

生物工程

磁性磷脂酶 D 交联酶聚集体的制备及其酶学性质

石婷婷^{1,2}, 吴蓉^{1,2}, 杨猛^{1,2}, 苏二正^{1,2*}

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 以磁性 Fe_3O_4 为载体, 采用吸附-聚集-交联的方法固定来源于 *Streptomyces chromofuscus* 的磷脂酶 D (scPLD), 制备了磁性磷脂酶 D 交联酶聚集体 (MCLEA)。该方法制备的 MCLEA 酶活回收率可达 72.89%, 酶活为 (437.00 ± 6.60) U/g。与游离酶相比, MCLEA 在不同温度和 pH 下的稳定性都得到了一定程度的提升, 但由于与底物的亲和力降低, 需要更高浓度的磷脂酰胆碱 (PC) 和 Ca^{2+} 作为反应底物与 MCLEA 结合。乙醇、四氢呋喃、叔丁醇、乙酸乙酯、乙醚和甲苯对 MCLEA 的酶促反应具有促进作用, MCLEA 在进行连续 13 次酶促反应后, 酶活仍可保留在 76% 以上, 其半衰期为 331.67 min, 该固定化方案可以提高酶的稳定性, 从而提高其在催化反应过程中的重复利用性。

关键词: 磷脂酶 D; 吸附法; 固定化; 磁性磷脂酶 D 交联酶聚集体; 性能; 生物工程

中图分类号: Q814.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2023) 11-2463-09

Preparation and enzymatic properties of magnetic cross-linked phospholipase D aggregates

SHI Tingting^{1,2}, WU Rong^{1,2}, YANG Meng^{1,2}, SU Erzhen^{1,2*}

(1. Co-innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Magnetic cross-linked phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus* (scPLD) aggregates (MCLEA) were prepared by adsorption-aggregation-crosslinking with magnetic Fe_3O_4 as the carrier. The enzyme activity recovery of MCLEA was 72.89%, and the enzyme activity was (437.00 ± 6.60) U/g. Compared to free scPLD, the MCLEA showed better tolerance at different temperatures and pH levels. However, due to the reduced affinity of MCLEA with substrate, higher concentrations of phosphatidylcholine (PC) and Ca^{2+} as reaction substrates were required for binding with MCLEA. Furthermore, organic solvents such as ethanol, tetrahydrofuran, tert-butanol, ethyl acetate, ether, and toluene could improve the enzymatic reaction of MCLEA. After 13 cycles of continuous enzymatic reaction, the activity of MCLEA remained above 76%, with a half-life of 331.67 min. This immobilization scheme could enhance the stability of the enzyme and thus improve its reusability in the catalytic reaction process.

Key words: phospholipase D; adsorption method; immobilization; magnetic cross-linked phospholipase D aggregates; properties; biological engineering

磷脂酰丝氨酸 (PS) 又被称为丝氨酸磷脂, 是真核生物膜中最丰富的带负电荷的甘油磷脂。PS 是人体大脑神经细胞细胞膜的重要组成部分之一, 通常位于细胞膜内侧, 对大脑的各种功能起到重要的

调节作用。研究证明, PS 可以提高大脑认知能力, 改善记忆力^[1]、预防儿童多动症^[2]、缓解紧张压力和脑部疲劳^[3]。随着人们对健康越来越重视, PS 已受到广泛的关注。目前, 合成 PS 的方法主要包括提取

收稿日期: 2022-12-16; 定用日期: 2023-04-04; DOI: 10.13550/j.jxhg.20221153

基金项目: 江苏省第五期“333工程”培养资金资助项目 (BRA2017458)

作者简介: 石婷婷 (1998—), 女, 硕士生。联系人: 苏二正 (1976—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: ezhsu@njfu.edu.cn。

法和生物酶转化法。提取法主要是从植物细胞以及动物细胞中提取分离。植物细胞中 PS 含量低,提取、分离制备步骤复杂,成本高;牛脑细胞中 PS 含量较高,但考虑到疯牛病的隐患,此提取方法也很少使用。酶转化法是以卵磷脂和 L-丝氨酸为底物,经磷脂酶 D (PLD) 催化转磷脂酰作用生成 PS。相较而言,生物酶法由于工艺绿色、副产物少等突出优势,成为目前 PS 合成中最安全高效的方法。

催化合成 PS 的 PLD 形式主要有游离酶和固定化酶两种。游离酶稳定性差、不能重复使用,催化反应后 PLD 不易与产品分离,增加了生物酶法工艺的酶制剂成本和分离成本。因此,制备廉价、稳定、易回收和高活性的 PLD 固定化酶对 PS 的合成有重要意义。TAKAMI 等^[4]运用阳离子交换树脂固定 PLD,虽然固定化的 PLD 稳定性较好,但是固定化酶活回收率、酶活均较低。OGINO 等^[5]利用生物质载体颗粒直接固定链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 细胞,实现连续产生 PLD,产率只能达到 1.5 U/mL,产率较低。LI 等^[6]购买商品化的 PLD,运用 SiO₂ 作为载体,固定化后的 PLD 具有较高的酶活,但是整个过程步骤较复杂、固定化成本高,且载体粒径较小,不利于固定化酶的回收。

本课题组前期在大肠杆菌中克隆、表达了 *Streptomyces chromofuscus* 来源的 PLD (scPLD),并通过培养基、培养条件的系统优化实现了 scPLD 的高水平发酵制备^[7]。本研究在前期研究的基础上,采用吸附-聚集-交联的方法尝试制备易回收的磁性磷脂酶 D 交联酶聚集体 (MCLEA),并对其最适温度及热稳定性、最适 pH 及 pH 稳定性、最适底物浓度、最适 Ca²⁺浓度、有机溶剂耐受性和连续酶促反应的稳定性等性质进行研究,以期制备易回收、性质稳定和高活性的 scPLD 固定化酶。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

工程菌株 pET28a+scPLD/BL21(DE3),由本实验室重组构建获得^[7];磷脂酰胆碱 (PC) (分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胆碱氧化酶 (分析纯),美国 Sigma-Aldrich 公司;辣根过氧化物酶 (分析纯),生工生物工程 (上海) 股份有限公司;戊二醛、FeCl₃·6H₂O (分析纯),国药集团化学试剂上海有限公司。其他试剂、药品均为市售分析纯。

VERTEX 80V 型红外光谱仪,德国 Bruker 公司;JSM-7600F 型扫描电子显微镜,日本电子株式会社。

1.2 游离酶液及纳米 Fe₃O₄ 的制备

1.2.1 scPLD 游离酶液的制备

参考本实验室前期工作^[7],将重组菌 pET28a+scPLD/BL21(DE3)按照体积分数 1% 的接种量接种至发酵培养基 (质量分数 0.7% 山梨醇、质量分数 0.3% 淀粉、质量分数 1.0% 鱼蛋白胨、质量分数 4.0% 安琪酵母、17 mmol/L KH₂PO₄ 和 72 mmol/L K₂HPO₄) 中培养 32 h 后,发酵液于 4 °C、8000 r/min 离心 10 min 收集菌体。取菌体 (相当于 5 mL 发酵液离心所得的菌体) 加入 15 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 进行超声破碎 (超声条件: 300 W 功率下,工作 3 s,间隔 5 s 为一个循环,超声 10 min),然后在 4 °C、8000 r/min 离心 10 min 后,收集上清液置于干净的离心管中,即为 scPLD 游离酶液。

1.2.2 纳米级 Fe₃O₄ 载体的制备

参考 RANJBAKHSR 等^[8]的方法并作适当调整。取 2.5 g FeCl₂·4H₂O 和 6.8 g FeCl₃·6H₂O 加入 200 mL 去离子水,加热到 60 °C 后加入体积分数为 25% 的氨水,剧烈搅拌 1 h。通过磁铁进行吸附沉降,将上清液倒去,沉淀用去离子水浸没反复洗涤 3 遍,然后加入 200 mL 去离子水,放置于超声波清洗机中,设置功率为 100 W,超声 1 h。用磁铁进行沉降,将固体用称量勺取出放置于干净烧杯中置于 60 °C 烘箱内干燥 3 h,取出反复研磨后,收集纳米级 Fe₃O₄ 载体,常温放置在干燥器中,备用。

1.3 MCLEA 的制备

取一定量的磁性 Fe₃O₄ 载体,加入 scPLD 游离酶液 (1.2.1 节) 中,在 4 °C、200 r/min 下振荡 2 h,缓慢加入于 4 °C 预冷的沉淀剂异丙醇中,冰浴 20 min。直接向该沉淀体系中加入体积分数 0.01% 的戊二醛,将整个体系放置在 4 °C 的环境下,200 r/min 振荡 80 min。然后,通过磁铁使得 MCLEA 沉降,移去上清液,用等体积 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 反复洗涤 3 次。最后用磁铁收集 MCLEA。

1.4 MCLEA 的制备条件优化

1.4.1 酶活和蛋白含量的测定

scPLD 酶活测定: 参照酶联显色法^[9]并作了部分修改。取底物溶液 100 μL (含有 1 g/L PC、10 mmol/L CaCl₂ 和体积分数为 0.1% 的曲拉通) 与 50 μL 的 scPLD 酶液混合,然后在 37 °C 水浴锅中反应 5 min。待反应结束后,加入 20 μL 的反应终止液 [0.37224 g EDTA-2Na 溶于 10 mL 的 1.0 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)],沸水浴 5 min; 待冷却至室温后,分别加入 10 μL 的显色液 [75 mg 苯酚、62.5 mg 4-氨基安替比啉溶于 50 mL 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)] 和 10 μL 的显色酶液 [12.5 U 的胆碱氧化酶和 10 U 的辣根过氧化物酶溶于 1 mL

的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中, 分装后放于 -80 °C 保存]; 混匀后, 在 37 °C 下显色 2 h。显色结束后, 在 505 nm 处测定其吸光度。同时, 以不同浓度的氯化胆碱溶液为标准品建立标准曲线。酶活的定义为每分钟水解释放 1 μmol 氯化胆碱所需要的酶量为 1 个酶活单位。氯化胆碱溶液的标准曲线方程为: $y=3.9011x+0.0201$ ($0.05<x<0.3$), $R^2=0.9997$, 在 0.05~0.3 mmol/L 浓度范围内的线性关系较好, 说明该方程可以用于酶活的定量分析。

蛋白含量的测定: 以牛血清白蛋白为标准, 采用 Bradford 法测定蛋白含量^[10]。

根据 MCLEA 酶活及蛋白含量相关结果, 按照公式 (1)、(2) 计算酶活回收率和蛋白回收率:

$$\text{酶活回收率}/\% = \text{MCLEA 总酶活}/\text{投入总酶活} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{蛋白回收率}/\% = (\text{投入总蛋白浓度} - \text{固定化后上清中蛋白浓度}) / \text{投入总蛋白浓度} \times 100 \quad (2)$$

1.4.2 沉淀剂体积分数的筛选

研究不同的沉淀剂 (甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙酮、叔丁醇) 对 scPLD 的沉淀效果以及残余酶活的影响。在 4 °C 预冷的沉淀剂中缓慢滴入 100 μL scPLD 游离酶液, 边滴边轻微振荡, 使沉淀剂最终体积分数达到 90%, 最终溶液总体积为 1 mL。随后冰浴 20 min, 离心收集上清液于干净离心管中, 沉淀置于干净烧杯中, 取上清液测定未沉淀蛋白含量 (具体方法见 1.4.1 节), 将沉淀复溶于 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中测定残余酶活 (具体方法见 1.4.1 节)。

1.4.3 沉淀剂体积分数的优化

选择最优沉淀剂异丙醇, 研究其不同浓度对 scPLD 的沉淀效果。取不同体积的 scPLD 游离酶液, 缓慢滴入于 4 °C 预冷的异丙醇中, 使异丙醇体积分数分别为 55%~90% (体积分数间隔为 5%), 最终溶液总体积为 1 mL。其余操作同 1.4.2 节。

1.4.4 Fe_3O_4 投入量的优化

分别称取 20~60 mg 纳米级 Fe_3O_4 载体加入到不同体积的 scPLD 游离酶液中, 25 °C、200 r/min 气浴振荡 1 h。然后加入体积分数为 80% 的异丙醇溶液, 冰浴 20 min。随后将固定化酶用磁铁沉降, 分别收集沉淀和上清液 (上清液直接倒在干净离心管中保存, 沉淀用称量勺取出置于干净烧杯中), 将沉淀 (固定化酶) 用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 浸没反复洗涤 3 次, 测定上清液和洗涤液中的蛋白含量以及固定化酶的酶活 (具体方法见 1.4.1 节)。

1.4.5 交联剂浓度的优化

选用固定化效率高且可以很大程度保留酶活性的戊二醛作为交联剂。在沉淀体系 (见 1.3 节) 中添加戊二醛, 使戊二醛最终体积分数分别为 0.005%、

0.01%、0.05%、0.1%、0.2%, 在 4 °C、200 r/min 振荡交联 1 h。分别收集沉淀的 MCLEA 和上清液, 将沉淀用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 浸没反复洗涤 3 次, 测定上清液和洗涤液中的蛋白含量, 同时测定固定化酶的酶活, 计算固定化酶活回收率 (具体方法见 1.4.1 节)。

1.4.6 交联时间的优化

根据 1.4.5 节得到交联剂戊二醛最优的体积分数, 在沉淀体系 (见 1.3 节) 中添加体积分数为 0.01% 的戊二醛后, 在 4 °C、200 r/min 下分别振荡交联 20~100 min。测定不同交联时间 (20、40、60、80、100 min) 对 MCLEA 酶活回收率和蛋白回收率的影响, 分别收集沉淀的 MCLEA 和上清液。将沉淀用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 浸没反复冲洗 3 次, 测定上清液和洗涤液中的蛋白含量, 同时测定固定化酶的酶活, 计算固定化酶酶活回收率。

1.5 游离酶及 MCLEA 性质研究

1.5.1 最适温度和热稳定性

最适温度: 在 27、32、37、42、47、52、57、62、67 °C 下测定游离酶和 MCLEA 的酶活。

热稳定性: 在不同温度下 (25、30、37、45、55、65 °C) 将游离酶和 MCLEA 孵育 0.5、1、2、3、4、5、6 h。测定每个时间点的酶活 (具体方法见 1.4.1 节) 并将每组实验中最高的酶活设定为 100%, 计算不同条件下的相对酶活 (%)。

1.5.2 最适 pH 和 pH 稳定性

最适 pH: 在不同 pH (7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5) Tris-HCl 缓冲液中测定游离酶和 MCLEA 酶活, 比较不同 pH 下的酶活。

pH 稳定性: 在不同 pH (5.0、7.0、8.5、9.0、10.0) Tris-HCl 缓冲液中将游离酶和 MCLEA 分别孵育 0.5、1、2、3、4、5、6 h。测定每个时间点的酶活并将每组实验中最高的酶活设定为 100%, 计算不同条件下的相对酶活 (%)。

1.5.3 最适底物浓度和米氏常数 (K_m)

底物浓度会对酶促反应速率产生影响, 随着底物浓度升高酶促反应速率也会越快, 为了研究游离酶和 MCLEA 在水相的最适底物浓度, 配制含有 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 g/L PC 的底物溶液, 在 37 °C、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中测定不同底物浓度下游离酶和 MCLEA 的酶活, 将每组最高酶活定为 100%, 计算不同底物浓度下的相对酶活 (%), 比较得出最适底物浓度。同时通过米氏方程 ($v = \frac{V_{\max}c}{K_m + c}$, 其中, v 为酶反应速度, $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; V_{\max} 为酶被底物饱和时的反应速度, $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; c 为底物浓度, mol/L ; K_m 为米氏

常数, mol/L) 来比较游离酶和 MCLEA 在水相中酶促最大反应速率达到一半时所需的底物浓度及 K_m 值。

1.5.4 Ca^{2+} 的影响

PLD 的催化活性需要 Ca^{2+} 作为辅因子^[11]。测定在不同 Ca^{2+} 浓度 (0、2.5、7.5、10、20 和 30 mmol/L) 下游离酶和 MCLEA 的酶活, 将每组最高酶活设为 100%, 计算不同条件下的相对酶活 (%)。

1.5.5 有机溶剂的影响

选取 $\log P$ (油水分配系数) 为 -1.3~3.5 的 14 种有机溶剂 (二甲基亚砜、甲醇、乙腈、乙醇、四氢呋喃、叔丁醇、乙酸乙酯、乙醚、正戊醇、氯仿、甲苯、正辛醇、石油醚和正己烷), 将游离酶和 MCLEA 分别在体积分数为 25%、50% 和 75% 的有机溶剂中混合, 25 °C、200 r/min 振荡孵育 2 h。将未加有机溶剂组确定为对照组, 酶活设为 100%, 计算不同条件下的相对酶活 (%)。

1.5.6 重复使用性及半衰期

在 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L 反应底物 (含有 1 g/L PC、10 mmol/L $CaCl_2$ 和体积分数为 0.1% 的曲拉通), 加入 50 mg MCLEA, 37 °C 振荡反应 10 min, 重复上述步骤多次 (13 次) 反应。每一次反应结束后, 用磁铁对 MCLEA 进行回收。对每一次收集的 MCLEA 测定酶活, 设定第一批酶活为 100%, 计算不同批次下的相对酶活 (%)。MCLEA 酶活半衰期按照 DINÇER 等^[12]报道的方法计算。

2 结果与讨论

2.1 MCLEA 的制备

2.1.1 沉淀剂的筛选

亲水的有机溶剂可以降低水中蛋白的溶解性, 从而使得蛋白析出, 但在使用的同时会损失酶活^[13], 因此选择适合的沉淀剂对后续保持较好的酶活回收率有重要意义。不同沉淀剂对 scPLD 沉淀效果影响见图 1A。如图 1A 所示, 叔丁醇为沉淀时蛋白回收率最低, 为 $68.25\% \pm 2.15\%$; 甲醇、乙醇、异丙醇和丙酮为沉淀时的蛋白回收率在同一水平, 都在 100% 附近。从酶活回收率来看, 乙醇作为沉淀剂时对酶活影响最大, 残余酶活只有 $67.00\% \pm 3.22\%$, 而异丙醇为沉淀时对酶活影响最低, 残余酶活为 $88.00\% \pm 1.99\%$ 。综合考虑, 选择异丙醇作为最佳沉淀剂进行下一步研究。

2.1.2 沉淀剂体积分数对 scPLD 沉淀效果的影响

以 scPLD 的沉淀效果和残余酶活为指标, 考察异丙醇体积分数对 scPLD 沉淀效果的影响, 结果见图 1B。如图 1B 所示, 随着异丙醇体积分数的增加, 蛋白回收率也随之增加, 当异丙醇体积分数达到

80% 时, 蛋白完全沉淀。残余酶活也随着异丙醇体积分数增加而增加, 但当体积分数高于 80%, 酶活呈现下降的趋势, 可能是沉淀剂体积分数过高时会对 scPLD 产生毒害作用。BRADFORD 课题组^[10]在使用乙醇对商品化的 PLD 进行沉淀时, 也得到相同结果。因此, 将异丙醇的体积分数确定为 80%。

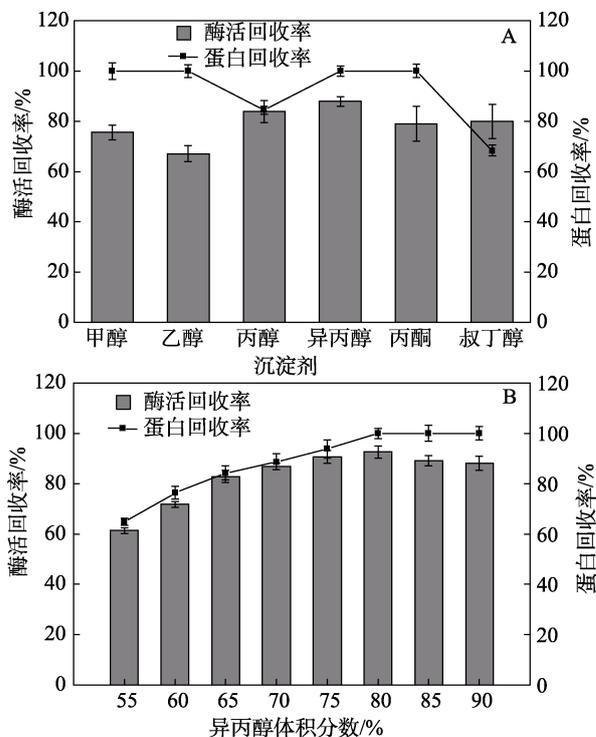


图 1 不同沉淀剂 (A) 及不同体积分数异丙醇 (B) 对 scPLD 沉淀效果的影响

Fig. 1 Effect of different precipitants (A) and different volume fraction of isopropanol (B) on precipitation effect of scPLD

2.1.3 Fe_3O_4 投入量对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响

以体积分数为 80% 的异丙醇为最佳沉淀剂, 继续优化 Fe_3O_4 的投入量对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 随 Fe_3O_4 投入量的增加, 蛋白回收率先增加后降低, 磁性固定化 scPLD 的酶活回收率也呈现先增加后降低的趋势, 在 $m(Fe_3O_4) : m(scPLD) = 5 : 1$ 时, 酶活回收率最高, 此时, 固定化酶活为 $(342.00 \pm 6.0) U/g$ 。 Fe_3O_4 投入量较少时, scPLD 没有足够的载体可以结合, 无法形成具有磁性的固定化酶, 导致在被 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 反复冲洗时, 未结合 Fe_3O_4 颗粒的酶蛋白会被复溶。此时增加 Fe_3O_4 的投入量, 蛋白回收率和酶活回收率都会增加。而当 Fe_3O_4 投入量过多时, 酶蛋白可以被充分固定, 但单位质量载体固定的酶蛋白较少。同时载体过多还会阻碍酶与底物之间的有效接触,

从而导致固定化后 scPLD 的活性降低。因此, 选择 $m(\text{Fe}_3\text{O}_4) : m(\text{scPLD}) = 5 : 1$ 来固定化 scPLD。

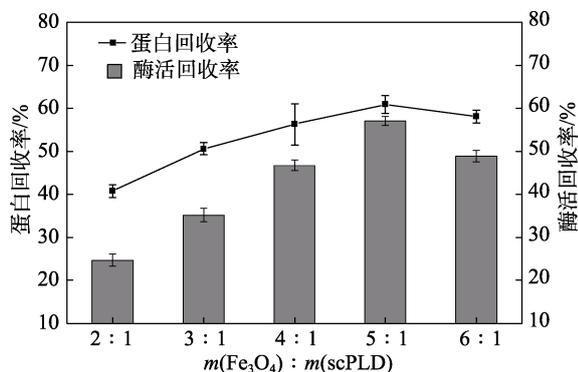


图 2 Fe_3O_4 载体与 scPLD 质量比对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响

Fig. 2 Effects of mass ratio of Fe_3O_4 carrier to scPLD on enzyme activity recovery and protein recovery of immobilized scPLD

2.1.4 戊二醛浓度对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响

按照 1.4.5 节研究不同体积分数的戊二醛对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响, 结果见图 3A。如图 3A 所示, 随着戊二醛体积分数的增加, 蛋白回收率和固定化酶活都呈先上升后下降的趋势。这可能是由于低体积分数的戊二醛不能交联固定所有蛋白, 而过高体积分数的戊二醛会改变酶的四级结构^[14], 影响酶活。此外, 也有研究表明, 戊二醛是一种酶蛋白失活剂, 它可以渗透到蛋白活性位点, 与必需氨基酸残基发生催化反应, 最终导致酶活性损失^[15]。因此, 确定交联剂戊二醛最佳体积分数为 0.01%。

2.1.5 交联时间对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响

戊二醛作为一种酶蛋白失活剂, 它可以使酶活性受到损害, 在确定了戊二醛体积分数为 0.01% 后, 按照 1.4.6 节实验方法考察了交联时间对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响, 结果见图 3B。如图 3B 所示, 酶活回收率随交联时间的增加而先增加, 在交联时间达到 80 min 时, 固定化酶活达到最大, 为 $(437.00 \pm 6.60) \text{ U/g}$, 此时, 酶活回收率达到 72.89%, 继续增加交联时间, 酶活回收率骤然下降。另外, 蛋白回收率则随着交联时间增加而增加, 在 80 min 时蛋白几乎完全被交联固定。因此, 选择最佳交联时间为 80 min。

通过上述条件优化, 确定了制备 MCLEA 过程中的最优条件为: 选择体积分数为 80% 的异丙醇作为沉淀剂, $m(\text{Fe}_3\text{O}_4) : m(\text{scPLD}) = 5 : 1$, 体积分数为

0.01% 的戊二醛作为交联剂交联 80 min。

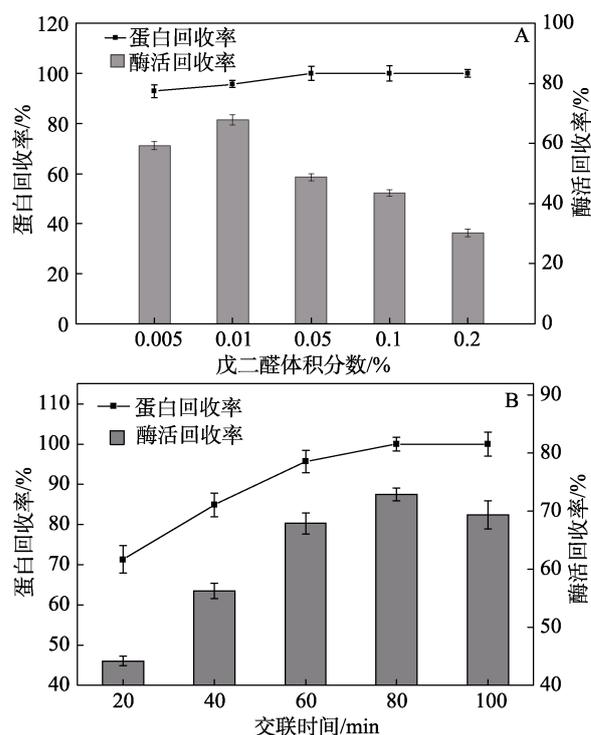


图 3 戊二醛体积分数 (A) 和交联时间 (B) 对固定化 scPLD 酶活回收率和蛋白回收率的影响

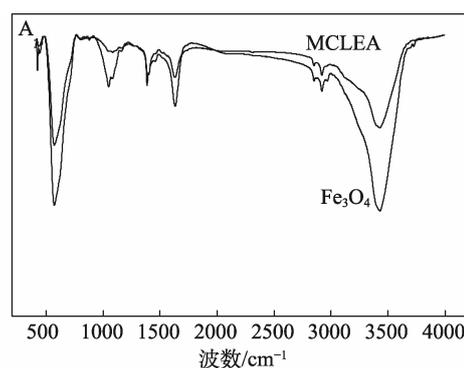
Fig. 3 Effects of glutaraldehyde volume fraction (A) and cross-linking time (B) on enzyme activity recovery and protein recovery of immobilized scPLD

2.2 MCLEA 的性质研究

2.2.1 MCLEA 的表征

Fe_3O_4 载体和 MCLEA 的 FTIR 谱图见图 4A。

由于 $=\text{CH}$ 键、 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 键、 $\text{O}=\text{C}-\text{NH}$ 肽键、 NH 和 OH 键的存在, 这些键的 FTIR 谱图分别会在 $500\sim 700$ 、 1050 、 1630 、 $3000\sim 3800 \text{ cm}^{-1}$ 处出现吸收峰。通过比较 MCLEA 和 Fe_3O_4 的 FTIR 谱图发现, MCLEA 在 $500\sim 700$ 、 1050 、 1630 、 $3000\sim 3800 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰波数都比 Fe_3O_4 大 (Fe_3O_4 载体在 1630 cm^{-1} 处的微弱吸收可能是制备过程中的微量蛋白污染造成), 说明 scPLD 成功与 Fe_3O_4 结合, 制得了 MCLEA。



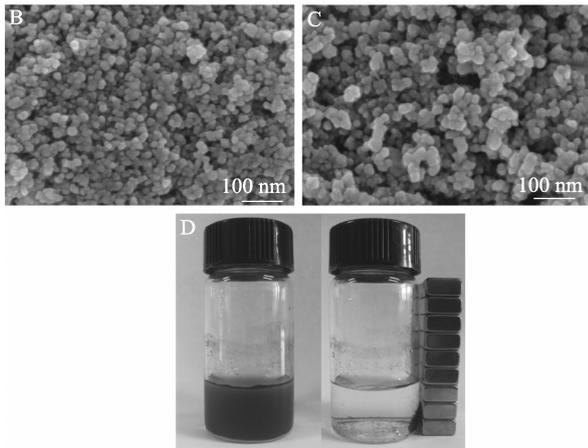


图 4 MCLEA 和 Fe_3O_4 的表征: FTIR 谱图 (A); Fe_3O_4 的 SEM 图 (B); MCLEA 的 SEM 图 (C); MCLEA 的磁场分离照片 (D)

Fig. 4 Characteristics of MCLEA and Fe_3O_4 : FTIR spectra (A); SEM image of Fe_3O_4 (B); SEM image of MCLEA (C); Magnetic field separation photo of MCLEA (D)

2.2.2 最适温度和热稳定性

在低温条件 (25~50 °C) 下酶活随着温度升高而增加, 但随着温度越来越高会使酶变性, 从而使酶活下降^[16]。不同温度对游离酶和 MCLEA 活力的影响见图 5A。如图 5A 所示, 游离酶的最适温度是 57 °C, MCLEA 的最适温度为 62 °C, 略高于游离酶。这可能是 Fe_3O_4 的投入和交联, 改变了 scPLD 的空间结构, 增加了分子刚性, 使得固定化后的 scPLD 的最适温度增加。

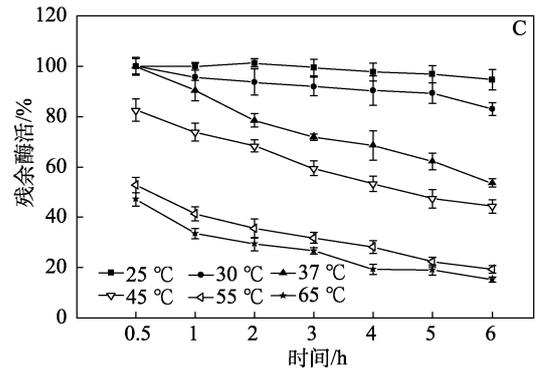
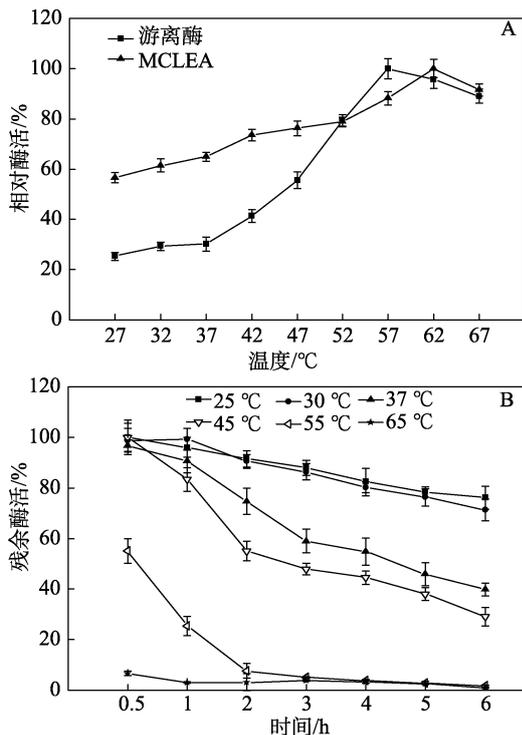


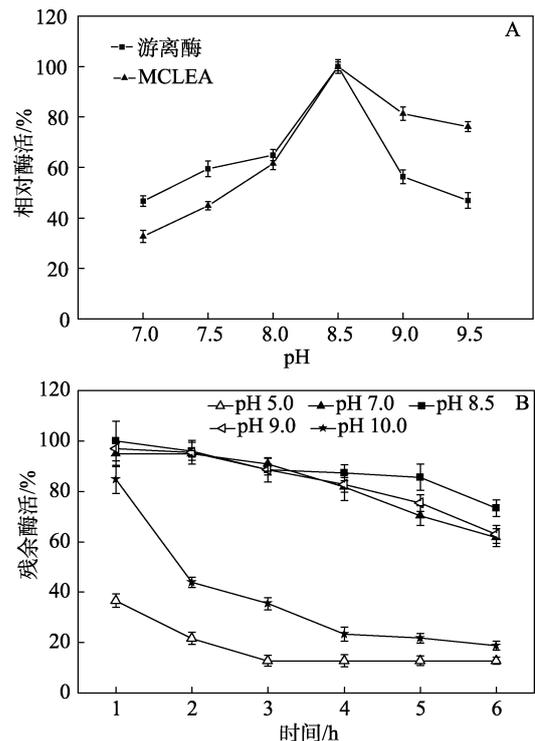
图 5 游离酶和 MCLEA 的最适温度 (A); 游离酶的热稳定性 (B); MCLEA 的热稳定性 (C)

Fig. 5 Optimum temperature for free scPLD and MCLEA (A); Thermal stability of free scPLD (B); Thermal stability of MCLEA (C)

游离酶和 MCLEA 的热稳定性如图 5B、C 所示。与游离酶相比, 固定化后的 scPLD 在 25~65 °C 的温度范围内的稳定性得到不同程度的提高。尤其是在高温环境下, 游离酶在 65 °C 下孵育 6 h 后几乎测不到酶活, 而 MCLEA 的残余酶活还可以达到 15% 以上。推测是由于磁性 Fe_3O_4 颗粒作为载体吸附固定化以及使用戊二醛交联过程中增加了 scPLD 酶分子的刚性。此外, 共价键的形成降低了固定化酶结构的灵活性, 从而使 MCLEA 表现出更高的热稳定性^[17]。

2.2.3 最适 pH 和 pH 稳定性

在 37 °C 下, 测定游离酶和 MCLEA 在 7.0~9.5 的 pH 范围内的最适 pH, 结果见图 6A。



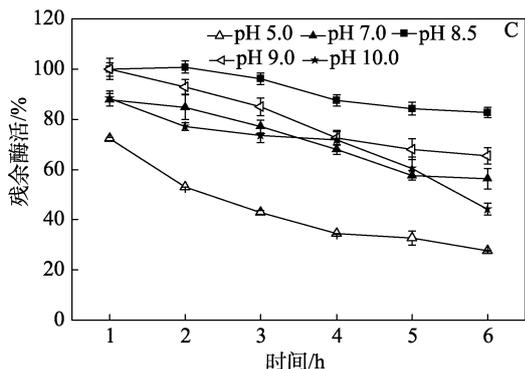


图 6 pH 对游离酶和 MCLEA 的影响: 最适 pH (A); 游离酶的 pH 稳定性 (B); MCLEA 的 pH 稳定性 (C)
Fig. 6 Effect of pH on free scPLD and MCLEA: Optimum pH (A); pH stability of free scPLD (B); pH stability of MCLEA (C)

如图 6A 所示, 游离酶和 MCLEA 的酶活随着 pH 的升高而升高, 在 pH 为 8.5 时达到最大值。当 pH 继续增大时, 不论是游离酶还是 MCLEA 的酶活都受到不同程度的损失。

游离酶和 MCLEA 在不同 pH 下的稳定性如图 6B、C 所示。在不同 pH 下, MCLEA 稳定性均有所提高, 这一结果和 XIE 等^[18]以 Fe_3O_4 为载体得到的固定化脂肪酶类似。在 pH 为酸性时, 游离酶和 MCLEA 酶活皆损失较多, 但 MCLEA 的酶活仍可以保留在 20% 以上。在 pH 为中性和弱碱性时, 二者酶活损失都较少, 其中, MCLEA 的残余酶活更高, 特别在最适 pH 8.5 的缓冲液中, 酶活可达到 90%。当 pH 为强碱性时 (pH 10), 与游离酶相比, MCLEA 的 pH 稳定性得到较大提升, 在孵育 6 h 后残余酶活依然达到 50% 以上, 此时游离酶酶活只有 20% 左右。

2.2.4 最适底物浓度和 K_m 值

酶的固定化通常会致酶的活性中心不易暴露, 降低其与底物的接触^[19]。为此, 按照 1.5.3 节方法进一步考察了底物浓度对游离酶活性和 MCLEA 活力的影响, 结果见图 7A。如图 7A 所示, MCLEA 需要更高的 PC 浓度才能达到与游离酶相同的相对酶活。这可能是固定化后酶与底物之间的传质阻力增加所致。

配制不同浓度 (0.025、0.0625、0.075、0.250、0.375、0.500 mol/L) 的底物溶液, 测定游离酶与 MCLEA 的酶活, 以及不同底物浓度下游离酶与 MCLEA 的反应初速度 (反应底物消耗 5% 以内时的反应速率)。因用米氏曲线作图所得 V_{\max} 为近似值, 所得的 K_m 为近似值不够准确, 所以为了更精确的获得 K_m 值, 以底物浓度的倒数作横坐标, 反应初速度的倒数作为纵坐标制作 $1/V-1/c$ 双倒数图, 如图 7B、

C 所示 [c 为底物浓度, mol/L; V 为反应初速度, $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]。根据拟合方程计算游离酶和 MCLEA 的 K_m 值与最大反应速率 V_{\max} 分别为: 0.30396 mol/L、9.9009 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 和 0.36504 mol/L、1.8932 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。从上述数据可得出和游离酶相比, MCLEA 的 V_{\max} 降低, K_m 升高, 推测 scPLD 被固定化后空间结构发生变化, 与底物的亲和性变弱。

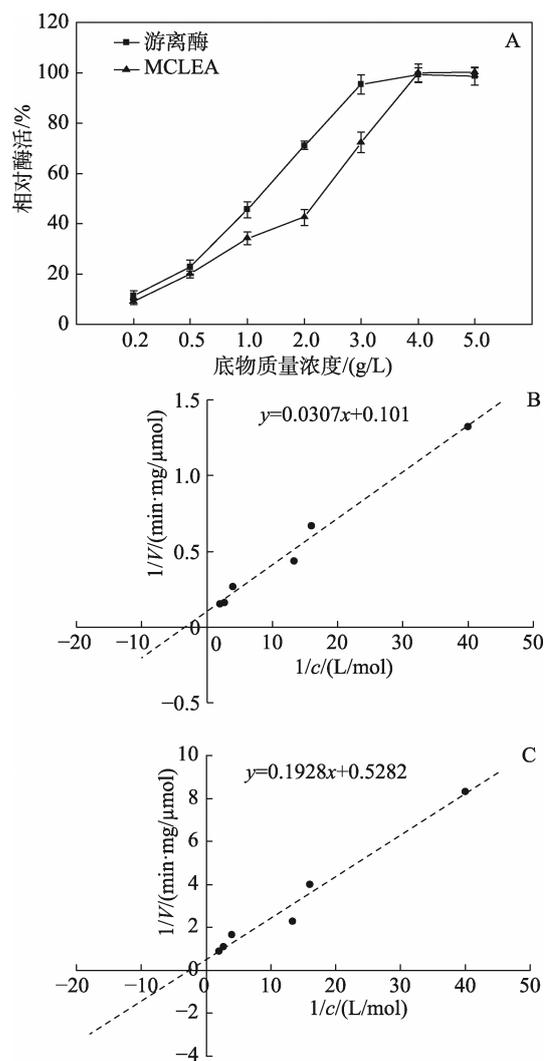


图 7 游离酶和 MCLEA 的动力学表征: 底物质量浓度影响 (A); 游离酶的双倒数作图 (B); MCLEA 的双倒数图 (C)

Fig. 7 Kinetic characterization of free scPLD and MCLEA: Effect of substrate concentration (A); Lineweaver-Burk plot of free scPLD (B); Lineweaver-Burk plot of MCLEA (C)

2.2.5 Ca^{2+} 对游离酶和 MCLEA 活力的影响

Ca^{2+} 能够与 PLD 的活性中心结合, 改变 PLD 的空间结构, 增强酶与底物之间的结合, 促进形成具有催化活性的中间酶-底物复合物^[20]。 Ca^{2+} 对游离酶和 MCLEA 活力的影响见图 8A。

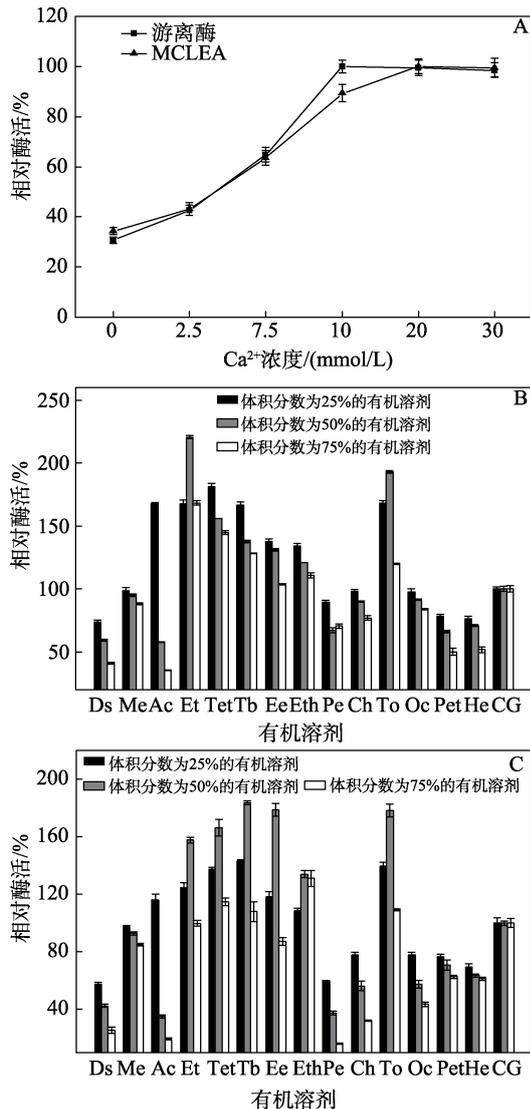


图 8 Ca²⁺和有机溶剂对游离酶和 MCLEA 酶活的影响: Ca²⁺浓度的影响 (A); 有机溶剂对游离酶的影响 (B); 有机溶剂对 MCLEA 的影响 (C)

Fig. 8 Effects of Ca²⁺ and organic solvents on activities of free scPLD and MCLEA: Effect of Ca²⁺ concentration (A); Effect of organic solvents on free scPLD (B); Effect of organic solvents on MCLEA (C)

如图 8A 所示, 游离酶和 MCLEA 的酶活随着 Ca²⁺浓度的增加而升高, 游离酶的最适 Ca²⁺浓度为 10 mmol/L, MCLEA 的最适 Ca²⁺浓度为 20 mmol/L。酶被固定化后空间结构发生变化, 且与底物的亲和性降低^[21], 致使催化反应中需要更高浓度的 Ca²⁺。

2.2.6 有机溶剂对游离酶和 MCLEA 活力的影响

具有不同疏水性的有机溶剂能够使底物和酶在发生酶促反应界面上的堆积密度不同^[22]; 具有不同极性的有机溶剂会影响酶蛋白空间结构, 对催化活性有不同程度的影响。有机溶剂对游离酶和 MCLEA 活力的影响见图 8B、C。

图 8B、C 中对应有机溶剂分别为二甲基亚砜 (Ds)、甲醇 (Me)、乙腈 (Ac)、乙醇 (Et)、四氢

呋喃 (Tet)、叔丁醇 (Tb)、乙酸乙酯 (Ee)、乙醚 (Eth)、戊醇 (Pe)、氯仿 (Ch)、甲苯 (To)、辛醇 (Oc)、石油醚 (Pet)、正己烷 (He)、对照 (CG)。如图 8B、C 所示, 对游离酶和 MCLEA 的酶活具有失活作用的有机溶剂为: 二甲基亚砜、甲醇、戊醇、氯仿、辛醇、石油醚和正己烷 7 种有机溶剂, 并且随着有机溶剂体积分数的增加, 对酶的毒害作用越大。对游离酶和 MCLEA 的酶活具有激活作用的有机溶剂为: 乙醇、四氢呋喃、叔丁醇、乙酸乙酯、乙醚和甲苯 6 种有机溶剂。这 6 种有机溶剂对 MCLEA 的激活作用要略弱于对游离酶的促进作用。可能是 scPLD 被固定化后, 空间结构发生改变, 导致与底物之间的亲和力降低, 需要更高浓度的有机溶剂才能最大程度的发挥其激活作用。基于这些结论, 在合成 PS 的过程中, 可以将 PC 溶解在乙醇、四氢呋喃、叔丁醇、乙酸乙酯、乙醚和甲苯等有机溶剂中, 与含有 scPLD 的 L-丝氨酸溶液按照合适的比例混合, 最大化增加酶与底物之间的亲和能力, 实现 PS 的高效合成。

2.2.7 重复使用性及半衰期

本研究使用磁性的 Fe₃O₄ 将 scPLD 固定化, 通过外加磁场, 实现 MCLEA 的分离回收。考察了 MCLEA 的重复使用, 当 MCLEA 被重复使用 13 次后, 其酶活仍可保持在 76% 以上, 根据半衰期计算公式^[12], 计算出 MCLEA 的半衰期为 331.67 min。与近几年使用其他方法制备的 PLD 固定化酶进行综合比较^[23-27]可知, 本研究固定化后的 scPLD 的稳定性较强, 酶活力损失较小且成本低, 具有工业应用前景。

3 结论

(1) 选择具有磁性的 Fe₃O₄ 为固定化载体, 在最佳固定化条件下 [体积分数为 80% 的异丙醇作为沉淀剂, m(Fe₃O₄) : m(scPLD)=5 : 1, 体积分数为 0.01% 的戊二醛作为交联剂, 交联 80 min] 固定化 scPLD, 得到的 MCLEA 的酶活回收率为 72.89%, 酶活为 (437.00±6.60) U/g。

(2) MCLEA 与游离酶相比具有更优的热稳定性和 pH 稳定性, 但由于对底物的亲和力降低, MCLEA 需要更高浓度的 PC 和 Ca²⁺ 作为反应底物。同时还发现乙醇、四氢呋喃、叔丁醇、乙酸乙酯、乙醚和甲苯等有机溶剂对 scPLD 具有激活作用。另外, MCLEA 在进行 13 次的酶促反应后, 酶活仍保留在 76% 以上, 半衰期为 331.67 min, 在整个连续催化过程, 固定化酶的稳定性较强, 酶活力损失较

小具有工业应用潜力。

参考文献:

- [1] CENACCHI T, BERTOLDIN T, FARINA C, *et al.* Cognitive decline in the elderly: A double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration[J]. *Aging Clinical and Experimental Research*, 1993, 5(2): 123-133.
- [2] PELLOW J, SOLOMON E M, BARNARD C N. Complementary and alternative medical therapies for children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD)[J]. *Alternative Medicine Review*, 2011, 16(4): 323-337.
- [3] HELLHAMMER J, FRIES E, BUSS C, *et al.* Effects of soy lecithin phosphatidic acid and phosphatidylserine complex (PAS) on the endocrine and psychological responses to mental stress[J]. *Stress*, 2004, 7(2): 119-126.
- [4] TAKAMI M, SUZUKI Y. Transphosphatidylation reaction of phosphatidylcholine to 4-methoxyphenol in water-immiscible organic solvents with immobilized phospholipase D[J]. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 1995, 79(4): 313-316.
- [5] OGINO C, KANEMASU M, FUKUMOTO M, *et al.* Continuous production of phospholipase D using immobilized recombinant *streptomyces lividans*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(1): 156-161.
- [6] LI B, JIAO W, ZHANG X L, *et al.* An enzyme net coating the surface of nanoparticles: A simple and efficient method for the immobilization of phospholipase D[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, 55(40): 10555-10565.
- [7] WU R, CAO J, LIU F X, *et al.* High-level soluble expression of phospholipase D from *streptomyces chromofuscus* in *escherichia coli* by combinatorial optimization[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2021, 50: 1-9.
- [8] RANJBAKSH E, BORDBAR A K, ABBASI M, *et al.* Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 179: 272-276.
- [9] FEDELI C, CARREA G, MONTI D. On the effects of site-specific mutations on activity and expression of the *streptomyces* PMF phospholipase D[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 41(1/2): 1-7.
- [10] BRADFORD M M. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1973, 72: 249-254.
- [11] ITO Y, NAKASHIMA S, KANO H, *et al.* Implication of Ca^{2+} dependent protein tyrosine phosphorylation in carbachol-induced phospholipase D activation in rat pheochromocytoma PC12 cells[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 68(1): 419-425.
- [12] DINÇER A, TELEFONCU A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 45(1): 10-14.
- [13] TALEKAR S, JOSHI A, JOSHI G, *et al.* Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs)[J]. *RSC Advances*, 2013, 3(31): 12485-12511.
- [14] BARBOSA O, ORTIZ C, BERENQUER M A, *et al.* Cheminform abstract: Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization[J]. *RSC Advances*, 2013, 4(4): 1583-1600.
- [15] CERDOBBEL A, DE WINTER K, DESMET T, *et al.* Sucrose phosphorylase as cross-linked enzyme aggregate: Improved thermal stability for industrial applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(11): 1192-1197.
- [16] LAN X D (兰雄雕), CHEN X H (陈锡鸿), LIAO D K (廖丹葵), *et al.* Preparation and properties of magnetic agarose microsphere immobilized angiotensin converting enzyme[J]. *Fine Chemicals(精细化工)*, 2014, 31(12): 1461-1465, 1470.
- [17] BONAZZA H L, MANZO R M, DOS SANTOS J, *et al.* Operational and thermal stability analysis of thermomyces lanuginosus lipase covalently immobilized onto modified chitosan supports[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 184(1): 182-196.
- [18] XIE W L, MA N. Immobilized lipase on Fe_3O_4 nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production[J]. *Energy & Fuels*, 2009, 23(3): 1347-1353.
- [19] MURZA A, FERNÁNDEZ-LAFUENTE R, GUISÁN J M. Essential role of the concentration of immobilized ligands in affinity chromatography: Purification of guanidinobenzoate on an ionized ligand[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 740(2): 211-218.
- [20] RAKHIMOV M M, KALENDAREVA T I, SSH R, *et al.* Role of calcium ions in the development of the catalytic activity of phospholipase D[J]. *Biokhimiia*, 1982, 47(10): 1649-1662.
- [21] HWANG S, LEE K T, PARK J W, *et al.* Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 17(2): 85-90.
- [22] HIRCHE F, KOCH M H J, KÖNIG S, *et al.* The influence of organic solvents on phospholipid transformations by phospholipase D in emulsion systems[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(6): 453-461.
- [23] PARK J W. Phosphatidic acid production by PLD covalently immobilized on porous membrane[J]. *Clean Technology*, 2015, 21(4): 224-228.
- [24] LI B L, JIAO W, ZHANG X L, *et al.* An enzyme net coating the surface of nanoparticles: A simple and efficient method for the immobilization of phospholipase D[J]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2016, 55(40): 10555-10565.
- [25] HAN Q Q, ZHANG H Y, SUN J A, *et al.* Immobilization of phospholipase D on silica-coated magnetic nanoparticles for the synthesis of functional phosphatidylserine[J]. *Catalysts*, 2019, 9(4): 361-373.
- [26] LI Y, WU J Q, LONG N B, *et al.* Efficient immobilization of phospholipase D on novel polymer supports with hierarchical pore structures[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 60-67.
- [27] WU J Q, XU X M, WANG D L, *et al.* Immobilization of phospholipase D on macroporous SiO_2 /cationic polymer nano-composited support for the highly efficient synthesis of phosphatidylserine[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 142: 109696-109728.