

固定化黑曲霉 β -葡萄糖苷酶制备染料木素活性苷元的研究

Study on Isoflavone Active Aglycone Preparation by Immobilized β -glucosidase from *Aspergillus niger*

潘利华, 罗建平*, 姜绍通

PAN Li-Hua, LUO Jian-Ping* and JIANG Shao-Tong

合肥工业大学生物与食品工程学院生物工程系, 合肥 230009

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

摘 要 比较了以海藻酸钠为载体, 用胶囊法、包埋-交联法、交联-包埋法三种不同方法固定化黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的效果, 并研究了最佳固定化方法的固定化条件和固定化酶的部分性质。结果表明, 交联-包埋法即 β -葡萄糖苷酶与 0.20% 戊二醛交联后再用 2.0% 海藻酸钠包埋的固定化方法中酶结合效率和酶活力回收率最高。海藻酸钠浓度和戊二醛浓度对酶结合效率影响较大, 戊二醛浓度和包埋颗粒直径大小对酶活力回收率影响显著。与游离酶相比, 制备的固定化酶最适温度、最适 pH 值和 K_m 值分别由 50°C、4.5 和 2.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下降到 40°C、4.0 和 2.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。固定化酶具有更强的耐酸性和稳定性。该固定化酶用于大豆异黄酮活性苷元染料木素的合成, 重复使用 6 次后, 固定化酶的活力仍保持 84.94%, 染料木苷转化率为 56.04%。

关键词 β -葡萄糖苷酶, 海藻酸钠, 固定化酶, 黑曲霉, 大豆异黄酮, 活性苷元

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1060-05

Abstract With sodium alginate as a carrier and glutaraldehyde as the crosslinking agent, an improved immobilization method of β -glucosidase for production of soybean genistein was developed. As compared with entrapment or entrapment-crosslinkage, crosslinkage-entrapment that β -glucosidase was treated with glutaraldehyde and then entrapped in sodium alginate remained high loading efficiency and activity recovery. Effects of bead sizes, concentrations of alginate and glutaraldehyde as well, on the loading efficiency and activity recovery were assessed. When compared with the free enzyme, the optimum temperature, pH value and K_m of the immobilized β -glucosidase were respectively shifted from 50°C to 40°C, 4.5 to 4.0 and 2.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 2.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The stabilities of the immobilized β -glucosidase were considerably better than that of the native enzyme. The immobilized β -glucosidase was employed to genistein production, 84.94% of the activity and 56.04% of conversion were kept after consecutive use of 6 times.

Key words β -glucosidase, sodium alginate, immobilized enzyme, *Aspergillus niger*, soybean isoflavone, active aglycone

染料木素具有防治癌症(乳腺癌、前列腺癌等)和防护心血管系统, 防止骨质疏松等多种药理作用及生物活性^[1], 是非常有前途的保健品和药品。但

是染料木素活性苷元含量极低^[2], 主要以不具活性的染料木苷糖苷形式存在。目前, 转化染料木苷糖苷为活性苷元的方法主要有酸水解法和酶水解法。

Received: January 23, 2007; Accepted: March 29, 2007.

This work was supported by the grants from the Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 050410301), and the Science and Technology Development Foundation of Hefei University of Technology (No. 053001F).

* Corresponding author. E-mail: jianpingluo1966@yahoo.com.cn

安徽省自然科学基金项目(No. 050410301), 合肥工业大学科学发展基金(No. 053001F)项目(No. 053001F)研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

酸水解法存在要求温度高,反应缺乏专一性,对环境产生污染等缺陷。酶水解法是用 β -葡萄糖苷酶水解染料木苷的 β -糖苷键生成染料木素活性苷元^[3],水解反应具有 β -糖苷键专一性,条件温和,效率高,活性苷元结构稳定。因此,酶水解法制备染料木素是生产染料木素活性苷元的潜在方向。本研究对黑曲霉 β -葡萄糖苷酶催化染料木苷合成染料木素活性苷元进行了尝试。

固定化酶不仅保持酶催化高效和专一的特点,而且有利于酶的重复使用和产品的纯化。酶的固定化常采用吸附、包埋、结合和交联等方法。关于 β -葡萄糖苷酶的固定化已有许多报道^[4-8],但存在制备价格昂贵,酶活力回收率低,酶的失活严重和渗漏等不利影响。本文探讨了将 β -葡萄糖苷酶交联后再包埋的固定化方法,该固定化方法既防止了酶的渗漏,又克服了交联酶不易与产物分离的缺陷。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:染料木苷和染料木素(色谱纯,上海同田生化技术有限公司)。

1.1.2 菌种:黑曲霉 M85(*Aspergillus niger*),购于上海工业微生物研究所。

1.2 β -葡萄糖苷酶的制备

黑曲霉 M85 经 PDA 斜面活化、液体种子培养基中扩培后转入 5L 发酵罐中发酵 72h。发酵罐操作体积 3.0L,温度 30℃,搅拌转速 300r/min,通气量 3L/min。取发酵液,12 000r/min 离心 15 min,得上清即粗酶液,进行粗酶液的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀,收集 35%~80% 饱和度沉淀物;取沉淀溶于 0.1mol/L, pH5.0 的醋酸缓冲液中,4℃ 冰箱透析过夜,即可用于酶的固定化。

1.3 β -葡萄糖苷酶的固定化

参考文献 8-10 进行,稍有改动,并根据各试验需要,选择各自所需海藻酸钠、 CaCl_2 、戊二醛浓度以及包埋颗粒的直径大小。

1.3.1 胶囊法制备固定化 β -葡萄糖苷酶:20mL 酶液、0.32g CaCl_2 、60mL 醋酸缓冲液(0.1mol/L, pH5.0,下同)充分混匀后分成 4 等份,用注射器逐滴分别加到 100mL 海藻酸钠溶液(1%~4%, W/V)中制成胶囊。向海藻酸钠溶液中加入 100mL 蒸馏水,过滤,收集胶囊;胶囊在 0.4% CaCl_2 溶液中硬化 1h 后取出,醋酸缓冲液冲洗直至洗液中无蛋白质析出。将

冲洗后的胶囊置甘油中 4℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 包埋-交联法制备固定化 β -葡萄糖苷酶:20mL 酶液与 60mL 醋酸缓冲液充分混匀后分成 4 等份,分别加入适量海藻酸钠使海藻酸钠浓度为 1%、2%、3%、4%,混匀,用注射器逐滴加到 0.4% CaCl_2 溶液制成小球,并在其中硬化 1h 后取出,置 30mL 0.2% 戊醛溶液交联 2h 后取出,冲洗后甘油处理、保存(方法同 1.3.1)。

1.3.3 交联-包埋法制备固定化 β -葡萄糖苷酶:20mL 酶液与 110 μL 36% 戊二醛溶液混合、交联 2h 后,分成 4 等份,分别加入 15mL 海藻酸钠溶液(1.3%、2.7%、4%、5.3%, W/V),混匀,用注射器逐滴加到 0.4% CaCl_2 溶液制成小球,并在其中硬化 1h 后取出,冲洗后甘油处理、保存(方法同 1.3.1)。

1.4 固定化酶最适反应温度、最适反应 pH、热稳定性、pH 稳定性和 K_m 的测定

参考文献 11 进行。

1.5 固定化酶转化制备大豆异黄酮活性苷元染料木素

10mL 醋酸缓冲液中加入 0.1mg 染料木苷和 5.0g 固定化 β -葡萄糖苷酶,在 45℃ 下反应 60min 后取样测定染料木苷转化率。每次反应后,将固定化酶过滤,洗涤后重复使用,共进行 6 次转化反应。

1.6 分析方法

1.6.1 染料木素的检测:HPLC 法,参考文献 12 进行。

1.6.2 蛋白质含量的测定:采用 Bradford 法,以牛血清白蛋白为标准^[13]。

1.6.3 酶活力的测定:

游离酶活力的测定:含 0.2mL 酶液、0.2mL 染料木苷以及 0.6mL 醋酸缓冲溶液的反应体系(pH5.0),于 45℃ 反应 30 min 后,测定染料木素含量。

固定化酶活力的测定:含 0.5g 固定化酶、0.2mL 染料木苷以及 0.8mL 醋酸缓冲溶液的反应体系(pH5.0),于 45℃ 反应 30 min 后,测定染料木素含量。

酶活力的定义为在上述测定条件下释放出 1 μg 染料木素所需的酶量为一个酶活力单位(u)。

酶活力回收率/% = $\frac{\text{固定化酶总活力}}{\text{用于固定化的总酶活力}} \times 100\%$

酶结合效率/% = $\frac{\text{加入的总酶活力} - \text{未结合的酶活力}}{\text{加入的总酶活力}}$

2 结果与分析

2.1 β -葡萄糖苷酶固定化方法的比较

三种不同固定化方法对 β -葡萄糖苷酶的固定化效果见表 1。表 1 结果显示,三种固定化方法中海藻酸钠浓度对酶结合效率的影响不大,但是,交联-包埋固定化法中海藻酸钠浓度对酶活力回收率有一定的影响,可能是因为酶构象的改变或底物扩散限制所致。交联-包埋法中酶结合效率和酶活力回收率最大即固定化效果最佳,其次是包埋-交联法,其次是胶囊法,这可能与酶的渗漏有关。酶经戊二醛交联后,大多数酶分子连接在一起,因此,从海藻酸钙凝胶中渗漏的酶就少,进而提高了酶结合效率。因此,以下选择交联-包埋法固定化 β -葡萄糖苷酶。

表 1 不同固定化方法对 β -葡萄糖苷酶固定化效果的影响

Table 1 Effect of different immobilized methods on β -glucosidase immobilization

Immobilized methods	Alginate concentration/%	Loading efficiency/%	Activity recovery/%
Encapsulation	1	37.6 ± 2.3	22.5 ± 3.4
	2	38.1 ± 1.8	26.5 ± 2.9
	3	38.4 ± 2.0	25.8 ± 1.8
	4	39.3 ± 1.6	27.1 ± 4.2
Entrapment-crosslinking	1	55.7 ± 2.8	30.5 ± 2.4
	2	59.8 ± 4.1	33.9 ± 2.1
	3	62.2 ± 2.5	34.8 ± 1.7
	4	54.6 ± 3.6	36.2 ± 1.9
Crosslinking-entrapment	1	73.8 ± 1.8	66.1 ± 4.1
	2	75.5 ± 3.4	65.5 ± 3.5
	3	74.4 ± 2.7	55.3 ± 2.6
	4	68.3 ± 3.1	54.9 ± 2.6

Note: CaCl_2 concentration, 0.4%; glutaraldehyde concentration, 0.2%; bead size, 3 ± 0.2mm.

2.2 交联-包埋法固定化 β -葡萄糖苷酶的条件优化

2.2.1 CaCl_2 浓度的影响: Ca^{2+} 可能影响凝胶网格的大小和酶的活力,因此,试验了 CaCl_2 溶液的浓度对 β -葡萄糖苷酶固定化的影响。图 1 结果显示, CaCl_2 浓度对酶结合效率和酶活力回收率影响不显著。

2.2.2 戊二醛浓度的影响: 戊二醛作为交联剂含有 2 个醛基,能够与酶分子之间形成共价键,得到三维交联的网状结构。戊二醛浓度对固定化酶的影响见图 2。酶结合效率随着戊二醛浓度的增加而增大,酶活力回收率却随之减小。戊二醛是双功能交联剂,但是,浓度增大后也会成为变性剂。

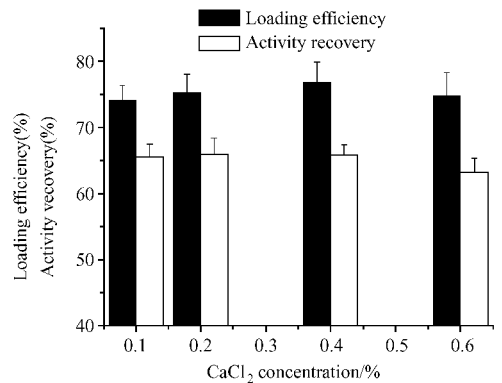


图 1 CaCl_2 浓度对 β -葡萄糖苷酶固定化的影响

Fig.1 Effect of CaCl_2 concentration on the β -glucosidase immobilization. Alginate concentration = 2%, glutaraldehyde concentration = 0.2%, bead size = 3mm ± 0.2mm.

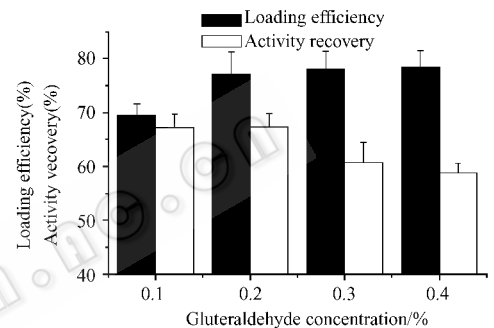


图 2 戊二醛浓度对 β -葡萄糖苷酶固定化的影响

Fig.2 Effect of glutaraldehyde concentration on the β -glucosidase immobilization

Alginate concentration = 2%, CaCl_2 concentration = 0.4%, bead size = 3mm ± 0.2mm.

2.2.3 包埋颗粒直径的影响: 在固定化酶反应体系中,因为包埋颗粒直径的大小可能影响传质过程而影响固定化酶活力,因此考察了包埋颗粒直径对 β -葡萄糖苷酶固定化的影响,结果见图 3。结果表明,包埋颗粒直径的大小对酶结合效率影响不大,对酶活力回收率却随着包埋颗粒直径的增大而减小,这

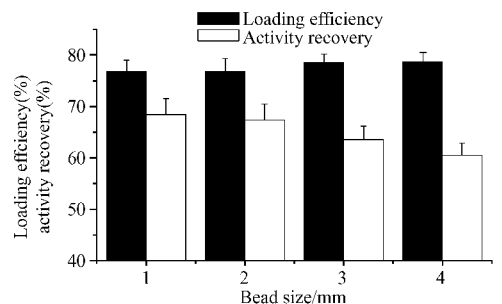


图 3 包埋颗粒直径对 β -葡萄糖苷酶固定化的影响

Fig.3 Bead size on the β -glucosidase immobilization. Alginate concentration = 2%, CaCl_2 concentration = 0.4%, glutaraldehyde concentration = 0.2%.

定化中也有报道^[14]。

2.3 固定化酶的部分理化性质

2.3.1 固定化酶反应的最适温度及热稳定性 温度(30~70℃)对固定化 β -葡萄糖苷酶的活性和稳定性的影响如图4所示。固定化酶的最适温度为40℃,游离酶的最适温度50℃。当温度高于50℃时,固定化酶和游离酶的活力随着温度增高而快速降低。这可能是因为高温破坏了苷元的结构,从而影响了酶活。与游离酶相比, β -葡萄糖苷酶固定化后,增强了对热的抵抗能力。

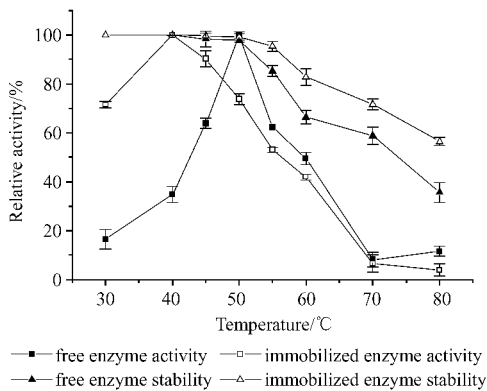


图4 温度对固定化酶及游离酶活性和稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on immobilized and free β -glucosidase activities and their stability

2.3.2 固定化酶反应的最适 pH 和 pH 稳定性 试验过程中发现,固定化酶在碱性环境中机械强度差,故只试验了 pH3.0~6.5 对固定化 β -葡萄糖苷酶的活性及稳定性的影响(图5)。图5结果显示,固定化酶的最适 pH 为 4.0,比游离酶的最适 pH 减少了 0.5 个 pH 单位;同时固定化酶对酸碱的耐性有所提高。

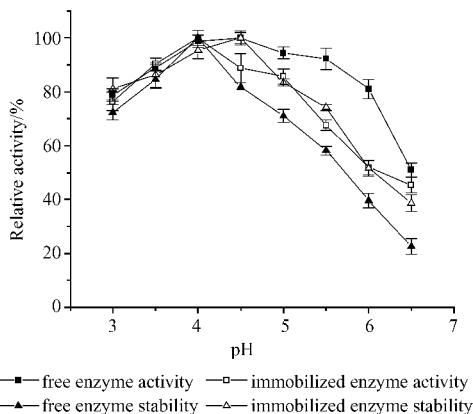


图5 pH 对固定化酶及游离酶活性和稳定性的影响

Fig.5 Effect of pH on immobilized and free β -glucosidase activities and their stability

2.3.3 米氏常数 K_m 取不同浓度染料木苷,分别加

入固定化酶和游离酶,于各自最适温度、最适 pH 条件下测定两种酶水解染料木苷的反应初速度,根据酶催化底物的 $v-v[S]$ 关系,通过 Eadie-Hofstee 作图法得固定化酶和游离酶的米氏常数 K_m 分别为 2.02 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.57 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.4 固定化酶的储存稳定性 将固定化酶于 4℃ 和室温保存,定时取样,测定固定化酶的酶活。结果显示,室温保存时,固定化酶活力随着保存时间的延长而逐渐降低,贮存至 25 d 相对酶活为 73.1%。4℃ 保存时,固定化酶活力损失不明显,贮存至 25 d 相对酶活为 90.1%。

2.3.5 固定化酶的操作稳定性 以固定化 β -葡萄糖苷酶为催化剂,考察固定化酶催化染料木苷合成染料木素活性苷元的操作稳定性,结果见图6。图6结果表明,在试验条件下,该固定化酶催化染料木苷糖苷合成染料木素活性苷元的转化率为 66.40%,经过重复 6 次使用后转化率为 56.04%。将合成染料木素活性苷元的转化率转化为酶活力,相当于经 6 次重复使用后,该固定化酶仍保持有 84.94% 的催化活性,进一步说明该固定化酶具有较好的稳定性。

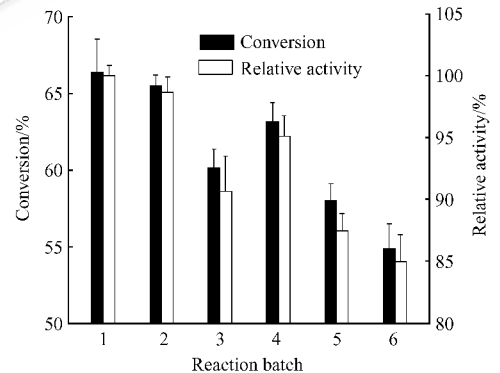


图6 固定化酶的操作稳定性

Fig.6 Operation stability of immobilized β -glucosidase

3 讨论

β -葡萄糖苷酶产生菌中,黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶和酶活力较一般菌株高,而且营养需求简单,不产生毒素;同时,黑曲霉 β -葡萄糖苷酶为胞外酶,制备简单,对底物专一性较差。因此,黑曲霉 β -葡萄糖苷酶具有较广泛的应用范围。将黑曲霉 β -葡萄糖苷酶固定化以生产高价值的大豆异黄酮活性苷元染料木素,不仅能提高酶的利用率,而且对大豆深加工具有重大现实意义。本研究中的黑曲霉 β -葡萄糖苷酶能够水解大豆异黄酮糖苷键,将其固定化后用于活性苷元染料木素的合成,重复使用 6 次后,固定化酶活

力仍保持 84.94% ,染料木苷转化率 56.04%。为使该方法具有工业应用价值,扩大试验将有待于进一步完善。

随着研究的深入,多种固定化载体被用于 β -葡萄糖苷酶的固定化。但是,许多载体都有存在一些不尽人意的地方。pH 两性载体 Eudragit S-100 和纳米碳管制备费用高, Duolite A-568 树脂等树脂因为制备过程中可能会有有害物质残留而不允许在药品等特殊行业中使用,丝素膜因载体膜的屏障作用酶活力回收率仅为 56.3%。海藻酸钠因其安全无毒,价廉易得,固定化方法简单,条件温和,酶活力损失小而成为较为理想的固定化载体。海藻酸钠固定化是通过其与钙、钡等多价金属离子交联成网状凝胶将酶和细胞进行包埋,因此,有些酶和细胞会从网格中渗漏出来,造成酶/细胞结合效率低^[15]。为减少酶失活和渗漏,除了优化固定化条件外,也有学者在海藻酸钙凝胶外在包一层壳聚糖外衣^[16]。本研究将 β -葡萄糖苷酶用 0.2% 戊二醛交联后,再进行海藻酸钙包埋以减少酶渗漏。结果表明,酶结合效率和酶活力回收率都大大提高了,酶结合效率比 busto MD 等^[17]用海藻酸钙直接包埋法高 15% ~ 25%。究其原因,本研究所用的黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的分子量相对较小(约 102kD),不交联时容易渗出,戊二醛交联后,酶分子聚集,减少了蛋白质渗漏现象。因此,通过固定化条件的优化,交联-包埋法有效防止了酶的泄露,高效地固定化了黑曲霉 β -葡萄糖苷酶,提高了酶的稳定性和利用率。

酶经固定化后,最适反应温度、pH 以及对热、pH 的稳定性酶学性质通常会发生较大的改变,有些变化对工业生产是非常有利的。 β -葡萄糖苷酶固定化后,最适反应温度从 50℃ 转变为 40℃,最适 pH 从 4.5 变为 4.0,对热和 pH 的耐性都有所提高。这对其在酸性环境催化合成热敏性产品是有利的。固定化酶学性质的改变,可能是因为海藻酸盐中的甘露糖醛容易离子化,导致 H^+ 在凝胶内部微环境和外环境不同,从而影响了酶的催化特性^[9]。

REFERENCES (参考文献)

[1] Sun Q(孙群), Kan JQ(阚建全), Zhao GH(赵国华), et al. Research progress of genistein. *Journal of Cereals & Oils(粮食与油脂)* 2003, **93**(2): 44 - 46.

- [2] Wang ZM(王兆梅), Li L(李琳), Guo SY(郭祀元), et al. Analysis for the structure and activity of soybean isoflavones. *Natural Product Research and Development(天然产物研究与开发)* 2002, **14**(3): 70 - 74.
- [3] Hsieh MC, Graham TL. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 2001, **58**: 955 - 1005.
- [4] Matthijs G, Schacht E. Comparative study of methodologies for obtaining β -glucosidase immobilized on dextran-modified silica. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **19**: 601 - 605.
- [5] Sardar JMM, Agarwal R, Kumar A, et al. Noncovalent immobilized of enzymes on an entric polymer Eudragit S-100. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, **20**: 361 - 367.
- [6] Gomez, Romero MD, Fernandez TM. Immobilized of β -glucosidase on carbon nanotube. *Catalysis Letters*, 2005, **101**(3 ~ 4): 275 - 278.
- [7] Zhang ZZ(张正竹), Li YB(李英波), Su EZ(苏二正), et al. Immobilization of β -glucosidase on silk fibroin membrane. *Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)* 2004, **30**(6): 6 - 9.
- [8] Ortega N, Busto MD, Mateos MP. Optimization of β -glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gels. *Bioresource Technology*, 1998, **64**: 105 - 111.
- [9] Catana R, Ferreira BS, Cabral JMS, Fernandes P. immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis. *Food Chemistry*, 2005, **91**: 517 - 520.
- [10] Tanriseven A, Dogan S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 2001, **36**: 1081 - 1083.
- [11] Chen N(陈宁). *Enzyme Engineering*. Beijing: China Light Industry Press, 2005.
- [12] Luo JR(罗建平), Shen GX(沈国栋), Jiang ST(姜绍通). Study on extraction and hepatoprotective function of isoflavones from callus cultures of *Maackia amurensis*. *Food Science(食品科学)* 2003, **24**(10): 139 - 142.
- [13] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248 - 254.
- [14] Fadnavis NW, Sheelu G, Kumar BM, Bhalerao MU, Deshpande AA. Gelation blends with alginate: gel for lipase immobilization and purification. *Biotechnology Progress*, 2003, **19**: 557 - 564.
- [15] Blandino A, Macias M, Cantero D. Glucose oxidase from calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **27**: 319 - 324.
- [16] Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 2004, **25**: 1937 - 1945.
- [17] Busto MD, Ortega N, Mateos MP. Study on microbial β -D-glucosidase immobilized in alginate gel beads. *Process biochemistry*, 1995, **30**: 421 - 426.