

# 产碱杆菌 DN25 纯化降氰酶稳定剂的选择\*

## Stabilizers Selection for the Purified Cyanide-degrading Enzyme from *Alcaligenes* sp. DN25

汪艳华, 刘幽燕, 李青云\*\*, 唐爱星, 王顺成, 甘雨

WANG Yan-hua, LIU You-yan, LI Qing-yun, TANG Ai-xing, WANG Shun-cheng, GAN Yu

(广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**向产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.) DN25 的纯化降氰酶中分别添加不同浓度的多元醇类、金属离子类、糖类、防腐剂类等添加剂, 研究不同种类、不同浓度的添加剂对降氰酶稳定性的影响, 优选可以提高降氰酶稳定性的添加剂。结果表明: 外加添加剂甘油浓度为 1.5% (*m/V*) 时, 酶活保留率为 5.4%;  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  浓度为 4% (*m/V*) 时, 酶活保留率为 5%; 淀粉浓度为 6% (*m/V*) 时, 酶活保留率为 14.3%; 甘氨酸浓度为 3% (*m/V*) 时, 活力酶活保留率为 19.6%。甘氨酸对产碱杆菌 DN25 降氰酶具有最强的保护作用。

**关键词:**稳定剂 产碱杆菌 降氰酶 酶活

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2013)04-0220-04

**Abstract:** The effects of the additive on the stability of the purified cyanide-degrading enzyme from *Alcaligenes* sp. DN25 were studied. Various types and different concentrations of polyhydric alcohols, preservatives, metal ions and carbohydrates were tested as stabilizers for the enzyme preparation. The results showed that the enzyme activity remained 5.4%, 5%, 14.3%, 19.6% when adding 1.5% glycerol, 4%  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ , 6% starch, 3% glycine, respectively. Glycine, therefore, was thought to be the most efficient for the purified cyanide-degrading enzyme among the selected additives.

**Key words:** stabilizer, *Alcaligenes* sp., cyanide-degrading enzyme, enzyme activity

酶被广泛应用于工业、农业、化学以及环境废水治理, 但是纯酶在以酶粉状保存时, 酶的活力损失较快, 保存稳定性较差, 各种物理因素(温度、湿度、压力、光、磁场)、化学因素(氧化、还原、溶剂、离子强度、pH)和生物学因素(酶修饰和酶降解)均有可能使酶丧失生物活性, 从而限制其应用。

使用添加剂是提高酶制剂的稳定性的重要手段之一, 其简单易行<sup>[1]</sup>, 应用较广。国内外大多采用在浓缩酶液中加入金属离子、多元醇、多糖类化合物等方

法来稳定酶的活力。陈惠<sup>[2]</sup>探讨了糖类、多元醇类以及硫酸铵对植酸酶热稳定性的影响; 李群等人<sup>[3]</sup>研究发现糖类物质中的海藻糖对乙醇脱氢酶和 SOD 酶蛋白保护效果最佳, 具有很好的酶热稳定性保护作用; 王普等人<sup>[4]</sup>采用不同种类、不同浓度的添加剂对液体碱性蛋白酶稳定性进行探讨, 并比较了复合稳定剂及其长效性。

我们在开展氰化物生物降解的研究中, 获得 1 株具有高降解性能的产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.), 并通过硫酸鱼精蛋白沉淀和疏水层析法制备出半纯化的降氰酶。利用此半纯化酶进行氰降解研究发现降氰酶较易失活, 稳定性较差, 在温度和酸碱条件改变下很快失活, 尤其是温度的影响最为显著。本研究的目的是选择一种合适的稳定介质, 保持降氰酶活性, 为此考察了多元醇类、防腐剂类、金属离子类

收稿日期: 2013-08-14

作者简介: 汪艳华(1982-), 女, 硕士, 主要从事生物化工研究。

\* 国家自然科学基金项目(No 511080985); 广西大学“大学生创新创业训练计划”项目(1201034)资助。

\*\* 通讯作者: 李青云(1978-), 女, 讲师, 主要从事生物工程技术研究。E-mail: qingyunlichina@126.com。

以及糖类在保护产碱杆菌 DN25 降氰酶酶活的效果,试图为未来酶稳定剂的选择提供一点思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种为产碱杆菌 DN25,由本实验室筛选并保藏。材料为产碱杆菌 DN25 纯化酶。主要试剂为 NaCl、KCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{BaNO}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、甘油、叔丁醇、异丙醇、丁醇、聚乙二醇 1000、乙二胺四乙酸钠、柠檬酸钠、甘氨酸、戊二醛、乙醇、淀粉、蔗糖、乳糖、果糖、葡萄糖、明胶。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 降氰酶活力测定

反应在 2 mL 离心管中进行,以氰化钾作为底物,在 1.7 mL 反应体系(含 500  $\mu\text{L}$  10.7 mmol/L 的氰化钾,1 mL 的 0.05 mol/L、pH 值 8.0 的 Tris-HCl),于 30  $^\circ\text{C}$  恒温水浴中加入 200  $\mu\text{L}$  浓度为 0.08 mg/mL 的酶液,在 150 r/min 下准确反应 20 min,取 20  $\mu\text{L}$  反应液立刻加入 0.1% NaOH 溶液中终止反应,采用异烟酸-吡唑啉酮法<sup>[5]</sup>测定氰离子浓度。酶活力单位的定义为:30  $^\circ\text{C}$ 、pH 值 8.0 条件下每分钟催化 1  $\mu\text{mol}$  HCN 水解所需要的酶量。

#### 1.2.2 外加多元醇类作为稳定剂试验

将多元醇类物质甘油、叔丁醇、异丙醇、丁醇、聚乙二醇 1000 等分别加入到半纯化酶液中(终浓度都为 2%,  $m/V$ ),在 60 $^\circ\text{C}$  保温 20 min 后立即冰浴,按照 1.2.1 小节的方法测定酶活力,将其与处理前酶活相比,计算酶活保留率,以不外加稳定剂样品做对照,得出最适多元醇类稳定剂及添加浓度。酶活保

$$\text{保留率}(\lambda, \%) = \frac{\text{热处理后的酶活}}{\text{热处理前的酶活}} \times 100\%$$

#### 1.2.3 外加防腐剂类作为稳定剂试验

将防腐剂类物质乙二胺四乙酸钠、柠檬酸钠、甘氨酸、戊二醛、乙醇等分别加入到半纯化酶液中(终浓度都为 3%,  $m/V$ ),按照 1.2.2 小节的方法,计算酶活保留率,得出最适防腐剂类稳定剂及添加浓度。

#### 1.2.4 外加金属离子类作为稳定剂试验

将金属离子类  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $[\text{NH}_4]^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等分别加入到半纯化酶液中(终浓度都为 3%,  $m/V$ ),按照 1.2.2 小节的方法,计算酶活保留率,得出最适金属离子类稳定剂及添加浓度。

#### 1.2.5 外加糖类作为稳定剂试验

将糖类物质淀粉、蔗糖、乳糖、果糖、葡萄糖、明胶等分别加入到半纯化酶液中(终浓度都为 3%,

$m/V$ ),按照 1.2.2 小节的方法,计算酶活保留率,得出最适糖类稳定剂及添加浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 多元醇对产碱杆菌 DN25 降氰酶稳定性的影响

多元醇甘油、叔丁醇、聚乙二醇 1000 等物质能与水分子相结合,降低水分子的活度,使酶蛋白分子受水分子的影响减少,特别是加入醇类物质后,酶液粘度增大,从而使酶液体系更加稳定、均一。分别选用甘油、叔丁醇、异丙醇、丁醇、聚乙二醇 1000 等进行单项添加试验。从图 1 发现,在多元醇类添加剂中,醇类叔丁醇、异丙醇、丁醇等添加剂对半纯化酶完全没有稳定能力;聚乙二醇 1000 稳定效果较差,酶活保留率较未添加时提高 2.3%;甘油的稳定效果最好,酶活保留率较未添加时提高 5.2%,可能是甘油有利于酶环境的稳定性。在此基础上,改变甘油添加浓度,考察其对酶稳定性的影响。由图 2 发现,当甘油浓度在 0~1.5% 之间时,酶活保留率随着甘油浓度的增加而增大,达到最佳浓度 1.5% 时,酶活保留率最高,为 5.4%;继续增加甘油浓度,酶活保留率迅速降低,可能是由于高浓度的甘油与水相之间两相分离,导致保护作用消失。

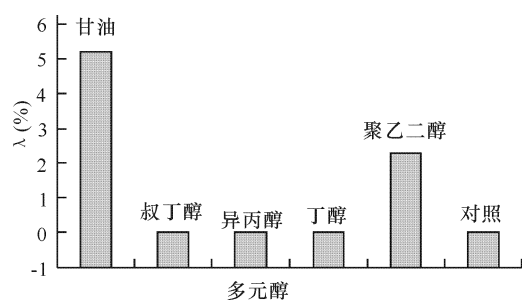


图 1 多元醇对酶热稳定性的影响

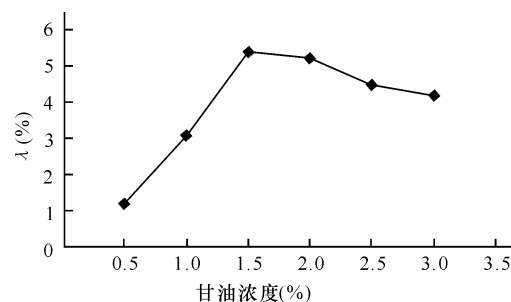


图 2 甘油的最佳添加浓度

### 2.2 防腐剂对产碱杆菌 DN25 降氰酶稳定性的影响

在半纯化酶中添加乙二胺四乙酸钠、柠檬酸钠、乙醇、戊二醛和甘氨酸,结果(图 3)发现,甘氨酸对

酶的稳定效果最好,柠檬酸钠次之,乙醇、戊二醛和乙二胺四乙酸钠没有稳定酶的能力。展开甘氨酸的最佳浓度实验,结果(图4)表明,当甘氨酸浓度在0~3%之间时,酶活保留率随着甘氨酸浓度的增加而增大,达到最佳浓度3%时,酶活保留率最高,为19.6%;继续增加甘氨酸浓度,酶活保留率迅速降低,可能是高浓度的甘氨酸破坏了酶的环境稳定性。合适浓度的甘氨酸使酶的结构稳定化,也可能是与氨基酸是组成所产酶的活性结构域的主要氨基酸有关<sup>[6]</sup>。文献<sup>[7,8]</sup>报道甘氨酸能够使锌铁形成的螯合物相当稳定,从而提高稳定性。

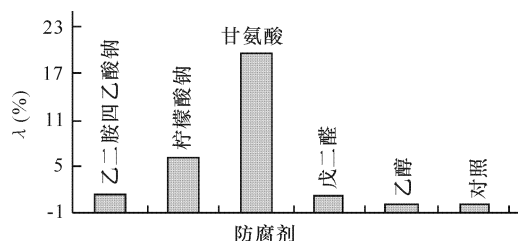


图3 防腐剂对酶热稳定性的影响

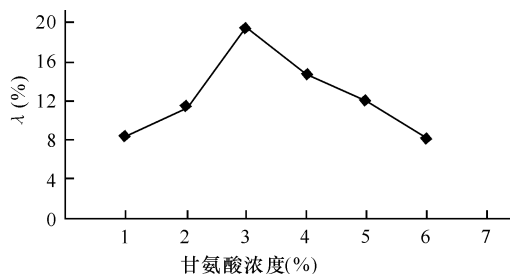


图4 甘氨酸的最佳添加浓度

### 2.3 金属离子对产碱杆菌 DN25 降靛酶稳定性的影响

分别就  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $[\text{NH}_4]^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等金属离子对半纯化酶的影响进行了考察。结果(图5)表明, $[\text{NH}_4]^+$ 和 $\text{K}^+$ 对酶的稳定作用比较明显,其它离子的作用效果较差。因此, $[\text{NH}_4]^+$ 可以作为此降靛酶的稳定剂。由于 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 加入后酶液体系容易产生沉淀或混浊,故不宜选用。硫酸铵的最佳浓度实验结果表明,在所选的浓度范围内,改变添加量对酶活保留率的影响不大(图6),可选择浓度为4%,此时酶活保留率达到5%。

### 2.4 糖类对产碱杆菌 DN25 降靛酶稳定性的影响

糖对于各种酶的热稳定性的影响是通过直接与大分子物质相互作用影响酶蛋白的高分子结构,并通过直接反应或两种机理组合,影响溶剂的结构和性质。糖被加到酶水溶液中,能在无极性的氨基酸残基中间增强疏水作用,使它们更抗分解和热变性。

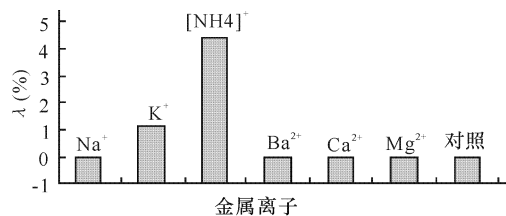


图5 金属离子对酶热稳定性的影响

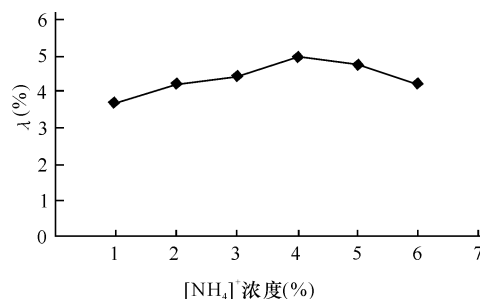


图6  $[\text{NH}_4]^+$ 的最佳添加浓度

在酶液中加入终浓度为3%的各种糖类(蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、明胶、淀粉),结果(图7)表明,淀粉和乳糖的添加效果较明显,酶活保留率分别可以达到12.4%和8.6%。选取淀粉做进一步的最佳浓度实验,结果(图8)表明,随着浓度的增大,酶活保留率增加,可能是因为多糖的浓度越大,酶液的粘度越高,此时酶液中自由水分含量降低,酶失活速率越慢。但是多糖用量过大时,发现酶液在常温下即呈固体状,可见其不适于作为常温稳定剂,所以选用1%作为稳定剂用量。

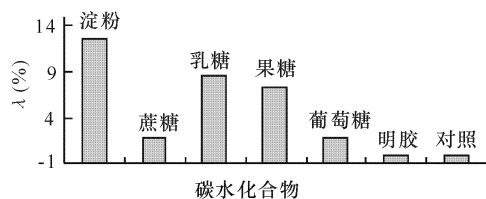


图7 糖类对酶热稳定性的影响

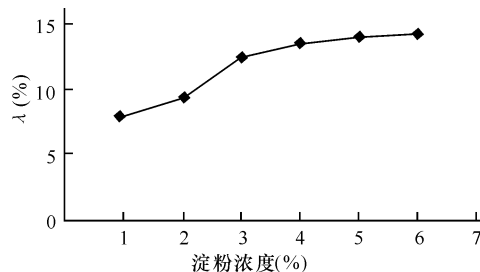


图8 淀粉的最佳添加浓度

## 3 结论

本研究探讨了不同稳定剂对产碱杆菌 DN25 降靛酶的影响,得出最适稳定剂及添加浓度,其中添加剂 $[\text{NH}_4]^+$ 在浓度为4% ( $m/V$ )时,酶活保留率为5%;添加剂甘油在浓度为1.5% ( $m/V$ )时,酶活保

留率为 5.4%;添加剂淀粉在浓度为 6% ( $m/V$ ) 时,酶活保留率为 14.3%;添加剂甘氨酸在浓度为 3% ( $m/V$ ) 时,酶活保留率为 19.6%;而不外加任何添加剂的酶液,经处理后完全失活。可见,甘氨酸稳定剂对降靛酶具有最强的保护作用,可能是甘氨酸使酶的结构稳定化,也可能是与氨基酸是组成所产酶的活性结构域的主要氨基酸有关。因此,对复合稳定剂综合效应以及稳定剂的长效试验还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 曹治云. 黑曲霉产酸性蛋白酶催化机制和稳定剂研究[D]. 福建:福建师范大学生命科学学院,2005.
- [2] 陈惠,王红宁. 糖及硫酸铵对植酸酶热稳定性的影响[J]. 中国饲料,2004,18:22-23.
- [3] 李群,袁勤生,李永丰. 海藻糖对酶热稳定性保护作用

的研究[J]. 药物生物技术,1997,4(1):28-31.

- [4] 王普,虞炳钧,曹一岚,等. 液体碱性蛋白酶稳定性的研究[J]. 食品与发酵工业,1995,5:1-7.
- [5] Toyama H, Nishibayash E, Saekis M. Factors required for the catalytic reaction of PqqC/D which produces pyrroloquinoline quinone [J]. Biochem Biophys Res Commun,2007,354(1):290-295.
- [6] Beg Q K, Bhushan B, Kapoor M. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3[J]. World J Microbiol Biotechnol,2000,16:211-213.
- [7] 张晓鸣,林萍,黄玲,等. 甘氨酸螯合铁理化性质的研究[J]. 中国粮油学报,2006,20(5):1-5.
- [8] 蔡海军,吕立新. 甘氨酸锌类螯合物 GZC 的合成和用作 PVC 热稳定剂的研究[J]. 中国塑料,1990,1:1-5.

(责任编辑:陈小玲)

(上接第 219 页)

#### 参考文献:

- [1] 韩维栋,高秀梅. 无瓣海桑人工林的生物量与能量研究[J]. 广西科学,2004(3):83-88.
- [2] 林海生,宋文东. 无瓣海桑叶子和果实中氨基酸成分的检测分析[J]. 氨基酸和生物资源,2009,31(2):76-78.
- [3] 纪卿飞,林文翰,李军,等. 中国红树林植物——无瓣海桑的化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志,2005(16):1258-1260.
- [4] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2007,55(22):8896-8907.
- [5] Shi T X, Li Y G, Jiang Y, et al. Isolation of flavonoids from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd and their antioxidant activities[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical,2013,22(1):36-39.
- [6] Hisashi K, Noriko S, Akiko H, et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris* [J]. Phytochemistry,1990,29(7):2351-2355.
- [7] 田艳,吴军,漆淑华,等. 银叶树的三萜成分研究[J]. 中

草药,2006,37(1):35-36.

- [8] 于德泉,杨俊山. 核磁共振波谱分析[M]. 第2版. 北京:化学工业出版社,1999:796.
- [9] 席芳. 板栗壳化学成分的研究[D]. 郑州:郑州大学,2007.
- [10] 周惠燕,章辉,李士敏. 竹叶化学成分研究 I [J]. 中国中药杂志,2005(24):1933-1934.
- [11] Frankel E N, Meyer A S. The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2000,80(13):1925-1941.
- [12] Wolfe K L, Kang X M, Dong M, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(18):8418-8426.
- [13] Song W, Derito C M, Liu M K, et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(11):6621-6629.

(责任编辑:尹 闯)