

凹凸棒土固定化 β -葡萄糖苷酶 催化葡萄糖合成辛基糖苷

张 焜, 马 勇, 刘严华, 崔正刚, 王 峰*

(江南大学化学与材料工程学院, 江南大学食品胶体与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:采用吸附-交联的方法获得凹凸棒土固定的 β -葡萄糖苷酶, 酶的固载量为 147 mg/g, 表观酶活为 87.5 U/g。固定后, 酶在加入叔丁醇混合溶剂中催化合成辛基葡萄糖苷的催化效率显著提高, 葡萄糖转化率提高 80.6%。在反应温度为 50℃, pH 为 6.5, 葡萄糖浓度为 0.05 mol/L, $V(\text{辛醇}):V(\text{叔丁醇}):V(\text{水})=8:1:1$ 的反应条件下, 葡萄糖转化率可达到 20.4%, 反应达到平衡的时间从自由酶催化反应的 120 h 缩短至 72 h。反应动力学研究表明, 葡萄糖对酶催化反应具有底物抑制作用, 通过固定化可提高酶耐受底物抑制的最大葡萄糖浓度, 增加最大反应速率。固定酶在重复使用 3 次后酶活下降 70%。

关键词:凹凸棒土; β -葡萄糖苷酶; 固定化; 辛基葡萄糖苷; 底物抑制

中图分类号: TQ426.97; O629.13

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)06-0132-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2016.06.032

Synthesis of octyl glucoside from glucose catalyzed by attapulgite immobilized β -glucosidase

ZHANG Xuan, MA Yong, LIU Yan-hua, CUI Zheng-gang, WANG Feng*

(School of Chemical and Material Engineering, Food Colloids and Biological Technology Key Laboratory of the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: β -Glucosidase is immobilized on attapulgite by adsorption-crosslinking method, leading to an immobilized derivative with 147 mg protein/g carrier of β -glucosidase and 87.5 U/g of apparent activity. The immobilized β -glucosidase exhibits the improved catalytic efficiency for synthesis of octyl glucoside in the *t*-butanol-water miscible organic solvent. The conversion rate of glucose is increased by 80.6%. At the same time, the conversion rate of glucose can reach 20.4% under the following conditions: 50℃ of temperature, 6.5 of pH, 0.05 M of glucose, 0.05 mol/L of glucose concentration and 8:1:1 of $V(\text{octyl alcohol}):V(\text{t-butanol}):V(\text{water})$. The reaction time for obtaining maximum conversion rate is decreased from 120 h (free enzyme) to 72 h. The investigation of kinetics demonstrates that the production of octyl glucoside from glucose catalyzed by β -glucosidase has substrate inhibition effect. Through immobilization, both the maximum value of glucose concentration for inhibiting the reaction and maximum reaction rate are increased. After recycling for 3 times, the activity of immobilized derivatives is dropped by 70%.

Key words: attapulgite; β -glucosidase; immobilization; octyl glucoside; substrate inhibition

以辛基葡萄糖苷为代表的中长链烷基糖苷是一类性能优良的非离子表面活性剂, 广泛应用于洗涤、化妆品等行业领域^[1]。通过传统化学法得到的烷基糖苷多为各种异构体和副产品的混合物, 严重限制了其在医药、生物领域的应用价值^[2]。酶是一种具有区域和立体选择性的生物催化剂, 酶法催化合成烷基糖苷可得到高纯度的产物^[3]。 β -葡萄糖苷酶可在非水相中催化葡萄糖和不同链长的烷基醇生成各类烷基糖苷^[4]。但是, 由于中长链烷基醇水溶性差, 酶在有机溶剂中易失活等因素的制约, 中长链烷基糖苷的产率均非常低^[5]。

酶固定化技术可以在保持酶催化高效性和专一性的基础上改善酶的稳定性^[6]。多种硅酸盐黏土

具有机械强度高, 热稳定性好, 抗有机溶剂, 生物亲和性良好, 抗微生物腐蚀等特点, 使用硅酸盐黏土作为酶固定化载体的研究受到了更多的关注^[7-9]。纳米凹凸棒土具有比表面积大, 吸附能力强的特点, 表面亲水基团可以富集水份^[10], 有利于水解酶维持三维结构。笔者以纳米凹凸棒土为载体, 通过吸附-交联的方法固定 β -葡萄糖苷酶, 在水溶性有机溶剂体系中催化合成了辛基葡萄糖苷。

1 实验部分

1.1 材料

纳米凹凸棒土由江苏省淮阴工学院化工学院提供; β -葡萄糖苷酶由实验室自苦杏仁中提取(酶活

收稿日期: 2015-11-05

基金项目: 中央大学基础研究基金(JUSRP211A09)

作者简介: 张焜(1989-), 男, 硕士生, 研究方向为生物化工, xuanzhang1118@163.com; 王峰(1970-), 博士, 副教授, 研究方向为生物化工, 通讯联系人, fwang@jiangnan.edu.cn。

为 109.18 U/g);对硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)购自美国 Sigma 公司;对硝基苯酚(pNP)、考马斯亮蓝(G-250)、柠檬酸、磷酸二氢钠等试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 凹凸棒土固定化 β -葡萄糖苷酶

将 50 mg 凹凸棒土置于 20 mL 0.8 mg/mL 酶溶液(pH = 5.8 磷酸盐缓冲液配置)中,20℃ 恒温吸附 2.5 h,离心分离上清液和固定酶。将固定酶置于 0.1% 的戊二醛中 10℃ 交联 1 h。固定酶用 50 mL 缓冲液洗涤 30 min,共洗涤 5 次,在 30℃ 真空干燥箱中干燥 5 h 后置于 4℃ 冰箱保存。计算上清液以及洗涤液中残留蛋白量。

1.2.2 固定酶催化合成辛基葡萄糖苷

取 40 mg 葡萄糖溶于 0.05 mL pH 5.8 的磷酸盐缓冲液中,加入 0.05 mL 助溶剂和 0.9 mL 辛醇,再加入 3 U 固定酶。于 50℃ 恒温培养箱中搅拌反应 5 d。每隔 24 h 取样 10 μ L 用色谱甲醇稀释 25 倍,经 0.45 μ m 膜过滤,通过高效液相色谱检测反应结果。

1.2.3 酶活力测定

将 0.4 mL 适当稀释的酶溶液(或者适量固定化酶)与 1.6 mL 5 mmol/L 对硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)溶液混合(混合前分别于 50℃ 水浴预热 5 min),置于 50℃ 水浴摇床震荡反应 4 min,立即加入 4 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应。在波长为 405 nm 的条件下检测吸光度。以 0.4 mL 的蒸馏水作空白对照。根据标准曲线计算生成对硝基苯酚的量。酶活单位定义:在 pH = 5.8、50℃,每 1 min 水解生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活(1 U)。

1.2.4 蛋白含量测定

以牛血清蛋白作为标准蛋白,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[11]。

1.2.5 HPLC 检测

利用 1525 液相色谱仪(美国 Waters 公司生产)接反相 C18 柱(岛津 YMC-Pack ODS-AQ ϕ 250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)进行检测,流动相 V(甲醇):V(水) = 7:3,流速为 0.8 mL/min,柱温为 65℃。以葡萄糖作参照确定辛基糖苷生成量。

1.2.6 酶促反应底物抑制动力学

底物抑制的 Lineweaver-Burk 速率方程:

$$1/r_{ss} = (1/K_{SI}r_{max})C_s + (1/r_{max})$$

式中, r_{ss} 为底物抑制反应速率; C_s 为底物浓度; K_{SI} 为

底物抑制解离常数; r_{max} 为最大反应速率。

2 结果与讨论

2.1 戊二醛交联对固定化酶吸附稳定性和酶活的影响

戊二醛交联对固定化及酶的固载稳定性的影响如图 1 所示。

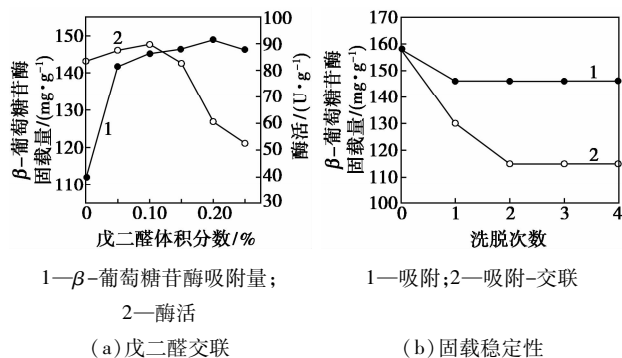


图 1 戊二醛交联对固定化及酶的固载稳定性的影响

通过吸附作用将酶固定在载体上,再经一定浓度的戊二醛交联可以增强酶的固载稳定性^[12]。然而戊二醛也是蛋白质的变性剂,高浓度的戊二醛可使酶失活^[13],纳米凹凸棒土具有高表面自由能,易于吸附蛋白质^[14]。在本研究中,以凹凸棒土为载体,在 20℃,pH 为 5.8,初始给酶量为 0.8 mg/mL 时吸附 2.5 h,凹凸棒土对 β -葡萄糖苷酶的固载量为 158 mg/g,但是吸附稳定性不强,经 50 mL 缓冲液洗涤 30 min,洗涤 2 次后 30% 的酶从载体脱落,如图 1 (b) 所示。由图 1 (a) 可知,经 0.1% 戊二醛交联后酶固载稳定性增强,洗脱后固载量为 146 mg/g,固定酶表观酶活为自由酶酶活的 79.1%,固载效果最佳。通过吸附-交联法介孔 SiO_2 固载 β -葡萄糖苷酶的量为 132 mg/g,固定酶表观酶活为自由酶酶活的 68.7%^[15]。可见,纳米凹凸棒土对 β -葡萄糖苷酶具有良好的固载能力。

2.2 固定酶催化合成辛基糖苷反应中助溶剂的选择

β -葡萄糖苷酶有机溶剂耐受能力较弱^[9]。多数 β -葡萄糖苷酶催化合成糖苷的反应只能选择在醇/水两相体系中进行^[16]。然而,泰国红木 β -葡萄糖苷酶催化合成烷基糖苷的研究中,加入助溶剂 DME 提高了辛基糖苷的产率^[17],表明在反应体系中加入有助于底物互溶的有机溶剂有利于 β -葡萄糖苷酶催化的糖苷化反应。

表1 不同助溶剂对自由酶催化合成辛基糖苷的影响

| 时间 | 辛基糖苷生成量/(mmol·L ⁻¹) | | | | |
|-----|---------------------------------|------|-----|--------------|------|
| | None | DMSO | DMF | <i>t</i> -BA | DME |
| 24 | 5.48 | 0 | 0 | 5.53 | 5.87 |
| 72 | 9.44 | 0 | 0 | 5.58 | 6.23 |
| 120 | 10.98 | 0 | 0 | 5.81 | 6.27 |

表2 不同助溶剂对固定酶催化合成辛基糖苷的影响

| 时间 | 辛基糖苷生成量/(mmol·L ⁻¹) | | | | |
|-----|---------------------------------|------|------|--------------|-------|
| | None | DMSO | DMF | <i>t</i> -BA | DME |
| 24 | 5.03 | 2.17 | 1.96 | 8.54 | 6.68 |
| 72 | 9.76 | 2.64 | 2.74 | 15.96 | 10.83 |
| 120 | 11.54 | 2.56 | 2.68 | 15.72 | 12.09 |

由表1可知,DMSO、DMF添加5%,自由酶完全失活,加入5%叔丁醇、乙二醇二甲醚,自由酶催化生成辛基糖苷的量显著下降。由表2可知,在加入5%极性助溶剂后,经凹凸棒土固定的 β -葡萄糖苷酶均可催化生成辛基糖苷,其中加入叔丁醇、乙二醇二甲醚助溶剂时,反应速率提高的同时辛基糖苷生成量也有所上升。各种助溶剂加入量对固定酶催化反应的影响如表3所示,其中叔丁醇体积分数为10%时效果最佳,辛基糖苷的生成量为16.98 mmol/L,转化率提高了55.2%。

表3 助溶剂加入量对固定酶催化生成辛基葡萄糖苷的影响

| 助溶剂体积分数/% | 辛基葡萄糖苷生成量/(mmol·L ⁻¹) | | | |
|-----------|-----------------------------------|------|--------------|-------|
| | DMSO | DMF | <i>t</i> -BA | DME |
| 0 | | | 10.94 | |
| 5 | 2.26 | 2.73 | 15.79 | 12.09 |
| 10 | 0 | 0 | 16.98 | 12.74 |
| 15 | 0 | 0 | 0.36 | 13.52 |
| 20 | 0 | 0 | 7.51 | 9.81 |

2.3 水体积分数、酶用量、pH及温度对辛基糖苷生成量的影响

水体积分数、酶用量、pH、温度对反应的影响如图2所示。

由图2(a)可知,当反应体系中水的体积分数为10%时,辛基糖苷生成量最高。相比于自由酶催化合成辛基糖苷所需的水的体积分数有所降低^[18],更利逆水解反应的进行。由图2(b)可知,在不同的酶用量条件下反应最大生成量相同,当加入酶量大于3 U时,反应速率不再提升,反应72 h结束,反应

时间明显短于自由酶催化反应的120 h^[19],及聚丙烯酸微胶囊固定化酶催化合成辛基糖苷反应的168 h^[20]。由图2(c)、图2(d)可以看出,在反应温度为50℃和pH 6.5时,酶催化合成辛基糖苷的生成量最高。

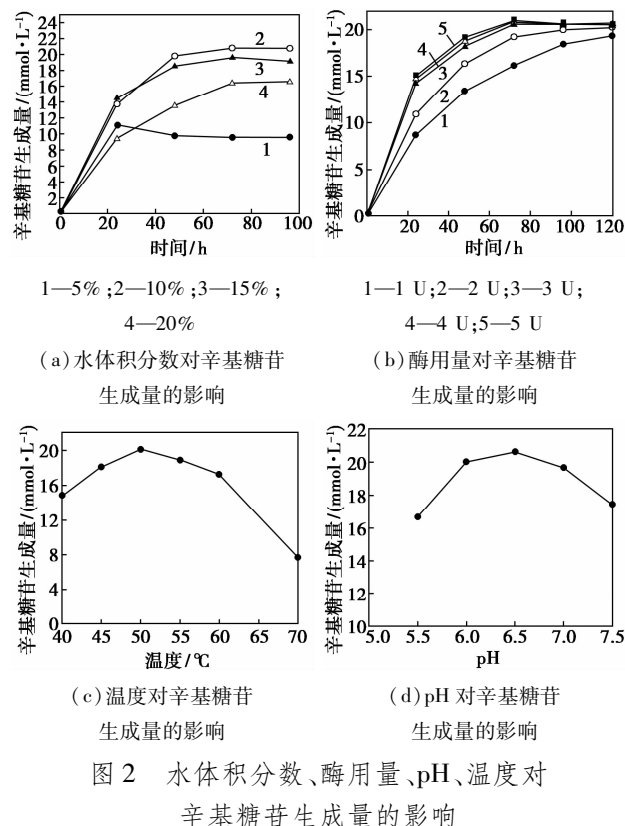


图2 水体积分数、酶用量、pH、温度对辛基糖苷生成量的影响

2.4 葡萄糖底物抑制

葡萄糖浓度对辛基糖苷生成量和转化率的影响如图3所示。

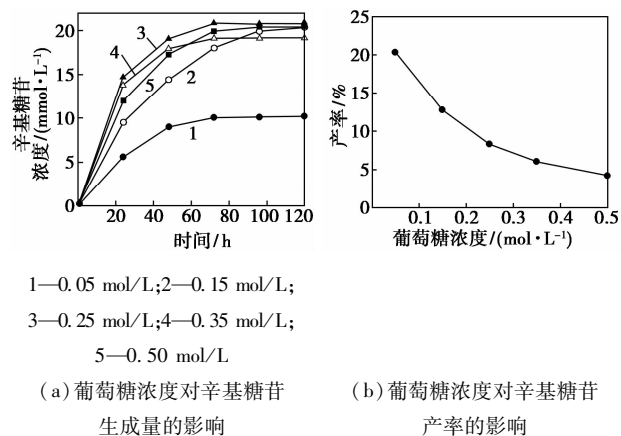


图3 葡萄糖浓度对辛基糖苷生成量和转化率的影响

在与底物浓度相关的催化反应中,底物浓度增加一般会有利于反应的正方向进行,然而由图3(a)可知,当葡萄糖的起始浓度高于0.25 mol/L时,辛

基糖苷最高生成量不再提升且反应时间变长。由图3(b)可以看出,葡萄糖转化率随着葡萄糖浓度的升高而降低。当葡萄糖起始浓度为0.25 mol/L时,反应72 h结束辛基糖苷生成量为20.82 mmol/L,助溶剂的应用比分相体系中酶催化合成辛基糖苷的催化效率提高214.5%。自由酶和固定酶的初始催化速率在高葡萄糖浓度时下降,如图4(a)所示。由图4(b)结合底物抑制的L-B公式计算表明,固定化后酶的 S_{max} 和 K_{SI} 分别从自由酶的180.3、158.9 mmol/L增加到固定酶的223.4、208.6 mmol/L,说明促使反应速率反转的最大底物浓度增加,非活性底物-酶与底物复合物的亲和力下降,最大酶促反应速率 V_{max} 也从自由酶的0.51 mmol/(L·h)增加到1.37 mmol/(L·h)。因此,在酶催化合成烷基糖苷的体系中,高葡萄糖浓度除了会增加体系的黏度而不利于传质反应进行这一限制原因外^[20],底物抑制也是限制 β -葡萄糖苷酶催化合成烷基糖苷的重要原因。

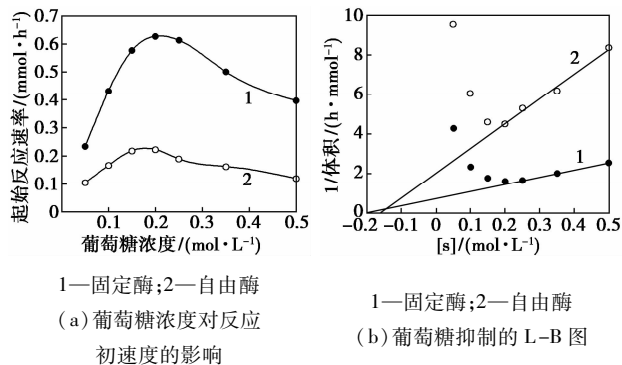


图4 葡萄糖浓度对反应初速度的影响及葡萄糖抑制的L-B图

2.5 固定酶重复使用性

固定酶重复使用性能如表5所示。固定酶重复使用3次后,酶活性下降70%,辛基糖苷生成量降至10.27 mmol/L。 β -葡萄糖苷酶的固定化不仅实现了酶的重复利用,而且使得酶易于从产物中分离,有利于下游处理。

表5 固定酶重复使用性能

| | 重复使用次数 | | | |
|---------------------------------|--------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 辛基糖苷生成量/(mmol·L ⁻¹) | 20.82 | 17.01 | 10.27 | 6.03 |
| 相对酶活/% | 73.69 | 50.93 | 26.51 | 18.26 |

2.6 产物分析

辛基糖苷的液相色谱及质谱分析如图5所示。

由图5(a)液相分析可知,5.1 min出峰的物质为葡萄糖,反应只生成一种新的物质,出峰时间为10.8 min。由图5(b)质谱分析可知,315.2是辛基糖苷单糖苷的特征分子离子峰,经验证新生成的物质为辛基糖苷单糖苷。

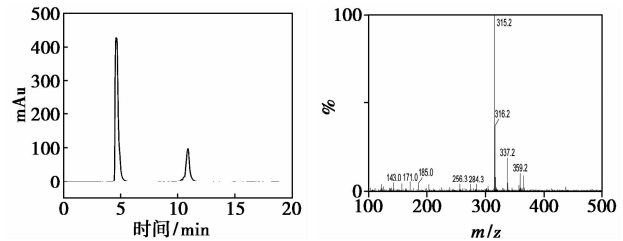


图5 辛基葡萄糖苷的液相色谱及质谱分析

3 结论

以凹凸棒土为载体,通过吸附-交联的方法得到固定化 β -葡萄糖苷酶,在含叔丁醇混合溶剂中催化合成辛基糖苷的最大生产强度为17.3 mg/(L·h·U),比自由酶提高214.5%,显示出凹凸棒土在酶法催化合成烷基糖苷中的应用潜力。

参考文献

- [1] Am'elie Ducret, Michael Trani, Robert Lortie. Comparison between various commercial sources of almond β -glucosidase for the production of alkyl glucosides[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 38: 91-94.
- [2] 吴颖, 于九皋. 糖苷酶催化制备烷基糖苷[J]. 化学通报, 2005, 68: 1-7.
- [3] van Rantwijk F, Woudenberg-van Osterom M. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glucosides[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1999, 6: 511-532.
- [4] Mohamed Gargouri, Issam Smaali, Thierry Maugard, et al. Fungus β -glucosidases: immobilization and use in alkyl glucoside synthesis [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29: 89-94.
- [5] Mohd Younis Rather, Saroj Mishra, Subhash Chand. β -glucosidase catalyzed synthesis of octyl- β -D-glucopyranoside using whole cells of Pichia etchellsii in micro aqueous media[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150: 490-496.
- [6] 袁勤生, 赵健. 酶与酶工程[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2005: 78-81.
- [7] Hakob K Karagulyan, Vardan K Gasparyan, Stephen R Decker. Immobilization of fungal β -glucosidase on silica gel and kaolin carriers [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008, 146: 39-47.
- [8] You Qinghong, Yin Xiulian. Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized Burkholderia cepacia lipase on modified attapulgite[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 202-207.

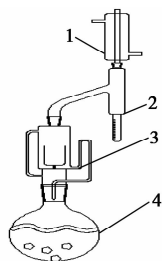
孔流入罐外的缓冲水池,由浸没泵将污泥泵送至加热搅拌罐,在加热搅拌罐中加热至 70℃,并搅拌均匀。然后泵送至卧螺离心机中进行离心处理。为提高处理效果,在污泥进入卧螺离心机前在线加入絮凝剂,使污泥中的细小沙粒进行絮凝,减轻高速离心运动中沙粒的破碎分散。离心处理后,污泥中的水相进入沉降罐,进行油水分离,浓缩后的污泥装车外运。

2 室内化验分析

评价离心式污泥减量化处理效果的指标为卧螺离心机出泥口泥饼的含水率及出水口的含固率。

2.1 泥样检测方法

卧螺离心机出泥口泥样检测装置如图 2 所示。



1—冷凝管;2—分液管;3—索氏提取器;4—圆底烧瓶

图 2 泥样检测装置

该检测装置^[8]的化学药剂为甲苯,甲苯的沸点为 110.6℃,密度小于水且极微溶于水。检测过程为:缓慢加热圆底烧瓶中的甲苯,甲苯蒸气冷凝后回流至分液管和索氏提取器,索氏提取器中泥样逐渐被甲苯浸没,液态甲苯对泥样中的原油进行萃取,同

时使泥样中的水加热蒸发。水蒸汽同圆底烧瓶中的甲苯蒸气一同经冷凝管冷凝后回流至分液管,由于水的密度大,水位于分液管下层,所以泥样中的含水量可由分液管读取。索氏提取器中甲苯达到一定高度后回流至圆底烧瓶,如此循环直至将泥样中的油和水脱除,剩余的泥沙经烘干后称重。最终由差重法得知泥样中含油量。

2.2 水样检测方法

水样是卧螺离心机进口和出水口试验样品的总称。水样含水量检测^[9]同泥样检测装置类似,将图 2 中的索氏提取器拿掉,直接将分液管与圆底烧瓶连接。简化后的实验装置只能检测水样中的含水量,而水样含油量检测需采取分光光度法^[10],由吸光度值和标准曲线计算得到水样中含油量。而水样中含固量由差重法计算得到。

3 离心式污泥减量化处理影响因素

3.1 设备运行参数对处理效果的影响

3.1.1 转鼓转速

转鼓转速直接影响物料所受离心力大小,转速越高,所受离心力越大,但过高的转速势必会消耗更大的动力,离心机轴瓦温度升高,不利于安全平稳运行^[11]。同时,过高的转速还会破坏絮凝体,使脱水效果变差。在卧螺离心机差速 9.2 r/min、堰板高度 112 mm、进泥量 10 m³/h、加药量 200 g/m³ 时,调整离心机的转速,考察转鼓转速对污泥处理效果的影响。具体测试数据见表 1 和图 3。

(上接第 135 页)

[9] Alessandra Basso, Amelie Ducret, Lucia Gardossia. Synthesis of octyl glucopyranoside by almond β -glucosidase adsorbed onto Celite R-640[®] [J]. *Tetrahedron Letters*, 2002, 43: 2005 - 2008.

[10] 周杰, 刘宁, 李云, 等. 凹凸棒石粘土的显微结构特征 [J]. *硅酸盐学报*, 1999, 6: 50 - 54.

[11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 54.

[12] 曹林秋, 杨晟, 袁中一. 载体固定化酶—原理、应用和设计 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 106 - 107.

[13] 韦策, 陆青山, 余世袁, 等. 多孔陶瓷固定 β -葡萄糖苷酶的研究 [J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2013, 37(3): 110 - 116.

[14] Huang Jianhua, Liu Yuanfa, Wang Xingguo. Influence of differently modified palygorskites in the immobilization of a lipase [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008, 55: 49 - 54.

[15] Reshmi R, Sugunan S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 85: 111 - 118.

[16] 郁惠蕾, 许建和. 糖苷水解酶在糖苷合成中的应用概况 [J]. *有机化学*, 2006, 26: 1052 - 1068.

[17] 胡艳霞. 毕赤酵母表面展示泰国红木 β -葡萄糖苷酶催化合成烷基糖苷的研究 [D]. 广东: 华南理工大学生物科学与工程学院, 2014.

[18] Dae-Won Park, Hae-Sung Kim, Joon-Ki Jung. Enzymatic synthesis of alkylglucosides by amphiphilic phase enzyme reaction [J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 951 - 956.

[19] 王琴琴, 郁惠蕾, 赵娜, 等. 利用交联杏仁粉作为廉价而稳定的催化剂通过优化逆水解反应体系显著提高长链烷基糖苷的平衡得率 [J]. *催化学报*, 2012, 33: 275 - 280.

[20] 全易, 赵崇明. 用微胶囊固定的酶催化合成烷基糖苷 [J]. *精细石油化工*, 1996, 6: 28 - 32. ■