

壳聚糖凝胶固定化绿豆乳糖酶的研究

陈芳艳¹, 黄志君¹, 王林川², 王小智¹, 邓文峰¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以壳聚糖凝胶颗粒为载体,采用共价键偶联法固定绿豆乳糖酶. 研究表明,以体积分数为0.6%的戊二醛在常温下处理壳聚糖凝胶颗粒40 min后固定绿豆乳糖酶,固定化的最佳条件为:给酶量1.025 mg/g(蛋白质质量浓度为2.0 mg/mL)、pH7.0、温度4℃下固定8 h,固定化酶活力为105.33 U/g、活力回收30.1%.

关键词:壳聚糖凝胶; 绿豆乳糖酶; 固定化酶

中图分类号:Q55

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)03-0052-04

Immobilization of Lactase from Mungbean on Chitosan

CHEN Fang-yan¹, HUANG Zhi-jun¹, WANG Lin-chuan², WANG Xiao-zhi¹, DENG Wen-feng¹

(1 College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Lactase from mungbean was immobilized onto chitosan surface by using glutaraldehyde as the cross-linking reagent. The chitosan was treated with volume fraction of glutaraldehyde of 0.6% at ambient temperature for 40 min, then 1.025 mg lactase was immobilized onto 1 g chitosan at pH7.0, 4.0℃ for 8 h. The activity of the immobilized lactase was 105.33 U/g, and the activity recovery of the immobilized lactase was 30.1%.

Key words: chitosan; lactase; immobilized enzyme

乳糖酶(Lactase, E C 3.2.1.23),学名为 β -D-半乳糖苷酶(β -D-galactoside),能水解乳糖为半乳糖和葡萄糖,具有半乳糖苷转移作用^[1].乳糖摄入机体内经位于小肠粘膜刷状缘的乳糖酶分解成葡萄糖和半乳糖,是重要的营养物质,如果乳糖酶缺乏,乳糖不能分解为单糖,进入结肠后,被肠道微生物发酵生成有机酸(乙、丙、丁酸等)和气体(CH_4 、 H_2 、 CO_2 等),这个发酵过程引起人肠鸣、腹痛、排气和腹泻等症状,这称“乳糖不耐受”^[2].人体自身乳糖酶缺乏并导致乳糖不耐受是一个广泛存在的世界性问题,在中国更是一个普遍的现象.牛乳和乳清中含有大量乳糖,会因乳糖不耐症而影响乳制品的摄入.用游离酶法可水解乳糖,但成本高,应用受到限制.国内

外正研究固定化酶和固定化细胞用于生产低乳糖饮品.所用载体有:多孔颗粒硅胶、带羟基或氨基的纤维素衍生物、多聚凝胶、脂肪酸、铝板等^[3-5].本研究以壳聚糖为载体固定乳糖酶,壳聚糖来源丰富、廉价、具有良好的吸附性能、安全无毒,生物相容性好,是一种优良的固定化酶的载体^[6].乳糖酶酶源大部分来自酵母,也有用细菌的.由于微生物酶(包括克隆酶)耐热性较差,长期反复使用容易造成有害菌群污染^[7-8].而植物乳糖酶热稳定性和耐酸碱性好,不会造成食物的污染,取材方便,在牛奶工业中有着广阔的应用前景^[9].本试验从豆科植物萌发种子中提取乳糖酶,以比表面积大的壳聚糖凝胶颗粒为载体,采用共价键偶联法固定绿豆乳糖酶,研究最佳固定化条件.

收稿日期:2006-12-21

作者简介:陈芳艳(1971—),女,讲师,硕士, E-mail: chenfangyan@scau.edu.cn

基金项目:华南农业大学校长基金资助项目(2004K069)

1 材料与方法

1.1 材料

绿豆 *Phaseolus radiatus* (市售);“粤皇”食用花生油(超市售);壳聚糖(脱乙酰度 95%, 济南海洋生物有限公司);邻硝基苯基 β -D-半乳糖苷(ONP-Gal)、牛血清白蛋白(BSA)(分析纯, Sigma 公司);考马斯亮蓝 G-250(分析纯, Sigma 公司);其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 绿豆乳糖酶的制备 取绿豆 50 g, 洗净, 均匀铺于表面皿中, 加入适量自来水, 20 ℃ 避光培养 8 h, 使种子萌发。将萌发的绿豆去皮, 加入 100 mL 预冷的缓冲液 A (pH 7.0、0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 内含体积分数为 5% 甘油, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠) 置于研钵中于冰浴条件下充分研磨。然后 5 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min, 收集上清液即为粗酶液, 4 ℃ 冷藏待测。

1.2.2 壳聚糖凝胶颗粒的制备 称取 1 g 壳聚糖, 置于 100 mL 烧杯中, 加入体积分数为 1% 的冰醋酸溶液 70 mL, 磁力搅拌器充分搅拌溶解, 再加入质量分数为 37% 甲醛 3 mL, 迅速混匀, 然后用注射器注入食用花生油中形成凝胶颗粒。向花生油凝胶混合液中加入 2 mol/L NaOH 150 mL, 搅拌皂化, 然后 5 000 r/min 室温离心 10 min, 得到凝胶颗粒, 再加蒸馏水抽滤洗涤至 pH 为 7.0。

1.2.3 乳糖酶的固定化 取 1 g 壳聚糖凝胶颗粒, 加入体积分数为 0.6% 戊二醛 0.6 mL 于常温下交联 40 min, 迅速用 pH 7.8、0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗除过剩的戊二醛, 得到活性壳聚糖凝胶颗粒。将 0.5 mL 蛋白质质量浓度为 2.00 mg/L、活力 98.0 U/mL 的溶液酶加入活性壳聚糖, 在 4 ℃ 条件下固定 8 h, 用缓冲液 B (pH 7.0、0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 内含体积分数为 5% 甘油, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, 0.1 mol/L NaCl) 洗至在 280 nm 波长处无光吸收, 吸干, 测定固定化酶的活力。

1.2.4 溶液酶的活力测定方法 反应体系由 5 mmol/L ONPGal 0.2 mL, pH 4.0、0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 0.2 mL 及 0.1 mL 溶液酶组成。50 ℃ 水浴条件下准确反应 15 min, 加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 1.0 mL 终止反应。在 420 nm 波长下测定吸光值。溶液酶活力单位(U)定义为: 在测定条件下, 每 1 min 在 420 nm 波长下, 每增加 0.001 个光吸收单位所需酶量为 1 个酶活力单位(U)^[9]。

1.2.5 固定化酶的活力测定方法 反应体系由

5 mmol/L ONPGal 0.2 mL, pH 4.0、0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液 0.2 mL 及 0.1 g 固定化酶组成。50 ℃ 水浴条件下准确反应 15 min, 加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 2.0 mL 终止反应。过滤去固定化酶, 上清液在 420 nm 波长下测定吸光值。固定化酶活力单位(U)定义为: 在规定条件下, 每 1 min 在 420 nm 波长下, 每克(g)载体每增加 0.001 个光吸收单位所需酶量为 1 个酶活力单位 U, 用 U/g 表示。

$$\text{固定化酶活力回收} = \frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{溶液酶总活力}} \times 100\%$$

1.2.6 蛋白质质量浓度的测定方法 按 Bradford 法^[10], 并以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.7 戊二醛溶液的浓度对酶固定化效果的影响

称取壳聚糖凝胶 5 份各 1 g, 分别加入体积分数为 0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的戊二醛溶液 0.6 mL, 常温下交联 40 min 后取出, 用 pH 7.8、0.1 mol/L 磷酸缓冲液迅速洗净, 加入 0.5 mL 酶活力为 98 U/mL, 蛋白质质量浓度为 0.295 mg/mL 的乳糖酶, 4 ℃ 条件下固定 14 h 后取出, 用缓冲液 B 洗至 280 nm 波长处无光吸收, 测定固定化酶的活力。

1.2.8 固定时间对固定化效果的影响 分别称取活化壳聚糖凝胶 5 份各 1 g, 分别加入 0.5 mL 酶活力为 151.1 U/mL, 蛋白质质量浓度为 0.593 mg/mL 的乳糖酶在 4 ℃ 左右分别固定处理 4、8、12、16、20 h 后, 用缓冲液 B 洗至 280 nm 波长处无光吸收, 测定固定化酶活力。

1.2.9 温度对酶固定化效果的影响 分别称取活化的壳聚糖凝胶 2 份各 1 g, 分别加入 0.5 mL 酶活力为 206.3 U/mL, 蛋白质质量浓度为 0.801 mg/mL 的乳糖酶, 分别于 4 ℃ 和常温下固定 8 h 后, 缓冲液 B 洗至 280 nm 波长处无光吸收, 测定固定化酶的活力。

1.2.10 pH 对酶固定化效果的影响 称取活化的壳聚糖凝胶 5 份各 1 g, 分别加入 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 酶活力为 61.6 U/mL, 蛋白质质量浓度为 0.215 mg/mL 的乳糖酶 0.5 mL, 于 4 ℃ 下固定 8 h 后, 用缓冲液 B 洗至 280 nm 波长处无光吸收, 测定固定化酶的活力。

1.2.11 给酶量对酶固定化效果的影响 称取活化的壳聚糖凝胶 5 份各 1 g, 分别加入酶活力和蛋白质质量浓度分别为 786.3 U/mL, 4.091 mg/mL; 623.7 U/mL, 3.272 mg/mL; 490.3 U/mL, 2.451 mg/mL; 291.3 U/mL, 1.636 mg/mL; 141.7 U/mL, 0.818 mg/mL 的乳糖酶 0.5 mL, 于 4 ℃ 下固定 8 h, 用缓冲液 B 洗至 280 nm 波长处无光吸收, 测定固定化酶的活力。给酶量

$(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \text{酶蛋白质质量}(\text{mg}) / \text{载体质量}(\text{g})$.

2 结果与分析

2.1 戊二醛溶液的浓度对酶固定化效果的影响

分别用体积分数为:0.4%、0.6%、0.8%、1.0%的戊二醛溶液处理壳聚糖凝胶颗粒40 min后,制备壳聚糖凝胶固定化乳糖酶,结果(图1)表明:用体积分数为0.6%的戊二醛处理壳聚糖凝胶40 min,固定化酶的活力及活力回收达最大值,分别为60.71 U/g及61.94%,故戊二醛体积分数小于或大于0.6%,固定化酶活力及活力回收均明显下降。

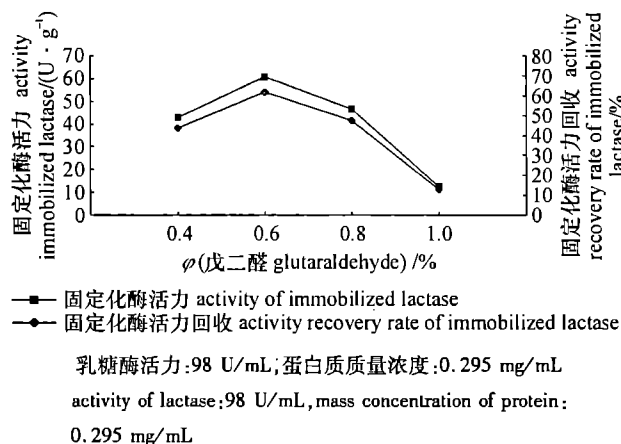


图1 戊二醛溶液的体积分数对固定化效果的影响

Fig. 1 Effects of volume fraction of glutaraldehyde on immobilized lactase

2.2 酶固定时间对固定化效果的影响

将酶活力为151.1 U/mL,蛋白质质量浓度为0.593 mg/mL的酶液分别固定4、8、12、16、20 h后,测定固定化酶活力及活力回收,结果(图2)表明:酶经过8 h交联处理,其固定化效果最佳,固定化酶的活力及活力回收分别达32.00 U/g和21.18%。超过8 h后,随时间增加固定化酶活力及活力回收均下降。故酶固定处理的最佳时间为8 h。

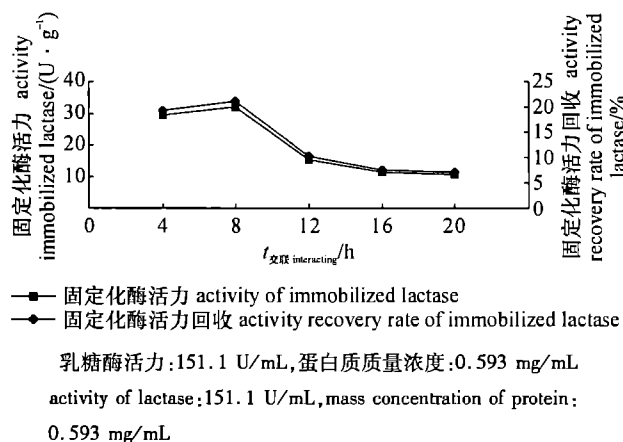


图2 酶吸附处理时间对固定化效果的影响

Fig. 2 Effects of interacting time on immobilized lactase

2.3 温度对酶固定化效果的影响

将酶液分别在4℃和常温下(20℃)固定8 h,研究温度对酶固定化效果的影响。在4℃时的固定化酶活力及活力回收为87.02 U/g、42.18%,常温下分别是79.65 U/g和38.61%。因此固定温度在4℃左右效果较好。

2.4 pH对酶固定化效果的影响

在pH值分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的条件下固定8 h后,测定其固定化酶的活力及活力回收,结果(图3)表明:固定化酶的活力及活力回收在pH 7.0时达到最高,分别是22.00 U/g和35.71%。随着酸性或碱性的增强,固定化酶活力及活力回收都在逐渐下降。

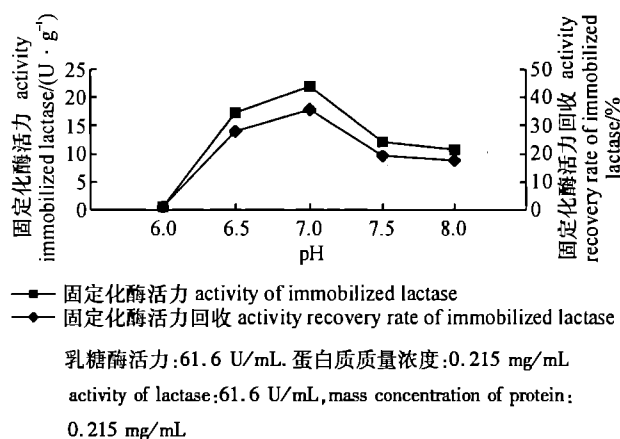


图3 pH对酶固定化效果的影响

Fig. 3 Effects of pH on immobilized lactase

2.5 给酶量对酶固定化效果的影响

给酶量分别为0.41、0.82、1.23、1.64及2.05 mg/g制备固定化酶。结果(图4)表明:随着给酶量的增加,固定化酶活力也逐渐升高,但其活力回收率却逐渐下降。生产中为了最大地降低生产成本,既要求固定化酶的活力回收率较高,而同时固定化酶的活力也要求比较高。因此,固定乳糖酶最佳给酶量是1.025 mg/g,固定化酶活力为105.33 U/g,其活力回收可达到30.1%。

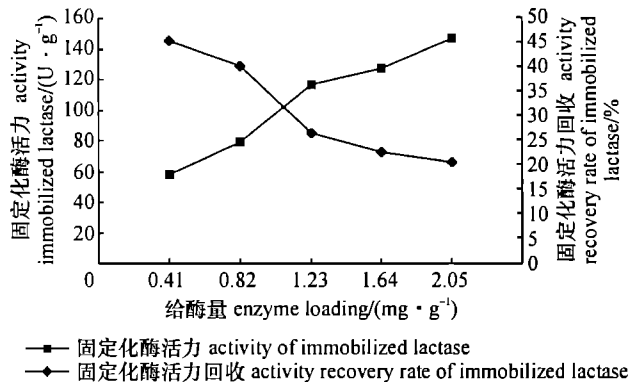


图4 给酶量对酶固定化效果的影响

Fig. 4 Effects of enzyme loading on immobilized lactase

3 讨论

一般固定化酶的活力回收达30%以上就可用于工业生产.以具有良好的吸附性能、比表面积大、安全无毒的壳聚糖凝胶为载体,采用共价键偶联法固定绿豆乳糖酶,活力回收可达30%以上;本研究结果与石墨固定化乳糖酶^[3]相比,活力回收高3%;与韩平治等^[9]用Sephadex G100固定的赤豆乳糖酶相比,活力回收虽低些,但载体来源要丰富、廉价得多.

研究发现,将壳聚糖制备成凝胶颗粒,用体积分数0.6%的戊二醛在常温下处理40 min,然后固定酶,效果最好.戊二醛体积分数低于或高于0.6%固定化酶活力及活力回收都下降,这可能是由于浓度低,偶联不充分;浓度过高,戊二醛对酶的结构有破坏作用,使酶活力下降甚至变性,从而造成固定化酶活力下降,活力回收降低.固定8 h,固定化酶活力与活力回收提高.固定时间短,则酶与壳聚糖凝胶未能充分接触、偶联,造成固定化酶活力及活力回收较低;固定时间长,则戊二醛自身缔合,导致酶与载体的多结合点,破坏酶的高级结构,影响酶的活力及活力回收.在4℃条件下比常温下固定,固定化酶活力及活力回收均较高.这可能是由于在温度高的情况下酶易失活造成的.在pH 7.0的条件下固定乳糖酶,固定化酶活力及活力回收最高.随着酸性或碱性的增强,固定化酶活力和活力回收都在逐步下降,这可能是由于在pH 7.0时,酶活力较高,戊二醛的偶联能力也较强,从而活力及活力回收最高.随着给酶量的增加,固定化酶的活力逐步增强,而活力回收却逐步下降.最佳给酶量为1.025 mg/g.当给酶量较少时,戊二醛可以将大部分酶都固定到壳聚糖凝胶上,因此活力回收率较高,而固定化酶活力则较低;当

给酶量较高时,酶量超过壳聚糖凝胶的最大固定容量,多余的酶不能固定而浪费,因而固定化酶活力回收低但固定化酶活力高.

参考文献:

- [1] 王敏,檀建新,张伟,等.乳糖酶的应用及发展现状[J].食品与发酵工业,2002,30(6):89-92.
- [2] 何梅.乳糖酶缺乏和乳糖不耐受[J].国外医学:卫生学分册,1999,26(6):339-342.
- [3] ZHOU Q Z K, CHEN Xian-dong. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde[J]. Journal of Food Engineering, 2001, 48: 69-74.
- [4] LADERO M, SANTOS A, GARCIA-OCCHOA F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 583-592.
- [5] HERNANIZ M J, CROUT D H G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 26-32.
- [6] 李红,王炜军,徐凤彩.壳聚糖微球的制备及其固定化木瓜蛋白酶的研究[J].华南农业大学学报,2000,21(2):49-53.
- [7] 张红艳,刘成更,赵文娟,等.乳糖酶的酶学特性及研究进展[J].食品研究与开发,2004,25(6):34-36.
- [8] 谭树华,高捷,海迪勒,等.酵母菌乳糖酶中试剂制备工艺研究[J].药物生物技术,2003,10(5):292-295.
- [9] 韩平治,丁进芳,孟延发.赤豆 β -半乳糖苷酶固定化及其性质研究[J].甘肃科学学报,2001,13(1):59-51.
- [10] BRADFORD 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): 248-254.

【责任编辑 柴 焰】