

文章编号: 1000-5471(2008)02-0083-04

纤维素酶固定化研究^①

伍红贤

西南民族大学 生命科学与技术学院 610041

摘要: 利用固态发酵法从瑞氏木霉 QM9414 发酵液中提取纤维素粗酶液, 然后将其固定在壳聚糖上, 测定粗酶液的酶活力, 固定化酶与粗酶的最适 pH, 最适温度和 K_m 值. 结果表明, 粗酶液的蛋白质含量为 33.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 酶活力为 120 IU/mL. 固定化酶的最适温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 而粗酶液为 50 $^{\circ}\text{C}$, 粗酶液的最适 pH=5, 固定化酶的最适 pH=4, 固定化酶的 K_m 值 $3.592\ 01 \times 10^{-2}$, 粗酶液的 K_m 值为 $4.076\ 04 \times 10^{-2}$, 表明固定化酶的很多性质均优于游离酶液.

关键词: 壳聚糖; 纤维素酶; 固定化

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

纤维素是植物光合作用的主要多糖类产物, 是地球上最为丰富的可再生资源. 据报道, 全球每年通过光合作用可以获得新的纤维素约 4.0×10^{10} t, 约占地球生物资源总量的 40%, 相当于每人每天 18.4 kg, 其蕴含的能量相当于当今全球总能耗的十倍以上^[1]. 目前, 利用纤维素酶水解纤维素是一种高效且无污染的理想途径, 它可以使大量纤维素资源和城市纤维素废料转变成人类所需的物质. 利用纤维素酶水解纤维素获得能量, 对于提高人民生活水平, 缓解能源危机, 食物短缺, 环境污染等日益严重的社会问题, 具有非常重要的意义^[2].

固定化酶是二十世纪发展起来的一项新技术, 1916 年 Nelson 和 Griffin 最先发现了酶的固定化现象后, 科学家们就开始了固定化酶的研究工作, 1969 年日本一家制药公司第一次将固定化的酰化氨基水解酶用来从混合氨基酸中生产 L-氨基酸, 开辟了固定化酶工业化应用的新纪元. 固定化酶与游离酶相比, 具有不可比拟的优点, 主要表现在: 首先, 酶与产物易于分开, 因而可以回收再利用; 其次, 在一定程度上可以改善酶的操作性能和稳定性; 第三, 可以多次反复使用和连续操作, 降低生产成本; 第四, 酶不混入产物, 可以精简分离工序等^[3-4]. 固定化酶的制备方法分为载体结合法、包埋法、交联法 3 种^[5]. 随着固定化酶技术的发展, 越来越多的研究者致力于对纤维素酶固定化的研究, 但是应用交联法固定化纤维素酶的报道很少. 本文采用壳聚糖交联法固定化纤维素酶, 研究戊二醛浓度和给酶量对固定化酶活性的影响, 以及固定化酶的最适温度、pH 值、 K_m . 结果表明, 交联法得到的固定化纤维素酶与游离酶相比具有很多优点, 对运用于工业生产具有重要意义.

1 材料与方方法

1.1 材 料

瑞氏木霉 QM9414(T. Reesei QM9414)由中国科学院微生物研究所友情赠送. 麦芽斜面培养基: 麦芽提取物 2 g、琼脂 2 g、 dH_2O 100 mL, 混匀后加热溶化, 调节 pH3.4~4.0, 121 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 高压灭菌后, 制成斜面备用; 固态发酵产酶培养基: 甘蔗渣 2.5 g、麸皮 1 g、Mandels 营养液 14 mL. 壳聚糖: 购自成都科龙公司.

① 收稿日期: 2007-12-10

作者简介: 伍红贤(1961-), 女, 重庆人, 实验师, 主要从事生物学研究.

1.2 方法

1.2.1 发酵粗酶液的提取

从冰箱中取出保存菌种,在超净工作台上接种到麦芽斜面培养基,30℃培养7d,然后用适量灭菌生理盐水刮洗斜面培养基上长满的菌种并稀释,在显微镜下调整菌液孢子浓度为 1.2×10^9 个/mL.在1个150 mL的三角瓶中分别加入甘蔗渣2.5 g,麸皮1 g, Mandels 营养液14 mL,接入0.6 mL上述浓度菌液孢子的菌液,在30℃的恒温培养箱发酵培养5 d. 5 d后,在发酵的固态培养物中加入醋酸缓冲液,20颗玻璃珠,在30℃的培养箱中以150 r/min的速度提取1h,然后8层纱布过滤,4 000 r/min离心10 min,上清液即为粗酶液.

1.2.2 酶活力的测定

粗酶液酶活力的测定:羧甲基纤维素钠测定法(CMC),在试管中加入一定量1%的CMC,再加入粗酶液,50℃作用30 min,加入葡萄糖显色剂(DNS),540 nm处测光密度值.酶活用国际单位,其定义为每克干曲每分钟水解生成 $1 \mu\text{mol}$ 葡萄糖的酶量为1个活力单位 $[\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})]$.

固定化酶活的测定方法:准确称取一定量固定化酶,加入缓冲液,再加入一定量1%的CMC,50℃作用30 min,加入DNS试剂,540 nm处测光密度值.酶活用滤纸酶活(FPU)表示,采用国际单位,其定义为每克固定化酶每分钟水解生成 $1 \mu\text{mol}$ 葡萄糖的酶量为1个活力单位 $[\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})]$.

1.2.3 载体的预处理和纤维素酶的固定化

将壳聚糖用粉碎机粉碎后过40目筛,然后分别用3%的HCl和10%的NaOH反复洗脱壳聚糖本身附着的钙成分和蛋白质成分.随后反复用蒸馏水洗涤并抽滤3次.抽干后保存于4℃冰箱备用.

纤维素酶的固定参照陈盛的方法:称取一定量的40目壳聚糖,加入一定浓度的戊二醛,室温下搅拌3 h,4℃冰箱静置过夜,反复水洗并抽滤,然后往交联后壳聚糖中加入一定量的纤维素粗酶液,室温下搅拌2 h,然后放置4℃冰箱过夜.次日,充分水洗并抽干即得固定化纤维素酶.

1.2.4 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

取6份0.2 g精致载体,分别放在6个干净的小烧杯中,然后在烧杯中分别加入4%,5%,6%,7%,8%,9%戊二醛5 mL,随后在磁力搅拌器上搅拌3 h.载体与戊二醛充分交联后,反复水洗并抽滤;然后向抽滤后的载体中加入5 mL粗酶液,相同条件磁力搅拌2 h.置冰箱4℃过夜.次日,抽滤水洗3次即得固定化酶.然后测定固定化酶的活力.

1.2.5 酶量对固定化酶活力的影响

取6份0.2 g精致载体分别加入6个干净的小烧杯中,再分别向每个烧杯中加入5 mL 5%的戊二醛,然后磁力搅拌器上搅拌3.5 h.载体与戊二醛充分交联后,反复水洗并抽滤.然后向抽滤后的载体分别加入2,3,4,5,6,7 mL的粗酶液,相同条件磁力搅拌2 h.置冰箱4℃过夜.次日,抽滤水洗3次即得固定化酶.测定固定化酶的活力.

1.2.6 固定化酶与粗酶液最适温度比较

取固定化酶0.05 g和粗酶液0.5 mL各7份,分别在40,45,50,55,60,65,70℃,其它条件相同的情况下测酶活力.

1.2.7 固定化酶与粗酶液最适pH比较

取固定化酶0.05 g和粗酶液0.5 mL各6份,分别在pH为2,3,4,5,6,7,其余条件相同情况下测酶活力.

1.2.8 固定化酶与粗酶液的表现米氏常数比较

取固定化酶0.05 g与粗酶液0.5 mL各6份,分别与不同浓度的底物3 mL反应,测酶活,用双倒数作图法,求得固定化酶和粗酶液米氏常数 K_m .

2 结果

2.1 粗酶液蛋白质含量及酶活力

经测定,提取的游离酶液中蛋白质含量为33.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$,酶活力为120 IU/mL.

2.2 戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

不同戊二醛浓度对固定化酶活力影响如图1所示:当戊二醛浓度较低时,固定化酶活力随着戊二醛浓

度的增大而增大,当戊二醛浓度达到 6% 时,固定化酶活力达最大,超过 6% 以后酶活力降低.表明 6% 的戊二醛足以使该壳聚糖分子上的氨基酸充分发生交联反应,所形成的载体与酶结合量达到最大值.

2.3 酶量对固定化酶活力的影响

不同酶量对固定化酶活力的影响如图 2 所示.当其他条件不变时,随着给酶量的增加,固定化酶活力增加,在 5 mL 时达到最大.图 2 表明:在本实验条件下,0.1 g 干壳聚糖与 6% 戊二醛交联后固定效果最好.

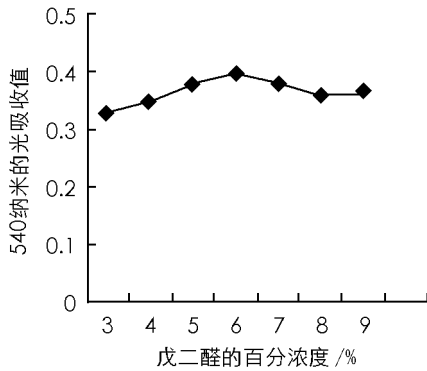


图 1 不同戊二醛浓度对固定化酶活力影响

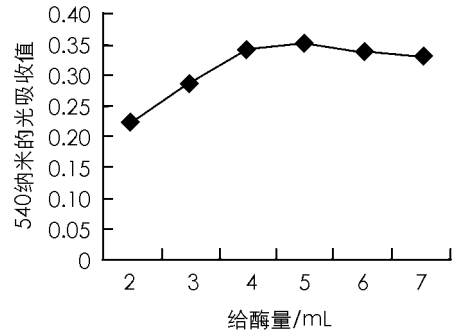


图 2 不同酶量对固定化酶活力的影响

2.4 固定化酶与粗酶液最适温度比较

固定化酶与粗酶液最适温度如图 3 所示,粗酶的最适温度为 50 °C,而固定化酶的最适温度为 60 °C,其原因可能是因为固定化酶改善了粗酶的一些性质.

2.5 固定化酶与粗酶液最适 pH 比较

固定化酶与粗酶液最适 pH 如图 4 所示,固定化酶最适 pH 4.0,游离酶的最适 pH 5.0,表明固定化酶在耐酸性方面较优于粗酶液,这将有利于固定化的工业应用.

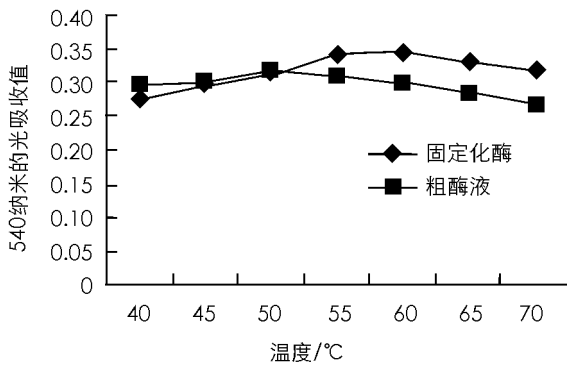


图 3 固定化酶与粗酶液最适温度

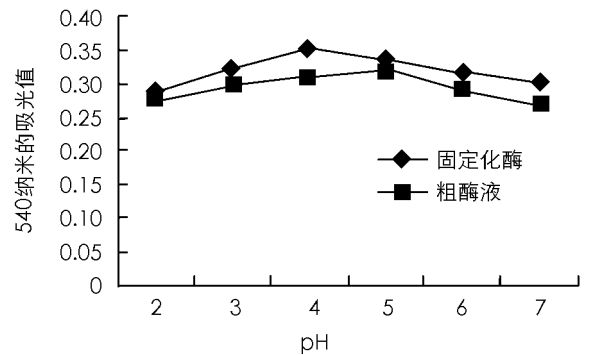


图 4 固定化酶与粗酶液最适 pH

2.6 固定化酶与粗酶液的表现米氏常数比较

固定化酶与粗酶液的表现米氏常数如图 5 所示.固定化酶 $K_m = 3.592 01 \times 10^{-2}$,粗酶液 K_m 值为 $4.076 04 \times 10^{-2}$,表明该纤维素酶经固定化以后,与底物的亲和力有所增加.

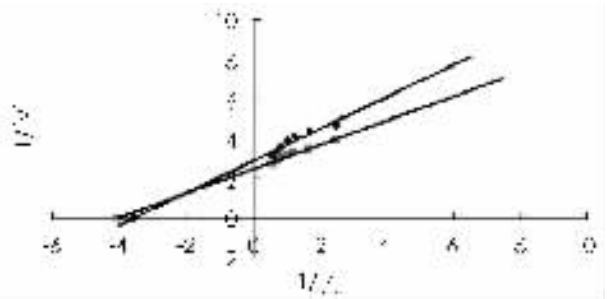


图 5 固定化酶与粗酶液的表现米氏常数

3 结论与讨论

本实验利用固态发酵法从瑞氏木霉 QM9414 发酵液中提取了纤维素粗酶液,将其固定在壳聚糖上,结果表明,游离酶液中的蛋白质含量为 33.33 ug/mL,酶活力为 120 IU/mL.当 0.1 g 载体与 5 mL 6% 的戊二醛固定纤维素酶后酶的活力最好.这是因为当壳聚糖的量一定时,其提供给酶的结合位点是一定的,随着给酶量的增加,其结合位点趋于饱和,因而制得的固定化酶活力随着酶量的增加而增大,当结合位点饱和以

后,增加给酶量却不增大酶活力^[4-8].

固定化酶的最适温度为 60 °C 而粗酶液为 50 °C,粗酶液的最适 pH 为 5,固定化酶的最适 pH 为 4. 这表明固定化纤维素酶的活力受环境因素如 pH、温度等的影响,固定化酶的最适 pH 向酸性方向移动,而最适反应温度比游离酶高. 固定化酶的这种特性有利于工业生产中的酸性环境以及高温环境,有利于提高生产效率和酶的利用率. 固定化酶的 K_m 值 $3.592\ 01 \times 10^{-2}$,粗酶液的 K_m 值为 $4.076\ 04 \times 10^{-2}$,表明纤维素酶经固定化以后,与底物的亲和力有所增加,固定化酶的理化性质相对游离酶来说得到了改善,这对提高反应速度是有利的^[6-8].

参考文献:

- [1] 孙君社,李 雪,董秀芹. 纤维素酶高产菌株的选育及产酶条件的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2002, 3: 83 - 85.
- [2] Fagang Zhong, Xinghua Huang. Study Progress of Cellulase [J]. Chinese Journal of Microecology, 2002, 10, 14(5): 308 - 310.
- [3] Divne C, Stahlberg J, Teeri T, et al. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 long tunnel of cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* [J]. Mol. Biol, 1998, 275: 309 - 325.
- [4] 周 桂,何子平,褚金彩. 双载体法固定化黑曲霉发酵产壳聚糖酶的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(5): 104 - 107.
- [5] 郭 勇. 酶工程(第二版) [M]. 北京:科学出版社, 2004: 108 - 186.
- [6] Riedel K, Bronnenmeier K. Active-site mutations which change the substrate specificity of the *Clostridium ercorarium* st-cellulase CelZ implications for synergism [J]. Eur J. BIOCHEM, 1999, 262: 218 - 223.
- [7] 邱雁临. 纤维素酶的研究和应用前景 [J]. 粮食与饲料工业, 2001(8): 30 - 31.
- [8] 肖海军,贺筱蓉. 定化酶及其应用研究进展 [J]. 生物学通报, 2001, 36(7): 9 - 10.
- [9] 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, 6: 20(2): 56 - 57.

A Study on Immobilized Cellulase

WU Hong-xian

School of Life Science and Biotechnology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: The extra-cellulase from *T. reesei* QM9414 was immobilized on chitosan by glutaraldehyde, then the activity, optimum pH, K_m , and optimum temperature of immobilized and free cellulase was also studied. The results indicated that protein concentration and enzyme activity of free enzyme was 33.3 ug/mL and 120IU/mL, respectively. The optimum pH of soluble enzyme and immobilized enzyme were pH 5 and pH 4, respectively. The optimum temperature of soluble enzyme was 50 °C, whereas immobilized showed high activity in 60 °C. The K_m of immobilized enzyme and soluble enzyme was $3.592\ 01 \times 10^{-2}$ and $4.076\ 04 \times 10^{-2}$, respectively.

Key words: chitosan; cellulase; immobilized enzyme

责任编辑 陈绍兰