

氨基甲酸乙酯降解酶的固定化研究

周雪燕, 石森, 康宁, 王壹, 王晓茜, 郭晓丰, 王斌, 史学伟*

(石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 为了制备固定化酶, 以体积分数 5% 的戊二醛溶液与壳聚糖交联 8 h 制备的载体对氨基甲酸乙酯(EC)降解酶粗酶液进行固定化, 并对固定化 EC 降解酶的酶学性质展开分析。结果表明: 固定化 EC 降解酶的最适温度和最适 pH 分别是 42 °C 和 3.6; 该酶在乙醇体积分数 7%~25% 的范围内和使用次数在 8 次以内的酶活均保持在 50% 以上, 说明该固定化酶的乙醇耐受范围广, 催化活性高; 而且分别在 4 °C 和 20 °C 下贮藏 6 周后的酶活损失率分别不足 30% 和 40%。基于以上特性, 为了考察实际应用效果, 采用双水相萃取结合气相色谱-质谱联用(GC-MS)法和顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC/MS)法分析了游离酶和固定酶对“美乐”葡萄酒中 EC 和挥发性风味物质的影响。结果表明, 固定化 EC 降解酶的 EC 去除率达 30.90%, 是游离酶的 81.53%; EC 降解酶的处理方式对葡萄酒中挥发性物质的相对含量没有显著影响, 只是引起了香气物质种类的减少和香气成分的改变, 但固定化酶对挥发性风味物质的不利影响远低于游离酶。

关键词: 固定化; 氨基甲酸乙酯降解酶; 气相色谱-质谱联用技术(GC/MS); 挥发性风味物质
中图分类号: TS 201.1 文章编号: 1673-1689(2021)06-0065-11 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.06.009

Study on Immobilization of Urethanase

ZHOU Xueyan, SHI Miao, KANG Ning, WANG Yi,
WANG Xiaoxi, GUO Xiaofeng, WANG Bin, SHI Xuewei*
(College of Food, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: In order to prepare immobilized enzyme, the crude urethanase was immobilized using the carrier cross-linked by 5% glutaraldehyde solution with chitosan for 8 h and the enzymatic properties of immobilized urethanase were analyzed. The results showed that the optimal temperature and pH of immobilized urethanase were 42 °C and pH 3.6, respectively. The enzyme activity could be kept above 50% within the range of 7%~25% ethanol or reused within 8 times, which indicated that the immobilized enzyme had wide ethanol tolerance range and high catalytic activity. The enzyme activity loss rate was less than 30% or 40% when stored at 4 °C or 20 °C for 6 weeks. Based on the above characteristics, the effect of free and immobilized enzyme on ethyl carbamate(EC) and volatile

收稿日期: 2020-05-13

基金项目: 八师石河子市科技计划项目(2020GY07); 兵团重点领域科技攻关项目(2019AB025, 2020AB014)。

* 通信作者: 史学伟(1980—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术与葡萄酒工程方面研究。

E-mail: 376787802@qq.com

flavor substances in 'Merlot' wine were analyzed by aqueous two-phase extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry method and headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS) method in order to investigate the practical application effect. The results showed that the EC removal rate of immobilized urethanase reached 30.90%, which was 81.53% of free enzyme. The treatment of urethanase had insignificant effect on volatile substances content in wine, and only caused the reduction of aroma species and changes of aroma components. However, the adverse effects of immobilized enzymes on volatile flavor substances were much less than those of free enzyme.

Keywords: immobilization, urethanase, gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), volatile flavor substances

固定化生物技术是使水溶性的细胞/酶与水不溶载体在物理或化学方法的作用下成为水不溶性细胞/酶的一类技术。酶固定化技术是用固体材料将游离的酶束缚或限制于一定区域,但仍具有催化活性并可重复使用的一种技术,其优点是:1)与游离酶相比,酶稳定性更高;2)可重复使用,节约资源;3)易于从目标物中实现分离;4)酶活性保留时间长;5)环保,对产物的影响较小。但也存在以下几点不足:对固定化技术要求高,增加成本;制备过程酶活受影响;固定化酶的效果受多种因素影响因而存在较大差异。

自1910年酶的固定化研究开始,酶的固定化技术也得到了很好的发展,尤其是酶的固定化新型载体层出不穷。人们常根据不同的应用需求选择不同的固定化载体,不仅要求它的固定化性能好,还有一些实际应用的要求^[1-4]。比如食品领域就要求高安全性能、无污染性、经济实用性等。根据固定化载体的组成成分可将其基本分为以下3大类:无机载体(硅藻土、活性炭、多孔陶瓷、玻璃等^[5-6])、天然高分子材料(壳聚糖、淀粉、海藻酸钠、纤维素等^[7-8])和合成有机材料(常见的有聚甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、氧化石墨烯等^[3,9-10])。依据酶与载体的结合方式可将酶的固定化方法分为4类:吸附法是依靠带电的酶与载体之间的静电作用,使酶吸附于载体表面上的一种方法^[11-12]。包埋法是将酶用物理的方法包埋在各种载体(网格或半透膜)内,此法是目前应用最多的一种理想的固定化方法^[12]。交联法是借助双功能试剂使酶分子和载体之间发生交联的一种固定化方法,此法固定的酶具有良好的稳定性,常用的双功能试剂有戊二醛、甲醛、京尼平、双偶氮苯

等^[13]。共价偶联法是借助共价键将载体的功能基团(芳香氨基、羟基、羧甲基等)和酶的活性非必需侧链基团(羧基、巯基、羟基、酚羟基和咪唑基等)进行偶联的一种方法^[14]。

在已有的报道中对固定化酶有如下研究:彭虹旋等以氨基多糖为材料,戊二醛为交联剂制备了表面光滑氨基多糖微球载体和多孔氨基多糖微球载体。以此载体对脲酶进行固定化,结果表明:多孔微球载体的固定化效率和固定化酶活力均高于表面光滑微球载体,因其固定的酶量更多,故表现出更高的酶活力^[15]。2015年,王简之等使用磁性复合微球对脂肪酶进行固定化,得到的固定化脂肪酶在热稳定性、酸碱耐受性、重复使用率方面有所提升。在pH 4.0,共价固定6 h后,固定化脂肪酶的酶活损失低于40%^[16]。有研究者将甲基丙烯、间苯二胺水凝胶、壳聚糖和氧化石墨烯反应制备复合材料,制得的复合凝胶在机械强度和吸附能力方面都有所提升^[17]。

固定化酶在提高食品利用率和营养价值方面有突出贡献,比如固定化淀粉酶可以将淀粉分解为易被人体吸收的短链小分子糖^[18-19];固定化脂肪酶可用于代可可脂的脱脂;而研究较多的固定化脲酶已应用于酒精饮料中尿素和EC的去除,可以提升发酵饮品的饮用安全性^[20-21]。为了充分发挥脲酶的实用价值,国内外研究者已对脲酶的固定化进行了不少探索^[14,20,22],而直到近几年,国内学者才逐渐展开对EC降解酶的固定化研究。赵雅敏对筛选到的产EC降解酶的菌株LBMAE-8进行研究,发现对该菌进行细胞固定化处理,壳聚糖/海藻酸钙微胶囊一步法比海藻酸钙包埋法制得的固定化细胞的酶活回收率高^[23]。张迁等将来自*P. rettgeri* JN-B815的

酸性脲酶经乙醇沉淀、离子交换等纯化后用壳聚糖微球进行固定化,制备的固定化酸性脲酶的温度稳定性、pH 稳定性及对黄酒中尿素和 EC 的去除率均有所提升^[24]。刘小锋使用氧化石墨烯(GO)和壳聚糖(CS)复合微球对酸性脲酶进行固定化,在流化床反应器中考察固定化酸性脲酶对黄酒的处理效果,该酶对黄酒中尿素的去除率高达 93.85%,而对 EC 的去除率达到 57.46%^[25]。

固定化酶的酶活力、底物亲和力、米氏常数、反应活化能等性质会由于酶的性质、载体材料的性质及包埋条件的不同而发生改变,因此,一般对载体材料和固定化方法经过实验摸索才能确定最佳方案。通过筛选产 EC 降解酶的微生物并优化其产酶条件,从而获得一定数量的 EC 降解酶并将其应用于国内酒精饮料中 EC 含量的降低成为目前研究的一个热点。

作者围绕固定化 EC 降解酶的固定条件、酶学性质及应用展开研究,为保障发酵饮品的安全性提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选取经活化和优化培养的 CAT-4 (*Kluyveromyces marxianus*) 酵母菌株作为出发菌株,取其发酵液通过反复冻融结合超声破碎法得到 EC 降解酶粗酶液,待用。

乙醇(色谱纯):天津致远公司产品;氨基甲酸乙酯、正丙基甲酸酯:Sigma-aldrich 公司产品;其余溶剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DVB/CAR/PDMS (50/30 μm)SPME 萃取头、7890 B-5977 A 气相色谱质谱联用仪:美国 Agilent 公司产品;FRESCO 21 高速冷冻离心机:Thermo Fisher Scientific 公司产品;AS-4S 超声细胞破碎仪:宁波新芝生物技术股份有限公司产品;722 型可见分光光度计:上海佑科仪器仪表有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 微球载体的制备及交联条件的优化

1)滴入法^[26]制备壳聚糖微球 称取 0.5 g 壳聚糖溶解于 50 mL 体积分数 1.0%的醋酸溶液中,置于摇床上活化 2 h,将活化的壳聚糖用注射器逐滴加入含有质量分数 20% NaOH 和体积分数 30%

CH₃OH 的凝结液中,挑选出粒度均匀、形状规整的壳聚糖微球,用去离子水洗至中性,冷藏备用。

2)戊二醛交联壳聚糖载体的制备 将上述制备的微球置于体积分数 6% 戊二醛溶液中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中振荡 6 h。反应完成后,用去离子水反复洗涤,以去除剩余的戊二醛,直至洗涤液在 280 nm 处的吸光度小于 0.01,即得戊二醛交联壳聚糖微球载体。

3)粗酶液的制备及 EC 降解酶的固定化 取一定量戊二醛交联壳聚糖微球载体,加入适量 CAT-4 菌株产生的粗酶液,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床上振荡 1 h。分离弃去上层溶液,用去离子水反复洗涤沉淀物,得到后续实验所用的固定化 EC 降解酶。

4)戊二醛体积分数对载体制备的影响 配制体积分数 2%、3%、4%、5%、6% 和 7% 的戊二醛溶液,用注射器将冷藏的壳聚糖微球缓慢滴加至不同体积分数的戊二醛溶液中,使其形成直径均匀的微球,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中振荡 6 h。反应结束后,用去离子水反复洗涤,直至洗涤液在 280 nm 处的吸光度小于 0.01,即得戊二醛交联壳聚糖微球载体,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。用羟胺法^[27]测其悬挂醛基质量分数。

5)戊二醛交联时间对载体制备的影响 用注射器将冷藏的壳聚糖微球缓慢滴加至体积分数为 6%的戊二醛溶液中,使其形成形状规整、均匀的微球,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中振荡 2、4、6、8、10 h。其余操作同 1.3.1 中 4)。

1.3.2 酶活力的测定 分别将 1 mL 粗酶液或 1 g 固定化 EC 降解酶和超纯水加到 2 支装有 1 mL 质量分数 3% EC 溶液的 10 mL 比色管中,将比色管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应 15 min 后加入 1 mL 终止剂,充分混匀后依次加入各 1 mL 的显色剂 I 和显色剂 II,强烈振荡后继续置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下保温 20 min,用超纯水定容至刻度线,测定并记录 $A_{625\text{nm}}$ 值。酶活计算公式如下:

$$M = \Delta A_{625\text{nm}} \times n \times k \times 10 / 15$$

式中: M 为酶活力; $\Delta A_{625\text{nm}}$ 为反应结束后空白对照与样品测定的光密度值之差; n 为待测样液的稀释倍数; k 为 NH_4^+ 标准曲线中斜率的倒数^[28]。

1.3.3 EC 去除率的测定

1)相图的制作 参考文献^[29]使用浊度滴定法测定双水相体系的二元曲线。具体做法如下:将乙

醇逐滴加入盛有已知浓度 K_2HPO_4 溶液的玻璃容器中,直到在 25 °C 时形成界限清晰的两相体系。记录此时乙醇和 K_2HPO_4 组成。在此基础上,将去离子水滴加到玻璃容器中,得到一个清晰的单相体系,继续滴加乙醇,再形成两相体系,如此反复。接着用不同质量浓度的 K_2HPO_4 重复上述步骤,记录数据。

2) 乙醇和 K_2HPO_4 双水相体系(ATPS)提取“美乐”葡萄酒中 EC 图 1 显示了用乙醇和 K_2HPO_4 双水相体系提取 EC 的原理。以含 50 $\mu\text{g/L}$ EC 和 100 $\mu\text{g/L}$ 正丙基甲酸酯(PC)的体积分数 55% 乙醇溶液作为模型溶液,用酒石酸和 NaOH 调节 pH 并记录当前的 pH。

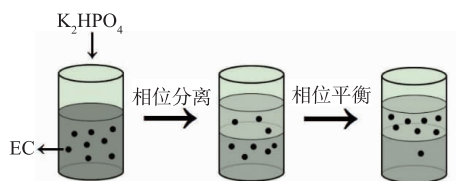


图 1 用 ATPS 提取“美乐”葡萄酒中 EC 的原理图

Fig. 1 Schematic diagram for extracting EC in ‘Merlot’ wine using ATPS

量取 5 mL 模型溶液和过量的 K_2HPO_4 固体加入离心管中,混匀后以 4 000 r/min 离心 5 min,以确保两相完全分离。将离心管置于 25 °C 恒温水浴中持续 3.5 h 达到相平衡。记录顶相体积并取 1.5 mL 的顶部溶液与 150 mg 无水硫酸镁完全混合,在转速为 12 000 r/min 的条件下离心 1 min。最后,将 1 mL 上清液通过 0.45 μm 膜过滤,用于 GC-MS 分析。

3) EC 的 GC-MS 检测^[30] 使用 Agilent 7890B GC-5977A MS 系统进行 EC 的定量和定性分析。气相色谱柱为 Carbowax 20M (30 m \times 0.25 μm \times 0.25 mm),以氦气为载气,流量为 1.0 mL/min,进样口温度 200 °C,检测器温度 250 °C。柱温采用程序升温:初始温度 50 °C 保留 1 min,以 3 °C/min 升至 180 °C 保留 1 min,然后以 20 °C/min 升至 220 °C,保留 10 min。

质谱条件:以氦气为载气,采用电子轰击源(EI)的电离模式,电子能量 70 eV;四级杆温度 150 °C;离子源温度 230 °C;选取离子监测(SIM)模式,选择质荷比(m/z)分别为 62、74 和 89 作 EC 的监测离子, m/z 为 62 作定量离子;选择 m/z 分别为 59、62 和 89 来监测 PC, m/z 为 62 作定量离子。

1.3.4 挥发性风味物质的检测

1) 香气化合物提取 根据顶空固相微萃取法(HS-SPME)改进的方法^[31]提取挥发性风味化合物,并用 GC/MS 进行分析。将 10 mL “美乐”葡萄酒样品和 3.6 g NaCl 放入 15 mL 萃取瓶中,再加入 20 μL 20 mg/L 的 3-辛醇标准溶液。萃取瓶用内衬密封,样品在 45 °C 下平衡 20 min,微萃取在 45 °C、500 r/min 的搅拌下持续 60 min。萃取结束将萃取头插入进样口解吸 5 min。

2) 色谱条件 用 Agilent 7890 B 气相色谱仪与 5977 A 质谱仪进行 GC-MS 分析。色谱柱型号 HP-Innowax column 柱(60 m \times 2.5 mm \times 0.25 μm),载气是流量为 1 mL/min 的氦气,进样口温度 230 °C。柱温采用程序升温:初始温度 50 °C 保留 5 min,以 3 °C/min 升至 125 °C 保留 3 min,然后以 2 °C/min 升至 180 °C 保留 3 min,最后以 15 °C/min 升至 230 °C 保留 15 min。

质谱仪在电子轰击源(EI)的电离模式下运行,使用间隔为 0.2 s 的全扫描模式(扫描范围 m/z 40~450),离子源温度 200 °C^[32]。

定性和定量分析:通过将各组峰中的化合物与 NIST14.L 谱库的标准化合物进行匹配,并将得到的质谱和保留指数(RI)与 NIST14.L 谱库中的标准化合物进行比较。用内标法计算各组分的相对含量^[33],结果表示为 3 个重复的“美乐”葡萄酒样品的平均值 \pm 标准差。

1.3.5 数据分析 每组实验重复 3 次,用 Excel 2016 对数据进行统计分析,结果表示为平均值 \pm 标准差($X\pm SD$)。采用 Origin Pro 8.5 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖载体交联条件的优化结果

2.1.1 交联剂体积分数对载体制备的影响 壳聚糖微球载体悬挂醛基的数量与其固定化酶能力的强弱有关。不同体积分数的戊二醛对壳聚糖微球载体上悬挂醛基质量分数的影响见图 2。

由图可知,在一定范围内,随着戊二醛溶液体积分数的增加,载体上的悬挂醛基质量分数呈上升趋势,但是当戊二醛溶液体积分数达到 5% 时,载体上悬挂醛基质量分数达 2.4%,之后随戊二醛体积分数增加,载体上悬挂醛基反而趋于平稳。使用不同加酶量,测得数据与此一致。结果说明,体积分数

5%的戊二醛溶液已经可以提供足够多数量的醛基与壳聚糖载体上的氨基发生交联反应,此时载体对酶的固定量达到最大^[34]。因此载体制备时选用体积分数为5%的戊二醛溶液作交联剂即可。

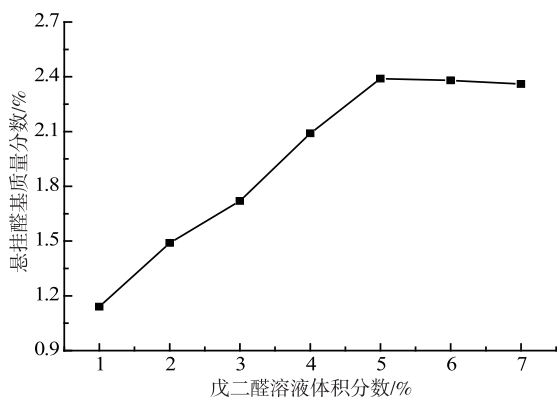


图2 戊二醛溶液体积分数对悬挂醛基的影响

Fig. 2 Impact of glutaraldehyde concentration on the suspended aldehyde group

2.1.2 交联时间对载体制备的影响 如图3所示,在2~8 h范围内,载体上的悬挂醛基随交联时间的增加而增加;当交联时间达到8 h后,悬挂醛基的质量分数基本保持不变。说明8 h的交联时间足以使戊二醛溶液中的醛基与载体上的氨基充分反应,使载体对酶的固定量最大。因此,选择8 h作为壳聚糖微球载体和戊二醛溶液的交联时间。

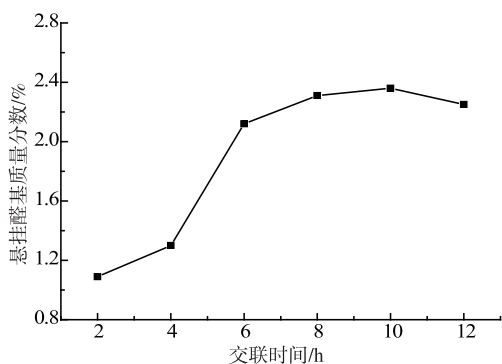


图3 交联时间对悬挂醛基的影响

Fig. 3 Impact of cross-linking time on the suspended aldehyde group

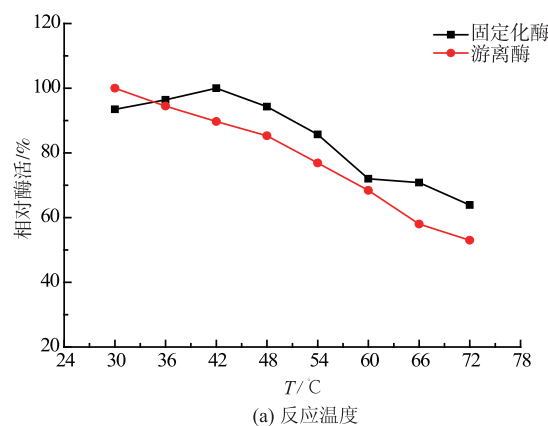
2.2 固定化 EC 降解酶的酶学性质

2.2.1 固定化 EC 降解酶的最佳反应温度及其稳定性 如图4所示,通过游离酶和固定化酶在30、36、42、48、54、60、66 °C和72 °C条件下的酶活结果可

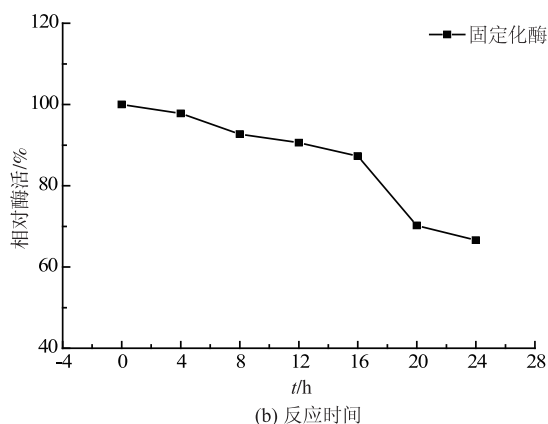
知,它们的最适温度分别为30 °C和42 °C。固定化酶在30~42 °C酶活性逐渐增高,最适温度比游离酶略高;在42 °C以后降解EC能力逐渐降低,与酶活呈下降趋势的游离酶变化基本一致;但固定化酶的酶活在42~72 °C均高于游离酶。

出现最适温度转移可能是由于EC降解酶的空间结构受到固定化载体的影响而略有改变,尤其是在42 °C以后,固定化EC降解酶的空间结构较为稳定,催化底物能力比游离酶略高。也有其他研究结果表明固定化脲酶与游离酶的最适催化温度有所差异^[35-36],但二者的催化效果并不存在显著差异。

稳定性结果显示,固定化EC降解酶在42 °C条件下存放24 h后相对酶活仍能达到60%以上,说明固定化EC降解酶能够耐受一定范围的温度,对环境的适应性较好,在室温环境下无需低温保护,是一种环境友好型固定化酶。



(a) 反应温度



(b) 反应时间

图4 固定化 EC 降解酶的最适温度及其稳定性

Fig. 4 Optimal temperature and its stability of immobilized urethanase

2.2.2 固定化 EC 降解酶的最适 pH 及其稳定性 从图 5 可以看出,在 pH 为 3.0、3.3、3.6、3.9、4.2、4.5 和 4.8 的条件下,游离酶和固定化酶催化底物 EC 的最适 pH 有所偏离,游离 EC 降解酶对 pH 4.5 的 EC 溶液具有最大的催化活性,且在 pH 3.0~4.5 酶活性逐渐增加,相对酶活在 30%~100%之间;固定化 EC 降解酶的最适 pH 为 3.6~3.9,且在此范围内酶活性均高于游离酶,尤其在 pH 3.6 左右表现出最大催化活性。

稳定性结果显示,固定化酶在最适 pH 条件下反应时间越长,相对酶活性的下降速度越快,尤其是 12~24 h 期间的相对酶活变化率远远高于 0~12 h 的变化率。固定化酶在 pH 3.6 条件下放置 24 h 之后的酶活损失率不超过 40%,说明固定化 EC 降解酶的耐酸性较游离酶好,更适于复杂环境的操作。之前就有研究将以京尼平为交联剂与来源于普罗维登斯菌(*Providencia rettgeri* JN-B815)的酸性脲酶进行交联,发现此交联酶能够适应黄酒的复杂微环境并去除尿素和 EC^[37]。

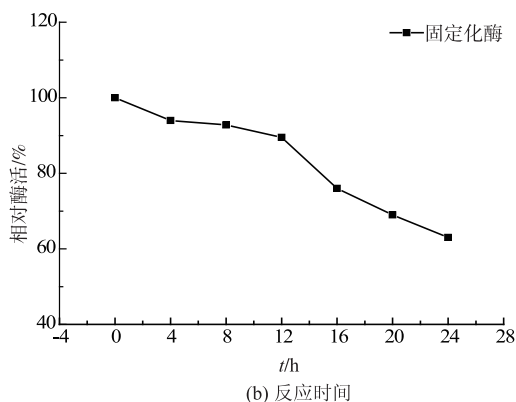
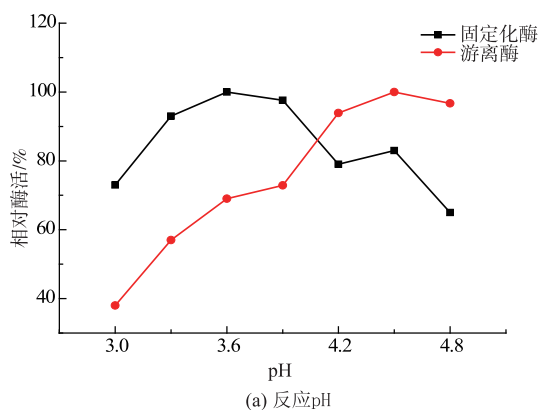


图 5 固定化 EC 降解酶的最适 pH 及其稳定性

Fig. 5 Optimal pH and its stability of immobilized urethanase

2.2.3 固定化 EC 降解酶的乙醇耐受性 EC 降解酶的乙醇耐受性在酒精饮料的应用中非常重要。从图 6 可以看出,随着乙醇体积分数的升高,游离酶和固定化 EC 降解酶酶活均随之下下降,但固定化 EC 降解酶对乙醇表现出良好的耐受性。在乙醇体积分数为 7%~25%时,固定化 EC 降解酶酶活均能保留 50%以上,同游离酶的乙醇耐受性相比,变化有一定差异,初步推测此固定化方法对其乙醇耐受性和酶活提高有一定影响。说明此固定化 EC 降解酶与游离酶相比,在乙醇体积分数相对较低时可以保持相对较高的酶活^[37],适用于乙醇体积分数相对较低的发酵酒精饮料。

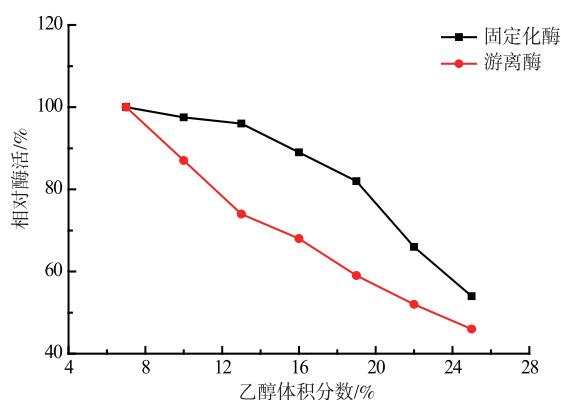


图 6 乙醇对固定化 EC 降解酶酶活的影响

Fig. 6 Effect of ethanol on urethanase enzymatic activity

2.2.4 固定化 EC 降解酶的重复使用性 如图 7 所示,在模拟酒样对固定化 EC 降解酶进行重复性实验,结果显示,每次使用后酶活均有下降。当重复使用 8 次以后,固定化 EC 降解酶酶活力保留在 50%以上,因此在 8 次前使用效果较好。

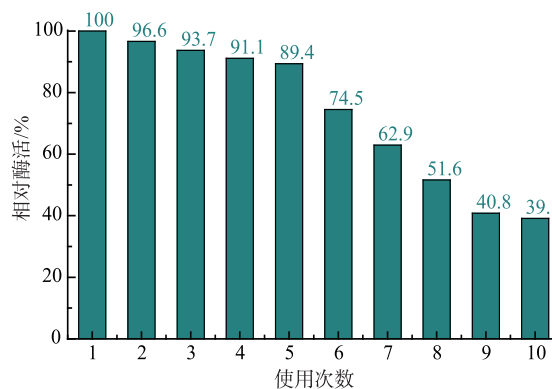


图 7 固定化 EC 降解酶的重复使用次数

Fig. 7 Reusability of immobilized urethanase

此结果与文献报道的 GO-CS 复合固定酸性酶使用 10 次时的酶活 80% 相比,可使用次数稍显劣势^[25],但就所得固定化酶而言,仍然可以考虑将使用次数尽量控制在 8 次以内以获得更好的效果。

2.2.5 固定化 EC 降解酶的储存稳定性 固定化 EC 降解酶在不同储存温度随贮藏时间的酶活变化如图 8 所示。在 4 °C 条件下,酶活随时间逐渐降低,酶活降低速率在 1~3 周和 4~6 周的变化都较平稳,而在 3~4 周的变化最大;且贮藏 6 周之内,酶活损失不足 30%。在 20 °C 条件下,酶活随时间延长逐渐降低,至第 5 周时基本保持不变,但在贮藏 6 周之后,酶活仅达到 60%。说明贮藏温度对固定化 EC 降解酶的酶活有一定影响,但不是唯一因素。因此在该实验条件下,尽量将固定化酶保存在 4~20 °C,但基于固定化酶最适反应温度和出于经济节约方面的考虑,以 20 °C 作为最佳贮藏温度条件。

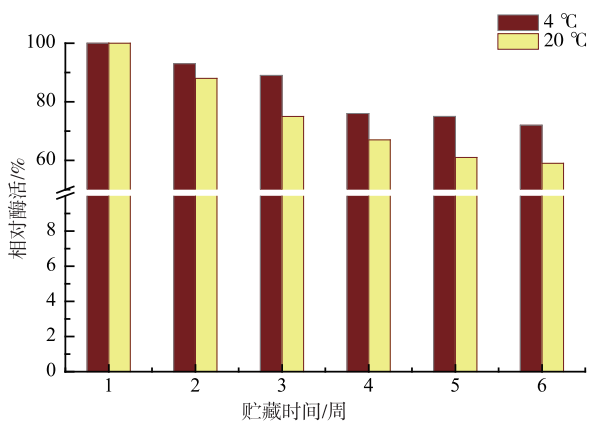


图 8 固定化 EC 降解酶储存稳定性

Fig. 8 Storage stability of immobilized urethanase

2.3 固定化酶对“美乐”葡萄酒的影响

2.3.1 固定化酶在“美乐”葡萄酒中的稳定性 如图 9 所示,随着静置时间增加,游离酶和固定化 EC 降解酶酶活均呈现下降趋势,但在整个过程中,固定化酶酶活均高于游离酶酶活。当静置 96 h 时,固定化酶酶活与游离酶酶活相差最大,相较于起初酶活差异,后期的差异更大,可能是由于相同酶量的条件下,起初游离酶更容易与底物接触,而随着时间推移,固定化酶由于载体的保护作用,仍能慢慢显示出较高的酶活性。静置 144 h 之前,固定化酶酶活的损失率在 50% 以下,说明此酶可以适应“美乐”葡萄酒的微环境,用于葡萄酒中 EC 的去除。

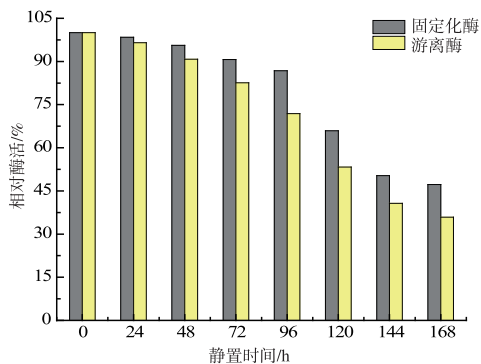


图 9 “美乐”葡萄酒中固定化 EC 降解酶酶活的变化

Fig. 9 Changes of immobilized urethanase activity in 'Merlot' wine

2.3.2 固定化酶对“美乐”葡萄酒中 EC 的去除率 “美乐”葡萄酒样品中添加等量酶活的固定化 EC 降解酶和游离酶一段时间后,样品中 EC 质量浓度逐渐降低。

从图 10 可以看出,样品中加酶处理后,处理组的 EC 质量浓度均低于对照组,处理组的 EC 去除率高于对照组,说明无论是游离还是固定化 EC 降解酶的处理,均使“美乐”葡萄酒中 EC 质量浓度得到了降低,但游离酶法去除 EC 的效果要优于固定化酶处理法。在该实验条件下,固定化 EC 降解酶对“美乐”葡萄酒中 EC 的去除率可达 30.90%,是游离酶的 81.53%。

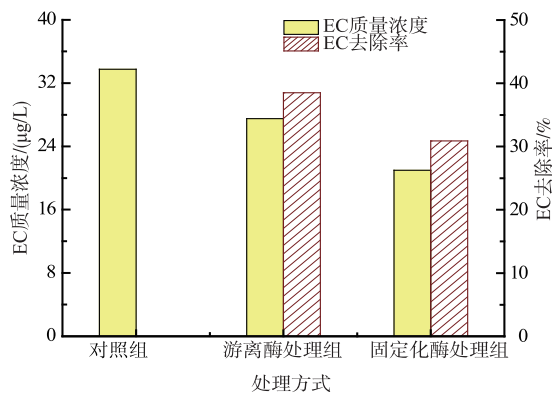


图 10 游离和固定化 EC 降解酶去除 EC 的效果

Fig. 10 Influence of free and immobilized urethanase on EC

2.3.3 固定化酶对“美乐”葡萄酒挥发性物质的影响 葡萄酒的风味不是独立存在的,而是由醇、酯、酸、醛、酮、萜类化合物和 C13-萜烯类化合物相互协调而产生的,它们共同构成了葡萄酒香气的组成成分^[38]。对“美乐”葡萄酒中香气化合物及其

相对含量进行了定性和定量分析。

对照组和处理组的葡萄酒中挥发性风味物质的相对含量如表 1 所示,在 3 种处理方式下的葡萄酒中,共检测到 29 种香气成分,包括 12 种酯类、9 种醇类、3 种有机酸和 5 种醛、酮、酚类。经分析可知,不同处理组中各挥发性物质的相对含量之间无显著差异,但是相较于对照组,处理组的物质种类均有所减少,其中固定化酶处理组减少了 8 种物质,而游离酶处理组减少了 12 种物质。说明酶处理对葡萄酒中挥发性物质的种类数量有些许影响,但对化合物的相对含量影响不显著,而且,固定化酶处理方式对葡萄酒更加友好。相比对照组,酶处理组中的物质均出现了数量的减少,但消失的物质并不相同,固定化酶处理组减少的物质包括:香茅醇、正癸醛、己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸己

酯、乙酸苯乙酯和异丙醇。而游离酶处理组减少的物质分别是香茅醇、 β -大马士酮、糠醛、正癸醛、己酸乙酯、苯乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、丁二酸二乙酯、2,3-丁二醇、异丙醇、1-己醇。说明不同类型的酶处理对葡萄酒的影响不同,但考虑到游离酶引起芳香味和果香味物质的损失更大,由于在考虑风味复杂性时要避免不愉快风味的发展,因此建议对“美乐”葡萄酒使用固定化 EC 降解酶进行处理。

此外,不同处理组测得的挥发性风味化合物的组成也有明显不同。表 1 和图 11 显示了“美乐”葡萄酒中不同酶处理方式下主要挥发性香气成分(醇、酯类、酸和醛)的变化规律。

由 C6 化合物、挥发性酚类物质和苯类化合物组成的香气成分在“美乐”葡萄酒中随着酶处理方式的不同而呈现出不同的趋势。酶处理后醇类和醛

表 1 不同酶处理方式对“美乐”葡萄酒中挥发性化合物的影响

Table 1 Effects of different enzyme treatment on volatile compounds in 'Merlot' wine

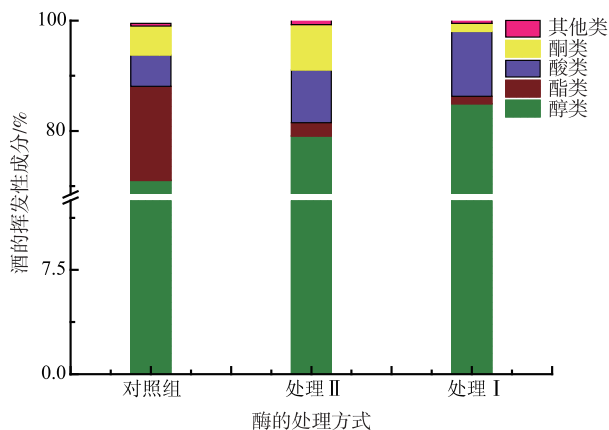
物质名称	线性指数	香味描述	挥发性化合物相对质量分数/%		
			处理 I	处理 II	对照
香茅醇	1 758	花香	Nd	Nd	0.320±0.019
β -大马士酮	1 809	花香、蜂蜜、甜味、苹果	Nd	0.290±0.103	0.260±0.054
2,4-二叔丁基酚	1 751	—	0.580±0.247	0.320±0.084	0.560±0.201
糠醛	1 451	甜香、烤面包、焦糖、杏仁、坚果香	Nd	3.300±0.045	1.880±0.321
正癸醛	1 181	脂香、橙香香气	Nd	Nd	0.530±0.778
5-羟甲基糠醛	1 672	纸和纸板臭	1.470±1.099	6.940±0.907	3.850±0.368
己酸乙酯	1 236	苹果、香蕉香气	Nd	Nd	5.870±0.769
辛酸乙酯	1 185	菠萝、梨	0.460±0.014	Nd	4.410±0.495
苯乙酸乙酯	1 785	令人愉悦的香味、花香	Nd	0.290±0.010	0.240±0.074
癸酸乙酯	1 388	蜡香、果香、玫瑰花香	0.790±0.083	0.630±0.006	0.850±0.159
乙酸异戊酯	1 120	香蕉香味、果香、甜香	Nd	Nd	2.040±0.548
乙酸戊酯	—	—	0.100±0.115	Nd	Nd
乙酸己酯	1 001	宜人的果香、梨子香味	0.820±0.004	Nd	0.670±0.321
乙酸癸酯	—	—	0.680±0.032	0.790±0.689	Nd
乙酸苯乙酯	1 226	令人愉悦的香味、花香味	Nd	Nd	0.700±0.128
丁二酸二乙酯	1 702	—	Nd	0.560±0.028	3.580±0.241
丁酸丙酯	1 614	水果香味、香蕉和菠萝香味	1.630±0.256	1.000±0.991	Nd
丁酸己酯	1 266	甜果香味	Nd	0.390±0.182	Nd
己酸	1 840	奶酪味、脂肪味	0.850±0.204	0.610±0.115	Nd
辛酸	2 051	汗味、奶酪味	4.570±2.056	5.020±0.261	3.180±0.209
癸酸	2 264	脂肪味、令人不愉快的味道	7.620±3.312	3.840±0.740	2.590±0.180
1-戊醇	1 240	—	35.340±1.127	9.910±1.903	Nd
异戊醇	1 193	苹果白兰地香气、辛辣味、不愉快的味道	43.380±9.159	49.680±1.648	45.720±6.333
2,3-丁二醇	1 534	黄油味、奶油味	Nd	1.080±0.148	4.820±0.930
异丙醇	1 029	—	Nd	Nd	1.730±1.038

续表 1

物质名称	线性指数	香味描述	挥发性化合物相对质量分数/%		
			处理 I	处理 II	对照
乙醇	—	—	4.270±1.105	Nd	Nd
丙三醇	—	—	0.720±0.056	16.80±3.619	11.830±2.994
苯乙醇	1 896	玫瑰香味、花粉香	1.450±0.427	1.730±0.319	2.960±0.134
1-己醇	1 356	青草味	Nd	1.190±0.244	0.270±0.115

注:“Nd”表示该项未被检测到;处理 I:游离酶处理组;处理 II:固定化酶处理组。

类占比降低,而酯类和酸类均有所增加,其他类基本保持不变,表明不同的酶处理方式对挥发性香气化合物产生了一定影响。尽管酶处理方式对葡萄酒中挥发性物质的相对含量没有显著影响,但引起了香气物质种类的减少和香气成分的改变,且游离酶对其不利影响要大于固定化酶。因此,在人们接受风味有所改变的前提下,固定化 EC 降解酶更适合用于“美乐”葡萄酒。



处理 I:游离酶处理组;处理 II:固定化酶处理组。

图 11 “美乐”葡萄酒中挥发性风味化合物的成分组成

Fig. 11 Composition of volatile flavor compounds in ‘Merlot’ wine

3 结语

通过对壳聚糖与戊二醛的交联条件进行优化后发现,以体积分数 5%的戊二醛溶液作交联剂,交联反应进行 8 h 时,载体对酶的固定量达到最大。之后对 EC 降解酶的酶学性质展开分析,得到如下结果:固定化 EC 降解酶的最适温度是 42 °C,在此温度下放置 24 h 时相对酶活达 60%以上;其最适 pH 是 3.6,在此条件下放置 24 h 的相对酶活大于 60%;在体积分数 7%~25%乙醇下,酶活均保持在 50%以上,说明该固定化酶的乙醇耐受范围广,催化活性高;该酶在重复使用 8 次后,酶活还保持在 50%以上,而且分别在 4 °C 和 20 °C 下贮藏 6 周后的酶活损失率不足 30%和 40%。最后,采用 ATPS 结合 GC-MS 检测不同酶处理的“美乐”葡萄酒中含有的 EC,得知固定化 EC 降解酶的 EC 去除率达 30.90%,是游离酶的 81.53%。EC 降解酶的处理方式对葡萄酒中挥发性物质的相对含量没有显著影响,只是引起了香气物质种类的减少和香气成分的改变,但固定化酶对挥发性风味物质的不利影响远低于游离酶。

参考文献:

[1] LIU W L, WU C Y, CHEN C Y, et al. Fast multipoint immobilized MOF bioreactor[J]. *Chemistry*, 2014,20(29):8923-8928.

[2] PAN Y Z, WU T F, BAO H Q, et al. Green fabrication of chitosan films reinforced with parallel aligned graphene oxide[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(4):1908-1915.

[3] KAHRAMAN M V, BAYRAMOGLU G, KAYAMAN-APOHAN N, et al. UV-curable methacrylated/fumaric acid modified epoxy as a potential support for enzyme immobilization[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2007, 67(2):97-103.

[4] LIM H N, LAU S C, BASRI M. Enhanced biocatalytic esterification with lipase-immobilized chitosan/graphene oxide beads[J]. *Plos One*, 2014, 9(8):1-10.

[5] CHAUDHARI P S, GOKARNA A, KULKARNI M, et al. Porous silicon as an entrapping matrix for the immobilization of urease [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, 107(1):258-263.

- [6] REN P, LIN J P, WEI D Z. Synthesis of butyl acetate in N-heptane by the recombinant CS-2 lipase immobilized on kieselguhr[J]. **African Journal of Food Science and Technology**, 2011, 2(3): 59-66.
- [7] MUETGEERT J, OTTO P H L, FLIPPO F A. Enzyme immobilization in a starch gel; US4418147[P]. 1983-11-29.
- [8] KUMAR S, DWEVEDI A, KAYASTHA A M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability; analytical applications[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2009, 58(1-4): 138-145.
- [9] KUILLA T, BHADRA S, YAO D, et al. Recent advances in graphene based polymer composites[J]. **Progress in Polymer Science**, 2010, 35(11): 1350-1375.
- [10] ZHANG J L, ZHANG F, YANG H J. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization[J]. **Langmuir**, 2010, 26(9): 6083-6085.
- [11] VELOSO C M, BRITO M J P, BONOMO R C F, et al. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization[J]. **Fuel Processing Technology**, 2017, 156: 421-428.
- [12] JORDAAN J, BRADY D. Advances in enzyme immobilisation[J]. **Biotechnology Letters**, 2009, 31(11): 1639-1650.
- [13] MIYAZAKI M, HONDA T, NAKAMURA H, et al. Immobilization of enzymes on a microchannel surface through cross-linking polymerization[J]. **Chemical Communications**, 2005(40): 5062-5064.
- [14] ORTIZ C, BARBOSA O, BERENQUER-MURCIA A, et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts[J]. **Biotechnology Advances**, 2015, 33(5): 435-456.
- [15] 陈西广, 彭虹旒, 孟祥红, 等. 氨基多糖多孔微球载体制备及其脲酶固定化特性[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 582-588.
- [16] WANG J Z, ZHAO G H, JING L Y, et al. Facile self-assembly of magnetite nanoparticles on three-dimensional graphene oxide-chitosan composite for lipase immobilization[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2015, 98: 75-83.
- [17] CHEN B, LI T T, ZHANG Z, et al. Design of robust and photoluminescence-responsive materials based on poly(methacrylic acid-co-m-phenylenediamine) with graphene oxide composite hydrogels and its adsorption[J]. **Journal of Applied Polymer Science**, 2018, 135(23): 1-8.
- [18] 孔伟, 周浩然, 赵书言, 等. 戊二醛改性壳聚糖缓释膜的研究[J]. 哈尔滨理工大学学报, 2010, 15(4): 45-47.
- [19] AMIRBANDEH M, TAHERI-KAFRANI A. Immobilization of glucoamylase on triazine-functionalized Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite: improved stability and reusability[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016, 93: 1183-1191.
- [20] YEON K H, LUEPTOW R M. Urease immobilization on an ion-exchange textile for urea hydrolysis[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2006, 81(6): 940-950.
- [21] WLODARCZYK J, LASKA J, ZABORSKA W. Polyaniline as a support for urease immobilization[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 1999, 6(6): 549-553.
- [22] DANIAL E N, HAMZA A H, MAHMOUD R H. Characteristics of immobilized urease on grafted alginate bead systems[J]. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2015, 58(2): 147-153.
- [23] 赵雅敏. 红酵母降解中国黄酒中氨基甲酸乙酯的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [24] ZHANG Q, ZHOU N D, TIAN Y P. Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs) of acid urease with urethanase activity and their application[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2016, 56(4): 422-431.
- [25] LIU X F, LIU Y, ZHOU N D. Characteristics of refold acid urease immobilized covalently by graphene oxide-chitosan composite beads[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2019, 127(1): 16-22.
- [26] 吕晓玲, 邢晓慧, 宫慧梅, 等. 甲壳素、壳聚糖作为酶固定化载体的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(2): 29-31.
- [27] 廖燕红, 王琴梅, 滕伟, 等. 盐酸羟胺 - 电位滴定法测定氧化海藻酸钠上的醛基浓度[J]. 分析实验室, 2008, 27(1): 83-86.
- [28] WEATHERBURN M W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. **Analytical Chemistry**, 1967, 39(8): 971-974.
- [29] NEMATI-KNADE E, SHEKAARI H J S A. Thermodynamic study of aqueous two phase systems for some aliphatic alcohols+sodium thiosulfate+water[J]. **Fluid Phase Equilibria**, 2012, 321: 64-72.
- [30] MA L J, TONG W Z, DU L P. Optimization of an aqueous two-phase system for the determination of trace ethyl carbamate in red wine[J]. **Journal of Food Protection**, 2019, 82(8): 1377-1383.
- [31] WOJDYLO A, SAMOTICHA J N P. Evaluation of phytochemicals, antioxidant capacity, and antidiabetic activity of novel

- smoothies from selected *Prunus fruits*[J]. **Journal of Functional Foods**, 2016, 25:397-407.
- [32] LEE S J, JUNG H, LIM J H, et al. Chemical and sensory profiles of *makgeolli*, Korean commercial rice wine, from descriptive, chemical, and volatile compound analyses[J]. **Food Chemistry**, 2014, 152:624-632.
- [33] XIA Y J, YANG Y J, WANG G Q, et al. Effect of mixed yeast starter on volatile flavor compounds in Chinese rice wine during different brewing stages[J]. **Food Science and Technology**, 2017, 78:373-381.
- [34] 仲飞, 李秀锦, 肖月娟, 等. 果胶酶在壳聚糖上的固定化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(10):50-53.
- [35] GUEDIDI S, YUREKLI Y, DERATANI A, et al. Effect of enzyme location on activity and stability of trypsin and urease immobilized on porous membranes by using layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte[J]. **Journal of Membrane Science**, 2010, 365(1-2):59-67.
- [36] DWEVEDI A, KUMAR S, KAYASTHA A M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: analytical applications[J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2009, 58(1-4): 138-145.
- [37] ZHANG Q, ZHA X H, ZHOU N D, et al. Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs) of acid urease with urethanase activity and their application[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2016, 56(4):422-431.
- [38] CAO Y, XIE G, WU C, et al. A study on characteristic flavor compounds in traditional Chinese rice wine-Guyue Longshan rice wine[J]. **The Institute of Brewing**, 2010, 116(2):182-189.

科 技 信 息

欧盟评估一种具有两种酶活性的食品酶的安全性

2021年5月12日,欧盟食品安全局就一种具有葡聚糖 1,4- α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性的食品酶的安全性评价发布意见。

据了解,这种食品酶是由转基因黑曲霉菌株 NZYM-BX 生产的,旨在用于淀粉加工、葡萄糖浆和蒸馏酒精的生产。

经过评估,专家小组认为,在预期的使用条件下,不能排除饮食暴露引起过敏和诱发反应的风险,但这种情况发生的可能性很低。根据所提供的数据,专家小组的结论是,在预期的使用条件下,这种食品酶不会引起安全问题。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟评估一种具有两种酶活性的食品酶的安全性[EB/OL].(2021-5-13). <http://news.foodmate.net/2021/05/593223.html>