

# 海藻酸钠固定化木聚糖酶的研究

王娜, 朱启忠, 任延刚, 张瑞景

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

**摘要:**以海藻酸钠为载体,研究了木聚糖酶的固定方法,并利用固定化酶和游离酶进行了酶解试验。结果表明:固定化酶的最适温度、热稳定性、最适 pH、稳定性及与底物的亲和力都有所提高。其中采用直接包埋方式固定率低,稳定差;交联包埋法固定的固定化酶反应 pH 范围变宽,固定率高,但与底物的亲和能力强和操作稳定性不如包埋交联法。

**关键词:**木聚糖酶;海藻酸钠;固定化

**中图分类号:**Q 946.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)05-0092-03

木聚糖酶是木聚糖水解酶系中最关键的水解酶,通过水解木糖分子 $\beta$ -1,4-糖苷键,将木聚糖水解为木寡糖和木二糖等低木聚糖,及少量木糖和阿拉伯糖。用木聚糖酶处理硫酸盐纸浆可减少后续漂白处理化学剂的用量。由于木聚糖可以用于纸浆的预漂白、饲料添加剂提高饲料的能量值及畜禽对饲料的吸收率、增殖肠道内的双歧杆菌,用于食品改良剂和酿酒等方面的潜在价值,越来越多的研究者对木聚糖酶的分子结构、性质、最佳作用条件及其在各领域的应用进行了广泛而深入的研究。该试验则对其固定化后的一些性质进行了论述。

与游离酶相比,固定化酶可以较长时间内重复酶解反应,反应条件和储藏条件都比游离酶范围要宽,从而提高酶的使用效率,增加产物收率,降低生产成本。基于这些基本特点,该研究探讨采用安全无毒,价廉易得的海藻酸钠对木聚糖酶进行固定化,并研究固定化酶的酶学性质及其相关应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

木聚糖酶(来源于高产优质菌株毛栓菌发酵液的上清液,上清液经过滤离心后贮于 $-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用),木糖(Sigma),木聚糖(Sigma),海藻酸钠(天津大茂化学试剂厂,化学纯),戊二醛(50%天津大茂化学仪器供应站,分析纯),其他试剂均为分析纯或化学纯。

### 1.2 主要仪器

721E 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

### 1.3 测定方法

底物 1%及木糖标准曲线制备均参照文献 [1]。

### 1.4 海藻酸钠固定化木聚糖酶<sup>[2,3]</sup>

**1.4.1 直接包埋法** 将 25 mL 粗酶液与 15.5 mL 质量分数为 3.5%的海藻酸钠溶液(用 pH 5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液溶解)混合,于  $37^{\circ}\text{C}$  水浴中充分混匀后于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中静置 30 min。用 10 mL 注射器吸取混合液,以 10 cm 左右的高度逐滴注入 450 mL 质量分数 2%的  $\text{CaCl}_2$  溶液中,立即形成光滑的凝胶小球。滤出凝胶小球,更换  $\text{CaCl}_2$  溶液,在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中静置硬化 2 h。抽滤并用质量分数为 0.9%的 NaCl 洗涤。贮存于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

**1.4.2 交联包埋法** 将 25 mL 粗酶液与 15.5 mL 质量分数为 3.5%的海藻酸钠溶液混匀后,加入 15.5 mL 质量分数为 0.5%的戊二醛,在振荡器上振荡 30 min 并于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中静置交联 3 h。步骤与直接包埋法相同。

**1.4.3 包埋交联法** 凝胶小球在  $\text{CaCl}_2$  溶液中硬化 2 h ( $4^{\circ}\text{C}$ )后,用质量分数为 0.3%的戊二醛交联 3 h。其他条件及步骤均与直接包埋法相同。

### 1.5 酶活力的测定

**1.5.1 游离酶活力测定** 取底物 1 mL 于管中,据酶活大小加适量的粗酶液,补加柠檬酸钠缓冲液至 2 mL,  $50^{\circ}\text{C}$  水浴反应 30 min,加 3 mL DNS 混匀,沸水浴 7 min,取出冷却后加水至 25 mL,在 540 nm 处测 OD 值。以 1 min 内 1 mL 粗酶液与木聚糖反应产生木糖的浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )作为 1 个酶活单位。

**1.5.2 固定化酶活力测定** 固定化酶的活力测定与游离酶基本相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶的性质

第一作者简介:王娜(1986-),女,山东寿光人,本科在读,研究方向为生物科学。E-mail:changfengchiluo@126.com。

通讯作者:朱启忠(1957-),男,山东单县人,教授,硕士研究生导师,现从事生物化学的教学和科研工作。E-mail:hzzqz@sdu.edu.cn。

收稿日期:2008-12-10

2.1.1 酶的最适温度和最适 pH 在 pH 值为 5.4 条件下, 将游离酶和固定化酶分别置于不同温度中测定酶活(以各自的最高酶活为 100%), 结果如图 1 所示。游离酶、包埋交联法和直接包埋法固定的固定化酶的最适温度均为 40℃, 而交联包埋法固定的固定化酶的最适温度为 50℃, 超过最适反应温度酶活迅速下降。高于 70℃, 游离酶酶活继续下降而 3 种固定化酶酶活基本保持不

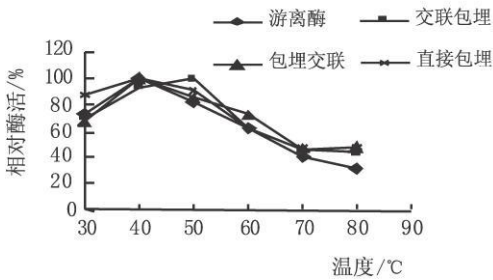


图 1 温度对酶反应的影响

2.1.2 酶的热稳定性和 pH 值稳定性 取一定量的游离酶和固定化酶, 加入 pH 值为 5.4 的柠檬酸钠缓冲液分别于 30、40、50、60、70、80℃保温 1 h, 测定剩余酶活力, 结果如图 3 所示。3 种方法得到的固定化酶的热稳定性均高于游离酶。但这 3 种固定化酶的热稳定性都不强, 这可能是因为硬化时间短<sup>[4]</sup>。将游离酶和固定化木聚

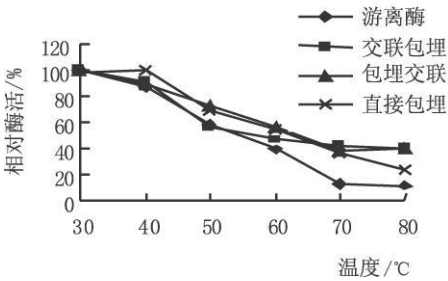


图 3 酶的热稳定性

2.1.3 酶的米氏常数 以不同的木聚糖浓度为底物, 在温度为 50℃, pH 为 5.4 的条件下测酶活, 按照 Lineweaver-Burk 作图法作图, 由米氏方程分别求其米氏常数, 结果如图 5 所示。游离酶、交联包埋法、包埋交联法、直接包埋法固定的固定化酶的米氏常数分别为 9.55、7.42、4.80、9.54 g/L。其中包埋交联法固定的固定化酶对底物的亲和力最强。

2.1.4 酶的储藏稳定性 将游离酶和固定化酶于 4℃和室温保存, 定时取样, 测定酶活。室温保存时, 酶活随时间的延长而逐渐降低。游离酶室温放置 4 d 酶活仅剩

变。在 50℃温度下, 将游离酶和固定化酶分别置于不同 pH 值的缓冲液中测定酶活(以各自的最高酶活力为 100%), 结果如图 2 所示。游离酶、交联包埋法、包埋交联法、直接包埋法固定的固定化酶的最适 pH 值分别为 4.0、6.0、7.8、6.6。由图 2 可见, 3 种固定化酶最适 pH 值偏向碱性方向移动, 其中交联包埋法固定的固定化酶在 pH 4.8~7.8 剩余酶活保持在 85%以上。

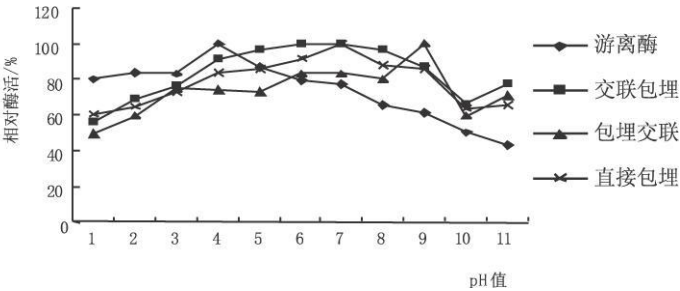


图 2 pH 对酶反应的影响

糖酶置于不同 pH (3~9.2) 的磷酸-柠檬酸缓冲液中, 室温保存 1 h, 然后于最适反应条件下分别测定其剩余酶活力(以各自最高酶活力为 100%), 结果如图 4 所示。交联包埋法、包埋交联法、直接包埋法固定的固定化酶稳定 pH 分别为 8.6、9.2、8.6。3 种方法固定的固定化酶稳定性向碱性方向移动。

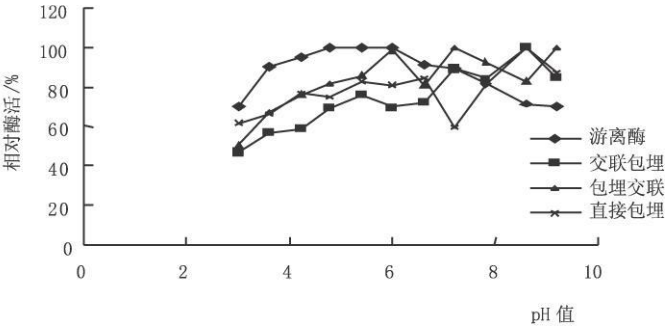


图 4 酶的 pH 值稳定性

23.23%, 交联包埋法固定的固定化酶贮存至 10 d 相对酶活为 58.73%, 包埋交联法固定的固定化酶贮存至 10 d 相对酶活为 48.35%, 直接包埋法固定的固定化酶贮存至 10 d 相对酶活只有 33.91%; 4℃保存时, 游离酶和固定化酶活力损失较小。

2.1.5 固定化酶的操作稳定性 取一定量的固定化酶于 pH 为 5.4 50℃的条件下反复操作并测定酶活。试验结果表明, 包埋交联法制得的固定化酶操作稳定性最好, 重复利用 6 次酶活仍保持在 40%以上。交联包埋法和直接包埋法固定的固定化酶操作稳定性相对较差, 重

复利用 6 次酶活分别保持在 30% 和 25% 以上。直接包埋法固定的固定化酶稳定性差的原因可能是部分酶分子从载体上脱落; 或酶自身性质受到破坏, 失活<sup>[5]</sup>。

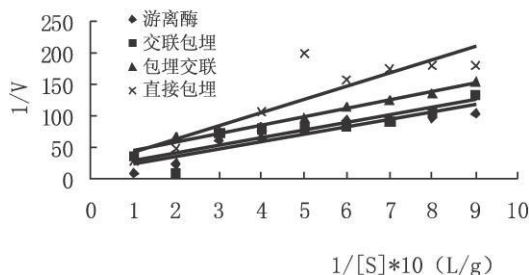


图 5 双倒数曲线

## 2.2 酶的应用

固定化木聚糖酶不仅具有游离酶的优点而且具有操作稳定好、能耐一定高温和一定酸碱等优点。通过试验研究已证明固定化木聚糖酶可用于低聚木糖的生产<sup>[6]</sup>, 纸浆漂白预处理<sup>[7]</sup>和燃料乙醇的生产<sup>[8]</sup>等工业。

## 3 讨论

海藻酸钠固定木聚糖酶具有反应条件温和, 成本低, 操作简单, 易于使用<sup>[9]</sup>等优点, 但是固定率比较低: 3 种包埋方法中交联包埋法固定的固定化酶固定率最高为 26.21%, 包埋交联法固定的固定化酶固定率最低只

有 13.82%。以上 2 种方法固定的固定化酶的稳定性等都优于直接包埋法固定的固定化酶。

海藻酸钠价廉易得、安全无毒; 固定化操作简单, 反应条件温和; 固定化木聚糖酶的热稳定性、碱稳定性、储藏稳定性以及与底物的亲和能力都有所提高, 而且具有可重复操作性。为使固定化木聚糖酶具有更优的性质, 固定条件有待进一步完善。

## 参考文献

- [1] 崔月明, 樊妙姬, 栾桂龙, 等. 枯草芽孢杆菌 XY1905 木聚糖酶学性质的初步研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(06): 21-23.
- [2] 赵林果, 李丽娟, 王平, 等. 海藻酸钠固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究[J]. 生物加工过程, 2007, 5(4): 25-31.
- [3] 毕金峰, 李春红, 陈天金. 海藻酸钠固定化  $\alpha$ -转移葡萄糖苷酶研究[J]. 食品科学, 2004, 25(增刊): 4-10.
- [4] 潘利华, 罗建平, 查学强, 等. 海藻酸钠固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶的制备及其性质研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2007, 30(10): 1331-1335.
- [5] 王家东, 姜子明, 曹彬, 等. 固定化糖化酶的研究[J]. 中国调味品, 2006(3): 14-16, 24.
- [6] 侯丽芬. 低聚木糖生产工艺的研究—原料预处理和固定化酶的研究[D]. 郑州: 河南工业大学硕士学位论文, 2006.
- [7] 朱运平. 海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) 产耐高温木聚糖酶 B 的固定化及应用[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2005.
- [8] 陈明. 利用玉米秸秆制取燃料乙醇的关键技术研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2007.
- [9] Blandino A, Macas M, Cantero D. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(3): 319-324.

## Study of Xylanase Immobilized on Alginate

WANG Na, ZHU Qi-zhong, REN Yan-gang, ZHANG Rui-jing

(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

**Abstract:** Xylanase was immobilized by using sodium alginate as carrier. The immobilized methods were studied. The immobilized xylanase was used to hydrolyze xylan. The results showed that the optimum temperature, thermal stability, optimal pH and pH stability of immobilized xylanase had increased. And its affinity for substrate was improved. Immobilized xylanase made by direct-embedded method had low immobilized rate and bad stability. The reaction pH of immobilized xylanase using cross-linking of embedded method broadens, and the immobilized rate was high. But its affinity for substrate and operation stability were behind embedded cross-linking method.

**Key words:** Xylanase; Sodium alginate; Immobilization