

固定化木聚糖酶的比较研究

张 剑, 范 芳

(武汉工业学院化学与环境工程系, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 以海藻酸钠和壳聚糖两种载体对木聚糖酶进行固定化, 研究游离酶和固定化酶的性质。结果表明, 游离酶的 $K_m=0.546$ mg/L, 以海藻酸钠和壳聚糖为载体的固定化酶的 K_m 分别为 38 mg/L 和 0.342 mg/L。尽管以壳聚糖固定的酶的最适 pH 与游离酶相同(都为 5.0), 但前者的适宜 pH 范围明显变宽; 而经海藻酸钠固定的酶, 最适 pH 向酸性范围移动 0.5 个 pH; 两种载体固定的酶最适温度与游离酶相比, 都从 40 提高到 50。实验还表明, 固定化酶提高了游离酶的贮藏稳定性。

关键词: 木聚糖酶; 壳聚糖; 海藻酸钠; 固定化

中图分类号: Q814; Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2007)02-0035-03

Comparative Study on Immobilized Xylanase

ZHANG Jian and FAN Fang

(Department of Chemical & Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

Abstract: Xylanase was immobilized by chitosan and sodium alginate as carrier respectively and the properties of free xylanase and immobilized xylanase were investigated. The results indicated that the K_m value of free xylanase was 0.546 mg/L, and the K_m values of immobilized xylanase with sodium alginate as carrier and chitosan as carrier were 38 mg/L and 0.342 mg/L respectively. The best pH value for immobilized xylanase with chitosan as carrier and free xylanase was the same (both as 5.0), but the former one had wider pH range. The optimal pH value for immobilized xylanase with sodium alginate as carrier shifted 0.5 pH value to acidity direction. The optimal temperature of immobilized xylanase increased from 40 to 50 compared with free xylanase. The experiments also showed that the immobilized xylanase had better storage stability than free xylanase.

Key words: xylanase; chitosan; sodium alginate; immobilization

半纤维素是陆生植物中除纤维素外, 含量最丰富的碳水化合物, 木聚糖酶(Xylanase, EC. 3.2.1.8)是降解木聚糖酶系中最关键的酶, 被广泛用于酿造中的澄清以及食品、饲料、造纸和纺织工业中^[1]。然而国内大多数厂家使用的都是进口酶。但该酶稳定性差, 保质期短, 重复利用率低, 往往使应用成本增高。

固定化酶是 20 世纪 60 年代发展起来的一项新技术。该技术除保留游离酶的优点外, 还具有游离酶无法媲美的优越性, 如可耐一定强度的酸、碱、热及有机溶剂, 能反复使用^[2]。目前, 国内外有关木聚糖酶固定化的报道很少。本文以海藻酸钠和壳聚糖两种载体将木聚糖酶固定, 从耐热性、酸度、温度、米氏常数、贮藏稳定性等方面比较了固定化木聚糖酶的性质。

1 材料与方 法

1.1 材 料

D-木糖(生化试剂), 配成 1% 的水溶液; 木聚糖(生化试剂, sigma 公司产品); 木聚糖酶(丹麦 NOVOZYMES 公司生产, 由武汉华润啤酒股份有限公司提供); 海藻酸钠、明胶(武汉光明乳业有限公司提供); 3,5-二硝基水杨酸, 化学纯; 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

酸度计, 真空抽滤机, 磁力搅拌器, 721 分光光度计, 恒温水浴锅等。

1.3 方 法

基金项目: 湖北省教育厅项目资助(D2005118004)和武汉工业学院大学生科研立项重点项目资助。

收稿日期: 2006-11-22

作者简介: 张剑(1970-), 男, 湖北汉川人, 硕士, 讲师, 主要从事酶的研究与开发。

1.3.1 酸水解壳聚糖的制备

取 20 g 甲壳素两份于 100 mL, 400 mL 25 % NaOH 溶液中, 在搅拌条件下分别反应 3 h 和 5 h, 经抽滤得到的固体, 用 1 % NaCl 溶液和蒸馏水反复冲洗至中性后, 置入 105 °C 通风干燥箱里通风干燥至恒重。采用线性电位滴定法^[3]测定脱乙酰度, 得到两种产物的脱乙酰度分别为 66 % 和 82 %。

取上述两种干燥产品, 用适量 0.8290 mol/L 的盐酸溶解, 于 100 °C 水浴中反应 30 min 后, 改用 1.070 mol/L NaOH 溶液中和至中性。反应后的产物经抽滤、水洗, 并用丙酮脱水, 放入通风干燥箱中通风干燥至恒重, 得酸水解壳聚糖。采用粘度法^[4-5]测两种酸水解产物的近似分子量分别为 5.60×10^5 和 2.18×10^5 。

固定化研究发现, 脱乙酰度高的壳聚糖具有溶解性能好、热稳定性能高、单位载体固定化酶量大等优点, 故下述实验中的壳聚糖采用脱乙酰度高的酸水解产物为载体。

1.3.2 固定化木聚糖酶的制备

根据酶包埋在有限空间还是吸附到支持物或载体材料上的区别, 固定化酶可分为吸附法、交联法、共价法和包埋法等 4 大类。本文分别采用壳聚糖(吸附和交联法)和海藻酸钠(包埋法)两种载体对木聚糖酶进行了固定, 比较了两种固定化效果。

1.3.2.1 壳聚糖对木聚糖酶的固定化

取壳聚糖溶于 4 % 醋酸溶液中, 得粘稠状液体, 用 6 号注射器针头将该液体从 15 cm 高度向下注入由 20 % NaOH + 30 % 甲醇 + 50 % 去离子水组成的溶液中, 立刻形成光滑的空心微球, 微球经洗净后, 加到 1 % 戊二醛溶液中(戊二醛浓度过低, 与壳聚糖的交联不完全, 超过 1 % 浓度, 酶的回收率基本不变), 室温搅拌放置 4 h。待硬化完全后, 经多次水洗、抽滤, 以洗去未藕联的戊二醛。取出微球, 加到经稀释的 250 mL 木聚糖酶溶液中, 慢速搅拌 17 h。洗出固定化酶, 冰箱保存。

1.3.2.2 海藻酸钠对木聚糖酶的固定化

取原酶液 15 mL 与 150 mL 的 3 % 的海藻酸钠溶液混合搅拌, 再加入 150 mL 3 % 明胶溶液(其中酶液、海藻酸钠、明胶用 pH 5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液溶解), 用 6 号注射器针头以 15 cm 高度向下注入到 1 % 的氯化钙溶液中, 立刻形成光滑的微球。于冰箱放置 30 min。经抽滤滤出微球, 置入 30 °C 5 % 的戊二醛中, 硬化 1 h, 待微球达到一定硬度后, 用生理盐水反复洗涤, 洗出的固定化酶于冰箱保存。

1.3.3 木聚糖酶活力测定

用 DNS 法, 参见文献[6]。

1.3.4 固定化酶活力测定

固定化酶的活力测定基本与游离酶相同, 只是酶反应时保持搅拌状态, 使其混合均匀。

1.3.5 酶活力的定义

40 °C 每毫升酶液每分钟水解木聚糖生成 1 μmol 木糖所相当的酶量为一个活力单位。

1.3.6 实验方法

将游离酶、两种载体对木聚糖酶固定化性质进行讨论。

2 结果与分析

2.1 1 % 木聚糖标准曲线绘制

分别吸取 1 % 的 D- 木糖标准溶液 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 和 6.0 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度。各取 0.5 mL 于试管中, 依次加入 1.5 mL 缓冲液, 3.0 mL 的 DNS 试剂后, 沸水浴中反应 5 min, 取出, 加 10 mL 的蒸馏水, 摇匀。以水代替木糖稀标准溶液作对照。冷却, 于波长 540 nm 处用分光光度计测定吸光度 \AA 。以吸光度 \AA 为纵坐标, 木糖含量(单位: 0.2 mg/mL) 为横坐标, 所作出的标准曲线线性方程为: $Y = 1.09464X - 0.09132$, 相关系数 $r = 0.9994$ 。

2.2 固定化酶的性质

2.2.1 最适 pH

以不同 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液溶解木聚糖和稀释酶(或固定化酶), 按 1.3.3 或 1.3.4 的方法测酶活。以 pH 值为横坐标, 最大吸光度 \AA 的相对酶活为 100 %, 其他酶活与最大吸光度酶活的比值为纵坐标, 作得的曲线见图 1。

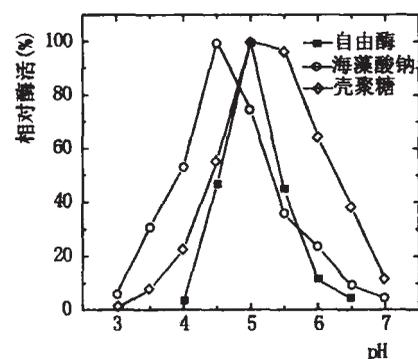


图 1 pH 对酶活的影响

从图 1 可知, 游离酶和经壳聚糖固定的酶最适 pH 为 5.0, 但用壳聚糖固定的酶工作范围明显比游离酶宽, 且向偏碱性方向移动, 这是由于壳聚糖分子含有游离氨基的缘故。经海藻酸钠固定的酶的最适 pH 为 4.5, 其原因与载体呈酸性有关。因此进行实际生产时, 应根据需要确定适当的固定化方法。

2.2.2 最适温度

在温度分别为 30、40、50、60、70 和 80 的水浴中, 按 1.3.3 或 1.3.4 的方法测酶活。以温度为横坐标, 以不同温度下的酶活占最适温度下的酶活的比率为纵坐标。绘制得的曲线见图 2。

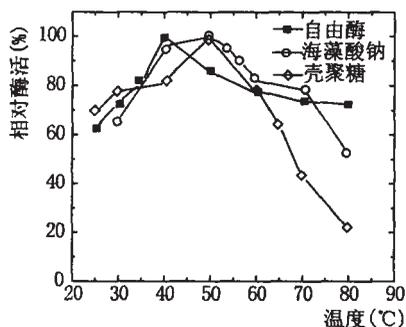


图 2 温度与酶活的关系

图 2 表明, 用海藻酸钠固定的木聚糖酶与用壳聚糖固定的木聚糖酶的最适温度都从 40 提高到 50, 但以海藻酸钠载体固定的酶的温度曲线较平缓, 适应的温度范围更宽。由此可见, 海藻酸钠载体固定的木聚糖酶热稳定性优于壳聚糖载体。

2.2.3 耐热性(图 3)

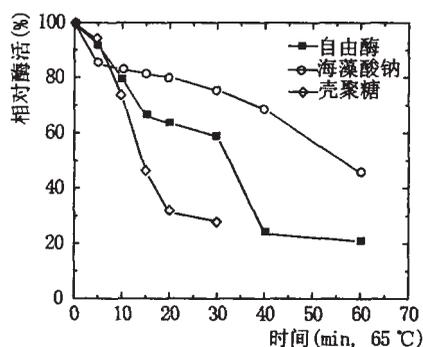


图 3 酶的耐热性

图 3 显示, 海藻酸钠固定的酶耐热性最好, 而壳聚糖固定的酶相对酶活比游离酶下降还快。可见, 海藻酸钠载体固定木聚糖酶热稳定性能优于壳聚糖载体。

2.2.4 米氏常数(Km)

分别以不同浓度的木聚糖为底物, 在温度为 50 (游离酶 40), pH 值为 5.0 的条件下测酶活, 按照 Lineweaver-Burk 作图法作图(见图 4)。由米氏方程求出 Km。游离酶的米氏常数 Km=0.546 mg/L, 用海藻酸钠-明胶为载体的固定化酶的米氏常数 Km 为 38 mg/L, 用壳聚糖为载体的固定化酶的 Km=0.342 mg/L。这表明: 用海藻酸钠固定的木聚糖酶的米氏常数大, 其对底物的亲和力小; 可能是因该法使用的固定化方式为包

埋法, 使酶与底物接触的几率减小, 表现出 Km 值升高。

用壳聚糖为载体固定的木聚糖酶的米氏常数小, 对底物的亲和力大, 这是由于壳聚糖交联的木聚糖酶发生在微球表面, 增加了酶密度的缘故^[7]。

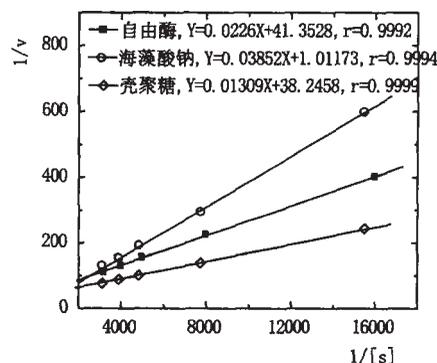


图 4 Lineweaver-Burk 关系图

2.2.5 固定化酶的贮藏稳定性

在温度为 4 时, 游离酶和固定化酶都相当稳定, 但在室温(25)下, 游离酶的半衰期只有 3 d, 而以壳聚糖为载体需 4 d, 海藻酸钠为载体固定化酶需 8 d, 这表明海藻酸钠载体固定化木聚糖酶的贮藏稳定性较壳聚糖的要好。

3 结论

用海藻酸钠载体固定的酶具有较好的热稳定性, 最适 pH 值较游离酶向偏酸性方向移动, 但由于酶被包埋起来, 酶活损失大, 对底物的亲和力小。用壳聚糖载体固定的酶, 其耐热性和稳定性都较差, 但固定化酶的适宜 pH 范围宽, 酶活回收率高(58%)。总体来讲, 这两种载体用作固定化酶都不很理想, 为此探索合适的载体, 有待于做更深层次的研究。

参考文献:

- [1] 胡沂淮, 邵蔚蓝. 木聚糖酶[J]. 生命的化学, 2002, 22 (3): 281-285.
- [2] 朱惠莉, 黎锡流. 糖化酶的固定化研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(6): 75-78.
- [3] 柯火仲, 陈庆绸. 线性法电位滴定壳聚糖[J]. 化学通报, 1990, (10): 44-46.
- [4] 蒋挺大. 粘度的测定. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [5] 周锦兰, 张开诚. 粘度法测定高聚物相对分子质量. 实验化学[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2005.
- [6] 费笛波, 冯观泉, 袁超. 饲用木聚糖酶活性测定方法的研究[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(2): 53-58.
- [7] 张剑, 张开诚, 方华, 等. 四种壳聚糖载体固定化糖化酶的比较研究[J]. 酿酒科技, 2006, (1): 35-38.