

一种复合酶的固定化及应用研究

虎亚芳, 刘育容, 丁克毅*, 刘 军

(西南民族大学 化学与环境保护工程学院, 四川 成都 610041)

摘要: 以壳聚糖为原料制备了壳聚糖微球, 并通过扫描电镜对微球的形态和结构进行了表征。以自制的壳聚糖微球为载体固定化复合酶, 分别通过单因素试验和正交试验, 对影响酶固定化效果的因素及固定化酶的酶学性质进行了考察, 并采用 HPLC 对其应用于催化京尼平苷制备京尼平的效果行了研究。结果表明: 壳聚糖微球平均粒径约为 2 μm , 表面呈多孔结构。酶固定化最优化条件为: 吸附时间 4 h, 交联时间 1 h, 交联剂质量分数 0.2%。固定化酶的最适温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, 游离酶最适温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 且固定化酶温度稳定性比游离酶高; 固定化酶与游离态酶的最适 pH 5.0, 且固定化酶 pH 稳定性比游离酶高; 固定化酶在使用 8 次以后剩余酶活力仍在 50% 以上; 固定化酶湿态储存适合短期内使用和储存, 干态储存适合长期储存。采用此固定化方法制得的固定化酶催化京尼平苷水解制备京尼平效果良好。

关键词: 壳聚糖; 复合酶; 固定化; β -葡萄糖苷酶

中图分类号: Q 814.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)04—0416—06

Immobilization and Application of a Composite Enzyme

HU Yafang, LIU Yurong, DING Keyi*, LIU Jun

(School of Chemistry & Environmental Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: Making chitosan as raw material, chitosan microspheres were prepared. The morphology and structure of the microspheres were characterized by SEM. Composite enzyme was immobilized by using chitosan microspheres as carrier. The influence of factors affecting the effect of immobilization enzyme was investigated via single factor test and orthogonal test. The enzymatic properties of immobilized enzyme were investigated also. The application effect of using the immobilized enzyme to hydrolysis geniposide to genipin was researched via HPLC method. The results indicated that, the average diameter of chitosan microsphere was about 2 μm and has a porous surface. The optimal conditions for enzyme immobilization were: adsorption time 4 h, crosslink time 1 h, concentration of crosslinking agent 0.2%. The optimum applying temperature for immobilized enzyme was 60 $^{\circ}\text{C}$, and 55 $^{\circ}\text{C}$ for free enzyme. Both temperature stability and pH stability of immobilized enzyme were higher than that of free enzyme. Both of the optimum pH for immobilized enzyme and free enzyme was 5.0. The residual enzyme activity of immobilized enzyme

收稿日期: 2013-12-17

基金项目: 四川省应用基础研究计划项目(2012JY0098); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(12ZYXS75)。

* 通信作者: 丁克毅(1966—), 男, 湖北仙桃人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: keyiding2000@aliyun.com

was more than 50% after being used for 8 times. For immobilized enzyme, wet storage was suitable for short-term application and storage, however, dry storage was suitable for long-term storage. The effect was perfect using the immobilized enzyme to hydrolysis geniposide to genipin.

Keywords: citosan, composite enzyme, immobilization, β -glucosidase

酶是一种常见的生物催化剂,其催化效率可高达 $10^6 \sim 10^{13}$,在生产、生活中的应用广泛^[1]。因纯酶价格昂贵,如 1 g 纯 β -葡萄糖苷酶的价格约是 1 g 复合 β -葡萄糖苷酶价格的 1 000 倍左右。所以在生产中多采用的是复合酶。复合酶一般是指几种不同种类的酶混在一起的粗酶,在食品^[2-3]、饲料^[4-5]和纺织等领域有广泛的应用。复合酶价格适中,生产成本较低,因而成为常用的工业化生产方法。但游离态酶在使用过程中存在耗酶量大、难分离、不能重复使用、反应周期长等缺点^[6]。因此提高在过程中的利用率是推广酶在大规模生产中应用的关键。酶的固定化^[7-8](Immobilization of enzymes)是采用有机或无机固体材料作为载体,将酶包埋起来或束缚、限制于载体的表面和微孔中,使其仍具有催化活性,并可回收及重复使用的酶化学方法与技术。与游离酶相比,固定化酶在使用过程中稳定性较高,而且固定化酶与反应液可以通过简单的过滤离心等方法进行分离,有利于产物的纯化和酶的多次使用,更有利于在工业中的大规模生产。

京尼平(Genipin)是梔子苷经 β -葡萄糖苷酶水解后得到的环烯醚萜类化合物,具有很高的药用价值^[9],也是一种天然生物交联剂^[10]。因京尼平在梔子中含量较低,而京尼平苷在梔子中的质量分数达 3%~8%,所以京尼平的制备一般是采用从梔子中提取京尼平苷再用复合酶水解而制得^[9]。

近几年酶固定化研究越来越受到人们的重视,但研究多是针对纯酶,对复合酶的固定化研究报道较少。作者对一种主要成分为 β -葡萄糖苷酶的复合酶进行了固定化研究,并用 HPLC 对固定化复合酶催化京尼平苷制备京尼平的反应过程进行了考察,为酶解法对梔子中京尼平苷转化为京尼平的工艺产业化提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

复合酶,京尼平苷,纯度 $\geq 98\%$,京尼平,纯度 $\geq$

98%,对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷(PNPG),纯度 $> 98\%$;成都康邦生物科技有限公司产品;壳聚糖,脱乙酰度 $\geq 85\%$;天津市瑞金特化学品公司产品;对硝基苯酚、乙酸、戊二醛、氢氧化钠、碳酸钠均为分析纯试剂。

紫外分光光度计 UV-500;美国热电公司产品;高效液相色谱仪 Agilent1200;安捷伦公司产品;扫描电子显微镜 QUANTA 250;美国 FEI 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖微球的制备^[11]及结构表征 称取 1 g 壳聚糖加入 30 mL 质量分数为 2%的乙酸溶液,搅拌使壳聚糖完全溶解,超声脱泡后加入注射器中。将壳聚糖溶液逐滴滴入质量分数为 3%的 NaOH 中,形成壳聚糖微球,充分固化 1 h 后,滤出微球用蒸馏水充分洗涤至中性,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

取制备的壳聚糖微球经冷冻干燥、喷金后用扫描电子显微镜观察微球表面结构。

1.2.2 酶活力的测定 游离酶与固定化酶活力的测定方法参照文献[11]。

1.2.3 酶固定化单因素试验 吸附时间:依次向 1~6 号烧杯中各加入 5 g 壳聚糖微球和 10 mL 质量浓度为 0.07 g/mL 的酶液,分别吸附 1~6 h 后滤出微球,加入适量体积分数为 0.4%的戊二醛溶液交联 1.5 h。滤出微球用 pH 5.0 的缓冲液洗涤后测定各组固定化酶的酶活力。

交联时间:依次向 1~6 号烧杯中各加入 5 g 壳聚糖微球和 10 mL 质量浓度为 0.07 g/mL 的酶液,吸附 5 h 后滤出微球。分别加入加入等量体积分数为 0.4%的戊二醛溶液分别交联 0.5~3 h。滤出微球用 pH 5.0 的缓冲液洗涤后测定各组固定化酶的酶活力。

交联剂质量分数:依次向 1~5 号烧杯中各加入 5 g 壳聚糖微球和 10 mL 质量浓度为 0.07 g/mL 的酶液,吸附 5 h 后滤出微球,分别加入等量体积分数为 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%的戊二醛溶液交联 1.5 h。滤出微球用 pH 5.0 的缓冲液洗涤后测定各组

固定化酶的酶活力。

1.2.4 酶固定化条件的优化 在单因素试验的基础上,按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,并计算各组试验指标。因素水平表见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	试验因素		
	吸附时间 A/h	交联时间 B/h	交联剂质量分数 C/%
1	4	1.5	0.6
2	5	2.0	0.4
3	6	1.0	0.2

1.2.5 温度对游离酶和固定化酶的影响 将 5 g 固定化酶和 1 mL 酶液分别置于 35~75 °C 水浴锅中预热 10 min 后,测定各组酶活力。反应体系缓冲液 pH 5.0。

1.2.6 pH 对游离酶和固定化酶的影响 将 5 g 固定化酶置于 60 °C, 1 mL 酶液置于 55 °C 水浴锅中各预热 10 min 后,分别测定游离酶与固定化酶在反应体系 pH 为 4.0~6.6 时的酶活力。

1.2.7 固定化酶的操作稳定性 取 5 g 固定化酶催化 PNPG 测定酶活力,每次催化反应后回收固定化酶,用 pH 5.0 的缓冲液洗涤后进行下一次催化反应并测其酶活力。

1.2.8 固定化酶的储存稳定性 分别将适量游离酶和 5 g 固定化酶置于 pH 5.0 的缓冲液中 4 °C 储存,每周测定酶活力。将 5 g 固定化酶室温干燥后常温储存,每周测定酶活力。

1.2.9 固定化酶催化京尼平苷制备京尼平^[12] 分别精密称取适量京尼平苷和京尼平标准品,加甲醇配成标准品溶液溶液,进行定量分析。色谱条件为:色谱柱为 C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)流动相为 v (甲醇): v (水)=30:70;流量:0.8 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:238 nm;柱温:25 °C。

取 40 g 固定化酶在 pH 5.0, 温度 60 °C 条件下催化 50 mL 质量浓度为 1 mg/mL 京尼平苷,分别在反应时间为 0、20、40、60 min 时取适量反应液测定溶液成分。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖微球的结构表征

如图 1(a)为湿润状态壳聚糖微球全貌图。壳聚糖微球呈大小均一的圆球形,平均直径约为 2 mm。

(b)为壳聚糖微球经冷冻干燥后放大 100 倍的电镜扫描图。(c)为微球表面放大 12 000 倍的电镜扫描图,由图可知壳聚糖微球表面呈蜂窝状多孔结构,有利于酶通过孔道进入微球内部和酶的固定化。

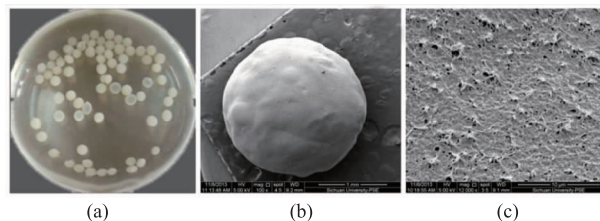


图 1 (a)湿润状态的壳聚糖微球(b)单个壳聚糖微球电镜扫描图(×100) (c)壳聚糖微球表面电镜扫描图(×12 000)

Fig. 1 (a)Chitosan microspheres at wet state (b)SEM of single chitosan microsphere (×100) (c)SEM of surface of chitosan microsphere surface(×12 000)

2.2 单因素试验

2.2.1 吸附时间 由图 2 可知,最佳吸附时间 5 h。由于壳聚糖微球内可以吸附酶的“位点”是有限的,在吸附量达到饱和之前,增加吸附时间,酶的吸附量增加,相对酶活力增加;当吸附量达到饱和之后,继续延长吸附时间也不能使微球吸附更多的酶。另外在有限的空间内,酶分子数量过高时,酶自身的构象也会发生一定变化,导致酶活力降低。

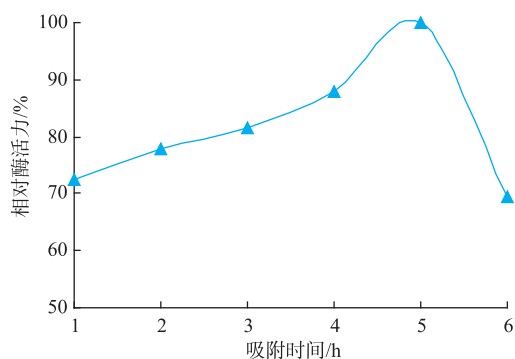


图 2 吸附时间对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of adsorption time on the activity

2.2.2 交联时间 由图 3 可知最佳交联时间为 1.5 h。戊二醛是双功能试剂^[13],它既是交联剂,同时又是酶失活剂。当交联时间小于 1.5 h 时,随着交联时间的增加,交联在壳聚糖微球上的酶量增加,酶活力逐渐增加,同时壳聚糖微球的机械强度和固定化酶的稳定性增强;当交联时间大于 1.5 h 时,随着交联时间的增加,部分已固定化的酶失活,酶活力逐

渐降低。

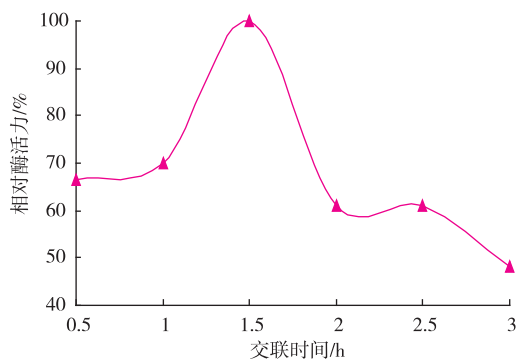


图3 交联时间对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of crosslinking time on the activity

2.2.3 交联剂质量分数 固定化酶活力随着交联剂浓度增加逐渐增加,当交联剂质量分数大于 0.4% 时,酶活力逐渐下降,这是因为戊二醛既能起到交联剂的作用又是酶失活剂,所以酶对戊二醛的用量十分敏感,当交联时间一定时,交联剂浓度过大,导致部分酶失活,固定化酶活力降低。由图 4 可知,最佳交联剂质量分数为 0.4%。

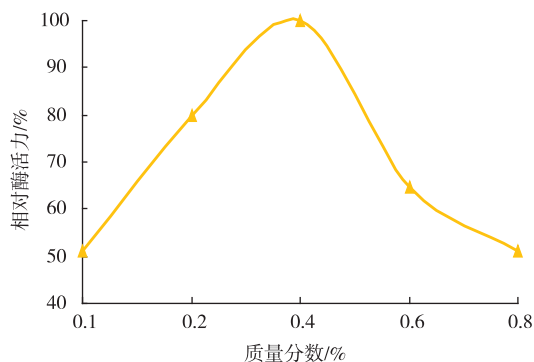


图4 交联剂质量分数对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of concentration of crosslinking agent on the activity

2.3 酶固定化条件的优化

由表 2 可知:3 个因素的主次顺序为: $B < A < C$ 。酶固定化的最佳条件为: $A_1B_3C_3$,即吸附时间 4 h,交联时间 1 h,交联剂质量分数 0.2%。

2.4 温度对游离酶和固定化酶的影响

由图 5 可知,游离酶最适温度为 55℃,固定化酶的最适温度为 60℃。固定化酶比游离酶的最适温度提高了 5℃。酶被交联在载体上,其刚性增加,要使它更好地与底物分子结合并发挥活性,就必须提高温度以增加底物的扩散速度。在较高温度时,

固定化酶比游离酶的酶活力下降得慢,因为载体对酶分子起到一定的保护作用,同时固定化作用稳定了酶分子的构象,从而减少了热致其构象变化的可能性,所以固定化酶具有更好的热稳定性。

表 2 正交试验方案及结果

Table 2 Methods and results of orthogonal test

处理号	吸附时间 A/h	交联时间 B/h	交联剂质量分数 C/%	空白列	试验结果
1	1(4)	1(1.5)	1(0.6)	1	$Y_1=0.712$
2	1	2(2.0)	2(0.4)	2	$Y_2=0.752$
3	1	3(1.0)	3(0.2)	3	$Y_3=0.826$
4	2(5)	1	2	3	$Y_4=0.698$
5	2	2	3	1	$Y_5=0.718$
6	2	3	1	2	$Y_6=0.665$
7	3(6)	1	3	2	$Y_7=0.796$
8	3	2	1	3	$Y_8=0.582$
9	3	3	2	1	$Y_9=0.663$
Dj	0.083	0.0513	0.127		
因素主次	B 交联时间 $<A$ 吸附时间 $<C$ 交联剂质量分数				
最佳条件	$A_1B_3C_3$				

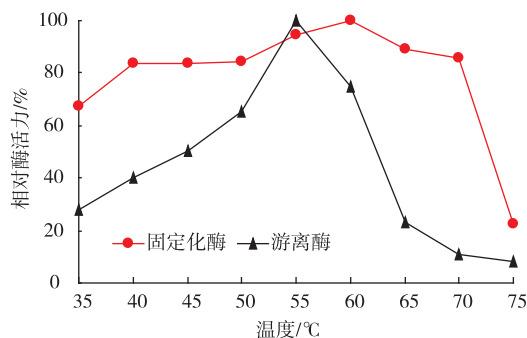


图5 温度对游离酶和固定化酶对酶活力的影响

Fig. 5 Influence of temperature on free enzyme and immobilized enzyme on the activity

2.5 pH 对游离酶和固定化酶的影响

由图 6 可知,固定化酶与游离酶的最适宜 pH 都为 5.0。酶固定化以后,pH 稳定范围变宽,是因为壳聚糖载体表面多孔且带有大量羟基、氨基等,可能对壳聚糖孔道中溶液的 pH 起到一定的缓冲作用,使得孔道内溶液的 pH 变化范围比外部的溶液变化范围窄一些,而游离酶是直接和外部溶液接触,所以受溶液 pH 影响明显一些。

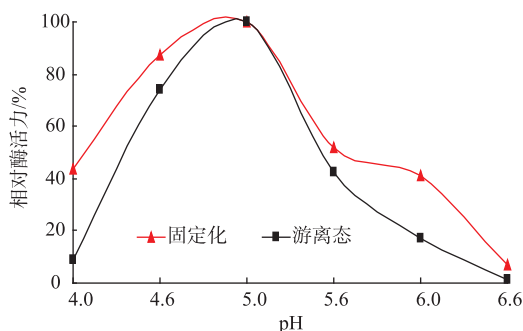


图6 pH对游离酶和固定化酶对酶活力的影响

Fig. 6 Influence of pH on free enzyme and immobilized enzyme on the activity

2.6 固定化酶的操作稳定性测定

由图7可知,固定化酶在使用8次之后,剩余酶活力仍在50%以上,说明固定化酶具有很好的操作稳定性,为实际生产中的重复利用提供了前提。固定化酶在第1~4次使用时,酶活力下降较明显,是因为部分未被固定在载体上的游离酶在洗涤过程中脱落流失,从而致使酶活力有所下降。

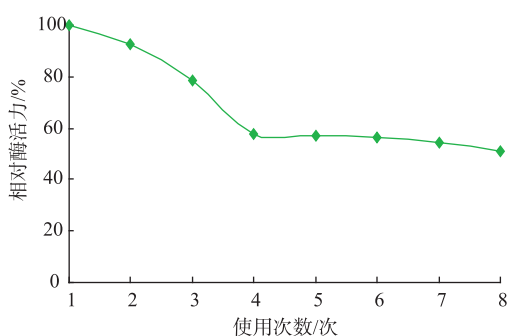


图7 固定化酶的操作稳定性

Fig. 7 Operation stability of immobilized enzyme

2.7 固定化酶的储存稳定性测定

由图8知,游离酶在4℃,pH 5.0的缓冲溶液

中,储存到第2周时,酶的活力下降趋势明显,且第2周以后酶液有明显发霉现象。固定化酶储存在4℃,pH 5.0的缓冲溶液中,储存至第5周时,相对酶活力为63%,所以其半衰期至少在35 d以上;在第6周以后有轻微发霉现象。常温干燥后,室温储存的干态固定化酶,活力降到湿态酶活力的75%,因为在干燥过程中壳聚糖小球失水,体积缩小,造成已固定的酶有部分结构发生变化,导致酶活力下降。干态储存5周后,相对酶活力降低了26%,没有发霉现象。

综上可知,固定化酶湿态储存酶活力降低较少,适合短期内使用和储存;干态储存的酶活力降低较多,但适合长期储存,这使得固定化酶在工业生产中的应用成为可能。

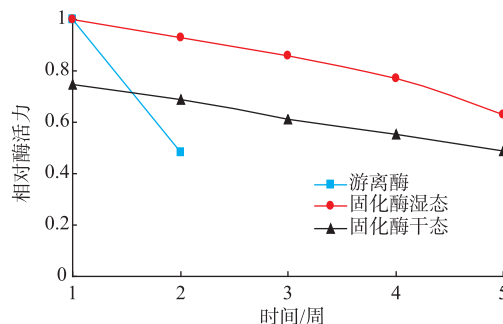


图8 固定化酶的储存稳定性

Fig. 8 Storage stability of immobilized enzyme

2.8 固定化酶催化京尼平苷制备京尼平

通过对京尼平苷和京尼平标准品的测定可得:京尼平苷出峰时间为11.5 min,京尼平出峰时间为17 min。由图9可知,随着反应的进行,原料京尼平苷的量逐渐下降为零,产物京尼平的量逐渐增加。表明用此固定化方法制得的固定化酶催化京尼平苷制备京尼平方法可行,效果良好。

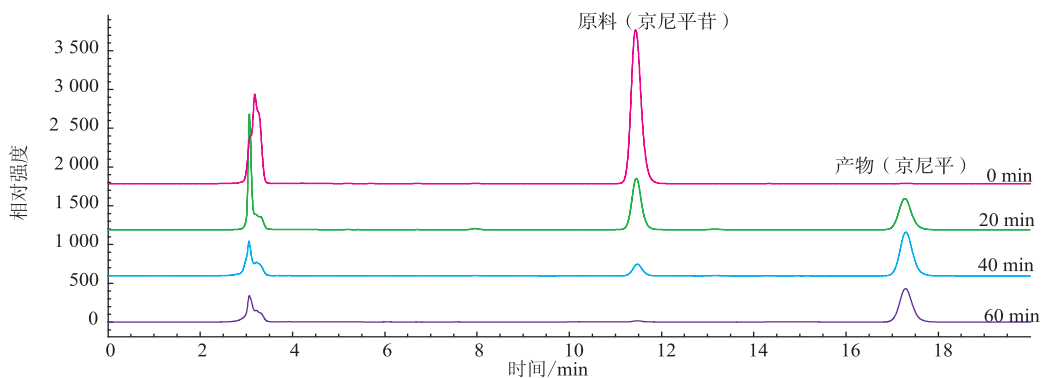


图9 固定化酶催化京尼平苷的过程

Fig. 9 Process of geniposide was catalyzed by immobilized enzyme

3 结 语

复合酶在生产过程中应用广泛,但有关复合酶的固定化的研究报道较少,作者以自制壳聚糖为载体,对复合酶进行固定化,并通过电镜扫描发现自制的壳聚糖微球表面呈蜂窝多孔,适合作为固定化

载体。研究表明最佳的固定化条件为:吸附时间为4 h,交联时间为1 h,交联剂质量分数为0.2%,这种方法制备固定化复合酶的方法可行,固定化后的复合酶的酶学性质与游离酶相比有了较大的提高和改善,更有利于实际生产。用制得的固定化复合酶催化京尼平苷制备京尼平效果良好。

参考文献:

- [1] ZHAO Xuebing, WU Ruchun, LIU Dehua. Production of pulp, ethanol and lignin from sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid delignification[J]. **Biomass and Bioenergy**, 2011, 35: 2874-2882.
- [2] 王宇, 叶盛权, 姜秋焕. 复合酶降解壳聚糖研究[J]. 广东农业科学, 2013, 5: 95-98.
WANG Yu, YE Shengquan, JIANG Qiuhuan. Study on the degradation of chitosan by compound enzyme [J]. **Guangdong Agricultural Sciences**, 2013, 5: 95-98. (in Chinese)
- [3] 陈蓉蓉, 姜华, 蒲含林. 酶解法制备白藜芦醇的工艺优化[J]. 中国食品添加剂, 2011, 5: 64-67.
CHEN Rongrong, JIANG Hua, PU Hanlin. Optimization technology for production of resveratrol by enzyme [J]. **China Food Additives**, 2011, 5: 64-67. (in Chinese)
- [4] Mathlouthi N, Ballet N, Larbier M. Influence of beta-glucanase supplementation on growth performances and digestive organs weights of broiler chickens fed corn, wheat and barley-based diet [J]. **International Journal of Poultry Science**, 2011, 10(2): 157-159.
- [5] Lee S Y, Kim J S, Kim J. Effects of multiple enzyme containing carbohydrases and phytase on growth performance and intestinal viscosity in broiler chicks fed corn-wheat-soybean meal based diets [J]. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 2010, 23(9): 1198-1204.
- [6] 张娇, 周廉淇, 田芳, 等. 采用磁性载体制备的固定化酶反应器的载体粒径对蛋白质酶解性能的影响[J]. 色谱, 2013, 31(2), 102-110.
ZHANG Jiao, ZHOU Lianqi, TIAN Fang, et al. Effects of the size of magnetic particles of immobilized enzyme reactors on the digestion performance[J]. **Chinese Journal of Chromatography**, 2013, 31(2): 102-110. (in Chinese)
- [7] Hernandez K, Fernandez-Lafuente R. Control of protein Immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2011, 48(2): 107-122.
- [8] 陈建龙, 祁建城, 曹仪植, 等. 固定化酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2006(2): 7-9.
CHEN Jianlong, QI Jiancheng, CAO Yizhi, et al. Research progress of immobilized enzyme [J]. **Chemistry & Bioengineering**, 2006(2): 7-9. (in Chinese)
- [9] 曾彦雯, 梁华正, 谢键私, 等. 京尼平和栀子苷含量的高效液相色谱法同时测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2344-2346.
ZENG Yanwen, LIANG Huahong, XIE Jianhong, et al. Determination of geniposide and genipin simultaneously by HPLC [J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2011, 22(10): 2344-2346. (in Chinese)
- [10] Yang C Y, Hsu C H, Tsai M L, et al. Effect of Crosslinked Condition on Characteristics of Chitosan/tripolyphosphate/genipin Beads and Their Application in the Selective Adsorption of Phytic acid from Soybean Whey[J]. **Carbohydr Polym**, 2011, 86(2): 659-666.
- [11] 虎亚芳, 丁克毅, 刘军. 两种不同方法固定化 β -葡萄糖苷酶的研究[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2013, 39(4): 520-524.
HU Yafang, DING Keyi, LIU Jun. Immobilization of β -Glucosidase by chitosan [J]. **Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition**, 2013, 39(4): 520-524. (in Chinese)
- [12] 徐尤智, 梁华正, 陈贺, 等. 高色价栀子蓝色素的制备及其稳定性研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(4): 440-443.
XU Youzhi, LIANG Huahong, CHEN He, et al. Study on preparation and stability of high color value gardenia blue [J]. **Modern Food Science & Technology**, 2011, 27(4): 440-443. (in Chinese)
- [13] 陈辉, 张剑波, 王维敬, 等. 壳聚糖固定化云芝漆酶的制备及特性[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2006, 42(2): 254-258.
CHEN Hui, ZHANG Jianbo, WANG Weijing, et al. Preparation and characteristics of immobilized laccase from coriolus versicolor on chitosan[J]. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis**, 2006, 42(2): 254-258. (in Chinese)