

# 明胶载体固定化木聚糖酶技术的研究

高启禹<sup>1</sup>, 徐光翠<sup>2</sup>, 李永佳<sup>1</sup>, 刘 瑞<sup>1</sup>, 周晨妍<sup>1,\*</sup>

(1.河南新乡医学院生命科学技术学院, 河南新乡 453003;

2.河南新乡医学院公共卫生学院, 河南新乡 453003)

**摘要:**以明胶为载体, 戊二醛为交联剂, 采用包埋-交联法制备固定化木聚糖酶, 探讨明胶浓度、戊二醛体积分数、交联时间和固定化时间对固定化酶相对酶活力的影响。通过正交实验确定木聚糖酶的最佳固定化条件, 比较固定化酶与其游离酶的最适反应温度、热稳定性、最适反应pH及pH稳定性。研究发现, 在明胶浓度为15%、戊二醛体积分数为4%、交联时间为1h和固定化时间为3h时, 固定化酶的回收率可达72.56%, 同时固定化和游离酶的最适温度分别为50、60℃, 最适pH分别为3.6、4.6, pH稳定性及热稳定性有显著提高。

**关键词:**木聚糖酶, 明胶, 戊二醛, 固定化酶

## Study on the technology of gelatin immobilized xylanase

GAO Qi-yu<sup>1</sup>, XU Guang-cui<sup>2</sup>, LI Yong-jia<sup>1</sup>, LIU Rui<sup>1</sup>, ZHOU Chen-yan<sup>1,\*</sup>

(1.College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

2.College of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** Xylanase was immobilized with gelatin and cross linked with glutaraldehyde. The effect of reaction conditions (the concentration of gelatin, glutaraldehyde concentration, cross-linking time and immobilized time) on the relative activity of immobilized xylanase were tested. The most optimal immobilized conditions were determined with orthogonal test. At the same time the most suitable immobilized temperature, thermal stability, the most appropriate reacted pH and the pH stability of the immobilized xylanase were compared with that of the free enzyme. The result showed that the best immobilized condition was obtained. The recovery rate of immobilized xylanase was 72.56% when the concentration of gelatin was 15%, the volume fraction of glutaraldehyde was 4%, the cross-linked time was 1h and the immobilized time was 3h. Simultaneously the most suitable immobilized temperature was respectively 50℃ and 60℃, the most appropriate pH was respectively 3.6 and 4.6 of the immobilized xylanase and the free enzyme. The pH stability and the thermal stability were obviously improved.

**Key words:** xylanase; gelatin; glutaraldehyde; immobilized enzyme

中图分类号: TS202.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)06-0223-05

木聚糖(xylan)是植物半纤维素的主要成分, 是自然界中最为丰富的多糖资源之一。作为一种多聚五碳糖, 它的基本结构单元是由 $\beta$ -1,4或 $\beta$ -1,3糖苷键连接的多聚木糖链, 在D-木糖的第二位氧上连接有D-葡萄糖醛酸或4-O-甲基葡萄糖醛酸或在第三位氧上连接有L-阿拉伯呋喃糖<sup>[1]</sup>。植物中木聚糖处于木质素和纤维素纤维之间, 木聚糖和木质纤维素的其他成分之间的这种相互作用能够起到维持原位纤

维素的完整性及保护纤维素免受纤维素酶的降解等作用<sup>[2]</sup>。由于木聚糖结构复杂, 因此完全降解需要多种酶的参与。木聚糖酶( $\beta$ -1,4-D-木聚糖水解酶, xylanase)是木聚糖水解酶系中最关键的水解酶, 可通过水解木糖分子间的 $\beta$ -1,4糖苷键, 将木聚糖水解为木寡糖和木二糖等低聚木糖, 且有少量木糖和阿拉伯糖的产生<sup>[3]</sup>。目前木聚糖酶主要应用在酿造、饲料工业中, 可分解酿造或饲料工业中的原料细胞壁以及 $\beta$ -葡聚糖, 降低酿造中物料的粘度, 促进有效物质的释放, 以及降低饲料用粮中的非淀粉多糖, 促进营养物质的吸收利用<sup>[4]</sup>。但由于绝大多数游离木聚糖酶的最适温度较低, 酶活性不高, 稳定性差, 保质期短, 重复利用率低, 应用成本高, 因此木聚糖酶的一

收稿日期: 2012-09-13 \* 通讯联系人

作者简介: 高启禹(1979-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 酶与酶工程。

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(112102210299); 河南省教育厅自然研究计划项目(2011A180026)。

acid sequence of curvaticin FS47, a heat stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 2191-2195.

[20] Gianluigi M, Maria A, Rosamaria A, et al. Francesco spray-drying of bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(7): 773-777.

定的限制<sup>[5]</sup>。而固定化酶作为酶工程的一项新技术,能将酶分子有效地束缚在载体上,使其既保持酶的天然活性,又便于与反应液分离,可以重复使用,此外还具有游离酶无法媲美的优越性,如可耐一定强度的酸、碱、热及有机溶剂等优点<sup>[6]</sup>。本实验以黑曲霉产木聚糖酶为材料,采用明胶载体固定化木聚糖酶,通过单因素实验及正交实验探讨了木聚糖酶的最优固定化条件,并比较了原酶与固定化酶在不同有机溶剂中的稳定性,从而为木聚糖酶的工业化应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

**黑曲霉An10** 由新乡医学院生命科学技术学院发酵实验室保藏;斜面培养基 去皮马铃薯100g,葡萄糖10g,琼脂10g,煮沸成糊状,过滤补水至500mL,分装,自然pH,120℃灭菌30min,冷却后备用;发酵培养基 麸皮1g,玉米芯1g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.75g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25g,MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.125g,NaCl 0.075g,Tween 80 75μL,补水至50mL,调pH至6.7,120℃灭菌30min,冷却后接种5mL菌悬液,30℃摇床培养96h);梓木木聚糖 美国Sigma公司;明胶、3,5-二硝基水杨酸等 天津市东丽区天大化学试剂厂;D-木糖、戊二醛(25%) 国药集团化学试剂有限公司;木聚糖酶 来自于黑曲霉液体培养产酶,经纯化后使用,酶活力为300000U/mL。

**752N紫外可见分光光度计** 上海菁华科技仪器有限公司;TGL-20M高速台式冷冻离心机 湘仪仪器有限公司;2HWY-2102新型恒温培养摇床 上海智诚分析仪器制造有限公司;精密恒温水浴锅 江苏金台市医疗器械厂;SW-CJ-2F双人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司;电子天平 沈阳龙腾电子有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 木聚糖酶的制备** 将培养后的发酵培养基用四层纱布过滤,取滤液于冷冻离心机4℃、10000r/min条件下离心10min,取上清液即为原酶液,4℃保存,备用。

**1.2.2 酶活力的测定** 酶活测定方法为DNS法<sup>[7]</sup>。酶活力单位采用在50℃、pH4.6条件下,以每分钟产生1mg木糖所需的酶量为一个酶活单位。固定化酶活力测定时用一定量的固定化酶替换原酶液并用缓冲液定容,测定相应吸光值并确定相对酶活力。

相对酶活力:同组实验中以活力最高的为100,其余固定化酶的活力与之相比,以百分常数表示。

固定化酶活力回收率(%)=(固定化酶活力/投入的游离酶活力)×100

**1.2.3 标准曲线的建立** 分别吸取0.2mg/mL的D-木糖标准液0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL,然后放入对应的25mL的具塞试管,并分别补蒸馏水至2.5mL;每支试管再加入2.5mL DNS试剂,混合均匀,于沸水浴中10min显色,用冷水迅速冷却后,加入5mL蒸馏水,混匀,用木糖含量为0的试管做空白,测定540nm处的光吸收值,以木糖含量为横坐标,光吸收值为纵坐标,

绘制标准曲线。得线性回归方程: $y=1.2046x-0.0467$ , $R^2=0.9924$ 。结果表明,木糖在此浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

**1.2.4 酶活计算方法** 由木糖标准曲线公式可得酶活计算公式: $U=X \times V \times N / 0.1 \times W \times 5$ 。其中:U:木聚糖酶活力(U/g);X:根据吸光度在标准曲线上查得的还原糖生成量(mg);V:样品提取时加入水的量(mL);N:样品二次稀释时的稀释倍数;0.1:参与反应的酶量(mL);w:样品重量(g);5:反应时间(min)。

**1.2.5 木聚糖酶的固定** 用相应浓度的明胶溶液与30℃的戊二醛溶液交联固定木聚糖酶,硬化2h,180r/min、30℃下振荡交联对应时间,再用生理盐水洗去固定化酶表面游离酶后,4℃保存备用。

**1.2.6 正交实验** 正交实验数据处理方法,参考文献[8]。选择对固定化效果影响较显著的明胶浓度、戊二醛体积分数、交联时间及固定化时间进行单因子实验分析,并根据单因素实验结果,将明胶浓度、交联剂戊二醛的体积分数、交联时间及固定化时间取3水平,按L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>)正交实验设计表进行实验,正交实验因素水平表见表1。

表1 正交实验因素

Table 1 The factor of orthogonal design

水平	因素			
	A 明胶浓度 (%)	B 戊二醛体积分数 (%)	C 交联时间 (h)	D 固定化时间 (h)
1	10	3	1	2.5
2	15	4	2	3
3	20	5	3	3.5

**1.2.7 有机溶剂对固定化酶及游离酶的影响** 将固定化酶和游离酶分别置于各自的稳定性最强的缓冲液、2%的三氯甲烷、甲醇、EDTA、异丙醇、丙三醇中,在4℃下放置8h,并在各自的最适温度和最佳pH中测定酶活。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验结果

**2.1.1 明胶浓度对固定化酶活力的影响** 分别用浓度为5%、10%、15%、20%、25%、30%的明胶溶液在相同条件下制备明胶颗粒,与4%的戊二醛溶液交联1h,固定3h后得固定化木聚糖酶。然后按常规方法测定

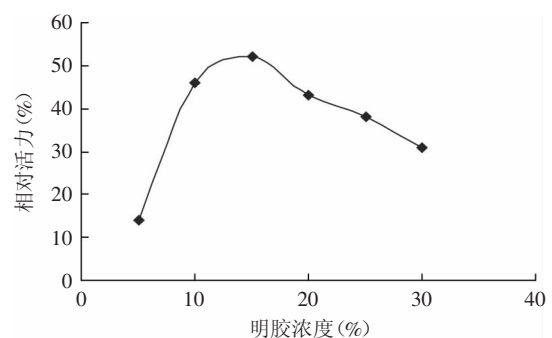


图1 不同明胶浓度对固定化酶活力的影响  
Fig.1 Effect of the concentration of gelatin on the relative activity of immobilized volume

固定化木聚糖酶的活性变化,结果如图1所示。

图1表明,随着明胶浓度的增加,固定化酶的相对活力不断增加,当浓度超过15%时,固定化酶的相对活力却不断减小,因此,明胶较适宜的浓度为15%。可能由于浓度过低会使载体硬度低、成型效果差、易破碎,而当浓度过大时,颗粒机械强度太大、孔径减小、不利于载体与木聚糖酶充分接触,从而影响固定化木聚糖酶的活力。

2.1.2 戊二醛体积分数对固定化酶活力的影响 配制浓度分别为2%、3%、4%、5%、6%和7%的戊二醛与15%的明胶载体交联1h,固定3h后制备固定化酶并测定固定化酶的酶活力,选择最适的戊二醛浓度,结果见图2。

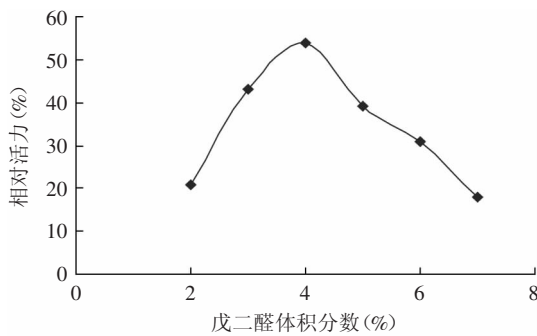


图2 不同体积分数戊二醛的固定化效果

Fig.2 Immobilization of xylanase on gelatin at different glutaraldehyde concentrations in volume

戊二醛既是交联剂又是酶的变性剂,其浓度对固定化酶活力影响较大。从图2可以看出,当戊二醛浓度过低时,固定化木聚糖酶的活力较小,可能是由于反应速度较慢,交联度低,木聚糖酶结合量少,而当戊二醛浓度过高时,固定化木聚糖酶的相对活力却不断减小,可能是过多的戊二醛与酶结合,改变木聚糖酶的酶结构,使酶失活。故适宜的戊二醛浓度为4%。

2.1.3 交联时间对固定化酶活力的影响 在明胶浓度15%、戊二醛体积分数4%及固定3h的条件下,选择1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5h的不同交联时间,比较所制备的固定化酶的相对酶活力。结果见图3。

由图3可以看出,随着交联时间的增加,固定化

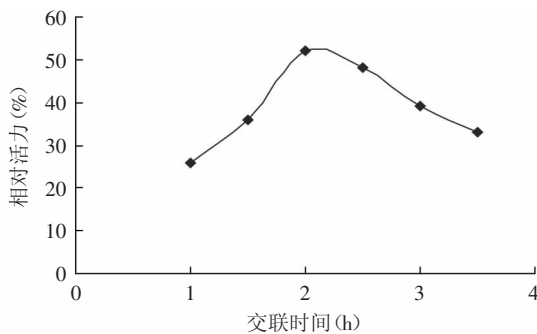


图3 交联时间对固定化酶的酶活影响

Fig.3 Effect of the cross-linking time on the relative activity of immobilized volume

木聚糖酶的活力不断增加,但当超过2h后,固定化木聚糖酶的活力随时间增加不断下降。可能交联早期明胶载体上的基团与戊二醛不断发生Schiff反应,木聚糖酶的结合位点增加导致固定化酶的活力升高。但当交联时间超过2h后,由于明胶载体上过多的醛基发生缩合反应或明胶载体上过多的醛基对木聚糖酶进行了过多的修饰,致使固定化木聚糖酶的活力反而降低。

2.1.4 固定化时间对固定化酶活力的影响 在明胶浓度15%、戊二醛体积分数4%及交联1h的条件下,将木聚糖酶与明胶载体混合后在4℃分别放置2、2.5、3、3.5、4、4.5h,测定固定化木聚糖酶的酶活,获得最优的固定化时间,结果见图4。

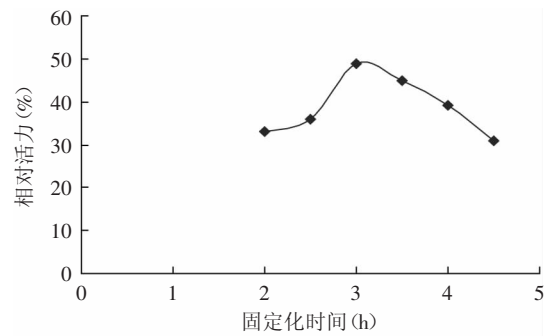


图4 固定化时间对固定化酶的酶活影响

Fig.4 Effect of the immobilized time on the relative activity of immobilized volume

图4表明,随着固定化时间的增加,固定化木聚糖酶的活力不断增大,但当固定化时间大于3h后,固定化木聚糖酶活力反而下降,可能是由于过多的木聚糖酶结合在明胶载体上后得屏蔽效应和空间限制效应引起。

## 2.2 明胶固定木聚糖酶的条件优化

表2 正交实验结果

Table 2 Test results of orthogonal design

实验号	A	B	C	D	相对酶活 (%)
1	1	1	1	1	84.54
2	1	2	2	2	94.67
3	1	3	3	3	69.62
4	2	1	2	3	77.26
5	2	2	3	1	72.39
6	2	3	1	2	100.00
7	3	1	3	2	78.18
8	3	2	1	3	87.67
9	3	3	2	1	72.69
K <sub>1</sub>	248.82	257.22	272.21	229.62	
K <sub>2</sub>	249.65	263.73	244.62	272.85	
K <sub>3</sub>	238.54	242.31	220.19	234.55	
k <sub>1</sub>	82.94	85.74	90.74	76.54	
k <sub>2</sub>	83.22	87.91	81.54	90.95	
k <sub>3</sub>	79.51	77.38	73.40	78.18	
R	11.11	21.42	52.02	43.23	

正交实验结果见表2。

由表2可知,影响固定化酶酶活的主次因素依次为C>D>B>A,组成最优固定化条件C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>B<sub>2</sub>A<sub>2</sub>,即最佳固定化条件为明胶浓度15%、戊二醛体积分数4%、交联时间1h、固定化时间3h。在最佳固定化条件下进行酶的固定并测定固定化酶活,与投入的游离酶酶活比较得酶活回收率为72.56%。

### 2.3 方差分析

表3 方差分析结果

Table 3 Test results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
A	8.54	2	4.27	13.56	$F_{0.01}(2,2)=99.0$	$p>0.05$
B	61.83	2	30.92	73.89	$F_{0.05}(2,2)=19.00$	$p<0.05$
C	150.53	2	75.27	156.92		$p<0.01$
D	124.47	2	62.24	138.16		$p<0.01$
误差	23.56	2				

由表3可知,C(交联时间)及D(固定化时间)对实验的影响 $p<0.01$ ,即对实验结果影响极显著;B(戊二醛体积分数)的 $p<0.05$ ,即戊二醛体积分数对实验结果影响显著;而A(明胶浓度)的 $p>0.05$ ,即因素A对实验结果没有太大影响。

### 2.4 固定化和游离木聚糖酶最适pH及pH稳定性

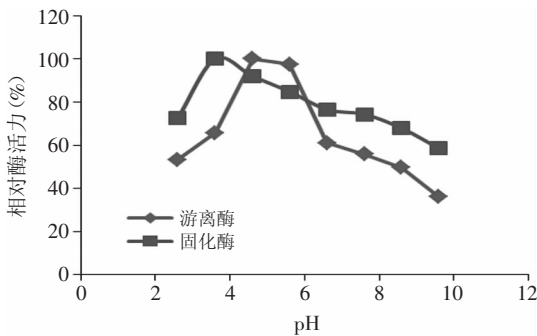


图5 pH对游离酶及固定化酶酶活力的影响

Fig.5 Effect of pH on the relative activity of the xylanase and immobilized enzyme

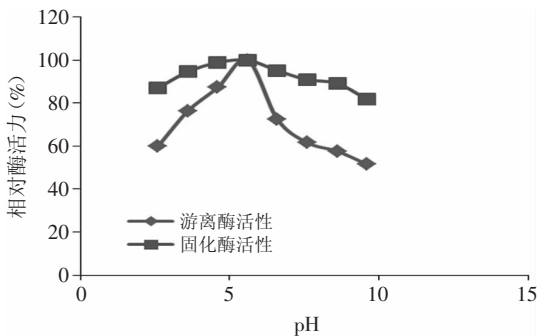


图6 游离酶及固定化酶的pH稳定性

Fig.6 pH stability of xylanase and immobilized enzyme

pH是影响酶活性的重要因素之一,在一定的pH范围内,随着pH的增加,酶的活性先升高后下降。由图5可知,固定化酶相对于游离酶而言,其最适反应pH

发生有利变化,且酶活较高,游离木聚糖酶最适pH为4.6,固定化酶的最适pH为3.6,这表明木聚糖酶的固定化可使其在较低pH时具有较高的活性。且从图6可知,在不同pH条件下保温2h后,固定化酶的pH稳定性明显高于游离酶,说明木聚糖酶经明胶固定后,其pH稳定范围变宽,有利于不同pH反应的需要,扩大了其应用范围。

### 2.5 固定化木聚糖酶的最适温度和热稳定性

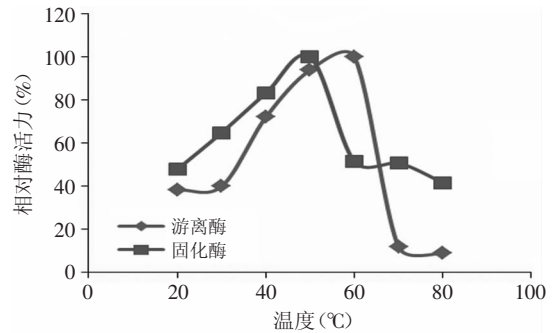


图7 温度对游离酶及固定化酶的影响

Fig.7 Effect of temperature on the relative activity of xylanase and immobilized enzyme

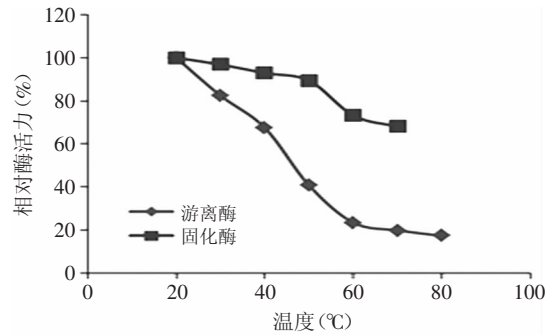


图8 游离酶及固定化酶的温度稳定性

Fig.8 Heat stability of xylanase and immobilized enzyme

图7结果表明,木聚糖酶经明胶戊二醛交联固定化后,固定化酶的最适反应温度较游离酶有所下降,由60°C下降到50°C左右。同时在相应温度20、30、40、50、60、70、80°C下分别对游离酶及固定化酶进行2h的热稳定性实验(见图8),发现固定化酶的温度稳定性有明显提高。

### 2.6 固定化酶和游离酶在有机溶剂中的稳定性

由图9可知固定化酶和游离酶在三氯甲烷、甲醇、异丙醇、丙三醇、EDTA中酶活力下降,且固定化酶的下降低程度略大于游离酶,而在甲醇和EDTA中,游离酶活性保持较好。总体而言,木聚糖酶被固定化后在有机溶剂中的稳定性较低。

## 3 结论

通过对固定化条件的单因素分析、正交设计 $L_9(4^3)$ 及方差分析表明,在明胶浓度为15%、戊二醛交联浓度4%、交联时间1h及固定化时间为3h下,明胶固定化木聚糖酶的活力最高。

(下转第230页)

争粮、不与人争地的优点,是一种有工业应用前景的琥珀酸发酵的原料。本实验室今后的研究着重于培养基和发酵条件的优化,增加WS100在玉米浆培养基中积累琥珀酸的产量,降低琥珀酸的生产成本,使廉价的玉米浆和废糖液能代替无机盐和葡萄糖制备琥珀酸成为可能。

### 参考文献

- [1] 奚永兰,陈可泉,李建,等. 琥珀酸发酵过程中固定CO<sub>2</sub>的研究进展[J]. 化工进展,2010(7):1314-1319.
- [2] 周彬,华渤文,周胜德,等. 琥珀酸放线杆菌发酵产琥珀酸的优化[J]. 食品与发酵科技,2012,48(3):18-21.
- [3] Willke T, Vorlop KD. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2004,66(2):131-142.
- [4] Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology,2006,39(3):352-361.
- [5] Davis C, Cleven D, Brown J, et al. Anaerobiospirillum, a new genus of spiral-shaped bacteria[J]. International journal of systematic bacteriology,1976,26(4):498-504.
- [6] 林日辉,黄新林,黄文勤. 高产琥珀酸放线杆菌的诱变选育[J]. 食品工业科技,2012,33(7):161-164.
- [7] Guettler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic acid-producing strain from the bovine rumen [J]. International journal of systematic bacteriology,1999,49(1):207-216.

- [8] Lee P, Lee S, Hong S, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2002,58(5):663-668.
- [9] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters,1989,63(3):223-234.
- [10] Wu H, Li Z, Zhou L, et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* *pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture[J]. Applied and environmental microbiology,2007,73(24):7837-7843.
- [11] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* [J]. Bioresource technology,2008,99(6):1736-1742.
- [12] Agarwal L, Isar J, Meghwanshi G, et al. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*[J]. Journal of applied microbiology,2006,100(6):1348-1354.
- [13] Wang D LQ, Yang MH, Zhang YJ, et al. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation[J]. Process Biochem,2011,46(1):365-371.
- [14] Causey T, Zhou S, Shanmugam K, et al. Engineering the metabolism of *Escherichia coli* W3110 for the conversion of sugar to redox-neutral and oxidized products: homoacetate production[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2003,100(3):825-832.

(上接第226页)

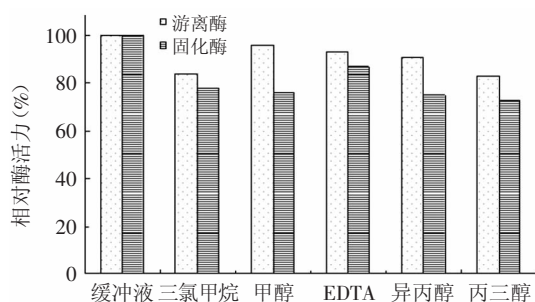


图9 固定化酶和游离酶在有机溶剂中的稳定性

Fig.9 The stability of xylanase and immobilized enzyme in organic solvent

其次通过对游离酶及固定化酶的性能指标研究发现,游离酶的最适pH为4.6,最适温度为60℃;固定化酶的最适pH为3.6,最适温度为50℃。与游离酶相比,固定化酶的pH稳定性及热稳定性均高于游离酶,这表明通过对酶的固定化增强了其对环境的耐受性,使酶的应用范围获得扩展。同时研究发现,采用明胶固定化木聚糖酶不能改善酶在有机溶剂中的催化能力。但应用明胶固定木聚糖酶使其最适温度有所下降,从而为固定化酶的进一步工业应用造成了一定

影响,故在后期固定化改进中应重点考虑。

### 参考文献

- [1] 杨燕凌. 木聚糖酶固体发酵条件的实验[J]. 河南科技大学学报,2005,26(5):93-94.
- [2] 刘成,孙中涛,田林茂,等. 黑曲霉产木聚糖酶固体发酵条件及部分酶学性质的研究[J]. 生物技术,2007,17(4):82-85.
- [3] 吴小刚,黄东平,曾莹. 黑曲霉产木聚糖酶发酵条件的研究[J]. 氨基酸和生物资源,2007,29(2):26-29.
- [4] 葛晓萍,郭清吉,石琰,等. 木聚糖酶产生菌的分离筛选及酶学性质[J]. 青岛大学学报,2007,28(4):290-293.
- [5] 张勇伟,胡虹,刘亮伟,等. 木聚糖酶热稳定性化学修饰研究[J]. 食品与发酵工业,2011,37(5):61-65.
- [6] Pochih Chang, Wein-Shiang Tsai, Chia-Liang Tsai, et al. Cloning and characterization of two thermo stable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2004,319:1017-1025.
- [7] 曹香林,王雅静,全艳艳,等. 壳聚糖固定化木聚糖酶的工艺研究[J]. 西北农业学报,2011,20(6):190-193.
- [8] 朱均均,江小华,勇强,等. 壳聚糖微球固定化β-葡萄糖苷酶的研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(2):16-20.