

交联 - 葡萄糖苷酶聚集体的制备及其性质

罗建平, 欧 杰, 潘利华

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 交联酶聚集体法是一种新型的无载体酶固定化方法。本实验用该法固定化黑曲霉 β -葡萄糖苷酶, 对其制备条件、结构特征、酶学性质进行了研究。结果表明, β -葡萄糖苷酶液在冰水浴中经 90% 的硫酸铵沉淀 30min 后, 以 5% 戊二醛水溶液进行酶聚集体交联反应, 可获得较高活性的交联酶聚集体, 酶活回收率达 75%, 对对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷作用的最适温度、最适 pH 值和 K_m 值分别为 60℃、pH4.0 和 $4.61 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 与游离酶相比, 表现更高的底物亲和力。将其用于大豆异黄酮活性苷元染料木素的合成, 40min 内对染料木苷转化率达到 66%。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 交联酶聚集体; 无载体固定化; 大豆异黄酮; 应用

Preparation and Properties of Cross-linked β -glucosidase Aggregates

LUO Jian-ping, OU Jie, PAN Li-hua

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) were used to immobilize β -glucosidase from *Aspergillus niger*. β -glucosidase was precipitated by 90% ammonium sulfate solution for 30 min at 0 °C, then the aggregates were cross-linked by 5% glutaraldehyde solution. The obtained cross-linked β -glucosidase aggregates remained 75% of total enzyme activity. Its optimum reaction temperature, reaction pH and K_m to pNPG were 60 °C, 4.0 and $4.61 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, respectively. Compared to the free β -glucosidase, the cross-linked β -glucosidase aggregates had higher affinity to the substrate. The conversion rate was 66% when cross-linked β -glucosidase aggregates were employed to genistein production from soybean isoflavone genistin in 40 min.

Key words β -glucosidase; cross-linked enzyme aggregates; carrier-free immobilization; soybean isoflavones; application

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0254-04

β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)能水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 是重要的工业酶制剂, 可用于食品风味改良^[1-2]。近年来的研究证明, 不具活性或低活性的大豆异黄酮糖苷须经 β -葡萄糖苷酶水解为活性苷元才能被吸收进体内发挥作用^[3-4]。因此, β -葡萄糖苷酶在制备大豆异黄酮活性苷元方面显示出潜在的应用前景^[5]。 β -葡萄糖苷酶作为生物催化剂应用于工业生产依赖于酶的固定化。酶的固定化方法可分为载体固定化和无载体固定化两类。包埋法、吸附法、共价结合法和交联法等载体固定化方法中由于非催化功能载体的引入(载体部分约占整个固定化酶结构的90%~99.9%), 既“稀释”了固定化酶的活性, 又影响催化反应过程中物质的扩散, 而且通常会导致酶活性的严重损失^[6-7]。无载体固定化酶主要有交联溶解酶、交联喷雾干燥酶、交

联酶晶体和交联酶聚集体(cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)等^[7-8], 其中CLEAs法具有制备过程简单、对酶蛋白的纯度要求不高、成本低、稳定性好、酶活性保持率高等优势, 近年受到人们关注。Chen等用该法制备的胰岛素CLEAs, 活力回收率达到78%^[9]。本实验研究了交联黑曲霉 β -葡萄糖苷酶聚集体的制备条件、结构特征和酶学性质, 并将其应用于水解大豆异黄酮糖苷制备异黄酮活性苷元。

1 材料与方法

1.1 产酶菌种

黑曲霉_{Mss}(*Aspergillus niger*) 上海工业微生物研究所。

1.2 游离 β -葡萄糖苷酶的制备

收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(050410301); 合肥工业大学科学发展基金项目(053001F)

作者简介: 罗建平(1966-), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。

β -葡萄糖苷酶由黑曲霉 M85 液态发酵制备。所获酶粗提物经过超滤浓缩、Sephadex G-100 凝胶过滤等纯化步骤得到后,溶于 pH5.0 的 0.1mol/L 柠檬酸-0.2mol/L 磷酸氢二钠缓冲液(下同)中 4℃ 保存,其酶活力为 3.4U/ml。

1.3 交联 β -葡萄糖苷酶聚集体的制备和结构表征

β -葡萄糖苷酶聚集体的制备:取一定浓度的游离 β -葡萄糖苷酶 10ml 置于冰水浴中,缓慢滴加沉淀剂 90ml,酶聚集 30min,10000r/min 离心 5min,再悬浮于 10ml 的缓冲液中,测定酶聚集活力,确定聚集条件。

β -葡萄糖苷酶聚集体的交联:取适当浓度的酶聚集悬液 0ml 置于冰水浴中,向其中缓慢滴加 10ml 一定浓度的戊二醛溶液(体积浓度, V/V)并轻微搅拌,交联 120min,6000r/min 离心 10min,弃去上清液,经缓冲液洗涤数次,得到交联 β -葡萄糖苷酶聚集体,测定酶活力,确定交联剂戊二醛溶液的浓度。

交联 β -葡萄糖苷酶聚集体的结构表征:将交联 β -葡萄糖苷酶聚集体真空冷冻干燥,用 JSM-6700F 场发射扫描电子显微镜观察交联聚集酶表面结构, Spectrum 100 傅立叶变换红外光谱仪在波长 4000~400cm⁻¹ 范围内分析 β -葡萄糖苷酶聚集体交联前后的红外光谱变化。

1.4 β -葡萄糖苷酶酶活力的测定

β -葡萄糖苷酶活力按文献方法测定^[10]。取 0.5ml 的游离酶液或交联酶聚集体,加入 5mmol/L 对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG, Sigma 公司)0.5ml 溶液,于 50℃ 恒温反应 10min 后,立即加入 1mol/L Na₂CO₃ 溶液 2ml 终止反应,冷却后于 400nm 处测光吸收值。以每小时内催化生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量定义为一个单位酶活力。蛋白质含量按 Bradford 法测定^[11]。相对酶活力为各自处理条件下的各酶活与其最大酶活的比值。交联聚集酶的活力回收率为交联聚集酶活力与交联聚集时所加游离酶总活力的比值。

1.5 染料木苷的水解应用

将交联聚集酶制备成 10mg/ml 的悬浮液一定体积,加入 0.1mg/ml 染料木苷-甲醇溶液 200 μ l,用 pH4.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液补至 1ml,混匀,50℃ 反应一定时间,取样,按文献[12]方法用 HPLC 测定染料木素的生成量。交联酶聚集体对染料木苷的水解转化率以生成的染料木素摩尔质量占加入的染料木苷摩尔质量的百分比表示。操作稳定性考察时,每次反应后,将 β -葡萄糖苷酶交联聚集体离心、洗涤后重复使用,共进行 10 批次水解转化实验。

2 结果与分析

2.1 沉淀剂和游离酶浓度对 β -葡萄糖苷酶聚集的影响

实验选择 13 种沉淀剂(表 1)聚集 β -葡萄糖苷酶蛋白,结果表明,以 90% 的硫酸铵聚集酶蛋白效果最好,

叔丁醇、丙酮、异丙醇、乙醇、乙腈效果次之,其他试剂效果较差,有的甚至检测不出活性,可能是聚集过程中引起了酶的失活。游离酶浓度对聚集体的制备影响也很大,将浓缩酶液逐步稀释,用 90% 的硫酸铵进行酶聚集,随酶浓度的降低,酶聚集体酶活逐渐增大,到稀释 8~12 倍时达到稳定(表 2)。后续实验使用经稀释到浓度为 0.34U/ml 的酶液制备聚集体。

表 1 不同沉淀剂对 β -葡萄糖苷酶聚集体制备的影响
Table 1 Effects of different precipitator on β -glucosidase aggregates activity

沉淀剂种类	聚集体酶活(U/ml)	相对酶活(%)
原酶液	0.3856	100
90%PEG600	0.0414	10.7
60%PEG6000	—(未检出)	—
90%叔丁醇	0.3078	79.8
90%乙醇	0.2996	77.7
80%丙酮	0.3100	80.4
40%二甲亚砜	—	—
90%乙腈	0.3014	78.2
90%异丙醇	0.3101	80.4
90%乙二醇	—	—
90%N,N-二甲基甲酰胺	—	—
50%乳酸乙酯	0.2604	67.5
90%乙二醇二甲醚	0.2871	74.5
90%(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3502	90.8

表 2 游离 β -葡萄糖苷酶液浓度对聚集体制备的影响
Table 2 Effects of free enzyme concentrations on β -glucosidase aggregates activity

原酶液稀释倍数	聚集体酶活(U/ml)	相对酶活(%)
原酶液	3.3546	100
2	0.3368	20.1
4	0.3788	45.2
6	0.3269	58.5
8	0.3404	81.2
10	0.3150	93.9
12	0.2630	94.2
14	0.2242	93.7

2.2 交联剂戊二醛浓度对 β -葡萄糖苷酶聚集体交联的影响

戊二醛在对酶聚集体交联时,其分子上的醛基和 β -葡萄糖苷酶分子的氨基间形成席夫碱,使交联酶聚集体具有相对有序的三维结构和一定的空隙,允许一定大小的物质通过,从而保证了交联酶聚集体催化功能的发挥^[13-14],它对酶聚集体交联的效果和它的使用浓度密切相关。图 1 表明,戊二醛浓度较低,酶聚集体交联不充分,酶活力回收率较低,当浓度达到 5% 时,获得的交联酶活力回收率最大,其后随着戊二醛浓度的继续增加而降低。究其原因,戊二醛含有双功能基团,既是酶交联剂,同时也是蛋白质变性剂,低浓度时有利于 β -葡萄糖苷酶聚集体交联,而高浓度会加剧酶蛋

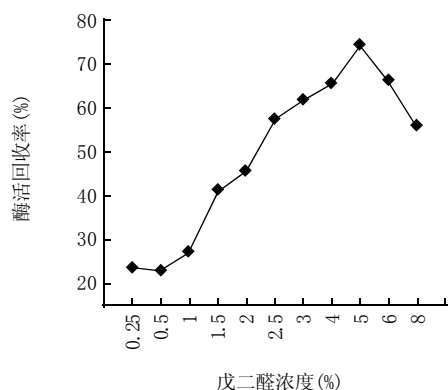


图1 戊二醛浓度对交联酶聚集体活力的影响

Fig.1 Effects of glutaraldehyde concentrations on CLEAs activity

白的变性失活。因此, 5% 的戊二醛溶液为最适交联剂浓度。

2.3 交联 β -葡萄糖苷酶聚集体的结构特征

对交联 β -葡萄糖苷酶聚集体进行 10×10^4 倍电镜扫描, 如图 2 所示, 交联 β -葡萄糖苷酶聚集体结构紧密单一。Schoevaart 等人^[8]曾对 12 种不同酶的交联酶聚集体结构进行电镜扫描观察, 发现只出现两种类型的结构: (1) 表面没有糖基化且高疏水性; (2) 表面被糖基化且带有大量的亲水残基。本实验制备的交联 β -葡萄糖苷酶聚集体结构形态与(1)相似, 即其表面疏水性高且糖基化程度低, 交联酶聚集体呈球状结构, 分子间缝隙有利于底物分子及产物的内外扩散, 保证了交联酶聚集体催化性能的发挥。

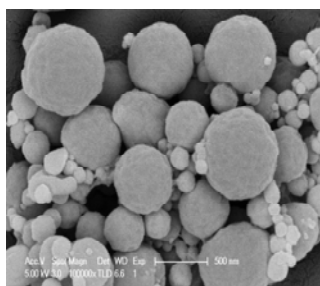
图2 交联 β -葡萄糖苷酶聚集体扫描电镜图

Fig.2 Morphology of CLEAs by scanning electron microscopy

对 β -葡萄糖苷酶聚集体交联前后的结构进行红外光谱分析, 可以看出, β -葡萄糖苷酶聚集体交联后在 1500cm^{-1} 处有强的峰存在(图 3), 表明在交联 β -葡萄糖苷酶聚集体中存在较多的由氨基与醛基反应形成的酰胺键, 验证了 β -葡萄糖苷酶聚集体通过戊二醛的交联作用, 形成结构紧密的交联酶聚集体。

2.4 交联 β -葡萄糖苷酶聚集体的酶学性质

分别测定游离酶与 CLEAs 在 $30 \sim 80^\circ\text{C}$ 反应条件下的酶活, 结果显示, 两者的最适反应温度都为 60°C , 未

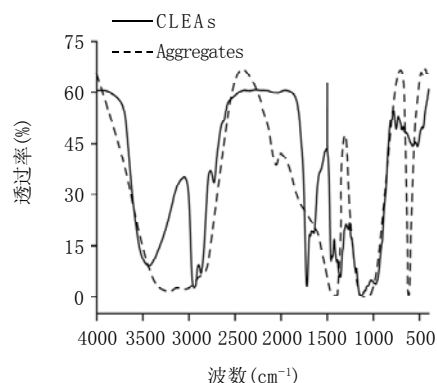
图3 β -葡萄糖苷酶聚集体交联前后的 FTIR 光谱

Fig.3 FTIR pattern of aggregates and CLEAs

发生变化, 但 CLEAs 的适宜作用温度范围明显变宽(图 4), 更有利于 CLEAs 的工业化应用。图 5 为游离酶与 CLEAs 在 pH 值为 $2.0 \sim 8.0$ 条件下的活力, 表明游离 β -葡萄糖苷酶作用底物的最适 pH 值为 5.0 , 而 CLEAs 的最适 pH 值则向酸性方向移动了 1 个 pH 单位, 为 4.0 , 表现出更强的耐酸性。将游离酶与 CLEAs 置于 4°C 下保存 90 d, 结果 CLEAs 仍保留 86% 的酶活, 而游离酶仅为 51%, 说明 β -葡萄糖苷酶经聚集交联后贮藏稳定性得到了显著的提高。取不同浓度 pNPG 溶液, 分别加入 β -葡萄糖苷酶 CLEAs 和游离酶, 于各自最适温度、最适

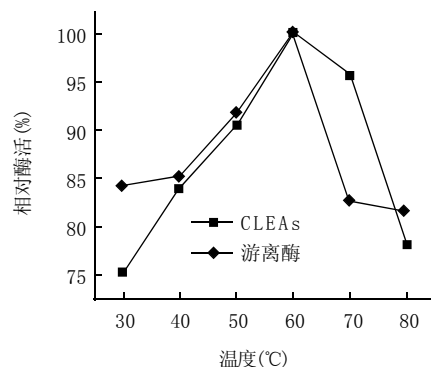


图4 交联酶聚集体的最适反应温度

Fig.4 Optimum temperature of CLEAs reaction

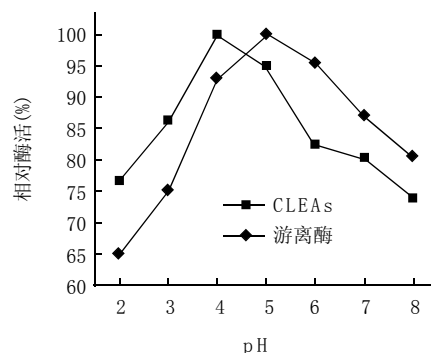


图5 交联酶聚集体的最适反应 pH

Fig.5 Optimum pH of CLEAs reaction

pH 条件下测定水解 pNPG 的反应初速度, 根据酶催化底物的 $1/v-1/[S]$ 关系, 通过 Lineweaver Burk 作图法^[15] 得 CLEAs 与游离酶的 K_m 值分别为 4.61×10^{-3} 和 $9.44 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。CLEAs 的 K_m 较小, 说明 CLEAs 与底物的亲和力较游离酶大, 有利于酶促反应的进行。

2.5 交联 β -葡萄糖苷酶聚集体的应用

将交联 β -葡萄糖苷酶聚集体 CLEAs 应用于染料木苷水解反应生产活性苷元染料木素。图 6 为 CLEAs 浓度对染料木苷水解作用的影响, 表明最大转化效率需要适当的底物和酶浓度比例。CLEAs 对染料木苷的水解反应进程见图 7, 显示 CLEAs 对染料木苷的水解反应进行至 40 min 后趋于平缓, 对染料木苷的水解转化率为 66%。CLEAs 的操作稳定性试验表明, CLEAs 连续使用六次对染料木苷的转化率仍能保持在 50% 以上, 操作稳定性较好, 使用十次后对染料木苷的转化率开始明显下降, 约为 35%。

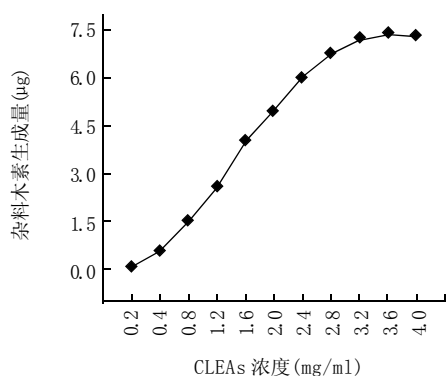


图6 交联酶聚集体浓度对染料木苷水解反应的影响

Fig.6 Effects of CLEAs concentrations on genistin hydrolyzation

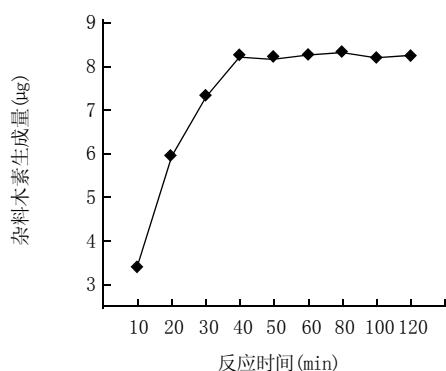


图7 交联酶聚集体对染料木苷的水解反应进程

Fig.7 Reaction course of Genistin hydrolyzed by CLEAs

3 结论

β -葡萄糖苷酶具有参与糖代谢等多种生物学功能,

应用广泛^[16]。但由于传统固定化方法制备费用较高, 尤其是固定化后酶活回收率低, 从而限制了它在工业中的应用。本研究以90%硫酸铵为沉淀剂, 以5%戊二醛为交联剂制备的无载体固定化酶——交联 β -葡萄糖苷酶聚集体, 制备工艺简单, 酶活回收率可达75%, 有效提高了 β -葡萄糖苷酶的利用率。交联 β -葡萄糖苷酶聚集体用于催化转化大豆异黄酮活性苷元染料木素生成的试验结果表明, 该无载体固定化酶具有较高的染料木苷转化率和操作稳定性, 这对大豆异黄酮深加工生产功能食品和医药用活性异黄酮苷元具有积极的意义。

参考文献:

- [1] 李平, 宛晓春, 陶文沂, 等. 丝素蛋白膜固定 β -葡萄糖苷酶及其改良食品风味研究[J]. 菌物系统, 2004, 23(1): 73-78.
- [2] YANNICK G, PATRICK C, STEPHANE P, et al. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase [J]. Journal of Biotechnology, 1997, 55: 151-156.
- [3] 徐茂军. β -葡萄糖苷酶对豆奶及豆奶粉中大豆异黄酮糖苷化合物的转化作用研究[J]. 中国食品学报, 2005(5): 28-33.
- [4] PYO Y H, LEE T C, LEE Y C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria [J]. Food Research International, 2005, 38: 551-559.
- [5] 王江海, 袁建平, 刘昕. 大豆异黄酮生理活性的研究进展—(2)大豆异黄酮的药理作用与保健功能[J]. 中国食品学报, 2004(4): 92-97.
- [6] TISCHER W, KASCHE V. Immobilized enzymes: crystals or carriers [J]. Trends Biotechnol, 1999, 17: 326-327.
- [7] CAO L, LANGEN L, SHELDON R A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14: 387-394.
- [8] SCHOEVAART R, WOLBERS M W, GOLUBOVIC M, et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87: 754-762.
- [9] CHEN J, ZHANG J L, HAN B X, et al. Synthesis of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in CO₂-expanded micellar solutions [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2006, 48: 72-76.
- [10] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 9-12.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-255.
- [12] 罗建平, 沈国栋, 姜绍通. 槐树培养细胞中异黄酮分析及其保肝作用[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 139-142.
- [13] CAO L, RANTWIJK F V, SHELDON R A. Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase [J]. Organic Letters, 2000(2): 1361-1364.
- [14] CAO L, LANGEN L M, RANTWIJK F V, et al. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001(11): 665-670.
- [15] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1990: 244-251.
- [16] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807.