

# 响应面法优化固定化酯酶 Est824 的性质研究

管梓然 1, 曾晓晖 1\*, 林潇潇 1, 林传钟 1

广州市花都区人民医院 广东广州 510000

**摘 要:** 本研究为了获得最佳的酯酶 Est824 固定化条件。利用 Box-Behnken 响应面优化试验, 确定最适固定化酯酶条件。结果显示, 最佳固定化酯酶条件: 海藻酸钠浓度为 2.8 %, 壳聚糖浓度为 2.1 %, 氯化钙浓度为 3.50 %。验证试验表明, 测得实际酶回收率为 85.20 %, 预测的最大酶回收率为 83.41 %, 实际值接近于预测值, 证实优化模型是有效和可靠的, 为将来该酶应用于工业生产或环境治理中奠定相关参数基础。

**关键词:** 酯酶; 固定化酶; 响应面优化法

**中图分类号** Q71

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酯酶是一种具有巨大应用潜质的水解酶, 酯酶具有催化活性高、反应选择性强、反应条件较为温和等优点, 其反应还不需要辅酶的参与<sup>[1-2]</sup>。因此, 酯酶被广泛应用于医药、食品、洗涤剂、油脂、化妆品、生物能源、环境治理等领域<sup>[2-4]</sup>。

但是游离的酯酶具有不稳定、重复利用率低等缺点, 这些缺点会很大限制酯酶在工业生产或环境治理中应用。而固定化酶技术的出现就能够有效解决这些问题, 固定化酶保留了自身特有的催化反应的同时又能够提高酶的稳定性, 并且能够使酶能够反复多次利用, 大大降低酯酶的应用成本<sup>[5]</sup>。制备固定化酶的方法有很多种, 其中包埋法制备固定化酶是不需要化学修饰酶蛋白的氨基酸残基, 且具有反应条件温和、酶活力损失小等优点, 是常用于制备固定化酶的方法<sup>[6]</sup>。故本实验首先以壳聚糖—海藻酸钠为载体, 固定化酯酶 Est824, 并对海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度和 CaCl<sub>2</sub> 浓度三个方面进行单因素进行优化, 随后进行响应面优化试验<sup>[7]</sup>, 最后得出酯酶 Est824 的最佳固定化条件。

酯酶 Est824 基因是实验室在新疆土壤微生物宏基因组文库筛选所得 (NCBI 登录号: MN062363), 实验室已将该基因与表达载体 pET-28a (+) 相连接, 成功在大肠杆菌 (E.coli) BL21(DE3) 中表达, 并保存于 4℃ 备用。海藻酸钠 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 壳聚糖 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 脱乙酰度 >95%); 戊二醛、磷酸钾 (KPB) 缓冲液 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 对硝基苯丁酸酯、氯化钙、三氯醋酸等其他试剂均为分析纯试剂 (天津市化学试剂六厂)。数显鼓风干燥箱 上海博实业有限公司医疗设备厂 (GZX-9070); 台式冷冻离心机 Eppendorf 公司 (Centrifuge 5804); 电子分析天平 上海舜玉恒平科学仪器有限公司 (FA2104); 酶标仪 Bio-Tek 公司 (ELX800); 紫外仪 北京市六一仪器厂 (WD-9403F); 电热恒温水槽 上海一恒科技有限公司 (DK-8D 型)。

### 1.2 实验方法

### 1.2.1 固定化酯酶 Est824 的制备方法

称取一定质量分数的海藻酸钠加水 10 mL, 充分搅拌混合均匀, 向海藻酸钠溶液中加入 1 mL 酶液, 使之搅拌均匀, 4℃冰箱中静置一段时间, 同时称取一定质量分数的壳聚糖使之溶解在 10 mL 1% 的醋酸溶液中, 并让其与一定质量分数的 10 mL CaCl<sub>2</sub> 溶液于 37℃ 水浴中充分搅拌混匀。使用无菌注射器将含有酶液的海藻酸钠溶液以 3 滴 / s 的速度滴加到壳聚糖与 CaCl<sub>2</sub> 溶液混合溶液中, 再加入一定质量分数的 10 mL 戊二醛溶液, 充分搅拌后, 置于 4℃ 冰箱中交联一定时间。洗涤, 冷冻干燥, 即可得到固定化酯酶 Est824, 4℃ 冰箱中保存备用。

### 1.2.2 单因素实验

设置海藻酸钠浓度为 2%, 壳聚糖浓度为 2% 和 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 3%, 控制三个变量中的两个因素不变, 分别改变余下变量变化值为海藻酸钠浓度 1% ~ 5%, 壳聚糖浓度 1% ~ 5% 和 CaCl<sub>2</sub> 浓度 1% ~ 5%, 来确定各因素中最佳的固定化效果, 绘制固定化酶活性回收率曲线图<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 Box-Behnken 实验设计

利用 Design-Expert 12 软件设计了 N=17 的响应面优化实验, 考察 3 个因素的交互作用和最佳水平, 对最佳固定化酶条件进行预测<sup>[9]</sup>。

### 1.2.4 固定化酯酶与游离酯酶的酶活的测定

本文采用对硝基苯丁酸酯

(*p*-nitrophenylpalmitate, *p*-PNP) 法测定酯酶活力<sup>[10]</sup>。2.97 μL 50 mM KPB 缓冲液 (pH 7.0)

中加入 30 μL 1 M *p*-NPB 母液, 50℃ 保温 2 min, 再加入 100 μL 的酶液, 震荡均匀。检测波长 405 nm, 每隔 10 s 记录一个 A<sub>405</sub> 值, 记录时长 1 min。

根据以下公式计算酶活力:

$$U = D \times 103 \times (\Delta A1 - \Delta A2) \times Vt \epsilon \times Vs \times d$$

U: 酶活力 (每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚的酶量); D: 稀释倍数; ΔA1: 样品吸光度变化值; ΔA2: 空白对照吸光度变化值; Vt: 反应液总体积, mL; ε: 摩尔吸光度, 13600 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>; Vs: 酶液体积, mL; d: 比色皿光程, cm。

### 1.2.5 固定化酶回收率的计算方法

固定化酶回收率 (%) = (固定化酶活力 / 固定化前游离酶的活力) × 100

## 2. 实验结果与分析

### 2.1 影响酯酶固定化的单因素实验结果

#### 2.1.1 海藻酸钠浓度对固定化酶回收率的影响

探究不同海藻酸钠浓度对固定化酶回收率的影响, 结果如图 1 所示, 当海藻酸钠浓度为 3% 时, 固定化酶回收率最高。当海藻酸钠浓度低于或者高于 3% 时, 由于海藻酸钠与酯酶之间的粘合度不足或者过大, 导致固定化酯酶的凝胶孔径过大或者过小, 固定化酯酶的酶回收率会因此降低, 所以最适的海藻酸钠浓度为 3%。

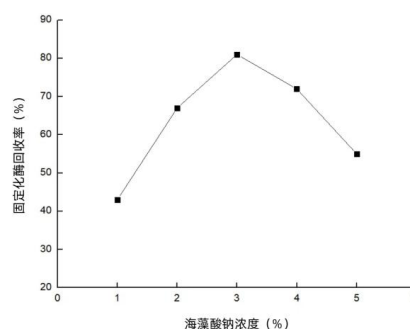


图 1 海藻酸钠浓度对固定化酶回收率的影响

Fig. 1 Effect of sodium alginate concentration on recovery rate of immobilized enzyme

2.1.2 壳聚糖浓度对固定化酶回收率的影响

探究不同壳聚糖浓度对固定化酶回收率的影响，结果如图 2 所示，壳聚糖浓度为 3% 时，固定化酶回收率最高。当壳聚糖浓度小于 3% 时，壳聚糖与海藻酸钙盐的静电作用不够，膜强度较弱。当壳聚糖浓度大于 3% 时，壳聚糖分子的电荷密度急剧增加，导致其与海藻酸钙盐的交联程度降低，所以固定化酶回收率也随之降低。因此最适的壳聚糖的浓度为 3%。

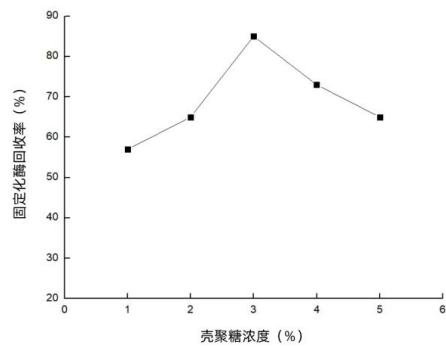


图 2 壳聚糖浓度对固定化酶回收率的影响

Fig. 2 Effect of chitosan concentration on recovery rate of immobilized enzyme

2.1.3 钙离子浓度对固定化酶回收率的影响

探究不同钙离子浓度对固定化酶回收率的影响，结果如图 3 所示，当氯化钙浓度小于 3% 时，随着钙离子浓度增大，固定化酶回收率逐渐增大；当大于 3% 时，随着钙离子浓度的增大，固定化酶回收率逐渐下降。因为钙离子浓度在固定化时会附着与凝胶表面，从而影响固定化酶的活力，因此最适的氯化钙浓度为

3%。

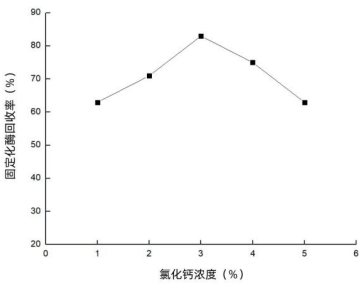


图 3 钙离子浓度对固定化酶回收率的影响

Fig. 3 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on recovery rate of immobilized enzyme

2.2 Box-Behnken 实验结果

使用 Design-Expert 软件进行 Box-Behnken 程序拟合获得的交互二次回归方程得出海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度与氯化钙浓度对固定化酶回收率的响应面因素水平见表 1，方差分析见表 2，等高线分析结果如图 4/5/6 所示。由各模型参数可知，A、B、C 的二次方项对酯酶 Est824 的固定化有极显著的影响。根据响应面图和等高线图趋势，经对比分析得出，在追求高固定化回收率时，在因素 A 保持稳定的情况下，应考虑 B 与 C 的交互作用。最后，通过软件分析对该模型最优水平进行预测，得知在各因素最佳优化值分别为海藻酸钠浓度 =2.8 %，壳聚糖浓度 =2.1 %，氯化钙浓度 =3.50%；在该条件下，进行实验验证，平行三次试验取平均值，测得实际酶回收率值为 85.20%，预测的最大产酶量为 83.41 %，实际值接近于预测值，说明模型可信。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平表

| Table 1 Levels of Box-Behnken test factors |      |    |   |   |
|--------------------------------------------|------|----|---|---|
| 因素                                         | 实验因子 | -1 | 0 | 1 |

|   |            |   |   |   |
|---|------------|---|---|---|
| A | 海藻酸钠浓度 (%) | 1 | 3 | 5 |
| B | 壳聚糖浓度 (%)  | 1 | 3 | 5 |

|   |           |   |   |   |
|---|-----------|---|---|---|
| C | 氯化钙浓度 (%) | 1 | 3 | 5 |
|---|-----------|---|---|---|

表 2 响应面法方差分析表

Table 2 Response surface method analysis of variance

| 因素             | 方差和        | 自由度 | 均方         | F 值        | P 值      | 显著性 |
|----------------|------------|-----|------------|------------|----------|-----|
| 模型             | 2603.33    | 9   | 289.26     | 16.73      | 0.0006   | *   |
| A- 海藻酸钠浓度      | 157.44     | 1   | 157.44     | 9.10       | 0.0195   |     |
| B- 壳聚糖浓度       | 54.86      | 1   | 54.86      | 3.17       | 0.1181   |     |
| C- 氯化钙浓度       | 0.55       | 1   | 0.55       | 0.032      | 0.8634   |     |
| AB             | 35.64      | 1   | 35.64      | 2.06       | 0.1942   |     |
| AC             | 7.225E-003 | 1   | 7.225E-003 | 4.178E-004 | 0.9843   |     |
| BC             | 2.12       | 1   | 2.12       | 0.12       | 0.7367   |     |
| A <sup>2</sup> | 241.16     | 1   | 241.16     | 13.95      | 0.0073   |     |
| B <sup>2</sup> | 1406.67    | 1   | 1406.67    | 81.35      | < 0.0001 |     |
| C <sup>2</sup> | 495.26     | 1   | 495.26     | 28.64      | 0.0011   |     |
| 重复误差           | 121.04     | 7   | 17.29      |            |          |     |
| 失拟检验           | 99.10      | 3   | 33.03      | 6.02       | 0.0577   |     |
| 纯误差            | 21.94      | 4   | 5.48       |            |          |     |
| 总误差            | 2724.37    | 16  |            |            |          |     |

\* 在 95% 置信度下显著

响的响应面图与等高线图

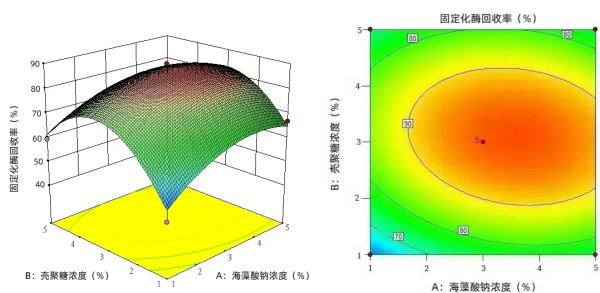


图 4 海藻酸钠浓度和壳聚糖浓度对固定化酶回收率影响

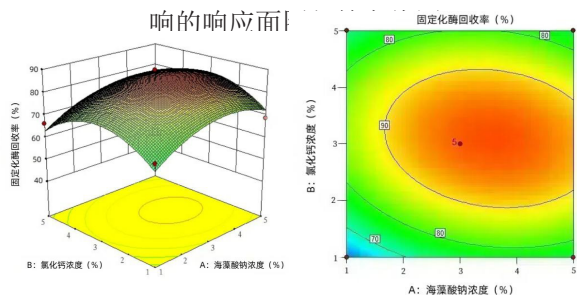


图 5 海藻酸钠浓度和氯化钙浓度对固定化酶回收率影响

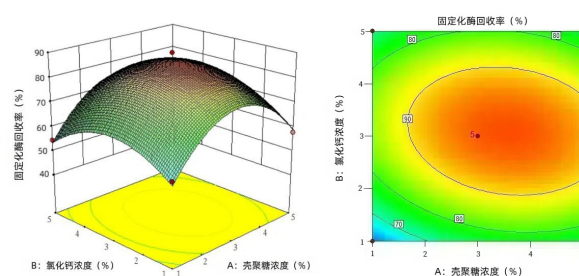


图 6 壳聚糖钠浓度和氯化钙浓度对固定化酶回收率影响

响的响应面图与等高线图

### 3. 结论

本研究对利用响应面优化法对酯酶 Est824 进行固定化酶条件优化分析, 通过单因素实验分析了海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度和氯化钙浓度这 3 种因素对固定

化酯酶的影响,得出各个最佳单因素为海藻酸钠浓度为 3%、壳聚糖浓度为 3% 和氯化钙浓度为 3%。最后通过响应面设计了 17 组实验,推测出最适的固定化酯酶条件为海藻酸钠浓度为 2.8 %,壳聚糖浓度为 2.1 %,氯化钙浓度为 3.50%。在此固定化条件下进行实验验证,测得实际酶回收率为 85.20%,预测的最大酶回收率为 83.41 %,实际值接近于预测值,证明模型可信。

## 参考文献

- [1] 赵妍,陈娟,袁倩,等. 产嗜热酯酶菌株的筛选、鉴定及发酵特性研究[J]. 中国果菜, 2023, 43(06):22-27.
- [2] Vydyam P, Choi JY, Gihaz S, et al. Babesia BdFE1 esterase is required for the anti-parasitic activity of the ACE inhibitor fosinopril[J]. J Biol Chem. 2023 Nov;299(11):105313.
- [3] 刘喆,李家霖,白利平. 微生物酯酶研究进展[J]. 微生物学报, 2023,63(02):451-464.
- [4] 陈思越. 伊斯隆恩西斯芽孢杆菌酯酶 SIEst 的酶学性质及分子改造研究[D]. 华南理工大学, 2021.
- [5] 田秀悦. 海藻酸钠-明胶-壳聚糖复合材料固定化漆酶的光吸收和荧光特性研究[D]. 山西大学
- [6] 张晓娟,赵青云,康敏艳,等. 海藻酸钠/壳聚糖复合凝胶球的制备及其对  $Pb^{2+}$  吸附性能研究[J]. 化学工程师, 2024,38(06):12-16+27.
- [7] Sethi N, Luhach N, Kirrolia AS, et al. Physicochemical characterization of rice straw before and after alkali-assist photocatalytic pretreatment: a comparative analysis[J]. Environ Sci Pollut Res Int. 2024 May 16.
- [8] 覃清霞,张莹樱,庞婷,等. 响应面法优化三七花提取物凝胶软糖的制备工艺[J]. 轻工科技, 2024,40(05):1-6.
- [9] 沈梦霞. 海绵动物共附生聚乙烯微塑料降解菌的筛选及降解影响因素响应面优化[D]. 海南热带海洋学院, 2023.
- [10] 刘艳艳,刘孝龙,赵萌,范新炯. 宏基因组来源的酯酶酶学性质及对邻苯二甲酸酯的降解[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2020, 59(06): 41-50.

作者简介:管梓然(1994-),男,汉族,广东省广州市,硕士,药师,研究方向:生物化学与分子生物学。

课题名称及编号:探究酯酶 Est824 对新型塑化剂 DiNP 降解的研究,院内科研基金项目号:2024B01。