

壳聚糖酶的 DEAE 纤维素固定化与性质研究

郑连英 肖玉良

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 以 DEAE 纤维素为载体、戊二醛为交联剂固定壳聚糖酶, 确定了交联剂的最佳用量为 100mg DEAE 纤维素与 5mL 5% 戊二醛交联, 酶与载体的最佳比例为 23mg 酶/g DEAE 纤维素, 固定化酶的最适温度和 pH 分别为 60°C 和 4.0, 其米氏常数为 18.87g/L; 所得固定化酶活力可达 1.5 U/g、酶活回收率可达 81.3%。壳聚糖酶在经固定化后, 最适温度从 50°C 升高到 60°C、最适 pH 从 5.0 下降到 4.0、米氏常数从 2.49g/L 升高到 18.87g/L, 说明酶经固定化后所产生的空间扩散阻力对壳聚糖酶的动力学性质的影响要比在固定化过程中所用载体所带的电荷的极性对酶的动力学性质的影响大得多。此外将该固定化酶重复使用十次, 酶活力损失小于 15%, 该固定化酶具有较好的操作稳定性。

关键词 DEAE 纤维素 固定化 壳聚糖酶 壳聚糖

Penicillium sp.ZD-Z1 Chitosanase Immobilized on DEAE Cellulose by Cross-linking Reaction

Zheng Lianying, Xiao Yuliang

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Chitosanase obtained from *Penicillium* sp.ZD-Z1 was immobilized on DEAE cellulose with glutaraldehyde by cross-linking reaction. The optimal ratio of immobilization were as following: 0.1g DEAE cellulose was treated with 5mL 5% glutaraldehyde solution, then 2.3mg chitosanase was immobilized on the carrier. The optimal temperature and pH was 60°C and 4.0, and the K_m value was 18.87g/L. Under the optimal conditions, the activity of immobilized enzyme is 1.5U/g, and the recovery of enzyme activity is 81.3%. After immobilization, the optimal temperature and K_m value increased (from 50°C to 60°C, from 2.49g/L to 18.87g/L), whereas the optimal pH reduced (from 5.0 to 4.0). All of these indicated that the effect of intraparticle diffusion resistance for chitosanase's kinetic property is greater than that of carrier's electrical property. The enzyme activity loss was less than 15% after 10 times batch reaction, the immobilized enzyme showed good stability in operation

Key words DEAE cellulose, Immobilization, Chitosanase, Chitosan

纤维素是世界上最丰富的有机化合物, 也是人类应用最多的一种高聚糖。纤维素具有开放性的长链和疏松的网状结构, 有利于大分子的渗透和吸附, 纤维素结构中存在着大量的羟基, 可通过各种反应制成多种纤维素衍生物而带有各种活泼基团, 因此通过纤维素衍生物固定酶制备具有生物活性的材料受到越来越多的重视, 如利用纤维素磁性微球固定半乳糖氧化酶^[1]、用

郑连英 女, 56 岁, 副教授, 从事生物工程方向的科研和教学工作。E-mail: zhengly@cmsce.zju.edu.cn

国家自然科学基金重点基金(50233020)、浙江省自然科学基金(200075)资助项目

2003-06-05 收稿, 2003-09-10 接受

纤维素固定葡萄糖基转移酶^[2]、利用修饰的纤维素固定虫漆酶^[3]均取得了不错的效果。DEAE 纤维素酶蛋白上均带有氨基,可以通过双功能试剂(戊二醛等)与 DEAE 纤维素和酶蛋白上的氨基发生 Schiff 反应而将酶固定到纤维素上。此外 DEAE 纤维素上富含负电荷,可以通过静电作用和疏水作用对酶蛋白进行吸附^[4]。笔者对几种不同的交联载体进行了酶的固定化试验,结果表明 DEAE 纤维素的固定化效果较好。本文选用 DEAE 纤维素作为酶的固定化载体,以戊二醛为交联剂,通过化学交联和吸附作用将壳聚糖酶固定在 DEAE 纤维素上,对 DEAE 纤维素固定化壳聚糖酶降解壳聚糖、酶固定化的条件及固定化酶的性质进行了研究。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖(分子量 29kDa,脱乙酰度 93%)、片状几丁质(玉环澳兴甲壳素有限公司);壳聚糖酶(本实验室筛选的高产壳聚糖酶的青霉菌株经发酵提纯获得,活力 200U/g);DEAE 纤维素、微晶纤维素、脱脂棉(上海试剂二厂);戊二醛(25%水溶液,上海化学试剂站分装);其它化学试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 载体的精制 纤维素、DEAE 纤维素、脱脂棉(剪成 0.2cm 的短棉绒)与 5 份 0.5mol/L NaOH 在室温下搅拌 15min,让其沉降。将其中的胶体颗粒与碱性上层液一起除去,用蒸馏水洗涤直至 pH 下降到 8~9,然后与 3 份 95%的乙醇混合,沉降后,倾去上清液,重复用 0.5mol/L NaOH 洗涤,用蒸馏水洗至中性,抽滤,用滤纸吸水至干。

将一定量的几丁质研磨成颗粒状,过 50 目筛,然后分别用蒸馏水浸泡过夜(室温下),抽滤,加入 6mol/L HCl 浸泡 2h,抽滤,加入 1mol/L NaOH,煮沸 0.5h,抽滤,用蒸馏水冲洗至中性,加入 0.01mol/L NaOH 溶液在 50℃ 浸泡 1h,抽滤,加入 0.01mol/L 醋酸溶液于 50℃ 浸泡 0.5h,抽滤,用蒸馏水冲洗至中性,80℃ 下干燥,得到精制载体。

1.2.2 载体的交联 称取一定量精制 DEAE 纤维素,加入一定量的戊二醛,室温下搅拌 5h,静置过夜,离心去上清液,将载体用蒸馏水反复冲洗以除去残存的戊二醛,抽滤,即得交联载体。

1.2.3 酶的固定化 交联后的载体中加入壳聚糖酶液,放入冰箱于 4℃ 下静置 8h,期间每隔 0.5h 搅拌一次。离心弃去上清液,沉淀物用蒸馏水反复冲洗,洗去游离酶,经抽滤即得固定化酶。

1.2.4 还原糖浓度的测定 采用 DNS 法^[5]。

1.2.5 酶活力测定 (1)游离酶活力测定:准确量取 5mL 壳聚糖酶溶液,加入 5mL 1%壳聚糖溶液,50℃ 下保温 60min,然后调节混合液 pH 至 8.0,离心去除絮状沉淀。吸取上清液 1mL,用 DNS 法测定还原糖含量,计算游离酶的活力。

(2)固定化酶活力的测定:准确称取 0.1g 固定化酶,加入 5mL 1%壳聚糖溶液,50℃ 下保温 60min,然后调节混合液 pH 至 8.0,离心去除絮状沉淀。吸取上清液 1mL,用 DNS 法测定还原糖含量,计算固定化酶的活力。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖酶固定化载体的选择

将 0.1g 精制的载体与 5mL 5%戊二醛交联后, 加入 30mg 壳聚糖酶固定化, 然后分别测定固定化前溶液的总酶活、固定化后溶液的总酶活以及固定化酶的总酶活; 然后将固定化酶在 4℃ 下储存一周, 查看其储存稳定性。由表 1 所示结果可见, DEAE 纤维素固定化壳聚糖酶的酶活最高, 储存稳定性最好(一周后酶活还高达原来的 93%), 其它几种载体不仅酶活低而且储存稳定性差, 故选用 DEAE 纤维素为壳聚糖酶的固定化载体。

表 1 不同的载体固定化壳聚糖酶的效果比较

Tab.1 The effect of different carriers immobilizing chitosanase

载体	固定化酶酶活 (U/g 湿载体)	在溶液中的 酶活下降率/%	在载体上的 酶活增长率/%	一周后剩余酶活/%
几丁质	46	9.91	7.72	43.5
微晶纤维素	0.19	24.07	12.74	14.6
DEAE 纤维素	0.86	63.52	51.66	92.4
脱脂棉	0.36	16.59	11.9	21.1

2.2 DEAE 纤维素固定化壳聚糖酶的条件研究

2.2.1 戊二醛浓度对壳聚糖酶固定化的影响 取 5 份 0.5g 精制 DEAE 纤维素, 分别加入不同浓度的戊二醛溶液(2%, 3%, 4%, 5%, 6%)5mL, 按 1.2.3 的方法得到固定化酶。分别测定各固定化酶的活力, 结果(图 1)表明, 固定化酶的活力随戊二醛浓度的增大而增大, 当戊二醛浓度达到 5% 时, 固定化酶的活力最大。这说明 5% 的戊二醛足以使几丁质分子上的氨基充分发生交联反应, 所形成的载体与壳聚糖酶的结合量最大。

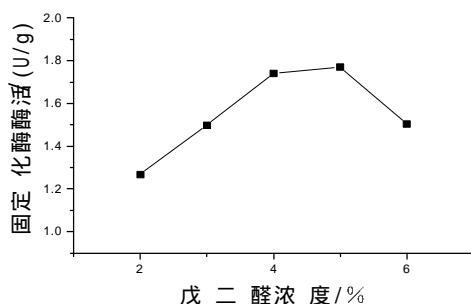


图 1 戊二醛浓度对壳聚糖酶固定化的影响

Fig.1 Effect of concentration of glutaraldehyde on chitosanase immobilization

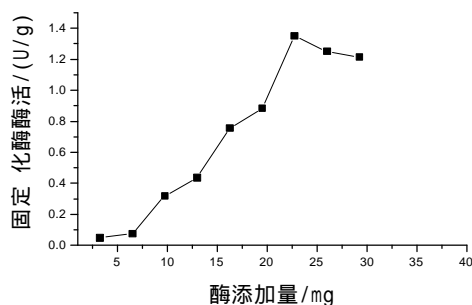


图 2 酶添加量对壳聚糖酶固定化的影响

Fig.2 Effect of amount of added enzyme on chitosanase immobilization

2.2.2 加酶量对壳聚糖酶固定化的影响 取 1g DEAE 纤维素与 5%戊二醛的交联物, 分别加入不同量的壳聚糖酶液, 使之固定化, 分别测定固定化酶活力, 结果如图 2 所示。可以看出, 固定化酶活力随着加酶量的增加而升高, 但当加酶量超过 23mg 后, 固定化酶的活力不再增加且稍微下降。这是因为一定量交联后的 DEAE 纤维素, 其活性基团是一定的, 因而在其结合位点未饱和之前所得固定化酶的活力随加酶量的增加而增大; 当结合位点达到饱和后, 继续增大加酶量可能会导致空间阻力的增大, 不但不能增加固定化酶的活力反而使得酶活有所下降。

2.2.3 交联时间对壳聚糖酶固定化的影响 称取 6 份 1g 经 5%戊二醛交联后的 DEAE 纤维素,

分别加入 23mg 壳聚糖酶, 于 4℃ 下固定化, 于不同时间取出, 经反复洗涤, 抽滤后, 分别测定酶活力, 结果如图 3 所示。由图 3 中可以看出, 随着酶固定化时间的增长, 所得到的固定化酶的活力也随之增加; 当固定化时间超过 8h 后, 所得到的固定化酶的活力增长趋缓, 这说明壳聚糖酶经过 8h 的固定后, 反应基本完成, 即交联 DEAE 纤维素上的活性结合位点基本都已与酶发生反应, 因而确定 8h 为最佳酶固定化交联时间。

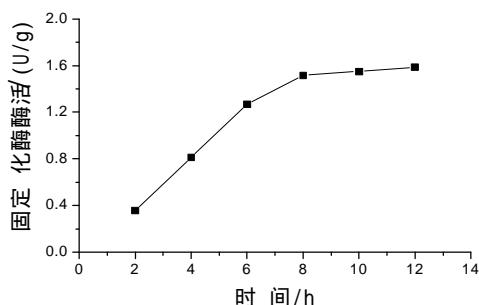


图 3 固定化时间对壳聚糖酶固定化的影响

Fig.3 Effect of immobilized time on chitosanase immobilization

2.2.4 在优化条件下壳聚糖酶的固定化 取 1g 交联后的 DEAE 纤维素, 加入 23mg 壳聚糖酶液, 按 1.2.3 所述方法进行酶的固定化。所得固定化酶的酶活可达 1.5U/g 载体(湿重), 酶活回收率为 81.3%。图 4、图 5 分别为固定化前后载体电镜扫描图, 从放大 500 倍的电镜图中可以看出经交联后纤维素表面沟痕明显增加, 酶被固定到了载体上。



图 4 未交联载体的电镜扫描图

Fig.4 SEM micrograph of free carrier



图 5 固定化酶的电镜扫描图

Fig.5 SEM micrograph of immobilized enzyme

2.2.5 温度对固定化酶活力的影响 取 0.2g 固定化酶与 5mL 壳聚糖酶液各 6 份, 分别于不同温度下测定固定化酶和游离酶的活力, 结果如图 6 所示, 固定化酶的最适温度为 60℃, 而游离酶的最适温度为 50℃, 而固定化酶在 50~65℃ 范围内都保持了较高的酶活力, 这说明壳聚糖酶经固定化后, 其在较高温度下的适应范围有了明显提高。

2.2.6 pH 对固定化酶活力的影响 取 0.2g 固定化酶与 5mL 壳聚糖酶液各 8 份, 分别于不同 pH 下测定固定化酶和游离酶的活力, 结果如图 7 所示, 固定化酶的最适 pH 为 4.0, 而游离酶的最适 pH 为 5.0。固定化酶的 pH 一般受两方面的影响: 一方面, 酶固定化的载体带正电荷, 即 $\gamma > 0$,

则固定化酶内部的 pH 要高于外部溶液的 pH, 其 pH-酶活曲线应向酸性偏移; 另一方面酶经固定化后产生了空间立体障碍或扩散阻力, 从而使得固定化酶内部的 H^+ 浓度小于外部溶液的浓度, 也导致 pH-酶活曲线向酸性偏移。因而壳聚糖酶经 DEAE 纤维素固定化后, 所得固定化酶的最适 pH 向酸性偏移。

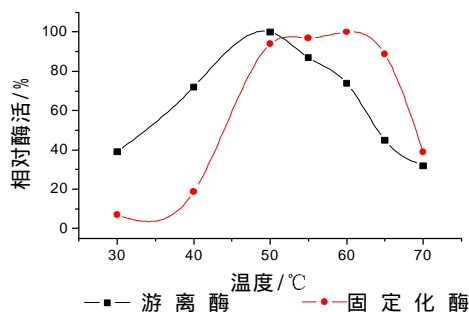


图 6 温度对固定化酶活力的影响

Fig.6 Effect of temperature on the activity of Immobilized chitosanase

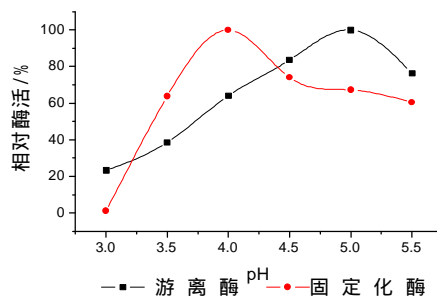


图 7 pH 对固定化酶活力的影响

Fig.7 Effect of pH on the activity of immobilized chitosanase

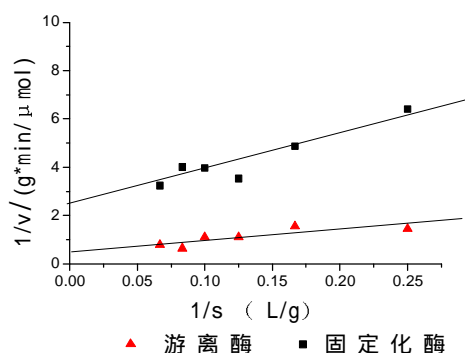
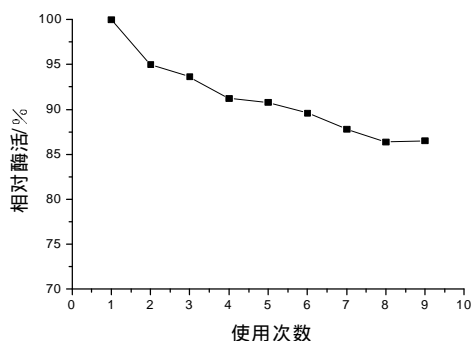
图 8 K_m 的确定Fig.8 Determination of apparent K_m 

图 9 固定化酶的操作稳定性

Fig.9 Operation ability of immobilized chitosanase

2.2.7 固定化酶与游离酶米氏常数比较 取固定化酶 0.2g 与 1% 壳聚糖溶液 5mL 各 6 份, 分别加入 2mL 不同浓度的壳聚糖溶液(0.4%~1.5%)于 50°C 水浴中保温 60min, 测定还原糖浓度, 用双倒数作图, 求得米氏常数, 如图 8 所示, 经线性拟合可求得 $K_m(\text{固})=18.87\text{g/L}$, $K_m(\text{游})=2.49\text{g/L}$, 说明该壳聚糖酶经固定化后, 表观米氏常数增加, 酶与底物的亲和力有所降低。固定化酶的 K_m 值一般受两方面的影响: 一方面, 当载体所带电荷与底物所带电荷相反时, 它们之间分别产生吸引作用, 导致固定化酶与底物的亲和力上升, 从而使 K_m 值降低, 反之 K_m 值升高; 另一方面, 酶经固定化后产生了空间立体障碍或扩散阻力, 导致 K_m 升高。本实验中选用的载体 DEAE 纤维素和底物壳聚糖所带电荷相反, 使得 K_m 值降低; 酶固定化后产生的空间立体障碍或扩散阻力使得 K_m 值升高, 从实验结果可以得出固定化过程中载体所带的电荷的极性对本

实验室所提取的壳聚糖酶的米氏常数的影响较酶经固定化后所产生的空间扩散阻力对酶的米氏常数的影响小。

2.2.8 固定化酶操作稳定性 将 0.5g 固定化酶与 10mL 1%壳聚糖溶液在 60℃ 下连续反应 10 次, 每次反应时间为 6h, 每次反应后分别测定酶活力, 结果如图 9 所示, 固定化酶的活力基本保持稳定, 活力损失 15%, 由此可见, 该固定化酶具有良好的操作稳定性。

3 结论

以戊二醛为交联剂, 采用 DEAE 纤维素、微晶纤维素、脱脂棉、几丁质为载体, 固定壳聚糖酶, 对不同的载体固定化壳聚糖酶的效果进行了比较, 最终确定 DEAE 纤维素为最佳固定化载体; 然后对 DEAE 纤维素固定化壳聚糖酶的条件以及固定化酶的性质进行了研究, 确定了壳聚糖酶的最佳固定化条件: 0.1g DEAE 纤维素与 5mL 5%戊二醛交联作用后, 加入 2.3g 酶进行固定化; 固定化酶的最适温度为 60℃, 最适 pH 为 4.0, 其米氏常数为 18.87g/L 所得固定化酶活力可达 1.5U/g、酶活回收率可达 81.3%; 壳聚糖酶的在经固定化后, 最适温度从 50℃ 升高到 60℃、最适 pH 向酸性偏移(从 5.0 下降到 4.0)、米氏常数从 2.49g/L 升高到 18.87g/L 说明在固定化过程中载体所带的电荷的极性对本实验室所提取的壳聚糖酶的最适宜的反应温度、米氏常数影响较小, 而酶经固定化后所产生的空间扩散阻力对酶的最适宜的反应温度、米氏常数影响较大。此外, 将该固定化酶重复使用 10 次, 酶活力损失小于 15%, 表明该固定化酶具有较好的操作稳定性。

参考文献

- [1] Z Býlkova, M Slovakova, A Lycka et al. Chromatogr. B, 2002, 770: 25~34.
- [2] M R Karim, F Hashinaga. Process Biochemistry, 2002, 38: 809~814.
- [3] J H Abdulkareem, Al Adhami, J Bryjak et al. Biochemistry, 2002, 37: 1387~1394.
- [4] 宋 杰, 候永发. 天然产物研究与开发, 1997, (9): 71~76.
- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.