

# 海藻酸钠明胶联合固定化香菇纤维素酶的技术研究

裴哲, 朱启忠, 李希红, 韩雷强, 张燕华

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

**摘要:**以海藻酸钠、明胶为载体, 戊二醛为交联剂, 对香菇纤维素酶进行固定化。研究了海藻酸钠浓度、明胶浓度、氯化钙浓度、给酶量、戊二醛浓度及交联时间对固定化酶的影响, 并对固定化酶的最适反应温度、最适 pH、温度稳定性等酶学性质进行了测定。结果表明: 海藻酸钠和明胶的最佳浓度分别为 3.5% 和 3.0%, 戊二醛浓度为 1.0%。与游离酶相比, 固定化酶最适反应 pH 向酸性方向移动了 0.4, 最适反应温度提高了 5℃, 并且固定化酶具有良好的贮存稳定性。

**关键词:** 海藻酸钠; 明胶; 纤维素酶; 固定化; 稳定性

**中图分类号:** S 646.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-0126-04

纤维素是地球上数量最大的可再生性碳源物质, 但目前有效利用纤维素生物量的主要障碍是纤维素酶的酶解效率低<sup>[1]</sup>, 进而导致纤维素酶解过程中纤维素酶的成本过高, 从而严重阻碍了纤维素酶在纤维素糖化中的广泛应用<sup>[2]</sup>。

酶的固定化技术为提高纤维素酶的使用效率, 降低

成本, 提供了可能性。高分子复合物作为载体制备固定化酶是近年来引人瞩目的发展方向<sup>[3]</sup>。海藻酸钠作为固定化载体, 具有传质性能好, 包埋条件温和, 成本低以及操作简单等优点<sup>[4]</sup>。明胶是一种常用的蛋白质胶凝剂, 溶解性好而且价格低廉<sup>[5]</sup>, 可以很好的改善海藻酸钠的成型效果。利用海藻酸钠与明胶联合固定化制备的胶粒与单一的应用海藻酸钠相比可以提供更大的固定化空间, 有利于物质的扩散<sup>[6]</sup>。目前, 海藻酸钠与明胶联合固定化的技术工艺鲜有报道, 现利用香菇产生纤维素酶特性, 以这 2 种载体为包埋材料, 戊二醛为交联剂, 对纤维素酶进行固定化, 并对其固定化条件与酶学性质进行了初步研究, 以期海藻酸钠明胶联合固定化纤维素酶提供技术参考。

**第一作者简介:** 裴哲(1988-), 男, 山西临汾人, 本科, 研究方向为生物化学。E-mail: 007peizhe@163.com.

**通讯作者:** 朱启忠(1957-), 男, 本科, 教授, 现主要从事生物化学的教学和科研工作。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn.

**基金项目:** 山东大学威海分校科研资助项目(A09017)。

**收稿日期:** 2009-12-15

## 2.4 不同浓度的 IBA 对油葵生根的影响

从图 2 可知, 0.5 mg/L IBA 激素浓度的处理生根率最高, 为 80%; 0.5~1.0 mg/L IBA 激素浓度的处理, 油葵平均根长最长, 为 30~35 mm。2.0 mg/L 高浓度的生长素 IBA 处理不仅生根率低, 而且玻璃化严重。所以, 最好的生根培养基配方为: 1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

### 参考文献

[1] 张金环, 甄二英, 王涛, 等. 油葵在畜牧业中的应用研究[J]. 饲料研

究, 2005(12): 44-45.

[2] 何承刚. 油葵品种在盐碱地的生态适应性研究[J]. 种子, 2004, 23(5): 6-7.

[3] 陈卫民, 宋红梅, 焦子伟, 等. 五种药剂防治油葵白锈病试验初报[J]. 新疆农业科学, 2005(S1): 247-249.

[4] 穆俊丽, 李建科, 杨静慧, 等. 不同油葵品种种子萌发期的耐盐性研究[J]. 北方园艺, 2009(5): 33-37.

[5] 徐培洲, 吴先军, 胡保民, 等. 油葵子叶外植体不定芽再生体系的建立[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(4): 18-21.

## A Regeneration System from Sunflower Ritmo(*Helianthus annuus* L.)

WU Chun-xia, YANG Jing-hui, LIU Tai-lin, HUANG Jun-xuan, LI Jian-ke, ZHANG Wei-yu

(Horticultural Department of Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

**Abstract:** The apical shoot broken, hypocotyl, cotyledon, leaf from sterile seedling were cultured in MS medium with different hormones. The result showed that more fluey green callus were gotten and some buds were regenerated from the callus with treatment of KT. The apical shoot broken among explants regenerated best and its differentiation ratio was 75% in the medium of MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The best rooting medium was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L in which the rooting ratio was 80%.

**Key words:** oil sunflower; Ritmo; regeneration; apical shoot broken

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种 该试验所用菌种采自威海野外, 分离纯化后, 对其培养鉴定为香菇 *Lentinula edodes*, 测定发现具有较高的纤维素酶活性。

1.1.2 试剂 海藻酸钠, 化学纯, 上海埃彼化学试剂有限公司; 明胶, 化学纯, 天津市大茂化学仪器供应站; 50% 戊二醛, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心; 氯化钙 化学纯, 天津市标准科技有限公司; 其他试剂均为分析纯或化学纯。

1.1.3 仪器 752 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 恒温水浴锅, 金坛市科兴仪器厂, GL-20G-II 型高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; Sartorius 普及型 pH 计 (PB-10), 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.1.4 培养基 固体培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1.5 g/L,  $\text{VB}_1$  0.01 g/L, 琼脂 20 g/L。液体培养基: 固体培养基中去除琼脂, 加入酵母膏 5 g/L。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 液体培养基, 接入 6~7 日龄平板菌种 4 片 (用无菌打孔器打成 10 mm 的菌片), 130 rpm, 28 °C, 恒温振荡培养。

1.2.2 粗酶液制备 将培养 7~8 d 的液体培养基经 3 500 rpm 离心 15 min 后, 取上清液即为粗酶液, 冰箱保存备用。

1.2.3 纤维素酶的固定化方法 将一定体积 3.5% 的海藻酸钠与一定量的粗酶液混合搅拌, 然后加入 3% 的明胶溶液混合乳化 10 min, 慢速搅拌并降温至 5~10 °C, 其中海藻酸钠和明胶用 pH 5.4 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲溶液溶解。用 10 mL 注射器将上述冷却液以 15 cm 的高度注进 2% 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中, 立即形成光滑的微球。滤出凝胶小球, 更换  $\text{CaCl}_2$  溶液, 在 4 °C 冰箱中静置硬化 2 h。再次滤出凝胶小球, 置于 30 °C 1% 的戊二醛溶液中, 硬化 1.5 h, 待微球达到一定硬度后, 用质量分数 0.9%  $\text{NaCl}$  洗涤, 所得固定化酶在冰箱中保存备用。

1.2.4 纤维素酶活力的测定 取 1 mL 羧甲基纤维素钠盐溶液于试管中, 据酶活大小加适量粗酶液, 补加柠檬酸钠缓冲液至 2 mL, 45 °C 水浴反应 30 min, 加 3 mL DNS 混匀, 沸水浴 7 min 后, 流水冷却, 定容至 25 mL, 于 500 nm 处比色。

1.2.5 固定化酶活力的测定 取 1 mL 羧甲基纤维素钠盐溶液于试管中, 加入固定化酶 0.3 g, 并加入 1 mL 柠檬酸钠缓冲液, 45 °C 水浴反应 30 min, 加 3 mL DNS 混匀, 沸水浴 10 min, 取出冷却后定容至 25 mL, 于 500 nm 处比色。以 45 °C 时 1 mL 酶液 1 min 水解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所相当的酶量为 1 个活力单位。固定化

酶活力保持率 = 固定化后酶的活力 / 固定化时加入的酶的活力  $\times 100\%$ 。

1.2.6 蛋白质浓度测定 考马斯亮蓝法<sup>7</sup> 以牛血清蛋白做标准曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化条件对固定化酶活力的影响

2.1.1 海藻酸钠和明胶浓度的影响 分别选取 2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5% 的海藻酸钠溶液和 1.5%、2.0%、5.5%、3.0%、3.5%、4% 的明胶溶液进行组合试验。结果表明, 当海藻酸钠浓度为 3.5%, 明胶浓度为 3.0% 时, 固定化酶活力保持率最高。

2.1.2  $\text{CaCl}_2$  浓度的影响 取最佳浓度组合的海藻酸钠和明胶与粗酶液按一定比例混合, 用注射器将混合液滴入到不同浓度的  $\text{CaCl}_2$  溶液中进行纤维素酶的固定化, 结果见图 1。当  $\text{CaCl}_2$  浓度在 0.5%~2% 的范围内, 随着  $\text{CaCl}_2$  浓度的增加, 固定化酶活力保持率显著增加, 在 2% 时达到最大值, 而后呈逐渐下降趋势。在低浓度范围内,  $\text{Ca}^{2+}$  有助于与海藻酸钠形成致密的凝胶结构, 减少了酶量的流失, 但浓度过高, 会增加酶与底物反应的困难程度, 使酶活力保持率降低。

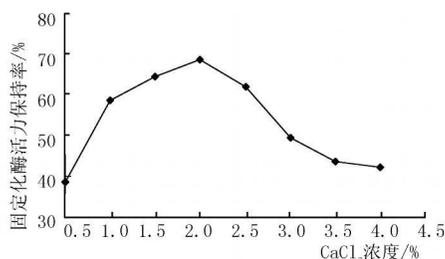


图 1  $\text{CaCl}_2$  浓度对固定化酶活力保持率的影响

2.1.3 给酶量的影响 取最佳浓度组合的海藻酸钠与明胶, 分别与体积为 6、7、8、9、10、11、12 mL, 蛋白质浓度为 0.2512 mg/mL 的粗酶液混合, 给酶量与固定化酶关

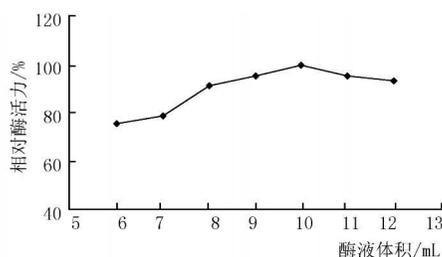


图 2 给酶量对固定化酶活力的影响

系如图 2 所示。随着给酶量的增加, 固定化酶的酶活力不断上升, 在 1.76~2.51 mg 的范围内增加较明显。当给酶量超过 2.51 mg 时, 固定化酶活力有所下降, 可能是由于载体表面的活性基团与酶的结合位点已经达到饱

和 即使增加给酶量, 也无法固定到载体上, 从而使酶活力不再升高。

2.1.4 戊二醛浓度的影响 在其它固定化条件均为最佳的情况下, 将凝胶小球分别与浓度为 0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5% 的戊二醛进行交联制备固定化酶。戊二醛可以与蛋白质中的氨基、酚基、巯基发生 Schiff 反应, 通过相互交联使固定化酶硬化。由图 3 可知, 在戊二醛浓度低于 1% 时, 固定化的酶活力随戊二醛浓度的增加而增大, 但进一步增加戊二醛浓度, 酶活力反而下降。这可能是由于高浓度的戊二醛使酶分子的活性中心发生改变, 同时增加了底物扩散的阻力, 使酶活力有所下降。

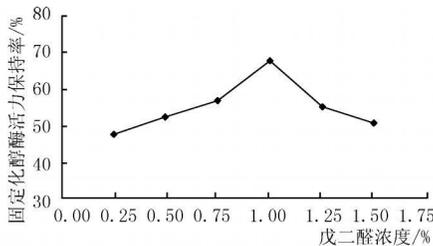


图 3 戊二醛浓度对固定化酶酶活保持率的影响

2.1.5 戊二醛交联时间对固定化酶活力的影响 固定其它条件, 将凝胶小球在 1% 的戊二醛溶液中分别静置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h, 按上述方法制备固定化酶并测其活性。由图 4 可知, 适当延长交联时间, 可以使固定化酶的活力升高, 1.5 h 的交联效果最佳。延长交联时间过度反而会使酶活力降低, 原因可能是由于载体上结合的酶接近饱和。

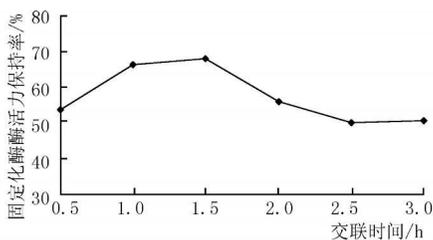


图 4 戊二醛交联时间对固定化酶酶活保持率的影响

## 2.2 固定化酶的酶学性质

2.2.1 酶反应的最适温度 在最适 pH 值条件下, 将固定化酶和游离酶于不同温度下测定酶活力, 结果如图 5 所示。游离酶的最适温度为 45℃, 固定化酶的最适温度为 50℃, 较游离酶上升了 5℃, 且固定化酶在 30 ~ 70℃ 下均可保持较高的酶活力, 适应的温度范围较宽, 这可能是由于固定化载体对酶分子起到了一定的保护作用。

2.2.2 pH 值对固定化酶和游离酶活力的影响 在最适温度条件下, 将固定化酶和游离酶置于不同 pH 缓冲

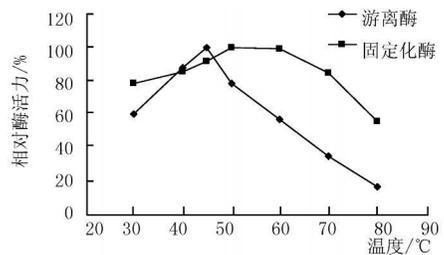


图 5 酶反应的最适温度

液中测定酶活力。图 6 结果表明, 游离酶的最适 pH 为 5.4, 固定化酶的最适 pH 为 5.0, 较游离酶向酸性方向移动, 同时由于曲线较平缓, 显示出比游离酶更强的耐酸碱能力。

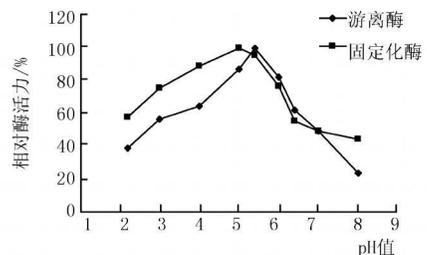


图 6 pH 值对固定化酶和游离酶活力的影响

2.2.3 固定化酶和游离酶的热稳定性比较 将一定量的游离酶和固定化酶分别置于 30、40、45、50、60、70、80℃ 保存 2 h, 测定酶活力的变化, 结果如图 7 所示。固定化酶的耐热范围明显比游离酶变宽, 在 70℃ 时仍保持 50% 以上的相对活力。这可能是由于载体与酶分子之间形成的共价键稳定了酶分子的构象, 减少了部分酶的自溶, 增加了固定化酶的热稳定性。

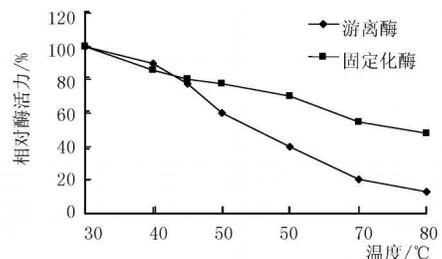


图 7 固定化酶和游离酶的热稳定性比较

2.2.4 酶反应动力学 取不同质量浓度的底物, 分别加入游离酶和固定化酶, 在最适温度, 最适 pH 值条件下测定酶活力。按照 Line weaver-Burk 法作图求  $K_m$  值。游离酶和固定化酶的  $K_m$  值分别为 0.52 g/L, 1.28 g/L。由此可见, 固定化酶对底物的亲和力有所降低。这可能是由于底物扩散困难 与酶接触的几率变小所引起的。

2.2.5 固定化酶的操作稳定性 以一定量的羧甲基纤

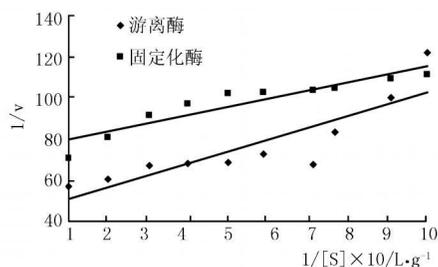


图8 酶反应动力学关系

纤维素钠盐为底物进行酶解反应, 分别在相同条件下连续进行6次重复操作, 测定其酶活力, 以第1次的酶活力为100%, 计算固定化酶的相对活力。在一定pH条件下, 带正电荷的明胶与带负电荷的海藻酸钠形成聚合物将游离酶包埋起来。由图9可知, 固定化酶的稳定性并没有得到很大的改善, 重复使用6次, 固定化酶的相对酶活力仅保留大约35%左右, 这可能是固定化酶凝胶结构的改变和部分酶的渗漏所引起的。

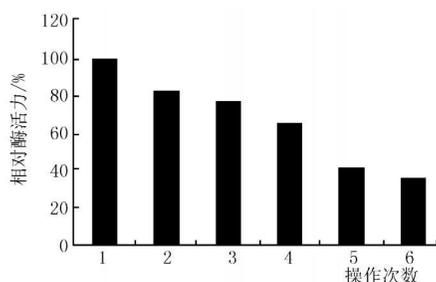


图9 重复操作次数对固定化酶活力的影响

**2.2.6 固定化酶的贮存稳定性** 固定化酶和游离酶在4℃和室温(25℃)分别保存2周后, 酶活力测定见表1。在室温下, 游离酶的半衰期大约为4d, 固定化酶的半衰期大约为8d。在4℃条件下, 固定化酶活力较游离酶下降幅度小, 说明固定化酶具有较好的贮存稳定性。

表1 固定化酶和游离酶的贮存稳定性

酶类型	贮存温度/℃	剩余酶活力/%					
		2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
游离酶	4	98.58	96.64	95.82	93.94	93.41	92.56
	25	68.42	49.56	32.87	15.32	—	—
固定化酶	4	98.94	98.41	96.57	95.91	95.64	94.56
	25	97.85	82.31	64.78	50.23	42.97	31.05

### 3 结论

该试验以海藻酸钠、明胶为包埋材料, 戊二醛为交联剂, 固定化香菇纤维素酶。确定了最佳的固定化方法, 即海藻酸钠浓度为3.5%, 明胶浓度为3.0%, CaCl<sub>2</sub>浓度为2%, 戊二醛浓度为1%, 戊二醛交联时间为1.5h, 最佳给酶量为2.51mg, 得到的固定化酶的最适pH为5.0, 比游离酶向酸性方向移动, 最适反应温度为50℃, 较游离酶高, 并且其具有较好的耐热性与贮存稳定性。但固定化酶与底物的亲和力较小, 操作稳定性较差。对于工业化使用, 还需探索更合适的载体, 在此方面有待于做进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] Walker L P, Wilson D B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview [J]. *Bioresource Technology*, 1991, 36(1): 3-14.
- [2] Sreenath H K, Koegel R G. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36(12): 1199-1204.
- [3] Wieland J A, Houchin-Ray T L, Shea L D. Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels [J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 120(3): 233-241.
- [4] Paul F, Vignais P M. Photophosphorylation in bacterial chromatophores entrapped in alginate gel: Improvement of the physical and biochemical properties of gel beads with barium as gel-inducing agent [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1980, 2(4): 281-287.
- [5] 赵力, 张利, 孔德领, 等. 明胶包埋黑根霉菌丝体对水中Pb<sup>2+</sup>吸附性能的研究 [J]. *离子交换与吸附*, 1996, 12(5): 418-424.
- [6] 王爱玲, 杨江科, 尹利, 等. 海藻酸钠明胶协同固定化的研究 [J]. *生物技术*, 2006, 16(6): 69-72.
- [7] 张伟, 杨秀山. 酶的固定化技术及应用 [J]. *自然杂志*, 2000, 22(5): 282-286.

## Immobilization of Cellulase of *Lentinula edodes* in Sodium Alginate-gelatin

PEI Zhe ZHU Qi-zhong LI Xi-hong, HAN Lei-qiang, ZHANG Yan-hua

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

**Abstract:** Cellulase of *Lentinula edodes* was immobilized on sodium alginate-gelatin carried with glutaraldehyde. The impact of the concentration of sodium alginate, gelatin concentration, amount of calcium chloride concentration, amount of the cellulase, amount of glutaraldehyde concentration and cross linking time on immobilization were analyzed. The thermostability, the optimum temperature and pH value were studied. The results showed that the optimal concentration of sodium alginate and gelatin were 3.5% and 3.0% respectively and the concentration of glutaraldehyde was 1.0%. In comparison with the free enzyme, the optimal pH of the immobilized cellulase shifted 0.4 to acidity and the optimum reaction temperature had increased by 5℃. The storage stability of the immobilized enzyme was obviously increased compared to that of the free one.

**Key words:** cellulase; sodium alginate; gelatin; immobilization; stability