

文章编号:1673-1689(2006)01-0040-05

单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共同固定化

苏二正, 夏涛*, 宛晓春, 张正竹, 黄继轸

(安徽农业大学 农业部茶叶生物化学与生物技术重点开放实验室,安徽 合肥 230036)

摘要: 比较了海藻酸钠和壳聚糖两种载体及不同固定化方法对单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共同固定化效果,结果表明以海藻酸钠为载体,采用交联-包埋-交联固定化方法的效果最佳。对共同固定化条件进行了优化,可使单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的活力回收率分别达 67.3 %和 46.0 %。

关键词: 单宁酶; β -葡萄糖苷酶;海藻酸钠;壳聚糖;共同固定化

中图分类号:Q 55

文献标识码:A

Studies on the Co-immobilization of Tannase and β -glucosidase

SU Er-zheng, XIA Tao*, WAN Xiao-chun, ZHANG Zheng-zhu, HUANG Ji-zhen

(Key Lab of Tea Biochemistry & Biotechnology of Agriculture Ministry, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The effects of two kinds of carriers and four different kinds of immobilized methods on the co-immobilization of tannase and β -glucosidase were investigated in this work. The results showed that the best co-immobilization could be obtained by selecting sodium alginate as the immobilized carrier and using the crosslinking-embedding-crosslinking method. The conditions of co-immobilization were also optimized, under which the activity recoveries of tannase and β -glucosidase could reach 67.3 % and 46.0 %, respectively.

Key words: tannase; β -glucosidase;sodium alginate;chitosan;Co-immobilization

20 世纪 80 年代,罐装液态茶饮料在日本和中国台湾成功开发,现已迅速发展成为当今国际饮料市场的主流产品之一。但茶饮料生产的三大技术难题即混浊沉淀、汤色褐变、香气淡薄,至今仍未得到根本解决。茶饮料的混浊沉淀主要是由茶多酚与其他物质通过氢键、疏水键形成的凝絮团^[1],单宁酶能够切断茶多酚上的没食子酸酯键释放出游离的没食子酸,没食子酸的阴离子又能同茶黄素、茶红素竞争咖啡碱形成相对分子质量较小的水溶物,从而达到澄清茶汤的目的^[2]。目前单宁酶已作

为酶促转溶茶乳酪的专一酶类而广泛应用于茶饮料生产中。大量研究表明茶叶中富含键合态形式的糖苷类香气前体,对增进茶叶香气品质具有较大潜力^[3]。 β -葡萄糖苷酶对茶饮料有明显的增香效果,茶叶中单萜烯醇类香气如香叶醇、芳樟醇等就是在 β -葡萄糖苷酶的作用下由其糖苷前体水解释放产生^[4]。曾有研究报道将固定化单宁酶和固定化 β -葡萄糖苷酶用于茶饮料生产,并取得良好的除混和增香效果^[2,5]。本文尝试对单宁酶和 β -葡萄糖苷酶进行共同固定化,旨在应用于茶饮料生产中发挥

收稿日期:2005-03-15; 修回日期:2005-05-13.

基金项目:教育部重点科研课题项目(02067);安徽省优秀青年科技基金资助项目.

作者简介:苏二正(1976-),男,安徽巢湖人,发酵工程博士研究生,* 通讯作者.

除混与增香之双重功效,从而为纯茶风味的茶饮料生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

β -葡萄糖苷酶(Fluka), 12.4 U/mg; 单宁酶(Fluka), 239 U/g; 单宁酸(Sigma); 对硝基苯酚 β -D-葡萄糖苷 pNPG(Sigma); 戊二醛 GA; E Merck, 海藻酸钠; 广东汕头市西陇化工厂产品, 壳聚糖: 浙江省玉环县海洋生物化学有限公司生产, 其他试剂和药品均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 单宁酶活力的测定 参考 S Iibuchi^[6] 等方法, 略有改进。取一支 5 mL 道夫管为对照管, 加 1 mL 柠檬酸钠缓冲液(pH 值 5.0, 50 mmol/L)。取二支 5 mL 道夫管为测定管, 加入 0.5 mmol/L 的单宁酸溶液 1 mL。30 °C 预热 5 min 后, 向三支道夫管分别加入已预热的单宁酶溶液 100 μ L, 分别于 t_1 、 t_2 (间隔 10 min) 时间取 100 μ L 反应液加入 4 mL 无水乙醇中终止反应, 于 310 nm 下进行比色。根据单宁酸的光密度减少值计算单宁酶活力。

固定化单宁酶的活力测定方法与液酶基本相同, 不同处在于先向 3 支道夫管中加 0.1 g 固定化酶。以每分钟水解减少 0.01 μ mol 底物单宁酸所需要的酶量定义为一个酶活单位。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶的活力测定 参考张正竹^[7] 等方法, 略作改变。取 3 支 5 mL 道夫管分别设定为对照管、测定管, 加入 0.9 mL 的柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0, 50 mmol/L) 和 0.05 mL β -葡萄糖苷酶酶液。对照管于 100 °C 水浴中处理 10 min 灭活 β -葡萄糖苷酶, 测定管于 35 °C 的水浴中预热 5 min。向 3 支管中各加 0.05 mL 经 35 °C 预热的 10 mmol/L pNPG, 精确反应 10 min, 加 1 mL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 405 nm 处测吸光值。

固定化 β -葡萄糖苷酶的活力测定方法与液酶基本相同, 不同处在于向 3 支道夫管中加 1 mL 柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0, 50 mmol/L) 和 0.1 g 固定化酶。以每 min 水解产生 0.01 μ mol 对硝基苯酚的酶量定义为一个酶活力单位。

1.2.3 以海藻酸钠为载体对单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共同固定化 直接包埋法: 取单宁酶和 β -葡萄糖苷酶各 2.5 mL (酶液质量浓度均为 0.1 mg/mL, 下文同), 按体积比为 0.75 : 1 的比例加入 3 g/dL 的海藻酸钠溶液 6.7 mL, 充分混匀后, 在振荡器上振荡 0.5 h。用 5 号针头注入 500 mL 2 g/dL 的

CaCl_2 溶液中, 滤出小球体, 更换 CaCl_2 溶液再浸泡硬化 1 h, 滤出小球体, 冰箱内用吸水纸吸干表面水分得共固定化酶。

包埋-交联法: 取单宁酶和 β -葡萄糖苷酶各 2.5 mL, 按体积比 0.75 : 1 的比例加入 3 g/dL 的海藻酸钠溶液 6.7 mL, 充分混匀后, 在振荡器上振荡 0.5 h。用 5 号针头注入 500 mL 2 g/dL 的 CaCl_2 溶液中, 滤出小球体, 更换 CaCl_2 溶液, 再浸泡硬化 1 h, 滤出小球体在冰箱内用体积分数 0.025% 戊二醛交联 2.5 h, 再滤出小球体并用柠檬酸钠缓冲液冲洗, 在冰箱内用吸水纸吸干表面水分得共固定化酶。

交联-包埋法: 取单宁酶和 β -葡萄糖苷酶各 2.5 mL, 按体积比 0.75 : 1 的比例加入 3 g/dL 的海藻酸钠溶液 6.7 mL, 充分混匀后, 加体积分数为 2.5% 的戊二醛 1.3 mL, 在振荡器上振荡 0.5 h, 于冰箱中静置交联 3 h。用 5 号针头注入 500 mL 2 g/dL 的 CaCl_2 溶液中, 滤出小球体, 更换 CaCl_2 溶液再浸泡硬化 1 h, 再滤出小球体并用柠檬酸钠缓冲液冲洗, 在冰箱内用吸水纸吸干表面水分得共固定化酶。

交联-包埋-交联法: 取单宁酶和 β -葡萄糖苷酶各 2.5 mL, 按体积比为 0.75 : 1 的比例加入 3 g/dL 的海藻酸钠溶液 6.7 mL, 充分混匀后, 加体积分数为 2.5% 的戊二醛 1.3 mL, 在振荡器上振荡 0.5 h, 于冰箱中静置交联 3 h。用 5 号针头注入 500 mL 2 g/dL 的 CaCl_2 溶液中, 滤出小球体, 更换 CaCl_2 溶液, 再浸泡硬化 1 h, 滤出小球体在冰箱内用体积分数 0.025% 戊二醛交联 2.5 h, 再滤出小球体并用柠檬酸钠缓冲液冲洗, 在冰箱内用吸水纸吸干表面水分得共固定化酶。

1.2.4 以壳聚糖为载体对单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共同固定化 壳聚糖载体的预处理: 5 g 80 目的壳聚糖加入 500 mL 体积分数为 2% 的醋酸溶液中, 充分搅拌成透明胶体, 再缓慢加入 5 g/dL 的 NaOH 溶液调节 pH 至中性, 得絮凝沉淀, 用去离子水冲洗、抽滤, 在真空干燥箱中 50 °C 干燥得预处理载体。

交联载体的制备: 预处理载体 2 g, 加入 50 mL 体积分数为 5% 的戊二醛溶液中, 4 °C 下缓慢搅拌 4 h, 于冰箱内静置 8 h, 柠檬酸钠缓冲液冲洗得交联载体。

直接吸附法: 预处理载体 0.5 g, 加 5 mL pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液、2.5 mL 单宁酶、2.5 mL β -葡萄糖苷酶, 4 °C 缓慢搅拌 4 h, 于 4 °C 冰箱内静置吸附 8 h, 抽滤柠檬酸钠缓冲液冲洗得共固定化酶。

吸附-交联法:预处理载体 0.5 g,加 5 mL pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液、2.5 mL 单宁酶、2.5 mL β -葡萄糖苷酶,4 ℃ 缓慢搅拌 4 h,于 4 ℃ 冰箱内静置吸附 8 h 后抽滤。再加入体积分数 5% 的戊二醛 12.5 mL,缓慢搅拌 4 h,4 ℃ 冰箱静置交联 8 h,抽滤柠檬酸钠缓冲液冲洗得共固定化酶。

交联-吸附法:交联载体 0.5 g,加 5 mL pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液、2.5 mL 单宁酶、2.5 mL β -葡萄糖苷酶于 4 ℃ 缓慢搅拌 4 h 后再于 4 ℃ 冰箱内静置吸附 8 h,抽滤柠檬酸钠缓冲液冲洗得共固定化酶。

交联-吸附-交联法:交联载体 0.5 g,加 5 mL pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液、2.5 mL 单宁酶、2.5 mL β -葡萄糖苷酶,4 ℃ 缓慢搅拌 4 h 后,于 4 ℃ 冰箱内静置吸附 8 h。加入 2.5 mL 体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液使体系的戊二醛体积分数最终达到 0.5%,缓慢搅拌 4 h,4 ℃ 冰箱静置交联 8 h,抽滤柠檬酸钠缓冲液冲洗得共固定化酶。

2 结果与分析

2.1 不同载体和固定化方法制备共固定化酶的效果比较

选用两种常用于酶固定化的载体海藻酸钠和壳聚糖,比较了它们对单宁酶和 β -葡萄糖苷酶的共同固定化效果。研究结果显示,海藻酸钠对两种酶的共同固定化效果明显优于壳聚糖,固定化方法以交联-包埋-交联最优(表 1)。故本文选用海藻酸钠为载体,采用交联-包埋-交联法进一步研究两种酶的共同固定化。

表 1 不同载体和固定化方法制备共固定化酶的效果
Tab. 1 Effects of different carriers and immobilizing methods on the activity of co-immobilized enzymes

载体	固定化方法	单宁酶的活力回收率/%	β -葡萄糖苷酶的活力回收率/%
海藻酸钠	直接包埋	47.53	15.43
	包埋-交联	62.99	18.24
	交联-包埋	58.50	18.97
	交联-包埋-交联	76.6	31.37
壳聚糖	直接吸附	52.73	6.93
	吸附-交联	42.1	12.0
	交联-吸附	37.5	13.2
	交联-吸附-交联	29.65	25.1

2.2 以海藻酸钠为载体进行两种酶共同固定化的条件优化

2.2.1 前交联戊二醛体积分数的影响 按 1.2.3

中交联-包埋-交联的方法(以下相同),分别调整前交联时戊二醛体积分数为 0.25%,0.50%,0.75%,0.10%,1.25%,1.50%,1.75%,2.0%,其它条件和步骤不变。试验结果显示 β -葡萄糖苷酶的活力回收率随戊二醛体积分数的增加而增加,到 1.0% 时达到最大,然后随着戊二醛浓度的增加而下降。单宁酶的活力回收率也呈现相同变化趋势,到戊二醛体积分数 1.25% 时达最大(图 1)。尽管 β -葡萄糖苷酶的最大活力回收率出现在戊二醛体积分数 1.0%,但其在 1.25% 的活力回收率也超过 96.0%。综合考虑两种酶的活力回收率,本试验选用前交联戊二醛最适体积分数为 1.25%。

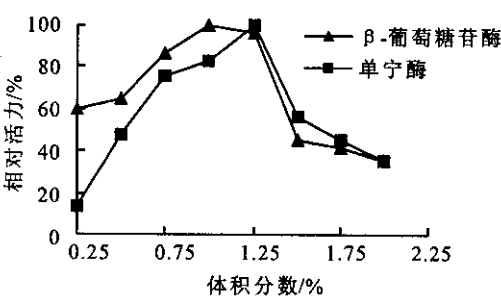


图 1 前交联戊二醛体积分数对共固定化酶活力的影响
Fig. 1 Effects of glutaraldehyde concentration on the activity of co-immobilized enzymes in the first cross-linking

2.2.2 前交联时间的影响 采用上述已优化条件,在冰箱内的静置交联时间分别设为 1~6 h。试验结果显示,两种酶的活力回收率均随着交联时间的增加而增大,到 4 h 时达最大,5 h 后活力回收率显著下降(图 2)。本试验选用 4 h 作为最适前交联时间。

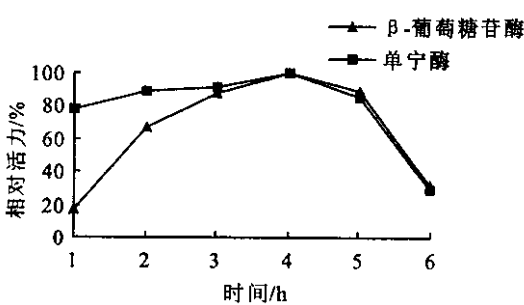


图 2 前交联时间对共固定化酶活力的影响
Fig. 2 Effects of the first cross-linking time on the activity of co-immobilized enzymes

2.2.3 前交联温度的影响 采用上述已优化条件,分别在冰箱中 4, 10, 20, 30, 40 ℃ 进行前交联试验。由图 3 可以看出前交联温度对 β -葡萄糖苷酶的活力回收率影响并不显著,在 30℃ 以内均表现出较高水平,相对活力均达 90.0% 以上,而对单宁酶的活力回收率影响较显著,10, 40 ℃ 仅相当于 20 ℃ 的

50.0 %左右。兼顾两种酶活力,本试验选用 20 $^{\circ}\text{C}$ 作为最适前交联温度。

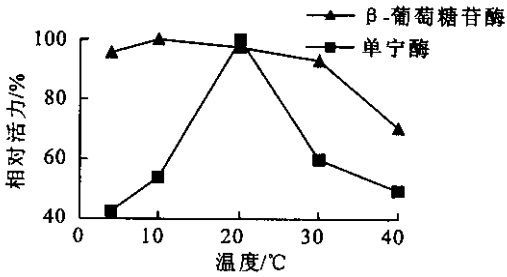


图 3 前交联温度对共固定化酶活力的影响
Fig. 3 Effects of the first cross-linking temperature on the activity of co-immobilized enzymes

2.2.4 海藻酸钠溶液质量浓度的影响 采用上述已优化条件,分别选用 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 g/dL 的海藻酸钠溶液质量浓度进行试验。由图 4 可见随海藻酸钠溶液质量浓度的提高,两种酶的活力回收率增加,到 3.0 g/dL 达最大。试验操作难易程度与酶的活力回收率呈相似的变化规律,在 3.0 g/dL 海藻酸钠溶液浓度以内操作较易,大于 3.0 g/dL 时操作很难。故本试验选用 3.0 g/dL 作为海藻酸钠溶液的最适质量浓度。

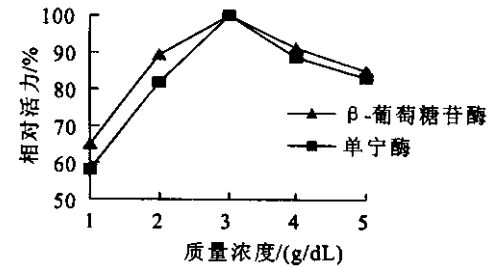


图 4 海藻酸钠溶液质量浓度对共固定化酶活力的影响
Fig. 4 Effects of alginate sodium concentration on the activity of co-immobilized enzymes

2.2.5 硬化剂 CaCl_2 质量浓度的影响 采用上述已优化条件,分别采用 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 g/dL 的 CaCl_2 溶液质量浓度进行试验。研究结果显示 CaCl_2 溶液质量浓度对两种酶的活力回收率影响很小,且随着浓度的变化并不呈现规律性的变化。在实际操作中除了 1.0 g/dL CaCl_2 溶液质量浓度所得胶珠强度稍差以外,其它质量浓度下所得的胶珠机械强度都很高,因此本试验选用 2.0 g/dL 作为 CaCl_2 溶液最适质量浓度。

2.2.6 硬化时间的影响 采用上述已优化条件,将硬化时间分别设为 1,2,3,4,5 h 进行试验。由图 6 可以看出 CaCl_2 溶液的硬化时间对两种酶的活力回收率影响很小,且随着时间的变化并不呈现规律性变化,故在本试验中采用 2 h 作为最适硬化时间。

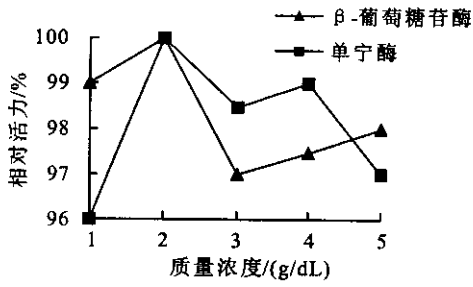


图 5 CaCl_2 质量浓度对共固定化酶活力的影响
Fig. 5 Effects of CaCl_2 concentration on the activity of co-immobilized enzymes

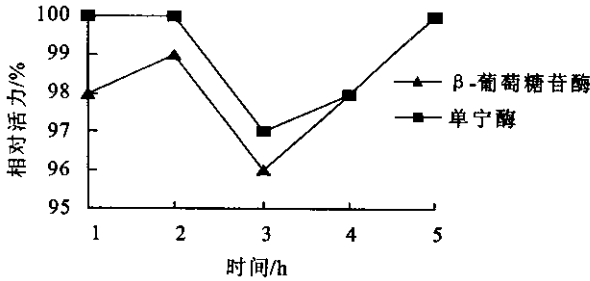


图 6 溶液的硬化时间对共固定化酶活力的影响
Fig. 6 Effects of stiffening time of CaCl_2 solution on the activity of co-immobilized enzymes

2.2.7 后交联戊二醛体积分数的影响 采用上述已优化条件,分别采用体积分数 0.025,0.05,0.075,0.10,0.125,0.15% 的戊二醛进行后交联试验。研究结果显示(图 7),后交联戊二醛体积分数对单宁酶的活力回收率影响较小,在 0.05% 至 0.125% 范围内相对活力均达到 90.0% 以上,而对 β -葡萄糖苷酶的活力影响较显著,在 0.025% 和 0.125% 的活力回收率仅为 0.075% 的 50.0% 左右。综合考虑两种酶活力,本试验采用 0.075% 作为后交联戊二醛最适体积分数。

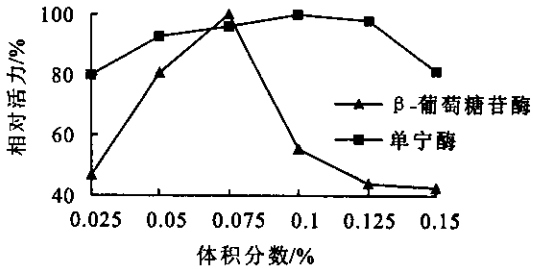


图 7 后交联戊二醛体积分数对共固定化酶活力的影响
Fig. 7 Effects of glutaraldehyde concentration on the activity of co-immobilized enzymes in the second cross-linking

2.2.8 后交联温度的影响 采用上述已优化条件,分别在冰箱中(4,10,20,30,40 $^{\circ}\text{C}$ 进行后交联试验。试验结果可以看出(见图 8),在 10 $^{\circ}\text{C}$ 时 β -葡萄糖苷酶的活力回收率最高,以后随着温度的上升回收率下降。而单宁酶的最大活力回收率在 20 $^{\circ}\text{C}$,

但其在 10 ℃ 的活力回收率达到 20 ℃ 的 96.8 %。所以本试验采用 10 ℃ 作为最适后交联温度。

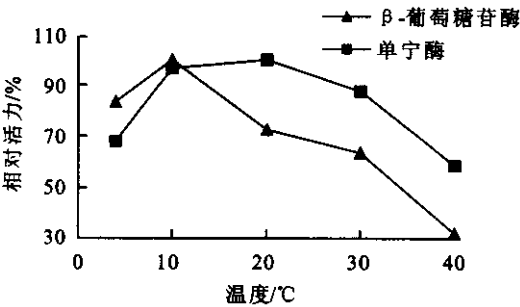


图 8 后交联温度对共固定化酶活力的影响

Fig. 8 Effects of the second cross-linking temperature on the activity of co-immobilized enzymes

2.2.9 后交联时间的影响 采用上述已优化的条件,后交联时间分别设定为 1,2,3,4,5 h。研究结果可见,随后交联时间的延长,两种酶的活力回收率均增加,到 3 h 时达最大(图 9)。故本试验采用 3 h 作为最适后交联时间。

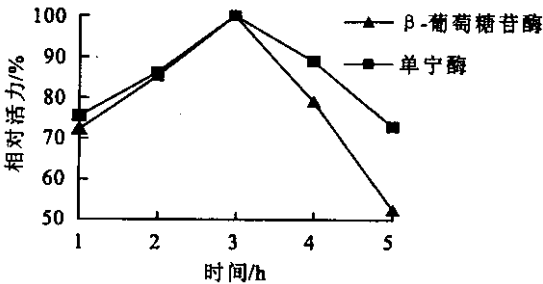


图 9 后交联时间对共固定化酶活力的影响

Fig. 9 Effects of the second cross-linking time on the activity of co-immobilized enzymes

采用最优固定化条件对单宁酶和 β-葡萄糖苷酶进行共固定化,结果可使单宁酶和 β-葡萄糖苷酶的活力回收率分别达 67.3%和 46.0%。

3 结 论

海藻酸钠和壳聚糖是固定化酶的常用载体。本文探讨了两种载体对单宁酶和 β-葡萄糖苷酶的共同固定化效果,比较了这两种载体的不同固定化方法,研究结果表明海藻酸钠对两种酶的共同固定化效果明显优于壳聚糖,且以交联-包埋-交联法的共同固定化效果最佳。对共同固定化条件进行了优化,得出最优固定化条件为:单宁酶和 β-葡萄糖苷酶各 2.5 mL,按体积比为 0.75 : 1 比例加入 3 g/dL 的海藻酸钠溶液 6.7 mL,充分混匀后加体积分数 2.5% 的戊二醛使其在溶液中的最终体积分数达到 1.25%,在振荡器上振荡 0.5 h,于 20 ℃ 静置交联 4 h。用 5 号针头注入 2.0 g/dL 的 CaCl₂ 溶液中,滤出小球体,更换 CaCl₂ 溶液后在冰箱内浸泡硬化 2 h,滤出小球体,用体积分数为 0.075% 戊二醛溶液在 10 ℃ 交联 3 h,再滤出小球体并用缓冲液冲洗,然后在冰箱内用吸水纸吸干水分得共固定化酶。

参考文献:

[1] 苏二正,夏涛. 饮料中蛋白质-多酚混浊的研究进展[J]. 食品科技, 2004,(3):70—73.

[2] 周纪东. 黑曲霉产单宁酶的研究和有机相中固定化黑曲霉细胞合成没食子酸丙酯的初探[D]. 杭州:浙江大学, 2002.

[3] 夏涛,童启庆. 茶叶香气前驱体研究进展[J]. 茶叶, 1996,22(1):14—17.

[4] 张正竹. 绿茶主要香气物质的糖苷类前体研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2000.

[5] 李平,宛晓春,丁霄霖. 丝素蛋白膜固定 β-葡萄糖苷酶及其改良食品风味的研究[J]. 菌物学报, 2004,23(1):73—78.

[6] S Iibuchi, Y Minoda, K Yamada. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms part II, a new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption[J]. J Agr Biol Chem, 1967,(31):513—518.

[7] 张正竹,李英波,苏二正,等. β-葡萄糖苷酶的蚕丝素蛋白膜固定化及其性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2004,(6):6—9.

(责任编辑:杨 萌)