

β -葡萄糖苷酶 ACA 微胶囊固定化实验研究

周亚军,王淑杰,苏丹,李宏谕,杨旭升
(吉林大学生物与农业工程学院,吉林 长春 130022)

摘要:对壳聚糖为壁材的共价交联固定、海藻酸钠为壁材的包埋固定及壳聚糖和海藻酸钠共用的新型复合载体(ACA)固定的 β -葡萄糖苷酶进行了对比研究,得出 ACA 微胶囊固定化的酶具有较好的催化活性、重复使用和低温贮藏性能。醋酸和戊二醛及 CaCl_2 的浓度、壳聚糖和海藻酸钠用量、引发和交联时间对 ACA 微胶囊固定酶的形态和性能影响较大,葡萄糖转化率随醋酸与戊二醛和 CaCl_2 浓度的增加、壳聚糖和海藻酸钠用量的增大、交联和引发时间的延长呈先增大后减小的变化趋势,并于不同特定值达到最大。

关键词: β -葡萄糖苷酶;ACA 微胶囊固定化;烷基糖苷;葡萄糖转化率

中图分类号: TQ426.97

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2009)10-0051-04

Research on techniques of β -glucosidase immobilized in ACA microcapsule

ZHOU Ya-jun, WANG Shu-jie, SU Dan, LI Hong-yu, YANG Xu-sheng

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

Abstract: The comparison study among β -glucosidase immobilized with chitosan by covalent cross-linking, with sodium alginate by embedded, or with the microcapsule containing both of them (alginate-chitosan-alginate, ACA) are made. The experimental results show that ACA microcapsule immobilized enzyme has better catalytic activity, reusability and the storage performance at low temperature. The concentration of acetate, glutaraldehyde and CaCl_2 and the amount of chitosan and sodium alginate, the initiation and cross-linking time have big influence to form and properties of ACA microcapsule immobilized enzyme. The conversion rate of glucose first has a increase and then decreases with increase of the concentration of acetate, glutaraldehyde and CaCl_2 , the amount of chitosan and sodium alginate and the extension of initiation and cross-linking time, and reach the maximum by specific value respectively.

Key words: β -glucosidase; ACA microcapsule immobilization; alkyl-polyglycoside; conversion rate of glucose

烷基糖苷(APG)是一种性能优良、用途广泛的绿色环保型生物表面活性剂,主要用于食品、医药、生物、化妆品、洗涤剂等领域^[1-3]。以葡萄糖和高碳醇为原料,利用 β -葡萄糖苷酶催化合成烷基糖苷是有发展前景的方法^[4]。而水溶性 β -葡萄糖苷酶不溶于反应物高碳醇,在催化合成反应中易聚集成团,活性和稳定性明显下降,酶不能回收重复使用。为提高 β -葡萄糖苷酶在有机合成反应中的活性和稳定性,增加重复使用次数,提高催化效率,降低成本,需对 β -葡萄糖苷酶进行固定化处理。笔者以壳聚糖^[5]和海藻酸钠^[6]为壁材,对壳聚糖为壁材的共价交联固定法^[7]、海藻酸钠为主的包埋固定法^[8]及壳聚糖和海藻酸钠共用的新型复合载体固定法(ACA)^[9]进行对比,并对影响 ACA 微胶囊固定酶催化性能的各因素进行实验研究。

1 实验部分

1.1 3种方法固定化的 β -葡萄糖苷酶微胶囊

主要实验材料包括海藻酸钠、壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$)、十二碳醇、亚铁氰化钾、乙酸锌、无水氯化钙、乙酸、戊二醛、酒石酸钾钠、氢氧化钠、无水乙酸钠、盐酸、次甲基蓝、硫酸铜、葡萄糖,均为分析纯; β -葡萄糖苷酶,酶活 230 000 u/g。

(1)酶的包埋固定化:称 1.2 g 海藻酸钠溶于 50 mL 蒸馏水,45℃ 水浴拌匀,加 0.2 g 葡萄糖苷酶搅匀,2 号针头注射器将其滴加 2% (质量分数,下同) CaCl_2 溶液中(冰浴)引发 20 min,用蒸馏水洗涤固定好的葡萄糖苷酶酶珠数次,置 4℃ 冰箱冷藏备用。

(2)酶的交联固定化:壳聚糖溶 1% 醋酸溶液,40℃ 水浴中溶解成胶体,加 β -葡萄糖苷酶 0.2 g,静

收稿日期:2009-07-13;修回日期:2009-09-03

基金项目:吉林省科技厅基础研究项目(20070577)

作者简介:周亚军(1966-),男,博士,教授,主要研究方向为生物有机合成技术,zhouyaj@jlu.edu.cn。

置 2.5 h, 滴加到 1% (质量分数, 下同) NaOH 溶液中, 制成球状颗粒, 蒸馏水反复冲洗后, 置于 0.25% (质量分数, 下同) 戊二醛溶液中静置 8 h, 滤出后用水反复冲洗, 室温干燥, 置 4℃ 冰箱中冷藏。

(3) 酶的 ACA 微胶囊固定化: 称 1.2 g 海藻酸钠溶于 50 mL 蒸馏水中, 加 0.2 g 壳聚糖搅匀, 再加 0.2 g 葡萄糖苷酶, 拌匀, 用 2 号针头注射器将壁材液滴加在 2% CaCl₂ (冰浴) 溶液, 20 min 后, 用蒸馏水洗涤固定好的葡萄糖苷酶酶珠数次, 固定酶加 0.1% 戊二醛溶液交联, 6 h 后用水洗涤数次, 洗去残余戊二醛, 置于 4℃ 冰箱冷藏备用。用壳聚糖和海藻酸钠共用的新型复合载体固定法 (alginate-chitosan-alginate, 简称 ACA)^[9] 对 β -葡萄糖苷酶进行固定, 其固定化酶的制备工艺流程如下: 壳聚糖 + 海藻酸钠 + β -葡萄糖苷酶 + 水 + 醋酸 → 氯化钙溶液 → 低温浸泡 → 过滤 → 洗净 → 戊二醛溶液 → 交联 → 过滤 → 洗净 → ACA 微胶囊固定化酶 → 冰箱冷藏。① 壳聚糖、海藻酸钠、 β -葡萄糖苷酶溶于水, 充分混匀后加醋酸; ② 壁材壳聚糖、海藻酸钠的溶解需用 40℃ 水浴加热; ③ 壁材溶液滴入引发剂氯化钙溶液应注意高度和滴速, 离液面 10 cm 匀速滴入; ④ 过滤用细孔塑料网, 网口不宜过大, 防止微胶囊漏出; ⑤ 预防戊二醛中毒; ⑥ 引发后形成微球及最终形成的微胶囊固定酶应反复冲洗。

1.2 葡萄糖转化率的测定

微胶囊固定化 β -葡萄糖苷酶的活性通过反应物葡萄糖转化率大小来衡量, 即转化率大, 酶催化活性强。葡萄糖转化率可用国家标准中还原糖测定 (GB 5009.7—85)^[10-11] 中的直接滴定法测葡萄糖残余量。

2 结果与讨论

2.1 酶固定化方法的选择及其催化性能

不同固定化葡萄糖苷酶对葡萄糖转化率的影响如图 1(a), 其中 ACA 微胶囊固定的酶催化效果最好。不同固定化 β -葡萄糖苷酶第 2 次使用对葡萄糖转化率的影响如图 1(b), 3 种固定化酶第 2 次重复使用性能均较好, 其催化能力顺序为: ACA 微胶囊固定酶 > 包埋固定酶 > 共价交联固定酶。ACA 微胶囊重复使用次数对酶的催化性能影响如图 1(c), 2 次重复使用, ACA 微胶囊固定酶的催化能力

变化较小, 葡萄糖转化率略微减小。自由酶与 ACA 微胶囊固定化酶催化能力对比如图 1(d), 酶经固定后的催化能力远大于未固定的自由酶, 自由酶在 40~50℃, 催化能力随温度升高而升高, 而固定后葡萄糖苷酶的催化能力是 40℃ 大于 50℃。

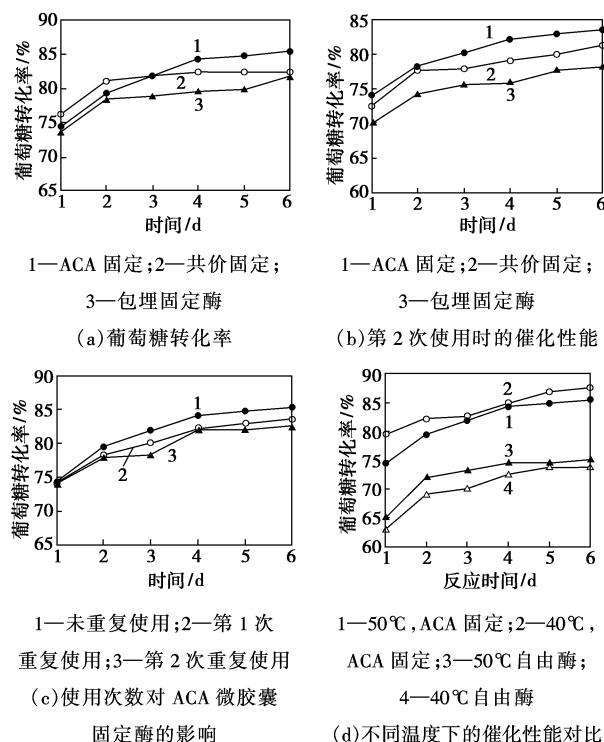


图 1 不同酶的性能比较

关于酶的贮藏时间, 结果显示 ACA 微胶囊固定酶在 4℃ 冰箱中密封保存可很好地保持其催化能力, 保存 16 d, 催化能力基本不变, 第 18 d 开始, 催化能力开始下降。

2.2 β -葡萄糖苷酶 ACA 微胶囊固定化单因素实验

2.2.1 醋酸的影响

醋酸分别取 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% (体积分数, 下同), 海藻酸钠 1.2 g, CaCl₂ 2% (质量分数), 引发时间 20 min, 戊二醛 0.25% (质量分数), 交联时间 6 h, β -葡萄糖苷酶 0.2 g, 壳聚糖 0.2 g, 其对微胶囊固定酶状态及性能影响如表 1。醋酸浓度增加, 壳聚糖溶解性变好, 壁材液黏度增大, 胶囊增大。醋酸体积分数若大于 1%, 无法形成胶囊, 小于 0.3%, 壳聚糖不全溶, 针管堵塞, 制备难度大。醋酸体积分数增加, 在 0~0.2%, 葡萄糖转化率变化小; 体积分数再增加, 葡萄糖转化率逐渐增大, 当体积分数为 0.4% 时最大, 后又减小。故醋酸体积分数取 0.4% 为最佳。

表 1 醋酸体积分数对 ACA 微胶囊固定酶形态和性能的影响

醋酸体积分数/%	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0
壁材及胶囊状态	未全溶,多沉淀,壁材液稀,囊小	未全溶,多沉淀,壁材液稀,囊小	未全溶,多沉淀,壁材液稀,囊小	未全溶,多沉淀,壁材液浓,囊小	溶解,无沉淀,壁材液浓,囊小	溶解,无沉淀,壁材液浓,囊大	溶解,无沉淀,壁材液浓,囊大
葡萄糖转化率/%	81.7	81.5	81.2	83.2	84.3	83.7	80.4

2.2.2 壳聚糖的影响

壳聚糖分别取 0、0.15、0.20、0.30、0.60、1.20 g, 醋酸体积分数 0.4%, 海藻酸钠 1.2 g, CaCl₂ 质量分数 2%, 引发时间 20 min, 戊二醛质量分数 0.25%, 交联时间 6 h, β -葡萄糖苷酶 0.2 g, 壳聚糖用量对微胶囊固定酶形态及催化性能的影响如表 2, 可以看出壳聚糖最佳用量为 0.2 g。

表 2 壳聚糖对 ACA 微胶囊固定酶形态和性能的影响

壳聚糖/g	0	0.15	0.20	0.30	0.60	1.20
壁材液状态	无杂质	全溶	全溶	全溶	稍不溶	大量不溶
葡萄糖转化率/%	81.7	83.2	83.3	83.1	82.0	81.8

2.2.3 海藻酸钠的影响

海藻酸钠分别取 0.2、0.6、1.2、1.6、2.4 g, 醋酸体积分数 0.4%, CaCl₂ 质量分数 2%, 引发时间 30 min, 戊二醛质量分数 0.25%, 交联时间 6 h, β -葡萄糖苷酶 0.2 g, 壳聚糖 0.2 g, 海藻酸钠用量对微胶囊固定酶形态及性能的影响如表 3。海藻酸钠质量在 0.6~1.6 g 时, 可形成正常胶囊, 用量 \leq 0.24 g 时胶囊易破裂, 用量 \geq 2.4 g 时壁材液黏度过大, 胶囊无法形成。

表 3 海藻酸钠用量对 ACA 微胶囊固定酶形态和性能的影响

海藻酸钠用量/g	0.24	0.60	1.20	1.60	2.40
壁材及胶囊形态	囊小, 透明, 反应中全破裂	囊小, 透明, 反应中无破裂	囊小, 不透明, 反应中无破裂	囊大, 不透明, 反应中无破裂	黏度大, 无法形成胶囊
葡萄糖转化率/%	无	85.6	84.6	84.7	无

2.2.4 CaCl₂ 的影响

CaCl₂ 作为引发剂与海藻酸钠发生成囊反应, 用 Ca²⁺ 取代海藻酸钠的 Na⁺, 使其交联成膜, 影响胶囊孔径和固定酶的性能, 其浓度对 ACA 微胶囊固定酶的影响如图 2(a), CaCl₂ 浓度对葡萄糖转化率影响较大, 随其浓度增加而增大, 反应 3 d 后葡萄糖转化率在 84.8%~85.4%, CaCl₂ 质量分数 1.5% 时可达最大的 85.4%, 随后逐渐减小。这是因为 Ca²⁺ 浓度增

加使固定酶构象改变而产生抑制作用所致。从胶囊形态看, CaCl₂ 质量分数为 1% 时形成椭球状胶囊, \geq 1.5% 时胶囊为球状。故 CaCl₂ 最佳质量分数为 1.5%。

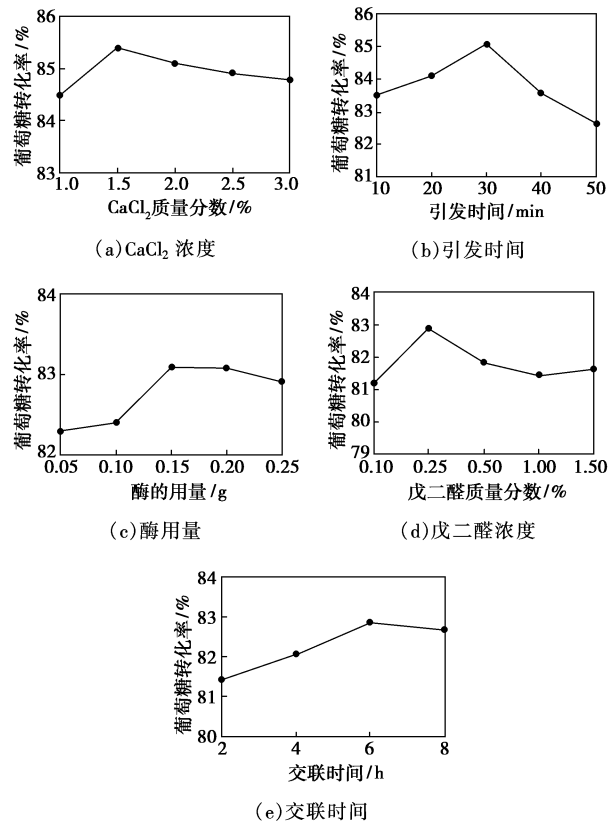


图 2 制备条件对 ACA 微胶囊固定酶性能的影响

2.2.5 引发时间的影响

引发时间分别取 10、20、30、40、50 min, 醋酸体积分数 0.4%, CaCl₂ 质量分数 2%, 戊二醛质量分数 0.25%, 交联时间 6 h, β -葡萄糖苷酶质量 0.2 g, 壳聚糖质量 0.3 g, 海藻酸钠质量 1.2 g, 引发时间对 ACA 微胶囊固定酶的影响如图 2(b)。葡萄糖转化率随壁材溶液在 CaCl₂ 溶液中引发时间的延长先增大后减小, 30 min 时最大。

2.2.6 加酶量的影响

β -葡萄糖苷酶分别取 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 g, 醋酸体积分数 0.4%, 海藻酸钠质量 1.3 g,

CaCl₂ 质量分数 2%, 引发时间 30 min, 戊二醛质量分数 0.25%, 交联时间 6 h, 壳聚糖 0.2 g, 酶用量对 ACA 微胶囊固定酶性能影响如图 2(c), 加酶量 0.05~0.25 g, 葡萄糖转化率先快速增大后缓慢减小, 0.15~0.20 g 达最大。加酶量为 0.15 g 时效果最好。

2.2.7 戊二醛的影响

戊二醛质量分数分别取 0.10%、0.25%、0.50%、1.00%、1.50%, 醋酸体积分数 0.4%, CaCl₂ 质量分数 2%, 引发时间 30 min, 交联时间 6 h, β-葡萄糖苷酶 0.2 g, 壳聚糖 0.2 g, 海藻酸钠 1.3 g, 交联剂对 ACA 微胶囊的影响如图 2(d)。葡萄糖转化率随戊二醛浓度升高先增大后减小, 0.25% 时最大。戊二醛是交联剂和酶的变性剂, 浓度过高, 使壳聚糖分子上的氨基与戊二醛发生分子内或分子间交联, 使酶和载体的结合力降低。

2.2.8 交联时间的影响

交联时间分别取 2、4、6、8 h, 醋酸体积分数 0.4%, CaCl₂ 质量分数 2%, 戊二醛质量分数 0.25%, 引发时间 30 min, β-葡萄糖苷酶 0.2 g, 壳聚糖 0.2 g, 海藻酸钠 1.3 g, 其对 ACA 微胶囊固定酶的影响如图 2(e)。葡萄糖转化率随交联时间的增加先增大后减小, 即交联时间 6 h, 葡萄糖转化率最大, 之后略有减小。因戊二醛有双功能基团, 一侧醛基与壳聚糖载体上的氨基偶联后, 在载体表面出现游离醛基多少影响酶的固定量。随戊二醛交联时间的延长, 载体表面醛基增到一定程度趋于平衡, 酶固定量达饱和不再增加。

3 结语

β-葡萄糖苷酶经 ACA 微胶囊固定化后与包埋固定、共价交联固定法相比, 具有较好的催化活性、稳定重复使用性和低温贮藏性能, 最佳反应温度由

原来 50℃ 降至 40~50℃。醋酸、戊二醛和 CaCl₂ 浓度, 壳聚糖和海藻酸钠用量, 引发时间和交联时间对 ACA 微胶囊形态和催化性能影响较大, 即葡萄糖转化率随醋酸、戊二醛和 CaCl₂ 浓度的增加, 壳聚糖和海藻酸钠用量的增大, 交联时间和引发时间的延长而呈现先增大后减小的变化趋势, 并于不同特定值达到最大。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Goedel 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.
- [4] 史俊. 可生物降解的表面活性剂烷基多糖苷在油田化学中的应用研究[J]. *油田化学*, 2001, 18(2): 97-100.
- [5] 李牧. 壳聚糖的性质及应用研究[J]. *科技信息*, 2007(20): 29-36.
- [6] 陈蕾, 罗志刚, 何小维. 海藻酸钠在医学工程上的应用研究进展[J]. *医疗卫生装备*, 2008(9): 35-44.
- [7] 江龙法, 张所信, 薛婉丽, 等. 壳聚糖生物微胶囊的制备及应用研究[J]. *淮海工学院学报*, 2001, 10(2): 50-53.
- [8] 李朝霞, 朱建良. 制备海藻酸钠-壳聚糖生物微胶囊的技术研究[J]. *盐城工学院学报*, 2005, 6(2): 18-25.
- [9] 李自成, 王浩红. 微胶囊及其应用简介[J]. *化学教学*, 2003(12): 24-25.
- [10] 彭道锋, 许文苑. 新型绿色表面活性剂一烷基糖苷[J]. *日用化学品科学*, 2004, 27(1): 1-34.
- [11] 周亚军, 王淑杰, 徐艳阳, 等. 微胶囊固定酶催化合成烷基糖苷的工艺优化[J]. *现代化工*, 2009, 29(5): 52-54. ■

《现代化工》被评为“RCCSE 中国权威学术期刊”

在武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)与武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发完成的《中国学术期刊评价研究报告》(2009—2010)中,《现代化工》被评为“RCCSE 中国权威学术期刊”。

该课题组经过对我国万种期刊的大致浏览、反复比较和研究, 从中挑选出了 6 170 种纯学术性期刊和半学术性期刊参与评价。专家们首先为“权威期刊”和“核心期刊”界定概念, 所谓“权威期刊”是指刊载基金论文数量多, 被读者利用次数高、广受网络用户点击、二次文献转载篇数多或被国外重要数据库收录多的期刊, 它们基本上代表了该学科领域内的学术前沿; 而“核心期刊”则指那些发表基金论文数量相对较多、被读者利用次数较高、网络用户点击较多、二次文献转载篇数较多或被国外重要数据库收录较多的那

些期刊, 它们刊载的学术论文学术影响力较高, 是该学科领域内主要成果的传播载体。研究人员将把在各学科期刊排行榜中排在最前面的 5% 的期刊定为“权威期刊”, 排在前面 6%~20% 的为“核心期刊”, 权威期刊是核心期刊中的“核心”, 是最重要的核心期刊, 在学术界与科研人员心目中享有权威地位和最高学术水平。

该评价中心系统, 采用定量评价与定性分析相结合的方法, 构建了科学、合理的多指标评价体系, 得出了 65 个学术期刊排行榜, 包括分学科的 61 个排行榜和分类型的 4 个高校学报排行榜。这次共有 6 170 种中国学术期刊参与评价, 计 1 324 种学术期刊进入核心区, 其中权威期刊 311 种, 核心期刊 1 013 种, 约占总数的 21.46%。

——《现代化工》编辑部