

海藻酸钠-琼脂混合固定化重组 右旋糖酐蔗糖酶的研究

张洪斌, 伊晓楠, 吴定涛, 胡雪芹

(合肥工业大学化学工程学院制药工程系, 安徽 合肥 230009)

摘要: 以海藻酸钠和琼脂混合物作为载体对右旋糖酐蔗糖酶固定化条件及其特性进行研究, 结果表明: 4% 海藻酸钠和1% 琼脂按1:1(V/V)混合后作为载体制备的微球固定化酶表现出持续高活力, 在第6批次转化率仍在40%左右; 海藻酸钠-琼脂混合载体与酶液体积比为2:1时固定化酶表现出的转化率最高; 得到的固定化酶最适反应温度为40℃; 最适反应pH值为5.4; 最适底物质量浓度为5g/100mL蔗糖; 35℃保温1h后剩余酶活力为原来的44%, 固定化酶比游离酶的热稳定性好; 固定化酶的动力学常数 $K_m = 0.02835 \text{ mol/L}$ 。

关键词: 右旋糖酐蔗糖酶; 固定化; 海藻酸钠; 酶学性质

Alginate-Agar Immobilization of Recombinant Dextranase

ZHANG Hong-bin, YI Xiao-nan, WU Ding-tao, HU Xue-qin

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Recombinant dextranase was immobilized with sodium alginate and agar. The immobilization conditions and enzymological properties of the enzyme were also investigated. Results indicated that immobilized dextranase could retain high activity via the immobilization using 4% sodium polymannuronate mixed with 1% gelatin at the ratio of 1:1 mixing. The transformation efficiency of the immobilized dextranase still retained 40% after repeated transformation for 6 times. The optimal volume ratio between mixed carrier and enzyme solution was 2:1, which achieved the highest enzyme activity. The optimal reaction temperature, pH and sucrose concentration as the substrate for the immobilized recombinant dextranase were 40 °C, 5.4 and 5 g/100mL, respectively. The enzyme activity remained 44% after storage at 35 °C for 1 h. The thermal stability of the immobilized enzyme was better than that of the free enzyme. The K_m value of this immobilized dextranase was 28.35 mmol/L.

Key words: dextranase; immobilization; sodium alginate; enzymological property

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0225-04

右旋糖酐蔗糖酶(dextranase, EC 2.4. 1. 5)是一种由肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和口腔链球菌(*oral streptococcus*)产生的葡萄糖基转移酶(glucosyltransferases)^[1], 由1250到1600个不同的氨基酸构成, 分子量约为170kD^[2]。该酶的催化是以蔗糖为底物, 将蔗糖分子中D-葡萄糖基催化转移形成D-glucosyl-enzyme^[2], 并释放出果糖, 生成重要药用血浆代用品右旋糖酐(dextran)。右旋糖酐因其具有安全、无毒、生物相容性好等多种优点, 已被广泛应用于医药、食品、色谱分析等多个方面^[3]。分子量7万D左右的右旋糖酐是目前公认的优良血浆代用品之一, 有增加血容量作用^[4], 临床主要用于治疗失血性休克。

目前国内生产右旋糖酐工艺主要采用厌氧发酵、乙醇捏洗、盐酸水解、乙醇划分等^[5]。该生产工艺能耗大, 乙醇和盐酸用量多, 导致废液排放量也大, 生产环境恶劣; 发酵生产过程中引入了杂氮、氯离子、硫酸盐灰分等杂质, 致使其产品质量指标低, 临床副反应多。Berensmeier等^[6]利用海藻酸钠与石英砂作为混合载体固定化右旋糖酐蔗糖酶, 动力学研究表明该法固定化酶失活较快。Petronijevic等^[7]利用带苯酰基的纤维素作为载体采用在表面交联固定右旋糖酐蔗糖酶取得较好的效果, 并可用Triton X-100再生, 但产品的分子量控制有待研究。所以选择合适的固定化方法是至关重要的。

收稿日期: 2009-09-14

基金项目: 安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2008A067); 合肥工业大学博士基金项目(GDBJ2008-021)

作者简介: 张洪斌(1970—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物化工与酶工程。E-mail: zhb5678@163.com

本实验在成功构建高效表达重组右旋糖酐蔗糖酶工程菌株并对该酶进行分离纯化的基础上^[8-10],对重组右旋糖酐蔗糖酶的固定化进行研究。利用海藻酸钠易在CaCl₂溶液中固化和固态琼脂孔隙较大的优点,选择海藻酸钠和琼脂混合载体微球法固定化右旋糖酐蔗糖酶,并对右旋糖酐蔗糖酶固定化条件及其特性进行研究,旨在为该酶能重复利用、连续化生产、提升右旋糖酐生产技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

重组右旋糖酐蔗糖酶工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28-dexYG 由本实验室构建、保存。

1.2 试剂

酶底物反应液和 DNS 试剂的配制见文献^[11]; 海藻酸钠 中国医药上海化学试剂公司; 琼脂粉 天津市福晨化学试剂厂; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

发酵培养基: 普通 LB 培养基; 酶诱导培养基: 用 0.2mol/L pH6.0 的磷酸盐缓冲液代替去离子水, 其他成分与 LB 培养基同。

1.4 仪器与设备

HQL300A 恒温冷冻摇床 中国科学院武汉科学仪器厂; 78-1 型磁力加热搅拌器 杭州仪表电机厂; GL-20G-II 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; VIS-723 紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; SL202N 电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司。

1.5 右旋糖酐蔗糖酶活力的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸试剂法测还原糖的量(DNS 法), 具体方法参考文献^[10]。

酶活力定义: 在 25℃ 下, 每分钟催化底物蔗糖产生 1 μmol 果糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.6 固定化右旋糖酐蔗糖酶制备与转化实验

右旋糖酐蔗糖酶酶的制备参见文献^[10], 取制备好的 4U/mL 酶液(V₁), 加入到海藻酸钠的混合液(V₂)中混匀, 磁力搅拌 150r/min, 缓慢滴入到 5(V₁+V₂) 2% CaCl₂ 溶液中, 并让其交联 1h, 即微球化固定化酶, 控制粒径为 1~2mm。

取固定化酶加入到酶底物反应液^[10]中, 在 30℃、200r/min 条件下催化反应, 每隔一定时间测反应液中生成的果糖量, 计算其摩尔转化率, 待其摩尔转化率不变时再进行下一批转化反应。

$$\text{摩尔转化率} \% = \frac{\text{果糖的物质质量}}{\text{蔗糖的物质质量}} \times 100$$

1.7 固定化右旋糖酐蔗糖酶学性质研究

1.7.1 固定化酶最适反应温度和热稳定性

分别设定不同的水浴温度: 15、20、25、30、35、40、45、50℃。将固定化酶在 pH5.4、20mmol/L 的醋酸钠缓冲液中置于上述不同温度反应 1h, 取样测定酶活力; 将酶液在 pH5.4、20mmol/L 的醋酸钠缓冲液中分别在 15、20、25、30、35、40、45、50℃ 保温 1h, 取样在最适反应温度下测定酶活力。以酶活力最高者为 100%, 计算相对酶活力。

1.7.2 固定化酶的最适反应 pH 值

将底物溶液配制成不同 pH 值的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 值分别为 4.6、5.0、5.4、5.8、6.4), 分别向不同 pH 值的 10mL 底物溶液中加入 1g 固定化酶, 30℃ 反应 1h 测定酶活力。

1.7.3 底物质量浓度对固定化酶活力的影响

配制酶反应液, 使蔗糖质量浓度分别为 2、5、10、15g/100mL 和 20g/100mL。将固定化酶在上述不同质量浓度酶反应液中于 30℃ 反应 1h, 测定酶活力。

1.7.4 动力学常数 K_m 的测定

将酶液与不同质量浓度的蔗糖底物作用, 测定酶反应的初速度, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出以蔗糖为底物的酶的 K_m 值。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠与琼脂不同比对固定化效果的影响

将 4% 海藻酸钠和 1% 琼脂按体积比 2:1、1:1、1:2 分别混合, 混合载体再与制备好的 4U/mL 右旋糖酐蔗糖酶酶液按体积比 2:1 进行固定化, 分别称取 1g 固定化酶置于 10mL 蔗糖底物溶液中, 在 30℃、200r/min 条件下反应 6h, 测定其转化率。中止反应, 将反应产物倒出, 再加入新的底物溶液, 重复进行转化反应, 测定其转化率, 结果如图 1 所示。

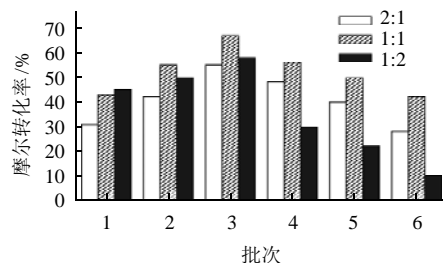


图1 海藻酸钠与琼脂不同配比的固定化酶转化率

Fig.1 Transformation efficiency of dextransucrase immobilized using sodium alginate mixed with agar at different ratios

由图 1 可知: 4% 海藻酸钠和 1% 琼脂按 2:1 混合后, 较多的海藻酸钠导致的固定化颗粒内部孔径较少, 影响蔗糖底物与酶的接触及产物的传质, 故在酶固定化后反

应的转化率相对较低;4%海藻酸钠和1%琼脂按1:2混合后,较多的琼脂提供不了大的强度致使固定化颗粒较早的散开,在前3批反应中酶活力较高,在反应第3批后剩余酶活力很快下降,转化率很低。4%海藻酸钠和1%琼脂按1:1混合后,右旋糖酐蔗糖酶表现出持续高活力,在第6批次转化率仍在40%左右,固定化效果较好,此条件下固定化有利于酶活的发挥和产物的传出。

反应体系的转化率在前3批反应中上升可能与产物在固定化颗粒内部富积后再逐渐排出有关,后3批反应中右旋糖酐产量下降与酶的慢慢失活和酶的流失有关。

2.2 混合载体与酶液的不同体积比对固定化效果的影响

将4%海藻酸钠和1%琼脂按1:1混合,混合液再与制备好的4U/mL右旋糖酐蔗糖酶酶液按体积比3:1、2:1、1:1进行固定化,交联1h得微球化固定化颗粒。分别称取1g固定化酶置于10mL蔗糖底物溶液中在30℃、200r/min条件下反应6h,测定其转化率。中止反应,将反应产物倒出,再加入新的底物溶液,重复进行酶反应,考察其利用次数,测定其转化率,结果如图2所示。

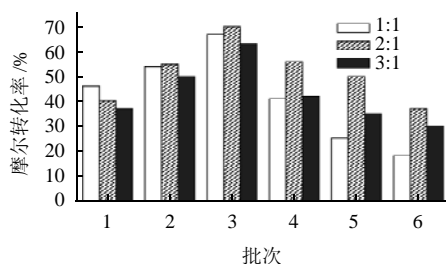


图2 混合载体与酶液不同体积比的固定化酶转化率

Fig.2 Transformation efficiency of dextranase immobilized using sodium alginate mixed with agar at different volume ratios of immobilizing carrier to enzyme solution

从图2可知,在第1批次的反应中,海藻酸钠与琼脂混合载体与酶液体积比为1:1的固定化颗粒得到的转化率最高,这是因为体积比为1:1的固定化颗粒其单位体积的酶量多,也即包埋在颗粒表层的酶量多,底物的进入和产物的逸出均较2:1、3:1的颗粒快,表现的摩尔转化率最高。随着反应批次的增多,各反应体系的摩尔转化率先上升后下降,到第3批次达到最大,其中混合载体与酶液体积比为2:1时增加最快,而且利用次数达6次时相对酶活力仍在40%左右。反应体系的还原糖量在前3批反应中上升可能与反应产物在固定化颗粒内部富积后再逐渐排出有关,在后3批反应中摩尔转化率下降与酶的慢慢失活有关。

结果表明海藻酸钠-琼脂混合载体与酶液体积比为2:1时的固定化酶表现出的摩尔转化率最高,所以在以下实验中均以此比例作为制备固定化酶的条件。

2.3 固定化右旋糖酐蔗糖酶酶学性质

2.3.1 固定化酶最适反应温度和热稳定性

由图3可见,固定化酶的最适反应温度为40℃,当

反应温度低于40℃时,酶活力随温度升高而缓慢升高,当反应温度高于40℃时,酶活力下降很快。该酶的游离态最适反应温度为30℃^[10],说明该酶固定化后最适反应温度提高了10℃。

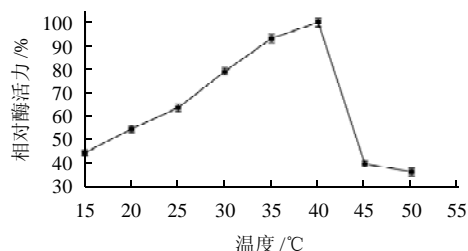


图3 温度对固定化酶活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on immobilized dextranase activity

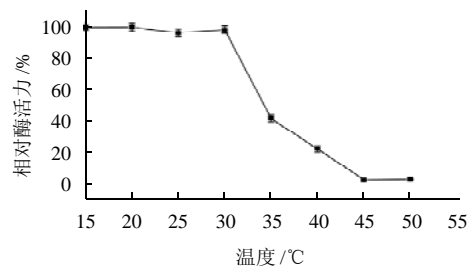


图4 固定化酶的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of immobilized dextranase

由图4可见,固定化酶在30℃以内保温1h后活力没有明显的降低,35℃保温1h后相对酶活力为44%,温度达到45℃保温1h后相对酶活力为2.4%,表明该酶在45℃以上的热稳定性差。该酶固定化后的热稳定性比游离酶提高近5℃^[10]。

从固定化酶最适反应温度和热稳定性实验结果可见选择30℃作为固定化酶反应温度较为合适。

2.3.2 固定化酶最适反应pH值

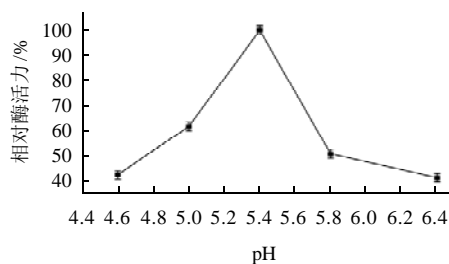


图5 pH值对固定化酶活力的影响

Fig.5 Effect of pH on immobilized dextranase activity

如图5所示,该固定化酶的最适反应pH值为5.4,与游离酶一致^[10]。说明右旋糖酐蔗糖酶固定化后对最适反应pH值没有影响。从图5还可以看出该固定化酶对pH值敏感,当pH值降低到5.0以下或升到5.8以上时,酶活力下降比较快。

2.3.3 底物质量浓度对固定化酶活力的影响

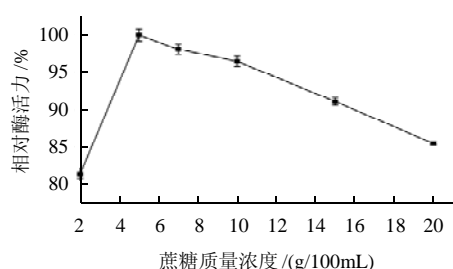


图6 不同质量浓度蔗糖对固定化酶活力的影响

Fig.6 Effect of sucrose concentration on immobilized dextranase activity

如图6所示,固定化酶最适底物质量浓度为5g/100mL蔗糖,低于游离酶8g/100mL的最适蔗糖质量浓度,较高质量浓度蔗糖(≥ 10 g/100mL)对该固定化酶活力有抑制作用。

2.3.4 固定化酶动力学常数 K_m 的测定

用pH5.4的醋酸缓冲液分别配制蔗糖质量浓度为1、2、4、5、6、9、10g/100mL的溶液5mL,分别向其中加入一份固定化酶(相当于1mL游离酶液),在30℃反应10min测果糖含量,用Lineweaver-Burk双倒数作图法计算底物反应速率(图7)。

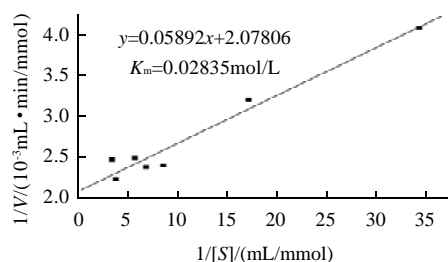


图7 固定化酶反应体系中蔗糖浓度和反应速率的双倒数曲线

Fig.7 Double reciprocal curve of velocity against sucrose concentration in the reaction system of immobilized dextranase

实验测得固定化酶的动力学常数 $K_m=0.02835$ mol/L, 高于游离酶的动力学常数 $K_m=0.01013$ mol/L^[10], 说明经过海藻酸钠-琼脂载体包埋固定化后, 其与底物的结合能力变弱, 反应速度变慢。

3 讨论

海藻酸钠和琼脂来源丰富、无毒、无抗原性、化学性质比较稳定, 是性能良好的固定化酶载体, 具备规模生产的条件。在海藻酸钠包埋固定化酶过程中, 利用固定剂 CaCl_2 中的钙离子与海藻酸根离子螯合形成不溶于水的海藻酸钙凝胶, 从而将酶固定, 用单一的海藻酸钠包埋法固定化右旋糖酐蔗糖酶后没有形成更大的空间供反应底物和产品的传递, 表现的活力较低。以海藻酸钠和琼脂混合作为固定化右旋糖酐蔗糖酶载体, 结合了海藻酸钠易在 CaCl_2 溶液中固化和固态琼脂孔隙较大的优

点, 便于底物与酶结合和产物的排出, 同时采用微球化固定化酶可以增加酶与底物的接触, 提高酶催化效率。

目前以海藻酸钠和琼脂混合作为固定化载体应用于右旋糖酐蔗糖酶固定化的研究较少。筛选合适的海藻酸钠和琼脂配比及其固定化条件的研究, 有助于对右旋糖酐蔗糖酶进行固定化, 使得固定化右旋糖酐蔗糖酶能较好地保持原有酶活性, 而且酶稳定性也有所提高, 还兼有可回收和反复使用等优点。因此研究右旋糖酐蔗糖酶的固定化对于酶催化产品的分离、分子量控制, 连续给料和酶重复使用等均具有现实意义。

本研究还比较了固定化右旋糖酐蔗糖酶与游离酶的酶学性质, 结果表明右旋糖酐蔗糖酶经海藻酸钠-琼脂固定化后稳定性提高。固定化右旋糖酐蔗糖酶与游离酶相比, 可以较长时间保持较高的酶活力; 固定化酶可以反复使用6次以上, 回收的固定化酶酶活回收率可达到40%以上; 在30℃水浴保温, 固定化右旋糖酐蔗糖酶的相对酶活力稳定性高于溶液酶; 该酶固定化后最适反应温度提高了10℃, 达到40℃, 相比于游离酶30℃的最适温度, 该固定化酶更有利于在工业化生产的控温。固定化酶的动力学常数高于游离酶的动力学常数, 说明经过海藻酸钠-琼脂载体包埋固定化后, 由于空间位阻的增加, 其与底物的结合能力变弱, 有利于小分子右旋糖酐的合成, 但酶反应速率变慢了。关于海藻酸钠和琼脂固定化右旋糖酐蔗糖酶及固定化酶酶学性质研究, 为右旋糖酐蔗糖酶的固定化催化反应和工业化应用提供了参考, 有利于酶的实际应用和开发。

参考文献:

- [1] MONCHOIS V, WILLEMOT R M, MONSAN P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 23: 131-151.
- [2] ROBYT J F. Mechanisms in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose[J]. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1995, 51: 133-168.
- [3] DEMUTH K, JORDENING H J, BUCHHOLZ K. Oligosaccharide synthesis by dextranase: new unconventional acceptors[J]. Carbohydrate Research, 2002, 337: 1811-1820.
- [4] 中华人民共和国药典委员会编. 中华人民共和国药典: 二部[J]. 2005版. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [5] 张洪斌, 姚日生, 朱慧霞, 等. 发酵法生产右旋糖酐的工艺研究[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2004, 27(9): 783-787.
- [6] BERENSMEIER S, ERGEZINGER M, BOHNET M, et al. Design of immobilised dextranase for fluidised bed application[J]. J Biotechnol, 2004, 114(3): 255-267.
- [7] PETROJEVIZ Z, RISTIC S, PESIC D, et al. Immobilization of dextranase on regenerated benzoyl cellulose carriers[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 763-768.
- [8] ZHANG Hongbin, HU Youjia, ZHU Chunbao, et al. Cloning, sequencing and expression of a dextranase gene (dexYG) from *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30: 1441-1446.
- [9] 张洪斌, 朱春宝, 胡又佳, 等. 右旋糖酐蔗糖酶工程菌株的构建及其培养条件的研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(4): 1-6.
- [10] 王雅洁, 张洪斌, 胡雪芹, 等. 重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的纯化及其性质研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(9): 1266-1269.
- [11] 张洪斌, 王雅洁, 胡雪芹, 等. 右旋糖酐蔗糖酶生产菌的产酶条件研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 303-306.