

交联壳聚糖载体固定化柚苷酶工艺

雷生姣, 余海立, 黄超, 郑兴龙
(三峡大学化学与生命科学学院, 湖北 宜昌 443002)

摘要:以戊二醛为交联剂, 壳聚糖为载体, 采用交联-吸附偶联法固定柚苷酶, 通过单因素和正交试验优化确定最佳固定化工艺。结果表明, 柚苷酶的最佳固定化条件为: 以质量浓度为3.5g/100mL的壳聚糖制备的凝胶微球为载体, 凝结剂NaOH质量浓度1.0g/100mL、戊二醛体积分数7.0%、交联时间2.0h、pH 4.0、酶液质量浓度2.0mg/mL、25℃时吸附交联3.0h, 得到固定化酶最高酶比活力为7.37U/g; 与游离酶相比而言, 固定化酶最适pH值与最适反应温度均无明显变化; 固定化酶在不同温度(40、50、60℃)条件下重复使用7次, 相对酶活力仍能保持在70%、60%和50%以上。

关键词:壳聚糖; 柚苷酶; 固定化

Cross-linked Chitosan as a Carrier for Immobilization of Naringinase

LEI Sheng-jiao, YU Hai-li, HUANG Chao, ZHENG Xing-long
(College of Chemistry and Life Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: Naringinase (EC 3.2.1.40) was immobilized onto glutaraldehyde cross-linked chitosan beads by an adsorption method. Using one-factor-at-a-time and orthogonal array designs, the optimal immobilization conditions were determined as follows: gel microspheres prepared with 3.5 g/100 mL chitosan as the carrier, 1.0 g/100 mL NaOH as the coagulant, 7.0% glutaraldehyde solution, 2.0 h of cross-linking, 2.0 mg/mL of naringinase concentration and 3.0 h of adsorption at 25 °C. The maximum specific activity of the immobilized naringinase under these conditions was 7.37 U/g (based on dry chitosan) without showing obvious differences in the optimum pH and temperature compared to the free enzyme. After 7 cycles of repeated use at 40, 50 °C and 60 °C, the immobilized enzyme maintained above 70%, 60% and 50% of its original activity.

Key words: chitosan; naringinase; immobilization

中图分类号: TS201.25

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0233-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323048

壳聚糖又名氨基葡萄糖, 是由氨基-D-葡萄糖和N-乙酰基-D-氨基葡萄糖通过 β -(1,4)糖苷键连接起来的直链多糖, 它是目前发现的唯一的一种天然碱性多糖^[1]。壳聚糖分子中除多糖结构以外, 还含有丰富的羟基和氨基功能基团, 易于进行化学修饰, 因而具有许多独特的性能^[2]。其在材料工业、化妆品、纺织、印染、造纸、生物医药、环保、农业等方面都具有广泛的用途^[3-7]。壳聚糖分子中的羟基和氨基还可形成活泼界面, 对蛋白质的亲和力非常高, 是性能优良的固定化酶载体^[8]。由于酶与载体结合力弱, 酶易从吸附载体上脱落, 因此常用吸附和交联结合方法提高其操作稳定性^[9]。

柚苷酶(EC 3.2.1.40)具有 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶的活性, 主要被应用于果汁的脱苦、鼠李糖生产、葡萄酒的增香以及制药工业^[10-14]等多种领域, 具有重要研究价值。随着柑橘深加工工业的快速发展和对柚苷酶

应用研究的不断深入, 对柚苷酶的需求将会越来越大。

本研究以戊二醛交联的壳聚糖为载体, 对壳聚糖固定化柚苷酶的影响因素进行研究, 通过正交试验进一步优化其工艺, 为固定化柚苷酶的拓展应用提供理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柚苷酶(CAS号: 9068-31-9, 369U/g)、柚皮苷(HLPC 98%) 美国Sigma-Aldrich公司。

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90.0\%$)、一缩二乙二醇(DEG)(化学纯) 国药集团化学试剂有限公司; 戊二醛(体积分数为25%) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2013-04-10

基金项目: 宜昌市夷陵区科学技术局合作研究项目(0720123200); 三峡大学博士科研启动基金项目(0620120050)

作者简介: 雷生姣(1975—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术与生物催化剂。E-mail: leishengjiao@163.com

1.2 仪器与设备

UV-7504型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司；410A型pH计 美国Thermo Orion公司；SHA-C水浴恒温振荡器 金坛市恒丰仪器厂；磁力加热搅拌器 金坛市富华仪器有限公司；电子天平 上海市精天电子仪器有限公司；BILON超声波清洗机 上海比朗仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 壳聚糖微球的制备

称取3.5g壳聚糖，用100mL体积分数2.0%的醋酸溶解，配制成质量浓度为3.5g/100mL的壳聚糖胶体溶液，并将溶液超声处理20min，驱除气泡、使其充分溶解。在另一烧杯中配制一定质量浓度的NaOH凝结液1000mL。用10mL针头的注射器吸取壳聚糖胶体溶液，逐滴滴入上述凝结液中制成微球，滴加完后于室温(25℃)条件下放置3h，用去离子水反复洗涤壳聚糖微球直至中性，再用蒸馏水冲洗3次，抽干，4℃冷藏备用。

1.3.2 交联壳聚糖凝胶固定化柚苷酶

称取壳聚糖微球固形物10g，加入体积分数4.0%的10mL戊二醛溶液中，于25℃恒温振荡(150r/min)2h，抽滤，用去离子水反复洗涤微球，直至微球上不含游离戊二醛为止。将已交联壳聚糖微球加入到10mL 1.5mg/mL的柚苷酶酶液(pH4.0, 0.2mol/L醋酸缓冲液)中，25℃恒温振荡(150r/min)2h，4℃冰箱中吸附偶联4.0h。再用pH4.0的醋酸缓冲液洗去固定化酶表面游离酶，即得固定化酶，4℃冰箱中保存。

1.3.3 固定化柚苷酶活力的测定

游离柚苷酶与固定化柚苷酶活力测定方法参照文献[15]。

酶活力定义(U)：在60℃、pH4.0条件下，每分钟消耗1μg柚皮苷所需的酶量为1个酶活力单位。酶比活力(U/g)：在60℃、pH4.0条件下，单位质量酶分子所表现出的酶活力。

$$\text{相对酶活力}/\% = \frac{\text{酶活力}}{\text{最高酶活力}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 壳聚糖微球制备条件的优化

2.1.1 壳聚糖质量浓度对固定化酶活力的影响

以1.5g/100mL的NaOH溶液为凝结液，固定乙酸体积分数为2.0%，固定化时酶液质量浓度为1.5mg/mL，戊二醛体积分数为3.0%，25℃条件下吸附3.0h，分别制备固定化酶凝珠，考察壳聚糖质量浓度对固定化酶活力的影响。如图1所示，以3.5g/100mL的壳聚糖溶液固定化柚苷酶时，固定化酶的相对酶活力较高，且操作过程中，凝珠易成型，珠体光洁、圆整，并具有适中的凝胶

强度。随着载体质量浓度的增加，凝胶的成型越不规则，操作难度增加。故选用壳聚糖的最佳质量浓度为3.5g/100mL。

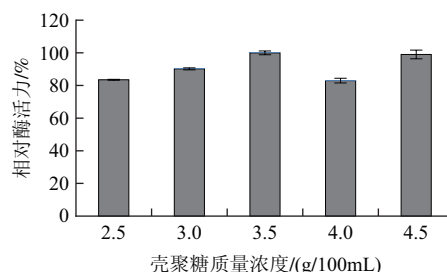


图1 壳聚糖质量浓度对固定化酶活力的影响

Fig.1 Effect of chitosan concentration on the activity of the immobilized naringinase

2.1.2 NaOH质量浓度对固定化酶活力的影响

以3.5g/100mL壳聚糖为载体溶液，固定乙酸体积分数为2.0%，固定化时酶液质量浓度为1.5mg/mL，戊二醛体积分数为3.0%，25℃条件下吸附3.0h，分别制备固定化酶凝珠，考察NaOH质量浓度对固定化酶活力的影响见图2。

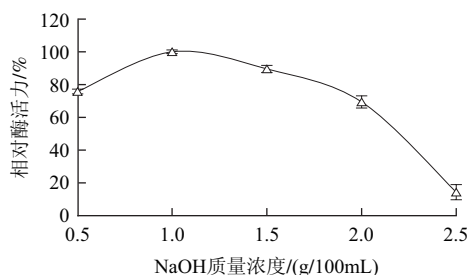


图2 NaOH质量浓度对固定化酶活力的影响

Fig.2 Effect of NaOH concentration on the activity of the immobilized naringinase

将壳聚糖溶液滴加到凝结液中，壳聚糖在碱性条件下迅速沉淀出来，形成凝珠。由图2可知，NaOH质量浓度由0.5g/100mL增加至1.0g/100mL时，固定化酶的相对酶活力增加；随着NaOH质量浓度的继续增大，固定化酶相对酶活力呈下降趋势。故选用NaOH的最佳质量浓度为1.0g/100mL。

据文献[16]报道，NaOH溶液中添加适量的乙醇，乙醇能插入到微球表面增加凝胶的多孔性，多孔性增大有利于酶的固定化，但也存在酶的泄漏和机械强度较弱等问题。本实验过程初期也考察了乙醇对凝珠的影响，但添加乙醇后，凝珠的成型不规则，有较为严重的拖尾现象，且凝珠机械强度较弱，因此本实验后期不考虑添加乙醇。

2.2 交联壳聚糖凝胶固定化酶工艺条件优化

采用单因素方法,以固定化酶相对酶活力和酶比活力为目标,依次考察戊二醛体积分数、戊二醛交联时间、吸附时溶液pH值、酶液质量浓度和酶的吸附时间对固定化效果的影响,以优化固定化工艺。

2.2.1 戊二醛体积分数对固定化酶活力的影响

固定壳聚糖质量浓度为3.5g/100mL, NaOH质量浓度为1.0g/100mL,其他固定化条件不变,分别加入戊二醛体积分数为2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%的交联剂,进行交联-吸附固定化,得到固定化酶,结果如图3所示。

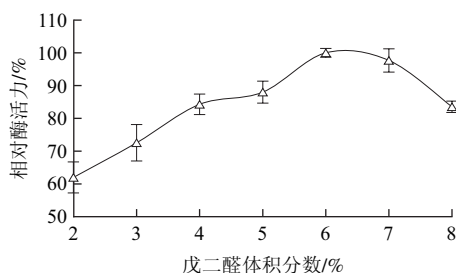


图3 戊二醛体积分数对固定化酶活力的影响

Fig.3 Effect of glutaraldehyde concentration on the activity of the immobilized naringinase

戊二醛既是固定化反应的交联剂,同时又是酶的变性剂。戊二醛体积分数对固定化效果影响最敏感。由图3可知,在戊二醛体积分数低于6.0%时,相对酶活力随戊二醛体积分数的增加而增大,但进一步增加戊二醛体积分数将导致相对酶活力下降。这可能是因为随着戊二醛体积分数增大,微球游离醛基随之增多,有利于与酶的共价连接;但当戊二醛体积分数超过一定量时,壳聚糖分子上的氨基与戊二醛、酶发生大量的分子内或分子间的强烈交联反应,交联程度从壳聚糖表面至内部,由强到弱,呈梯度减弱,大大降低了载体与酶结合的能力^[7]。因此,适宜的戊二醛体积分数为6.0%。

2.2.2 戊二醛交联时间对固定化酶活力的影响

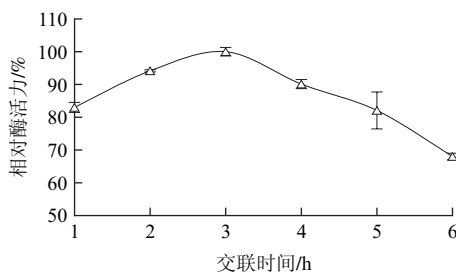


图4 戊二醛交联时间对固定化酶活力的影响

Fig.4 Effect of glutaraldehyde crossing time on the activity of the immobilized naringinase

固定壳聚糖质量浓度为3.5g/100mL, NaOH质量浓度为1.0g/100mL,戊二醛体积分数为6.0%,其他固定化

条件不变,改变戊二醛与壳聚糖交联时间,得到固定化酶,结果如图4所示,戊二醛交联时间由1h延长至3h时,固定化酶相对酶活力逐渐增加;交联时间达到3h时,相对酶活力达到最高值;继续延长交联时间,则相对酶活力逐渐下降。这是由于固定化酶的相对活力的高低不仅取决于固定化时间,同时受戊二醛变性作用的影响。戊二醛与载体上的氨基发生Schiff反应,随着交联时间的延长,载体上的醛基数目不断增加,酶与载体的交联反应进行得更加完全,固定化酶的相对酶活力逐渐增加;但交联时间过长时,过多的醛基发生缩合反应或载体上过多的醛基对酶进行了过多的修饰,引起酶蛋白的变性,致使酶活力逐渐降低。因此,选择最适戊二醛交联时间为3h。

2.2.3 吸附时溶液pH值对固定化酶活力的影响

固定壳聚糖质量浓度为3.5g/100mL、NaOH质量浓度为1.0g/100mL、戊二醛体积分数为6.0%、交联时间为3h,其他固定化条件不变,改变吸附时溶液pH值,得到固定化酶,结果如图5所示。

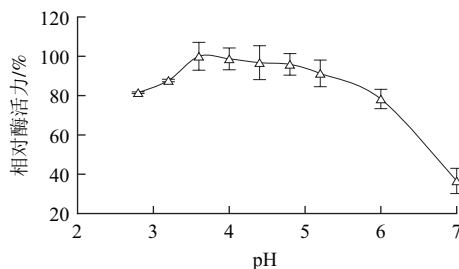


图5 固定化酶液pH值对固定化酶活力的影响

Fig.5 Effect of solution pH on the activity of the immobilized naringinase

由图5可知,固定化时,酶液体系pH值由2.8增至3.6时,相对酶活力逐渐增加;酶液pH值继续增加至5.2时,固定化酶活力变化不敏感;但当酶液pH值继续增加时,固定化酶活力急剧下降。这可能是因为壳聚糖是一种聚阳离子载体,溶液pH值的改变会影响载体表面基团的电性,当载体表面结合较多的H⁺后,载体微环境中负电荷增多,进而使最适固定化pH值向酸性方向偏移;同时,固定化过程的最适pH值与游离酶本身要求的酸碱性环境直接相关,本研究中游离酶的最适pH值为4.0左右,当pH值过高或过低时均会破坏酶的空间结构,使酶的活性中心失活,而固定化后酶的空间结构受载体的影响,更降低了固定化酶对pH值变化的敏感性。综合考虑各因素的影响和操作的难易度,本实验确定固定化溶液的最适pH4.0为研究条件。

2.2.4 酶液质量浓度对固定化酶活力的影响

固定壳聚糖质量浓度为3.5g/100mL、NaOH质量浓度为1.0g/100mL、戊二醛体积分数为6.0%、交联时间为3h、溶液pH值为4.0,其他固定化条件不变,改变固定化酶液质量浓度,得到固定化酶,结果如图6所示。

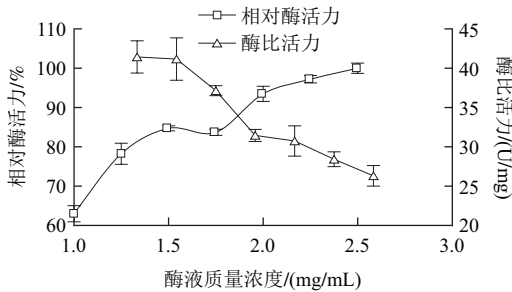


图6 酶液质量浓度对固定化酶活力的影响

Fig.6 Effect of enzyme concentration on the activity of the immobilized naringinase

由图6固定化酶相对酶活力曲线的曲率可知,当酶液质量浓度由1.0mg/mL增加至1.5mg/mL时,固定化酶的相对酶活力快速增加;当酶液质量浓度继续增加时,固定化酶的相对酶活力增速明显减缓。由固定化后酶的比活力曲线可知,当酶液质量浓度由1.0mg/mL增加至1.5mg/mL时,酶的比活力稍有下降;但随着酶液质量浓度的继续增加,酶比活力急剧下降。这是因为一定量壳聚糖载体所含的活性基团是一定的^[18],在结合位点未饱和前,固定化酶相对酶活随酶质量浓度的增加而快速升高;当结合位点趋于饱和时,增大加酶量不能大幅增加固定化酶的比活力;当结合位点达到饱和后,有些酶分子进入载体孔深处,使底物扩散相对困难,因而,酶分子发挥作用的能力减弱。而且,当载体固定的酶量过高时,酶分子自身空间构象可塑性减小,致使其不能充分发挥其催化功能,酶比活力下降。综合考虑经济可行性,使酶得到充分的利用,因此选用酶液质量浓度为1.5mg/mL进行固定化研究。

2.2.5 酶吸附时间对固定化酶活力的影响

固定壳聚糖质量浓度为3.5g/100mL、NaOH质量浓度为1.0g/100mL、戊二醛体积分数为6.0%、交联时间为3.0h、溶液pH值为4.0、固定化酶液质量浓度为1.5mg/mL,其他固定化条件不变,改变酶的吸附时间,得到固定化酶,结果如图7所示。

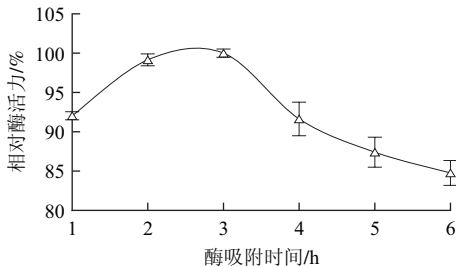


图7 酶吸附时间对固定化酶活力的影响

Fig.7 Effect of enzyme adsorption time on the activity of the immobilized naringinase

由图7可知,随着酶吸附时间的增加,固定化酶的酶活力不断增大,但当大于3.0h后,相对酶活力反而下降。这可能主要是由于过多的酶结合在载体上,致使酶与底物无法充分结合,使酶促反应速率降低,相对酶活力下降;而且吸附偶联时间过长,部分酶分子进入载体孔道深处,与底物的结合能力减弱,其表观活性也会降低。因此,本实验酶吸附时间以3h为宜。

2.3 柚苷酶固定化条件的优化

根据单因素试验结果及相关的文献[19]报道,选择对固定化酶酶活力影响较大的因素:NaOH质量浓度、戊二醛体积分数、酶液质量浓度、固定化酶的吸附时间与戊二醛交联时间进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,确定最佳固定化条件。正交试验因素与水平设计及结果分析见表1。

表1 正交试验因素与水平设计及结果

Table 1 Results and analysis of orthogonal array design						
试验号	A NaOH质量 浓度/(g/100mL)	B戊二醛体 积分数/%	C酶液质量 浓度/(mg/mL)	D酶吸附 时间/h	E戊二醛 交联时间/h	酶比活力/ (U/g)
1	1(0.5)	1(4.0)	1(1.25)	1(1.0)	1(1.0)	4.63±0.15
2	1	2(5.0)	2(1.50)	2(2.0)	2(2.0)	6.54±0.24
3	1	3(6.0)	3(1.75)	3(3.0)	3(3.0)	6.71±0.40
4	1	4(7.0)	4(2.00)	4(4.0)	4(4.0)	7.30±0.03
5	2(1.0)	1	2	3	4	6.49±0.19
6	2	2	1	4	3	5.82±0.07
7	2	3	4	1	2	7.01±0.02
8	2	4	3	2	1	7.22±0.04
9	3(1.5)	1	3	4	2	6.93±0.06
10	3	2	4	3	1	6.98±0.12
11	3	3	1	2	4	5.21±0.06
12	3	4	2	1	3	6.06±0.21
13	4(2.0)	1	4	2	3	7.18±0.11
14	4	2	3	1	4	6.61±0.14
15	4	3	2	4	1	4.85±0.06
16	4	4	1	3	2	5.99±0.45
K_1	6.30	6.31	5.41	6.08	5.92	
K_2	6.64	6.49	5.99	6.54	6.62	
K_3	6.30	5.95	6.87	6.55	6.44	
K_4	6.16	6.64	7.12	6.23	6.40	
R	0.48	0.70	1.71	0.47	0.70	

由表1可知,影响固定化酶比活力的因素主次依次为: $C>B=E>D>A$,即酶液质量浓度为固定化酶酶比活力的最重要影响因素。按照各因素的最好水平选取最优固定化工艺为: $A_2B_4C_4D_3E_2$,根据正交试验所得的最佳工艺条件,进行3次平行实验,测得固定化酶酶比活力平均值为 (7.37 ± 0.07) U/g,结果大于正交试验中9组试验的酶比活力最高组。

由表2方差分析可知,对于因素C, $F_{比}>F_{0.05(3,15)}$, $F_{比}<F_{0.01(3,15)}$,酶液质量浓度显著,其他因素均不显著,各因素对试验指标影响的主次与极差分析一致。因此,以3.5g/100mL的壳聚糖溶液为载体时,固定化柚苷酶的最佳工艺条件为:NaOH质量浓度1.0g/100mL、戊二醛交联剂体积分数7.0%、戊二醛交联时间2.0h、酶液质量浓度2.0mg/mL、酶液吸附时间3.0h。

表2 固定化酶比活力方差分析

Table 2 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

因素	偏差平方和	自由度	$F_{\text{比}}$
A	0.50	3	0.23
B	1.08	3	0.50
C	7.47	3	3.47
D	0.65	3	0.30
E	1.06	3	0.50
误差	10.76	15	

注: $F_{0.05(3,15)}=3.29$, $F_{0.01(3,15)}=5.42$ 。

2.4 交联壳聚糖凝胶载体固定化柚苷酶酶学性质研究

以正交试验确定的最优固定化工艺制备固定化柚苷酶凝胶,按照酶活力测定方法,分别测定游离酶与固定化酶的酶活,以相对酶活力为目标,依次考察固定化酶的酶学性质与使用稳定性。

2.4.1 固定化酶与游离酶的最适pH值

以不同pH值的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH2.8~7.0)配制底物柚皮苷溶液,分别向不同pH值的底物溶液中加入游离酶(蒸馏水配制)或固定化酶,60℃反应30min后测定酶活力,确定游离酶与固定化酶的最适pH值。

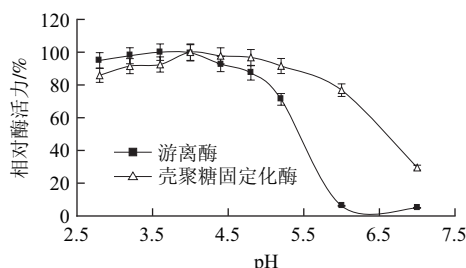


图8 游离酶与固定化酶的最适反应pH值

Fig.8 Optimal reaction pH of the free and immobilized naringinase

由图8可知,经固定化处理后,固定化酶的最适反应pH值与游离酶相比基本维持不变,这表明壳聚糖固定化柚苷酶后对酶反应的最适pH值没有明显影响。当pH值低于4.0时,游离酶的相对酶活力较固定化酶高;pH值大于4.0后,固定化酶和游离酶的相对酶活力均有不同程度的下降,但固定化酶酶活力的下降幅度明显小于游离酶。该结果提示,柚苷酶经壳聚糖固定化处理后其耐酸碱性能有所增强,这可能与固定化载体成分中带电基团对酸碱的缓冲能力有关。

2.4.2 固定化酶与游离酶的最适温度

将游离酶与固定化酶分别置于不同温度(30~80℃)的水浴锅中反应30min后,取样测定酶活力,确定游离酶与固定化酶的最适反应温度。由图9可知,固定化酶与游离酶在温度30~70℃范围内相对酶活力随温度升高而增大,在70℃时,相对酶活力均达到最大。这表明柚苷酶固定化后对其最适温度没有影响。但温度高于70℃后,

游离酶活力迅速下降,而壳聚糖固定化酶活力下降缓慢,说明柚苷酶经过固定化之后热稳定性有所提高,这可能与富含水分的凝胶载体自身具有较大的比热值有关。

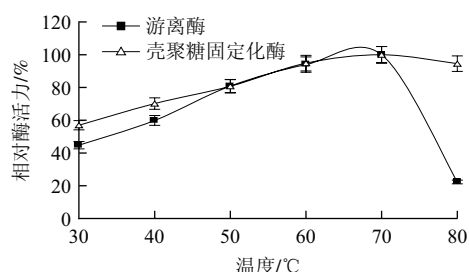


图9 游离酶与固定化酶的最适反应温度

Fig.9 Optimal reaction temperature of the free and immobilized naringinase

2.4.3 固定化酶在不同温度条件下的热稳定性

将壳聚糖固定化酶分别在40、50℃和60℃的水浴锅中保温不同的时间后,取出在60℃水浴中反应30min,测定其相对酶活力,比较其不同温度下的热稳定性。

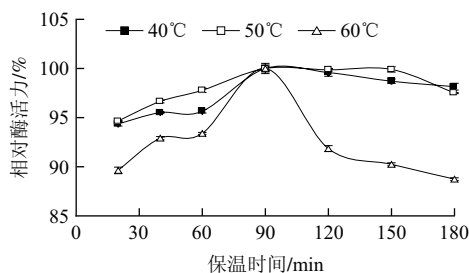


图10 固定化酶在不同温度下的热稳定性

Fig.10 Thermal stability of the immobilized naringinase at different temperatures

由图10可知,固定化酶在不同温度下保温90min以内,相对酶活力均明显的提高;当保温时间超过90min后相对酶活力均开始下降,这说明固定化酶存放于适当的温度下,其酶蛋白链能够充分的伸展,利于其活性中心暴露,从而提高酶活力^[20]。另外,在60℃条件下,当保温时间达到180min时,相对酶活力为86.6%,下降了13.4%,而在40℃和50℃条件下保温,其酶活力基本维持恒定,这表明固定化酶在60℃时的热稳定性明显低于40℃和50℃。由以上结果可以看出,酶和高分子载体结合后,结构变得相对牢固,酶的构相被固定,需要在适宜的温度条件下贮存保持酶蛋白的稳定性。如果贮存条件不适宜,酶蛋白的高级结构将难以维持,其酶的稳定性也将降低。

2.4.4 固定化酶在不同温度条件下的重复使用性

将固定化酶与底物柚皮苷溶液在不同温度(40、50℃和60℃)条件下反应完成后,取出用0.2mol/L的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.0)洗涤至无反应产物残留,重新装入新鲜底物溶液,测定固定化酶相对酶活力,以此进行多次水解循环来测定固定化酶在不同温度条件的重复使用性。

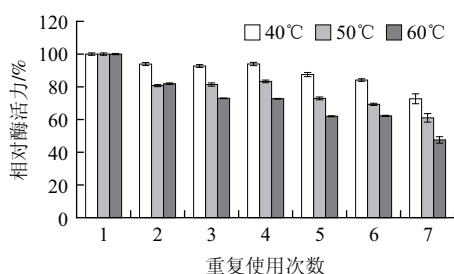


图 11 固定化酶在不同温度下的操作稳定性

Fig.11 Resuable stability of the immobilized naringinase at different temperatures

由图11可知,随着固定化酶重复水解次数的增加,固定化酶的相对酶活力逐渐降低,但在40、50、60℃的温度条件下经过重复使用7次后,固定化酶的相对酶活力仍分别为70%、60%和50%左右,有较高的使用效率。这说明酶固定化后,酶活性位点所处的微环境发生了变化,使得固定化酶的蛋白结构更稳定,活性中心得到保护,不易受外界环境影响而导致酶的活性逐渐丧失。本结果表明柚苷酶经过固定化后具有良好的重复使用性。

3 结 论

以壳聚糖微球为载体,戊二醛为交联剂,采用交联-吸附偶联法固定化柚苷酶。通过单因素试验,确定了每一因素的最佳值,并采用正交试验来进一步确定最佳固定化条件。固定柚苷酶的最适条件为:壳聚糖载体质量浓度3.5g/100mL、NaOH质量浓度1.0g/100mL、戊二醛体积分数7.0%、交联时间2.0h、pH 4.0、温度25℃、酶液质量浓度2.0mg/mL、吸附交联时间3.0h时,固定化酶比活力最大。柚苷酶经壳聚糖凝胶载体固定化后,其最适pH值与最适温度与游离酶相比,基本维持不变,但其热稳定性和操作稳定性均明显提高了;在40、50、60℃的温度下经过重复使用7次后,固定化酶的相对酶活力仍分别为70%、60%和50%左右。本实验优化了壳聚糖固定化柚苷酶的一些条件,研究了其固定化酶的基本酶学性质,可为固定化柚苷酶提供理论研究基础与借鉴。

参考文献:

- [1] 季更生,陈爱春.微生物壳聚糖酶的研究进展[J].食品科学,2010,31(3):297-301.
- [2] 贾海红,王学松,韩宝平.壳聚糖吸附酸性品红的平衡及动力学研究[J].环境工程学报,2011,5(8):1800-1804.
- [3] BARBARA K. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 25: 126-139.
- [4] 黄进,汪世龙,孙晓宇,等.壳聚糖及其衍生物基因载体的研究进展[J].高分子通报,2006(1):65-69.
- [5] 林松毅,宋龙凤,刘静波,等.壳聚糖微球固定碱性蛋白酶的研究[J].食品科学,2006,29(11):351-355.
- [6] 蒋小姝,莫海涛,苏海佳,等.甲壳素及壳聚糖在农业领域方面的应用[J].中国农学通报,2013,29(6):170-174.
- [7] 李利君,倪辉,肖安风,等.一株产柚苷酶的罗伦隐球酵母的鉴定及柚苷酶表达[J].微生物学报,2010,50(9):1202-1207.
- [8] 彭志英.食品酶学导论[M].北京:中国轻工业出版社,2002:182-189.
- [9] BRADY D, JORDAAN J. Advances in enzyme immobilization[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(11): 1639-1650.
- [10] SPAGNA G, BARBAGALLO R N, CASARINI D, et al. A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28: 427-438.
- [11] CAVIA-SALIZ M, MUNIZ P, ORTEGA N, et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchangeresin[J]. Food Chemistry, 2011, 125: 158-163.
- [12] PURI M. Updates on naringinase: structuraland biotechnological aspects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93: 49-60.
- [13] SORIA F, ELLENRIEDER G, OLIVEIRA G B, et al. α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93: 1127-1134.
- [14] 黎继烈,崔培梧,李忠海.柚苷酶产生菌 *Penicillium* sp.1523 分批发酵动力学研究[J].中国食品学报,2012,12(1):32-37.
- [15] 雷生姣,王可兴,吕晓燕,等.聚乙烯醇-海藻酸钙固定化柚苷酶的研究[J].食品科学,2011,32(3):138-143.
- [16] 程仕伟,贾彦荣,缪静,等.戊二醛交联壳聚糖固定化青霉素G酰化酶及其性质研究[J].烟台大学学报:自然科学与工程版,2011,24(2):163-166.
- [17] 左莹,马惠玲,张萍.壳聚糖对栓菌属漆酶固定化条件的研究[J].安徽农学通报,2010,16(24):28-31.
- [18] DIAB M A, EL-SONBATI A Z, AL-HALAWANY M M, et al. Thermal stability and degradation of chitosan modified by cinnamic acid[J]. Open Journal of Polymer Chemistry, 2012, 2: 14-20.
- [19] ZVERLOV V, HERTEL C, BRONNENMEIER K, et al. The thermostable α -L-rhamnosidase Ram A of *Clostridium stercoararium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase[J]. Molecular Microbiology, 2000, 35(1): 173-179.
- [20] 吴德洁,吴文林,刘斌.嗜热酶耐热机制及提高酶热稳定性的研究进展[J].亚热带农业研究,2006,2(4):293-297.