

微胶囊固定酶催化合成烷基糖苷的工艺优化

周亚军,王淑杰,徐艳阳,李宏谕,吕晨艳

(吉林大学生物与农业工程学院,吉林 长春 130022)

摘要:用微球截留固定化和酶催化有机合成技术对 β -葡萄糖苷酶固定化及其催化合成烷基糖苷的工艺进行了研究。优化出酶固定化最优工艺为:壁材海藻酸钠4.0%、交联剂戊二醛0.2%、凝聚剂 CaCl_2 0.10 mol/L、酶用量140 mg。以固定酶为催化剂、葡萄糖和正丁醇为原料合成烷基糖苷,确定合成的最佳工艺为:正丁醇20 mL、糖醇比2.0:20(g/mL)、固定酶6 g、反应温度40℃,反应时间3 h。得到的固定酶活力比游离酶高,稳定性好,重复使用3次后仍有较好活性。

关键词:烷基糖苷;固定酶; β -葡萄糖苷酶;工艺优化

中图分类号:O629.13;TQ426.97

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2009)05-0052-03

Optimization of alkyl-polyglycoside synthesis catalyzed by immobilized enzyme in microcapsules

ZHOU Ya-jun, WANG Shu-jie, XU Yan-yang, LI Hong-yu, LU Chen-yan

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: The optimal process of β -glucosidase immobilization and alkyl-polyglycoside (APG) synthesis is studied by the microspheric entrapment and the enzyme catalytic techniques respectively. The optimal conditions of enzyme immobilization are obtained as follows: sodium alginate concentration of 4.0% as cell materials, glutaraldehyde concentration of 0.20% as cross-linkers, CaCl_2 concentration of 0.10 mol/L as coagulants and β -glucosidase amount of 140 mg. APG is synthesized by glucose and *n*-butanol under the catalysis of immobilized enzyme and its optimal synthetic conditions are achieved as follows: *n*-butanol volume of 20 mL, ratio of glucose to *n*-butanol of 2.0:20(g/mL), immobilized enzyme amount of 6 g, reaction temperature at 40℃ and reaction time of 3 h. Compared with free enzyme, the immobilized enzyme can maintain higher activity and better stability, and can be reused for 3 times while still preserving high activity.

Key words: alkyl-polyglycoside; immobilized enzyme; β -glucosidase; process optimization

烷基糖苷(APG)是一种绿色环保型生物表面活性剂,用途广泛^[1-3]。其生产原料葡萄糖为可再生资源,生产过程无污染,产品易生物降解^[4]。目前生产方法仍为化学合成,产品纯度低、工艺复杂、成本高、安全性没有保障,不能用于食品、医药和生物领域^[5-7]。酶法催化合成烷基糖苷反应条件温和、工艺简单、收率高、纯度高^[6,8]、生物降解彻底、固定酶可重复使用、成本低,是一种有前途的方法^[9-10]。至今国内外有关酶法合成烷基糖苷研究报道不多^[7-8,11-15]。笔者用微球截留固定化和酶催化合成技术对 β -葡萄糖苷酶固定化及其催化合成烷基糖苷的工艺进行了研究。

1 实验部分

1.1 主要试剂

β -葡萄糖苷酶、硫酸铜、亚铁氰化钾、酒石酸钾钠、氢氧化钠、冰醋酸、次甲基蓝、无水已酸钠、正丁醇、海藻酸钠、葡萄糖、戊二醛、无水氯化钙。

1.2 实验步骤

微胶囊固定酶制作工艺流程如下: β -葡萄糖苷酶→(加入戊二醛)海藻酸钠→氯化钙→过滤→(加入氯化钙)浸泡→过滤→(加入戊二醛)浸泡→过滤→(加入蒸馏水)浸泡→过滤→储存。采用的是包埋法中的微球截留固定化技术^[9],即海藻酸钠为壁材、戊二醛为交联剂、氯化钙为凝聚剂,将 β -葡萄糖苷酶包埋在其中。将100 mg β -糖苷酶和0.50 mL 0.2%(质量分数)的戊二醛溶液先后加入到10.00 mL 4%(质量分数)的壁材溶液(海藻酸钠溶液)中,搅拌器搅拌均匀。将上述混合液用注射器滴入20 mL 0.1 mol/L的 CaCl_2 溶液中,挤成圆球状,用纱布滤出小球,换20 mL相同浓度的 CaCl_2 溶液继续浸泡2 h;再次滤出小球,用20 mL 0.02%(质量分数)的戊二醛溶液再次浸泡2 h(3℃冰箱中浸泡)。滤出小球并以蒸馏水洗涤数次,滤纸吸干,放入冰箱中备用。制作微胶囊固定酶时做到:配置海藻酸钠溶液用热水浴,可加速溶解;注射器选用5 mL的医用注射器,

收稿日期:2009-01-20

基金项目:吉林省自然科学基金项目(20070577)

作者简介:周亚军(1966-),男,博士,教授,主要从事生物有机合成技术方面的研究,0431-85095254, zhoyaj@jlu.edu.cn。

针头离液面高度约 10 cm,溶液以每 2 秒 1 滴的速度滴下,可得到球形固定酶,直径约 2 mm;固定酶制好后要及时放入 3℃ 冰箱,避免酶失活。

固定酶催化合成烷基糖苷工艺流程如下:正丁醇 + 葡萄糖 → (加入固定酶)搅拌均匀 → (恒温水浴振荡器)恒温反应 → 产品。还原糖的测定方法参考 GB5009.7—85,计算葡萄糖转化率。

2 结果与讨论

2.1 酶固定化的单因素实验和多因素正交实验结果

主要研究酶用量、海藻酸钠、戊二醛、氯化钙和浸泡时间对固定酶活力的影响。不同固定酶用量对葡萄糖转化率的影响规律如图 1(a)所示,葡萄糖转化率随酶用量的增加呈先增加后减少的变化,用量 120 mg 时,葡萄糖转化率最高,此时固定酶活力最大。

不同浓度海藻酸钠制成固定酶微胶囊对葡萄糖

转化率的影响如图 1(b),葡萄糖转化率随海藻酸钠质量分数的增加而升高,当质量分数大于 4%,黏度大而难以成球。海藻酸钠的最佳用量范围为质量分数 2% ~ 4%。

β -葡萄糖苷酶微胶囊固定时戊二醛浓度对葡萄糖转化率的影响如图 1(c),戊二醛浓度太低导致网格孔太大,引起酶的流失,太高则交联强度太大而导致底物与酶难接触,甚至对酶产生毒害作用引起酶失活。当质量分数为 0.2% 时,葡萄糖转化率最大。氯化钙浓度对葡萄糖转化率的影响如图 1(d),最佳 CaCl_2 浓度位于 0.2 mol/L。氯化钙包埋时间的影响如图 1(e),葡萄糖转化率随 CaCl_2 溶液的包埋时间的增加而增加,但增加速度缓慢,即 CaCl_2 溶液的包埋时间对固定酶活力的影响不显著,1 ~ 3 h 均可。戊二醛包埋时间对葡萄糖转化率的影响如图 1(f),葡萄糖转化率随戊二醛包埋时间的增加而有所增大,但影响并不明显,1 ~ 3 h 均可。

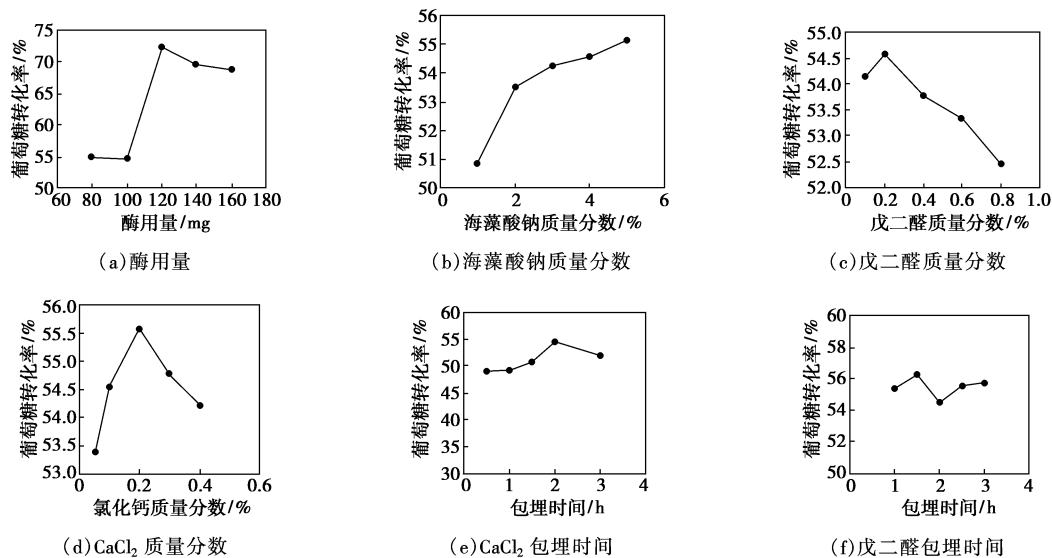


图 1 酶固定的单因素实验结果

根据上述单因素实验研究的结果,选酶用量、海藻酸钠、戊二醛和 CaCl_2 浓度为因素,每因素均设 3 水平,以 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平,设计实验。结果显示,影响固定酶活力因素的主次顺序为海藻酸钠浓度、戊二醛浓度、 CaCl_2 浓度、酶用量;固定酶最优工艺参数组合为酶用量 140 mg、海藻酸钠 4%、戊二醛 0.2%、 CaCl_2 0.1 mol/L。

2.2 固定酶催化合成烷基糖苷的单因素实验和正交实验

主要研究糖醇比、酶用量、反应温度和反应时间对葡萄糖转化率的影响规律。

不同糖醇比对葡萄糖转化率的影响如图 2(a),

当糖醇比为 1.5:20 (g/mL) 时,固定酶和游离酶催化的反应速率达到最高,同时相同条件下在两相反应体系中固定酶较游离酶活性高。

不同固定酶和游离酶用量对葡萄糖转化率的影响分别如图 2(b)、(c) 所示,条件相同时固定酶的催化葡萄糖转化率较游离酶催化的反应要高,即固定酶与游离酶相比具有高效性。

由图 2(d) 反应温度的影响可知,游离酶的最佳反应温度为 40℃,而固定酶则为 50℃。当温度大于 50℃ 时,游离酶迅速失活,固定酶由于有壁材保护,虽也有失活,但幅度相对较小。并且在相同的反应条件下,固定酶的活力均高于游离酶活力。

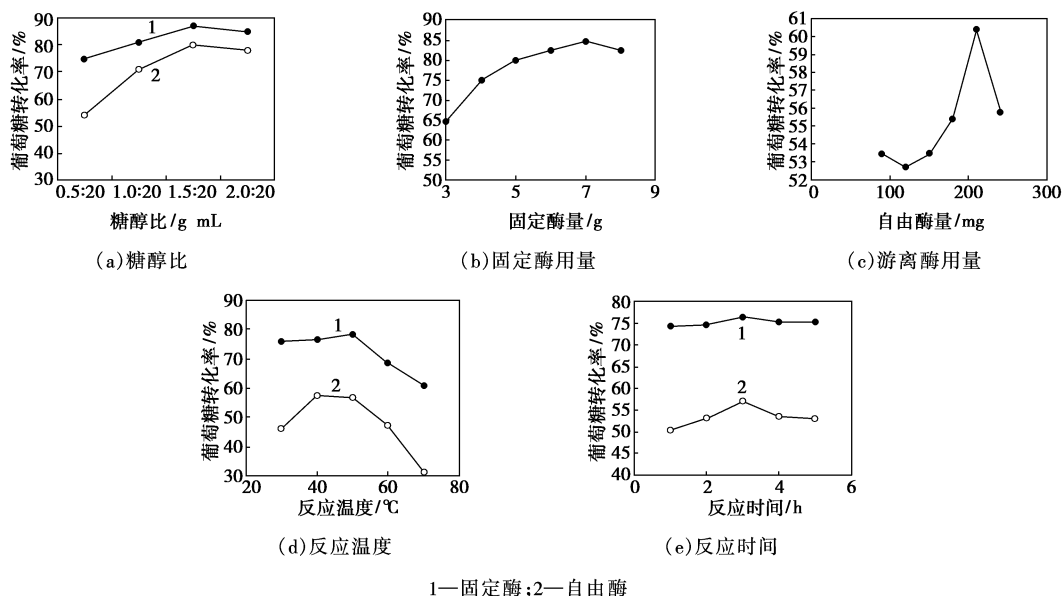


图 2 固定酶催化合成烷基糖苷的单因素实验

由图 2(e)可知,葡萄糖转化率随着反应时间的增加呈现先增后减的趋势。其最优反应时间为 3 h,并且在相同反应条件下,固定酶的活力要明显高于游离酶活力。

根据单因素实验的结果,选择糖醇比、固定酶用量、反应时间、反应温度为因素,每因素均设 3 水平,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验方案。结果显示 4 个因素都是显著因素,合成烷基糖苷工艺的最优工艺参数为:正丁醇用量 20 mL,糖醇比 2.0:20(g/mL),固定酶 6 g,反应温度 40℃,反应时间 3 h。

通过重复和对对比实验可知,该固定酶可以重复使用 3 次。

参考文献

[1] 劳国强,李颖.展示 APG 的美好前景[J].日用化学品科学,2001,24(2):30-32.
 [2] Goeld C, Schwarz A, Minani A, et al. Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilized enzyme for production of α -D-glucose-1-phosphate [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(1):77-86.
 [3] Shimada A, Shinohara K, Moriguchi K, et al. Methyl-D-mannopyranoside-responsive release of microcapsulated glucoamylase [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(4):551-553.
 [4] Masada S, Kawase Y, Nagatashi M, et al. An efficient chemoenzymatic production of small molecule glucosides with in situ UDP-glucose recycling [R]. FEBS Letters, 2007, 581(13):2562-2566.
 [5] Gargouri M, Smaali I, Manguardb T, et al. Fungus β -glycosidases: Immobilization and use in alkyl- β -glucoside synthesis [J]. Journal of Molecular

lar Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29(2):89-94.
 [6] Turner P, Svensson D, Adlercreutz P, et al. A novel variant of *Thermotoga neapolitana* β -glucosidase B is an efficient catalyst for synthesis of alkyl glucosides by transglucosylation [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 130(1):67-74.
 [7] 卫新,吕小丽,王兴涌.新型表面活性剂烷基糖苷合成研究进展 [J].菏泽师范专科学校学报,2004,26(4):44-47.
 [8] 孙波,安钢,何家骐,等.辛烷基葡萄糖苷的合成研究 [J].天津理工大学学报,2000,16(1):78-82.
 [9] Ducret A, Trani M, Lortie R. Comparison between various commercial sources of almond β -glucosides for the production of alkyl glucosides [J]. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 38(2):91-94.
 [10] Piscevcova A, Rossi C, Husakova L, et al. β -1,4-Galactosyltransferase-catalyzed glycosylation of sugar derivatives: Modulation of the enzyme activity by α -lactalbumin, immobilization and solvent tolerance [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 39(1/2/3/4):98-104.
 [11] Bertrand A, Morel S, Lefoulon F, et al. *Leuconostoc mesenteroides* glucanucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(7):855-863.
 [12] Makropoulou M, Christakopoulos P, Tsitsimpikou C, et al. Factors affecting the specificity of β -glucoside *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alky- β -D-glucosides [J]. Biological Macromolecules, 1998, 22(2):97-101.
 [13] Balogh T, Boross L, Kosary J. Novel reaction systems for the synthesis of α -glucosides by enzymatic reverse hydrolysis [J]. Tetrahedron, 2004, 60(11):679-682.
 [15] Trincone A, Pagnotta E, Rossi M, et al. Enzymatic synthesis of 2-deoxy- β -glucosides and stereochemistry of β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* on glucal [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12(5):2783-2787. ■