

固定化 β -半乳糖苷酶的催化特性研究

宋景深,陈振鹏,邓宝浣,陈子健

(江门量子高科生物股份有限公司,广东江门 529081)

摘要: β -半乳糖苷酶经固定化后,其催化性能得到一定程度的改善。在各种反应条件相同的条件下,固定化酶的最适反应条件与游离酶相比得到一定程度的拓宽:受反应温度变化的影响变小,pH从5.8~6.2扩宽至5.7~6.5;对乳糖的转化效率有了不少的提高,酶的稳定性也得到了加强。实验中固定化 β -半乳糖苷酶重复使用28次,底物转化率均在45%以上,具备了一定实际应用能力。

关键词: β -半乳糖苷酶,固定化,催化特性

Study on catalytic characteristics of immobilized β -galactosidase

SONG Jing-shen, CHEN Zhen-peng, DENG Bao-huan, CHEN Zi-jian

(Quantum Hi-tech Biological Co., Ltd., Jiangmen 529081, China)

Abstract: Comparing to free enzyme, the catalytic characteristics of immobilized β -galactosidase were modified. The ranges of optimum reactive conditions have been extended: the influence of temperature became smaller, pH widened to 5.7~6.5 from 5.8~6.2. The conversion rate of substrate becomes higher and the stability of enzyme has been enhanced. Having been re-used for 28 times, the conversion rate of substrate keeps being more than 45%.

Key words: β -galactosidase; immobilization; catalytic characteristics

中图分类号: TS201.2+5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)10-0092-03

低聚半乳糖(Galactooligosaccharides,简称GOS)可以促进肠道内双歧杆菌(Bifidobacteria)和乳酸杆菌等有益菌的生长,是一种益生元(prebiotics)。低聚半乳糖是以乳糖为原料,经 β -半乳糖苷酶(EC3.2.1.23)作用转化而成^[1]。可将 β -半乳糖苷酶固定化,固定化酶具有催化效率高、稳定性高、低能耗、低污染等优点,将 β -半乳糖苷酶固定化后用于生产,可提高酶的利用率,节省生产成本。本研究中固定化酶是以树脂为载体,经吸附作用制作而成。酶被固定化以后,由于受到多方面的影响,与游离酶相比较,其微观结构等往往会发生改变,对底物的转化特性也可能随之而变^[2]。如:受扩散现象影响,酶固定在多孔载体,由于受到质量传递限制,酶活力可能会受到扩散现象影响;受空间构型影响,因酶的比活力非常依赖于所用载体的本身性质,另外酶固定化疏水性载体和亲水性载体的差异性很大;受微环境影响,微环境是指吸附的酶分子周围的载体性质,其可能会对酶的特性产生影响;受载体孔径大小影响,载体孔径过小,酶无法进入被吸附或者吸附后容易受到扩散限制;载体孔径过大,酶被吸附后有可能引起酶构型的改

变。可见,酶在固定化以后可能会受到多个方面的影响,固定化酶的特性与游离酶相比较可能发生变化。本研究在以上理论上,摸索 β -半乳糖苷酶被树脂固定化后的性质变化情况,观察对乳糖转化的特性是否受到影响,各转化参数是否有变化。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

β -半乳糖苷酶 江门量子高科生物股份有限公司;吸附树脂 天津南开和成科技有限公司;乳糖 购自戴维林国际贸易有限公司(荷兰DMV乳糖);蒸馏水 自制;0.5mmol的氢氧化钠溶液 自配;pH6.0缓冲液 磷酸缓冲液(自配)。

水浴摇床 常州澳华仪器有限公司;可调电炉 长沙市远东电炉厂;三角瓶、烧杯、玻棒 购自江门国侨科技仪器公司。

1.2 实验方法

转化率检测方法参照低聚半乳糖的高效液相色谱测定法^[3],转化率(%)以低聚半乳糖含量计。

转化反应的影响因素主要有底物浓度、反应液pH、反应温度、搅拌速度等。固定化酶转化生产低聚半乳糖反应条件确定主要从这些因素着手。研究中比较游离酶的各反应条件,观察酶被固定化以后反应特性是否发生了变化。

固定化酶的制备:用250mL三角瓶称取3g的吸附

收稿日期:2011-08-12

作者简介:宋景深(1979-),男,研究生,食品工程师,研究方向:低聚糖生产技术研究。

树脂,加入100mL蒸馏水后放入摇床,室温条件下摇动活化2h,取出后将蒸馏水倒干净;量取10mL缓冲液(pH6.0)转入100mL三角瓶,吸取总活力500U的液态 β -半乳糖苷酶加入三角瓶,溶于缓冲液;将完成活化的树脂倒入装有酶液的三角瓶,然后置于6℃冷冻摇床摇动吸附,吸附24h。完成吸附后倒掉吸附残留液,用蒸馏水将固定化酶清洗干净。制作若干份固定化酶,存放于4℃冰箱,待用。

1.2.1 pH对反应转化率的影响研究 用三角瓶分别配制两组乳糖溶液,每组各5份,干物质浓度 $50\% \pm 1\%$ (50g乳糖+50mL蒸馏水),加热完全溶解后降温至55℃,然后使用氢氧化钠溶液将其中4份乳糖溶液的pH调至 5.0 ± 0.1 、 6.0 ± 0.1 、 7.0 ± 0.1 ,另外一份乳糖溶液保留在自然pH(4.2),两组操作相同,以作对比。在第一组的五份乳糖溶液中加入4mL游离酶(125U/mL),在第二组的五份乳糖溶液中加入3g固定化酶(166U/g),然后将所有乳糖溶液置于同一水浴摇床进行酶解反应,控制温度55℃,反应过程每隔1h用氢氧化钠溶液校对一次pH。

1.2.2 反应温度对转化率的影响研究 设定四个温度梯度:50、55、60、65℃,用三角瓶分别配制两组乳糖溶液,每组各4份,浓度 $50\% \pm 1\%$ (50g乳糖+50mL蒸馏水),加热完全溶解,降温至60℃后在第一组的4份乳糖溶液中加入4mL游离酶(125U/mL),在第二组的4份乳糖溶液中加入3g固定化酶(166U/g),然后分别置于50、55、60、65℃水浴摇床中。

1.2.3 底物浓度对转化率的影响研究 配制两组乳糖溶液,每组各4份,浓度分别为 $40\% \pm 1\%$ 、 $45\% \pm 1\%$ 、 $50\% \pm 1\%$ 、 $55\% \pm 1\%$,加热完全溶解后降温至60℃时在第一组的4份乳糖溶液中分别加入4mL游离酶(125U/mL),在第二组的4份乳糖溶液中分别加入3g固定化酶(166U/g),两组反应液都置于65℃水浴摇床进行反应。

1.2.4 米氏常数 K_m 的测定 分别在两组4个250mL的三角瓶中用pH6.0的磷酸盐缓冲液分别配制0.0585、0.0877、0.1170、0.1462mol/L的乳糖溶液,在两组溶液中分别加入相同的总酶量50U的游离酶和固定化酶,在65℃下反应60min,分别测定其生成含量最高的转移三糖的量,并计算反应速度。

1.2.5 酶的半衰期测定 分别称量2份游离酶和2份固定化酶,每份游离酶4mL,每份固定化酶3g,分别放入pH6.0的醋酸盐缓冲液中,置于65℃条件下进行保温,分别在保存的第0、5、10、15d取出一份游离酶和一份固定化酶进行酶活检测,据此测定游离酶和固定化酶的半衰期。

1.2.6 固定化酶使用寿命的测定 在250mL中配制固形物含量50%的乳糖溶液,加入3g固定化酶,置于65℃水浴摇床摇动反应,当反应液中GOS含量达到45%以上,停止反应;回收固定化酶,重复上述步骤,直至GOS含量低于45%。

2 结果与讨论

2.1 pH对反应转化率的影响

反应16h后每隔2h分别从两组反应液中取样,取样后第一组反应液升温至100℃灭酶1min,第二组反

应液用纱布滤去固定化酶,然后用高效液相色谱检测转化率,比较游离酶和固定化酶在不同pH条件下的乳糖转化率,直至转化率开始下降,停止取样。每一份反应液都是在进行到24h后转化率最高,当反应进一步进行,部分的低聚半乳糖将分解成单糖,而且随着时间的推移,低聚半乳糖的损失增多。

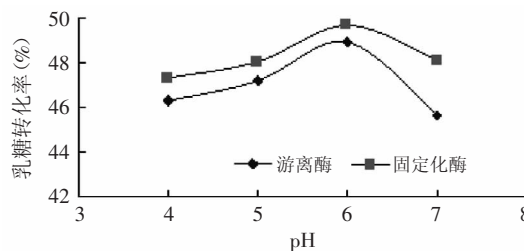


图1 反应液pH对游离酶和固定化酶转化效率的影响

从图1可见,酶在被固定化以后最适pH有所偏移,游离酶的最适pH为5.8~6.2,而固定化酶的最适pH为5.7~6.5,最适pH范围更宽。另外,从图中可见,与游离酶比较,在相同的条件下,固定化酶催化乳糖转化的效率更高。

2.2 反应温度对反应转化率的影响

反应24h后取样,第一组反应液升温至100℃灭酶1min,第二组反应液用纱布滤去固定化酶,然后用高效液相色谱检测转化率,比较游离酶和固定化酶在不同温度条件下的乳糖转化率。

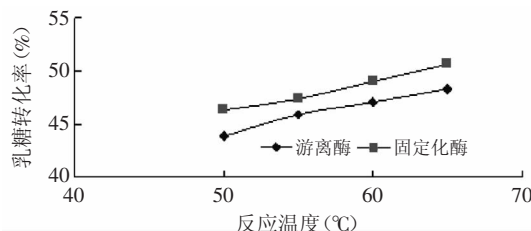


图2 反应温度对游离酶和固定化酶转化效率的影响

从图2的结果来看,随着反应温度的升高,在相同的反应时间内,游离酶和固定化酶对乳糖的转化率都升高,因为所用的酶为耐高温酶,可耐受温度80℃以上,但考虑到载体树脂所能耐受的温度为65℃,设定固定化酶的最适反应温度为65℃。固定化酶和游离酶比较,随着反应温度的下降,固定化酶的转化率下降幅度较游离酶的小,从不同反应温度角度来说,酶经大孔树脂固定化以后稳定性升高,受反应温度变化的影响较小。

2.3 底物浓度对反应转化率的影响

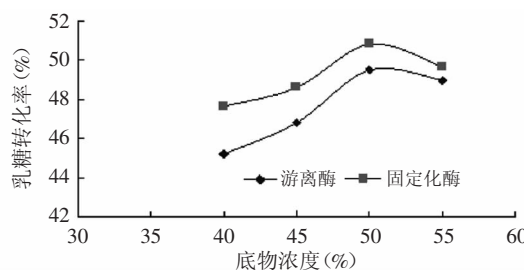


图3 底物浓度对反应转化率的影响

反应24h后分别取样检测低聚半乳糖含量(转化

率),观察在不同底物浓度条件下游离酶和固定化酶的乳糖转化率。

从图3可见,无论是游离酶或是固定化酶,底物浓度为40%、45%时乳糖转化率较低,而当底物浓度为50%时乳糖转化率最高,酶的固定化酶并没有改变此特性。而在同一条件下,固定化酶受底物的影响更低,乳糖转化率更高。

2.4 酶的动力学常数

以双倒数作图法测定游离酶和固定化酶的米氏常数 K_m ,如图4,游离酶的 $K_m=449\text{mmol/L}$, $V_{\max}=4.560\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$;固定化酶的 $K_m=289\text{mmol/L}$, $V_{\max}=3.605\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

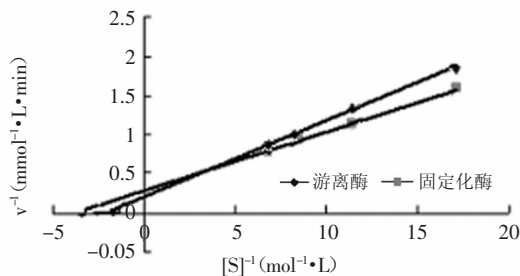


图4 游离酶和固定化酶的Lineweaver-Burk双倒数曲线

从动力学常数来看, β -半乳糖苷酶被固定化以后,对底物的亲和力更强,催化乳糖转化成低聚半乳糖的速度被提高。

2.5 半衰期检测

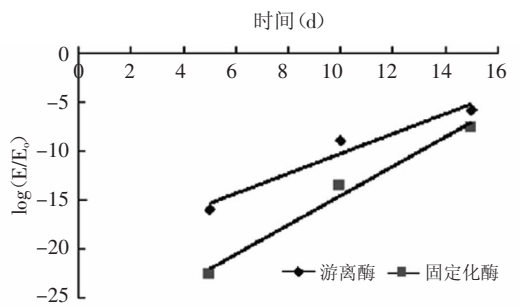


图5 时间与 $\log(E/E_0)$ 值对应曲线

β -半乳糖苷酶酶活检测方法参考文献[10]中所描述的检测方法,根据公式计算半衰期: $t_{1/2}=0.693/K_D$

式中: $K_D=-2.303/t\cdot\log(E/E_0)$,为衰减常数,其中E为第5、10、15d检测酶活平均值, E_0 为第0d检测酶活平均值。

以时间与对应的 $\log(E/E_0)$ 值做标准曲线,如图5所示。

按照公式所计算出来的游离 β -半乳糖苷酶半衰期为27d,而固定化 β -半乳糖苷酶半衰期为34d,进一步证明酶被固定化以后稳定性提高。

2.6 固定化酶使用寿命

游离酶因为无法回收,所以只能使用一次,而固定化酶在间歇式反应中可以通过分离来重复使用,随着使用次数的增加,酶活力逐渐衰减。通过间歇式反应实验的观察,证实一批固定化 β -半乳糖苷酶可反复使用28次,每次反应转化率都在45%以上。

3 结论

经研究发现,与游离酶相比较, β -半乳糖苷酶经固定化以后,酶的最适pH范围产生了偏移,从5.8~6.2扩宽至5.7~6.5,而最适反应温度、最适底物浓度并没有发生改变,但稳定性比游离酶高,但在各种反应条件相同的条件下,固定化酶比游离酶反应转化效率更高。酶在固定化以后米氏常数 K_m 变小,从游离酶时的449mmol/L变为固定化后的289mmol/L;半衰期延长,比游离酶延长了7d,说明经固定化以后酶的特性得到了进一步改善。使用固定化酶方法生产低聚半乳糖,将很大程度上节省生产成本,提升生产效率,提高产品质量,将推动低聚半乳糖甚至低聚糖行业在我国的进一步发展。

参考文献

- [1] 郑健仙.功能性低聚糖[M].北京:化学工业出版社,2004:104-109.
- [2] 曹林秋.载体固定化酶-原理、应用和设计[M].北京:化工出版社,2008:53-72.
- [3] 白鸿.保健食品功效成分检测方法[M].北京:中国医药出版社,2011:103-110.

(上接第91页)

参考文献

- [1] 王君,张宝善.微生物生产天然色素的研究进展[J].微生物学通报,2007(3):580-584.
- [2] V Betina, P Sedmera, J Vokoun, et al. Anthraquinone pigments from a conidiating mutant of *Trichoderma viride* [J]. Cellular and Molecular Life Sciences,1986,42:196-197.
- [3] 吴晓冰,于新,吴青.绿色木霉菌T-YY黄色素的稳定性研究[J].农业工程学报,2008(1):285-291.
- [4] 颜日明,张志斌,邱晓芳,等.杜仲细胞悬浮培养产黄酮及其动力学研究[J].中国生物工程杂志,2008,28(10):60-65.
- [5] 周宇虹,桂冰.关于Logistic方程的几种推导方法[J].工科数学,1998,8(4):112-115.
- [6] 张志东,王伟,茆军,等.低温淀粉酶发酵动力学模型的研究

[J].食品科学,2009,30(3):137-140.

[7] 戚以政,王叔雄.生化反应动力学与反应器[M].北京:化学工业出版社,1999:275-300.

[8] 黄建新,杨金水,卫阳.Z5-G菌生产聚 β -羟基丁酸PHB发酵动力学模型[J].化学工程,2005(1):45-47.

[9] 邵伟,熊泽,吴炜,等.红色色素液体发酵动力学模型的构建[J].江苏调味副食品,2006(6):18-20.

[10] 郑毅,张志国,关雄,等.苏云金芽孢杆菌蛋白酶发酵动力学模型的构建[J].生物数学学报,2008,23(4):727-734.

[11] 白秀峰.发酵工艺学[M].中国医药科技出版社,2003.

[12] 张志光.真菌原生质体技术[M].湖南科学技术出版社,2003.

[13] 黄英明,李春,焦鹏,等.DCA13发酵产酸期代谢动力学模型的建立[J].中国生物工程杂志,2003,23(8):57-60.