

来源于 *Anoxybacillus* sp. SK3-4 普鲁兰酶 PulASK 的固定化及酶学性质研究

张华伟¹, 樊帅², 杨兆勇², 丁春光^{*1}

(1. 国家卫生健康委员会 职业安全卫生研究中心, 北京 102308; 2. 中国医学科学院 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 普鲁兰酶在淀粉加工、多糖制备以及啤酒酿造等领域有着广泛应用。然而, 该酶游离下催化产物需分离纯化和本身不可再生限制了其工业应用。磁性纳米材料具有可重复使用、磁回收性质和比表面积大等特点, 有助于解决游离酶的工业化应用难题。作者将源于 *Anoxybacillus* sp. SK3-4 的普鲁兰酶 PulASK 固定在纳米磁性材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 上以制备固定化酶复合体: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$, 测定固定化酶的酶学性质和动力学参数。结果显示, 与游离酶 PulASK 相比, 固定化酶 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ 的最适反应温度由 60 °C 提高到 65 °C, 最适 pH 与游离 PulASK 相同; 在 60 °C, pH 6.0 下孵育 7 h, 固定化酶残余酶活为 62%, 而游离酶的仅为 30%。分析酶动力学数据可知, 在 60 °C, pH 6.0 的情况下, 游离酶 PulASK 的 K_m 为 4.7 mmol/L, 为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ 的 1.47 倍; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ 的 k_{cat} 值是 350 s^{-1} , 与 PulASK 的 k_{cat} 值相当, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ 的 k_{cat}/K_m 是 PulASK 的 1.57 倍; 并且 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ 在重复使用 9 次后, 活力仍保持 50% 以上。与 PulASK 相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ 具有良好的热稳定性且可重复使用, 具有潜在应用于食品工业的价值。

关键词: 普鲁兰酶, 固定化, 磁性纳米材料, 酶学性质, 可重复性

中图分类号: TS 264 文章编号: 1673-1689(2023)04-0024-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.04.003

Immobilization of Pullulanase PulASK from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 and Its Enzymatic Properties

ZHANG Huawei¹, FAN Shuai², YANG Zhaoyong², DING Chunguang^{*1}

(1. National Center for Occupational Safety and Health, National Health Commission of the People's Republic of China, Beijing 102308, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: Pullulanase is of high industrial value in the fields of starch processing, functional medicine polysaccharide preparation and beer brewing. However, the high costs of the separation and purification of catalytic products and non-renewability of free pullulanase limit its industrial application. Magnetic nanoparticles possess unique features, such as reusability, magnetic recovery and specific surface area, which is helpful to solve the problems of industrial application of free enzymes. The immobilized enzyme complex $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine/PulASK}$ was prepared by

收稿日期: 2021-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872782); 国家卫生健康委员会职业安全卫生研究中心自管课题项目(2020019)。

* 通信作者: 丁春光(1983—), 男, 博士, 研究员, 主要从事药物分析和酶工程研究。E-mail: chunguangding@163.com

immobilizing PulASK from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 onto the Fe_3O_4 @Histidine magnetic nanoparticles. The enzymatic properties and kinetic parameters of the immobilized enzyme was investigated. In comparison with free PulASK, the optimal reaction temperature of Fe_3O_4 @Histidine/PulASK increased from 60 °C to 65 °C, while their optimal reaction pH was the same. The residual activity of immobilized enzyme was 62% after 7 h incubation at pH 6.0 under 60 °C, while that of free enzyme was only 30%. The enzyme kinetics data analysis revealed that K_m of the free enzyme PulASK was 4.7 mmol/L at pH 6.0 under 60 °C, which was 1.47 times as that of Fe_3O_4 @Histidine/PulASK. The k_{cat} value of Fe_3O_4 @Histidine/PulASK was 350 s⁻¹, which was comparable to that of PulASK. The k_{cat}/K_m values of Fe_3O_4 @Histidine/PulASK was 1.57 times as that of PulASK. Furthermore, Fe_3O_4 @Histidine/PulASK remained more than 50% active after 9 cycles of usage. Compared with PulASK, Fe_3O_4 @Histidine/PulASK obtained remarkable thermal stability and reusability, exhibiting potential application value in food industry.

Keywords: pullulanase, immobilization, magnetic nanoparticles, enzyme characterization, reusability

普鲁兰酶(EC 3.2.1.41)属于糖苷水解酶家族,是一类能有效水解糊精、支链淀粉、普鲁兰多糖以及其他支链多糖 α -1,6 糖苷键的淀粉脱支酶^[1]。淀粉是食品、纺织、制药、酿造和洗涤剂等行业的主要原料^[2],而在淀粉加工过程中,由于多数淀粉酶只能特异性水解 α -1,4 糖苷键,使得淀粉不能充分水解而造成原料浪费和成本升高。普鲁兰酶具有水解支链淀粉 α -1,6 糖苷键的能力,因此在淀粉糖化过程中额外添加普鲁兰酶会减少糖化酶用量和糖化作用时间,从而提高淀粉生物质的转化率。因此,普鲁兰酶在食品、制药、酿造和纺织等领域有重要的商业价值^[3]。但是现今大部分普鲁兰酶的催化效率和稳定性较低,与现有的工艺所要求的酶性质不匹配,从而无法在淀粉工业上大规模应用。

酶催化具有环境友好、条件可控、反应高效和产物单一等特点,并且可以在温和的条件下完成众多化学合成难以实现的反应,此酶对于绿色制造的发展尤为重要。在酶的工业化应用中,固定化酶因其具有可循环使用和更加稳定等特点,有益于底物回收和产物分离,从而缩减工艺步骤,因此酶的固定化在众多工业酶催化过程中的应用越来越广泛。在酶的固定化中,最重要的是选择合适的固定化载体,现今众多材料(如高聚物^[4]、凝胶^[5]、多孔介质^[6]、金属有机骨架材料^[7]以及磁性介质^[8])均可被应用于酶的固定化,其中磁性纳米材料与其他传统的固定化材料相比,具有比表面积大、酶负载量高、回收迅速和稳定性好等优点,由此越来越显现出其在工业

上应用的潜力。

普鲁兰酶自发现以来已有 60 多年的历史,大部分的研究主要基中在微生物来源的普鲁兰酶,至今已有来源于 *Anoxybacillus* LM 18-11^[9]、*Bacillus naganoensis*^[10]、*Aspergillus awamori*^[11]、*Thermotoga petrophila*^[12]等一系列普鲁兰酶被挖掘和表征。在工业化应用方面,野生普鲁兰酶催化效率较低^[13]、耐酸耐热稳定性差^[14]、产物分离纯化工艺复杂^[15]等一系列原因导致其难以满足工业化的需求,而固定化酶由于具有可重复使用、提高酶的稳定性、有利于产物分离和生产工艺简化等特点被广泛应用。现阶段普鲁兰酶的固定化研究多基中在共价结合方面,如利用海藻酸、琼脂糖与酪蛋白和磁性壳聚糖微球等载体的固定化,但酶的共价固定化使得载体难以重复利用,进而增加了固定化成本,所以开展可逆固定化有助于普鲁兰酶的重复利用、实现载体的循环使用和改善酶的稳定性,最终降低普鲁兰酶的工业应用成本。利用 Fe_3O_4 -壳聚糖纳米粒子固定化普鲁兰酶,其酶固载量为 96.4 mg/g,酶活保留率达到 95.6%,并设计以 Fe_3O_4 -壳聚糖纳米粒子为内核的固定化酶重复使用 6 次后残余酶活仍在为原始酶活的 87%^[16]。研究人员通过表面接枝修饰制备固定化普鲁兰酶 Fe_3O_4 @CMC/PDA-PEI-GTA/PUL-His6,经过 13 次重复使用,残余酶活仍为初始酶活的 69%^[17]。来源于 *Anoxybacillus* sp. SK3-4 的普鲁兰酶 PulASK 在 pH 5.0~7.0、50~60 °C 条件下活性较高,其酶学性质符合工业化淀粉糖化的反应条

件,作者通过将 PulASK 固定在纳米级磁性材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 上^[18],测定固定化酶的催化的最适 pH 和温度,比较固定化酶与游离酶在底物亲和力和催化效率的差异,同时还测定了固定化酶可重复使用的批次,探究普鲁兰酶 PulASK 固定于磁性材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 在食品行业工业化应用的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PulASK 表达菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3) 购自 Novagen 公司;PulASK 基因 (NCBI 登录号: EPZ37738); 华大基因合成并进行适于大肠杆菌表达的密码子优化,通过 *Nde* I/*Xho* I 酶切位点构建表达质粒 pET-21PulASK;普鲁兰多糖:购自 Sigma 公司;蛋白胨和酵母膏:购自 OXOID 公司;其余试剂均为国产分析纯。

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 10 g/L,121 °C 灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 重组 PulASK 的表达与纯化 将构建的表达质粒 pET-21PulASK 转入 BL21(DE3),转接在含有 Amp(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养到 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为 0.6~0.8,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,18 °C、200 r/min 诱导表达 16 h。离心收集诱导培养的菌体,用裂解缓冲液(20 mmol/L PBS pH 7.4,150 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑)重悬菌体,利用高压均质机破碎后,20 000 r/min、4 °C 离心 60 min,收集上清液备用。由于 pET-21a(+)带有组氨酸标签,因此可选用 BeyoGold™ His-tag 填料进行目的蛋白质的纯化,首先用 0.45 μm 滤膜过滤上清液,然后利用平衡后的填料在 4 °C 下结合 1 h,随后用平衡缓冲液(20 mmol/L PBS、pH 7.4、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑)5 倍柱体积冲洗,最后用洗脱缓冲液(20 mmol/L PBS、pH 7.4、150 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白质,经 SDS-PAGE 检测后将目的蛋白质用 50 K 超滤浓缩管(Millipore,USA)进行脱盐浓缩后备用。

1.2.2 重组 PulASK 的固定化 取一定量纯化后的 PulASK 加入干质量为 1 g 且已用结合缓冲液(20 mmol/L PBS、pH 6.0、150 mmol/L NaCl)平衡的磁性材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$,在 4 °C 下结合 2 h,然后利用

磁铁吸附磁性填料并去除上清,通过测定上清溶液中蛋白质含量(未固定蛋白质的量),与 PulASK 初始的加入量相减从而得到固定在磁性材料上蛋白质的量,即为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 的固载量。

固定化酶酶活保留率的计算公式如式 1 所示:

$$\text{酶活保留率}(\%)=I/A \quad (1)$$

式中: I 为固定化酶的比活, U/mg ; A 为初始游离酶的比活, U/mg 。

固定化酶回收率的计算公式如式 2 所示:

$$\text{回收率}(\%)=C_i/(C_i-C_0) \quad (2)$$

式中: C_i 为固定化酶的酶活, U ; C_0 为初始游离酶的酶活, U ; C_0 为固定化后上清的酶活, U 。

1.2.3 高分辨率扫描电子显微镜(SEM) 样品的扫描电子显微镜图片由 Hitachi SU8010 高分辨冷场发射扫描电子显微镜获得。

1.2.4 X 射线衍射分析(XRD) X 射线衍射数据由 D8 Discover diffractometer($\lambda=0.154\ 056\ \text{nm}$, $4^\circ/\text{min}$, $2\theta:10^\circ\sim 90^\circ$)获得。

1.2.5 PulASK 及 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}/\text{PulASK}$ 的活性测定 PulASK 活性的测定采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)方法测定,反应体系包含 1 mL 质量分数 2% 普鲁兰多糖,100 mmol/L PBS(pH 6.0),60 °C 水浴保温 15 min,实验组加入 100 μL PulASK(0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),反应计时 10 min,反应结束后加入 1 mL DNS 溶液,沸水浴 5 min,在 540 nm 下测定吸光度。在同等条件下,反应不加酶作为对照。酶活单位 U 的定义为在上述指定的活性测定条件下,每分钟催化普鲁兰多糖分解生成相当于 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葡萄糖的还原糖所需的酶量。

1.2.6 游离酶 PulASK 和固定化酶 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}/\text{PulASK}$ 酶学性质分析

1) 最适反应温度的测定 将 PulASK 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}/\text{PulASK}$ 在不同温度(30、40、50、60、70、80 °C)条件下测定酶活性,将最高活力定为 100%;

2) 最适反应 pH 的测定 在不同 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0),测定 PulASK 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}/\text{PulASK}$ 的活性,将测得的最高活力定为 100%;

3) 温度稳定性的测定 温度稳定性的表征由测定 PulASK 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}/\text{PulASK}$ 在 50 °C、pH 7.5 不同保温时间的残余酶活来完成,首先将 PulASK 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}/\text{PulASK}$ 分别在 50 °C,

pH 7.5 下孵育 2.5 h,其中每半小时取一次样,取完样品后在冰上冰浴 5 min,利用 1.2.5 所述及的方法测定活性,并以初始 PulASK 的活性为 100%。

1.2.7 PulASK 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK 酶动力学分析 动力学实验测定的条件为不同质量浓度普鲁兰多糖 (0.2~4 mg/mL), 100 mmol/L PBS, 在 pH 6.0、60 °C 的条件下反应 10 min, 可计算出 PulASK 在不同底物浓度的反应体系中的活性, 通过软件 GraphPad Prism v5.0(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 中 Michaelis-Menten 方程计算 PulASK 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK 反应的 $V_{\max}$ 和 K_m 。根据测得的 $V_{\max}$ 值以及公式 3 计算 k_{cat} 值。

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} c_E \quad (3)$$

式中: c_E 为酶的浓度。

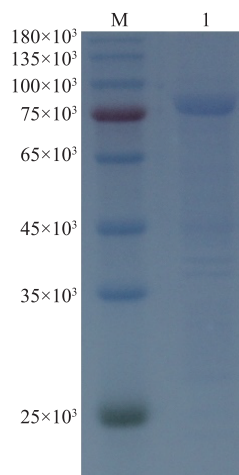
1.2.8 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK 重复使用批次分析 在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK 的重复使用批次测定中, 活性测定方法同 1.2.5, 其中每次吸附磁性材料后均需弃去上清液并用一倍柱体积的缓冲液 (100 mmol/L PBS, pH 6.0) 清洗磁性材料后继续测定固定化酶 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK 的酶活, 以第一次测定的活性为 100%。

2 结果

2.1 PulASK 的表达与纯化

将表达菌株 BL21 (DE3)/pET-28PulASK 在 18 °C、IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 的条件下, 低温诱导表达 16 h, 经高压破碎离心除去不溶物, 利用 BeyoGold™ His-tag 填料纯化后, 经 SDS-PAGE 检测

(图 1), 相对分子质量为 80 000, 与 PulASK 理论相对分子质量一致, 证明可通过大肠杆菌获得 PulASK 可溶性表达。



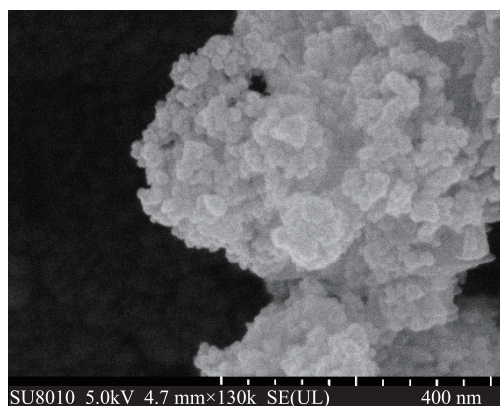
M: protein marker; 1: PulASK。

图 1 PulASK 的 SDS-PAGE 分析

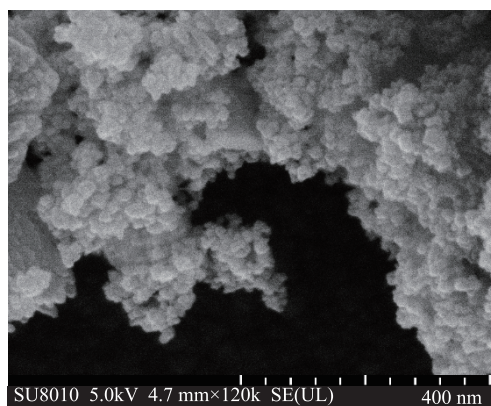
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of PulASK

2.2 扫描电子显微镜分析

以 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK 材料为研究对象, 利用扫描电子显微镜研究酶固定后在粒径大小和形貌等性质对 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 材料的影响, 结果如图 2。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 材料 (图 2 (a)) 和酶固定化后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ /PulASK (图 2 (b)) 均呈现均匀圆粒状, 其中粒径均在 30~40 nm 左右, 表明酶固定化对 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Histidine}$ 材料无明显的性状影响。



(a) 纳米材料



(b) 固定化酶

图 2 扫描电子显微镜分析磁性纳米材料及固定化酶

Fig. 2 SEM images of magnetic nanomaterials and immobilized enzyme

2.3 X 射线衍射仪分析

利用 X-射线衍射仪分析酶固定化对 Fe_3O_4 @Histidine 的影响,结果如图 3 所示。原始和酶固定化后 Fe_3O_4 @Histidine 材料均显示 6 个典型的衍射峰 ($2\theta=30.2^\circ$ 、 35.6° 、 43.2° 、 53.6° 、 57.1° 、 62.7°),与标准卡(JCPDS 01-1111)一致,根据 Scherrer 方程计算, Fe_3O_4 @Histidine 的直径大约在 35 nm 左右。

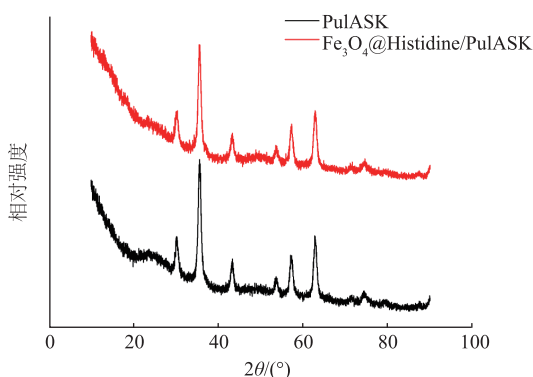


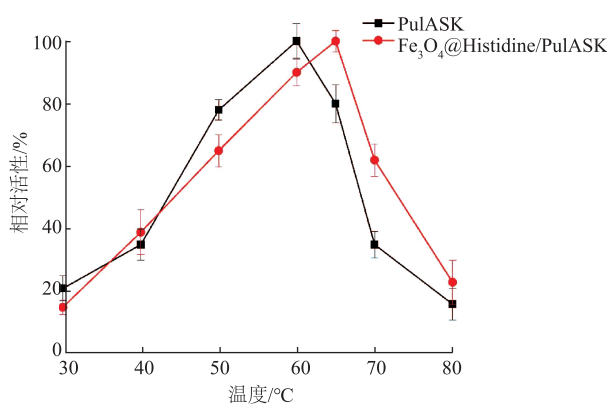
图 3 X-射线衍射分析磁性纳米材料及固定化酶
Fig. 3 XRD images of magnetic nanomaterials and immobilized enzyme

2.4 PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的酶学性质

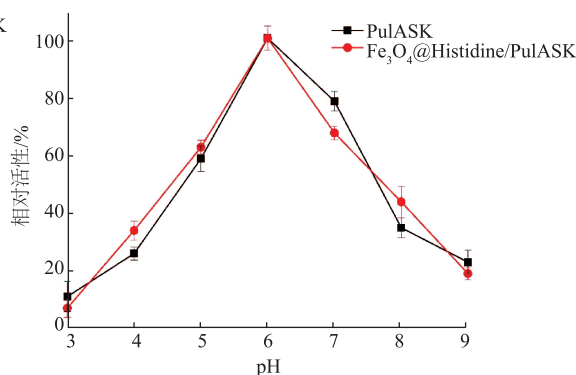
2.4.1 温度和 pH 对酶活性的影响 在不同温度 (30、40、50、60、70、80 $^\circ\text{C}$) 下考察温度对定 PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的活性的影响,结果如图 4 (a) 所示,PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 在 50~70 $^\circ\text{C}$ 范围内具有较高的活性,其中,PulASK 的最适温度为 60 $^\circ\text{C}$, Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的最适作用温度比 PulASK 的高 5 $^\circ\text{C}$,为 65 $^\circ\text{C}$ 。

如图 4 (b) 所示,PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的活性在 pH 为 5.0~7.0 时酶活较高,当 pH 低于 5.0 或高于 7.0 时,PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的活性剧烈降低,PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的最适 pH 均为 6.0。

2.4.2 温度对酶稳定性的影响 在 60 $^\circ\text{C}$,pH 6.0 条件下测定 PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的稳定性。图 5 结果显示,固定化酶 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 孵育 7 h 后残余 62% 的活性,而 PulASK 仅残余 30 % 的活性。



(a) 温度对PulASK和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK活性的影响



(b) pH对PulASK和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK活性的影响

图 4 温度和 pH 对 PulASK 和 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 活性的影响

Fig. 4 Effects of temperature and pH on activity of PulASK and Fe_3O_4 @Histidine/PulASK

2.5 PulASK 游离酶和固定化酶动力学特性

在 PulASK 的固定化过程中,随着 PulASK 添加量的增加,酶固载量不断上升并达到 83.2 mg/g 后不再上升,由此 Fe_3O_4 @Histidine 最大固载量为 83.2 mg/g,在此条件下,固定化酶的回收率为 75%,酶活保留率为 92%。

通过不同质量浓度普鲁兰多糖为底物,酶促反应的产物与二硝基水杨酸反应生成 3-氨基-5-硝基

水杨酸,该产物煮沸后在 540 nm 测定吸光度的变化从而测得反应速率。通过软件 GraphPad Prism v5.0 中 Michaelis-Menten 方程计算酶反应的 $V_{\max}$ 和 K_m ,并利用公式(1)计算 k_{cat} 值,结果如表 1 所示。在 60 $^\circ\text{C}$,pH 6.0 的情况下,游离酶 PulASK 的 K_m 为 4.7 mmol/L,为 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的 1.47 倍; Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的 k_{cat} 值是 350 s^{-1} ,与 PulASK 的 k_{cat} 值相当。 Fe_3O_4 @Histidine/PulASK 的

k_{cat}/K_m 是 PulASK 的 1.57 倍,这一结果表明在 60 °C, pH 6.0 条件下,固定化酶 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 催化能力高于游离酶 PulASK。

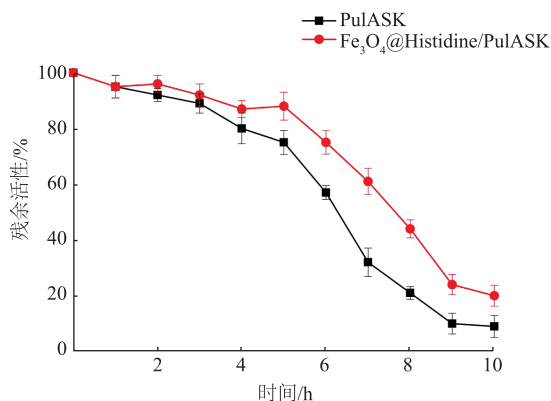


图 5 温度对 PulASK 和 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 稳定性的影响

Fig. 5 Effects of temperature on stability of PulASK and $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$

表 1 PulASK 和 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 催化动力学常数
Table 1 Kinetic parameters obtained for PulASK and $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$

酶	$K_m/(mg/mL)$	k_{cat}/s^{-1}	k_{cat}/K_m ($mL/(mg \cdot s)$)
PulASK	4.7 ± 0.4	350 ± 21.7	74.5
$Fe_3O_4@Histidine/PulASK$	3.2 ± 0.9	374 ± 17.8	116.9

2.6 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 重复使用批次和储存稳定性分析

相较于游离酶,固定化酶的优势之一即为方便回收利用,所以可重复使用次数是衡量固定化酶工业应用的重要指标之一, $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 在前 5 次的重复使用过程中,酶活性较稳定,能保持在 80% 以上,经过 9 次循环使用后, $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 的残余活性仍保持在 50% 以上。贮藏稳定性方面, $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 在 4 °C 下储存 30 d 后,仍能保持 80% 以上的活性,由此说明 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 具有重复使用性和良好的稳定性,具有一定的工业应用潜力。

3 结 语

由于普鲁兰酶具有专一性水解 α -1,6 糖苷键的能力,可与 α -淀粉酶或糖化酶等联合使用,故在

食品、制药和化工等领域广泛的应用^[2]。目前国际和国内市场,普鲁兰酶产品基本被诺维信 (PromozymeD2) 和杰能科 (OPTIMAXL-1000) 公司垄断,国内市场对于国产替代产品的需求急迫。本研究中,针对在工业应用中,游离酶因其不能重复使用和下游纯化过程中需要除酶等缺点造成工艺流程和生产成本的增加从而不利于酶在工业上的应用^[19],而固定化酶因将酶固定在不溶于水的介质上,具有可循环使用、贮存稳定性好和易于分离等特点,从而可简化生产工艺。作者采用磁性纳米材料 $Fe_3O_4@Histidine$, 将大肠杆菌异源表达的普鲁兰酶 PulASK 采用亲和层析的方法固定在 $Fe_3O_4@Histidine$ 上,将亲和纯化和固定化合为一步, $Fe_3O_4@Histidine$ 最大固载量即为 83.2 mg/g,在此条件下,固定化酶的回收率为 75%,酶活保留率为 92%。随后对比了固定化酶 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 在酶学性质和酶动力学方面相对于游离酶 PulASK 的优势,并评价了固定化酶的重复使用次数。研究发现,酶固定化会提高酶的耐热性^[20-22],在本研究中,相较于游离酶 PulASK, $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 的最适温度提高 5 °C,且在 60 °C、pH 6.0 条件下 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 孵育 7 h 以后残余 62% 的活性,而游离酶 PulASK 仅有 35% 的活性,因此 PulASK 固定在磁性纳米材料 $Fe_3O_4@Histidine$ 后耐热性得到了提高,这有助于拓宽普鲁兰酶 PulASK 的使用范围,适应不同的工艺要求,同时温度的提高可增加反应速率^[23],在高温下保持活性有助于提高催化效率,降低生产成本;固定化酶在每次重复使用过程中,更换底物和搅拌的机械力会造成酶损失和失活,因此固定化酶的重复使用次数一般在 5~15 次^[24],而本研究使用的磁性纳米材料相对于共价结合的固定化材料具有可重复固定酶、利用磁场就可释放/回收固定酶和比表面积大等特点,最终固定化酶 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 在前 5 次的重复使用过程中,残余酶活能保持在 80% 以上,经过 9 次循环使用后, $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 的活性仍保持在 50% 以上,同时固定化酶 $Fe_3O_4@Histidine/PulASK$ 的催化常数 k_{cat}/K_m 是游离酶的 1.57 倍,尽管与已报道固定化普鲁兰酶^[16-17]在固载量和重复使用性上还有一定的提高空间,但磁性纳米材料 $Fe_3O_4@Histidine$ 固定化 PulASK 在食品、制药和精细化工中仍具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] DUAN X, CHEN J WU J. Improving the thermostability and catalytic efficiency of *Bacillus deramificans* pullulanase by site directed mutagenesis[J]. **Applied and Environmental Microbiolog**, 2013, 79, 4072-4077.
- [2] HAKI G D, RAKSHIT S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review[J]. **Bioresource Technology**, 2003, 89(1): 17-34.
- [3] NIHANI A, BURHAN A. An amylopullulanase (ApuNP1) from *Geobacillus thermoleovorans* NP1: biochemical characterization and its potential industrial applications[J]. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2019: 1-9.
- [4] MARTIN L S, CERON A, MOLINARI D, et al. Enhancement of lipase transesterification activity by immobilization on β -cyclodextrin-based polymer[J]. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, 2019, 91(6).
- [5] CHAUHAN G S. Evaluation of nanogels as supports for enzyme immobilization[J]. **Polymer International**, 2014, 63.
- [6] WU L, LIU Y, CHI B, et al. An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on ϵ -poly-L-lysine modified mesoporous TiO_2 [J]. **Food Chemistry**, 2015, 187: 182-188.
- [7] XIE T, CHI L, LIU R, et al. Immobilization of enzymes on metal-organic frameworks and its application in environmental fields [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2019.
- [8] ULU A, NOMA S A A, KOYTEPE S, et al. Chloro-modified magnetic Fe_3O_4 @ MCM-41 core-shell nanoparticles for *L*-asparaginase immobilization with improved catalytic activity, reusability, and storage stability[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018: 1-19.
- [9] 甄杰, 胡政, 李树芳, 等. 一个新型耐热普鲁兰酶的结构与功能[J]. **生物工程学报**, 2014, 30(1): 119-128.
- [10] 王海, 叶燕锐, 刘欣, 等. 重组普鲁兰酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达[J]. **现代食品科技**, 2018, 34(10): 93-99.
- [11] 高兆建, 陈雪莲, 王先凤, 等. 新型耐热耐酸普鲁兰酶的分离纯化与酶学特性分析[J]. **食品工业科技**, 2019, 40(4): 81-87.
- [12] 邢岩, 邱爽, 聂慧慧, 等. *Thermotoga petrophila* 普鲁兰酶基因的异源表达与酶学性质分析[J]. **河南农业大学学报**, 2018, 52(3): 404-411.
- [13] 杨向会, 陈晟, 吴敬. 嗜酸芽孢杆菌普鲁兰酶在大肠杆菌中的表达及发酵优化[J]. **食品与机械**, 2018(5).
- [14] 曾艳, 郑宏臣, 付晓平, 等. 普鲁兰酶 N 端结构域 CBM68 对酶学性质的影响[J]. **南开大学学报(自然科学版)**, 2018, 51(4): 95-101.
- [15] 周念波, 孙杰, 王晶, 等. 普鲁兰酶在食品工业中的应用[J]. **食品工程**, 2008(2): 18-20.
- [16] LONG J, WU Z, LI X, et al. New method for the immobilization of pullulanase onto hybrid magnetic (Fe_3O_4 - κ -carrageenan) nanoparticles by electrostatic coupling with pullulanase/chitosan complex[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63, 13, 3534-3542.
- [17] WANG J, LIU Z, ZHOU Z. Improving pullulanase catalysis via reversible immobilization on modified Fe_3O_4 @Polydopamine nanoparticles[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2017, 182(4): 1467-1477.
- [18] RASHID Z, NAEIMI H, ZARNANI A H, et al. Facile fabrication of nickel immobilized on magnetic nanoparticles as an efficient affinity adsorbent for purification of his-tagged protein[J]. **Materials Science and Engineering**, 2017, 80: 670-676.
- [19] TISCHER W, KASCHE V. Immobilized enzymes: crystals or carriers[J]. **Trends in Biotechnology**, 1999, 17(8): 326-335.
- [20] RAGHU S, PENNATHURUR G. Enhancing the stability of a carboxyl esterase by entrapment in chitosan coated alginate beads[J]. **Turkish Journal of Biology**, 2018, 42(4): 307-318.
- [21] CHOU Y L, KO C Y, CHEN L F, et al. Purification and immobilization of the recombinant *Brassica oleracea* Chlorophyllase 1 (BoCLH1) on DIAION® CR11 as potential biocatalyst for the production of chlorophyllide and phytol[J]. **Molecules**, 2015, 20(3): 3744-3757.
- [22] JUN L Y, MUBARAK N M, YON L S, et al. Immobilization of peroxidase on functionalized MWCNTs-buckypaper/ polyvinyl alcohol nanocomposite membrane[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9(1): 2215.
- [23] IYER P V, ANANTHANARAYAN L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment[J]. **Process Biochemistry**, 2008, 43(10): 1019-1032.
- [24] WANG H T, YANG J, CHEN K I, et al. Hydrolyzation of mogrosides: immobilized β -glucosidase for mogrosides deglycosylation from *Lo Han Kuo*[J]. **Food Science and Nutrition**, 2019, 7(2): 834-843.

(责任编辑:李春丽)