

大孔树脂 D380 固定化橄榄绿链霉菌 E-86 来源木聚糖酶的研究*

艾志录¹ 江正强¹ 李里特¹ 石 波² 日下部功¹

1(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京, 100083)

2(中国农业科学院饲料研究所, 北京, 100081)

摘 要 选择有代表性的 14 种吸附和离子交换树脂进行了橄榄绿链霉菌 E-86 来源的木聚糖酶固定化试验, 筛选出固定化效果较好的 724 和 D380 两种树脂; 对含伯氨基的离子交换树脂 D380 采用戊二醛进行交联固定化, 研究了其固定化条件。结果表明, 戊二醛浓度为 1% , 处理 30min , 加酶量为 0.8~1 mL , 酶液 pH 5.8 25℃ 5~10h 固定化处理效果最好, 获得的固定化酶活力可达 64 U/g 载体。

关键词 树脂, 固定化, 橄榄绿链霉菌 E-86, 木聚糖酶

木聚糖是自然界中仅次于纤维素的再生资源之一, 它的生物降解需要多种酶的参与, 其中 β -1, 4 内切木聚糖酶 (endo-xylanase , EC. 3.2.1.8)以内切方式作用于主链, 产生长度不同的低聚木糖和少量的木糖, 是木聚糖水解酶中最关键的酶^[1], 它在各个工业领域中的应用越来越广泛^[2]。

目前国内外有关固定化木聚糖酶的研究还很少^[3~6]。入江利夫等^[3]选择了对酶吸附性能优异的 HP20 树脂, 采用先吸附后用戊二醛交联的方法成功地进行了 *Trichoderma viride* (reesei) 变异株 K-10-34 来源的木聚糖酶的固定化, 为利用固定化酶反应器生产低聚木糖进行了有益的尝试, 但其报道的固定化酶活性发现率仅 1.3%。Renu Tyagi 等^[5]研究了磁性聚苯乙炔(羧基改性) 微球以炭化亚胺交联固定化精制木聚糖酶, 获得了 80% 的相对酶活力, 此法利用磁力实现了固定化酶的有效回收。Meryam Sardara 等^[6]成功地以可逆溶解性聚合物 Eudragit L-100 非共价结合固定化 *Aspergillus niger* 来源木聚糖酶, 并实现了木聚糖酶的同时精制与固定化, 为商业分离精制木聚糖酶同时制备固定化酶提供了新的有效途径。国内则仅见有朱启忠、蔡敬民等以壳聚糖为载

体采用戊二醛交联固定化的报道^[7~9], 固定化木聚糖酶的活性较低而活性回收率较高。

文中以常见的工业用离子交换树脂为载体戊二醛交联固定化橄榄绿链霉菌 E-86 来源木聚糖酶, 并对其固定化条件进行了探讨, 为工业化经济高效应用固定化木聚糖酶提供依据。

1 材料与方法

1.1 固定化载体及预处理

选择工业应用广泛的吸附和离子交换树脂 14 种: D3520、S-8、D380、X-5、AB-8、201GF、D072、201×4、D152、110 等, 南开大学化工厂; 732 阳离子交换树脂, 中国医药集团上海化学试剂公司; 724 阴离子交换树脂, 华北特种试剂开发研究中心(天津)。

吸附树脂采用乙醇、丙酮、蒸馏水交替处理, 最后用蒸馏水冲洗至中性备用; 离子交换树脂先用蒸馏水浸泡胀润、去杂, 然后用 HCl、NaOH 交替处理, 最后用蒸馏水冲洗至中性, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 木聚糖酶液制备

采用日下部功先生馈赠的橄榄绿链霉菌 E-86 菌种(*Streptomyces olivaceoviridis* E-86), 菌种经平板活化后, 30℃, 150 r/min 摇瓶培养。

第一作者: 博士研究生(江正强博士为本文通讯作者)。

* 教育部研究重点项目和国家“十五”攻关课题(2001BA708B04-06)

收稿时间 2003-10-20 改回时间 2003-12-18

培养基组成 :1.5%木聚糖、1% KH_2PO_4 、0.05% MgSO_4 、0.5% 吐温 80、0.3% 酵母抽提物、1.5% 胰蛋白胨 ,培养 6 d 后离心得粗酶液。粗酶液用蒸馏水透析(截留分子量 12 ~ 14 ku) ,聚乙二醇(20 000)浓缩 ,4℃ 冰箱保存备用。

1.3 试 剂

Birchwood xylan 购自 Sigma 公司 ;50% 戊二醛、柠檬酸、 NaH_2PO_3 、DNS 等试剂均为分析纯 ,北京市化学试剂公司。

1.4 设 备

TU-1810 紫外-可见分光光度计 ,北京普析通用仪器有限责任公司 ;DK-S22 型恒温水浴槽 ,上海精宏实验设备有限公司 ;HXS-H 水浴恒温摇床 ,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司 ;GL-20B 冷冻离心机。

1.5 木聚糖酶固定化的方法

采用单因素对比试验分别进行载体选择、戊二醛浓度和处理时间、加酶量和酶处理时的温度、pH 环境等交联条件的优化试验。

载体选择 :取处理后载体(湿态)约 1.00 g ,分别加入 2 mL 含一定量原酶液的 McIlvaine 缓冲液(pH 6.8、0.05 mol/L)摇匀 ,在水浴摇床上室温(25℃) ,160 r/min 振摇 ,5 h 后微摇过夜(12 h) ,以 G1 玻璃烧结滤器过滤 ,并以原缓冲液冲洗 5 次 ,抽滤 30 s。分别测定固定化酶和上清液中酶活力 ,并计算固定化得率。根据其酶活力和得率进行筛选。

固定化条件的优化 :取处理后载体(湿态)0.50g 左右 ,加入设计给定量戊二醛 ,在水浴摇床上定温(25℃、4℃)160 r/min 振摇一定时间 ,G1 玻璃烧结滤器过滤 ,蒸馏水反复冲洗至无戊二醛残留。处理后加入酶液进行固定化 ,条件同载体选择。

1.6 酶活性和蛋白质含量检测

酶活性测定参照文献[10]稍作改动 :0.1 mL 经过适当稀释的游离酶或一定量固定化酶与经 55℃ 保温 5 min 的 1% Birchwood xylan 溶液(pH 5.8、0.05mol/L 醋酸盐缓冲溶液配制)混合 ,在 55℃、160 r/min 水浴振荡 10 min ,冰水浴中终止反应 ,DNS 法测定产生的还原糖量。酶活力定义为 :在试验条件下每分钟分解木聚糖产生 1 μmol 木糖所需的木聚糖酶量为 1 个酶活力单位(U)。

固定化得率/ % =

$$\frac{\text{固定化酶活力}}{(\text{加入酶活力} - \text{上清液酶活力})} \times 100$$

蛋白量检测 :Bradford 法^[11]。

偶联率/ % =

$$\frac{(\text{加入酶蛋白量} - \text{上清液蛋白量})}{\text{加入蛋白量}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 树脂载体的选择

不同载体对木聚糖酶的固定化效果如表 1 所示。

表 1 不同树脂载体的固定化比较

使用树脂	D3520	S-8	D380	X-5	AB-8	201GF	732	724	D072	201×4	D152	D311	110	711
固定化得率/ %	1.24	0.74	13.81	1.27	1.08	1.05	0.67	16.20	1.29	1.73	9.06	12.28	11.18	2.46
酶活力/ U · g ⁻¹ (载体)	3.38	2.12	37.37	3.58	2.95	2.86	1.76	43.10	2.89	4.00	20.60	14.48	25.50	5.67

由表 1 可知 ,不同载体的固定化效果差别明显 ,其中 ,D380、724、110 和 D152 固定化酶活力和活力回收均表现突出。此结果与 Mohamed^[4]报道的离子交换法固定化效果相当。D380 为大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂 ,功能基为伯氨基 ;724、110、D152 树脂均为弱酸性丙烯酸阳离子交换树脂 ,功能基为 -COOH。

试验中还发现(数据未列出) ,几种吸附树

脂 S-8、X-5、AB-8 等虽然结合的蛋白量很高 ,但表现活性却很低。这可能与大孔吸附树脂的比表面积大 ,吸附能力强 ,而作为酶作用底物的木聚糖则溶解性差 ,扩散能力弱有关。另外 ,载体的过强吸附也会导致酶的失活。

物理结合法固定化是依靠离子键、氢键、范德华引力等结合的一种固定化方法 ,该方法载体价廉易得 ,操作简便 ,条件温和 ,易于工业化

生产应用。D201GF 已经作为葡萄糖异构酶的固定化载体应用于果葡糖浆的工业化连续生产。但是该法制备的固定化酶稳定性较差,酶易受操作条件影响而脱落。戊二醛是一种双功能试剂,它不但可以与蛋白质和载体上的氨基形成 sheff 碱交联而使酶固定化,又可以增加固定化酶的稳定性。根据以上结果,选择对木聚糖酶固定化良好的 D380(功能基团为伯氨基)离子交换树脂,进行戊二醛处理,并研究其最适固定化方法。

2.2 戊二醛(glutaraldehyde , GA)处理条件的优化

2.2.1 戊二醛浓度对固定化效果的影响

固定其他条件,载体用不同浓度(1% ~ 6%)的戊二醛 10 mL 处理后进行固定化,结果如图 1 所示。

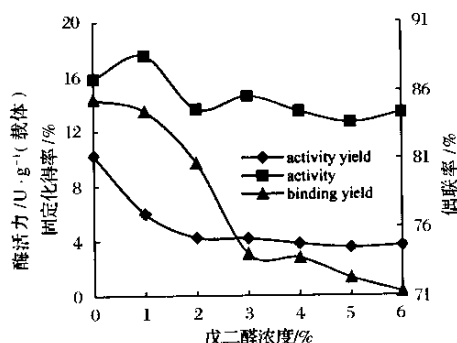


图 1 戊二醛浓度对固定化效果的影响

由图 1 可知,固定化得率、蛋白偶联率随戊二醛浓度的提高逐渐下降,最终保持一大致稳定水平。固定化酶活力则在戊二醛低浓度下处理活力较高,而高浓度时较低。这是因为一定量的 D-380 树脂,其携带的 $-NH_2$ 基团是固定的,双功能试剂戊二醛既可以与载体氨基和酶蛋白上的氨基结合,使酶固定化,又可以与载体上的氨基相互间结合使载体上功能基团失去作用。因此,在未进行戊二醛处理时,载体的结合能力最高(即树脂的交换容量),加戊二醛处理后其结合能力下降。表现为随着戊二醛加入量的增加,固定化得率和偶联率下降。而由于戊二醛的作用,载体与固定化的酶分子之间加入了戊二醛短臂,酶分子作用的空间自由度增

加,底物和产物的扩散限制作用减小,制备的酶活性提高,但高浓度时由于树脂功能基团的失活,结合的酶量降低,导致固定化酶活力降低。因此,表现为低浓度戊二醛处理时酶活力高而高浓度时活力降低。

综上所述,戊二醛处理时应以低浓度为宜,在本研究条件下以 2% 以下较好。

2.2.2 戊二醛处理时间对固定化效果的影响

固定其他条件,改变戊二醛处理时间进行固定化处理,结果如图 2 所示。

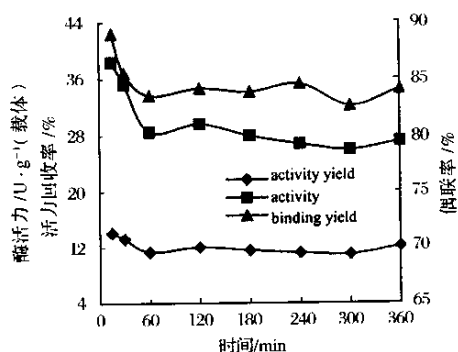


图 2 戊二醛处理时间对固定化效果的影响

在加入戊二醛处理后的 60 min 内,固定化酶的活性、活性得率、偶联率下降,其后基本无变化,这显示在本研究条件下戊二醛的作用非常迅速,60 min 已基本反应完全,从固定化效果考虑,30 min 内处理较好。

2.3 酶处理条件对固定化效果的影响

2.3.1 pH 对固定化效果的影响

固定其他条件,改变酶液 pH 值进行固定化处理,结果如图 3 所示。

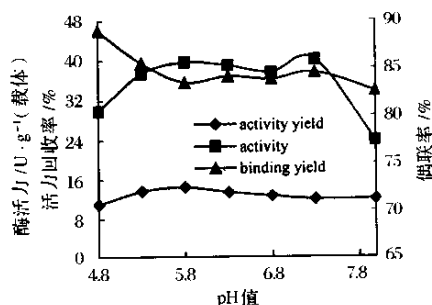


图 3 pH 值对固定化效果的影响

在 pH 5.3~7.3 范围内处理时,固定化酶

活性和固定化得率变化不大,偏酸和偏碱性环境均大幅下降,这可能与本研究室选用的木聚糖酶在该 pH 范围的稳定性有关^[12],显示固定化操作具有良好的 pH 适应性。偶联率的变化在酸性条件下较高,且在 pH 5.7~8.3 范围内基本不变,这可能是由于在 pH 过低的情况下,上清液中木聚糖酶蛋白变性,导致计算的偶联率增加,应作进一步的试验确证。从固定化酶活力和得率综合考虑,pH 5.8 的处理条件较好。

2.3.2 加酶量对固定化效果的影响

固定其他条件,改变加入的酶液量进行固定化试验,结果如图 4 所示。

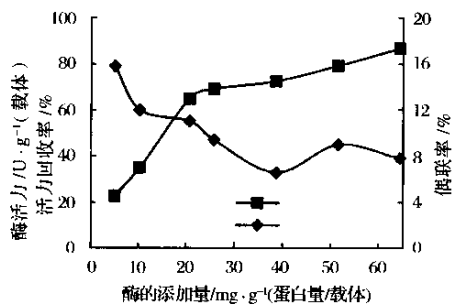


图4 加酶量对固定化效果的影响

图4 随着加酶量的增加,固定化酶活性增加,加酶量在 21 mg/g(蛋白量/载体)以下酶活性增加迅速,而在 21~26 mg/g(蛋白量/载体、pH 5.8)以上酶活性增加缓慢,这是由于随着加酶量的增加,固定化载体上结合的酶分子增加,酶活性迅速提高,当达到一定程度时,结合的酶分子过多会造成酶作用的空间位阻加大,酶活性的增加减缓,直至不再增加。

加酶量越大活性越高,但固定化得率越低,从经济角度考虑则要求尽可能地减少加酶量。因此综合考虑加酶量在 21~26 mg/g(蛋白量/载体)最好。

2.3.3 温度和时间对固定化效果的影响

固定其他条件,改变偶联时间和温度进行固定化,结果如图 5 A、B 所示。

比较图 5 A、B 可以看出,在 25℃ 时,固定化酶活性随着时间的延长而增加迅速,作用 5 h 后活性增加缓慢,作用 12 h 达到最大值,其后

活性下降。而固定化得率则在 1~12 h 间变化不大,其后随固定化酶活性降低回收率降低。偶联率与固定化酶活性前期趋势相同,但在 12 h 后偶联率继续增加,酶活性则下降,这可解释为前述的随结合酶量增加空间位阻产生使酶活力下降。

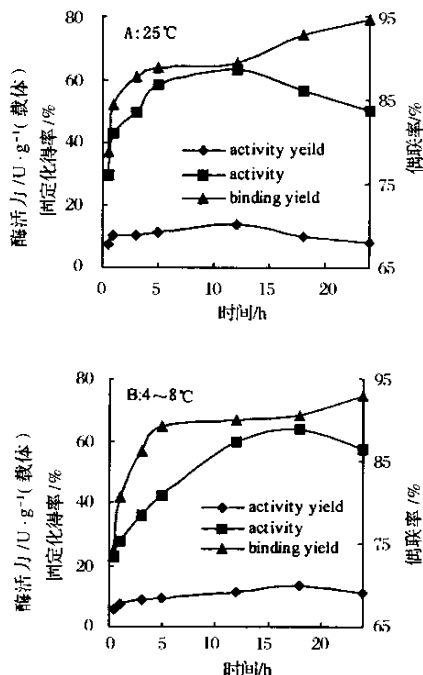


图5 偶联时间对固定化效果的影响

低温条件下(4~8℃)固定化效果与 25℃ 下处理趋势基本相同但进程明显延后,固定化酶活性和固定化得率在 18 h 后达最大值其后下降,最大值两者没有明显区别。因此可以认为在本研究条件下 4~8℃ 处理与 25℃ 处理固定化效果基本相同,但 25℃ 处理可以缩短处理时间。

3 结 论

选择有代表性的 14 种吸附和离子交换树脂进行比较试验,并对效果较好的含伯氨基的离子交换树脂用戊二醛进行交联固定化,研究其固定化条件,得到如下结果:

弱酸性、弱碱性离子交换树脂对橄榄绿链霉菌 E-86 来源木聚糖酶的固定化效果较好,其

中以 724 大孔弱酸性聚丙烯酸型阳离子交换树脂和 D380 大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂最好；

戊二醛浓度 1%、处理时间 30 min、加酶量 21~26 mg/g(蛋白量/载体) 酶液 pH 5.8、25℃ 5~10 h 固定化处理效果最好,获得的固定化酶活力可达 64 U/g(载体)。

固定化成功为其工业应用提供了可能性,而固定化酶的酶学特性是进行工业化应用的基础,对此将在另文进行讨论。

参 考 文 献

- 1 Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria[J]. Crit Rev. Biotechnol. 1997, 17:39~67
- 2 Q K Beg, M Kapoor, L Mahajan et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A Review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56:326~338
- 3 入江利夫,小西哲哉,田子山保典等. *Trichoderma viride*(*reesei*) 突变株 K-10-34 的生产するキシラナーゼの固定化[J]. 发酵工学会志, 1991, 69(3):151~157
- 4 Abdel Naby M A et al. Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and beta-xylosidase, and properties of the immobilized enzymes[J]. Appl

- Biochem Biotechnol, 1993, 38(1~2):69~81
- 5 Tyagi R et al. Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on magnetic latex beads[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1995, 21:217~222
- 6 Meryam Sardara et al. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer eudragit TM L-100[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(9):672~679
- 7 朱启忠. 青霉菌胞外半纤维素酶的固定化研究[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2):56~57
- 8 朱启忠. 壳聚糖固定化半纤维素酶的研究. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3):274~277
- 9 蔡敬民, 吴克, 张洁等. 脱乙酰壳聚糖固定化宇佐美曲霉木聚糖酶及固定化酶的性质和应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(5):548~522
- 10 Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol[J]. 1992, 23:257~270
- 11 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72:248~254
- 12 日下部功, 川口政良, 安井恒男ら. 菌体外放线菌キシラナーゼの精制とその諸性質について[J]. 农化, 1977, 51(7):429~437

Immobilization of Xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 Using Resin D380

Ai Zhilu¹ Jiang Zhengqiang¹ Li Lite¹ Shi Bo² Kusakabe Isao¹

¹(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing, 100083)

²(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

ABSTRACT Xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 was immobilized on 14 kinds of industrial adsorption and ion exchange resins. Among them, 724 with -COOH and D380 with -NH₂ showed the excellent result for xylanase immobilization. The resins of D380 with -NH₂ was pretreated with the bifunctional agent-glutaraldehyde and was crosslinked with xylanase. The optimal conditions for xylanase immobilization were as follow: the glutaraldehyde concentration, 1%; the time pretreated D380 with glutaraldehyde, 30 min; the amount of xylanase used, 21~26 mg protein/g carrier (pH 5.8); the temperature and time for immobilization, 25℃ and 5~10 h, respectively. The activity of immobilized enzyme was over 64 U/g carrier.

Key words resins, immobilization, *Streptomyces olivaceoviridis* E-86, xylanase