

戊二醛交联法固定化 β -D- 呋喃果糖苷酶的研究

杨秀芳,陈 梅

(陕西科技大学 教育部轻工助剂化学与技术重点实验室,陕西 西安 710021)

摘 要:大豆低聚糖属于功能性低聚糖的一种,具有促进双歧杆菌生长繁殖等生理特性。采用戊二醛交联法固定 β -D- 呋喃果糖苷酶。研究固定化酶法生产大豆低聚糖过程中对酶固定化制备的条件、操作稳定性。采用戊二醛交联法固定 β -D- 呋喃果糖苷酶。结果表明:最佳固定化条件为:戊二醛浓度 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,蛋白质浓度 1.0% ,酶与固定液之比 $1:10$,固定化时间 2 h ;此条件下制备的固定化酶平均酶活达 $340\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,酶活保留率 80% 以上。固定化酶在间歇反应器中具有较高的操作稳定性,固定化酶的半衰期为 58 d ,完全可以满足工业化生产的要求。

关键词:交联法; β -D- 呋喃果糖苷酶;固定化酶

中图分类号:TS245.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)05-0902-04

Study on Immobilized β -D-fructofuranosidase by Cross-linking with Glutaraldehyde

YANG Xiu-fang, CHEN Mei

(Key Laboratory of Auxiliary Chemistry & Technology for Chemical Industry, Ministry of Education; Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, Shaanxi, China)

Abstract: The soybean oligosaccharide is a kind of functional oligosaccharides, which can multiply the number of Bifidobacteria. A novel method to immobilize β -D-fructofuranosidase by cross-linking with glutaraldehyde was successfully constructed. The preparation condition and operation stability of immobilization enzyme were investigated during the process of soybean oligosaccharide production. A novel method to immobilize β -D-fructofuranosidase by cross-linking with glutaraldehyde was successfully constructed. The conditions of immobilization were investigated by orthogonal experiment method. The optimal conditions of immobilization investigated by orthogonal experiment method were as follows: the concentration of glutaraldehyde and protein were $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1.0% , the ratio of enzyme and immobilization liquid was $1:10$, the immobilizing time was 2 h . Under the optimal condition the average activity of immobilized enzyme reached $340\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, after immobilization and the activity could retain more than 80% . The immobilized enzyme showed high operation stability in batch reactor, whose half-life was 58 d . The stability of immobilized enzyme could completely meet the need of industrial production.

Key words: Cross-linking with glutaraldehyde; β -D-fructofuranosidase; Immobilization enzyme

大豆低聚糖属于功能性低聚糖的一种,具有促进双歧杆菌生长繁殖,改善肠内菌群结构、增强机体免疫功能、抗氧化、防衰老、促进肠内营养物质的生成与钙吸收和降血脂等^[1]优良的生理特性而倍受世人瞩目。日本对大豆低聚糖的开发和应用位居世界前列,已推向市场,广泛应用于饮料、酸奶、水产制品、果酱、糕点和面包等食品中。到目前为止,大豆低聚糖还是美国 FDA 惟一认可应用于食品中的功能性低聚糖^[1]。我国对大豆低聚糖的研究开发是

伴随着大豆分离蛋白生产技术在我国的引进开始的。1998 年黑龙江省五常天菊集团建立了日处理 800 t 大豆乳清全套生产线,年产大豆低聚糖 $2\ 280\text{ t}$,但产品的纯度低,棉子糖和水苏糖含量为 $30\%\sim 35\%$,其余为蔗糖和糊精,因此该产品的热值较高,功能效果差,阻碍了该行业的进一步发展。研究旨在对固定化酶法生产大豆低聚糖过程中对酶固定化制备的条件、操作稳定性进行探讨。

收稿日期:2008-11-02

基金项目:陕西省教育厅自然科学基金资助项目(08JK238)。

作者简介:杨秀芳(1963-),女,教授,研究方向为天然产品的研究与开发。E-mail:yangxf@sust.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

β -D- 呋喃果糖苷酶,日本天野制药株式会社产品,酶活力 $300\,000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;牛血清蛋白,Sigma 公司;大豆低聚糖浆,由山东三维集团公司提供。其它试剂为市购。

1.2 方法

1.2.1 固定化 β -D- 呋喃果糖苷酶的制备 将在液体培养基中培养的 β -D- 呋喃果糖苷酶放入溶有牛血清蛋白的醋酸盐缓冲溶液中($\text{pH}=5.5$),加入一定量的戊二醛溶液,用搅拌器搅拌均匀后于室温下静置 1-2 h,抽滤,用无菌去离子水充分洗涤,除去未作用的戊二醛,抽滤备用。

1.2.2 酶活力的测定 固定化酶活力的测定:取 0.1 g 固定化酶放入 10 mL,25% 蔗糖溶液(用 $\text{pH}=5.0,0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲溶液配制)中,混合均匀,50℃ 下反应 1 h,100℃ 煮沸 15 min 终止酶解反应。果糖基转移酶活力通过测定酶解过程中所释放出的葡萄糖(G)和还原糖(R)的含量,按照下列公式计算酶解过程中所产生的果糖量(F)和被转移的果糖量(F^-)。

$$F=R-G;F^-=G-F=2G-R$$

在相同条件下,以蔗糖溶液作为对照。在上述条件下,1 min 内转移 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 果糖所需的酶量为一个果糖基转移酶活力单位($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)。酶活保留率:酶活保留率是指 1 g 游离的酶经过固定化处理测得酶活力(E')与未经固定化处理时所测得酶活力(E)之比:

$$\text{酶活保留率}=\frac{E'}{E}\times 100\%$$

茚三酮显色检测蛋白质:取固定化酶洗液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 滴于滤纸上,风干后在原来滴加样品位置滴加 $5\text{ }\mu\text{L}$ 茚三酮-乙醇溶液,风干后,在酒精灯外焰附近烘烤显色。以蒸馏水为空白,比较洗液和蒸馏水显色的差别,如相同则证明蛋白质已经洗净,如不同应继续洗涤固定化酶,直至样品显色与空白相同为止^[2]。

2 结果与讨论

2.1 固定化条件的确定

2.1.1 戊二醛的浓度对固定化酶的影响 在牛血清蛋白浓度 1%,固定化时间 1 h,苷酶与固定液用

量比为 1:10 条件下,研究不同戊二醛浓度对固定化酶酶活影响,结果见图 1。当戊二醛浓度低于 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶活保留率在 80% 以上,继续提高戊二醛浓度会引起酶活显著下降,但贮存稳定性提高。Payne 等^[3]研究指出,发生交联反应时,若反应体系中戊二醛浓度较低,分子间交联较易发生,从而保持了蛋白质分子的空间构型,使酶活受影响较小;当反应体系中戊二醛浓度较高时,较易发生分子内交联,从而改变了蛋白质分子的空间构型,当活性位点的构型发生改变时,酶的催化活性受影响较大。因此戊二醛作为交联剂,通常来说含量越低,对酶活性的损失越少,但交联剂的浓度过小,容易使酶脱落。

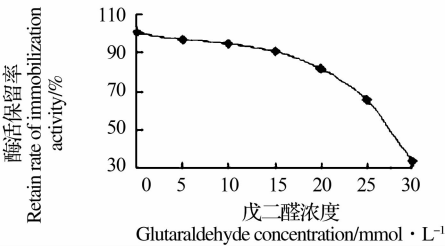


图 1 戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

Fig. 1 Effects of glusaraldehyde concentrations on enzyme activity of immobilized

2.1.2 固定化时间对固定化酶的影响 在 45℃ 下,取固定化时间分别为 1~4 h,测定酶活保留率,结果如图 2。固定化时间为 3 h 时,酶活保留率最高,超过 3 h 后固定化酶的酶活保留率急剧下降。这是由于酶活保留率的高低不仅取决于固定化时间,同时受戊二醛变性作用的影响。随着时间的延长,酶与固定化载体的交联反应进行得更加完全,固定化酶的活力随之上升,但过度的交联会引起酶蛋白的急剧变性^[4],故选用 3 h 进行固定化。

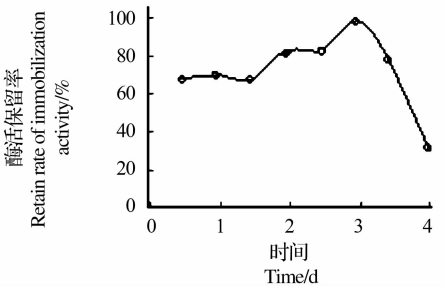


图 2 固定化时间对固定化酶的影响

Fig. 2 Effects of time on enzyme activity of immobilized enzyme

2.1.1.3 蛋白质浓度对固定化酶的影响 在戊二醛浓度 20 mmol · L⁻¹, 固定化时间为 3 h, 酶与固定液用量比为 1:8 的条件下, 研究不同蛋白质浓度对固定化酶酶活力的影响, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 随着蛋白质浓度增加, 酶活保留率增加, 在蛋白质浓度达到 1% 时, 酶活保留率最大, 继续增加浓度, 酶活增加速率趋缓。在固定化过程中, 添加惰性蛋白质能够保护酶活性部位的氨基酸, 为固定化酶提供天然的生化环境, 提高固定化酶的产量, 适合于胞内酶的固定化处理。但蛋白质浓度过高, 会增加扩散阻力, 使酶的活性有所下降^[4]。

表 1 蛋白质浓度对固定化酶活力的影响

Table 1 Effects of different protein concentration on enzyme activity of immobilized enzyme

水平 Level	蛋白质浓度 Protein concentration /%	戊二醛浓度 Glutaraldehyde concentration /mmol · L ⁻¹	酶与固定液 的比例 Ratio of enzyme and immobilization liquid	酶活保留率 Retain rate of immobilization activity/%
1	0	20	1:8	45.5
2	0.25	20	1:8	56.2
3	0.5	20	1:8	75.3
4	1.0	20	1:8	82.5
5	1.5	20	1:8	82.6

2.1.1.4 正交试实验优化固定条件 根据单因素试验结果及相关的文献报道, 选择对固定化酶酶活影响较大的因素: 戊二醛浓度、蛋白质浓度、酶与固定液之比及固定化时间进行正交试验确定最佳固定化条件。

表 2 正交因素水平表

Table 2 Factor and level of orthogonal experiment

水平 Level	A 戊二醛浓度 Glutaraldehyde concentration /mmol · L ⁻¹	B 蛋白质 浓度 Protein concentration /%	C 酶与固定液 的比例 Ratio of enzyme and immobilization liquid	D 固定化时间 Immobilization time/h
1	20	1.0	1:4	1
2	10	0.5	1:8	2
3	15	1.5	1:10	3

采用正交表 L₉(3⁴) 的设计方案, 正交试验因素水平表, 结果及极差分析见表 2, 表 3。比较 4 个因素的极差 R, A > B > C > D, 戊二醛浓度是较重要的因素, 蛋白质浓度与酶与固定液之比为次要因素, 固

定化时间影响最小。方差分析结果见表 4, 由于 $F_{0.025}(4,2) = 10.65 < F_A, F_{0.05}(4,2) = 6.94 < F_B$, 所以戊二醛浓度在水平 $\alpha = 0.025$ 下对固定化酶酶活产生影响显著, 蛋白质浓度在水平 $\alpha = 0.05$ 下对固定化酶酶活产生影响显著。根据显著性检验的结果来选择最佳参数组合为 A₁B₁C₃D₂, 即戊二醛浓度 20 mmol · L⁻¹, 蛋白质浓度 1.0%, 酶与固定液之比为 1:10, 固定化时间为 2 h。

表 3 正交试验表

Table 3 Test of orthogonal

水平因素 Factor	A	B	C	D	酶活力 Enzyme activity /U · g ⁻¹
1	1	1	1	1	323.21
2	1	2	2	2	341.41
3	1	3	3	3	296.80
4	2	1	2	3	254.68
5	2	2	3	1	261.43
6	2	3	1	2	199.29
7	3	1	3	2	312.30
8	3	2	1	3	274.65
9	3	3	2	1	218.01
K ₁	320.473	296.730	265.717	267.550	
K ₂	238.467	292.497	271.367	284.333	
K ₃	268.320	238.033	290.177	275.377	
R	82.006	58.697	24.463	16.783	

表 4 正交试验方差分析表

Table 4 Result of orthogonal experiment

因素 Factor	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	显著性 Sign.
A	10336.285	2	5168.240	14.961	[*]
B	6429.473	2	3214.737	9.138	[*]
C	984.030	2	492.015	1.399	
D	423.159	2	211.580	0.601	
方差 Variance	1407.19	4	703.595		
$F_{0.025}(4,2) = 10.65$					
$F_{0.05}(4,2) = 6.94$					

2.2 固定化酶的操作稳定性

利用固定化酶进行间歇式酶解反应, 100 mL, 2.5% 蔗糖溶液 (pH6.0), 0.5 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 固定化酶 5 g, 反应温度为 55℃, 振荡速度 150 r · min⁻¹, 每 24 h 为一个周期, 测定酶活保留率随时间的变化情况^[5], 结果如图 3 所示。连续操作 28 d, 酶活保留率大于 60%。一般认为, 酶失活符合一级动力学方

程 $[E] = [E_o] \exp(k_d t)^{[4]}$,对图 3 中的数据进行线性拟合得到方程 $[E]/[E_o] = \exp(-0.012t)$,则 $k_d = 0.012$, $t_{1/2} = \ln 2/k_d = 58\text{ d}$,即半衰期为 58 d,通常工业化生产要求酶的半衰期为 20 d 以上,因此该固定化酶的操作稳定性已能满足工业生产要求。

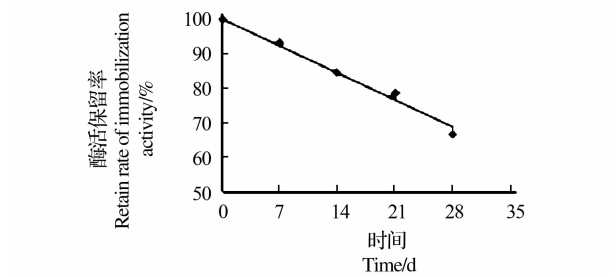


图 3 固定化酶的操作稳定性

Fig. 3 Operational atability of immobilized enzyme

3 结论

3.1 以戊二醛为交联剂,牛血清蛋白为活性保护剂,对 β -D-呋喃果糖苷酶进行固定化。优化后的固定化条件:戊二醛浓度 $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,蛋白质浓度 1.0%,酶与固定液之比 1:10,固定化时间 2 h。在此条件下制备的固定化酶平均酶活达 $340\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,酶活保留率 80% 以上。

3.2 固定化酶在间歇反应器中具有较高的操作稳定性,固定化酶的半衰期为 58 d,完全可以满足工业化生产的要求。

参考文献

[1] 唐春江,邓放明,王乔隆,等.大豆低聚糖的研究进展[J].农产品加工(学刊),2008,2;33-37. (Tang C J, Deng F M, Wang Q L, et al. Study progress on soybean oligosaccharides[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2008, 2; 33-37.)

[2] 北京师范大学生物系生物化学教研室. 基础生物化学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1982;5. (The Beijing Normal University Biology Department Biochemistry Working Office. Foundation biochemistry experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1982; 5.)

[3] Rubens Cruz, Vinicius D Cruz, Marcia Z Belm, et al. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of Aspergillus Japomecus immobilized in calium alginate[J]. Bioresource Technology, 1998, 65 : 139-143.

[4] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003. (Luo G M. Enzyme project[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.)

[5] 童群义,朱桂兰. 节杆菌 β -1-呋喃果糖苷酶的纯化及性质研究[J]. 食品科学, 2005, 26(3) : 69-71. (Tong Q Y, Zhu G L. Purification and properties of β -fructofuranosidase from Arthrobacter 10137[J]. Food Science, 2005, 26(3) : 69-71.)

[6] 陈钧辉,杨荣武,郑伟娟,等. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社,2003;10. (Chen J H, Yang R W, Zheng W J, et al. Biology chemistry experiment[M]. Beijing: Science Press, 2003; 10.)

[7] 罗伟,李东,赵晋府. 调配型酸性豆乳饮料工艺及稳定性影响因素的研究[J]. 食品工业科技, 2000, (5) : 36-38. (Luo W, Li D, Zhan J F. Studies on the technology of a formulated sour soybean milk drink and the affection factor of its stability[J]. Science and Technology of Food Industry, 2000(5) : 36-38.)

[8] 朱秀清,周玉伦,王喜泉. 豆奶稳定性的影响因素分析及技术措施[J]. 大豆通报, 1995(6) : 25-26. (Zhu X Q, Zhou Y L, Wang X Q. Study on the stability of soybean milk and technology [J]. Soybean Bulletin, 1995(6) : 25-26.)

[9] 李彦荣,张国农,胡明燕,等. 钠盐对果汁豆奶稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业 2005, (7) : 126-128. (Li Y R, Zhang G N, Hu M Y, et al. The effect of sodium salts on the acidic fruit juice soymilk [J]. Food and Fermentation Industries, 2005 (7) : 126-128.)

[10] 胡国华,食品添加剂在豆制品中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005;8. (Hu G H. The application of food additives in soybean processing [M]. Beijing: The Chemistry and Industry Press, 2005; 8.)

[11] Cruz N, Capellas M, Hernandez M, et al. Ultra high pressure homogenization of soymilk: microbiological, physicochemical and microstructural characteristics [J]. Food Research International, 2007, 40(6) : 725-732.

[12] 李里特. 大豆加工与利用[M]. 北京:化学工业出版社,2002;12. (Li L T. Soybean processing and utilization[M]. Beijing: The Chemistry and Industry Press, 2002; 12.)

[13] Kwok K C, Liang H H, Niranjana K. Optimizing conditions for thermal processes of soy milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50 (17) : 4834-4838.

[14] 白卫东,王琴,赵文红,等. 豆奶稳定性的研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1) : 5-7. (Bai W D, Wang Q, Zhao W H et al. Study on the stability of soybean- milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(1) : 5-7.)

(上接第 901 页)

[5] 陈钧辉,杨荣武,郑伟娟,等. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社,2003;10. (Chen J H, Yang R W, Zheng W J, et al. Biology chemistry experiment[M]. Beijing: Science Press, 2003; 10.)

[6] 罗伟,李东,赵晋府. 调配型酸性豆乳饮料工艺及稳定性影响因素的研究[J]. 食品工业科技, 2000, (5) : 36-38. (Luo W, Li D, Zhan J F. Studies on the technology of a formulated sour soybean milk drink and the affection factor of its stability[J]. Science and Technology of Food Industry, 2000(5) : 36-38.)

[7] 朱秀清,周玉伦,王喜泉. 豆奶稳定性的影响因素分析及技术措施[J]. 大豆通报, 1995(6) : 25-26. (Zhu X Q, Zhou Y L, Wang X Q. Study on the stability of soybean milk and technology [J]. Soybean Bulletin, 1995(6) : 25-26.)

[8] 李彦荣,张国农,胡明燕,等. 钠盐对果汁豆奶稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业 2005, (7) : 126-128. (Li Y R, Zhang G N, Hu M Y, et al. The effect of sodium salts on the acidic fruit juice soymilk [J]. Food and Fermentation Industries, 2005 (7) : 126-128.)

[9] Du B, Li G, Zhang H, et al. Influence of molecular weight and degree of substitution of carboxymethylcellulose on the stability of acidified milk drinks [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23 : 1420-1426.