

磁性壳聚糖微球固定化 β -呋喃果糖苷酶的研究

许牡丹,曾令军,姚甲玉,刘红梅

(陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西西安 710021)

摘要:以磁性壳聚糖微球为载体,采用戊二醛交联法固定化 β -呋喃果糖苷酶,并对固定化酶的理化性质等进行了研究。结果表明:固定化 β -呋喃果糖苷酶与游离酶相比,具有较强的耐碱性,在温度低于70℃范围内有良好的热稳定性;固定化酶在4℃下保存15d后,剩余酶活力为80%左右,具有良好的储存稳定性,连续10次操作使用后保持50%的酶活,具有良好的操作性,固定化酶回收率为26%。

关键词:磁性壳聚糖微球, β -呋喃果糖苷酶,固定化酶

Study on β -fructofuranosidase immobilized with magnetic chitosan microspheres

XU Mu-dan, ZENG Ling-jun, YAO Jia-yu, LIU Hong-mei

(College of Life Science and Technology, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: β -fructofuranosidase was immobilized by cross linking with glutaraldehyde onto magnetic polyvinylalcohol microsphere. And the physical and chemical properties of the immobilized enzyme were studied. The results showed that the immobilized β -fructofuranosidase had stronger resistance to alkali compared with the free enzyme. In less than 70℃ situation, the immobilized β -fructofuranosidase showed good thermal stability. The recovery activity was 80% when the immobilized β -fructofuranosidase was stored at 4℃ for 15d. The recovery activity of the immobilized β -fructofuranosidase was more than 50% after repeated use for 10 times and immobilized enzyme recovery was 26%.

Key words: magnetic chitosan microspheres; β -fructofuranosidase; immobilization enzyme

中图分类号:TS201.2⁺5

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2010)08-0180-03

壳聚糖(CTS)是自然界存在的唯一碱性多糖,可由蟹、虾壳中的甲壳素经脱乙酰化反应而制得。其资源丰富,安全无毒,具有独特的分子结构和易于化学修饰、生物可相容性和可再生性等功能。它的胺基极易形成四级胺正离子,可与弱碱性阴离子交换。 β -呋喃果糖苷酶是一种广泛存在于植物和微生物中的蔗糖苷酶^[1],工业上利用 β -呋喃果糖苷酶生产低聚乳果糖,在pH4~8稳定,最适pH为5.5,最适温度为50℃,在55℃以下稳定^[2]。尽管 β -呋喃果糖苷酶本身稳定,但是容易受环境的种种不利因素影响而丧失活性。并且,很难使酶从反应体系中回收利用。酶固定化是一种能够使酶重复利用的技术,但目前对于 β -呋喃果糖苷酶磁性壳聚糖微球固定化技术的研究报道很少。壳聚糖具有一定的机械强度,可抵御化学降解以及可阻止金属离子对于酶的干扰以及抑菌等,从而被认为是一种良好的酶固定材

料^[3-4]。最近几年磁性微球技术已是固定化酶的研究热点,而壳聚糖可以作为磁性微球固定技术的磁性载体,可以大大改善酶的催化效率和酶的回收率。本文用壳聚糖磁性微球制备了 β -呋喃果糖苷酶固定酶,并对其理化性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖 浙江玉溪,脱乙酰度为90%,粘度为70mPa·s;粗酶液 本实验室提供;Fe₃O₄ 实验室自制;磁铁 实验室自备。

DA-8002型电子恒温水域锅 北京市化玻联医疗器械有限公司;501型超级恒温水域锅 上海仪器实验总厂;722型分光光度计 上海第三分析仪器厂;FA2004电子天平 上海精密科学仪器有限公司;冰箱。

1.2 实验方法

1.2.1 磁性壳聚糖微球的制备^[5] 将2mL磁流体、20mL 2%的壳聚糖溶液(用3%乙酸溶液配制)、80mL液体石蜡、3mL Span-80加入2mL吐温-80、20mL异丙醇的250mL锥形瓶中,超声10min,迅速加

收稿日期:2009-07-31

作者简介:许牡丹(1963-),女,教授,硕士,研究方向:食品生物技术及分析检测。

入 4mL 20% 戊二醛, 调 pH 至 9.0, 反应 2h, 分别用异丙醇、乙醚、丙酮和水充分洗涤后, 冻干, 用磁铁将产物分离, 得到磁性壳聚糖微球。

1.2.2 磁性微球固定化 β -呋喃果糖苷酶的制备
50mg 磁性壳聚糖微球, 加入 5mL 粗酶液 (0.1mol/L, pH7), 30℃ 缓慢搅拌 1h, 在 4℃ 静置 2h, 倒掉上清液, 用 pH7 的磷酸盐缓冲液反复洗涤, 抽滤, 得到的固定化酶在 4℃ 下保存。

1.2.3 固定化酶活力检测方法 称取 50mg 固定化的 β -呋喃果糖苷酶, 于 1mL 混合糖液 (由 20% 蔗糖和 40% 木糖溶于 pH6.5 的磷酸缓冲液制成) 混合, 40℃ 保温 10min, 再于 100℃ 加热 10min, 产生的葡萄糖含量用葡萄糖试剂盒测定。

2 结果与分析

2.1 固定化酶的最适温度

在不同温度下测得固定化酶活力变化如图 1。

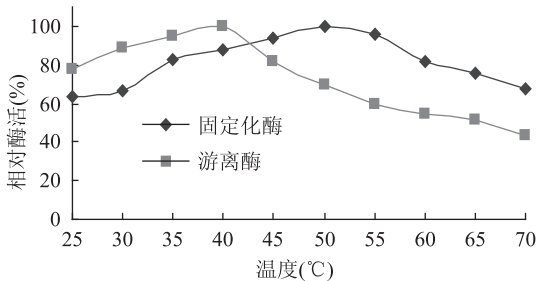


图 1 固定化酶的最适反应温度

由图 1 可知, 温度对固定化酶有较大的影响, 固定化酶的最适温度为 50℃, 在 40~70℃ 的范围内稳定性较好, 酶活力保持在 70% 以上, 具有良好的稳定性。

2.2 固定化酶的最适 pH

在不同 pH 条件下测得游离酶和固定化酶的活力变化如图 2。

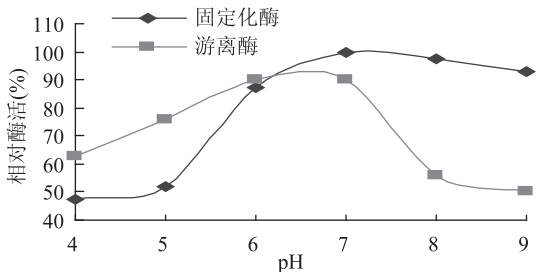


图 2 固定化酶的最适反应 pH

由图 2 可知, pH 低于 5 时, 强酸性环境容易破坏磁性壳聚糖微球的稳定性, 固定化酶的最适 pH 在 7 左右, pH6~9 范围内酶活力保持在 80% 以上, 与游离酶相比耐碱性增强。

2.3 固定化酶的热稳定性

在不同温度下, 将游离酶和固定化酶保持 1h, 然后测其酶活力, 如图 3。

由图 3 可知, 固定化酶较游离酶的热稳定性提高, 70℃ 以下保温 1h, 酶活力保持 80% 以上, 可知固定化酶的耐热性增强。

2.4 固定化酶的储存稳定性

将固定化酶 4℃ 储存 1、5、15、20、25、30d, 测其酶

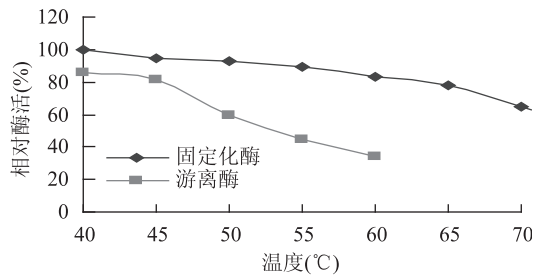


图 3 固定化酶的热稳定性

活力变化, 见图 4。

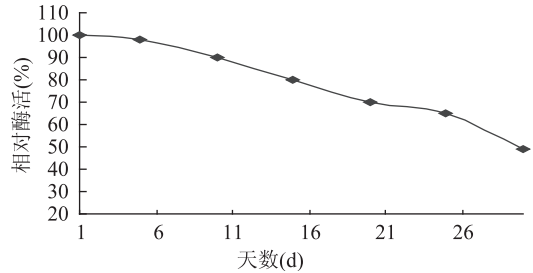


图 4 固定化酶的贮存性

由图 4 可知, 固定化酶在 4℃ 下保存 15d 时, 保持 85% 的酶活力, 20d 还具有 70% 的酶活力, 说明固定化酶具有良好的储存性。

2.5 固定化酶的操作稳定性

将固定化酶连续操作使用 10 次, 测其酶活力的变化, 如图 5。

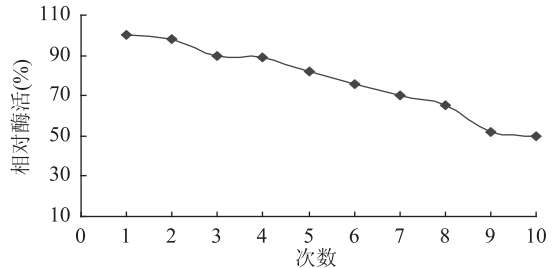


图 5 酶蛋白与载体结合的牢固程度

由图 5 可以看出, 5 次操作后保持 80% 的酶活, 连续操作 10 次保持 50% 的酶活力。磁性壳聚糖微球固定化酶制备工艺比较繁琐, 成本较高, 其操作稳定性有待进一步研究, 需提高其使用次数, 降低固定化成本。

3 结论

通过对磁性壳聚糖微球固定化 β -呋喃果糖苷酶性质研究, 结果表明: 固定化 β -呋喃果糖苷酶与游离酶相比, 最适 pH 向碱性一侧偏移约为 2.5, 表现出较强的耐碱性; 最适温度为 50℃, 耐高温能力增强, 在小于 70℃ 范围内有良好的热稳定性; 在 pH6~9 的范围具有良好的 pH 稳定性; 固定化酶在 4℃ 下保存 15d 后, 剩余酶活力为 80% 左右, 具有良好的储存稳定性; 连续 10 次操作后保持 50% 的酶活, 具有良好的操作性, 固定化酶回收率为 26%。

参考文献

[1] 张宁, 曹劲松, 彭志英. 液-液双相体系中 β -D-呋喃果糖苷酶催化转移反应的特性[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(9): 16-20.

[2] Quang D, Nguyen, Judit M, et al. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(7): 2461-2466.

[3] N Duran, MA Rosa, A D' Annibale, et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review [J]. *Enzym Microb Technol*, 2002, 31: 907-931.

[4] RS Juang, FC Wu, RL Tseng. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization [J]. *Adv Environ Res*, 2002(6): 171-177.

[5] 姜德生, 龙胜亚, 肖海燕, 等. 磁性壳聚糖微球的制备及其作用漆酶固定化载体 [J]. *应用化学*, 2005, 22(10): 1122-1126.

(上接第 146 页)

表 4 鲜味肽与其它鲜味剂的协同效应

鲜味剂组成			理论鲜味值				实测鲜味分值	增效系数(%)
MSG(%)	I+G(%)	组分 B(%)	MSG	I+G	组分 B	总鲜味值		
0.17	—	0.03	2.2	—	1.5	4.2	4.8 ± 0.85	14.3
—	0.01	0.01	—	2.0	1.0	3.5	3.7 ± 0.71	5.70
0.20	0.01	0.01	2.6	2.0	1.0	6.1	8.0 ± 0.63	31.4
0.17	0.02	0.03	2.2	4.0	1.5	7.7	8.9 ± 0.89	15.6

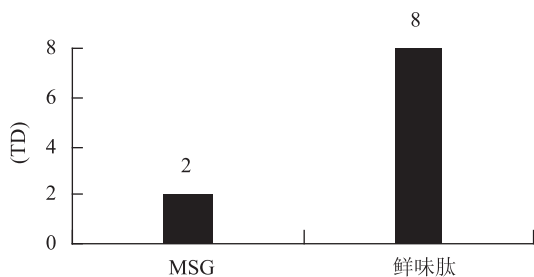


图 6 鲜味肽的 TDA 值

随着解吸液极性逐渐降低,疏水性增大,助鲜作用增强^[14]。本实验还发现,添加鲜味肽的组分都有显著加强了的口感厚实感。

表 3 不同组分洗脱液对鲜味提升效果的影响

底物	乙醇洗脱液	添加量 (%)	鲜味分值	评价
牛肉汤	—	—	5.0 ± 0.00	
	A	0.02	6.5 ± 0.52	鲜味提升效果明显
	B	0.02	9.0 ± 0.41	鲜味提升效果明显, 鲜味感受速度快
	C	0.02	6.5 ± 0.72	鲜味提升效果一般
	D	0.02	7.0 ± 0.48	鲜味提升效果一般
	E	0.02	9.0 ± 0.63	有明显鲜味提升效果, 鲜味厚实感重

2.7.2 鲜味肽与鲜味剂的协同效应 由表 4 得到,组分 B 与 MSG 具有明显的协同效应,增效系数为 14.3%,而组分 B 与 I+G 基本协同效应不明显。MSG、组分 B、I+G 不同比例对比对鲜味提升效果有显著差异,尤其 MSG 添加量改变,对鲜味的增效影响最大。

3 结论

蓝蛤粗肽液经过 NKA-II 大孔吸附树脂处理后,目标鲜味肽段得到有效富集,发现分离得到的鲜味肽对鲜味具有显著提升效果,在弱极性溶剂中呈现较强的鲜味和浓厚味。同时本实验分离得到的鲜味肽与味精协同效应明显,对风味的厚实感也有提升效果。

参考文献

- [1] Yamasaki Y, Maekawa K. A peptide with delicious taste [J]. *Agric Biol Chem*, 1978(42): 1761-1765.
- [2] Tamura M, et al. The relationship between taste and primary structure of Delicious Peptide (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from beef soup [J]. *Agric Biol Chem*, 1988(53): 319-325.
- [3] Spanier A M. Contribution of a naturally occurring nonvolatile peptide to beef flavor [J]. *Allured Publ Co Carol Stream, USA*. 1996:47-57.
- [4] Hedwig, et al. Analysis of Taste-Active compounds in an Enzymatic Hydrolysate of Deamidated Wheat Gluten [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50: 1515-1522.
- [5] 罗艳玲, 欧仕益. 大孔树脂在食品活性成分分离中应用 [J]. *食品与机械*, 2005, 21(5): 81-83.
- [6] 李朝兴. 大孔吸附树脂对绞股蓝皂甙的吸附研究 [J]. *离子交换与吸附*, 1994, 10(3): 203-207.
- [7] Frank O, Ottinger H. Characterization of an Intense Bitter-Tasting 1H, 4H-Quinolizinium-7-olate by Application of the Taste Dilution Analysis, a Novel Bioassay for the Screening and Identification of Taste-Active Compounds in Foods [J]. *Agric Food Chem*, 2001, 49: 231-238.
- [8] Katsumata T, Egi M, Ogasawara M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide [J]. *Food Chemistry*, 2006(99): 600-604.
- [9] Pieter D, Andre H A, Wim M M. The taste of delicious beefy Meaty Peptide [J]. *Agric Food Chem*, 1995, 43: 2828-2832.
- [10] 张水华, 等. 食品分析 [M]. 中国轻工业出版社, 2007.
- [11] 潘见. 大孔树脂对葛根黄酮的吸附分离特性研究 [J]. *农业工程学报*, 1999, 15(1): 236-240.
- [12] 苏拔贤. 生物化学制备技术 [M]. 科学出版社, 1998.
- [13] Labovs J N, Cagan RH. Complexity of flavor recognition and transduction [J]. *Amer Chem Soc*, 1993(2): 10-27.
- [14] 翁世兵, 孙恢礼. 海产鲜味物质及海产品特征滋味的研究进展 [J]. *中国调味品*, 2007(11): 21-26.