

毛加宁,杨莹,农向. 改性壳聚糖的性质及对纤维素酶的固定效果[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):160-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.045

改性壳聚糖的性质及对纤维素酶的固定效果

毛加宁,杨莹,农向

(乐山师范学院生命科学学院,四川乐山 614000)

摘要:采用改性壳聚糖作为载体研究改性壳聚糖作为固定化材料对纤维素酶吸附大小的影响。结果表明,当交联剂浓度达到4%时对改性固定化酶活性影响最大,改性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值为 4.3,改性壳聚糖作为载体的固定化纤维素酶米氏常数为 3.7×10^{-3} ,未改性壳聚糖为载体的固定化纤维素酶的米氏常数为 7.2×10^{-3} ,用改性壳聚糖作为载体的固定化纤维素酶最适温度为 55 ℃ 左右。结果表明,改性壳聚糖作为载体固定化纤维素酶可以提高游离酶的性质。

关键词:纤维素酶;壳聚糖;固定化;改性

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0160-04

纤维素作为地球上最丰富的可再生资源,具有广阔的开发利用前景,以纤维素酶为固化对象,通过试验比较化学改性与未改性壳聚糖固化酶载体,探索固化酶的制备方法与性质,旨在研究固化酶的最适条件,从而改善传统意义壳聚糖固定化纤维素酶的相关研究。甲壳类动物废弃的外壳中可以提取一种多糖——壳聚糖,学名为 2-氨基-1,4-β 葡聚糖,含有极其丰富的甲壳素(chitin)。壳聚糖的结构与纤维素类似,也是至今为止在自然界中被发现的唯一的阳离子型可食用纤维,对疾病有很好的保健和预防作用^[1-4]。由于分子中存在氨基,使其易于酶共价结合,也可络合金属离子,化学性质较稳定,耐热性好,经常作为固定化酶的载体^[5-8]。本试验通过采用化学方法改性壳聚糖固定化纤维素酶,改变壳聚糖的某些分子结构,探索相比未改性壳聚糖分子更优化的性质。

本研究采用简单的化学方法对壳聚糖进行了改性,并采用拉曼光谱和 X 光衍射分别测定了改性壳聚糖的部分性质。最后,研究了改性壳聚糖固定化纤维素酶的效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

纤维素酶,壳聚糖,氨基硫脲-壳聚糖改性产物,3,5-二

硝基水杨酸染色液,羧甲基纤维素钠盐溶液,其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 纤维素酶液的制备 取 1 g 纤维素酶,加入 1 000 mL 蒸馏水,充分搅拌直至全部溶解,得纤维素酶液,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 羧甲基纤维素钠盐溶液的配制 准确称取 1.00 g 羧甲基纤维素钠,用 50 mmol/L、pH 值为 5.0 的柠檬酸钠缓冲液加热溶解后,转移到 100 mL 容量瓶中,待冷却后,用该缓冲液定容至刻度,4 ℃ 保存备用。母液 A(0.2 mol/L 柠檬酸溶液):称取 42.03 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 溶解稀释至 1 000 mL;母液 B(0.2 mol/L 柠檬酸钠溶液):称取 58.82 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 溶解稀释至 1 000 mL;取 20.5 mL 母液 A 和 29.5 mL 母液 B 混合,调节 pH 值至 5.0,稀释至 200 mL,即得 50 mmol/L、pH 值为 5.0 的柠檬酸钠缓冲液。

1.2.3 固定化酶活性测定 在一定量固定化酶中(一般取 0.1~0.5 g)加入一定量(一般为 3.0 mL)羧甲基纤维素钠盐溶液,40 ℃ 水浴保温 10 min 后离心 5 min,吸取反应液 2.0 mL,加入 0.4 mL 2 mol/L NaOH 溶液,加入 0.8 mL 3,5-二硝基水杨酸显色剂,定容至 6.2 mL,沸水浴中加热 5 min 后流水冷却,在最适条件(40 ℃)下,1 min 内催化 1 μmol 底物转化为产物所需的酶量定为 1 个活性单位,用 721 分光光度计在 490 nm 处测定吸光度^[5]。

1.2.4 壳聚糖改性产物的制备 壳聚糖乙酸溶液的制备^[1]:将 1 g 壳聚糖在 100 mL 蒸馏水中浸泡润湿 15 min,然后加入 40 mL 2.5% 的乙酸溶液,充分搅拌使其溶解,即得到壳聚糖乙酸溶液。

收稿日期:2016-09-12

基金项目:四川省乐山市科技计划(编号:13SZD136)。

作者简介:毛加宁(1961—),男,四川乐山人,副教授,主要从事生物学科教学论、生物化学等相关研究。E-mail: mjn2605700@163.com。

通信作者:农向,博士,副教授,主要从事生物化学、病虫害防控等相关研究。E-mail: nongx2008@163.com。

[J]. 热带作物学报,2011,32(6):1172-1175.

[10] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京:中国农业出版社,2007.

[11] 余书平,尹军峰,袁海波,等. 小叶种红茶发酵外观色差及其主要品质成分相关性[J]. 食品安全质量检测学报,2015(6):2201-2208.

[12] 段红星,邵宛芳. 红茶加工中物质变化与品质形成的关系[J].

福建茶叶,2004(2):13-14.

[13] 刘仲华,黄建安,施兆鹏,等. 红茶制造中过氧化物酶变化的研究[J]. 湖南农学院学报,1990,16(2):169-175.

[14] Muthumani T, Kumar R. Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea[J]. Food Chemistry,2007,101(1):98-102.

壳聚糖改性吸附剂的制备:称取 3 g 氨基硫脲置于 250 mL 烧杯中,加入 100 mL 蒸馏水,加热搅拌至 50 ℃ 时,逐滴加入 6 mL 25% 的戊二醛溶液,并充分反应 45 min。加入配制好的壳聚糖乙酸溶液,加热至 70 ℃,充分反应 30 min 后,取出反应物,流水冷却,再分 3 次加入 80 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液,搅拌充分后,抽滤,用蒸馏水洗涤产物至滤液 pH 值为 7.0,再用乙酸乙酯、无水乙醇分别洗涤后,放入真空干燥箱于 60 ℃ 下至质量不再变化,最终获得淡黄色固体粉末状壳聚糖改性产物。

1.2.5 纤维素酶的固定化 称取 2 g 改性壳聚糖,加入 100 mL 6% 的戊二醛,充分搅拌 3.5 h 直至溶解,静置 24 h,3 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液,水洗 2~3 次以除去残余戊二醛,抽滤,往交联后的壳聚糖中加入 1 g 纤维素酶,室温下继续搅拌 2.5 h,转入冰箱于 4 ℃ 保存备用。静置 24 h,3 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液,水洗 2~3 次,抽滤即得改性固定化酶;称取一定量的未改性壳聚糖作以上同样的处理,即得未改性固定化酶。

1.2.6 酶活性的测定 葡萄糖含量的测定用 3,5 - 二硝基水杨酸法,并作如下修改:1 mg/mL 标准葡萄糖水溶液,浓度梯度终体积为 4 mL,加入 1 mL 3,5 - 二硝基水杨酸准确煮沸 5 min,流水冷却后于 520 nm 处比色,利用标准曲线计算产生的葡萄糖量,从而计算酶活性,以葡萄糖质量为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。最后做出的标准曲线公式为 $y = 1.935 40x - 0.062 05, r^2 = 0.996 51$ 。

2 结果与分析

2.1 拉曼光谱(Raman spectra)

拉曼光谱(Raman spectra)是一种散射光谱。拉曼光谱分析法是基于印度科学家 C. V. 拉曼(Raman)所发现的拉曼散射效应,对与入射光频率不同的散射光谱进行分析以得到分子振动、转动方面信息,并应用于分子结构研究的一种分析方法。

拉曼光谱分析技术是以拉曼效应为基础建立起来的分子结构表征技术,其信号来源于分子的振动和转动。拉曼光谱分析技术对不同的物质具有不同的特征光谱,因此可以通过光谱进行改性壳聚糖的定性分析,根据物质对光谱的吸光度的特点,可以对改性壳聚糖物质的量进行分析。

改性壳聚糖或未改性壳聚糖的拉曼光谱都产生了明显的波长变化,随着拉曼频移逐渐增大,壳聚糖的拉曼光强逐渐减小,相比未改性壳聚糖,改性壳聚糖在拉曼频移为 1 300 cm^{-1} 时,拉曼光强为 32 000 左右,而未改性壳聚糖在拉曼频移为 1 300 cm^{-1} 时,拉曼光强为 18 000 左右(图 1)。拉曼散射光的强度并不是在所有方向上相等。影响 2 种壳聚糖拉曼峰强的因素有很多,晶体材料比非晶体材料有更强的拉曼峰,拉曼强度也会随键级而增强。

2.2 X 光衍射(X-ray diffraction)

X 光衍射(X-ray diffraction),即 X 射线衍射。X 光的波长范围为 $10^{-2} \sim 10^2$ nm,与原子尺度接近。X 光绕射广泛被用来探知物质内部的微结构,利用特性 X 光入射到结晶材料,在某些入射角材料的相邻结晶面散波彼此相位相同,且光程差为波长的整数倍,因此发生了建设性干涉。根据改性壳

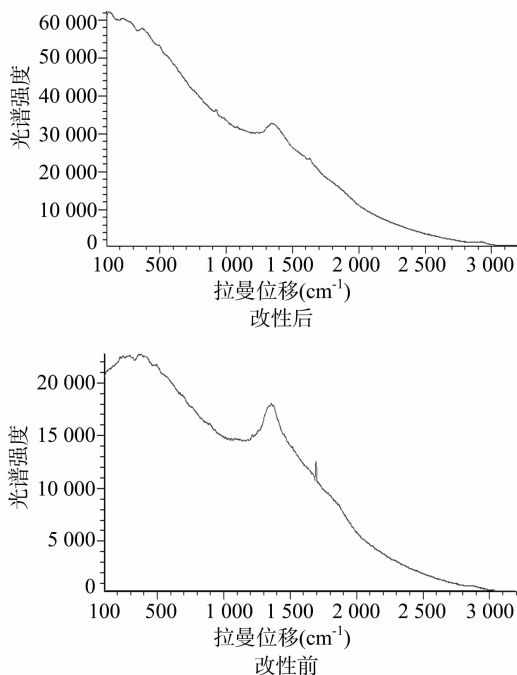


图1 改性前后壳聚糖作为载体的拉曼光谱分析

聚糖与未改性壳聚糖结晶结构的不同,有所谓的空间群(space group)的区分,即使结构相同晶体内部原子组成不同,其结构因子(structure factor)不同,对于 X 光散射能力也不同。

X 光衍射可以进行多物相成分的定性分析,壳聚糖的 2 种晶形分别称为 FormI (2θ 在 32° 左右)和 FormII (2θ 在 20° 左右),如图 2 所示,改性壳聚糖在 32° 有明显的衍射峰,表明原料壳聚糖粉末只有 FormI 一种晶体存在。当壳聚糖被改性后,改变了壳聚糖分子的结构,FormI 晶形的衍射峰从 20.0° 迁移到 32.8°,这表明伴随着壳聚糖改性,一种新的晶体逐步形成。

2.3 用不同浓度的戊二醛溶液对 2 种固定化酶活性的影响

称取 6 份 0.1 g 改性壳聚糖于小烧杯中,分别加入浓度为 1%~6% 的戊二醛溶液 5.0 mL,充分搅拌 3.5 h,置于离心机中 3 000 r/min 离心 10 min 进行分离,用蒸馏水洗涤 2~3 次以除去溶液中的戊二醛,往交联物中分别加入 4.0 mL 1 g/L 的纤维素酶溶液,置于 4 ℃ 冰箱中,1 h 搅拌 1 次,持续 24 h,3 000 r/min 离心 5 min 弃去上清液,水洗 3 次,得固定化酶。称取 6 份 0.1 g 未改性壳聚糖作同样的处理。

固定化酶活性测定结果如图 3 所示,壳聚糖改性固定化酶最适戊二醛交联浓度为 3%,未改性壳聚糖固定化酶最适戊二醛交联浓度为 4%,当戊二醛的浓度达到 3% 时,改性固定化酶的活力已达到最大。

2.4 2 种固定化酶的最适 pH 值

准确配制 pH 值为 3.6、4.0、4.4、4.8、5.2、5.6 的 HAc/NaAc 缓冲液。吸取梯度缓冲液各 1.5 mL,分别加入 1.5 mL 20% 的蔗糖溶液。与改性固定化酶反应时,先在固定化酶中加入 1 mL 蒸馏水,混匀后再将蔗糖溶液倒入纤维素酶中,30 ℃ 反应 5 min,壳聚糖固定化酶则用沸水浴反应 1 min 终止反应,4 000 r/min 离心 5 min,各管取反应液 0.5 mL,加入 3.5 mL 蒸馏水中,加入 1 mL 染色液,显色后测吸光度。结果如图 4 所示,改性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值为 4.3,而未改

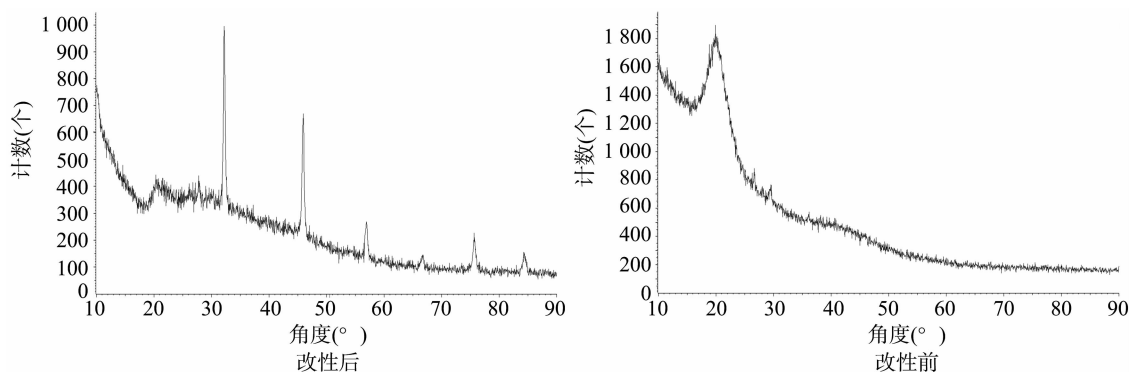


图2 改性前后壳聚糖作为载体的 X 光衍射分析

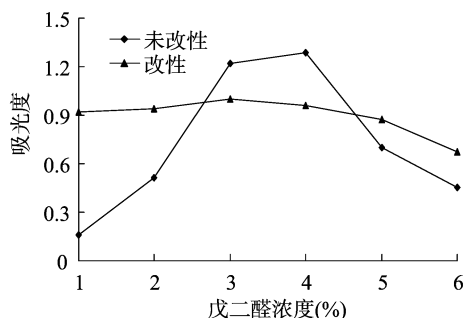


图3 不同戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

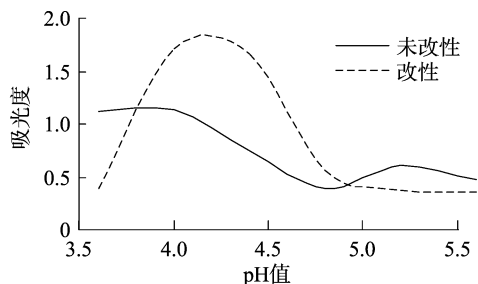


图4 改性前后壳聚糖作为载体的固定化酶的最适 pH 值比较

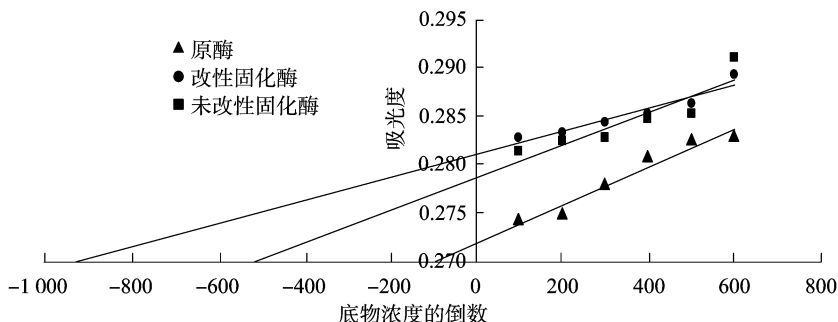


图5 改性前后壳聚糖作为载体的固定化酶米氏常数比较

2.7 改性壳聚糖、未改性壳聚糖固定化酶的稳定性

随着时间的推移,壳聚糖固定化酶的稳定性由高变低,在 12~24 h 固定化酶的稳定性普遍较好,相比未改性固定化酶,改性壳聚糖固定化酶有更好的稳定性(图 7)。

3 讨论

大多数试验中均采用壳聚糖作吸附剂、戊二醛为交联剂固定化酶^[2],但采用化学方法改性壳聚糖固定化纤维素酶,却没

性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值为 3.8。

2.5 原酶、固定化酶与改性固定化酶米氏常数的比较

平行取固定化酶与改性固定化酶各 0.1 g、原酶 0.5 mL (1 g/L) 各 6 份,分别与一定量(3.0 mL)不同浓度(1%~6%)的底物于 40℃ 水浴中反应 15 min,测其吸光度,用 Lineweaver Burk 双倒数法作图,求得米氏常数(K_m)。结果如图 5 所示,原酶的 K_m 值为 7.3×10^{-3} g/L,未改性固定化酶的 K_m 值为 7.2×10^{-3} g/L,改性固定化酶的 K_m 值为 3.7×10^{-3} g/L,壳聚糖被改性后,固定纤维素酶表现为米氏常数减小。

2.6 温度对酶活性的影响

酶在固定化后,稳定性普遍增加,这主要表现在改性固定化酶的最适温度较原酶高,对热的稳定性也较原酶高。

平行取 0.1 g 固定化酶、0.1 g 改性固定化酶和 0.5 mL 1 g/L 的原酶各 6 份,分别在不同温度(30~80℃)条件下测定酶活性。如图 6 所示,未改性固定化酶的最适温度为 40℃,之后随着温度升高,曲线趋势较陡峭,酶的活性降低;当壳聚糖被改性后,使得酶的最适温度有所提升,改性固定化酶活性的最适温度在 55℃ 左右,相比未改性固定化酶,改性固定化酶对热的稳定性有所提高。

有相关说明。通过试验改性壳聚糖,壳聚糖作为载体的性能得到了提高。

试验中发现当交联剂浓度为 4% 时,对改性固定化酶活性影响最大;改性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值为 4.3,未改性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值为 3.8;采用改性壳聚糖为载体的纤维素固定化酶的米氏常数为 3.7×10^{-3} g/L,未改性壳聚糖为载体的纤维素固定化酶的米氏常数为 7.2×10^{-3} g/L,将纤维素酶用改性壳聚糖固定后,改性固定化酶最适温度在 55℃ 左右,未

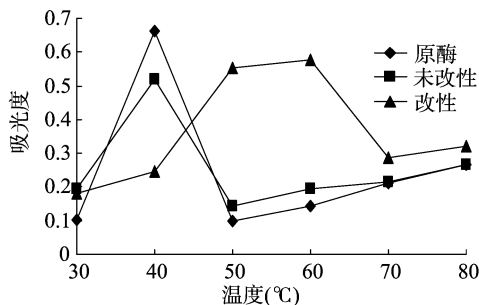


图6 改性前后壳聚糖作为载体的固定化酶最适温度

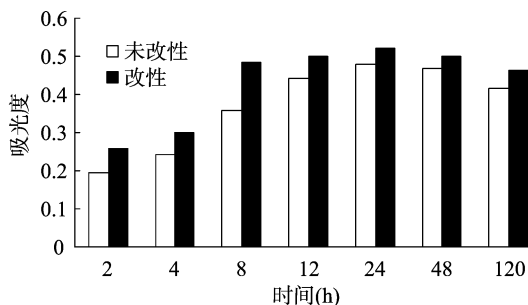


图7 改性前后壳聚糖作为载体的固定化酶稳定性比较

改性固定化酶最适温度为 40 ℃,通过试验对比改性固定化酶与未改性固定化酶发现,改性固定化酶热稳定性与贮藏稳定性更高。

壳聚糖与甲壳素作为自然界唯一的碱性多糖,来源广泛,更简单制备,对于其利用开发,对环境保护和资源开发有着一定的作用^[9-13]。通过研究发现,将壳聚糖通过化学方法改性处理后,壳聚糖的分子结构产生了变化,性质也跟改性前大不相同,在戊二醛浓度对固定化酶活性影响的试验中,改性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值高于未改性壳聚糖,固定化酶的活性也比未改性壳聚糖固定化酶的略高,在对温度的研究中,改性固定化酶比未改性固定化酶的耐受温度更高,稳定性也更强。酶的活性容易受环境条件的影响,通过固定化,正好可以将纤维素酶的活性得以保留。

参考文献:

- [1] 武娜娜. 壳聚糖改性吸附剂的制备及其在重金属污染的污水和土壤处理中的应用[D]. 广州:华南理工大学,2014.
- [2] 农 向,胥成浩,伍 红. 交联改性前后壳聚糖的纤维素酶固定效率研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(2):424-425.
- [3] Jones P O, Vasudevan P T. Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase[J]. Biotechnology Letters,2010,32(1):103-106.
- [4] Sohel D, Aparna S, Nath G M. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities[J]. Chemistry Central Journal,2007,1(1):1-5.
- [5] 农 向. 瑞氏木霉 QM9414 产纤维素酶的研究[D]. 成都:西南民族大学,2006.
- [6] Panagiotou G, Olsson L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates[J]. Biotechnology & Bioengineering,2007,96(2):250-258.
- [7] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology,2005,96(6):673-686.
- [8] 张 强. 用壳聚糖固定化纤维素酶的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2005.
- [9] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 自然科学进展,2003,13(1):21-29.
- [10] 杨永彬,黄谚谚,林跃鑫. 纤维素酶的结构及分子多样性[J]. 生命的化学,2004,24(3):21.
- [11] Saville B A, Khavkine M, Seetharam G, et al. Characterization and performance of immobilized amylase and cellulase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2004,116(1):251-259.
- [12] Zhang J, Yan H, Yang T, et al. Removal of dicofol from water by immobilized cellulase and its reaction kinetics[J]. Journal of Environmental Management,2011,92(1):53-58.
- [13] Zhang Y H, Ding S Y, Mielenz J R, et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions[J]. Biotechnology & Bioengineering,2007,97(2):214-223.
- [14] 张江荣,杨 军,董文明. 食品中粗脂肪测定方法的改进研究[J]. 现代农业科技,2013(3):333-334.
- [15] 聂国兴,王俊丽,肖 竞. 两种粗脂肪测定方法的比较研究[J]. 河南畜牧兽医,2001,22(7):7-8.
- [16] 方 敏,丁小霞,李培武,等. 索氏抽提测定含油量的方法改良及其应用[J]. 中国油料学报,2012,34(2):210-214.
- [17] 李正强,郭贵敏,杨顺国,等. 高产高油花生新品种黔花生4号的选育[J]. 湖北农业科学,2008,47(1):31-32.
- [18] 任志秋,孙淑华,乐也国. 测定大豆粗脂肪含量方法 SZC-C 型脂肪测定仪[J]. 黑龙江粮食,2003(5):36-37.

(上接第 156 页)

- [9] 严映德,周荣亮. 油菜籽含油量(索氏)测定试样处理方法的改进[J]. 粮油仓储科技通讯,1992(5):39-40.
- [10] 罗有文,刘俊栋,周红蕾,等. 脂肪测定教学中的影响因素及改进方法[J]. 现代农业科技,2014(23):340,343.
- [11] 魏 红,钟红舰,江 红. 索氏抽提法测定粗脂肪含量的改进[J]. 中国油脂,2004,29(6):52-54.
- [12] 王玉玲,丁淑芬. 索氏抽提法测定粗脂肪含量方法的探讨[J]. 粮食加工,2014,39(5):76-77.
- [13] 钟艳梅,曾宪录. 食品脂肪测定方法的改进[J]. 广东化工,2008,35(6):130-131.