

DA-F127 水凝胶包埋固定化含腈水合酶细胞

张颖 王莹 杨立荣 吴坚平*

(浙江大学化学工程与生物工程学院生物工程研究所 杭州 310027)

摘要 腈水合酶是一类可催化腈类化合物转化生成相应酰胺类物质的酶。含腈水合酶的游离细胞催化水合反应存在酶容易失活、细胞无法重复利用、分离纯化困难等缺陷,细胞固定化技术可有效解决这些问题。为探索合适的固定化方法,以含腈水合酶的重组 *E. coli* 细胞为研究对象,以固定化酶活回收率和批次反应情况为评价指标,筛选比较了几种常用的包埋固定化方法。结果表明,DA-F127 水凝胶包埋固定化细胞不仅具有较高的酶活回收率,而且稳定性也很好。对该方法进行了固定化条件和操作稳定性优化,当 DA-F127 浓度为 15%、UV 光源距离为 20cm、光照时间为 6min、菌体含量为 20mg/g 固定化细胞时,酶活回收率为 89.74%,并且可以催化 9 批次 150g/L 的 3-氰基吡啶完成转化,第九批次转化率可达 98.26%。与游离细胞催化过程相比,单位质量游离细胞的烟酰胺产量提高了 12 倍,具有良好的工业应用前景。

关键词 DA-F127 腈水合酶 细胞固定化 烟酰胺

中图分类号 Q814

腈水合酶(nitrile hydratase, Nhase)是一类可以催化腈类化合物生成相应酰胺的酶,广泛应用于丙烯酰胺、烟酰胺和丁酰胺等产品的工业化生产^[1-3]。利用含有腈水合酶的微生物催化生产酰胺类化合物具有反应效率高、专一性好及条件温和等优点。但游离细胞在反应过程中易发生破碎,释放出所含腈水合酶和细胞组分,不仅酶容易失活,而且细胞无法重复利用,只能转化单批次反应,同时会导致产物分离纯化困难等问题。细胞固定化技术可以有效解决上述问题,具有重要的工业应用价值。

近年来,含有腈水合酶细胞的固定化技术取得了显著的进展,通常采用包埋固定化法。尹灵富^[4]用海藻酸钙固定化 *Rhodococcus* sp. 93-10-115 催化生产烟酰胺,重复使用 5 批次后基本丧失酶活。Lonza 公司^[5]用聚丙烯酰胺将 Genus *Rhodococcus* 全细胞包埋固定化后催化生产烟酰胺,固定化效果很好,用固定化细胞催化 960mmol/L 的 3-氰基吡啶可连续使用 300h 以上,并维持较高转化率。刘善和等^[6]用羟甲基纤维素钙固定化

枯草杆菌催化生产烟酰胺,转化率达 99.5%。Singh 等^[7]用 2% 的琼脂固定化 *Bacillus* sp. APB-6 催化生产丁酰胺,重复使用 6 个批次后酶活仅剩余 45%。近年也有使用新型材料对含有腈水合酶细胞进行固定化的研究,Kubac 等^[8]使用水凝胶 LentiKat 固定化 *Rhodococcus erui* A4 催化合成烟酰胺,酶活回收率达 100%,但仅能催化浓度为 30mmol/L 的 3-氰基吡啶的反应,且稳定性较差,重复使用 4 批后酶活损失一半。Maksimova 等^[9]使用多壁碳纳米管(MWCNTs)材料将 *Rhodococcus ruber* gt1 固定化后催化生产烟酰胺,重复使用 6 个批次后酶活剩余 50%。总体而言,目前所采用的包埋固定化方法操作相对简单,固定化效果较好,但是依然存在的问题,如海藻酸钙固定化细胞在使用过程中机械强度会逐渐降低,且无法在磷酸盐中稳定存在。琼脂固定化法在操作过程中受温度影响较大,在稍高温度下固定化细胞结构容易破碎。而聚丙烯酰胺固定化法的缺点是包埋过程中加入的几种物质具有一定毒性,对细胞产生较大伤害。因此亟须探索高效的固定化方法。

DA-F127 由丙烯酰氯与普兰尼克 F127 反应接枝后得到,其水溶液在紫外线(UV)照射下形成水凝胶。

收稿日期:2019-03-12 修回日期:2019-04-15

* 通讯作者,电子信箱:wjp@zju.edu.cn

DA-F127水凝胶的反应过程可控,生物相容性好,非常适合作为细胞固定化的材料^[10]。已有报道^[11]用DA-F127水凝胶作为动物细胞反应器,但作为细胞固定化材料还没有报道。本研究采用DA-F127作为固定化材料,对实验室前期构建的含腈水合酶重组*E. coli*细胞进行包埋固定化,以催化3-氰基吡啶转化烟酰胺为模式反应。DA-F127水凝胶包埋法、海藻酸钙包埋法及聚丙烯酰胺包埋法等固定化方法的酶活回收率和重复反应批次,确定DA-F127水凝胶是一种非常合适的新型包埋固定化细胞材料。对其固定化条件及催化条件进行了优化,在最佳条件下制备获得的固定化细胞可重复使用9批,在第9批时转化率可达98.26%,与游离细胞相比,细胞的利用效率得到了显著提升。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *A. manganoxydans* SI85-9A1来源的产腈水合酶重组*E. coli*由本实验室构建^[12]。

1.1.2 试剂 普兰尼克购自上海麦克林生化科技有限公司,光引发剂Irgacure 2959购自巴斯夫股份公司,丙烯酰胺购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,其他常规试剂均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 种子培养基和发酵培养基均为LB培养基。*E. coli*细胞于37℃、200r/min摇床中振荡培养。发酵液经离心收集细胞,生理盐水清洗3遍,除去上清液,置于-20℃冰箱中保存。

1.2.2 细胞酶活的测定 酶活力单位定义:在25℃、pH 7.0的条件下,每分钟催化3-氰基吡啶生成1μmol烟酰胺所需的酶量定义为1个酶活力单位(U)。游离细胞酶活测定:1.5ml EP管中加入490μl的3-氰基吡啶溶液(20g/L, pH 7.0),放入金属浴反应器25℃预热10min,加入0.01ml菌悬液,25℃下,200r/min振荡反应10min,加入0.5ml乙腈终止反应,HPLC检测反应生成的烟酰胺浓度,计算游离细胞酶活。

固定化细胞酶活测定:30ml锥形瓶中加入10ml的3-氰基吡啶溶液(20g/L, pH 7.0),放入25℃恒温摇床预热10min,加入0.1g固定化细胞,放入25℃摇床中200r/min,反应10min,加入10ml乙腈终止反应。HPLC检测反应生成的烟酰胺浓度,计算固定化细胞酶活。

HPLC检测条件:见文献^[13]。

酶活回收率:固定化细胞的总酶活与用于固定化的游离细胞总酶活之比的百分率。

相对酶活:同组反应中,以最高酶活为100%,其他反应点的酶活相对最高酶活所占的百分数。

固定化细胞的性能评价:强度(strength)指标是指将20颗完整固定化细胞加到水溶液中,放置在25℃的摇床中,转速为200r/min,24h后观察固定化颗粒的完整性,若所有颗粒均完整则为5个+,每破碎4颗减少一个+。

1.2.3 含腈水合酶固定化细胞的制备 海藻酸钙固定化细胞:称0.8g海藻酸钠,加35ml去离子水,50℃搅拌溶解,冷却至30℃。取0.5g湿菌体加5ml磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH 7.0),与海藻酸钠混合均匀,通过注射针头滴入CaCl₂溶液(4%, m/m)中,制成直径约为3mm的颗粒,4℃下继续固化6h,取出后用去离子水清洗3次,4℃放置备用。

聚丙烯酰胺固定化细胞:取5.28g丙烯酰胺,0.47g甲叉双丙烯酰胺,加4.688ml磷酸缓冲液溶解,加入20ml的菌悬液(0.2g菌体/ml),0.625ml过硫酸铵溶液(37.5%, m/m)和1.25ml TEMED溶液(18.6%, m/m),冰水浴中成胶,4℃保存于PBS缓冲液中。

κ-卡拉胶固定化细胞:称2g κ-卡拉胶加100ml去离子水,高压灭菌锅中融化,35℃保温,取0.2g湿菌体加10ml磷酸缓冲液,35℃保温,与预先保温的卡拉胶混合均匀,冷却成胶后放于2% KCl溶液中,4℃放置过夜。

琼脂固定化细胞:称1g琼脂加100ml去离子水,高压灭菌锅中融化,35℃保温,取0.2g湿菌体加10ml磷酸缓冲液,35℃保温,与预先保温的卡拉胶混合均匀,冷却成胶后4℃保存于磷酸缓冲液中。

DA-F127固定化细胞:DA-F127的制备方法见文献^[10]。取0.5g DA-F127溶解于4ml磷酸缓冲液中(0.05mol/L, pH 7.0),加入1ml的菌悬液(0.06g菌体/ml)及65μl光引发剂Irgacure 2959(0.2g/600μl DMSO)混匀,UV照射10min成胶,4℃保存于PBS缓冲液中。

1.2.4 固定化条件优化 采用单因素实验,控制一个因素不变,分别改变DA-F127浓度、UV照射条件、细胞包埋量,以固定化回收率和批次反应为指标,衡量各个条件对固定化效果的影响。

1.2.5 固定化细胞的催化特性 pH的影响:配制不同pH的底物缓冲液(pH 6.0~10.0),按固定化细胞酶

活测定方法,测定固定化细胞的相对酶活。同时将固定化细胞储存在 30℃,不同 pH 缓冲溶液中(pH 6.5 ~ 8.0),测定固定化细胞的 pH 储存稳定性。

温度的影响:在最适 pH 条件下,将固定化细胞置于不同温度(20 ~ 60℃)中测定固定化细胞的相对酶活。同时将固定化细胞储存在最适 pH、不同温度的缓冲液中(18 ~ 60℃)中,测定固定化细胞的温度储存稳定性。

1.2.6 固定化细胞批次反应 在 30ml 锥形瓶中加入 10ml 的 3-氰基吡啶溶液(60g/L, pH 7.0),放入 18℃ 水浴锅中预热 10min,加入酶活总量为 200U 的固定化细胞,磁力搅拌反应,在反应进行 10min、30min 时分别加入 0.45g 的 3-氰基吡啶,继续反应 110min,反应结束后用去离子水清洗固定化细胞 3 次后重复上述操作,连续反应多个批次,分别测量烟酰胺与 3-氰基吡啶浓度。

2 结果与讨论

2.1 细胞固定化制备方法的比较

海藻酸钙和聚丙烯酰胺是用来固定化含脲水合酶细胞的两种常用材料, κ -卡拉胶^[14]及琼脂^[15]包埋法也是固定化细胞常用的方法。使用海藻酸钙、聚丙烯酰胺、 κ -卡拉胶 DA-F127、琼脂和 DA-F127 这 5 种材料包埋固定化含脲水合酶重组 *E. coli* 细胞,比较 5 种方法的固定化酶活回收及重复使用批次,表 1 中结果表明,用 DA-F127 固定化细胞,酶活回收率高于其他 4 种固定化方法,强度也较好。用以上 5 种固定化细胞完成批次反应,批次反应情况见图 1。海藻酸钙固定化方法在前两批的重复使用中较稳定,转化率达 98% 以上,但随后转化率出现明显下降,可能在反应后期存在细胞泄露的情况,导致批次转化率快速下降。使用聚丙烯酰胺、 κ -卡拉胶和琼脂包埋的固定化细胞,在批次重复反应中表现较差,仅使用两个批次后转化率就有较大下降,不适合作为固定化重组 *E. coli* 细胞的材料。DA-F127 固定化方法在批次反应中,反应批次最多,且酶活回收率相对较好,因此我们选择 DA-F127 作为固定化细胞的材料。

2.2 DA-F127 固定化条件优化

2.2.1 DA-F127 浓度 我们首先探究 DA-F127 浓度对固定化酶活回收率的影响,结果见表 2。可知,固定化细胞的酶活回收率随着 DA-F127 浓度的增加而降低。DA-F127 浓度影响水凝胶成胶孔径大小、孔壁的厚度,浓度越高,成胶后孔径越大,孔壁越厚^[16]。壁厚的增加可能影响底物与酶的结合,导致酶活降低。图 2

表 1 不同固定化方法的比较

Table 1 Comparison of different immobilization method

Immobilization method	Shape	Strength	Enzyme recovery (%)
Calcium alginate	Bead	++++	48.08 ± 2.16
Polyacryamide	Cube	++++	54.93 ± 1.83
DA-F127	Cube	++++	61.28 ± 2.64
Carrageenan	Cube	++	47.43 ± 2.27
Agar	Cube	+++	34.76 ± 1.86

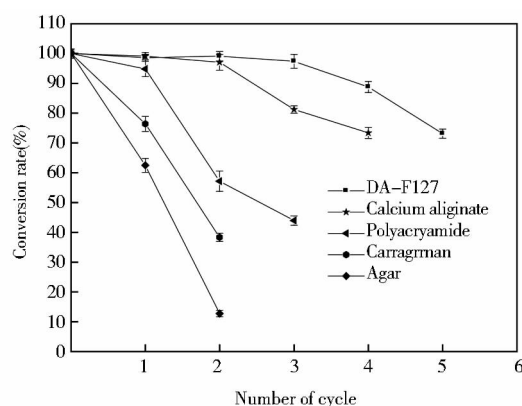


图 1 不同固定化方法批次反应情况

Fig.1 Batch reaction of different immobilization methods

为不同 DA-F127 浓度固定化细胞的批次反应情况,DA-F127 浓度为 15% 时,批次反应稳定性最高,而其他浓度的固定化细胞在批次反应的过程中转化率均有不同程度的降低。这或许与凝胶孔径变大导致细胞在反应过程中存在不同程度的泄露有关。而当 DA-F127 浓度小于 15% 时,水凝胶的强度较低,在反应过程中容易破碎,致使固定化细胞重复性能较差。综合考虑酶活回收率与重复利用情况,我们选择 DA-F127 的浓度为 15%,进行后续优化实验。

表 2 DA-F127 浓度对细胞固定化回收率的影响

Table 2 Effect of DA-F127 concentration on enzyme recovery

DA-F127 concentration (%)	UV irradiation time (min)	Cell embedding amount (mg) ①	Enzyme recovery (%)
10	10	12	62.32 ± 3.71
15	10	12	57.86 ± 2.47
20	10	12	56.61 ± 3.34
25	10	12	44.67 ± 1.73

① Cell embedding amount: The amount of cells embedded per 1g of carrier

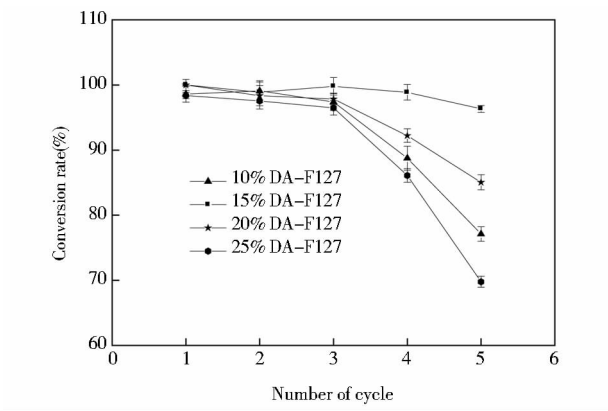


图2 不同 DA-F127 浓度对反应批次的影响
Fig.2 Effect of different DA-F127 concentrations on reaction batches

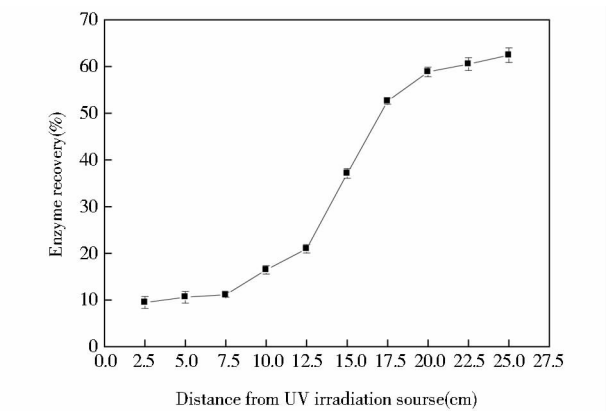


图3 UV 照射距离对固定化细胞酶活回收的影响
Fig.3 Effect of UV irradiation distance on enzyme recovery rate of immobilized cells

2.2.2 UV 照射条件

(1)UV 的照射距离。UV 照射距离影响 UV 的照射强度。对 UV 照射距离的优化结果见图3。由图3可知,当 UV 光源距离为 2.5 ~ 10cm 时,随着光照距离的增加,固定化细胞的酶活回收率缓慢提高,距离增加到 12.5cm,酶活回收率大幅提高。当光源距离达到 20cm 以后,继续增加光照距离,酶活回收率仍有所提高,但幅度很小,且此后水凝胶的成胶效果较差。我们推测过高的 UV 照射强度,会对蛋白质结构造成一定损伤^[17],导致固定化细胞酶活损失较大。随着照射距离增加,UV 强度逐渐降低,对蛋白质结构损伤减小。另外,较低强度的 UV 光照形成的水凝胶壁厚更薄^[16],更有利于底物与细胞的结合,因此固定化细胞的酶活回收率会随着光照距离的增加而提高。综合考虑水凝胶的成胶效果,确定最适 UV 照射距离为 20cm,此时固定化细胞酶活回收率为 58.84%。

(2)UV 的照射时间。对 UV 照射时间进行优化,优化结果见表3。由表3可知,当 UV 照射时长为 6min 时,酶活回收最高,达到为 86.28%,此后随着照射时间增加,酶活急剧降低。UV 照射促使光引发剂自由基攻击丙烯酸酯基团中的碳-碳双键,发生聚合反应,过长时间的 UV 照射可能会一定程度损伤蛋白质结构^[17],导致酶活下降。图4结果显示,4 ~ 8min 内随着 UV 照射时间增长,固定化细胞前 5 个批次的重复使用情况相差不大,当照射时间超过 8min 后,固定化细胞重复性能开始下降。我们推测过长的 UV 照射时间可能会对凝胶结构造成破坏,使得细胞在反应过程中更易泄露。综合考虑酶活回收,确定 UV 照射时间为 6min。

表3 UV 照射时间对细胞固定化回收率的影响

Table 3 Effect of UV irradiation time on enzyme recovery

UV irradiation time (min)	DA-F127 concentration (%)	Cell embedding amount (mg) ①	Enzyme recovery (%)
4	15	12	80.14 ± 2.42
6	15	12	86.28 ± 3.57
8	15	12	66.68 ± 1.66
10	15	12	53.31 ± 3.13
12	15	12	20.56 ± 2.85

① Cell embedding amount: The amount of cells embedded per 1g of carrier

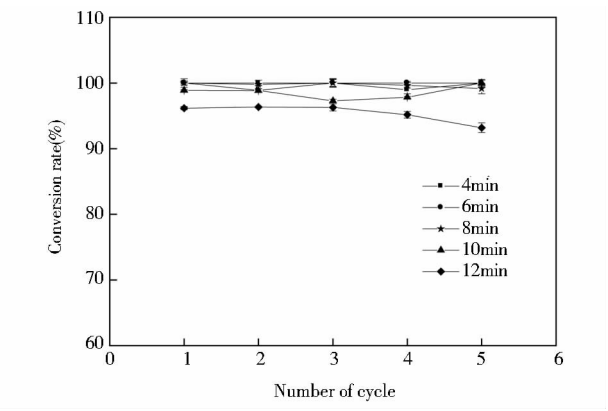


图4 UV 光照时间对反应批次的影响
Fig.4 Effect of UV irradiation time on reaction batches

2.2.3 菌体添加量的优化 细胞加入量对酶活回收率的影响见表4。固定化细胞酶活回收率随菌体添加

量的增加而略有提高,菌体浓度超过 20mg/g 固定化细胞后,细胞在凝胶孔隙内过量聚集,影响底物与细胞之间的接触,使固定化酶活力开始下降。DA-F127 水凝胶在菌体包埋量为 20mg/g 固定化细胞时的包埋效率最高,此时的酶活回收为 89.74%。DA-F127 水凝胶固定化最佳菌体包埋量与其他包埋材料相近,如聚丙烯酰胺固定化 *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 的最佳包埋量为 8.11mg/g 固定化细胞^[18],海藻酸钙固定化 *E. coli* BL21 的最佳包埋量为 12.5mg/g 固定化细胞^[19]。

表 4 细胞添加量对细胞固定化回收率的影响

Table 4 Effect of cell addition amount on enzyme recovery

Cell embedding amount (mg) ^①	DA-F127 concentration (%)	UV irradiation time (min)	Enzyme recovery (%)
4	15	6	74.13 ± 2.29
8	15	6	76.08 ± 3.57
12	15	6	83.16 ± 2.64
16	15	6	84.30 ± 1.76
20	15	6	89.74 ± 1.58
24	15	6	82.92 ± 1.47
28	15	6	80.57 ± 2.56

① Cell embedding amount; The amount of cells embedded per 1g of carrier

经过固定化条件的优化,固定化细胞酶活回收率提高到 89.74%,批次反应稳定性较优化前也有所提高,催化 5 个批次,转化率没有明显下降。由此将 DA-F127 浓度为 15%、UV 光照时间为 6min、菌体包埋量为 20mg/g 固定化细胞确定为最佳的固定化条件。

2.3 DA-F127 固定化细胞的催化特性

2.3.1 DA-F127 的最适反应 pH 对反应 pH 条件进行研究,结果见图 5。pH 条件影响底物和酶的电离,影响酶的催化活性,由图 5 可知,DA-F127 固定化细胞在 pH 为 7~8.5 有 75% 以上的相对酶活, pH 7.0 的磷酸缓冲液中酶活最高。固定化后的细胞与游离细胞^[20]的最适 pH 均为 7.0。

2.3.2 DA-F127 固定化细胞 pH 稳定性 考查 DA-F127 固定化细胞的 pH 稳定性。由图 6 可知,DA-F127 固定化细胞在不同 pH 缓冲液中储存稳定性区别不大,但在酸性条件下较不稳定。综合考虑, pH 7.0 时相对酶活最高,稳定性也相对较好,适合作为批次反应的 pH。

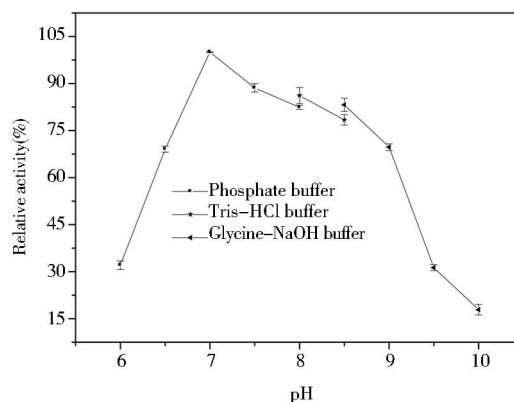


图 5 pH 对固定化细胞反应的影响

Fig. 5 Effect of pH on catalytic reaction of immobilized cell

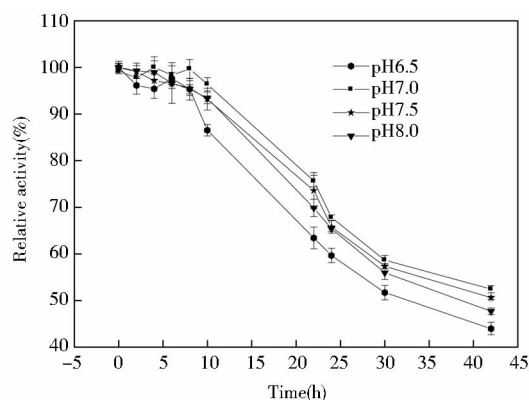


图 6 DA-F127 固定化细胞 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of DA-F127 immobilized cell

2.3.3 DA-F127 固定化细胞反应温度 用 DA-F127 固定化细胞在不同温度下进行催化反应。实验结果见图 7,温度升高,固定化细胞的酶活升高,当温度高于 40℃ 时,由于细胞中的酶开始失活,固定化细胞的催化能力下降,DA-F127 固定化细胞的最适反应温度为 40℃,此时固定化细胞酶活最高。游离细胞与固定化细胞的相对酶活-温度曲线趋势一致^[20],但游离细胞的最适反应温度为 50℃,比固定化细胞高 10℃。

2.3.4 DA-F127 固定化细胞温度稳定性 考察 DA-F127 固定化细胞的温度稳定性,由图 8 可知,40℃ 虽然是固定化细胞的最适反应温度,但仅在 40℃ 中保温 20h,固定化细胞酶活便下降 50%,不适于作为催化反应的温度。将固定化细胞储存在 18℃ 磷酸缓冲液中 80h,其相对酶活仍有 90.63%,储存稳定性远好于其他几个温度。由上述实验结果表明,固定化细胞在 18℃

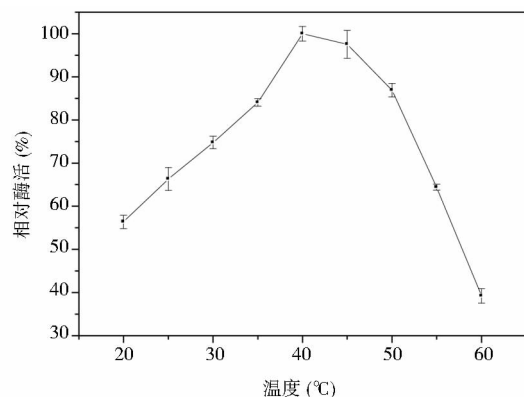


图7 温度对固定化细胞反应的影响

Fig.7 Effect of temperature on catalytic reaction of immobilized cell

下具有良好的稳定性,因此后续我们选择在 18℃ 下进行固定化细胞的批次重复实验。

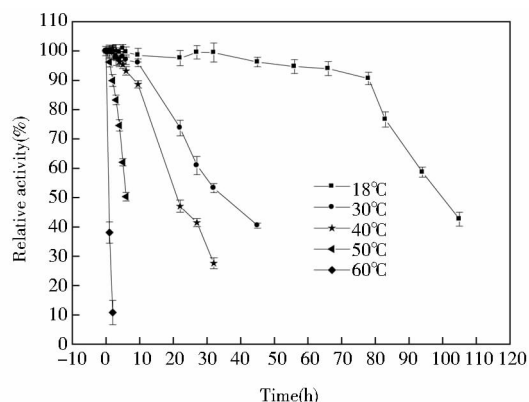


图8 DA-F127 固定化细胞温度稳定性

Fig.8 Temperature stability of DA-F127 immobilized cell

2.4 DA-F127 固定化细胞的重复利用

DA-F127 固定化细胞催化 3-氰基吡啶生成烟酰胺的批次反应结果见图 9。由图 9 可知,将 200U 固定化细胞催化得到终浓度为 180g/L 的烟酰胺溶液,至少可重复使用 9 个批次。第 1 批反应时间 140 min,转化率 99.9% 以上;第 9 批反应时间有所增加,但转化率仍可达 98.26%。与游离细胞催化过程相比,单位质量游离细胞制成的固定化细胞催化可得 294.1g 烟酰胺,而同样质量的游离细胞仅能催化获得 24.6g 烟酰胺^[20],固定化细胞的催化能力约是游离细胞的 12 倍,通过固定化技术大大提高了细胞的利用效率。

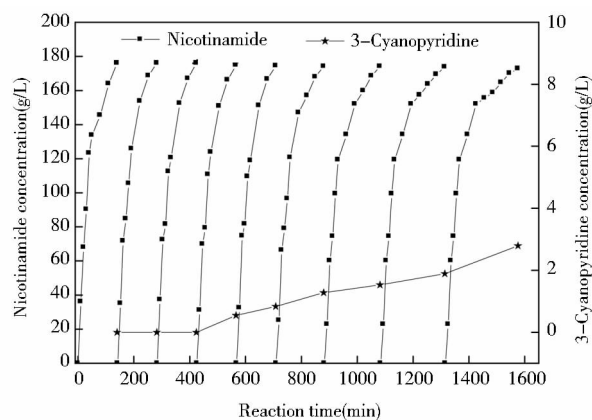


图9 DA-F127 固定化细胞催化 3-氰基吡啶批次反应

Fig.9 Batch reaction of 3-cyanopyridine-catalyzed by DA-F127 immobilized cell

3 结 论

本实验研究了几种常用固定化材料与 DA-F127 水凝胶新材料对含脲水合酶重组 *E. coli* 细胞的固定化效果。通过对酶活回收率和批次反应稳定性的比较,确定 DA-F127 为最佳的固定化材料。但此时的固定化细胞仅能催化 5 个批次的反应,转化率仅为 76.51%,固定化效果还有待进一步提高。对 DA-F127 固定化条件优化,发现 DA-F127 浓度为 15% 时批次反应稳定性最高,反应 5 批后底物转化率仍有 96.36%,通过对 UV 照射时间、菌体添加量条件的优化,将固定化酶活回收提高到 89.74%。对反应 pH、温度进行研究,确定了固定化细胞最适反应 pH 为 7.0,最适反应温度为 18℃。优化后的 DA-F127 固定化细胞可催化 150g/L 的 3-氰基吡啶完成 9 个批次的转化,且第 9 批的底物转化率仍达 98.26%,操作稳定性较好,具有良好的工业化应用前景。

参考文献

- [1] Chen Y Z, Jiao S, Wang M M, et al. A novel molecular chaperone GroEL2 from *Rhodococcus ruber* and its fusion chimera with nitrile hydratase for co-enhanced activity and stability. *Chemical Engineering Science*, 2018, 192(1): 235-243.
- [2] Shaw N M, Robins K T, Kiener A. Lonza: 20 years of biotransformations. *Adv Synth Catal*, 2003, 345 (4): 425-435.
- [3] Singh R, Devi N, Chand D, et al. Bench scale production of butyramide using free and immobilized cells of *Bacillus* sp. APB-6. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018, 41 (8): 1225-1232.
- [4] 尹灵富. 生物催化技术生产烟酰胺的研究. 杭州: 浙江工业

- 大学, 2004.
- Yin L F. Production of nicotinamide by biological catalyst. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2004.
- [5] Zigova J, Robins K, Bartek J. Polyacrylamide beads containing encapsulated cells: America, US20070822928. 2007-11-08 [2019-4-10]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=patent&id=US20070822928.
- [6] 刘善和, 钱前, 梁锡臣, 等. 一种利用固定化细胞将烟腈转化为烟酰胺的方法: 中国, CN201510115815. 9. 2015-07-08 [2019-4-10]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=patent&id=CN201510115815.9.
- Liu S H, Qian Q, Liang X C. Method of converting nitrile into nicotinamide with immobilized cells: China, CN201510115815. 9. 2015-07-08 [2019-4-10]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=patent&id=CN201510115815.9.
- [7] Singh R, Pandey D, Devi N, et al. Bench scale production of butyramide using free and immobilized cells of *Bacillus* sp. APB-6. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018, 41(8): 1225-1232.
- [8] Kubac D, Cejkova A, Masak J, et al. Biotransformation of nitriles by *Rhodococcus equi* A4 immobilized in LentiKats. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2006, 39 (1-4): 59-61.
- [9] Maksimova Y G, Nikulin S M, Osovetskii B M, et al. Heterogeneous biocatalyst for nitrile and amide transformation based on cells of nitrile-hydrolyzing bacteria and multiwalled carbon nanotubes. *Appl Biochem Microbiol*, 2017, 53(5): 506-512.
- [10] Lee S Y, Tae G. Formulation and *in vitro* characterization of an *in situ* gelable photo-polymerizable Pluronic hydrogel suitable for injection. *J Control Release*, 2007, 119 (3): 313-319.
- [11] Rodrigues R O, Baldi G, Doumet S, et al. Multifunctional graphene-based magnetic nanocarriers for combined hyperthermia and dual stimuli-responsive drug delivery. *Materials Science and Engineering*, 2018, 93(1): 206-217.
- [12] Pei X L, Zhang H Y, Meng L J, et al. Efficient cloning and expression of a thermostable nitrile hydratase in *Escherichia coli* using an auto-induction fed-batch strategy. *Process Biochemistry*, 2013, 48(1): 1921-1927.
- [13] Yang Z F, Pei X L, Xu G, et al. N-terminal engineering of overlapping genes in the nitrile hydratase gene cluster improved its activity. *Enzyme & Microbial Technology*, 2018, 117(1): 9-14.
- [14] Duque S M M, Castro I J L, Flores D M. Evaluation of antioxidant and nutritional properties of sago and its utilization for direct lactic acid production using immobilized *Enterococcus faecium* DMF78. *International Food Research Journal*, 2018, 25 (1): 83-91.
- [15] Li Y M, Gao J Q, Pei X Z, et al. Production of L-alanyl-L-glutamine by immobilized *Pichia pastoris* GS115 expressing -amino acid ester acyltransferase. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18 (1): 18-27.
- [16] Lee S, Tae G, Kim Y H. Thermal gelation and photopolymerization of di-acrylated Pluronic F 127. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2007, 18 (10): 1335-1353.
- [17] Chun K W, Lee J B, Kim S H, et al. Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels. *Biomaterials*, 2005, 26 (16): 3319-3326.
- [18] Raj J, Sharma N N, Prasad S, et al. Acrylamide synthesis using agar entrapped cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 in a partitioned fed batch reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(1): 35-40.
- [19] 邹树平, 颜海蔚, 胡忠策, 等. 固定化重组大肠杆菌细胞催化合成(R)-环氧氯丙烷. *现代化工*, 2013, 33(7): 55-59.
- Zou S P, Yan H W, Hu Z C, et al. Synthesis of (R)-epichlorohydrin catalyzed by immobilized recombinant *Escherichia coli* cells. *Modern Chemical Industry*, 2013, 33(7): 55-59.
- [20] 裴晓林. 腈水合酶基因资源开发及其重组表达体系在制备烟酰胺中的应用. 杭州: 浙江大学, 2013.
- Pei X L. Discovery of nitrile hydratase genes and their recombinant expression for the production of nicotinamide. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.

DA-F127 Hydrogel Embedded Immobilized the Nitrile Hydratase-Containing Cells

ZHANG Ying WANG Ying YANG Li-rong WU Jian-ping

(College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Nitrile hydratase are enzymes that catalyze the conversion of nitriles to their corresponding amides. There are many problems in the catalytic process of free cells containing nitrile hydratases, such as low cell utilization rate and the high cost of later separation, which can be solved effectively by immobilization of cells. Several commonly embedding immobilization methods by evaluating the reaction batches and the activity recovery rate of immobilized enzymes with nitrile hydratase containing recombinant *E. coli* cells as the research object to find a suitable immobilization method were compared. The results showed that DA-F127 was the most suitable material for immobilization of recombinant *E. coli* cells. When the concentration of DA-F127 was 15% , the UV irradiation distance was 20cm , the irradiation time was 6min , and the cell content was 20mg/g carrier , the recovery rate of enzyme activity is 89.74% , and it could be reused up for 9 batches to covert 150g/L 3-cyanopyridine. The conversion rate of the ninth batch could reach to 98.26% . The nicotinamide yield was increased by 12 times compared with the same amount of free cell catalysis.

Key words DA-F127 Nitrile hydratase Immobilization cell Nicotinamide