DOI:10.12441/spyswjs.20230410001 [文章编号] 1673-1689(2025)10-0028-11

磁性纳米颗粒定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D及其热稳定性研究

解巧玲[1] 龙 杰[1] 陈 龙[1] 邱 超[1] 周 星[1] 金征宇[1,2*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】实现β-琼胶酶的特异位点的定向固定化,以提高其热稳定性及操作稳定性。**【方法】**利用计算机辅助手段,通过特定位点的半胱氨酸的巯基与载体特异性结合,得到定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D。**【结果】**定向固定化的最优反应条件为:反应时间12 h、酶载量(酶与载体的质量比)1∶50、交联剂与载体质量比10∶50。不同定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率为40%~75%,大多数定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的相对酶活力>80%。在40、45 ℃条件下,定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D比野生型游离酶具有更好的热稳定性。定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D在重复使用4次后的酶活力保留率仍可达30%以上。在有机试剂中,野生型游离酶丧失了全部活性,而大多数定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力保留率仍可达70%以上。**【结论】**该研究制备的定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D有较高的酶活力,且热稳定性及操作稳定性较强,具有较高的工业应用潜力。

关键词:β-琼胶酶;定向固定化;热稳定性

Directional Immobilization of Mutant β-Agarase Aga50D onto Magnetic Nanoparticles and Its Thermal Stability

XIE Qiaoling[1] *LONG Jie*[1] *CHEN Long*[1] *QIU Chao*[1] *ZHOU Xing*[1] *JIN Zhengyu*[1,2*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to achieve site-directed immobilization of β-agarase at targeted residues, thereby enhancing its thermal stability and operational performance. [**Method**] Computer-aided design was employed to selectively immobilize the mutant β-agarase Aga50D *via* sulfhydryl groups introduced at specific cysteine residues, enabling binding to the carrier. [**Result**] The immobilization conditions were optimized as follows: reaction duration of 12 h, an enzyme loading level (enzyme-to-carrier mass ratio) of 1∶50, and a crosslinker-to-carrier mass ratio of 10∶50. The immobilization efficiency ranged from 40% to 75%, with most mutants retaining the relative enzyme activity >80%. Compared with the wild-type free enzyme, the site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D exhibited superior thermal stability at 40 ℃ and 45 ℃. After four reuse cycles, the enzyme activity retention rate of site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D remained above 30%. Notably, while the wild-type free enzyme completely lost its activity in organic reagents, the enzyme activity retention rate of most site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D remained above 70%. [**Conclusion**] The site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D demonstrated high enzyme activity and enhanced thermal/operational stability, showing significant promise for industrial applications.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32072164)。

通信作者:金征宇(1960—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品科学与工程领域碳水化合物资源开发与利用研究。E-mail:fpcenter@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-04-10 **修回日期:**2023-05-17

Keywords: β-agarase; site-directed immobilization; thermal stability

琼胶酶能够特异性降解琼胶，其水解产物主要是琼脂寡糖（agaro-oligosaccharides，AOS）和新琼寡糖（neo agaro-oligosaccharides，NAOS）。AOS易溶于水，安全且易被生物体吸收和利用，因此其广泛应用于食品[1]、医药[2]、化妆品[3-4]等领域。目前，已报道的琼胶酶均属于糖苷水解酶，根据琼胶酶的降解作用，琼胶酶可分为α-琼胶酶和β-琼胶酶。α-琼胶酶作用于α-1，3-糖苷键，能产生还原端含有3，6-无水-α-*L*-半乳糖的AOS；β-琼胶酶作用于β-1，4-糖苷键，能产生还原端含有*D*-半乳糖的NAOS。由于糖苷键的特异性，酶解琼胶是有利的，且酶解过程不会形成有毒化合物，因此酶解琼胶是可持续生产AOS和NAOS的有效方法。研究表明，AOS和NAOS有优良的生理、生物活性，如具有抗炎、抗氧化、抗菌和皮肤美白等作用[5-8]。

自然界存在的天然酶一般都需要改进酶学性质，使其能够在高温或者强酸碱条件下保持较好的酶活力，以适应实际工业条件。大多数天然琼胶酶的最适温度为30~40 ℃，而琼胶在38 ℃时呈凝胶状态，由于琼胶的胶凝特性，琼胶酶的热稳定性和操作稳定性对其工业应用至关重要，因此提高琼胶酶的热稳定性和操作稳定性是近几年的研究热点。由于酶具有高效、选择性和专一性等优异性能，其可作为催化剂广泛应用于各行业。然而，野生型游离酶存在热稳定性差、可适用的pH范围窄、在水环境中的有效酶活力低且单次循环使用后催化活性易丧失等缺点，导致其在工业上的应用受到限制[9-11]。酶的固定化是指通过特定方法将游离酶限制在特定空间内或完全负载在特定支持物上，使酶不能自由移动，但仍能保留其原有的空间结构和完整的活性中心。该技术通过将酶固定在载体表面或孔洞内，得到稳定、可重复使用且酶活力更高的酶。固定化酶通常具有更优良的性质，例如在苛刻的工业条件下具有更高的酶活力和可重复使用性[12-14]，因此酶的固定化是一种以低成本实现高反应产率的策略，也是使酶能够在实际工业中大规模应用的可靠方法。酶的固定化方法很多，主要为4类：吸附法[15]、包埋法[16]、交联法[17]和共价结合法[18]。其中共价结合法是目前研究最深入、应用最广泛的固定化方法，可进一步分为随机共价结合和定向共价结合。在随机共价结合中，酶与载体位点随机结合，这样可能会破坏酶的天然构象或造成空间位阻，影响底物进入酶的活性位点，极大降低固定化酶的酶活力。同时，随机共价结合可能会导致固定化酶活性位点的阻塞，使底物结合和产物释放困难[19]。相反，定向共价结合可使酶按特定方向（远离活性中心）固定在合适的载体上，从而使酶更好地与底物结合[20]。因此，位点特异性固定对于提高酶活力和生产力至关重要。

该研究通过特定位点的半胱氨酸的巯基与载体特异性结合，实现β-琼胶酶的特异位点的定向固定化，从而既可以保证较高的酶活力，又可以提高酶的热稳定性及操作稳定性，最终获得具备较高工业应用潜力的固定化β-琼胶酶。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

六水三氯化铁（$FeCl_3$•$6H_2O$）、乙二醇、醋酸钠、壳聚糖、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醇、正丙醇、正丁醇、二甲亚砜、异丙醇、二恶烷、丙酮、冰醋酸、硫酸、过硫酸钾（$K_2S_2O_8$）：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；琼脂糖、2，2-联氮-双（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）（ABTS）：北京伊诺凯科技有限公司；BSA蛋白质浓度检测试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐（Traut）试剂、琼胶低聚糖标准品：上海源叶生物科技有限公司；1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）：上海麦克林生化科技有限公司；羟基自由基清除能力检测试剂盒：生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2 仪器与设备

水浴摇床：SW22型，优莱博技术（北京）有限公司；高温烘箱：DRHX885-2型，苏州达瑞电热设备有限公司；酶标仪：Multiskan GO型，美国赛默飞世尔科技公司；傅里叶变换红外光谱仪（FTIR）：IS10型，美国Nicolet公司；热重分析仪：TGA2型，

瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司；X-射线衍射仪：D2 PHASER型，德国布鲁克AXS有限公司；扫描电子显微镜（SEM）：GeminiSEM 300型，卡尔蔡司（上海）管理有限公司；振动样品磁强计（VSM）：8604 VSM型，美国Lakeshore公司。

1.3 氨基化磁性Fe_3O_4纳米颗粒（NH_2-MNPS）的制备

溶剂热法制备磁性纳米颗粒：将6.25 mmol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$溶解于30 mL乙二醇中，加入50 mmol/L醋酸钠和0.02 g壳聚糖，剧烈搅拌30 min后，密封在高压釜（容量为50 mL）中，在200 ℃的高温烘箱内加热8 h，在室温下冷却后，用乙醇多次洗涤，在60 ℃下干燥6 h，得到NH_2-MNPS粉末。

1.4 定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的制备

将10 mg Traut试剂与50 mg NH_2-MNPS混合，于25 ℃水浴振荡12 h，得到巯基修饰的氨基化磁性Fe_3O_4纳米颗粒（SH-NH_2-MNPS），将其作为载体加到含有1 mg突变型β-琼胶酶Aga50D的溶液中，使得最终酶载量（酶与载体的质量比）为1∶50，然后将混合物置于25 ℃水浴中振荡24 h，得到定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D。

1.5 定向固定化酶的性质表征

采用KBr压片法，利用FTIR对样品的结构进行分析，测试波数范围为4 000~400 cm^{-1}，分辨率为0.01 cm^{-1}；称取适量NH_2-MNPS和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D于离心管中，加入无水乙醇超声分散5 min后，滴入硅片中，待乙醇挥发后，将其粘于SEM铜台的导电胶表面，喷金后进行扫描拍摄。采用VSM在室温下对样品的磁学性质进行表征，磁感应强度为±2 T。

1.6 蛋白质浓度的测定

参照BSA蛋白质浓度检测试剂盒的操作说明检测样品的蛋白质浓度。

1.7 反应条件的优化

1.7.1 反应时间的优化

将10 mg Traut试剂与50 mg NH_2-MNPS混合，分别于25 ℃水浴振荡6、8、12、24 h，得到SH-NH_2-MNPS。将50 mg SH-NH_2-MNPS加到含有1 mg突变型β-琼胶酶Aga50D的溶液中，使得最终酶载量为1∶50，然后将混合物于25 ℃水浴振荡24 h，得到定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D，并按照式（1）计算定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率。

$$A_1 = \frac{X_1 - X_2}{X_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

A_1——定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率，%；

X_1——定向固定化前溶液中的β-琼胶酶Aga50D质量，mg；

X_2——定向固定化后上清液中的β-琼胶酶Aga50D质量，mg。

1.7.2 酶载量的优化

将50 mg SH-NH_2-MNPS分别加到含有0.5、1.0、2.0、5.0 mg突变型β-琼胶酶Aga50D的溶液中，即酶载量分别为0.5∶50、1∶50、2∶50、5∶50，将混合物于25 ℃水浴振荡24 h，得到定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D，并按照式（1）计算定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率。

1.7.3 交联剂与载体质量比的优化

分别将1、5、10、15、20、25 mg Traut试剂加到含50 mg NH_2-MNPs的悬浮液中，即交联剂与载体质量比分别为1∶50、5∶50、10∶50、15∶50、20∶50、25∶50，将混合物于25 ℃水浴振荡12 h；取50 mg SH-NH_2-MNPS加到含有1 mg突变型β-琼胶酶Aga50D的溶液中，将混合物于25 ℃水浴振荡24 h，得到定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D，并按照式（1）计算定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率。

1.7.4 最优反应条件下的固载率测定

将10 mg Traut试剂加到含50 mg NH_2-MNPS的悬浮液中，混合物于25 ℃水浴振荡12 h；将50 mg SH-NH_2-MNPS加到含有1 mg突变型β-琼胶酶Aga50D的溶液中，使得最终酶载量为50∶1，将混合物于25 ℃水浴振荡24 h，得到定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D，并按照式（1）计算定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率。

1.8 相对酶活力的测定

酶活力单位（U）的定义：在30 ℃、pH 7.5条件下，每分钟催化产生相当于1 μmol *D*-半乳糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。

取2 mL琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5）于比色管中，分别加入0.1 mL的野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D酶液，于30 ℃振荡混匀，反应5 min，加入1.5 mL 3，5-二硝基水杨酸（DNS）终止反应，沸水浴5 min，室温下冷却，于520 nm处测定吸光度，按照式（2）计算相对酶活力。

$$B_1=\frac{K_i}{K_f}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

B_1——相对酶活力，%；

K_i——定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力，U/mg；

K_f——野生型游离酶的酶活力，U/mg。

1.9　重复使用性的测定

取2 mL琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5）于比色管中，分别加入0.1 mL的野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D酶液，于0 ℃振荡混匀，反应5 min，磁性分离后倒出上清液，加入1.5 mL DNS终止反应，沸水浴5 min，室温下冷却，于520 nm处测定吸光度并计算其酶活力。再向固定化酶中加入2 mL琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5），重复上述步骤，按照式（3）计算定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力保留率。

$$B_2=\frac{K_n}{K_0}\times 100\% \quad (3)$$

式中：

B_2——定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力保留率，%；

K_n——定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D第n（n>1）次使用后的酶活力，U/mg；

K_0——定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D第1次使用后的酶活力，U/mg。

1.10　热稳定性的测定

取0.1 mL的野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D酶液，分别于40 ℃孵育30、60、90、150、270、360 min；再取0.1 mL的野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D酶液，分别于45 ℃孵育30、60、90、150、270、360 min。加入2 mL琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5）后置于比色管中，于30 ℃振荡混匀，反应5 min，加入1.5 mL DNS终止反应，沸水浴5 min，室温下冷却，于520 nm处测定吸光度并按照式（4）计算酶活力保留率。

$$B_3=\frac{K_x}{K_1}\times 100\% \quad (4)$$

式中：

B_3——酶活力保留率，%；

K_x——不同孵育时间（x）的野生型游离酶或定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力，U/mg；

K_1——野生型游离酶或定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的初始酶活力，U/mg。

1.11　有机试剂对定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的影响

取0.1 mL的野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D酶液，分别加到体积分数50%的有机试剂（甲醇、正丙醇、正丁醇、二甲亚砜、异丙醇、二恶烷、丙酮）溶液和无水乙醇中，于30 ℃孵育30 min，加入2 mL琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5）后置于比色管中，于30 ℃振荡混匀，反应5 min，加入1.5 mL DNS终止反应，沸水浴5 min，室温下冷却，于520 nm处测定吸光度并按照式（5）计算酶活力保留率。

$$B_4=\frac{K_y}{K_2}\times 100\% \quad (5)$$

式中：

B_4——酶活力保留率，%；

K_y——在不同的有机试剂中孵育30 min后的野生型游离酶或定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力，U/mg；

K_2——在不同的有机试剂中野生型游离酶或定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的初始酶活力，U/mg。

1.12　酶解产物的薄层色谱（TLC）分析

取2 mL琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5）于离心管中，加入0.1 mL酶液，在30 ℃的水浴摇床中孵育，分别在10、30 min和1、2、4、6 h的酶解时间点取样，将样品和NAOS[新琼二糖（NA2）、新琼四糖（NA4）、新琼六糖（NA6）、新琼八糖（NA8）]标准品分别点样于硅胶板上。展开剂为正丁醇-冰醋酸-水（体积比2∶1∶1）溶液，显色剂为含有体积分数10% H_2SO_4的乙醇溶液[21]。

1.13 酶解产物的液相色谱-质谱联用仪（LC-MS）分析

取 10 mL 琼脂糖溶液（1 mg/mL、pH 7.5）于玻璃试管中，加入 0.5 mL 的酶液，酶解 24 h 后，煮沸 5 min，离心取上清液，加入适量体积（3~4 倍）的无水乙醇，静置一夜，直至不溶物沉淀，用 0.22 μm 滤膜过滤上清液，除去杂质，再通过旋转蒸发仪去除上清液中的乙醇，对样品进行富集，最后将样品冻干至粉末状，得到酶解产物。取适量 NA2 标准品和酶解产物冻干粉末，溶于超纯水中，用 LC-MS 进行分析。色谱柱为 XBridge BEH C18 色谱柱（2.1 mm×150 mm×3.5 μm），流量为 0.30 mL/min。流动相 A 为体积分数 0.1% 的甲酸，流动相 B 为乙腈。洗脱程序为：0~40 min，流动相 A 体积分数为 100%；40~45 min，流动相 A 体积分数为 70%，流动相 B 体积分数为 30%；45~50 min，流动相 A 体积分数为 20%，流动相 B 体积分数为 80%；50~55 min，流动相 B 体积分数为 100%。

2 结果与讨论

2.1 定向固定化酶突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的表征

2.1.1 定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的 FTIR 分析

由于 β-琼胶酶 Aga50D 分子表面含有较多的氨基及羧基，无法实现特定位点的定向固定化，而酶分子表面不含有巯基，因此可以将其他氨基酸突变为半胱氨酸，利用巯基实现特定位点的定向固定化。在前期研究中，作者所在研究团队得到了位于酶分子表面的 6 个正向突变位点 R66C、K211C、E308C、N452C、S558C 和 K588C，因此该研究基于突变型酶分子表面半胱氨酸的巯基与磁性纳米颗粒上的巯基可以形成二硫键，实现了突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的定向固定化。由图 1（a）可知，各定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D（R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS）的 FTIR 谱图均一致。由图 1（b）可知，NH_2-MNPS 在 3 413 cm^{-1} 和 1 634 cm^{-1} 处的峰明显变大，3 413 cm^{-1} 和 1 634 cm^{-1} 处的峰为伯胺 N—H 的伸缩振动峰，证明磁性纳米 Fe_3O_4 颗粒的成功氨基化；1 072 cm^{-1} 和 436 cm^{-1} 处为 N452-SH-NH_2-MNPS 单元中 C—S 和 S—S 的吸收峰[22]；而 NH_2-MNPS 中没有 C—S 和 S—S 的吸收峰，证明酶已成功负载在氨基化磁性纳米颗粒上。

2.1.2 定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的 SEM 分析

由图 2 可知，NH_2-MNPS 的粒径均匀，粒子间空隙较少；突变型 β-琼胶酶 Aga50D 被定向固定化后（以 N452C-SH-NH_2-MNPS 为例），NH_2-MNPS 表面覆有一层薄膜，颗粒变得光滑，表明酶被固定在了巯基修饰的 NH_2-MNPS 上。

2.1.3 定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的 VSM 分析

由 VSM 分析可知，NH_2-MNPS 及 R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS 的矫顽力都依旧为 0，饱和磁化强度分别为 70.38、71.74、80.06、61.92、74.61、65.29、67.59 emu/g。其中，R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS 具有更强的磁响应能力，因此更容易在磁场作用下进行定向运动，这将有利于酶的重复回收利用。

2.2 反应条件优化结果

2.2.1 反应时间优化结果

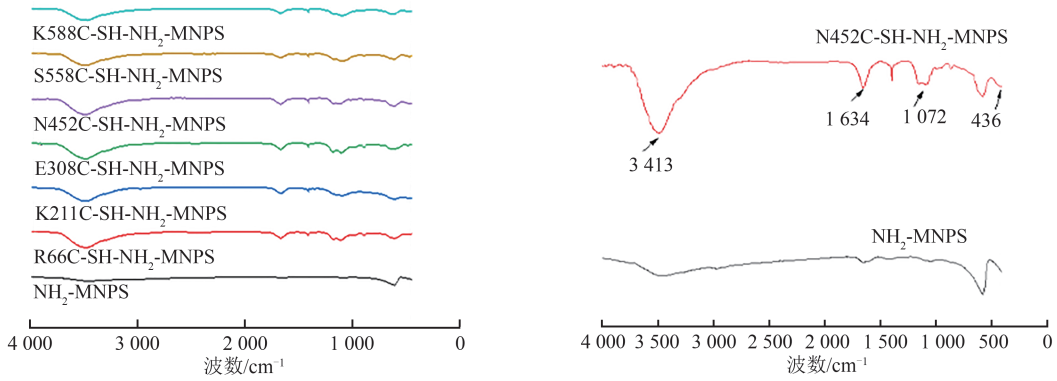
由图 3 可知，随着反应时间的增加，定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率出现明显的提升，当反应时间为 12 h 时达到最大值，而当反应时间延长至 24 h 时，固载率略微下降。结果表明，当反应时间为 12 h 时，Traut 试剂与 NH_2-MNPS 的反应已完成，而反应时间过长会影响突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的定向固定化效果，因此后续试验选择 12 h 为最优反应时间。

2.2.2 酶载量的优化结果

由图 4 可知，当酶载量为 0.5∶50 时，K211C-SH-NH_2-MNPS 和 E308C-SH-NH_2-MNPS 的固载率约为 90%，其他 4 种定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率可达 100%。当酶载量分别为 1∶50、2∶50、5∶50 时，曲线趋于平稳，表明载体达到饱和，因此后续试验选择酶载量为 1∶50。

2.2.3 交联剂与载体质量比的优化结果

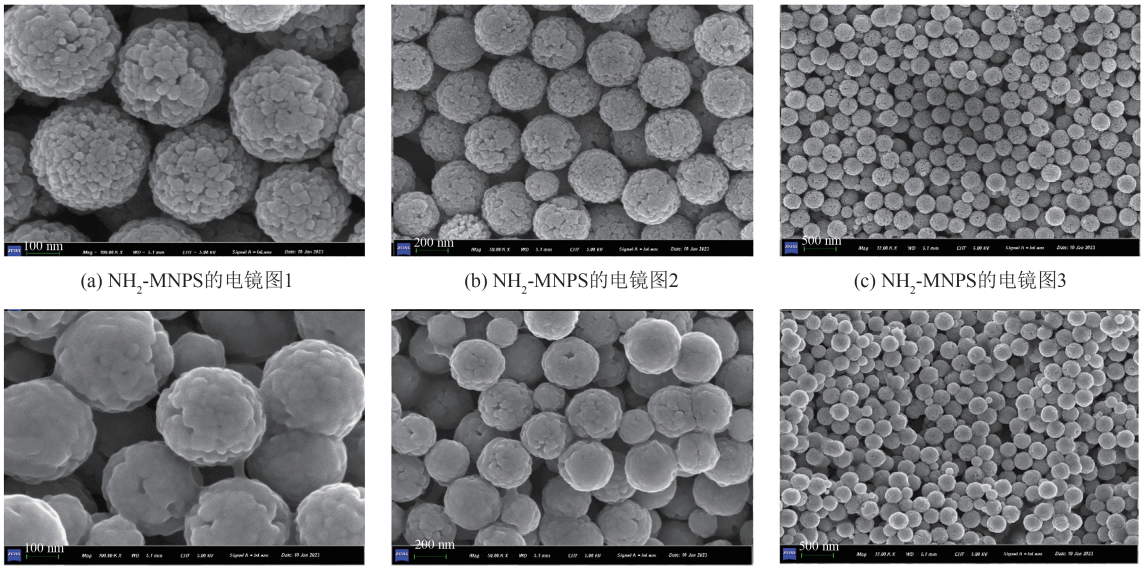
由图 5 可知，随着交联剂与载体质量比的增加，定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率也逐渐增加，但交联剂与载体质量比高于 10∶50



(a) 所有样品的FTIR谱图　　(b) NH_2-MNPS和N452-SH-NH_2-MNPS的FTIR谱图

图1　定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的FTIR谱图

Fig. 1　FTIR spectra of the directed immobilized mutant β-agarase Aga50D



(a) NH_2-MNPS的电镜图1　(b) NH_2-MNPS的电镜图2　(c) NH_2-MNPS的电镜图3

(d) N452C-SH-NH_2-MNPS的电镜图1　(e) N452C-SH-NH_2-MNPS的电镜图2　(f) N452C-SH-NH_2-MNPS的电镜图3

图2　NH_2-MNPS和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的SEM图

Fig. 2　SEM images of NH_2-MNPS and site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D

时，曲线趋于平缓，证明交联剂质量浓度已达到饱和，继续增加交联剂质量浓度对试验效果无影响，因此后续试验选择交联剂与载体质量比为10∶50。

2.3　最优反应条件下定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率

根据优化试验结果，得到最优反应条件为：反应时间12 h、酶载量1∶50、交联剂与载体质量比10∶50，因此后续试验均在此反应条件下进行。在最优反应条件下，测定野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的固载率，结果见图6。野生型游离酶由于没有Cys基团，无法固定在SH-NH_2-MNPS载体上；R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS的固载率分别为63.5%、41.7%、42.3%、71.6%、61.9%、55.1%，定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D均成功固定在了SH-MH_2-MNPS载体上。

2.4　定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的相对酶活力

如图7所示，R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS的相对酶活力分别为92.2%、94.4%、68.3%、88.0%、81.3%、96.8%，除E308C-SH-NH_2-MNPS外，其他定向固定化突变型β-琼胶酶

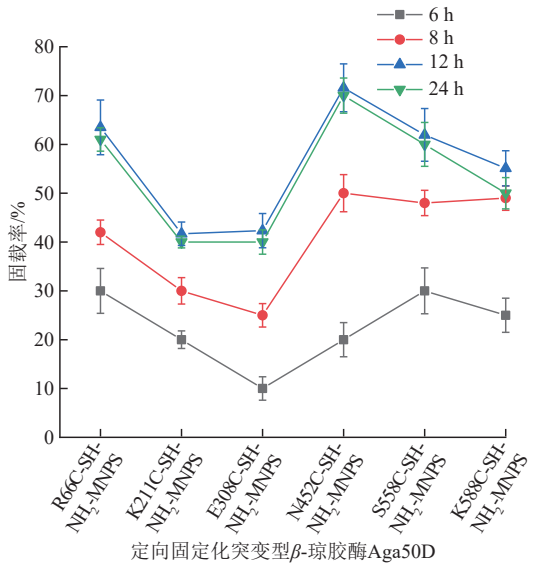


图 3 不同反应时间下的定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率

Fig. 3 Immobilization efficiency of site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D at different time points of reaction

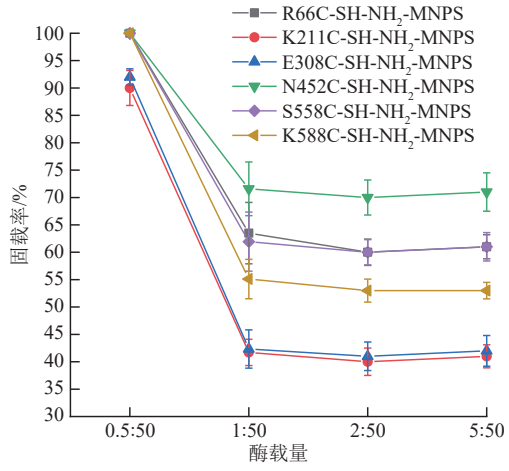


图 4 不同酶载量下的定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率

Fig. 4 Immobilization efficiency of site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D at different enzyme loading levels

Aga50D 的相对酶活力均在 80% 以上，证明该种定向固定化策略对突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的酶活力影响较小，方法较成功。

2.5 定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的重复使用性

如图 8 所示，固定化酶在重复使用 4 次后，酶活力保留率均保持在 30% 以上，E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS 和 K588C-SH-NH_2-MNPS 在重复使用 4 次后的酶活力保留率仍达 50% 左右。定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 在反复使用后，酶活力保留率下降幅度较大，主要原因在于重复 1 个循环后固液无法实现完全分离，部分定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 因琼胶凝固无法回收等原因会造成损失，从而导致酶活力保留率下降。如果将定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 固定在填充床中连续反应可避免该损失，实现较高的重复使用性。

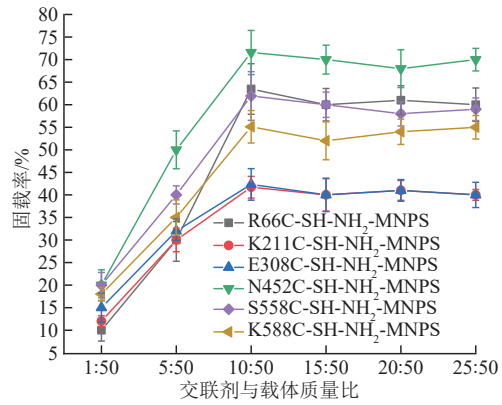


图 5 不同交联剂与载体质量比下的定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率

Fig. 5 Immobilization efficiency of site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D at different crosslinker-to-carrier mass ratios

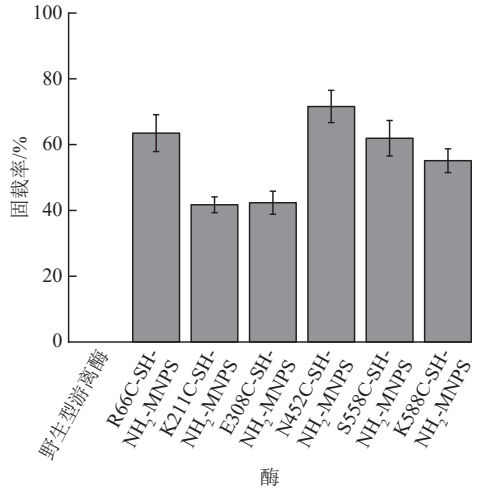


图 6 野生型游离酶和定向固定化突变型 β-琼胶酶 Aga50D 的固载率

Fig. 6 Immobilization efficiency of wild-type free enzyme and site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D

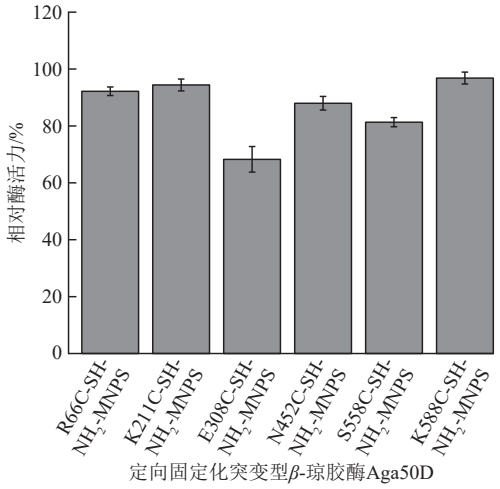


图7　定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的相对酶活力

Fig. 7　Relative enzyme activity of site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D

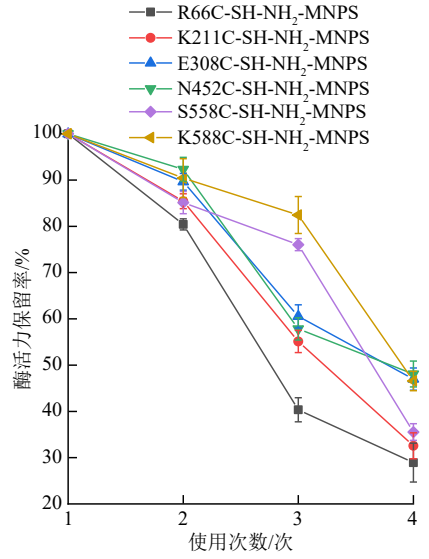
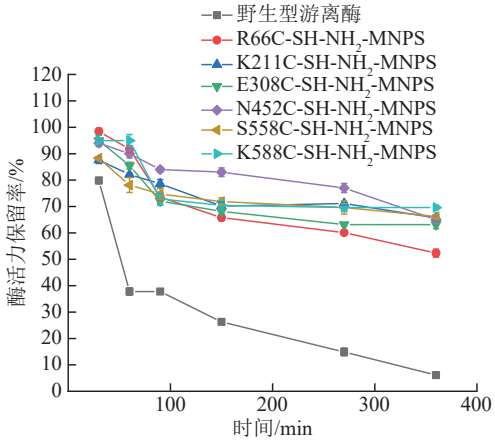


图8　野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的重复使用性

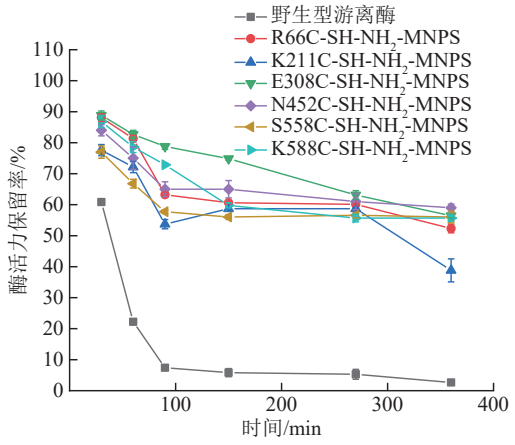
Fig. 8　Reusability of the wild-type free enzyme and site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D

2.6　定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的热稳定性

由图9可知，随着水浴时间的增加，定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力保留率逐渐降低，但其酶活力损失速率明显低于野生型游离酶。结果表明，与野生型游离酶相比，定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的热稳定性得到显著增强，可能是定向固定化后酶的空间构象发生了改变，定向固定化提高了酶的结构稳定性[23]。



(a) 40 ℃下的热稳定性



(b) 45 ℃下的热稳定性

图9　野生型游离酶和定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D在40、45 ℃下的热稳定性

Fig. 9　Thermal stability of wild-type free enzyme and site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D at 40 ℃ and 45 ℃

在40 ℃条件下，野生型游离酶在孵育30、60 min后，酶活力保留率分别为79.8%和37.8%；而孵育360 min后，几乎丧失所有酶活力；R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS在40 ℃条件下孵育30 min后，酶活力保留率分别为98.4%、87.6%、95.0%、94.0%、88.3%、95.0%；孵育60 min后，酶活力保留率分别为91.7%、82.1%、85.5%、90.0%、78.1%、95.0%；孵育360 min后，酶活力保留率分别为52.3%、65.7%、63.1%、65.0%、66.2%、69.6%。

在45 ℃条件下，野生型游离酶在孵育30 min及

60 min后，酶活力保留率分别为60.8%和22.2%；孵育360 min时，丧失全部酶活力。R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS在45 ℃条件下孵育30 min后，酶活力保留率分别为88.1%、77.6%、88.8%、84.0%、77.0%、86.8%；孵育60 min后，酶活力保留率分别为81.3%、72.1%、82.7%、75.0%、66.8%、78.6%；孵育360 min后，酶活力保留率分别为52.3%、38.8%、56.4%、59.0%、56.6%、55.6%。

2.7 有机试剂对定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的影响分析

甲醇、正丙醇等有机试剂的存在会影响蛋白质的溶解性、折叠、解折叠和变性行为，从而导致酶活力下降，限制了酶的工业化应用。如表1所示，在体积分数为50%的甲醇、正丙醇、正丁醇、异丙醇、二恶烷、二甲亚砜和丙酮以及无水乙醇中孵育30 min后，野生型游离酶均丧失全部酶活力，这表明有机试剂对野生型游离酶的酶活力影响较大。而定向固定化显著提高了酶的结构稳定性，能够有效抵抗有机试剂对酶活力的影响，例如在体积分数为50%的正丙醇、二甲亚砜中，定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的酶活力保留率均>80%，相较于野生型游离酶均明显提高，这表明定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D的空间构象更加稳定，使得其酶学性质更加稳定。

表1 有机试剂对定向固定化突变型β-琼胶酶Aga50D酶活力保留率的影响

Table 1 Effects of organic reagents on the enzyme activity retention rate of site-directed immobilized mutant β-agarase Aga50D

有机试剂	酶活力保留率/%						
	野生型游离酶	R66C-SH-NH_2-MNPS	K211C-SH-NH_2-MNPS	E308C-SH-NH_2-MNPS	N452C-SH-NH_2-MNPS	S558C-SH-NH_2-MNPS	K588C-SH-NH_2-MNPS
体积分数50%甲醇	0.0±0.0	80.0±0.5	78.9±1.8	83.7±3.6	79.4±3.9	80.6±4.6	90.3±3.8
体积分数50%正丙醇	0.0±0.0	98.4±1.2	98.5±2.9	87.4±4.9	99.4±1.2	89.5±5.6	85.4±4.6
体积分数50%正丁醇	0.0±0.0	94.3±2.6	78.5±1.2	80.5±5.2	83.2±4.3	76.4±3.6	72.1±3.7
体积分数50%二甲亚砜	0.5±0.3	98.5±4.8	93.3±2.5	95.0±3.1	80.9±3.5	98.5±1.0	87.6±2.5
体积分数50%异丙醇	0.0±0.0	95.4±3.2	89.0±3.5	69.5±2.4	70.8±3.6	79.6±3.6	85.3±3.8
体积分数50%二恶烷	0.0±0.0	78.4±2.8	60.8±3.6	70.5±3.7	86.4±3.7	80.7±1.6	88.9±4.2
体积分数50%丙酮	0.5±0.1	75.6±3.6	92.4±2.6	88.9±4.6	75.3±3.6	94.3±6.8	94.6±5.7
无水乙醇	0.0±0.0	50.7±3.6	70.9±3.6	60.4±3.5	73.6±5.2	80.9±5.7	40.6±6.9

2.8 酶解产物的TLC分析结果

酶解产物可以通过TLC进行鉴定。如图10所示，不同的反应时间下，样品均生成条带清晰的单一产物，与标准品NA2、NA4、NA6、NA8进行对比，可以得出酶解产物为单一的NA2；当酶解反应10 min时，即可观察到清晰的NA2条带，延长反应时间至6 h，条带未发生明显变化。结果表明，酶解反应进行得很快，且产物为单一的NA2。

2.9 酶解产物的LC-MS分析

由图11可知，经过分离纯化后的酶解产物的LC-MS图谱中，杂峰少，且在*m/z* 323处有明显的峰，经比对分析，证实该产物为高纯度的NA2，与TLC的结果一致。

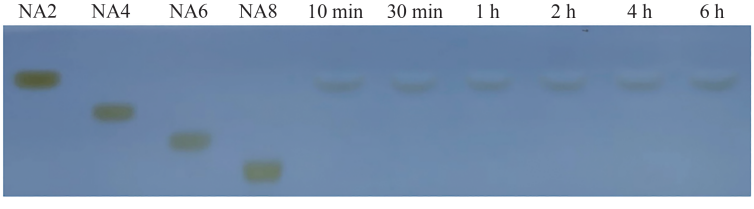


图10 样品和NAOS标准品在不同反应时间下的酶解产物的TLC图

Fig. 10 TLC profile of enzymatic hydrolysates from samples and NAOS standards at different time points of reaction

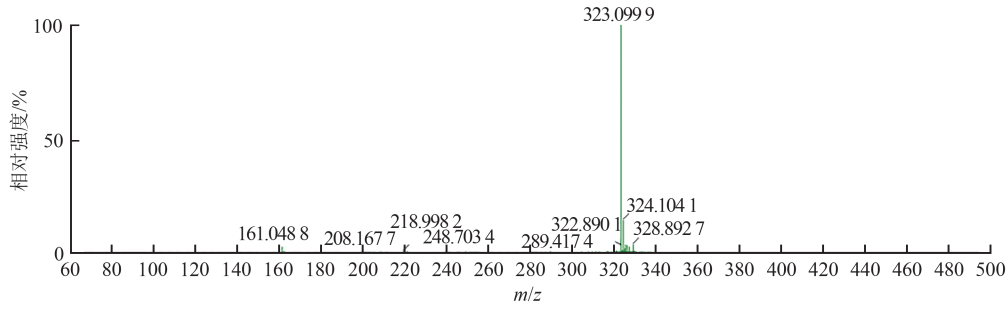


图 11　酶解产物的 LC-MS 图

Fig. 11　LC-MS diagram of enzymatic hydrolysates

3　结论

该研究利用 Traut 试剂交联 NH_2-MNPS 得到 SH-NH_2-MNPS，该颗粒可自发与突变型β-琼胶酶 Aga50D 上的半胱氨酸残基形成二硫键，从而实现突变型β-琼胶酶特定位点的定向固定化。此方法得到的定向固定化突变型β-琼胶酶 Aga50D 的相对酶活力较高，R66C-SH-NH_2-MNPS、K211C-SH-NH_2-MNPS、E308C-SH-NH_2-MNPS、N452C-SH-NH_2-MNPS、S558C-SH-NH_2-MNPS、K588C-SH-NH_2-MNPS 的相对酶活力分别为 92.2%、94.4%、68.3%、88.0%、81.3%、96.8%；相较于野生型游离酶，该定向固定化方法显著提高了突变型β-琼胶酶 Aga50D 的热稳定性。例如，在 45 ℃下，野生型游离酶在孵育 30、60 min 后，酶活力保留率分别为 60.8% 和 22.2%，而在孵育 360 min 后，野生型游离酶丧失了全部酶活力。固定化酶 E308C-SH-NH_2-MNPS 在 45 ℃条件下孵育 30 min 和 60 min 后，酶活力保留率分别为 88.8% 和 82.7%；孵育 360 min 后，酶活力保留率仍达到 56.4%。此外，定向固定化还显著提高了突变型β-琼胶酶 Aga50D 对有机试剂的耐受性，在有机试剂中，野生型游离酶丧失了全部酶活力，而大多数定向固定化突变型β-琼胶酶 Aga50D 的酶活力保留率仍可达 70% 以上，这表明定向固定化能有效抵抗有机试剂对酶活力的影响，提高了β-琼胶酶 Aga50D 的稳定性。该研究为β-琼胶酶 Aga50D 的工业化应用提供了参考依据。

参考文献

[1] SELVAM K，GOVARTHANAN M，SENBAGAM D，et al. Activity and stability of bacterial cellulase immobilized on magnetic nanoparticles[J]. Chinese Journal of Catalysis，2016，37(11)：1891-1898.

[2] CHEN X Y，LI H J，QIAO X N，et al. Agarose oligosaccharide- silver nanoparticle- antimicrobial peptide-composite for wound dressing[J]. Carbohydrate Polymers，2021，269：118258.

[3] HONG S J，LEE J H，KIM E J，et al. Toxicological evaluation of neoagarooligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agar[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology，2017，90：9-21.

[4] LEE D G，JANG M K，LEE O H，et al. Over-production of a glycoside hydrolase family 50 β-agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product[J]. Biotechnology Letters，2008，30(5)：911-918.

[5] ENOKI T，OKUDA S，KUDO Y，et al. Oligosaccharides from agar inhibit pro-inflammatory mediator release by inducing heme oxygenase 1[J]. Bioscience，Biotechnology，and Biochemistry，2010，74(4)：766-770.

[6] MA C，YANG K，WANG Y F，et al. Anti-aging effect of agar oligosaccharide on male *Drosophila melanogaster* and its preliminary mechanism[J]. Marine Drugs，2019，17(11)：632.

[7] LEE M R，KIM J E，JIN Y J，et al. Anti-obesity effects of agar (*Gelidium amansii*)-derived oligosaccharides in high-fat diet-treated C57BL/6N mice due to differential regulations of lipogenesis and lipolysis[J]. Bioscience，Biotechnology，and Biochemistry，2022，86(12)：1648-1657.

[8] XU S Y，KAN J，HU Z，et al. Quantification of neoagaro-oligosaccharide production through enzymatic hydrolysis and its anti-oxidant activities[J]. Molecules，2018，23(6)：1354.

[9] NGUYEN H H，LEE S H，LEE U J，et al. Immobilized enzymes in biosensor applications[J]. Materials，2019，12(1)：121.

[10] LI X X，LI D M，WANG W F，et al. Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin：characterization and its application in synthesis of partial

glycerides [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 133: 154-160.

[11] LIBURDI K, BENUCCI I, PALUMBO F, et al. Lysozyme immobilized on chitosan beads: kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines [J]. Food Control, 2016, 63: 46-52.

[12] BASSO A, SERBAN S. Industrial applications of immobilized enzymes: a review[J]. Molecular Catalysis, 2019, 479: 110607.

[13] 聂铭甫,李由然,石贵阳. 基于磁性壳聚糖复合材料对耐高温酶的固定化研究[J]. 中国生物工程杂志,2023,43(Suppl. 1):83-94.
NIE M F, LI Y R, SHI G Y. Immobilization of high temperature resistant enzymes based on magnetic chitosan composites[J]. China Biotechnology, 2023, 43(Suppl. 1): 83-94.(in Chinese)

[14] KANBAR B, OZDEMIR E. Thermal stability of carbonic anhydrase immobilized within polyurethane foam [J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(5): 1474-1480.

[15] 祖昕,杜凯,曹方,等. 有机溶剂处理提高固定化脂肪酶活性及稳定性[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(1):89-94.
ZU X, DU K, CAO F, et al. Treatment of organic solvents to improve activity and stability of immobilized lipases[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(1): 89-94.(in Chinese)

[16] 汝成业,张娟,堵国成,等. 包埋固定化酶降解牛奶 α_{s1}-酪蛋白过敏性研究[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(4):387-392.
RU C Y, ZHANG J, DU G C, et al. Allergenicity investigation of hydrolyzed α_{s1}-casein in bovine milk by immobilized protease[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(4): 387-392.(in Chinese)

[17] 张宇军,曹慧,徐斐,等. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的固定化研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(10):98-104.
ZHANG Y J, CAO H, XU F, et al. Studies on immobilization of neutral protease from *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(10): 98-104.(in Chinese)

[18] 张玉然,辛瑜,杨海麟,等. 黄嘌呤氧化酶酶学性质及共价交联固定化[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(1):16-21.
ZHANG Y R, XIN Y, YANG H L, et al. Enzymatic properties of xanthine oxidase and its covalent immobilization on different supports [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(1): 16-21.(in Chinese)

[19] FARMAKES J, SCHUSTER I, OVERBY A, et al. Enzyme immobilization on graphite oxide (GO) surface *via* one-pot synthesis of GO/metal-organic framework composites for large-substrate biocatalysis[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(20): 23119-23126.

[20] PAGOLU R, SINGH R, SHANMUGAM R, et al. Site-directed lysine modification of xylanase for oriented immobilization onto silicon dioxide nanoparticles [J]. Bioresource Technology, 2021, 331: 125063.

[21] 李海新,梁家铭,李蓉,等. 琼胶寡糖的抗氧化活性研究[J]. 广州化工,2018,46(20):66-68.
LI H X, LIANG J M, LI R, et al. Study on antioxidant activity of agar-oligosaccharide [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2018, 46(20): 66-68.(in Chinese)

[22] 陈亮,张萍波,蒋平平,等. 基于二硫键的自修复水性聚氨酯的制备与性能研究[J]. 中国塑料,2022,36(6):46-53.
CHEN L, ZHANG P B, JIANG P P, et al. Preparation and properties of self-healing waterborne polyurethane based on disulfide bonds[J]. China Plastics, 2022, 36(6): 46-53.(in Chinese)

[23] 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.

(责任编辑:闫林红)