

文章编号: 1009-038X(2004)04-0060-05

离子交换树脂固定果糖转移酶

张艳, 江波*, 陈超

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 超声波破碎黑曲霉细胞提取游离果糖转移酶, 然后选择 D201 大孔阴离子交换树脂为载体, 通过先吸附后交联的方法固定果糖转移酶。优化的固定化条件: 加酶量为每克湿树脂 400 U, 吸附 pH 值为 5.0 ~ 5.5, 吸附温度为 30 °C, 吸附时间为 8 h, 交联剂戊二醛(终)质量浓度为 0.01 ~ 0.05 g/dL, 交联时间为 8 h, 交联温度为 1 ~ 4 °C。固定化酶活最高回收率为 30.2 %。

关键词: 低聚果糖; 果糖转移酶; 固定化; 阴离子交换树脂

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

Immobilizing Fructosyltransferase with Ion-exchange Resin and the Optimal Conditions

ZHANG Yan, JIANG Bo*, CHEN Chao

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Fructosyltransferase was extracted from the cells of *Aspergillus niger* with ultrasonic treatment, and then was immobilized through adsorption and crosslinking. The carrier was D201 macroporous anion-exchange resin. The optimum conditions for the immobilization were as follows: 400 U of enzyme per g wet resin, pH 5.0 ~ 5.5, 30 °C, and 8 hours, respectively. The crosslinking temperature and time were 1 ~ 4 °C and 8 h respectively, and the concentration of the crosslinking agent (glutaraldehyde) was 0.01 ~ 0.05 g/dL. The maximum yield of immobilized enzyme was 30.2 %.

Key words: fructooligosaccharides; fructosyltransferase; immobilization; anion-exchange resin

低聚果糖是一种保健食品, 具有很多对人体有益的功能, 如它热量低, 不引起龋齿, 润肠通便, 是双歧杆菌的增殖因子等^[1], 所以低聚果糖的工业化生产对促进我国低聚果糖研究和国民经济发展具有重要的意义。目前国内江波等人已经利用游离酶进行工业化生产低聚果糖, 并对其固定化生产高含量低聚果糖进行了较深入地研究^[2,3]。普通酶法生产具有工艺简单等特点, 但生物催化剂无法重复使

用, 生产上也只能使用批量法, 而固定化技术则可克服上述缺点。树脂是工业上使用最广的材料之一, 它价格低廉, 机械强度高, 物化性能稳定, 容易再生, 作为固定化载体使用有广阔的应用前景^[4,5]。用离子交换树脂进行固定化可通过离子交换吸附, 但利用此法固定在树脂上的酶蛋白结合的不够紧密, 在使用的过程中酶很容易脱落, 故在吸附之后又使用了戊二醛进行交联, 以增加固定化效果^[5],

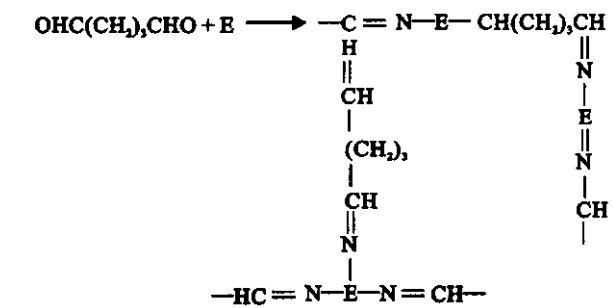
收稿日期: 2003-09-05; 修回日期: 2003-11-24。

作者简介: 张艳(1979-), 女, 安徽亳州人, 食品科学与工程硕士研究生; * 通讯作者。

万方数据

目前国内对于固定化果糖转移酶的报道较少.

交联剂戊二醛是带有两个醛基的双功能试剂 , 它与酶蛋白的结合是不可逆 Schiff 反应 ,若其使用质量浓度过高会引起酶的失活 ,其交联机理如下(E 代表酶蛋白)^[5] :



1 材料与方法

1.1 实验材料

黑曲霉 AS0023 :作者所在实验室保藏菌种 ,树脂 :江苏苏青化工集团生产 ,25 g/dL 戊二醛水溶液 (glutaraldehyde) :生化试剂 ,中国医药(集团)上海化学试剂公司生产.

1.2 主要实验仪器

T25 高度分散仪 :德国 IKA-Labortechnik 生产 ; H43-120 超声波细胞破碎仪 :无锡市超声电子设备公司制造 ;VCX400 超声波细胞破碎仪 :Sonics and materials INC 公司提供 ,SHZ-88 台式恒温水浴振荡器 :江苏太仓实验设备厂制造 ,超级恒温水浴锅 :上海实验仪器厂制造 ,GL-20B 冷冻离心机 :上海安亭科学仪器厂制造 ,酶反应器 :实验室定做.

1.3 实验方法

1.3.1 树脂的转型方法 树脂转型有静态和动态两种方法 ,作者采用静态法把 D201 型离子交换树脂转成 Cl 型 树脂 → 去离子水清洗多次 → 4 g/dL NaOH 浸泡 2 h → 去离子水清洗多次至中性 →4 g/dL HCl 浸泡 2 h → 用去离子水清洗多次至中性 → 用 2 倍体积以上去离 子水浸泡备用.

1.3.2 游离果糖转移酶提取方法 黑曲霉 AS0023 细胞的制备见参考文献 [7].称取一定量黑曲霉细胞放入烧杯中 ,加入适量的 0.05 mol/L、pH 值 5.0 的柠檬酸-磷酸缓冲液 ,在冰浴环境中用超声波处理一定时间后 ,于 4 ℃ 下冷冻离心(10 000 g) 20 min ,收集上清液在 4 ℃ 条件下进行超滤以提高单位酶活 ,压力 0.15 MPa ,截留相对分子质量 10 000 粗酶提取液放入冰箱保藏备用.

1.3.3 果糖转移酶的固定化方法 湿树脂(本实验所用树脂均为湿树脂)用滤纸吸干表面水后称取

1.0 g 放入三角瓶中 ,加入一定量酶液 ,在所需的 pH 值条件下放入恒温水浴摇床进行吸附 ,摇床摇速为 120 r/min. 吸附完成后在搅拌的情况下加入 2.5 g/dL 戊二醛溶液 ,最后静置进行交联.

1.3.4 固定化效果评价指标及其测定方法

1) 固定化果糖转移酶活^[7,8] :酶活定义 :每分钟产生 1 μmol 蔗糖三糖(1-kestose)为一个活力单位. 蔗糖三糖质量不超过总糖质量的 10 % .

交联好的树脂用约 10 倍体积的去离子水清洗 ,以除去未固定的游离酶 ,清洗后的树脂于酶反应器中测定固定化后的酶活 ,其方法同游离果糖转移酶活力测定. 用高效液相色谱测定蔗糖三糖的质量.

2) 固定化酶活回收率 :酶活回收率定义为固定化酶活与所添加的总酶活的比值.

2 结果与讨论

2.1 果糖转移酶活提取方法的选择

将不同提取方法进行对比其结果见表 1.

表 1 几种酶活提取方法的对比

Tab.1 Performance comparison of three extraction methods

提取方法	提取后单位活力/ (U/mL)	提取前总酶活/ U	提取后总酶活/ U	酶活提取率/%
高度分散仪处理 20 min	1.88	2662.66	409.84	15.39
H43-120 型超声处理 20 min	10.77	9270.10	1583.19	17.08
VCX400 型超声处理 25 min + 超滤	94.86	16365.65	8063.10	49.27

由表 1 可知 ,用高度分散仪和 H43-120 型超声波处理效果不理想 ,酶活均很低 ,而用 VCX 400 型超声波破碎黑曲霉细胞的效果却很好 ,明显高于前两种方法. 两种超声波仪器在工作功率和时间相差不大的情况下 ,其破碎效果相差很大的原因可能在于二者探头的不同. 两种超声波均为平面辐射 ,而前者超声波探头底部直径为 30 mm ,后者仅为 13 mm ,所以探头底部面积小的波密度大 ,能量集中 ,破碎效果显著 ;另外 ,两种超声波探头的材料不同 ,对破碎效果也有很大影响 ,前者为锡铅合金 ,后者为钛合金.

2.2 树脂的选择

对 D201 ,D202-Ⅱ ,D301-G 3 种型号树脂进行上述操作 ,其吸附交联情况见表 2.

表 2 3 种阴离子交换树脂的固定化

Tab. 2 Performance comparison of three kinds of anion-exchange resin on immobilization

树脂型号	每克树脂 固定化酶活/U	酶活 回收率/%
D201	65.06	30.2
D202-II	52.57	24.21
D301-G	33.21	15.42

由表 2 可知 ,D201 型树脂的固定化效果最好 ,酶活回收率达 30.2 % . 因为 D201 型树脂的强型基团容量高于其它两种树脂 ,约为 3.80 mmol/ g ,故酶蛋白与树脂进行离子交换的几率较高 ;另外也可能 D201 型树脂的孔径更有利于该酶蛋白与它进行离子交换吸附 ,故选择 D201 型树脂作为本实验的固定化材料.

2.3 固定化条件的选择

2.3.1 吸附条件的选择

1) 加酶量的选择 选择不同的加酶量 ,固定以下条件进行吸附交联 :吸附 pH 值为 5.0 ,吸附时间 10 h ,吸附温度 30 ℃ ,戊二醛(终)质量浓度 0.4 g/ dL ,交联时间 12 h ,交联温度 4 ℃ ,其效果见图 1.

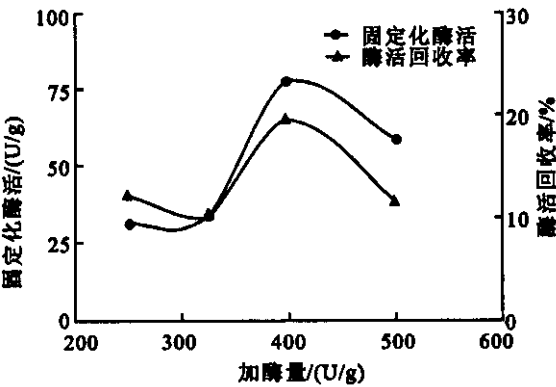


图 1 加酶量对固定化效果的影响

Fig.1 Effect of enzyme addition amount on immobilization

由图 1 结果表明 :在每克湿树脂加酶量 324 U 之前 ,随着酶液的增加 ,固定化酶活基本不变 ,并且较低 ,这是由于添加酶活过低树脂上阴离子和酶蛋白接触几率很小的缘故 ;当加酶量大于 324 U 时 ,固定化酶活才逐渐升高 ,直到每克树脂加酶量为 400 U 时 ,固定化酶活和酶活回收率才达到最好 . 当加酶量高于 400 U 时 ,酶和载体结合的几率大大增加 ,这样会造成酶分子间的空间障碍增大 ,底物和产物的扩散受到某种程度的限制 ,固定化酶活和回收率开始呈降低趋势^[5-9].

2) 吸附 pH 值的选择 :在吸附 pH 值分别为

4.5 5.0 6.0 7.0 时进行固定化 ,其它条件为 :每克树脂加酶量为 412 U ,吸附时间 10 h ,吸附温度 30 ℃ ,戊二醛(终)质量浓度 0.4 g/ dL ,交联时间 12 h ,交联温度 4 ℃ ,见图 2.

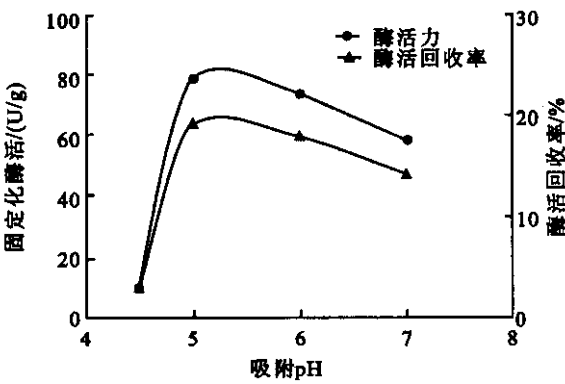


图 2 吸附 pH 值对固定化的影响

Fig.2 Effect of adsorbtion pH on immobilization

从图 2 可知 ,在 pH 值为 5.0 ~ 5.5 时 ,固定化效果最好 . 果糖转移酶的等电点为 4.5^[10] ,所以一定要保证吸附 pH 值大于 4.5 ,使酶蛋白带负电 ,这样它才与阴离子交换树脂进行离子交换 ;当然 ,当 pH 值高于一定值时 ,就改变了固定化的最适条件.

3) 吸附时间的选择 :在不同的吸附时间(3 ,6 ,8 ,10 h)下测定固定化效果 ,其它条件为 :每克树脂加酶量为 250 U ,吸附 pH 值为 5.0 ,吸附温度 30 ℃ ,交联剂戊二醛(终)质量浓度 0.04 g/ dL ,交联时间 12 h ,交联温度 4 ℃ ,见图 3.

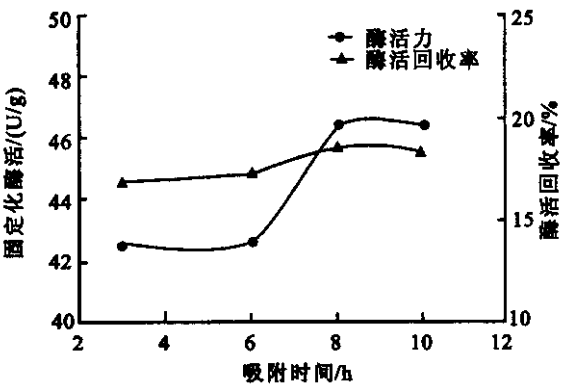


图 3 吸附时间对固定化效果的影响

Fig.3 Effect of adsorbtion time on immobilization

从图 3 可知 8 h 为最佳吸附时间 ,说明 8 h 吸附达到平衡 ;在吸附没有达到平衡前 ,随着时间的增加 ,酶蛋白和树脂的离子交换一直增加 ,而在平衡后再继续增加吸附时间 ,树脂上可供交换的阴离子基本上没有了 ,固定化酶活基本不变.

4) 吸附温度的选择 :改变吸附温度(20 ,30 ,40 ℃)进行固定化 ,其它条件为 :每克树脂加酶量

为 412 U ,吸附 pH 值为 5.0 ,吸附时间 10 h ,戊二醛 (终) 质量浓度 0.4 g/dL ,交联时间 12 h ,交联温度 4 ℃ ,见图 4.

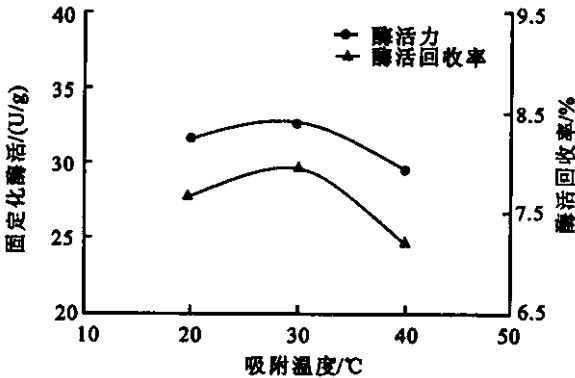


图 4 吸附温度对固定化效果的影响

Fig.4 Effect of adsorbntion temperature on immobi-
lization

从图 4 可知 ,30 ℃ 为最佳吸附温度.这是因为 :蛋白质的吸附是吸热过程 ,在温度较低时 ,酶不容易吸附到树脂上 ;而在温度较高时 ,则可能引起酶的失活.

2.3.2 交联条件的选择

1) 交联剂质量浓度的选择 :选择不同的戊二醛质量浓度进行固定化 ,其它条件为 :每克树脂加酶量为 412 U ,吸附 pH 值为 5.0 ,吸附时间 10 h ,吸附温度 30 ℃ ,交联时间 12 h ,交联温度 4 ℃ ,见图 5.

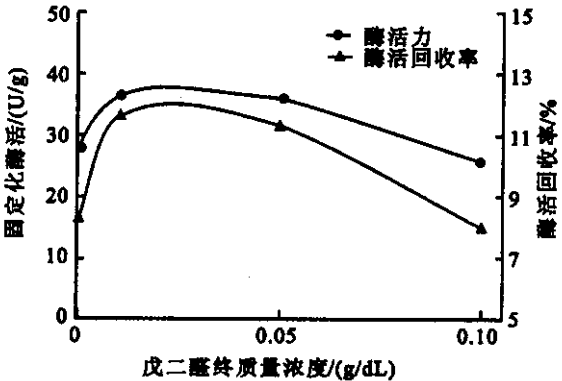


图 5 交联剂戊二醛终质量浓度对固定化的影响

Fig.5 Effect of crosslinking concentration agent on
immobilization

从图 5 可知 ,戊二醛 (终) 质量浓度为 0.01 ~ 0.05 g/dL 时固定化效果较好.戊二醛质量浓度过低 ,和酶蛋白交联的量少 ,酶不能完全牢固地吸附在树脂上 ;若质量浓度过高和酶蛋白反应过于剧烈 ,使酶失活^[5].

2) 交联时间的选择 :改变交联时间(4 ,8 ,12 ,

16 h) 进行固定化 ,其它条件 :每克树脂为加酶量 379 U ,吸附 pH 值为 5.0 ,时间 10 h ,温度 30 ℃ ;戊二醛 (终) 质量浓度 0.1 g/dL ,交联温度 4 ℃ ,见图 6.

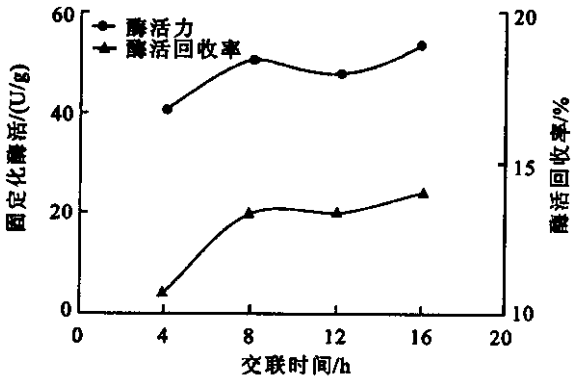


图 6 交联时间对固定化的影响

Fig.6 Effect of crosslinking time on immobilization

从图 6 可知 ,交联反应 8 h 固定化效果最好.低于 8 h ,戊二醛和酶蛋白的反应还不完全 ;高于 8 h ,戊二醛可发生交联反应的醛基数目已经很少了 ,所以再增加交联时间固定化酶活和回收率也基本不变.

3) 交联温度的选择 :在不同的交联温度(1 ℃ ,10 ℃) 下进行固定化 ,其它条件 :每克树脂为加酶量 379 U ,吸附 pH 值为 5.0 ,时间 10 h ,温度 30 ℃ ;戊二醛质量浓度 0.1 g/dL ,交联时间 12 h ,见图 7.

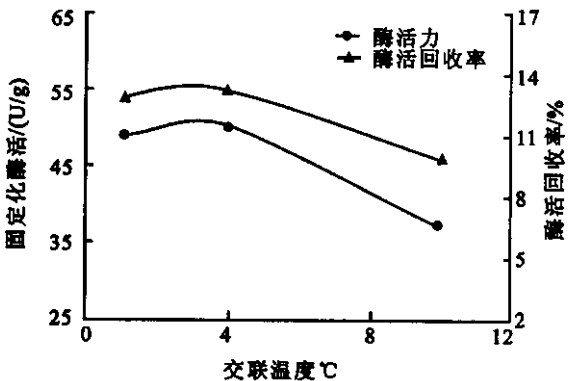


图 7 交联温度对固定化的影响

Fig.7 Effect of crosslinking temperature on immobi-
lization

从图 7 可看出 :交联温度在 1 ~ 4 ℃ 时固定化酶活及其回收率变化不明显 ,但有上升的趋势 ,这是因为温度过低戊二醛会发生分子间交联 ;在 4 ~ 10 ℃ 时固定化酶活回收率有明显的下降 ,估计是温度偏高不利于交联反应进行 ,且酶容易失活 ,所以选择交联温度 1 ~ 4 ℃ .

3 结 论

用 VCX400 型超声波处理黑曲霉细胞提取果糖转移酶,提取率可达到 49.27 %,选择 D201 大孔阴离子交换树脂作为载体,通过先吸附后交联的方

法固定果糖转移酶.优化的固定化条件:每克树脂加酶量为 400 U,吸附 pH 值为 5.0 ~ 5.5,温度 30 ℃,时间 8 h,交联剂戊二醛(终)质量浓度 0.01 ~ 0.05 g/dL,交联时间 8 h,交联温度 1 ~ 4 ℃.固定化酶活的回收率最高为 30.2 %.

参考文献：

[1] JONG Won Yun. Fructooligosaccharides —Occurrence , preparation and application[J]. **Enzyme and Microbial Technol** , 1996 ,19 :107 – 117.

[2] 江波,王璋,丁霄霖.共固定化生产高含量低聚果糖的研究[J].食品与发酵工业,1996 (1) :1 – 6.

[3] 史锋,江波,王璋.连续生产低聚果糖的最佳操作参数[J].无锡轻工大学学报,2000 ,(1) :1 – 4.

[4] 张树政.酶制剂工业(上册)[M].北京:科学出版社,1998.

[5] 陈陶声,居乃琥,陈石根.固定化酶理论与应用[M].北京:轻工业出版社,1987.

[6] 钱庭宝.离子交换剂应用技术[M].天津:天津科学技术出版社,1984.

[7] 江波.固定化黑曲霉生产低聚果糖的研究[D].无锡:无锡轻工业学院,1992.

[8] Hidemasa Hidaka ,Masao Hirayama ,Naomi Sumi. A Fructooligosacchrude-producing enzyme from *aspergillus niger* ATCC 20611 [J]. **Agric Biol Chem** ,1988 ,52(5) :1181 – 1187.

[9] 邢晓慧,吕晓玲.胰蛋白酶的固定化及其性质的研究[J].食品研究与开发,2002 ,23(1) :17 – 19.

[10] Chung-Jen Chiang ,Wen-Chien Lee. Immobilization of β -fructofuranosidases from *aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides[J]. **Biotechnol Prog** ,1997 ,13 :577 – 582.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 40 页)

参考文献：

[1] Stuvén R ,Bock E. Nitrification and denitrification as a source for NO and NO₂ production in high-strength wastewater[J]. **Wat Res** ,2001 ,35(8) :1905 – 1914.

[2] Garrido J M ,Campos J L ,Lema J M. Nitrous oxide production by nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor[J]. **Wat Sci Tech** ,1997 ,36(1) :157 – 163.

[3] Moriyama K ,Sato K ,Harada Y ,*et al.* Simultaneous biologicalremoval of nitrogen and phosphorus using oxic-anaerobic-oxic process[J]. **Wat Sci Tech** ,1990 ,22(7 ~ 8) :61 – 66.

[4] Masuda S ,Watanabe Y ,Ishiguro M. Biofilm proerties and simultaneous nitrification and denitrification in aerobic rotating biological contactors[J]. **Wat Sci Tech** ,1991 ,23 :1355 – 1363.

[5] Kokufuta E ,Shimohashi M ,Nakamura I. Simultaneously occurring nitrification anddenitrification under oxygen gradient by polyelectrolyte complex-coim-mobilised *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* cell[J]. **Biotech Bioeng** ,1988 ,31 :382 – 384.

[6] 国家环境保护局.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,1989.

[7] Itokawa H ,Hanaki K ,Matsuo T. Nitrous oxide emission during nitrification and denitrification in a fullscale night soil treatment plant[J]. **Wat Sci Tech** ,1996 ,34(1 ~ 2) :277 – 284.

[8] Czepiel P ,Crill P ,Harriss R. Nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment[J]. **Environ Sci Tech** ,1995 ,29 :2352 – 2356.

(责任编辑 杨 勇)