研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2018.08.001

固定化马来酸顺反异构酶合成富马酸

刘文茂[1,2]，周 丽[1,2]，周哲敏*[1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：为了制备稳定高效的固定化酶转化底物马来酸来生产富马酸，本文将粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）来源的马来酸顺反异构酶与R5肽段融合表达，融合酶比酶活可达42 U/mg。将细胞破碎上清液用40%硫酸铵沉淀，再用终体积分数为0.1%的戊二醛在室温下交联1 h形成交联酶聚集体，最后用1 mol/L正硅酸甲酯包埋，固定化酶的酶活回收率达到60%。在55 ℃下，固定化酶的半衰期可达4 h（游离酶仅为0.5 h），进行8次重复催化反应后，可保留78%的初始酶活。将固定化马来酸顺反异构酶装入填充床反应器，连续转化10个批次后富马酸的转化率可保持在95%以上。该研究为马来酸顺反异构酶生产富马酸的工业化应用提供了借鉴。

关键词：马来酸顺反异构酶；富马酸；R5肽段；固定化酶

中图分类号：Q 814　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2018)08—0785—08

Immobilization of Maleate Cis-Trans Isomerase and Synthesis of Fumarate

LIU Wenmao[1,2]，*ZHOU Li*[1,2]，*ZHOU Zhemin*[*1,2]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministray of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: In order to prepare a stable and efficient immobilized enzyme to produce fumarate from maleate, maleate cis-trans isomerase (MaiA) from *Serratia marcescens* was used as a model enzyme in which a silica-precipitating peptide R5 were fused to its N-terminal. The specific activity of the purified fusion enzyme (R5-MaiA) could reach 42 U/mg. The optimum conditions for preparing the immobilized enzyme could be summarized as: cell crude extract was precipitated with 40% -saturation ammonia sulfate followed by cross-linking with 0.1% glutaraldehyde for 1 h at room temperature; then the cross-linking enzyme aggregates (CLEAs) was encapsulated through biosilicification by rapidly mixing with 1 mol/L hydrolyzed tetramethoxysilane (TMOS). The immobilized enzyme Si-CLEAs retained 60% specific activity of the free enzyme. Si-CLEAs had higher thermostability ($t_{1/2}$=4 h) than the free enzyme ($t_{1/2}$=1.5 h) at 55 ℃. Si-CLEAs retained about 78% of the initial activities after eight catalytic batches. When loaded in a packed bed reactor, the packed-bed reactor showed high stability and conversion ratio of 95% after reused for 10 times. The

收稿日期：2015-12-31

基金项目：国家863计划项目(2014AA021304)。

* **通信作者：**周哲敏(1969—)，男，河北石家庄人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

引用本文：刘文茂，周丽，周哲敏. 固定化马来酸顺反异构酶合成富马酸[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(08)：785-792.

study will be useful for industrial applications of fumarate synthesis using immobilized maleate cis-trans isomerase.

Keywords: maleate cis-trans isomerate, fumarate, R5 peptide, immobilized enzyme

富马酸(Fumaric acid)是一种天然存在的四碳平台有机酸,又称为反丁烯二酸、延胡索酸,在医药、食品、日用化工等领域有着重要的价值[1]。马来酸顺反异构酶 (EC 5.2.1.1,Maleate cis-trans Isomerase,MaiA)属于天冬氨酸、谷氨酸消旋酶超家族[2],能够催化马来酸在碳碳双键不断裂的情况下异构化生成富马酸。其中,粘质沙雷氏菌株来源的马来酸顺反异构酶具有转化率高、pH 范围宽泛、K_m 值较低等特点,被认为是有望用于工业生产富马酸的生物催化剂之一[3]。游离酶在用于生物催化反应时,具有稳定性低、回收利用困难、分离成本高等问题;而固定化酶则具有可重复利用,能控制反应过程,热稳定性好,酶与底物和产物易分离,产物纯度高,能降低分离纯化成本等优点[4-5]。然而,目前尚无马来酸顺反异构酶固定化以及用固定化马来酸顺反异构酶合成富马酸的研究报道。

交联酶聚集体(Cross-linked enzyme aggregates,CLEAs)[6]是一种新型无载体固定化技术,通过在溶液中使酶蛋白分子发生物理聚集,随后利用常规交联剂戊二醛[7]对聚集体进行化学交联,该方法制备过程简单,但是由于固定化酶全部由酶蛋白组成,其机械强度较差,在实际应用中会暴露出很多问题。一方面,CLEAs 的粒径一般都在 10 μm 以下,这样就很难通过简单地离心或过滤从反应体系中分离和回收 CLEAs。另外,CLEAs 压缩阻力很低,离心和过滤后很难重新均匀地分散到反应体系中,使其催化效率下降。

传统包埋法具有随机性、包埋效率低、制备过程条件苛刻、时间长、制得的固定化酶颗粒较大导致转化时传质阻力大等缺点[8]。通过对硅藻沉淀硅的机理进行研究,发现了硅蛋白(silaffins),并筛选出硅蛋白中可以高效沉淀硅的 R5 短肽[9],R5 肽段在中性 pH 及常温条件下,几秒钟内即可体外诱导硅沉淀,形成自包埋结构[10]。Lai[11]、Chien[12]、Marner[13]等人应用 R5 肽段在温和的条件下高效、快速地制备出酶活回收率高、操作稳定性好、热稳定性好的固定化酶。但是,本研究前期发现 R5 肽段与酶融合后,直接包埋制得的固定化酶颗粒较小不易回收,并且热稳定性也较差。而将交联酶聚集体技术与 R5 肽段自包埋两种方法相结合,即可以解决 CLEAs 机械强度差、易分散等问题,又可以解决 R5 肽段直接包埋不易回收、热稳定性差的问题,但目前尚未见类似研究。

本研究利用马来酸顺反异构酶合成菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET-24a(+)-*maiA*[14]高效表达马来酸顺反异构酶,采用交联酶聚集体技术与 R5 肽段自包埋技术相结合的方法,制备热稳定性好、操作稳定性高的固定化马来酸顺反异构酶(Si-CLEAs);进一步研究固定化马来酸顺反异构酶的酶学性质,并将其装入填充床反应器应用于富马酸的合成。该研究为固定化马来酸顺反异构酶合成富马酸的工业化应用提供了借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株与引物

基因工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET-24a(+)-*maiA*、重组质粒 pET-24a(+)-*maiA* 由本实验室构建、保藏。

本文所用引物如下:

primer F:

5′-CCATATGTCCTCCAAGAAATCGGGATCCTACTCGGGATCCAAGGGTTCCAAGCGTCGCATCTTGATGAGCAACCACTACCGCATCGGCCAGATC-3′;

primer R:

5′-GCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATATGTATATCTCC-3′。

1.2 主要试剂

Primer star DNA 聚合酶,Nde Ⅰ限制性内切酶,T4 DNA 连接酶等:日本宝生物工程(大连)有限公司产品;马来酸,富马酸,25%戊二醛:BBI Life Sciences;正硅烷甲酯,磷酸二氢钾,硅藻土:国药化学试剂有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 重组菌株诱导表达及纯化方法 将菌株 *E.*

coli BL21(DE3)/ pET-24a(+)-*R5-maiA* 在 LB 固体平板上划线活化,挑取 LB 平板上单菌落,接种至 5 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 200 r/min 振荡培养 8 h,取 500 μL 上述培养物接种至 50 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 200 r/min 振荡培养至菌液 OD_{600} 达到 0.8,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,20 ℃诱导 20 h。

收集菌体超声破碎,12 000 r/min 离心 10 min 获得粗酶液,粗酶液经 0.45 μm 的滤膜过滤后用 1 mL 的 His Trap FF crude 柱对重组蛋白进行纯化。

1.3.2 马来酸顺反异构酶酶活测定方法 取 100 μL 游离马来酸顺反异构酶溶液(或固定化酶悬浮液),加入 50 μL 浓度为 1 mol/L 的马来酸(KOH 调至 8.0)溶液,用 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液将反应体系补加到 500 μL,于 40 ℃(固定化酶最适温度为 50 ℃)保温 10 min。100 ℃煮沸 10 min,离心,取上清液稀释 50 倍,测定生成的富马酸含量。

酶活力单位定义:在上述反应条件下,每分钟转化 1 μmol 底物所需的酶量定义为 1 U。

$$比酶活=\frac{酶活力}{蛋白质量}\times 100\%$$

蛋白质定量采用常规的 Bradford 法[15]。

Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液:由 1/15 M Na_2HPO_4 母液和 1/15 M KH_2PO_4 母液按比例配制不同 pH 缓冲液。

1.3.3 马来酸和富马酸的测定方法 马来酸和富马酸浓度用高效液相色谱法测定。HPLC 检测条件:色谱柱 Prevail Organic Acid (250×4.6 mm,5 μm;Grace Davison Discovery Sciences),流动相为 25 mmol/L 的 K_2HPO_4 溶液 pH=2.5,流速 1 mL/min,柱温 40 ℃,紫外检测器,波长 210 nm,进样量 10 μL。

1.3.4 固定化酶的制备方法 将马来酸顺反异构酶融合酶重组菌株的发酵液离心,获得菌体,用 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液清洗,加入适量 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液重悬菌体至菌悬液的 OD_{600} 值为 35,超声破碎后离心取上清液,用硫酸铵聚集马来酸顺反异构酶融合酶、戊二醛交联并用正硅酸甲酯包埋制备固定化酶。具体过程如下:

(1)聚集条件的优化。细胞破碎液中逐步添加硫酸铵粉末,分别至饱和浓度为 0~20%、20%~40%、40%~60%、60%~80%、80%~100%,置于 4 ℃下缓慢搅拌 30 min,4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,将每个饱和浓度下的沉淀蛋白均用 $NaHPO_4$-KH_2PO_4 缓冲液溶解并透析,通过 SDS-PAGE 判断每一浓度梯度下目的蛋白含量,确定最佳硫酸铵添加量。

(2)交联条件的优化。交联 pH 的优化:调节硫酸铵沉淀后蛋白液 pH 分别至 6.5、7、7.5、8、8.7,滴加戊二醛溶液至终体积分数为 0.1%,在室温下搅拌交联 1 h,获得交联酶聚集体,对交联酶聚集体酶活进行检测,确定最优交联 pH 值。

交联剂戊二醛浓度的优化:调节硫酸铵沉淀后蛋白液 pH 至 7.5,分别加入戊二醛至终体积分数为 0.025%、0.05%、0.075%、0.1%、0.125%、0.18%、0.3%、0.5%、0.7%、1%,在室温下搅拌交联 1 h,获得交联酶聚集体,对交联酶聚集体酶活进行检测,确定最优戊二醛添加浓度。

交联时间的优化:调节硫酸铵沉淀后蛋白液 pH 至 7.5,滴加戊二醛溶液至终体积分数为 0.1%,分别在室温下缓慢搅拌交联 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h,获得交联酶聚集体,对交联酶聚集体酶活进行检测,确定最佳交联时间。

(3)包埋条件[11]。上述最优条件下获得的交联酶聚集体用 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液洗涤 3 次,重悬于 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液中,并且按照硅化反应液:交联酶聚集体:正硅酸甲酯=1:8:1 的比例混合(硅化反应液为 pH=8 的 0.1 mol/L 磷酸氢二钾和 0.1 mol/L 氢氧化钠的混合溶液;正硅酸甲酯浓度为 1 mol/L,用 1 mmol/L 的盐酸配置)[11],剧烈搅拌 30 s,静置离心收集固定化酶 Si-CLEAs,并用与细胞破碎液等体积的 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液重悬。

1.3.5 马来酸顺反异构酶固定化酶活力的测定 将 100 μL Si-CLEAs(用粗酶液作为对照)加入到含有 100 mmol/L 马来酸钾的 Na_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液中,反应液总体积为 0.5 mL,于 40 ℃反应 10 min 后立即用 100 ℃煮沸 10 min 终止反应,适当稀释并用 0.22 μm 有机滤膜过滤后用高效液相色谱检测马来酸和富马酸的含量,计算出固定化酶的酶活力。

$$相对酶活=\frac{固定化酶酶活}{固定化酶的最高酶活}\times 100\%$$

$$酶活回收率=\frac{固定化酶酶活}{游离酶酶活}\times 100\%$$

1.3.6 Si-CLEAs 的酶学性质 酶促反应最适温度的测定:Si-CLEAs 和游离酶分别在 30、35、40、45、50、55、60 ℃、pH 8.04 条件下,反应 10 min 后测定

富马酸含量,并计算酶活。

酶促反应温度稳定性的测定:Si-CLEAs 和游离酶分别在 55 ℃、pH 8.04 条件下处理,每小时均取样品测定测定富马酸含量,并计算酶活。

酶促反应最适 pH 的测定:Si-CLEAs 和游离酶分别在 pH 为 5.91、6.47、6.98、7.38、7.73、8.04、8.34、9.18 以及反应温度分别为 55 ℃或 40 ℃的条件下,反应 10 min 后测定富马酸含量,并计算酶活。

Si-CLEAs 的操作稳定性的测定:Si-CLEAs 在最适反应温度和最适反应 pH 下连续反应 8 次,测定富马酸含量并计算酶活力,以第一次反应的酶活力为 100%,分别计算相对酶活力。

1.3.7 固定化酶填充床反应器操作过程优化及操作稳定性 将 100 mL 的固定化酶悬浊液与 200 g 硅藻土充分混合后填入玻璃柱反应床(25 cm×3.6 cm,450 mL),利用蠕动泵将底物由下向上泵入反应床中,控制催化温度 40 ℃。

停留时间对富马酸生产的影响:将浓度为 0.6 mol/L 马来酸钾作为底物,泵入填充床反应器中反应,并分别控制底物停留时间为 0.55、0.67、0.83、1.1、1.67 h,测定富马酸的产量,计算出富马酸转化率和体积转化速率,确定最适停留时间。

底物浓度对富马酸生产的影响:在停留时间为 0.83 h 的条件下,分别用浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mol/L 的马来酸钾进行转化,测定富马酸的产量,计算出富马酸的转化率和体积转化速率,确定最佳底物浓度。

固定化酶填充床反应器操作稳定性:以优化后的停留时间和底物浓度进行富马酸连续生产,运行 15 批次,计算每个批次的底物转化率,由转化率的降低程度评估反应器的操作稳定性。

$$转化率=\frac{流出时富马酸浓度}{流入时马来酸浓度}\times 100\%$$

$$停留时间=\frac{反应器的工作体积}{泵入反应器的体积流速}\times 100\%$$

$$体积转化速率=\frac{泵入时底物浓度-泵出时底物浓度}{停留时间}\times 100\%$$

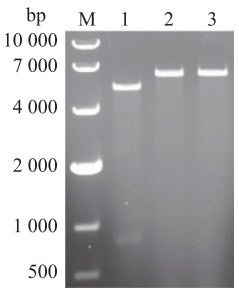
2 结果与讨论

2.1 马来酸顺反异构酶融合酶 R5-MaiA 的克隆、表达

对文献[9]报道的 R5 短肽的氨基酸序列进行密码子优化,获得适合于大肠杆菌表达的 R5 短肽基因序列,并根据该基因序列设计引物。用 primer F 和 primer R 引物,以携带编码马来酸顺反异构酶基因的重组质粒 pET-24a-*maiA*[14]为模板,反向 PCR 扩增。将 PCR 产物用 *Nde* Ⅰ酶切后自身连接,获得重组质粒 pET-24a-*R5-MaiA*。重组质粒用 *Nde* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,电泳图谱获得 5 300 bp 和 850 bp 大小两条带;用 *Nde* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ分别单酶切,获得 6 150 bp 一条带(图 1),表明 R5 肽段已经成功插入,进一步经 DNA 测序验证表明成功构建了重组质粒 pET-24a-*R5-MaiA*。

将重组质粒 pET-24a-*R5-MaiA* 转入 *E. coli* BL21(DE3)中,经诱导表达后,SDS-PAGE 电泳获得分子量 29 000 Da 左右的电泳条带,如图 2 所示。

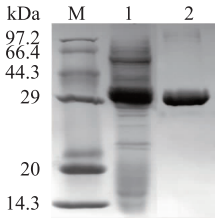
利用重组蛋白 C 端的 His 标签[14],经 1 mL 的 His Trap FF crude 镍柱纯化后(SDS-PAGE 电泳分析结果见图 2),在 40 ℃ pH=8.0 的条件下测定重组酶 R5-MaiA 的比酶活为 42 U/mg 与 MaiA 的比酶活(48 U/mg)相差不大,表明融合表达 R5 短肽对 MaiA 酶活性无显著影响。



M-DNA maker 10 000;1-*Nde* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切;2-*Nde* Ⅰ单酶切;3-*Hind* Ⅲ单酶切

图 1 pET-24a-*R5-MaiA* 质粒酶切验证电泳图

Fig. 1 Identification of pET-24a-*R5-MaiA* by enzyme digestion



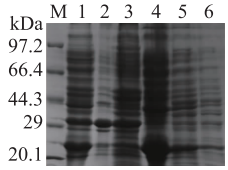
M-Protein marker;1-重组菌粗酶液;2-纯化后蛋白

图 2 R5-MaiA 融合酶表达与纯化 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Expression and purification of R5-MaiA in *E. coli*

2.2 融合马来酸顺反异构酶固定化酶(Si-CLEAs)的制备

2.2.1 不同硫酸铵饱和度对融合酶(R5-MaiA)沉淀能力的影响 分别用不同体积分数的硫酸铵分级沉淀细胞破碎上清中的游离酶,从图 3 可以看出,在 0~20%,20%~40%两个梯度的饱和硫酸铵体积分数下都有大量的R5-MaiA 沉淀聚集;当饱和硫酸铵浓度在 40%~60%时沉淀聚集的蛋白质中几乎不再含有 R5-MaiA,并且含有大量的杂蛋白;在 60%~80%和 80%~100%饱和硫酸铵体积分数下 R5-MaiA 和杂蛋白都很少有聚集沉淀。因此选择 40%的硫酸铵作为聚集沉淀的体积分数。



M-Protein marker;1-细胞破碎液上清;2-20%硫酸铵;3-20%~40%硫酸铵;4-40%~60%硫酸铵;5-60%~80%硫酸铵;6-80%~100%硫酸铵

图 3 硫酸铵分级沉淀 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 Effect of ammonium sulfate concentration on R5-MaiA precipitation

2.2.2 交联 pH 对 R5-MaiA 交联酶聚集体(CLEAs)酶活的影响 交联 pH 对交联酶聚集体 CLEAs 酶活的影响如图 4 所示。在磷酸盐缓冲液 pH 7.5 的时候 CLEAs 的酶活最高,这是因为 R5-MaiA 预测的等电点在 7.5 附近,在此 pH 条件下 R5-MaiA 沉淀较为完全,交联反应也较充分,所以交联后酶活回收率也较高,因此选择 7.5 作为交联时的 pH 值[11]。

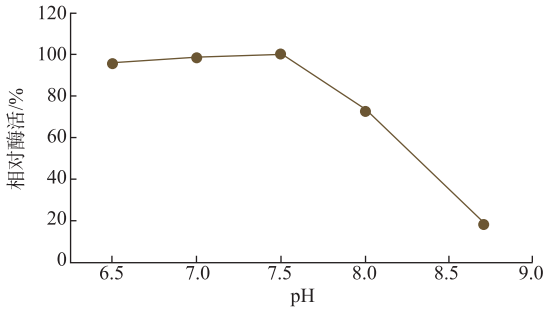


图 4 交联时 pH 对 CLEAs 酶活的影响

Fig. 4 Effect of cross-linking pH on the relative activity of CLEAs

2.2.3 交联剂戊二醛的浓度对 CLEAs 酶活的影响 交联剂戊二醛的体积分数对 CLEAs 酶活的影响如图 5 所示。低体积分数的戊二醛使得反应液中的酶分子交联程度低,部分游离酶损失且形成的交联颗粒小导致酶活偏低;随着戊二醛体积分数的增大,CLEAs 的酶活回收率不断增加,当戊二醛体积分数增加到 0.1%时 CLEAs 的酶活最高;继续提高戊二醛的体积分数,过度的交联,导致酶活回收率不断下降。因此确定交联时戊二醛的最佳添加体积分数为 0.1%。

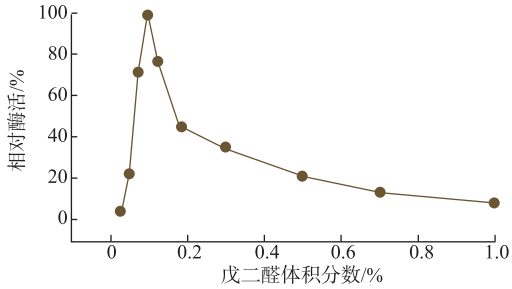


图 5 戊二醛体积分数对 CLEAs 酶活的影响

Fig. 5 Effect of concentration of glutaraldehyde on the relative activity of CLEAs

2.2.4 交联时间对 CLEAs 酶活的影响 交联时间对 CLEAs 酶活的影响如图 6 所示。当交联时间小于 1 h 时,随交联时间的增加酶活保留逐渐增大,交联时间过短不能使得酶分子充分交联,离心沉淀后使得部分游离酶损失;当交联时间为 1 h 时,CLEAs 的酶活保留达到最高值;当交联时间大于 1 h 后,随着交联时间的增加,酶活保留逐渐下降,这是由于交联时间过长导致戊二醛与酶分子过分交联,破坏了酶分子的构象从而影响了酶活。因此,确定 1 h 为较适合的交联时间。

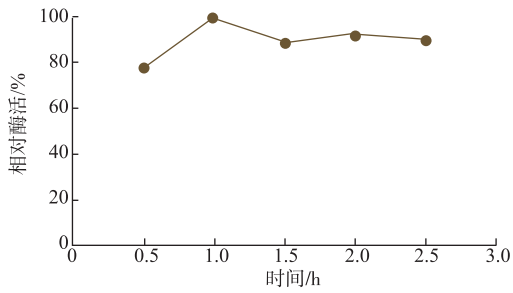


图 6 交联时间对 CLEAs 酶活的影响

Fig. 6 Effect of cross-linking time on the relative activity of CLEAs

在上述最优硫酸铵沉淀条件和戊二醛交联条

件下制备 CLEAs 的基础上,进一步利用正硅酸甲酯与 R5 肽段作用的特性,完成对 CLEAs 的包埋,即获得固定化酶 Si-CLEAs,并考察该固定化酶的性质。

2.3 马来酸顺反异构酶固定化酶 Si-CLEAs 的性质

2.3.1 固定化酶最适酶促反应温度 图 7 比较了游离酶与 Si-CLEAs 固定化酶的最适催化温度,可见游离酶的最适酶促反应温度为 40 ℃,而固定化酶的最适酶促反应温度为 55 ℃。这是由于 Si-CLEAs 中酶分子是以共价键的形式连接在一起,使得 CLEAs 中的酶分子比游离酶的刚性更强,而在 CLEAs 外围包埋的硅也进一步增加了传热阻力,因此酶促反应的发生就需要更多的能量,才可以使酶分子活性中心与底物结合发挥催化作用。

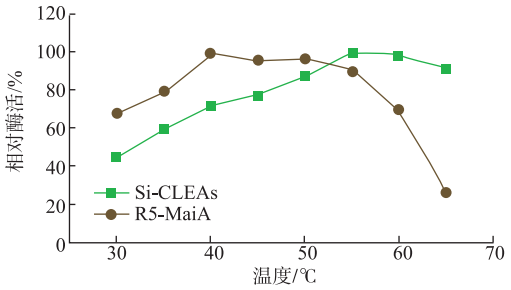


图 7 固定化酶与游离酶最适反应温度

Fig. 7 Optimun reaction temperature of Si-CLEAs and R5-MaiA

2.3.2 固定化酶热稳定性 游离酶经过固定化后热稳定性通常会有所提高[16],实验比较了游离酶和 3 种固定化酶在相同温度下的热稳定性,结果如图 8 所示。随着储存时间的延长,游离酶和固定化酶的酶活性均呈现下降的趋势,并且可以看出游离酶活性下降的速度要明显比固定化酶快,游离酶在 55 ℃下的半衰期为 0.5 h,直接包埋的固定化酶 Si-R5-MaiA 和交联酶聚集体 CLEAs 在 55 ℃下的热稳定性均有提高,而固定化酶 Si-CLEAs 在 55 ℃下的热稳定性最好,半衰期为 4 h,因此,Si-CLEAs 这种固定化方法有效提高了马来酸顺反异构酶的热稳定性。

2.3.3 固定化酶最适酶促反应 pH 固定化酶的最适 pH 除与载体和产物性质有关外,还会受到其他因素的影响。游离酶经过固定化后其最适酶促反应 pH 值通常发生变化,且很难预测。由图 9 所示,在经过固定化后,固定化酶的最适酶促反应 pH 为 7.3,与游离酶相比(最适反应 pH 为 8.0)略向酸性方向偏移。

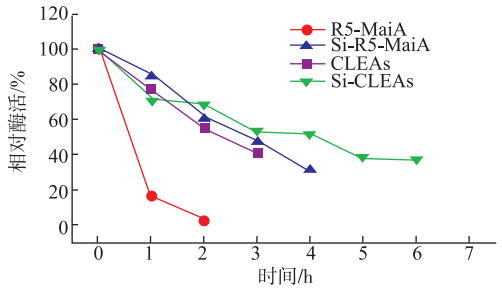


图 8 3 种固定化酶与游离酶热稳定性的比较

Fig. 8 Stability of CLEAs,Si-R5-MaiA,Si-CLEAs and free R5-MaiA at 55 ℃

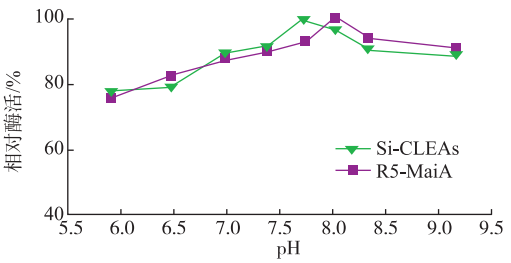


图 9 固定化酶与游离酶的最适反应 pH

Fig. 9 Optimun pH of Si-CLEAs and R5-MaiA

2.3.4 固定化酶 Si-CLEAs 的重复使用性 固定化酶这一技术的主要目标就是制备能够重复多次使用的生物催化剂,所以固定化酶的操作稳定性是评判固定化方法的一个重要指标,并且能够影响生产成本。对 3 种固定化酶 Si-CLEAs,Si-R5-MaiA,CLEAs 进行操作稳定性实验,结果如图 10 所示,Si-CLEAs 在经过 8 个批次的重复使用后依然保留 78%的酶活,其酶活保留高于 CLEAs 和 Si-R5-MaiA,固定化酶 Si-CLEAs 具有良好的重复使用性。

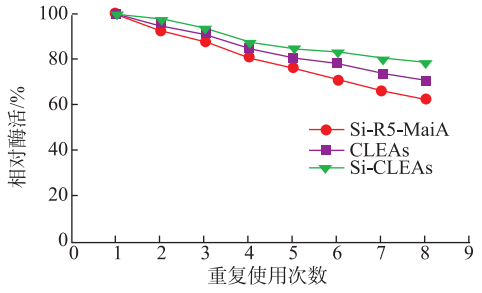


图 10 固定化酶的重复使用性

Fig. 10 Effect of reusability on relative activity of Si-R5-MaiA,CLEAs and Si-CLEAs

2.4 固定化酶 Si-CLEAs 在富马酸合成中的应用

进一步将马来酸顺反异构酶固定化酶装入填充床反应器,以马来酸为底物合成富马酸,并对反应条件进行优化。

2.4.1 *停留时间对填充床反应器生产富马酸的影响* 停留时间是底物催化的一个重要参数,停留时间由泵入底物的流速和反应器体积大小决定,本实验通过调节底物的流速来控制停留时间。由图 11 可知,富马酸的转化率随停留时间的增加而增加,体积转化速率随时间的增加先增加后减少。低的停留时间虽然节约了时间但是不利于底物转化,而高的停留时间则会导致生产周期长、增加生产成本。因此综合考虑,选择 50 min 作为最佳停留时间。

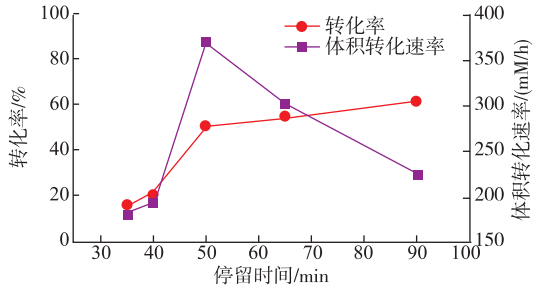


图 11 停留时间对填充床反应器生产富马酸的影响

Fig. 11 Effect of residence time on the production of fumarate in a packed-bed reactor

2.4.2 *底物浓度对填充床反应器生产富马酸的影响* 底物浓度对富马酸生产的影响如图 12 所示,在最佳停留时间下,转化率随底物浓度的增加而降低,体积转化速率在较低浓度下很低,在中高浓度下体积转化速率维持在较稳定的水平;停留时间为 50 min 的条件下,此固定化酶填充床反应器可完全转化的最佳底物浓度为 0.3 mol/L,此时填充床反应器的催化效率最高。

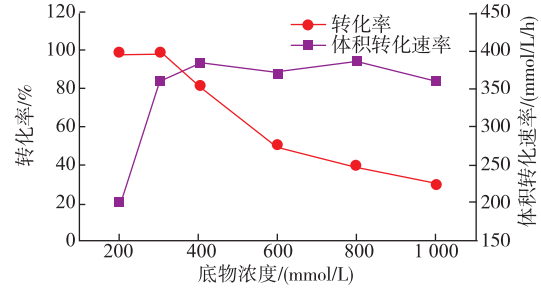


图 12 底物浓度对填充床反应器生产富马酸的影响

Fig. 12 Effect of substrate concentration on the production of fumarate in a packed-bed reactor

2.4.3 *填充床反应器生产富马酸的能力* 在实际生产中,为保证富马酸工业生产的需要,富马酸的转化率要保持在 95%以上,根据填充床反应器的操作稳定性,需调节底物浓度和保留时间以达到工业生产富马酸的需要,选择最佳底物浓度为 0.3 mol/L,初始转化率为 99%,在生产 10 个批次后,富马酸转化率依然保持在 95%以上(图 13),表明固定化酶反应器能较好的满足工业化酶法生产富马酸的需求。

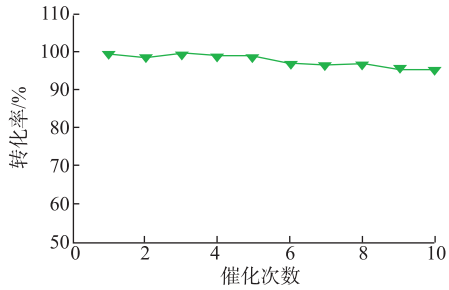


图 13 填充床反应器重复生产富马酸的能力

Fig. 13 Reusability of Si-CLEAs in a packed-bed reactor for fumarate production

3 结 语

马来酸顺反异构酶与 R5 肽端融合表达后,比酶活无显著降低。以 40%的硫酸铵作为沉淀剂,体积分数 0.1%的戊二醛作为交联剂制得的融合马来酸顺反异构酶交联酶聚集体 CLEAs,在经过自包埋处理之后形成固定化酶 Si-CLEAs,其酶活回收率为 60%。固定化酶的催化最适温度为 55 ℃比游离酶提高了 15 ℃,有利于实现马来酸顺反异构酶在极端条件下的催化应用;在 55 ℃条件下的半衰期由原来的 0.5 h 提高到 4 h,其热稳定性有了明显的提高;在分批进行 8 个批次的重复催化反应后,保留了 78%的初始酶活,显示出良好的操作稳定性。Si-CLEAs 固定化酶装入填充床反应器以马来酸为底物生产富马酸,重复生产 10 个批次后,仍可保留 95%的转化率。该研究为应用固定化酶 Si-CLEAs 工业化生产富马酸提供了借鉴。

参考文献:

[1] ROA ENGEL C A,STRAATHOF A J J,ZIJLMANS T W,et al. Fumaric acid production by fermentation [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2008,78(3):379-389.

[2] YASUO K,JINSAKU Y,YASUHISA A. Maleate cis-trans isomerase from *Arthrobacter sp*. TPU 5446 [J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**,1995,80(6):610-612.

[3] KAZUHISA H,MAKOTIO G,ASUKAZI U,et al. Molecular analysis of maleate cis-trans isomerase from thermophilic bacteria [J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,2000,64(3):569-576.

[4] GARCIA G C,BERENGUER M A,FERNANDEZ L R,et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance[J]. **Advanced Synthesis and Catalysis**,2011,353(16):2885-2904.

[5] HU Yafang,LIU Yurong,DING Keyi,et al. Immobilization and application of a composite enzyme[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(4):1673-1689.(in Chinese)

[6] SHELDON R A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts [J]. **Organic Process Research and Development**,2011,15(1):213-223.

[7] BARBOSA O,ORTIZ C,BERENGUER M A,et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design:a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization[J]. **Rsc Advances**,2013,4(21):1583-1600.

[8] LI Lianlian,CUI Jiandong. Preparation and properties of cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase in the aminated macroporous silica gel[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2014(11):160-166.(in Chinese)

[9] KROGER N,DEUTZMANN R,SUMPER M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation [J]. **Science**,1999,286(5442):1129-1132.

[10] MARNER W D,SHAIKH A S,MULLER S J,et al. Morphology of artificial silica matrices formed via autosilification of a silaffin protein polymer chimera[J]. **Biomacromolecules**,2008,9(1):1-5.

[11] LAI J K,CHUANG T H,JAN J S,et al. Efficient and stable enzyme immobilization in a block copolypeptide vesicle-templated biomimetic silica support[J]. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**,2010,80(1):51-58.

[12] CHIEN L J,LEE C K. Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle [J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2008,100(2):223-230.

[13] MARNER W D,SHAIKH A S,MULLER S J,et al. Enzyme immobilization via silaffin-mediated autoencapsulation in a biosilica support[J]. **Biotechnology Progress**,2009,25(2):417-423.

[14] WANG Ya,CUI Wenjing,ZHOU Li,et al. Purification and characterization of maleate *cis-trans* Isomerase from *Serratia marcescens*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(11):1024-1029.(in Chinese)

[15] BRADFORD M M. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72:248-254.

[16] XIE Xiuyin,WANG Cunxin,WANG Zhiyong. Thermokinetic studies on the inhibition of acetylcholinesterase reaction by SDS[J]. **Acta Chimica Sinica**,2006,64(21):2151-2156.(in Chinese)