游离酶和固定化酶的最适反应 pH 值,各组以特定 pH 值条件下测得的最高活力为 100%,结果如图 2 所示(反应温度均为 37℃)。游离酶在 pH 值为 9 时表现出最高酶活力,而固定化酶最适反应 pH 值则偏向于碱性区域,即在 pH 值为 10 时表现出最高酶活力(如图 2)。引起这种现象的原因是 ZH-HA 载体表面的一些带负电的基团更倾向于吸引并聚集带正电核的氢离子,使酶反应区域微环境的 pH 值呈下降趋势,为了抵销这一影响,溶液的 pH 值必须向碱性方向偏移,才能使酶活力达到最大。所以固定化酶的最适 pH 值曲线向碱性方向偏移<sup>[18]</sup>。由此可见,酶在固定化的过程中,部分表面基团和载体形成新的共价键,同时载体表面的部分游离基团也会影响反应体系的微环境,从而改变酶的一些特性。因此,通过固定化技术可以实现酶的一些基本特性得到可控的改变,从而使酶具有更广泛的应用性。

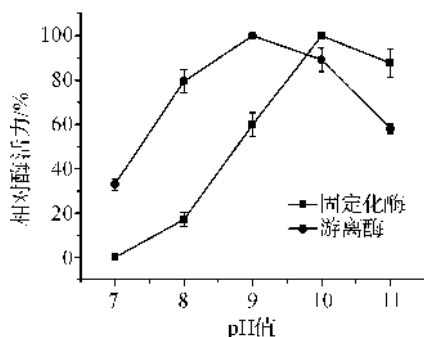


图2 pH值对固定化酶活力的影响

### 2.3 温度对固定化的影响

温度敏感性是酶的又一重要特性,提升温度一方面能够加快酶反应的速度,另一方面也会导致蛋白质发生热变性而失活。任一酶促反应都是在一定温度条件下进行的,温度的这两种效应都会发生作用。因此,“最适温度”是这两种效应的综合结果。本实验控制不同温度进行催化反应,考察游离酶和固定化酶的最适反应温度,分别在 30、35、40、45、50℃条件下测定酶活力,定义实验所获得的最高酶活力为 100%,结果如图 3 所示(反应 pH 值均为 10)。图 3 可见,游离酶在 35℃时表现出最大活力,随着温度的升高则由于热变性使其活力明显降低,固定化酶最适温度在 45℃,实际活力达到 220 U/g。相较游离酶而言,固定化酶的热稳定性得到了明显

的提高,这说明通过固定化形成的共价键有助于增强酶的结构稳定性从而抵御热变性,因此显著提高了使得固定化酶的催化活力。在工业生产中,提供较高的反应温度,一方面有利于增加脂类物质的溶解性,降低反应介质粘度,减少传质阻力;另一方面,较高的温度可防止连续长时间反应过程中产生杂菌污染,更有利于工业上持续生产,因此该固定化酶具有良好的工业应用前景。

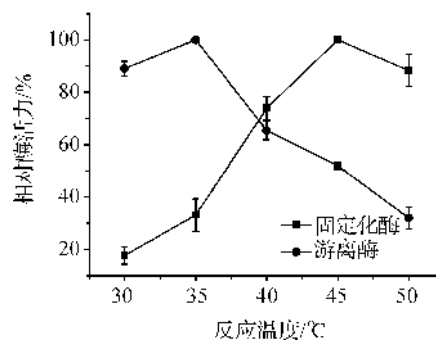


图3 温度对固定化的影响

### 2.4 工作稳定性

固定化酶最重要的特点是实现酶的反复利用,本实验中利用了共价法固定化制备的固定化酶可以使酶与载体牢固地结合,酶的工作稳定性采用自制柱式反应器测定(如图 4)。取 20 mg 固定化酶装入夹套保温的柱式反应器中,加入 20 mL,45℃预热的底物溶液,搅拌反应 10 min,加入 20 mL 乙醇灭活后,取出反应液测定  $A_{410}$  吸光值。用相同缓冲溶液将反应器中的固定化酶颗粒反复洗涤几次,然后重复上述操作,继续进行下一批反应。初始批次酶活力定义为 100%,重复反应 15 次,结果如图 5 示。图 5 显示,固定化酶在反复使用 15 批次之后酶活力

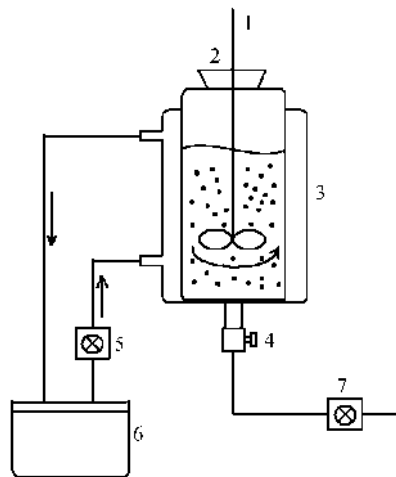


图4 固定化酶分批反应器

1. 搅拌桨, 2. 底物入口, 3. 固定化酶反应池, 4. 阀门, 5. 蠕动泵, 6. 水浴

仍保持在90%以上。固定化酶的特点是实现酶的反复利用,从而降低总的生产成本。因此,工作稳定性是考察固定化酶实用性的重要指标。同时,固定化酶的另一特点是可以通筛网将酶与反应体系完全分离,避免了酶作为可溶性蛋白质而成为产物中的杂质。相较于传统的吸附法、包埋法而言,该酶通过醛基与其氨基形成席夫碱(Schiff base)使得酶分子表面氨基酸残基与载体形成牢固的共价连接,使得该酶具有很好的稳定性,由此可见,该固定化酶具有工业应用的潜力。

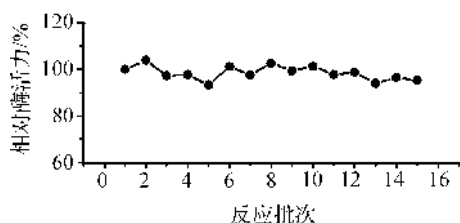


图5 固定化脂肪酶的工作稳定性

### 3 结 论

酶的固定化技术是其应用于生产的关键步骤之一,通过固定化可实现酶的反复利用,降低生产成本。在本工作中,地衣芽孢杆菌来源的胞外脂肪酶被固定化在经戊二醛活化后的氨基型载体 ZH-HA 上。得到的固定化酶颗粒具有较高的热稳定性,并且具有很高的工作稳定性,因此该固定化脂肪酶具有一定的工业应用潜力。

### 参考文献:

- [1] Treichel H, Oliveira D D, Mazutti M A, et al. A review on microbial lipases production[J]. Food Bioprocess Technol, 2010, 3(2): 182-196.
- [2] Ramani K, Boopathy R, Vidya C, et al. Immobilisation of pseudomonas gessardii acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(6): 986-992.
- [3] Dong H P, Wang Y J, Zheng Y G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (s)-3-hydroxyglutarate by immobilized candida antarctica lipase B [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 66(1-2): 90-94.
- [4] Izah S C, Ohimai E I. The challenge of biodiesel production from oil palm feedstock in nigeria[J]. Greener Journal of Biological Sciences, 2013, 3(1): 001-012.
- [5] Speranza P, Macedo G A. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 1699-1706.
- [6] Atabani A E, Silitonga A S, Badruddin I A, et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012, 16(4): 2070-2093.
- [7] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnol Adv, 2007, 25(3): 294-306.
- [8] Robles-Medina A, Gonzalez-Moreno P A, Esteban-Cerdan L, et al. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(4): 398-408.
- [9] Yusuf N N A N, Kamarudin S K, Yaakub Z. Overview on the current trends in biodiesel production[J]. Energy Conversion and Management, 2011, 52(7): 2741-2751.
- [10] Balat M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production-a review of current work[J]. Energy Conversion and Management, 2011, 52(2): 1479-1492.
- [11] Holmquist M. Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: Structures, functions and mechanisms [J]. Current Protein & Peptide Science, 2000, 1(2): 209-235.
- [12] Kallenberg A I, Rantwijk F V, Sheldon R A. Immobilization of penicillin G acylase: the key to optimum performance [J]. Adv Synth Catal, 2005, 347(7-8): 905-926.
- [13] 孙 健,周毅频,陶家权,等. 巨大芽孢杆菌青霉素 G 酰化酶在新型环氧载体 ZH-HA 上的固定化[J]. 工业微生物, 2008, 38(1): 1-5.
- [14] Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(7): 509-515.
- [15] Wheatley J B, Schmidt D E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 849(1): 1-12.
- [16] Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(6): 1451-1463.
- [17] Sassolas A, Blum L J, Leca-Bouvier B D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 489-511.
- [18] Roberto F L, Veronica R, Cesar M, et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1999, 7: 181-189.

## Preparation of Immobilized Extracellular Lipase from *Bacillus Licheniformis*

WU Cheng-yu, YE Piao, YANG Xiao-ting, XU Ye-qian, GONG Xiao-lei, TANG Qi-qing,  
ZHAO Fu-kun, PAN Jian-yi, CHEN Wei

(School of Life Science, Zhejiang Science and Technology University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Lipase is a kind of important hydrolase which is widely used in food, medicine, and chemical industry etc. Lipase immobilization can improve the usage efficiency of lipase. In this study, glutaraldehyde covalent linkage was applied to fix extracellular lipase from *Bacillus licheniformis* to amino carrier ZH-HA. After 1 g carrier was put into 10 mL enzyme solution and reacted for 3h, the activity of immobilized lipase was up to 60 U/g wet carrier. The temperature stability of the immobilized enzyme was significantly improved, and the highest enzyme activity reached up to 220 U/g wet carriers at 45°C. Moreover, immobilization made enzyme stability boost under alkaline condition, and the optimal pH value for reaction was 10. Working stability of this enzyme was investigated through self-made column reactor. After continuous hydrolysis reaction for 15 batches, the immobilized lipase still remained 90% activity and it showed good operational stability.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*; lipase; immobilization; ZH-HA

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 693 页)

## In-Vitro Inhibitory Effect of Oncolytic Adenovirus ZD55-MnSOD Combined with New CDK Inhibitor on Human Colon Cancer Cells

HAN Jian-cui<sup>a</sup>, MA Bu-yun<sup>a</sup>, WU Cheng-yu<sup>a</sup>, WANG Yi-gang<sup>a</sup>, WANG Shi-bing<sup>a,b</sup>

(a. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, b. Research Centre, School of Life Science,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The research is to develop in-vitro inhibitory effect of MnSOD carried oncolytic adenovirus Ad-E1B55Kd-MnSOD (ZD55-MnSOD) combined with small molecular drug novel CDK inhibitor SNS-032 on colon cancer cell lines such as SW620, HCT116 and HT-29. Oncolytic virus and drugs were combined to seek good antitumor effects. In this experiment, MTT was used to detect the application effect of 5MOI ZD55-MnSOD combined with different dosage of SNS-032 (0, 20, 40, 80, 160 ng/mL) on human colon cell line. The authors found that the combination of oncolytic virus and drug could promote tumor cell apoptosis; and also found that treatment of SW620 and HT-29 with combined ZD55-MnSOD (5 MOI) and SNS-032 (80 ng/mL) had great time dependence. Hoechst33342 staining method and flow cytometry were used to detect apoptosis. The results also show that the apoptosis phenomenon in the group of combined use of ZD55-MnSOD with SNS-032 has better effects than separate use of oncolytic virus or drug alone. This research preliminarily proves ZD55-MnSOD (5 MOI) and SNS-032 have supplementary effect and can effectively inhibit the growth of colon cancer cells in vitro.

**Key words:** oncolytic adenovirus; SNS-032; colon cancer; antitumor effect

(责任编辑: 许惠儿)