

分类号

密级

# 硕士学位论文

题

目：黄原胶对酶制剂耐热性的影响  
及其在酶制剂中的应用

英文并列题目：

Effect of Xanthan Gum on Enzyme

Thermostability and Its Application in Enzyme

研究生：

薛正莲

专业：

发酵工程

研究方向：

微生物多糖应用与开发

导

师：

赵光鳌副教授

学位授予日期：

94

年

月

无锡轻工业学院

地址：无锡市青山湾

年 月 日

## 摘要

黄原胶能提高AS 3.4309糖化酶、枯草杆菌BF-7658  $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性。0.2%黄原胶的糖化酶液65℃处理2小时,残余酶活比对照相对增加63.9%。0.2%黄原胶的 $\alpha$ -淀粉酶液75℃处理7分钟,残余酶活为25.8%,而对照几乎完全失活。黄原胶与某些金属离子协同作用可得到更好的热稳定效果。

用黄原胶作为主要添加剂,用酒精沉淀法制备固体糖化酶和 $\alpha$ -淀粉酶,可使它们的酶活收率分别提高8~9%,6%左右;喷雾干燥法可使糖化酶酶活收率增加7%左右, $\alpha$ -淀粉酶酶活收率增加5%左右。

加黄原胶制得酶粉的最适作用温度、最适作用pH、pH稳定性及应用性质基本与对照酶相同,而米氏常数 $K_m$ 值变小。

在相同热处理条件下(部分热失活),对照和加胶 $\alpha$ -淀粉酶的残余酶活不同,紫外差光谱和荧光光谱也不同,表明在部分失活过程中,它们的构象变化程度是不同的。

关键词:多糖,黄原胶,热稳定性

AS 3.4309糖化酶,枯草杆菌BF-7658  $\alpha$ -淀粉酶

### Abstract

Xanthan gum(XG) can improve the thermostability of *AS 3.4309* glucoamylase and *Bacillus subtilis* BF-7658  $\alpha$ -amylase.

Glucoamylase solution containing 0.2% XG is incubated at 65°C water bath for 2 hours, its relative increased activity is up to 63.9%. Incubated at 75°C for 7 minutes,  $\alpha$ -amylase solution with 0.2% XG can maintain 25.8% of activity, while the activity of native  $\alpha$ -amylase is mostly lost. By adding XG and some metal ions, the enzyme solution shows better thermostability.

When XG is used as main additive, the recovery of solid glucoamylase and  $\alpha$ -amylase is about 8-9% and 6% higher respectively than that of native enzyme with alcohol precipitation, on the other hand, the recovery is increased by 7% and 5% respectively with spraying dry method.

The optimum temperature, optimum pH, pH stability and applied properties of enzymes containing XG are almost the same as native enzymes, but  $K_m$  is smaller than that of native enzymes.

Under the same hot treatment condition (partly thermoinactivation), the residual activity of  $\alpha$ -amylase containing XG differs from the native  $\alpha$ -amylase, their UV spectra and fluorescence emission spectra are also different, this indicated that the degree of their conformation changes is different.

**Keywords:** polysaccharide, Xanthan gum, *AS 3.4309* glucoamylase, *Bacillus subtilis* BF-7658-  $\alpha$ -amylase, thermostability

## 目 录

中文摘要	
英文摘要	
一、前言	1
二、黄原胶对糖化酶、 $\alpha$ -淀粉酶热稳定性作用的研究	5
(一)、材料与方法	5
(二)、结果与讨论	9
2.1 糖化酶部分	9
2.2 $\alpha$ -淀粉酶部分	17
三、黄原胶在制备固体糖化酶、固体 $\alpha$ -淀粉酶中的应用	20
(一)、材料与方法	20
(二)、结果与讨论	21
3.1 糖化酶部分	21
3.2 $\alpha$ -淀粉酶部分	27
四、加胶酶基本性质的研究	31
(一)、材料与方法	31
(二)、结果与讨论	34
4.1 糖化酶部分	34
4.2 $\alpha$ -淀粉酶部分	38
五、黄原胶对酶热保护作用机理初探	42
(一)、材料与方法	43
(二)、结果与讨论	46
5.1 凝胶过滤色谱	46
5.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	47
5.3 黄原胶对 $\alpha$ -淀粉酶热变性过程中构象变化的影响	48
六、结论	53
七、存在的问题与展望	54
参考文献	55
致谢	57

## 一. 前 言

近年来，微生物多糖的功能及其应用研究颇为活跃，多种有应用价值的微生物多糖正迅速发展成一门新型的发酵工业。虽然对这一领域的研究起步不久，由于它本身所固有的特殊性能使得它在食品工业、医药工业、化学工业和其他工业上具有很大的应用潜力。

黄原胶 (Xanthan gum) 是微生物多糖中工业产量最大，目前最具有代表性的多糖。它是由甘蓝黑腐病黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 以碳水化合物为主要原料经发酵产生的一种水溶性的胞外杂多糖。它是由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸、丙酮酸和乙酸所组成的“五糖重复单元”经  $\beta$ -(1,4)-糖苷键聚合而成的高分子多糖，其分子量在  $2 \sim 50 \times 10^6$  之间<sup>[1]</sup>。“五糖重复单元”的结构<sup>[2]</sup>如图 1.1。

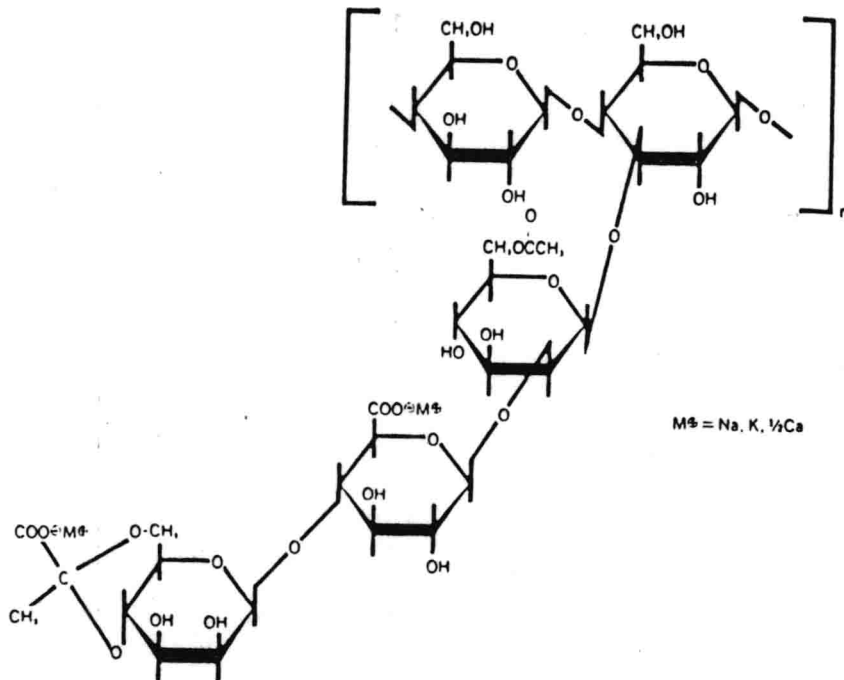


图 1.1 “五糖重复单元”的结构示意图

在水溶液中天然黄原胶分子的带电侧链反向缠绕纤维素主链形成棒

状刚性的一级结构。黄原胶分子靠氢键可形成双螺旋的二级结构。黄原胶分子的双螺旋结构间还可以靠微弱的非共价键结合，排列成超级接合带状螺旋聚合体构成类似凝胶的网状结构。在温度、剪切力、离子强度等外界条件的影响下，黄原胶的分子结构可以发生改变<sup>[3]</sup>，如图1.2。

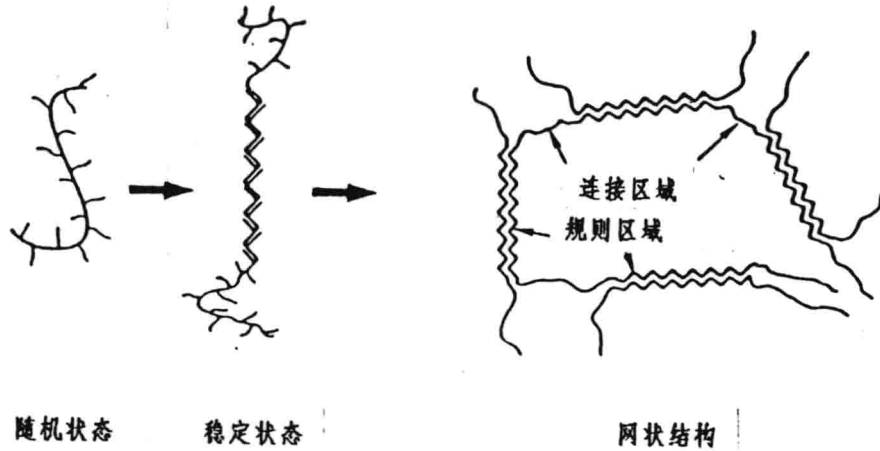


图1.2 黄原胶在水溶液中形态示意图

由于黄原胶的组成和结构的复杂多样性，它的功能也是多种多样的：它有良好的分散作用和优异的悬浮能力；在低盐、很宽的pH条件下有极好的稳定性；同酸、碱、表面活性剂和防腐剂在同一溶剂系统中具有良好的兼容性；具有较好的抗高温、抗酸、碱、抗生物酶解和耐高盐的作用。正因为黄原胶有如此独特优良的理化性能，大力开发应用黄原胶显得有特别的现实意义和经济价值。

黄原胶最早开发于美国<sup>[4]</sup>，1964年，美国Kelco公司首先实现了商品化生产，制成了工业级黄原胶。1969年食品级的黄原胶产品获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准。1970年前后，在美国获得多项专利，随之法、英、日、德等国也相继开发。而我国有关黄原胶的研究起步较晚，现在已形成规模生产。为了加快黄原胶的应用，微生物多糖黄原胶的应用被列为国家“八·五”攻关课题，本课题即为其中一部分。

酶制剂工业在近二十年来得到了迅速的发展，它在众多领域都获得了越来越广泛的应用。但酶是具有生物活性的蛋白质，它的明显弱点是稳定性差，各种因素均有可能使酶丧失生物活力，这一弱点常限制了它

的应用。在实际工业应用上，造成酶失活的主要原因是热，所有已知的酶类都有受热即伸展，继而丧失活性这样一个基本的特性<sup>[5]</sup>。为了要增加产率和防止微生物污染，在较高温度下操作是不可避免的选择。随着酶工业应用的迅速发展，各种提高酶热稳定性的方法和手段层出不穷。把胶体物质，大分子多糖应用于酶的稳定性研究是一个古老而又年轻的方法。早在1923年，Kern和Jenny就用阿拉伯胶、明胶等亲水性胶体来稳定 $\alpha$ -淀粉酶的活性<sup>[6]</sup>。1971年，Torvard C. Laurent等用亲水性多糖来稳定胰蛋白酶、乳酸脱氢酶、透明质酸酶的活性<sup>[7]</sup>。1989年Grirastave等人用高分子的葡聚糖来稳定 $\alpha$ -淀粉酶，可避免酶一定的热失活<sup>[8]</sup>。在八十年代后期，有一些黄原胶在固定化方面的专利报道，如用黄原胶来固定植物细胞<sup>[9]</sup>，与 $Fe^{3+}$ 形成凝胶固定脂肪酶<sup>[10]</sup>等。虽然胶体、多糖类用于提高酶的热稳定性理论研究的报道有一些，但应用于实际工业生产却报道得很少，黄原胶在酶制剂工业上应用的详细报道几乎没有，且国内这方面的工作也尚属空白。由于黄原胶超常的优良性能，以及前人用多糖类物质对酶稳定性保护作用研究给我们的启示为黄原胶用于酶稳定性研究提供了理论依据。

本课题是在刘稼骏硕士研究对黄原胶1.398中性蛋白酶耐热性有较显著提高好结果的基础上与无锡星达生物工程有限公司商定希望以生产量大的糖化酶和枯草杆菌 $\alpha$ -淀粉酶作试验，如若成功将会产生明显的经济效益，同时也为黄原胶在酶制剂工业上的应用打开一条新的路子。

通过对文献资料的综合分析，结合酶厂的一些实际情况，本论文主要是从以下几方面进行了探索性研究：

1. 研究了在不同条件下，黄原胶对糖化酶的热稳定性的影响；以及与其它胶体物质对酶的热稳定性效果进行了比较；研究了在黄原胶、中性盐、有机溶剂协同作用下对糖化酶耐热性的影响；研究了在不同温度下黄原胶对 $\alpha$ -淀粉酶的热保护作用。

2. 耐热性实验研究表明，黄原胶能提高这两种酶的热稳定性。结合生产固体糖化酶，固体 $\alpha$ -淀粉酶在烘干过程中酶活损失情况，以黄原胶作为主要添加剂，通过工艺条件的摸索控制可使糖化酶的酶活收率提

高8-9%左右， $\alpha$ -淀粉酶的酶活收率提高6%左右。鉴于目前酶厂制酶的干燥工艺和设备都比较落后，喷雾干燥也是日后制备固体酶制剂的趋势，采用对加胶和对照酶液直接喷雾干燥，喷雾结果，糖化酶酶活收率提高7%， $\alpha$ -淀粉酶酶活收率提高5-6%左右。

3. 对加胶酶的基本性质如最适作用温度、最适作用pH、稳定pH、 $K_m$ 以及淀粉糖化和液化的应用性质进行了分析研究。

4. 在现有实验条件下，利用紫外差光谱、荧光光谱就黄原胶对酶的热保护机理作了初步探讨。



## 二. 黄原胶对糖化酶, $\alpha$ -淀粉酶热稳定作用的研究

无论是国内还是国外, 糖化酶,  $\alpha$ -淀粉酶都是酶制剂家族中产量最大, 用途最广的一员。在食品工业上, 主要用于制造葡萄糖、饴糖、麦芽糖、糖浆, 改善面包质地等。在发酵工业上, 主要用于啤酒、清酒、白酒、果酒、酒精等的制造。正因为它们有着如此广泛的应用, 如何改善这类酶制剂的性能特别是提高其在应用中的热稳定性显得尤为重要。黄原胶具有稳定性好、抗高温等特点, 加上前人工作的启示, 把黄原胶用于这两种酶的耐热性研究, 结果表明黄原胶对这两种酶具有良好的热保护作用。

### (一). 材料与方方法

#### 1. 原料及主要试剂

黄原胶	食品级	扬州金湖黄原胶厂生产
糖化酶浓缩液	食品级	无锡星达生物工程有限公司生产, 酶活约 100,000u/ml
固体 $\alpha$ -淀粉酶	食品级	无锡星达生物工程有限公司生产, 酶活约 6,000u/g
可溶性淀粉	CP	浙江菱湖淀粉厂
甘油	AR	苏州金城试剂厂
甲醇	AR	宜兴第二化学试剂厂
阿拉伯胶		进口
海藻酸钠	CP	温州助剂厂
瓜尔胶		进口
魔芋		国产

羧甲基纤维素  
Sephadex G-25  
上海赛璐珞厂  
Pharmacia公司产品

## 2. 主要仪器与设备

SK-1快速混匀器  
MA110型电子天平  
ZXT-64-01离心机  
80-2离心沉淀器  
ZXZ-4型旋片式真空泵  
色谱柱  
HL-1恒流泵  
SS-14A型超滤器  
超滤膜XHP-\*2(截留分子量2万)  
721分光光度计  
江苏国华仪器厂  
上海天平厂  
北京医疗仪器修理厂  
上海手术器械厂  
上海真空泵厂  
上海锦华实验仪器厂  
上海市沪西仪器厂  
上海瑞丽分离仪器厂  
上海瑞丽分离仪器厂  
上海第三分析仪器厂

## 3. 方法

### 3.1 各种pH缓冲液的配制<sup>[11]</sup>

### 3.2 1%黄原胶溶液的配制

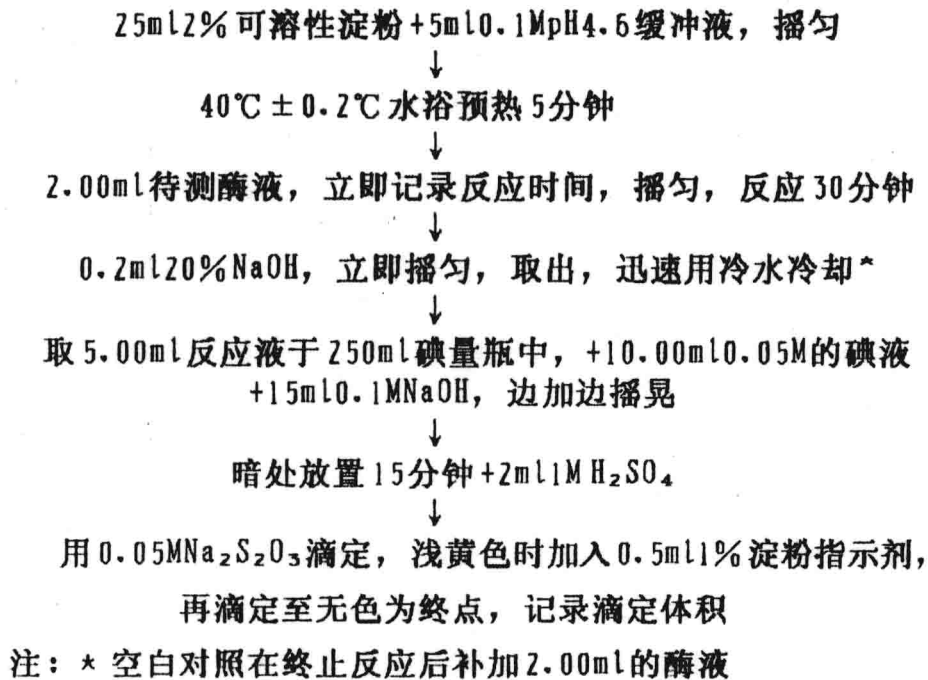
称1.00克黄原胶粉置100ml小烧杯中,逐步加去离子水并不时搅拌至40ml,置80-90℃水浴中20分钟,取出稍冷以后倒入100ml容量瓶中,用去离子水定容至刻度,放置一天,间以数次振荡,然后可稀释使用。

### 3.3 黄原胶添加方法

于含有适当酶活的酶液中加入一定量的1%黄原胶至所需胶浓度,在快速混匀器上振荡均匀,放置两小时,即可进行实验。

### 3.4 糖化酶酶活测定方法<sup>[12,13]</sup>

### 3.4.1 酶活定量测定法



### 3.4.2 酶活单位定义:

1ml 酶液 40°C, pH4.6 条件下, 1 小时分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖定义为一个酶活单位, 以 u/ml 表示。

### 3.4.3 酶活计算公式

$$\text{酶活性单位} = \frac{(A-B) \times N \times 90.05 \times 32.2 \times n \times 2}{2 \times 5}$$

A——空白消耗 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 标准溶液的体积 (ml)

B——样品消耗 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 标准溶液的体积 (ml)

N——Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 标准溶液的浓度 (mol/l)

90.05——1ml 1M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 标准溶液所相当的葡萄糖的毫克数

2——吸取酶液的体积 (ml)

32.2——反应液总体积 (ml)

5——吸取反应液体积 (ml)

n——稀释倍数

2——换算成一小时的酶活系数

3.5  $\alpha$ -淀粉酶酶活测定方法 [12] [40]

3.5.1 酶活定量测定法

取 20.00ml 2% 可溶性淀粉溶液和 5ml 0.1M pH6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，放于 25×200mm 大试管中，在 60℃ 恒温水浴中预热 5 分钟，然后加入预先稀释好的酶液 0.5ml，立即记录时间，充分摇匀。定时取出反应溶液 1.0ml 滴入预先加有 4.0ml 比色稀碘液的试管中，混合均匀，并用分光光度计 (620nm 处) 以标准色样为参比测定其透光度，直到测出一个大于 100% 的数据，用内推法求得终点 (100%) 的准确时间。

3.5.2 酶活单位定义

1 克酶粉或 1ml 酶液 60℃，pH6.0 条件下，一小时液化可溶性淀粉的克数来表示。

3.5.3 酶活计算公式

$$\text{酶活力单位} = \frac{60 \times 20 \times 2\% \times n}{T \times 0.5}$$

60——一小时等于 60 分钟

20——可溶性淀粉溶液的体积 (ml)

2%——可溶性淀粉溶液的浓度

n——稀释倍数

0.5——测定时用酶量 (ml)

T——测定记录时间 (分钟)

3.6 酶热稳定性 (耐热性) 的测试方法

将配制好的加有保护剂的酶液和对照酶液在一定温度和 pH 下处理一定时间后，立即用冷水冷却，稀释至适宜的倍数测其酶活。

$$\text{残余酶活} = \frac{\text{热处理后酶液的酶活}}{\text{热处理前酶液的酶活}} \times 100\%$$

$$\text{相对增加酶活} = \frac{\text{样品酶液残余酶活} - \text{对照酶液残余酶活}}{\text{对照酶液的残余酶活}} \times 100\%$$

### 3.7 超滤膜过滤浓缩

采用SS-14A-60ml超滤过滤器，XHP-\*2过滤膜，用氮气加压超滤。

### 3.8 凝胶过滤<sup>[14、15]</sup>

脱盐：采用Sephadex G-25，凝胶柱50cm×φ2.5cm

层析条件：加样量25ml，流速2ml/min

洗脱剂：0.02M pH6.0的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液

酶液呈肉眼可见的浅黄色，收集浅黄色酶液，根据所需酶浓度进行浓缩或稀释即可进行实验。

### 3.9 蛋白质浓度测定<sup>[11]</sup>

采用Folin-酚法，以酪蛋白为标准蛋白质

## (二) 结果与讨论

### 2.1 糖化酶部分

#### 2.1.1 黄原胶含量与酶热稳定性的关系

分别将黄原胶浓度0，0.03%，0.05%，0.07%，0.1%，0.15%，0.2%，0.3%的酶液（酶活约400u/ml），在65℃，pH4.4条件下保温2小时，测定残余酶活，结果如图2.1。

从实验结果看加入黄原胶对提高酶的耐热性能有一定的效果，随着胶浓度的增加，酶的热稳定性也逐步增强。但这两者并不成比例关系，这可能是为了使黄原胶分子与酶蛋白分子及其微环境发生直接或间接的相互作用必须达到一定的浓度，同时溶液中除了酶分子外还有其它的杂蛋白，由于结构的不同，黄原胶分子与它们作用的机会并非均等。当黄原胶浓度达到0.2%时，相对增加酶活可提高到63.9%，为了以后实验

的方便及经济因素，取黄原胶的最终添加浓度为0.2%。

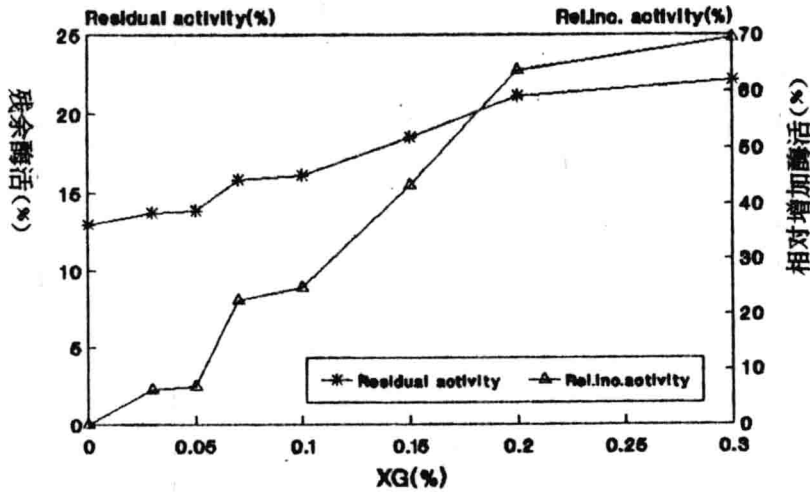


图 2.1 黄原胶与糖化酶热稳定性的关系

### 2.1.2 不同温度下黄原胶对酶热稳定性的影响

酶活约 400u/ml 的对照酶液及含有 0.2% 黄原胶的酶液在 pH4.4 的条件下分别于 40℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃ 保温 1 小时，测定酶活结果见图 2.2。

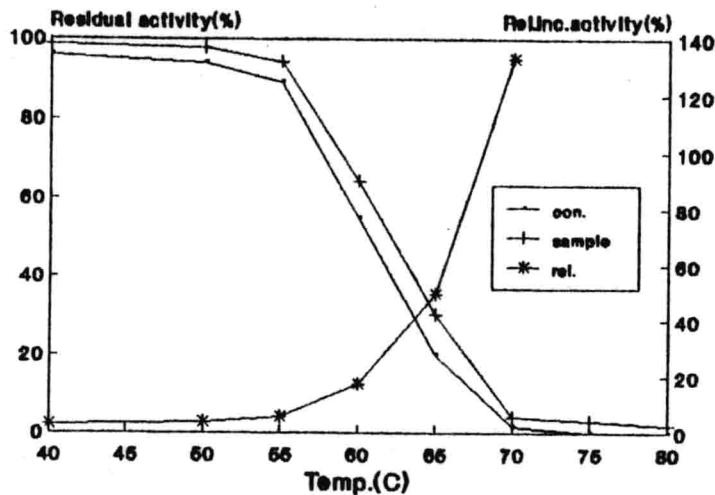


图 2.2 不同温度下黄原胶对糖化酶热稳定性的影响

由图可知这种酶在 55℃ 以下较为稳定，在 60℃ 特别是 65℃ 以后，随着温

度的升高，活力急剧下降，而黄原胶的加入能减弱酶活降低的程度，且随着温度的升高，黄原胶对酶的热保护作用增强，为了能较好地显示黄原胶对酶的热保护作用，并考虑残余酶活不能太低，否则实验误差较大，在以下的耐热性实验中取65℃为热处理温度。

### 2.1.3 不同热处理时间黄原胶对酶的热保护作用

将含0.2%胶的酶液，对照酶液于pH4.4、65℃进行热处理，每隔20分钟分别取样测残余酶活，见图2.3。

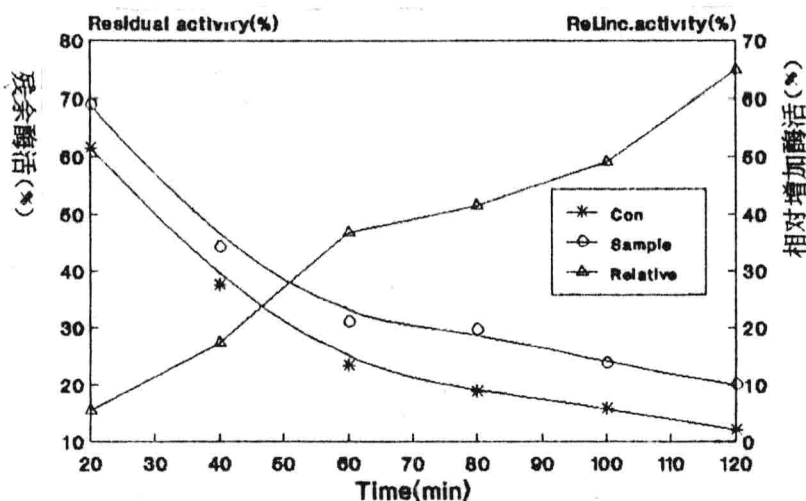


图2.3 热处理时间与糖化酶热稳定性的关系

加胶酶液的残余酶活比同样条件下对照酶液的残余酶活都有了一定程度的提高。而且随着热处理时间的延长，黄原胶对酶的热稳定作用就越显著。在处理120分钟时，相对增加的酶活可达64.8%。

通过以上的系列实验可以看出，黄原胶对酶耐热性质的改善是有效果的。黄原胶的这种热保护作用在越偏离酶的适宜条件下表现得越明显。酶的活性功能决定于其分子结构的完整和严格的构象，功能效率的高低极大地受表面几何构象所影响。生物分子是热敏分子<sup>[17]</sup>，它的立体构象对热有较高的敏感性。一般情况下，当温度上升时，酶蛋白分子之间以及与微环境中其他粒子相互撞击频率加大，使其分子动能(位移能)增

大，同时基团的振动能扩大。当超过维持酶蛋白高级结构的正常键能水平时，酶的高级立体结构不能维持，于是氢键等大量破坏， $\alpha$ -螺旋无规则地散开，有序分子结构变成无序，酶丧失其原有的生物活性，表现为失活。具有胶体性质的酶蛋白分子，在水溶液体系中可认为是球状或接近球状，它相对于分子量大几百倍甚至几千倍的黄原胶分子可近似为质点。从动力学的角度讲，对于球形质点，其运动是由热运动所支配，即在微观上以布朗运动的形式表现出来，宏观上表现为扩散现象<sup>[18]</sup>，从Einstein的布朗运动公式<sup>[19]</sup>：

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta\gamma N_0}$$

可知质点布朗运动与质点大小成反比，同时与介质的粘度成反比。黄原胶的加入在一定程度上降低质点扩散运动速度，具有空间结构的黄原胶大分子形成的网状结构可产生“筛孔效应”，对较小的酶蛋白分子“空间限位”<sup>[20][6]</sup>，这些都能减少酶分子的相互碰撞，从而减弱酶蛋白分子的动能，一定程度上提高了酶分子的热稳定性。

#### 2.1.4 多糖对酶热稳定作用的比较

据资料报道<sup>[6][24]</sup>，阿拉伯胶，海藻胶，瓜尔胶，羧甲基纤维素等一些亲水性多糖类胶体都能用来保护稳定蛋白质。本实验意在比较这几种亲水性胶体对糖化酶的热保护程度，并希望从中得出一些共同的理论。

阿拉伯胶(AG)<sup>[21]</sup>：是一种豆科植物的茎枝分泌出的一种高分子多糖，它是由L-阿拉伯糖，D-半乳糖，D-鼠李糖和D-葡萄糖醛酸所组成，其分子量为24-58万道尔顿。

海藻酸钠(SA)<sup>[22]</sup>：是海带的精制品。是 $\beta$ -D-甘露糖醛酸钠与 $\alpha$ -L-古罗糖醛酸钠盐的聚合物，分子量约3.2-20万道尔顿。

瓜尔胶(GG)<sup>[21]</sup>：是豆科植物瓜尔豆种子中的胚乳多糖，由甘露糖和半乳糖组成，主链是 $\beta$ -(1,4)-糖苷键连接的甘露聚糖，半乳糖侧链



经  $\beta$ -(1, 6)-键和主链连接, 分子量为22万道尔顿。

魔芋葡甘露聚糖<sup>[23]</sup>(KGM): 是由D-葡萄糖和D-甘露糖通过  $\beta$ -(1, 4)键连接而成的大分子复合多糖类。甘露糖和葡萄糖之比约为1.6:1, 在主链甘露糖的C<sub>3</sub>位置上存在  $\beta$ -1, 3-键的支链结构, 每32个糖残基就有一个乙酰基以酯的形式结合。

羧甲基纤维素(CMC)<sup>[22]</sup>: 是葡萄糖聚合度为100-200的纤维素的衍生物, 基本结构是纤维素分子中部分葡萄糖C<sub>6</sub>羟基被醚化。

分别将含有0.2%不同多糖的酶液及对照酶液于pH4.4、65℃恒温水浴2小时, 测残余酶活, 结果见图2.4。

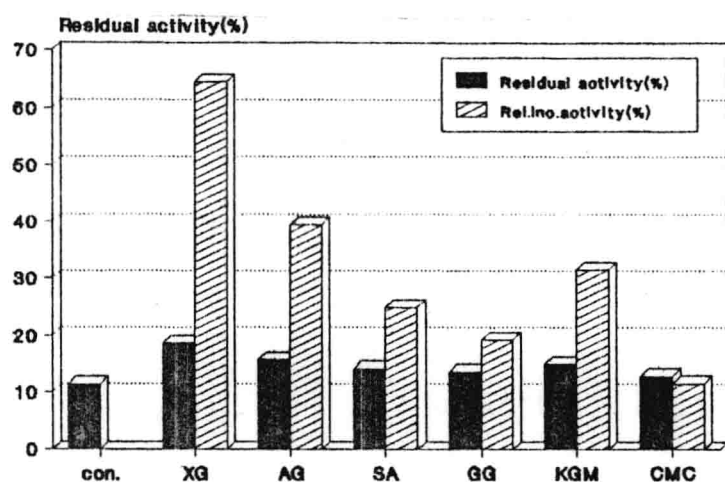


图2.4 多糖对糖化酶热保护作用的比较

这几种胶体对酶都有一定的热保护作用, 其中以黄原胶最明显, 阿拉伯胶、魔芋次之, 而CMC的作用最不明显。胶体对酶的保护作用可能与它们的高分子量和很好的亲水性有关<sup>[20][24]</sup>。一般在酶蛋白分子表面既有极性的亲水区域又有非极性的疏水区域。这些疏水区域对保护酶分子空间结构和发挥生物功能起着重要的作用, 然而在水溶液介质中, 这些疏水区域的存在对蛋白质的稳定是不利的, 会使酶不稳定<sup>[25]</sup>。因此减少蛋白质的非极性表面应能稳定蛋白质。大分子可溶性多糖的加入使得水的自由度变小, 加强了酶蛋白分子的疏水相互作用, 同时大分子上的一些疏水基团与酶分子表面的疏水区域或孔发生疏水相互作用, 使