

重组甘油单酯脂肪酶 GMGL 的高效表达及固定化

牛亚春¹, 蓝东明², 王永华², 杨博^{1*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究以来源于海洋地衣芽孢杆菌的甘油单酯脂肪酶 GMGL 为研究对象, 在 5 L 发酵罐中优化了重组大肠杆菌的发酵条件, 确定了最佳诱导培养条件: 诱导温度 25 °C, 发酵培养基 pH 7.0, 发酵液菌体 OD₆₀₀ 达到 20 时添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 葡萄糖流加方式为变速流加。诱导培养 24 h, 菌体湿重达到 125.40 g/L, 发酵液活力为 1985 U/mL, 较优化前 (1185 U/mL) 提高了 67.50%。进一步对 GMGL 进行固定化研究, 确定最佳固定化条件为: 酶载量为 100 mg/g, 磷酸盐缓冲液离子强度为 0.50 mol/L, pH 为 9, 优化后固定化 GMGL 的活力为 4770 U/g, 较优化前 (1650 U/g) 提高了 189.09%。利用扫描电镜 (SEM) 和傅里叶红外光谱 (FT-IR) 对固定化酶进行表征, 证实 GMGL 成功负载在 ECR8285 上。上述结果表明将为高活力甘油单酯脂肪酶的高效制备提供了一定的研究依据。

关键词: 甘油单酯脂肪酶; 发酵优化; 固定化

文章编号: 1673-9078(2021)10-70-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0204

High-efficiency Expression and Immobilization of Recombinant Monoglyceride Lipase GMGL

NIU Ya-chun¹, LAN Dong-ming², WANG Yong-hua², YANG Bo^{1*}

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The monoglyceride lipase GMGL derived from *Bacillus licheniformis* was used as the research object. The fermentation conditions of recombinant *Escherichia coli* bacteria were optimized in a 5 L bioreactor, and the best inductive culture conditions were determined: inductive temperature 25 °C, the pH of the fermentation medium was 7.0, the bacterial OD₆₀₀ reached 20, and the final concentration of IPTG was 1 mmol/L. The glucose feeding method was variable speed feeding. After 24 hours of induction culture, the wet weight of the bacterial cell reached 125.40 g/L, and the fermentation activity was 1985 U/mL, which increased by 67.5% compared to the pre-optimization period (1185 U/mL). Further immobilization studies were carried out on GMGL, and the optimal immobilization conditions were determined as follows: enzyme load was 100 mg/g, phosphate buffer salt concentration was 0.50 mol/L, and pH was 9. After optimization, the activity of immobilized GMGL was 4770 U/g, which increased by 189.09% compared to that before optimization (1650 U/g). Using scanning electron microscopy (SEM) and Fourier infrared spectroscopy (FT-IR) for characterization, it was confirmed that GMGL was successfully loaded on ECR8285. These results will provide a research basis for the efficient preparation of monoglyceride lipase with high activity.

Key words: monoglyceride lipase; fermentation optimization; immobilization

引文格式:

牛亚春, 蓝东明, 王永华, 等. 重组甘油单酯脂肪酶 GMGL 的高效表达及固定化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 70-78

NIU Ya-chun, LAN Dong-ming, WANG Yong-hua, et al. High-efficiency expression and immobilization of recombinant monoglyceride lipase GMGL [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 70-78

收稿日期: 2021-02-27

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (31725022)

作者简介: 牛亚春 (1994-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: N1843315366@163.com

通讯作者: 杨博 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程及生物催化,

E-mail: yangbo@scut.edu.cn

具有特异性底物专一性的生物酶在工业领域中具有重要的应用价值。与常见的甘油三酯水解酶 (EC 3.1.1.3) 不同^[1-3], 甘油单酯脂肪酶 (monoacylglycerol lipases, EC 3.1.1.23) 能专一地作用于甘油单酯, 将其水解成脂肪酸和甘油^[4]。由于其高度专一的底物特异性, 可应用于合成高纯度甘油二酯^[5]或者甘油单酯^[6],

而甘油单酯是重要的乳化剂、稳定剂、药品添加剂及防腐剂等^[7,8]。另外,甘油单酯脂肪酶在人体中具有重要的生理调控作用,如介导 2-花生四烯酸甘油酯(2-AG)信号传导和花生四烯酸代谢^[9,10],是重要的药物研发靶蛋白。

微生物来源的甘油单酯脂肪酶具有显著的耐热性能及催化活力,更具有工业应用潜力,其发掘及结构功能的研究一直是热点。Imamural 等^[4]对来源于 *Bacillus* sp. H-257 的甘油单酯脂肪酶 MGLP 的酶学性质进行了研究,结果表明其最适反应温度为 75 °C,最适 pH 6~8; Riegler-Berket 等^[11]研究了来源于 *Arabidopsis thaliana* 的甘油单酯脂肪酶 AtMAGL 的底物特异性、区域特异性及脂肪酶特异性; Kim 等^[12]研究了甘油单酯脂肪酶 MGL 的盖子结构及功能关系;随后,唐薇^[13]对来源于 *Geobacillus* sp.12AMOR1 的甘油单酯脂肪酶 GMGL 进行克隆表达,首次解析了海洋微生物来源的甘油单酯脂肪酶的晶体结构,并研究了 GMGL 识别及水解底物的过程。

固定化酶是提高游离酶应用性能的有效方法之一,如提升生物酶的稳定性,延长使用寿命及生产成本低等优点^[14-16]。常见的固定化方法主要包括吸附法、包埋法、共价结合法、交联法和热处理法等,其中吸附法是通过疏水相互作用、范德华力等物理相互作用力,将酶分子和树脂相互结合,使用此类结合方法常见的树脂有大孔吸附树脂,但其固定后的酶分子易脱落,性能不稳定,影响固定化酶的重复利用。因此,为解决大孔吸附树脂所固定的酶使用寿命短的问题,寻找一种新的树脂用于固定化很有意义。ECR8285 树脂是一种环氧丙烯酸酯树脂,主要通过共价结合作用使酶分子表面上的非必需基团与载体材料表面上的活性官能团实现多点共价结合,与大孔吸附树脂相比,该方法获得的固定化酶具有更高的固定化效率及较长的使用寿命。Li 等^[17,18]通过共价结合方法将偏甘油酯脂肪酶 SMG1-F278N 固定在 ECR8285 树脂,与游离脂肪酶相比,固定化 SMG1-F278N 的热稳定性显著提高,重复使用 7 次后催化活力保留率仍为 98.00%。由此可见,ECR8285 树脂由于其牢固的共价结合方式用于固定化酶载体具有潜在的应用价值。

目前,甘油单酯脂肪酶的研究主要集中在基因挖掘、酶学性质表征及晶体结构与功能的关系等^[11,12],但已报道的甘油单酯脂肪酶产量低,难以满足产业化生产需求及游离酶无法重复利用等缺点,且迄今为止关于重组甘油单酯脂肪酶高效表达的发酵条件优化又尚未报道。因此,为降低产业化成本,提高经济效益,本研究以甘油单酯脂肪酶 GMGL 重组大肠杆菌为研

究对象,在 5 L 发酵罐中研究了诱导时间、诱导温度、诱导 pH 以及葡萄糖补料方式对重组工程菌表达甘油单酯脂肪酶的影响,并以环氧树脂 ECR8285 为固定化材料,研究了酶载量、缓冲盐浓度以及缓冲液 pH 对 GMGL 固定化的影响。研究结果为后期甘油单酯脂肪酶的高效表达和固定化酶制备提供研究基础,以期获得生物化工和食品化工领域应用的甘油单酯脂肪酶固定化酶制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

重组大肠杆菌表达菌株 pET30a-GMGL/BL21 (DE3)由华南理工大学生物化工实验室构建和保藏。

1.1.2 生化试剂

酵母粉、蛋白胨、一水葡萄糖、卡那霉素等购自国药集团;单硬脂酸甘油酯(MAG)购自上海麦克林试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

生化培养箱,重庆市永生试验仪器厂;DYY-8C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;SKY2102C 型摇床,SUKUN;全自动凝胶成像仪,BIO-RAD;5 L 发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司;SBA-40D 生物传感器,山东省科学院生物研究所;Merlin 型场发射扫描电子显微镜,Zeiss;Nicolet IS50-Nicolet Continuum 型傅里叶变换红外光谱仪-红外显微镜,Thermo Fisher Scientific。

1.1.4 培养基

摇瓶种子液培养基(L⁻¹):10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母粉,10 g NaCl,补加终浓度为 50 μg/mL 的卡那霉素。

发酵培养基(L⁻¹):10 g 一水葡萄糖,11.5 g 酵母膏,19.5 g 蛋白胨,4 g (NH₄)₂SO₄,0.9 g 柠檬酸,18 g K₂HPO₄·3H₂O,3 g KH₂PO₄,1.2 g MgSO₄(单独灭菌),微量元素液 1 mL。

微量元素溶液(L⁻¹):2.8 g FeSO₄·7H₂O,2 g MnCl₂·4H₂O,2.8 g CoSO₄·7H₂O,1.5 g CaCl₂·2H₂O,0.2 g CuCl₂·2H₂O,0.3 g ZnSO₄·7H₂O,溶于 1 mol/L HCl 中。

补料培养基(L⁻¹):600 g 葡萄糖,10 g MgSO₄·7H₂O。

1.2 实验方法

1.2.1 种子液制备

冻存的重组大肠杆菌在 LB 固体培养基上(含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 划线, 培养 12~18 h。接种单菌落到 5 mL LB 培养液中, 培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 200 r/min 的条件培养 12~14 h; 将上述培养物按 1% 的接种量加到 150 mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至对数生长中后期, $\text{OD}_{600}=2\sim6$ 左右。

1.2.2 发酵罐培养条件

5 L 发酵罐中装液量为 3 L, 接种量 5%, 发酵培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 通过调节搅拌转速和空气流速使溶氧不低于 10%, 流加氨水控制 pH 7.0 左右。分批培养 4 h 后, 进行补料培养, 葡萄糖流加速度为 12.5 g/h。在对数生长期对细胞进行诱导, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 27 h 时停止补料, 31 h 时停止发酵。诱导阶段每 4 h 取样, 测定细胞湿重、酶活、葡萄糖残留含量。诱导时间设置为对数生长前期 (2 h)、对数生长中期 (4 h) 和对数生长后期 (7 h); 诱导温度设置为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$; 诱导 pH 设置为 6.5、7.0 和 7.5。

葡萄糖流加方式分别设定为恒速流加、变速流加、指数流加和 pH-STAT。(1) 恒速流加葡萄糖流速为 12.5 g/h; (2) 变速流加控制发酵液中葡萄糖含量低于 5 g/L; (3) 指数流加控制比生长速率为 0.065 h^{-1} ; (4) pH-STAT 串联 pH 和补料, 当 pH 低于 7.0 时流加葡萄糖。

1.2.3 GMGL 酶活力检测

取 15 mL 发酵液离心去上清, 菌体用 15 mL pH 7.5 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液重悬菌体, 超声破壁 15 min, 离心所得上清即为 GMGL 粗酶液。GMGL 酶活力测定参见唐微等的方法^[13]并加以修改。取 4 g 乳化液 (4% 的聚乙烯醇(PVA):MAG 体积比为 3:1) 加入 5 mL pH 7.5 磷酸盐缓冲液, 空白对照中加入 15 mL 95% 的乙醇, 于 150 r/min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中预热 5 min, 预热后加入 1 mL 稀释适当倍数的酶液, 然后反应 10 min。待反应结束后立即加入 15 mL 95% 的乙醇终止反应。反应结束后加入 2 滴酚酞指示剂, 用 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定。在一定反应条件下, 每分钟催化底物水解生成 1 μmol 脂肪酸所需要的酶量定义为 1 U。

1.2.4 发酵液中葡萄糖含量测定

用 SBA-40D 生物传感仪测定发酵液中葡萄糖含量。

1.2.5 GMGL 的固定化

将粗酶液浓缩至 5000 U/mL, 取部分酶液与树脂 ECR8285 按不同固定化条件进行混合, 25 $^{\circ}\text{C}$ 固定时间为 8 h。真空泵除去吸附后残液, 将待干燥固定化酶置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱干燥 8 h, 控制水分含量在 5% 以

下, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。固定化条件: (1) 酶载量为 50、100、150、200 和 250 mg/g; (2) 缓冲液盐浓度为 0.05、0.10、0.30、0.50 和 1.00 mol/L; (3) 缓冲液 pH 为 5、6、7、8、9 和 10。

1.2.6 固定化 GMGL 的表征

1.2.6.1 固定化酶 GMGL 的 SEM 表征

根据 Liu 等^[19]的方法, 利用 SEM 研究 GMGL 固定前后环氧树脂 ECR8285 的表面形貌。

1.2.6.2 固定化酶 GMGL 的 FT-IR 表征

FT-IR 光谱检测参照 Liu 等^[19]的方法。

1.2.7 固定化酶 GMGL 的蛋白吸附量测定

蛋白吸附量测定方法参考文献^[17]。

1.2.8 固定化酶水解活力测定方法

固定化 GMGL 酶活力测定参见唐微等^[13]方法并加以修改。取 4 g 已制备好的乳化剂 (4% 的 PVA: 单硬脂酸甘油酯体积比为 3:1) 加入 5 mL pH 7.5 磷酸盐缓冲液, 空白对照中加入 15 mL 95% 乙醇, 设定转速为 150 r/min, 温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中预热 5 min, 预热后加入 0.01 g 固定化 GMGL, 然后反应 10 min。待反应结束后立即加入 15 mL 95% 的乙醇终止反应。反应结束后加入 2 滴酚酞指示剂, 用 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定。

1.2.9 数据处理

以上每项检测指标均设置三个平行。用 Microsoft Excel 2010 软件计算所有数据的平均值和标准差, 采用 Origin 2021 软件作图, SPSS 9.0 进行分析, 显著性水平 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 重组大肠杆菌高效表达 GMGL 的发酵条件优化

2.1.1 诱导时间对重组大肠杆菌表达 GMGL 的影响

lac 启动子是一种常用的由乳糖或其类似物异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达的启动子, 诱导剂 IPTG 在不同的生长时期进行诱导, 对目的基因的表达会产生显著性差异。Sriubolmas 等^[20]采用大肠杆菌 DH5 α (pQEA11) 生产青霉素酰化酶时, 在对数生长初期和中期进行诱导时, 青霉素酰化酶的表达量不高, 但在对数生长中后期进行诱导时, 青霉素酰化酶的表达量显著提高。因此, 分别在对数生长前期、中期和后期添加 IPTG 进行诱导, 探究不同诱导时间对重组大肠杆菌发酵表达水平的影响。如图 1c, 在对数生长前期和中期进行诱导, 菌体生长情况受到影响,

最大细胞湿重只能达到 99.88 g/L,可能是由于细胞较早地开始合成 GMGL,从而给菌体后期的生长带来压力,提前诱导会导致发酵液中的葡萄糖提前积累。如图 1a 和 1b,对数生长后期诱导更有利于细胞的生长和产物的合成,同时提高了细胞对葡萄糖的利用率,发酵 31 h 时,酶活力达到 1550 U/mL,比对数生长前期诱导提高了 30.80%,比对数生长中期诱导提高了 21.40%。这一结果表明在对数生长后期开始诱导,有利于 GMGL 的表达,为探究诱导时间对其他重组蛋白表达的影响提供良好的借鉴。

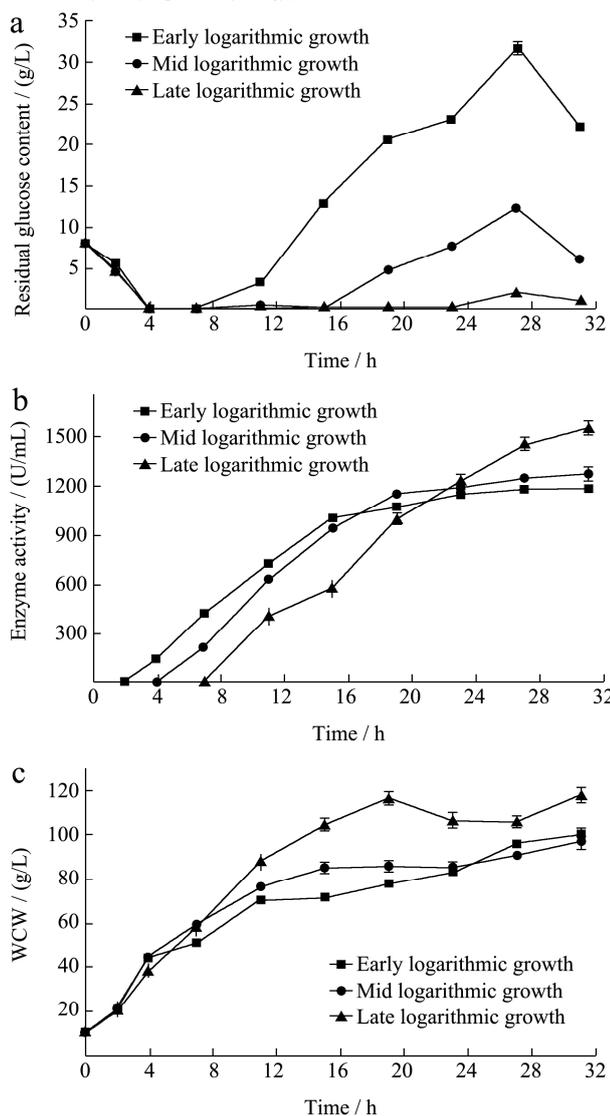


图1 诱导时间对重组大肠杆菌发酵过程的影响

Fig.1 Effect of induction time on the fermentation process of recombinant *E. coli*

2.1.2 诱导温度对重组大肠杆菌表达 GMGL 的影响

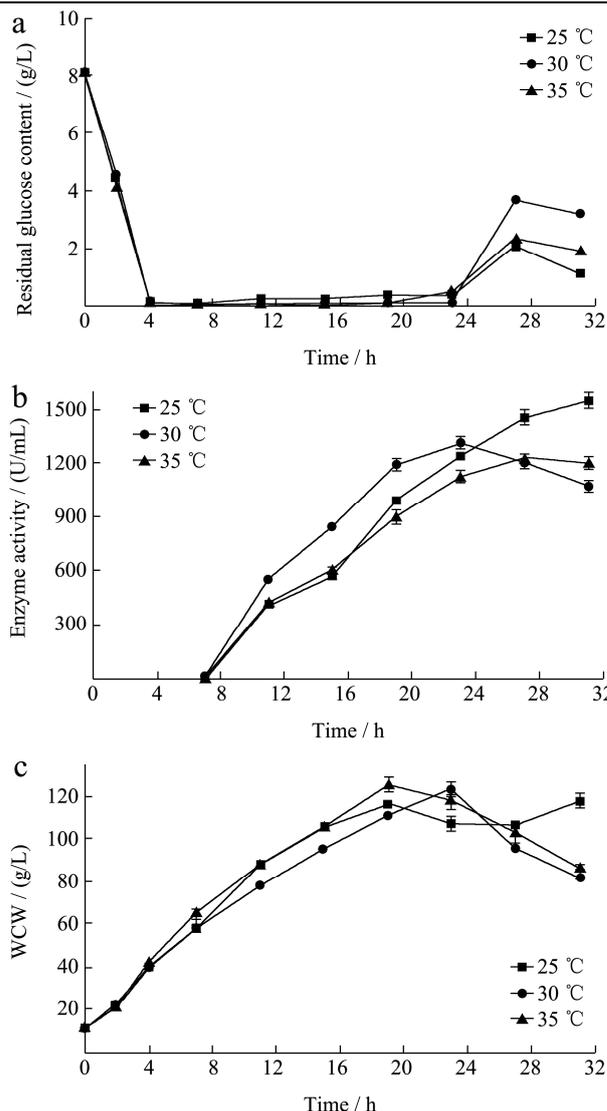


图2 诱导温度对重组大肠杆菌发酵过程的影响

Fig.2 Effect of induction temperature on the fermentation process of recombinant *E. coli*

诱导温度是影响菌体生长和调控产物合成的重要因素。丁兰宝等^[21]报道较高的诱导温度有利于大肠杆菌的高密度发酵,但低温诱导能提高目的产物的合成,而且在不同培养阶段采用不同的培养温度有利于提高大肠杆菌的生长密度和重组产物的表达量,可缩短发酵周期。此外,一些研究表明,培养温度的升高会导致工程菌的质粒稳定性变差,造成质粒丢失。本研究生探究了不同诱导温度对重组大肠杆菌产 GMGL 的影响,如图 2c,在 35 °C 条件下诱导,发酵 19 h 时,细胞湿重达到最高 125.40 g/L,之后细胞湿重开始下降,23 h 时发酵液中开始积累葡萄糖,27 h 时残糖量达到最高 2.40 g/L,酶活达到最高 1233 U/mL。在 30 °C

的诱导温度下,发酵 23 h 时,细胞湿重达到最高 123.98 g/L。如图 2a 和 2b, 随后发酵液中的葡萄糖大量积累, 细胞湿重和酶活力开始下降, 31 h 时酶活力为 1075 U/mL。在 25 °C 的诱导温度下, 发酵 19 h 时细胞湿重开始下降, 但酶活力继续增加, 发酵 31 h 时达到最高 1550 U/mL, 比 30 °C 和 35 °C 分别提高了 44.19% 和 29.38%, 说明低温更有利于甘油单酯脂肪酶活力的提高。这一现象在其他研究中也报道^[22], 推测一是低温有利于外源蛋白质的有效折叠; 二是在低温条件下, 乙酸等代谢产物的积累减少, 降低了细胞生长过程中的毒害作用。

2.1.3 诱导 pH 对重组大肠杆菌表达 GMGL 的影响

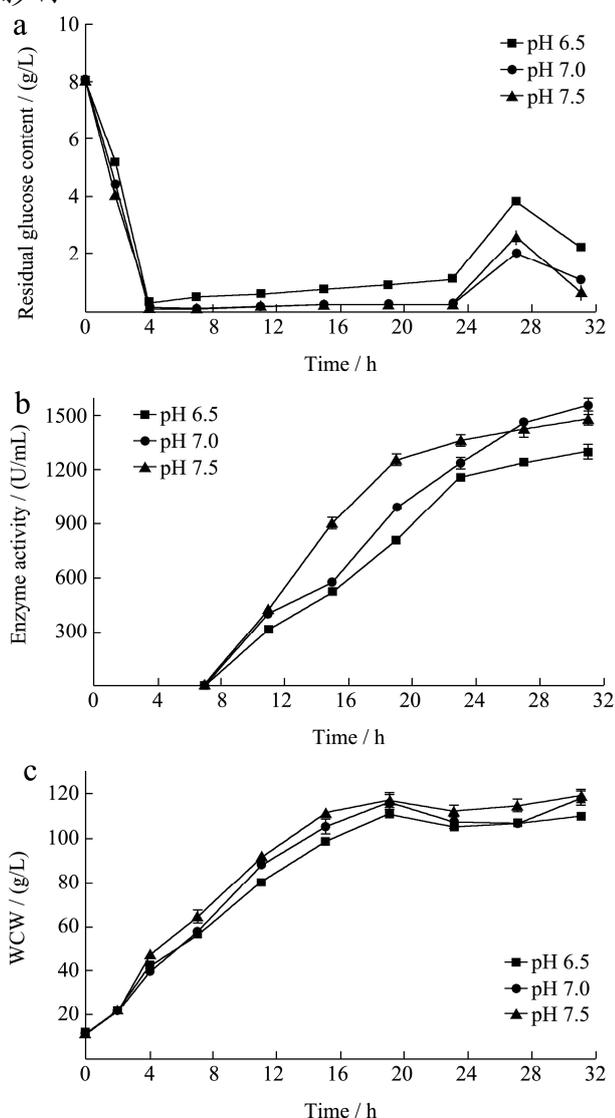


图 3 诱导 pH 对重组大肠杆菌发酵过程的影响

Fig.3 Effect of induction pH on the fermentation process of recombinant *E. coli*

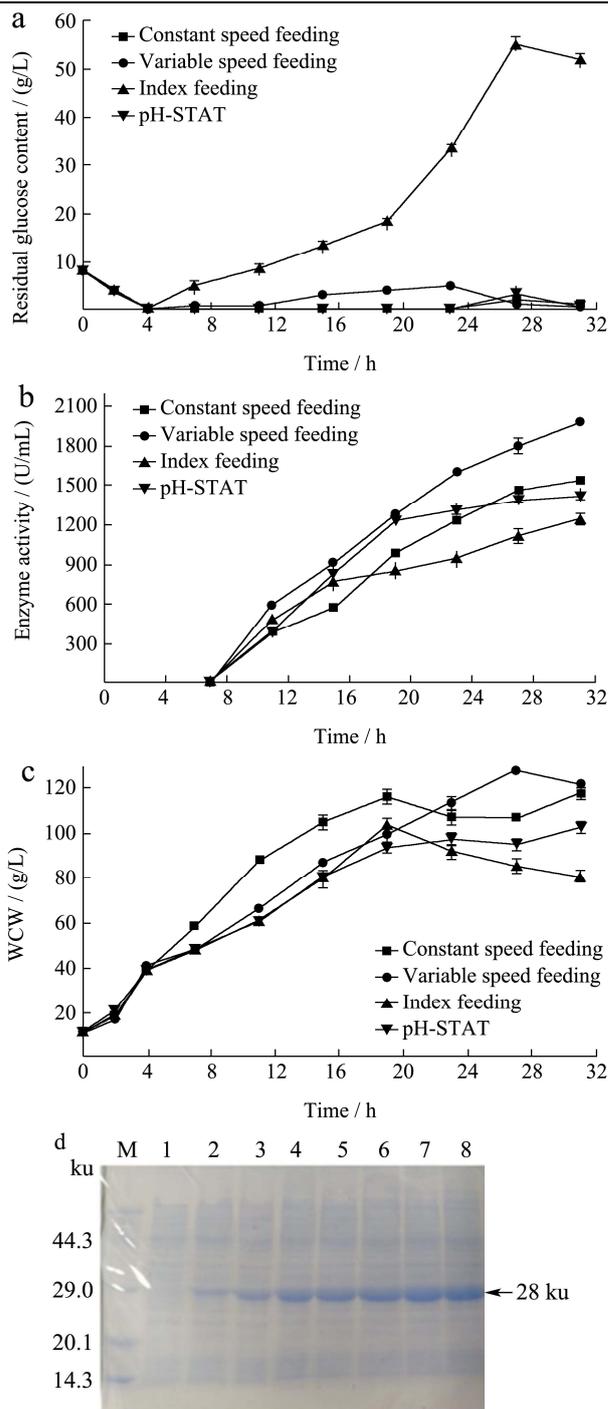


图 4 葡萄糖流加方式对重组大肠杆菌发酵过程的影响及 GMGL 的 SDS-PAGE 检测

Fig.4 Effect of glucose feeding on the fermentation process of recombinant *E. coli* and SDS-PAGE test results of GMGL

注: M: Maker; 1~8: IPTG 诱导 0、1、5、9、13、17、21 和 25 h。

发酵过程中维持稳定的 pH 是使细胞保持最佳生理状态的必要条件。一方面, 外界 pH 值的变化会通过弱酸或弱碱的变化改变细胞内的 pH, 从而影响细胞

的生理代谢。另一方面,大肠杆菌利用碳源产生的代谢产物即有机酸的积累,会造成 pH 值的下降;而有机酸的消耗,以及无机氮源的利用,则会造成 pH 值上升。在发酵过程中,通过流加低浓度的碱对 pH 进行调节,进而控制发酵液的 pH 处于适宜的范围内,可以避免 pH 值的剧烈变化对细胞生长和代谢造成不利影响。分别控制诱导 pH 为 6.5、7.0 和 7.5,探究了不同恒定 pH 发酵条件下对甘油单酯脂肪酶重组表达的影响。如图 3b 和 3c,在 pH 7.5 条件下诱导更有利于细胞的生长,发酵 6~23 h 时 GMGL 酶活力更高,发酵 31 h 时酶活为 1485 U/mL。在 pH 7.0 条件下诱导,相比 pH 6.5 和 pH 7.5,27 h 时发酵液中葡萄糖积累量最小为 2.05 g/L,且甘油单酯脂肪酶关于葡萄糖的得率最高。如图 3a,在 pH 6.5 条件下诱导时,细胞生长较缓慢,随着发酵时间的延长,发酵液中残糖量逐渐增加,27 h 时残糖量最高为 3.84 g/L,发酵 31 h 时 GMGL 酶活力达到 1298 U/mL。结果表明,不同诱导 pH 对细胞生长影响不大,但 pH 7.0 更有利于甘油单酯脂肪酶的合成。因此,研究诱导 pH 对重组蛋白的表达具有重要意义。

2.1.4 葡萄糖流加方式对重组大肠杆菌表达 GMGL 的影响

大肠杆菌在过量葡萄糖或缺氧的条件下会发生葡萄糖效应,积累大量有机酸而影响重组菌的生长和外源蛋白的高效表达^[23]。大肠杆菌高密度发酵中,葡萄糖的合理流加方式是关键的影响因素。分别研究了恒速流加补料、变速补料、指数补料和 pH-STAT 等 4 种方式对重组酶表达的影响。如图 4c,恒速流加条件下,细胞生长较快,发酵 19 h 时达到 116.75 g/L,由于诱导前期葡萄糖流加速度过快,细胞代谢过快丧失活力,19 h 后细胞衰老死亡。变速流加条件下,控制发酵液中葡萄糖残留含量低于 5 g/L,限制性地流加葡萄糖,随着发酵时间的延长,酶活力逐渐增加,31 h 时达到最高 1985 U/mL (图 4b),重组蛋白的表达量随发酵时间的变化见 4d,蛋白分子量与唐薇^[13]预测大小一致,约为 28 ku。指数流加条件下,4~19 h 细胞能按照恒定比生长速率 0.065 h^{-1} 生长,但由于发酵液中葡萄糖大量积累,19 h 后细胞大量死亡,发酵 31 h 时酶活达到 1255 U/mL。一般来说,细菌比生长速率高乙酸的比生成率就高,当重组菌的生长速率超过某个临界值便产生乙酸^[24],指数流加结果表明,降低该重组大肠杆菌的比生长速率有利于甘油单酯脂肪酶的合成。如图 4a, pH-STAT 流加条件下,发酵液中葡萄糖含量一直维持在较低水平,且细胞生长缓慢,可能碳源不足,发酵 31 h 酶活达到 1420 U/mL。大肠杆菌代

谢葡萄糖产生的有机酸会导致发酵液中 pH 的降低,pH 的下降在一定程度上反映了细胞对葡萄糖的需求,因此通过 pH 变化调节葡萄糖流加速率可以有效避免葡萄糖和乙酸的积累,但该方法的缺点就是 pH 的变化相对比较滞后,往往细胞已经处于饥饿状态^[25]。

2.2 重组甘油单酯脂肪酶 GMGL 的固定化

2.2.1 酶载量对 GMGL 固定化的影响

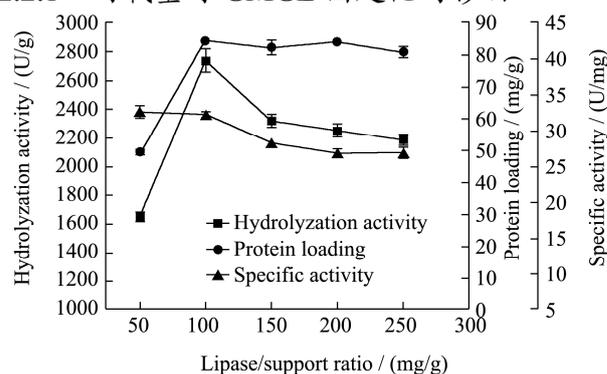


图 5 酶载量对 GMGL 固定化的影响

Fig.5 Effect of lipase/support ratio on the immobilization of GMGL

本实验探究了酶载量对 GMGL 固定化的影响,结果如图 5 所示,当酶载量小于 100 mg/g 时,蛋白吸附量随着酶载量的增加而增加;当酶载量为 100 mg/g 时,固定化 GMGL 活力最高为 2735 U/g,比活力为 32.35 U/mg,蛋白吸附量为 84.55 mg/g;当酶载量大于 100 mg/g 树脂时,蛋白吸附量不会随着酶载量的增加而增大而是逐渐趋于稳定的趋势,说明 ECR8285 树脂对 GMGL 的吸附量达到饱和状态。Li 等^[17]研究发现 ECR8285 树脂对 SMG1-F278N 的吸附量也存在一个饱和临界值,为 30 mg/g。以上结果表明树脂对酶的吸附都存在一个饱和临界值。酶加量超过这个临界值,在固定化过程中会造成酶原料的浪费,额外增加生产成本。因此,研究酶载量对 GMGL 固定化的影响,对实现固定化 GMGL 的低成本的工业化生产具有重要意义。

2.2.2 缓冲液离子强度对 GMGL 固定化的影响

离子强度影响酶在载体疏水表面的物理吸附。本实验探究了不同离子强度对固定化 GMGL 活力、比活力及蛋白吸附量的影响,结果如图 6 所示,在离子强度为 0.50 mol/L 时,酶活力达到 2925 U/g,比活力为 39.63 U/mg,蛋白吸附量为 73.79 mg/g,相比低离子强度条件下 (0.05 mol/L) 酶活力提高了 181.25%,这表明 GMGL 固定化最适的离子强度是 0.50 mol/L, Li 等^[17]通过提高盐离子强度使固定化 SMG1-F278N 的

酶活力提高了 275.00%。这些结果表明提高盐离子强度有助于固定化酶活力的提高。分析原因是高离子强度缓冲液有利于酶与载体的疏水表面发生吸附, 进一步有助于载体的环氧基团与酶的氨基或巯基发生反应, 形成非常稳定的共价键, 提高酶的有效吸附率^[26]。这一研究结果为后期环氧树脂做固定化材料提供合适的缓冲液离子强度参考值, 具有重要意义。

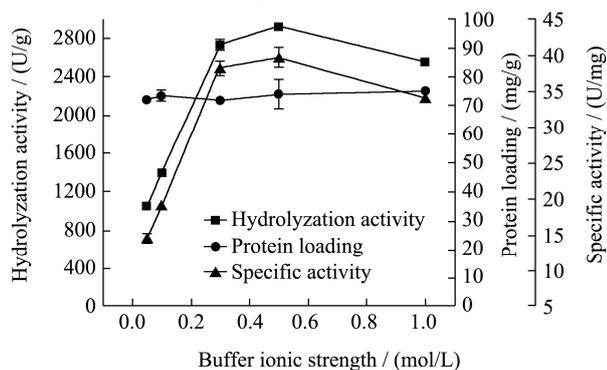


图 6 缓冲液离子强度对 GMGL 固定化的影响

Fig.6 Effect of buffer ionic strength on the immobilization of GMGL

GMGL

2.2.3 缓冲液 pH 对 GMGL 固定化的影响

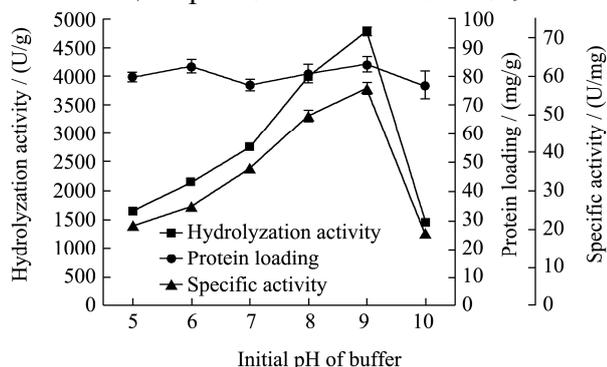


图 7 缓冲液 pH 对 GMGL 固定化的影响

Fig.7 Effect of initial pH of buffer on the immobilization of GMGL

缓冲液的 pH 值是影响固定化酶活力的关键因素, 因为它会影响酶的活性构象和结构^[17]。因此, 本实验探究了不同 pH 对 GMGL 固定化的影响, 结果如图 7 所示, GMGL 固定化最适缓冲液 pH 为 9, 固定化 GMGL 活力为 4770 U/g, 较 pH 5 提高了 189.09%。不同缓冲溶液 pH 值的蛋白吸附量几乎一致, 但比活力和酶活力都先增加后减小。这一结果与 Harris 等^[27,28]报道一致, 表明酶活性中心的解离基团随固定化体系 pH 值的变化而变化, 从而影响固定化酶的活性。因此, 选用酶载量为 100 mg/g、缓冲液离子强度为 0.50 M 和缓冲液 pH 为 9 的条件, 用于制备固定化 GMGL 的工艺, 为甘油单酯脂肪酶的固定化研究提供了理论依据。

2.3 固定化 GMGL 的表征

2.3.1 固定化 GMGL 的 SEM 表征和 FT-IR 表征

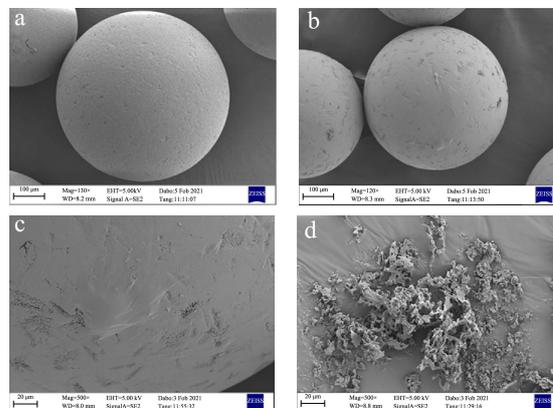


图 8 ECR8285 (a)、固定化 GMGL (b, c) 和游离 GMGL (d) 电镜图

Fig.8 Scanning electron micrographs of surface of resin

ECR8285 (a), immobilized GMGL (b,c) and free GMGL (d)

注: a: $\times 130$, b: $\times 120$, c, d: $\times 500$ 。

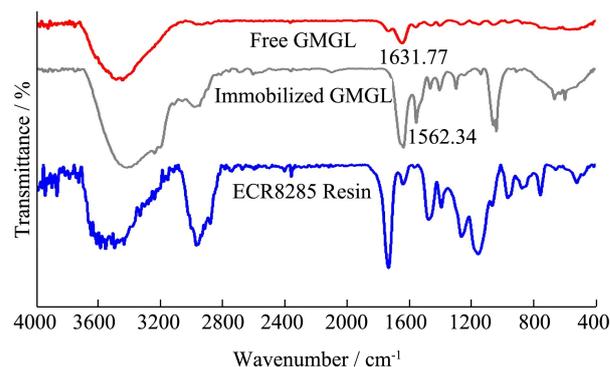


图 9 游离 GMGL、固定化 GMGL 和 ECR8285 树脂的 FT-IR 图谱

Fig.9 FT-IR spectra of free GMGL, immobilized GMGL and resin ECR8285

利用 SEM 对环氧树脂 ECR8285, 固定化 GMGL 及游离 GMGL 进行比较分析。由图 8 可见, 环氧树脂 ECR8285 表面较光滑, 而固定 GMGL 之后, 其表面有明显凸起附着物, 表明 GMGL 酶分子与环氧树脂 ECR8285 成功结合^[29,30]。进一步利用 FT-IR 进行表征分析 (图 9), 固定化 GMGL 和游离 GMGL 分别在 1562.34 cm^{-1} 和 1631.77 cm^{-1} 出现蛋白质特有的一级结构中-NH-键的吸收峰, 而在 ECR8285 树脂红外光谱中未发现-NH-键的吸收峰, 再次表明游离 GMGL 已成功固定在 ECR8285 树脂上。

3 结论

本研究在 5 L 发酵罐体系中探究了不同诱导时间、温度、pH 和葡萄糖补料方式对重组大肠杆菌生长和甘油单酯脂肪酶 GMGL 合成的影响。确定了最佳发

醇条件为重组大肠杆菌在 25 °C, pH 7.0, 对数生长后期进行诱导, 葡萄糖流加方式为变速流加, 优化后甘油单酯脂肪酶活力达到 1985 U/mL, 较优化前提高了 67.50%。通过共价结合的方式将 GMGL 固定到环氧树脂 ECR8285 上, 对 GMGL 进行固定化研究, 确定最佳固定化条件为酶载量为 100 mg/g, 磷酸盐缓冲液离子强度为 0.50 M, pH 为 9, 优化后固定化酶 GMGL 活力为 4770 U/g, 较优化前提高了 189.09%。利用扫描电镜 (SEM) 和傅里叶红外光谱 (FT-IR) 进行表征, 证实 GMGL 成功负载在 ECR8285 上。本研究首次将甘油单酯脂肪酶成功固定在 ECR8285 上, 丰富了固定化酶制剂种类, 优化结果也为甘油单酯脂肪酶固定化酶的工业化生产及应用提供了一种新策略。

参考文献

- [1] Goswami D, Basu J K, De S, et al. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2012, 33(1): 81-96
- [2] Hasan F, Shah A A, Hameed A, et al. Industrial applications of microbial lipases [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251
- [3] Yuce-Dursun B, Cigil A B, Dongez D, et al. Preparation and characterization of solgel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2016, 127: 18-25
- [4] Imamura S, Kitaura S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257 [J]. Journal of Biochemistry, 2000, 127(3): 419-425
- [5] Zheng P Y, Xu Y, Wang W F, et al. Production of diacylglycerol-mixture of regioisomers with high purity by two-step enzymatic reactions combined with molecular distillation [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2014, 91: 251-259
- [6] Sakiyama T, Yoshimi T, Miyake A, et al. Purification and characterization of a monoacyl-glycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(1): 27-32
- [7] 邹祺.单脂肪酸甘油酯的合成与应用[D].南京:南京理工大学,2006
ZOU Qi. Synthesis and application of mono-fatty acid glyceride [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2006
- [8] 刁明明.半乳糖基月桂酸甘油单酯的抑菌活性及机理的研究[D].南京:南京农业大学,2016
DIAO Ming-ming. Antibacterial activity and mechanism of monolauroyl-galactosylglycerol against bacterial [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016
- [9] Laura S, Daniele P, Marco M. Monoglyceride lipase: structure and inhibitors [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2016, 197: 13-24
- [10] Bertrand T, Auge F, Houtmann J, et al. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 396(3): 663-673
- [11] Riegler-Berket L, Leitmeier A, Aschauer P, et al. Identification of lipases with activity towards monoacylglycerol by criterion of conserved cap architectures [J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids, 2018, 1863(7): 679-687
- [12] Kim R J, Kim H J, Shim D, et al. Molecular and biochemical characterizations of the monoacylglycerol lipase gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2016, 85(6): 758-771
- [13] 唐薇.海洋地衣芽孢杆菌脂肪酶的酶学性质表征及催化机制研究[D].广州:华南理工大学,2019
TANG Wei. Characterization of enzymatic properties and catalyzation mechanism of lipase from *Geobacillus* sp. 12AMOR1 [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019
- [14] Yousefi, Maryam, Habibi, et al. Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil [J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 101(15): 23-31
- [15] Santos J C S D, Rodrigues R C, Garcia-Galan C. Improving the catalytic properties of immobilized lecithase via physical coating with ionic polymers [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 60: 1-8
- [16] Rodrigues R C, Berenguer M, Fernandez L R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes [J]. Advanced Synthesis and Catalysis, 2011, 353(13): 2216-2238
- [17] 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
- [18] Li X X, Liu P Z, Khan F L, et al. Substrate selectivity and optimization of immobilized SMG1-F278N lipase in synthesis of propylene glycol monooleate [J]. European

- Journal of Lipid Science and Technology, 2017, 119(5): 1600423
- [19] Liu N, Fu M, Wang Y, et al. Immobilization of lecithase ultra onto a novel polystyrene DA-201 resin: characterization and biochemical properties [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(5): 1108-1120
- [20] Sriubolmas N, Panbangred W, Sriurairatana S, et al. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47: 373-378
- [21] 丁兰宝.重组大肠杆菌高密度发酵研究[D].无锡:江南大学, 2012
DING Lan-bao. High cell-density cultivation of recombinant *Escherichia coli* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012
- [22] Ohta K, Shibui T, Morimoto Y, et al. High level production of human proapo A-I by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 75(2): 155-157
- [23] 李民,陈常庆,朴勤,等.利用恒溶氧-补料分批技术高密度培养大肠杆菌生产重组人骨形成蛋白-2A[J].生物工程学报, 1998,14(3):270-275
LI Min, CHEN Chang-qing, PU Qin, et al. Production of human recombinant bone morphogenetic protein-2A by high density culture of *Escherichia coli* with DO-stat fed-batch condition [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1998, 14(3): 270-275
- [24] Han K, Lim H C, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 39(6): 663-671
- [25] Son Y J, Phue J N, Trinh L B, et al. The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 1-9
- [26] Mihailovic M, Stojanovic M, Banjanac K, et al. Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite A109 and its post-immobilization stabilization [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(4): 637-646
- [27] Harris T K, Turner G J, Harris T K, et al. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites [J]. International Union of Biochemistry & Molecular Biology Life, 2002, 53(2): 85-98
- [28] Tang W, Lan D M, Zhao Z X, et al. A thermostable monoacylglycerol lipase from marine *Geobacillus* sp. 12AMOR1: biochemical characterization and mutagenesis study [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 780
- [29] 钟南京,林少燕,冯思婷,等.大孔树脂 NKA-9 负载 RML 催化高酸价油脂脱酸及制备甘油二酯[J].现代食品科技,2020, 36(8):147-152
ZHONG Nan-jing, LIN Shao-yan, FENG Si-ting, et al. Enzymatic deacidification of high-acid oil for diacylglycerol production using NKA-9 macroporous resin-supported *Rhizomucor miehei* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 147-152
- [30] 刘向前.CALB 的固定化及其催化合成富含 EPA/DHA 甘油三酯的研究[D].广州:华南理工大学,2017
LIU Xiang-qian. Immobilization of CALB and its application in synthesis of EPA/DHA -rich triglycerides [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
-
- (上接第 269 页)
- [35] 赵扬帆,郑宝东.植物多酚类物质及其功能学研究进展[J].福建轻纺,2006,11:107-110
ZHAO Yang-fan, ZHENG Bao-dong. Research progress of plant polyphenols and their functions [J]. The Light & Textile Industries of Fujian, 2006, 11: 107-110
- [36] 郭睿,杨玲,郭旭凯,等.糯高粱黄酒糖化工艺优化及抗氧化活性分析[J].中国酿造,2018,37(3):101-106
GUO Rui, YANG Ling, GUO Xu-kai, et al. Optimization of saccharification process of Chinese glutinous sorghum wine and its antioxidant activity analysis [J]. China Brewing, 2018, 37(3): 101-106