

棉织物对甲苯磺酰氯活化法固定化菊粉酶工艺的研究

李莹¹, 江波^{1*}, 金征宇²

(1. 江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036

2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 以4-甲苯磺酰氯活化的棉纤维为载体, 对固定化菊粉酶的条件进行探讨。通过对不同纤维成分布料的比较, 绒布为载体时得到了较高的固定化酶活。分别采用单因素试验和正交试验, 得到优化的工艺参数: 每克干基棉布加入10ml干吡啶, 对甲苯磺酰氯与干吡啶的比例为1g:1ml, 偶联pH值4.5, 离子强度0.2mol/L, 加酶量80U/g, 菊粉酶活回收率达到83.60%。在优化的工艺条件下, 对糖组分进行HPLC分析, 固定化酶与250g/L菊糖(5U/g菊糖)作用1.5h, 低聚果糖含量达到28.21%。

关键词: 菊粉酶; 固定化; 对甲苯磺酰氯; 棉纤维

Technology of Inulinase Immobilization on Tosylated Cotton Cloth

LI Ying¹, JIANG Bo^{1*}, JIN Zheng-yu²

(1. The Key Lab of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Inulinase from *Aspergillus ficuum* SK004 was immobilized on cotton cloth activated with p-toluenesulfonyl chloride (tosyl chloride). The immobilization conditions were optimized and the results showed that the optimal amount of dry pyridine was 10ml to each gram of cotton and the ratio of tosyl (g)/pyridine (ml) was 1g:1ml. The optimal coupling pH was found to be 4.5 and ionic strength was 0.2mol/L. 80U enzyme was immobilized onto each gram of cotton cloth. The highest enzyme activity yield achieved 83.60% through orthogonal test. At these conditions, immobilized enzyme reacting with 250g/L inulin for 1.5h gained

收稿日期: 2005-05-27

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(20376029)

作者简介: 李莹(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物技术在食品中的应用。

肝浸液5g, Tween80 1ml, 半胱氨酸盐酸盐0.3g, pH6.463。最终优化所得培养基可获得菌体干重达到4.462g/L, 比优化前3.16g/L提高了1.43倍。

参考文献:

- [1] G Miguel, D Susana, M Baltasar, et al. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks[J]. Food Research International, 2004, 37: 839-850.
- [2] V Venkata Dasu, T Panda. Optimization of microbiological parameters for enhanced griseofulvin production using response surface methodology[J]. Bioprocess Engineering, 2002, 22: 45-49.
- [3] 宫衡, 李小明. 响应面法优化赖氨酸发酵培养基[J]. 生物技术, 1995 (4): 13-15.
- [4] 胡升, 梅乐和. 响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J]. 食品与发酵工业, 2002, 29: 13-17.
- [5] B V V Ratnam, M Narasimha Rao, M Dmodar Rao, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003, 19: 523-526.
- [6] S Trupkin, L Levin, F Forchiassin. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 682-690.
- [7] M Hujanen, S Linko, Y -Y Linko, et al. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) (s)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NNRL B-441[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 126-130.

28.21% FOS (fructose oligosaccharide) analyzed by HPLC. Among different fibrous materials tested, the charpie cotton cloth showed the highest immobilized enzyme activity.

Key words inulinase; immobilization; tosyl chloride; cotton cloth

中图分类号 TS201.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2006)03-0119-05

近年来,固定化酶技术在食品、医药、环境保护和化学工业中的发展得到科学界和产业界的高度重视。与游离酶相比,固定化酶可用于反复分批反应和装柱连续反应,适用多酶反应体系,易于将固定化酶和底物、产物分离,酶可重复使用,使用效率增加,成本显著降低。

稳定性得到提高^[1]。目前国内外菊粉酶固定化方法研究报道较多,其中大多使用戊二醛吸附交联的方法。魏文铃^[2]将菊粉酶通过吸附交联的方法固定在大孔树脂上,酶活回收率在60%左右;Esteban^[3]通过戊二醛交联使菊粉酶固定在海藻酸钡;贾英民^[4]等人同样使用戊二醛做交联剂,通过吸附交联方法固定菊粉酶在几丁质上,酶活最大收率32%。Ettalibi^[5]通过交联剂戊二醛将菊粉酶固定在大孔玻璃,酶活回收率达77%。顾天成^[6]采用不同载体,运用吸附法和包埋法固定菊粉酶,得到以海藻酸钠做包埋材料时显示最大酶活收率54%,单位固定化酶活27U/g。

在彭英云^[7]对游离菊粉酶的发酵条件及酶学性质研究基础之上,本文采用共价连接的方法将菊粉酶固定在棉纤维上,该法在菊粉酶固定上的应用尚未见报道。棉纤维是固定化酶的良好载体,填充在酶反应器中拥有许多理想的物理特性:高空隙率(95%~98%),比表面积高,低压降,传质阻力极低,扩散限制较弱;强机械性能,即使高黏度底物酶反应器也可在高流速下操作;价格低廉,产地不受限制等优点^[8],这使其具有广阔应用前景。纤维表面含有大量羟基,容易改性而与酶共价结合^[9],而被广泛地应用于固定化酶技术。

本文以棉纤维为载体,NaOH和吡啶为引发剂,对甲苯磺酰氯作为中间物共价连接在棉纤维上,试验了对甲苯磺酰氯活化棉纤维固定化菊粉酶的工艺。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料

菌种 无花果曲霉SK004(实验室);菊糖 比利时ORAFTi公司GR型;绒布(当地布料市场)。

1.1.2 主要试剂

对甲苯磺酰氯 化学纯,上海松江茶花胶粘剂厂;吡啶 分析纯,上海化学试剂公司;丙酮 分析纯,国

药集团化学试剂有限公司;吡啶与丙酮在使用前用4Å分子筛处理(称为干吡啶、干丙酮)。

1.2 实验方法

1.2.1 酶活力测定方法

固定化酶活测定:固定化酶(3cm×3cm棉布)与20ml 2%菊糖(溶解于0.2mol/L、pH4.5的醋酸缓冲液)在60℃,300r/min回转式水浴恒温振荡器(SHZ-88型)内反应30min。

1个酶活单位定义为:在上述条件下,固定化菊粉酶催化水解菊粉,每分钟产生1μmol的还原糖所消耗的酶量。3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定还原糖含量^[7]。

$$\text{酶活回收率}(\%) = \frac{\text{棉纤维上所固定的酶活力(U)}}{\text{固定前最初加入的酶活力(U)}} \times 100$$

单位固定化酶活(U/g):每g干基棉纤维上所固定的酶活力。

1.2.2 糖分组成 高效液相色谱,面积归一法测定。高效液相色谱仪(Waters 600/z410型高效液相色谱仪, Spherisorb NH₂型色谱柱,流动相:乙腈/水(75:25 V/V),柱温:30℃,流速:1ml/min,进样体积:10μl)。

1.2.3 胞外菊粉酶制备^[7]

1.2.4 载体制备

10ml 0.5mol/L的NaOH浸泡3cm×3cm棉布3h(25℃) → 去离子水漂洗NaOH至中性(纸巾吸干棉纤维上水分) → 干丙酮进一步干燥 → 以10ml干吡啶/g棉布(优化条件)的比例加入干吡啶,在25℃,250r/min恒温水浴振荡器中作用3h → 比例为10g对甲苯磺酰氯/g棉布(优化条件),向棉布与干吡啶混合物中加入对甲苯磺酰氯(1g对甲苯磺酰氯溶解于2ml干丙酮),在25℃,250r/min恒温水浴振荡器中作用3h → 丙酮清洗,5mmol/L HCl洗去多余对甲苯磺酰氯及吡啶 → 棉布放于5mmol/L的HCl中4℃保存。

1.2.5 固定化酶制备

去离子水洗棉纤维3次,缓冲液洗涤。室温下,以80U/g比例(优化条件),将棉纤维投入5ml 0.2mol/L(优化条件)、pH4.5(优化条件)醋酸缓冲液稀释的粗酶液中,于250r/min的恒温水浴振荡器中固定12h,缓冲液洗涤3次,4℃缓冲液中保存。

2 结果与讨论

2.1 酶固定机理

纤维表面的羟基, 经改性与对甲苯磺酰氯形成共价

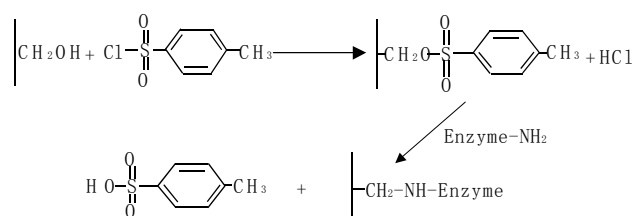


图1 酶固定在甲苯磺酰化棉纤维的反应机理

Fig.1 Reaction mechanism for enzyme immobilization on cotton cloth by activation with tosyl chloride

键, 在酶固定的过程中对甲苯磺酰氯被酶取代下来, 如图1所示。

2.2 不同纤维载体对酶活的影响

从当地布料市场购得几种不同的布料, 经相同的处理和相同测定条件下, 得到了不同的单位固定化酶活, 结果见表1。

从表1可以看到, 绒布拥有最高的固定化酶活。从植物的组织结构分析, 密度越小, 孔隙率越大, 比表面积越大的布, 单位固定化酶活越高。

2.3 单因素试验

2.3.1 干吡啶加入量对酶活回收率的影响

吡啶的 pK_a 值5.23, 是一种有机碱, 主要用来中和甲苯磺酰化后产生的HCl。同时它也是一种好的可塑剂和膨胀剂, 打开棉布上的纤维结构, 在纤维变性中起到催化作用。选择干吡啶: 棉布=5~20ml/g, 分别处理棉纤维3h, 考察对酶活回收率的影响, 结果如图3所示。由图可知, 当干吡啶: 棉布为10ml/g时, 固定化酶活回收率达到最大, 为80.33%, 此时载体已被酶饱和。

2.3.2 对甲苯磺酰氯/干吡啶的比例对酶活回收率的影响

选择对甲苯磺酰氯: 干吡啶为0.25~2g/ml, 分别对棉纤维处理3h, 对甲苯磺酰氯/干吡啶的比例对酶活回

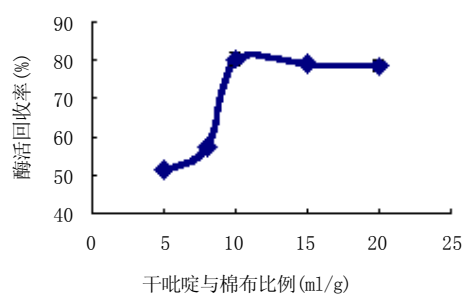


图2 干吡啶对酶活回收率的影响

Fig.2 Effects of dry pyridine on recovery yield of enzyme activity

收率的影响见图4。由图可得知, 当对甲苯磺酰氯: 干吡啶=1g/ml时固定化酶活回收率达到最高, 为71.58%。随着比例增加, 酶活回收率反而下降。通常情况下, 干吡啶的增加有助于对甲苯磺酰氯与棉纤维的偶联, 相应有利于酶的固定; 随着比例增加意味着对甲苯磺酰氯的增加, 干吡啶相应减少, 反应会释放更多的HCl, 干

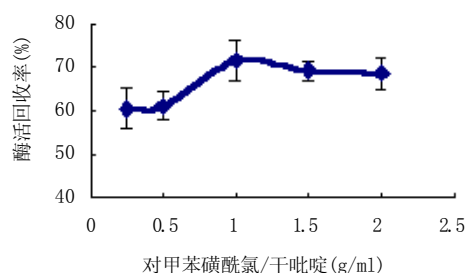


图3 对甲苯磺酰氯对酶活回收率影响

Fig.3 Effects of tosyl on recovery yield of enzyme activity

吡啶不能充分中和, 可能会降低固定化酶活。因此, 出现对甲苯磺酰氯: 干吡啶的最佳值1g/ml。

2.3.3 pH对酶活回收率的影响

反应体系酸碱度对酶促反应的影响是十分复杂的。pH值变化会影响酶与底物的离子化程度从而决定之间的亲和力, 还影响到酶的稳定性、构象及酶活性中心的性能, 进而决定酶活力。在不同pH条件下, 酶蛋白分子上带有的各种氨基酸残基会以不同解离状态存在, 往往只有一种状态最适合酶促反应。极端pH条件对酶可引起不可逆破坏。对甲苯磺酰氯活化后的载体, 分

表1 不同甲苯磺酰化纤维的单位固定化酶活

Table 1 Immobilized enzyme activity of inulinase onto various tosyl-activated supports

参数	法兰绒	棉	毛巾布	绒布	涤纶
3 × 3cm ² 纤维干基质量(g)	0.21	0.14	0.29	0.1	0.26
吸光值 A	0.170	0.186	0.356	0.258	0.316
	0.175	0.179	0.350	0.273	0.307
单位固定化酶活(U/g)	0.724 ± 0.064	3.063 ± 0.978	17.741 ± 0.406	27.248 ± 2.933	15.373 ± 0.678

别于 pH4.0~5.5 的醋酸缓冲液中进行固定化反应, 结果见图 5。由图可知, 在 pH4.5 时, 固定化效果最好,

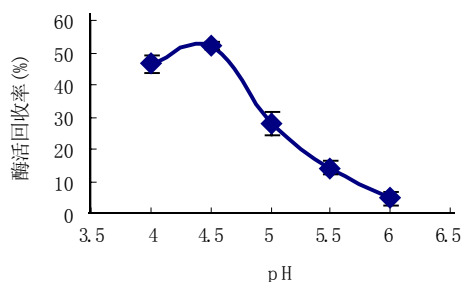


图 4 pH 对酶活回收率的影响

Fig.4 Effects of coupling pH on recovery yield of enzyme activity

达到 52.08%。当大于 4.5 时, 酶活回收率下降幅度较大。为得到较高活力的固定化酶, 应在 pH4.5 左右进行固定化。

2.3.4 离子强度对酶活回收率影响

在已确定的上述条件下, 分别于 0.05、0.1、0.2、0.3mol/L, pH4.5 的醋酸缓冲液中进行固定化, 结果见图 5。酶蛋白的高级结构是凭借氢键, 疏水键和离子键等较弱的键维持。盐浓度可影响蛋白质的离子键, 进而决定酶的构象及固定化酶的活力回收率。由图 5 可

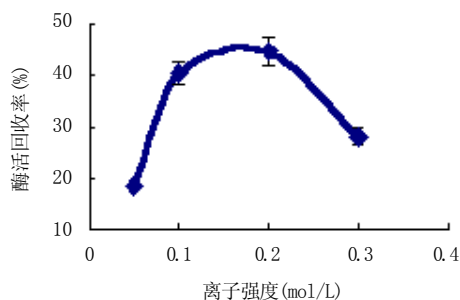


图 5 离子强度对酶活回收率影响

Fig.5 Effects of coupling ion strength on recovery yield of enzyme

知, 过高或过低的离子强度并不利于酶的固定化, 0.2mol/L 的离子强度得到最高的酶活回收率 44.57%。

2.3.5 加酶量对酶活的影响

加酶量分别为 41、82、205、287U/g 时, 分析加酶量对活力回收率和单位固定化酶活力的影响, 结果见图 6。从图中可以看到, 固定化酶的活力回收率随着加酶量的增加而降低, 但单位固定化酶活力呈现先增加后减少的趋势。杨静^[10]在固定化耐热重组 β -半乳糖苷酶也发现同样现象。这是由于在酶浓度较低时, 载体没有完全被饱和; 而载体承载菊粉酶的能力是有限度的, 当载体被饱和时, 过多的酶分子造成反应空间受到限制, 固定化酶活力呈下降趋势。均衡两指标考虑, 选择加酶量在 80U/g 左右。

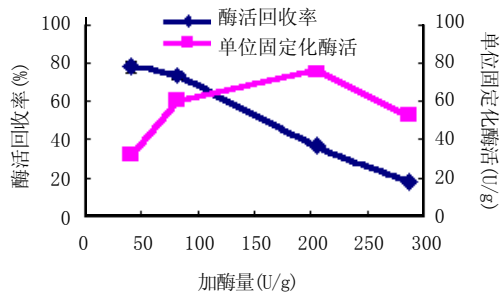


图 6 加酶量对酶活的影响

Fig.6 Effects of adding amount of enzyme on immobilized enzyme activity

2.4 正交试验方案及结果分析

根据单因素试验所得结果, 对甲苯磺酰氯与干吡啶

表 2 $L_9(3^3)$ 正交试验因素及水平的选取

Table 2 The selection of orthogonal test on factors and levels

因素	1	2	3
A(对甲苯磺酰氯:干吡啶)	0.5	1.0	1.5
B(pH)	4.0	4.5	5.0
C(离子强度)	0.1	0.2	0.3

表 3 $L_9(3^3)$ 正交试验方案及结果

Table 3 Orthogonal design and the results

实验号	A	B	C	活力回收率
1	1	1	1	40.29
2	1	2	2	74.35
3	1	3	3	46.40
4	2	1	2	55.93
5	2	2	3	74.67
6	2	3	1	68.53
7	3	1	3	66.99
8	3	2	1	71.24
9	3	3	2	60.53
K_1	161.04	163.20	180.06	
K_2	199.13	220.26	190.81	
K_3	198.76	175.47	188.06	
k_1	53.68	54.40	60.02	
k_2	66.38	73.42	63.60	
k_3	66.25	58.49	62.69	
R	12.70	19.02	3.58	

的比例, 固定化过程中缓冲液 pH、离子强度是影响酶活回收率的主要因素, 因此设计正交试验 $L_9(3^3)$, 试验方案及结果如表 2、表 3 所示。

从极差 R 的大小可得知, 影响酶活力回收率的主要因素是 pH, 其次是对甲苯磺酰氯与干吡啶的比例和离子强度。各因素的主次顺序是 $B > A > C$, 最佳的固定化条件为 $A_2B_2C_2$, 按最佳固定化条件得到固定化酶活回收率达到 83.60%。

2.5 固定化菊粉酶催化水解菊粉的糖分组成

在已确定的最优条件下, 固定化菊粉酶与 250g/L 菊

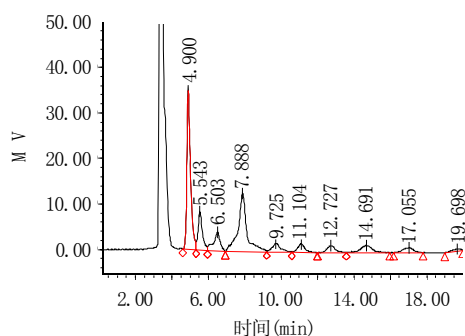


图7 菊粉酶水解菊粉HPLC糖分析

Fig.7 Sugar analysis through HPLC from hydrolyzed inulin by inulinase

糖(5U/g 菊糖)作用1.5h,对糖组分进行HPLC分析。在图7的高效液相色谱图中,根据峰面积与峰分布,以及果糖标样的峰面积,低聚果糖绝对含量达到28.21%。

3 结论

3.1 棉纤维对甲苯磺酰氯活化法成功地应用在菊粉酶的固定化,这点尚未发现报道。针对不同纤维成分的布料比较,发现绒布的固定化酶活较高。

3.2 通过单因素和正交实验得出优化的工艺条件:干吡啶:棉布=10ml/g,对甲苯磺酰氯:干吡啶=1g/ml, pH值4.5,离子强度0.2mol/L,加酶量80U/g,菊粉酶酶活回收率达到83.60%。

3.3 在优化的工艺条件下对糖组分进行HPLC分析,固定化酶与250g/L菊糖(5U/g菊糖)作用1.5h,低聚果糖含量达到28.21%。

参考文献:

- [1] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. 123-124.
- [2] Wei Wenling, Wan Wuguang, Le Huiying, et al. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85[J]. Process Biochemistry, 1999, 34: 643-646.
- [3] Esteban B F, Mariano G G, Lorena G R, et al. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2001, 37: 513-519.
- [4] 贾英民, 赵学慧. 几丁质固定化菊粉酶的研究[J]. 河北农业大学学报, 1997, 20(3): 80-84.
- [5] Ettalibi M, Baratti J C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28: 596-601.
- [6] 顾天成, 吕跃钢. 固定化菊粉酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(6): 19-23.
- [7] 彭英云, 江波, 金征宇. 曲霉SK004^{ATCC}菊粉酶发酵条件的确定及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 61-65.
- [8] 姜弘海, 邹汉法, 汪海林, 等. 复合纤维素膜固定化胰蛋白酶反应器及其应用于蛋白质酶解[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(5): 702-706.
- [9] 彭立凤, 刘新喜. 棉织物上 SESA 活化法固定化脂肪酶工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2001, 25(1): 30-32.
- [10] 杨静. 耐热重组 β -半乳糖苷酶固定化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2003. 18-19.