

壳聚糖固定化单宁酶及其澄清绿茶汤的应用研究

刘冠卉¹, 屠洁¹, 马海乐², 鲍坤¹

1(江苏科技大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江, 212018) 2(江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江, 212013)

摘要 以固定化单宁酶的酶活和活力回收为指标, 筛选出壳聚糖海绵载体固定化单宁酶。与游离酶相比, 固定化酶的最适反应 pH 向酸性偏移 0.5, 最适反应温度提高 5℃; 对金属离子和 EDTA 的稳定性均增强。固定化酶的半衰期也明显延长, 4℃时半衰期由 35.39 h 延长至 324.25 h, 25℃时半衰期仍高达 189.56 h。分别以没食子酸甲酯溶液和绿茶汤为底物, 经连续 6 批次酶促反应, 固定化单宁酶的酶活保持稳定。经固定化单宁酶处理后, 绿茶汤澄清度、贮存稳定性明显提高。

关键词 单宁酶, 壳聚糖, 固定化, 绿茶汤, 澄清

近年, 以绿茶为原料的纯茶饮料发展迅速, 已成为茶饮料市场主流产品。由于绿茶浸提液中茶多酚、蛋白质含量较高, 绿茶饮料易出现浑浊沉淀, 采用饮料工业常规方法难以解决且能耗高, 成为了技术瓶颈^[1]。单宁酶能断裂儿茶酚与没食子酸间的酯键, 使苦涩味的酯型儿茶素水解, 释放出的没食子酸又能与茶黄素、茶红素竞争咖啡碱, 形成分子量较小的水溶性短链物质, 可减低茶汤的浑浊度^[2]。但是单宁酶价格昂贵、使用寿命较短, 若将其固定在特定载体上, 则可保持酶活、重复使用。目前国内外对单宁酶固定化的相关研究尚不多, 已有的研究^[3~5]主要集中在固定化条件上, 而与其应用相关的理化性质研究较少。

壳聚糖来源丰富、价格低廉, 具有良好的吸附性能和生物相容性, 安全无毒^[6], 而且壳聚糖易于成型, 可加工成微球、膜、纤维、海绵等不同形态的载体^[7,8], 能满足生化反应器的结构要求。本课题以壳聚糖为原料, 在对单宁酶固定化条件研究的基础上, 首先比较了不同形态载体对固定化效果的影响, 再进一步研究了固定化酶的理化性质和重复使用性。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

单宁酶, Kikkoman Corporation, 进口分装; 绿茶, 宜兴毛尖, 市售; 壳聚糖, 脱乙酰度 $\geq 90\%$, 中国医药集团上海化学试剂公司; 没食子酸甲酯、罗丹宁为化学纯; 其他药品试剂均为分析纯。

试验仪器: AX120 电子天平(Shimadzu Corpora-

tion); UV9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); FD-1 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); HK-2A 超级恒温水浴锅(南京物化智能设备有限责任公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 壳聚糖载体的制备

壳聚糖粉末载体的制备参照文献[9]的方法。壳聚糖微球载体的制备参照文献[10]的方法。壳聚糖海绵载体的制备参考文献[11]的制备方法。

1.2.2 单宁酶的固定化

按 6mg/g 载体的给酶量, 在 pH 值 5.0 条件下, 4℃振荡 8 h, 然后用柠檬酸缓冲液清洗、吸干得固定化酶。

1.2.3 酶活力测定方法

游离酶活力测定: 参考文献[12]的方法测定。

固定化酶活力测定: 取 0.020 g 固定化酶按游离酶方法测定。

相对酶活: 在同组试验中将活性最高的试验点的值或初始值记为 100%, 其余试验点的值与该点的值相比, 以百分数表示。

1.2.4 热失活半衰期的测定^[13]

$$t_{1/2} = 0.693t / [2.303 \times \lg(E_0/E)]$$

式中: $t_{1/2}$ 为半衰期(h); E_0 为酶初始活力, 计为 100%; E 为 t 时的相对酶活。

1.2.5 蛋白质含量测定^[14]

1.2.6 绿茶汤的制备

茶样适度碾磨, 用去离子水浸提。V(茶): V(水)=1: 40, 浸提温度 80℃, 浸提时间 10 min, 然后抽滤除去叶梗等粗大不溶物^[15]。

第一作者: 硕士, 讲师。

收稿日期: 2008-05-06

1.2.7 茶汤澄清度的测定

参考文献[16],在 640 nm 下测定吸光值。

2 结果与分析

2.1 不同壳聚糖载体对单宁酶固定化效果的影响

用 3 种不同形态的壳聚糖载体固定化单宁酶,分别收集滤液和固定化酶,进行测定,见表 1。

表 1 不同载体对固定化单宁酶性质的影响

载体	总酶活/U			未偶联蛋白质 /μg	固定化酶酶活 /U·g ⁻¹ (载体)	酶活回收率 /%
	添加酶量	游离酶	固相酶			
粉末	0.18	0.086±0.001 9	0.076 2±0.007	12.61±0.5	0.145±0.013	42.3
微球	0.18	0.076±0.001 9	0.016 9±0.002	24.20±0.5	0.036±0.005	9.4
海绵	0.18	0.019±0.000 1	0.097 0±0.003	3.90±0.5	0.205±0.005	53.9

注:表中数值代表 4 次重度试验均值±标准差;活力回收率/%= $\frac{\text{固相酶总活力}}{\text{加入的总酶活力}} \times 100$

结果表明,海绵载体吸附蛋白质的性能最强,固定化酶的活力回收高于粉末和微球载体。这可能与其孔隙大,利于底物与载体接触有关。故以下试验均选用海绵载体固定化单宁酶。

2.2 固定化酶的最适反应温度和最适反应 pH

将固定化酶置于不同的温度(20~45℃)下测定酶活力,最适反应温度在 30℃左右。将固定化酶置于不同的 pH(pH3.5~6.5)环境中测定酶活力,最适反应 pH 在 4.5 左右。

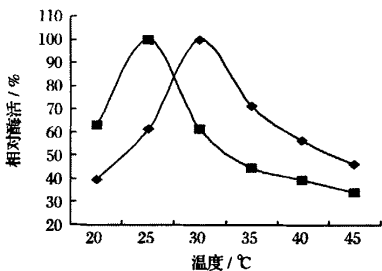


图 1 温度对固定化酶(◆)和游离酶(■)活力的影响

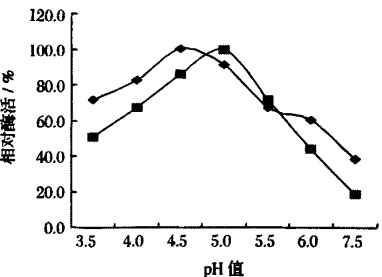


图 2 pH 对固定化酶(◆)和游离酶(■)活力的影响

单宁酶经壳聚糖固定化后,蛋白质结构变得稳固,最适反应温度提高,且在 40℃下可保持较高活力,利于在较高温度下的酶促反应。固定化酶的最适反应 pH 向酸性方向偏移,这与 Krajewska B 用壳聚

糖固定化脲酶^[17]的实验现象相同,其可能原因是:壳聚糖属于阳离子型载体,根据分配效应使得载体内的 H⁺ 的局部浓度较低,导致最适 pH 向酸性方向移动。这有利于该固定化酶在饮料工业中的应用。

2.3 金属离子对酶活力的影响

用 0.05 mol/L pH5.0 的柠檬酸缓冲液配制 CaCl₂ 溶液、CuSO₄ 溶液、FeCl₂ 溶液、ZnSO₄ 溶液和 EDTA 溶液。在酶反应体系中模拟绿茶汤中溶出金属离子的浓度,以不含金属离子与螯合剂 EDTA 的反应液为对照,测定游离酶活。同样方法,测定固定化酶活。

由表 2 可知,当 Ca²⁺ 浓度达到 0.25×10⁻⁴ mol/L 时对游离酶呈现抑制作用,而此浓度下对固定化酶却有激活作用。直至 Ca²⁺ 浓度达 1.0×10⁻⁴ mol/L 时表现出对固定化酶的抑制作用。Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺ 对游离酶与固定化酶均有激活作用。Cu²⁺ 在浓度为 1.0×10⁻⁴ mol/L 时对游离酶激活作用最高,相对酶活达 154.7%,而此浓度下固定化酶的相对酶活为 125.0%。Fe²⁺ 在浓度为 2.0×10⁻⁴ mol/L 时对游离酶激活作用最强,相对酶活达 170.7%,而此浓度下固定化酶的相对酶活为 115.5%。Zn²⁺ 在浓度为 2.5×10⁻⁵ mol/L 时对游离酶激活作用最高,相对酶活达 133.2%,而此浓度下固定化酶的相对酶活为 110.3%。EDTA 在试验浓度下对游离酶有激活作用,但对固定化酶没有明显作用。

表 2 金属离子对游离酶与固定化酶活力的影响

试剂	游离酶相对酶活力/%						固定化酶相对酶活力/%					
	浓度 $\times 10^{-4}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$						浓度 $\times 10^{-4}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					
	0	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	0	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0
CaCl ₂	100	103.7	93.8	91.3	90.1	77.6	100	121.9	115.6	112.5	96.9	93.3
CuSO ₄	100	105.0	116.1	133.5	154.7	144.7	100	102.9	105.9	120.6	125.0	126.5
FeCl ₂	100	105.0	111.2	121.1	143.5	170.7	100	101.7	103.4	106.9	110.3	115.5
ZnSO ₄	100	121.1	133.2	124.8	121.1	112.4	100	106.3	110.3	111.6	108.7	101.5
EDTA	100	124.8	132.2	126.0	124.8	117.3	100	101.6	101.6	100.2	106.3	103.7

结果表明,固定化单宁酶对环境中的金属离子及 EDTA 的稳定性较高,这与固定化过程可能引起酶分子的构象改变有关,并且载体对酶分子具有保护作用,使得金属离子及 EDTA 难以靠近酶的活性中心^[18]。另外,载体壳聚糖本身就能与金属离子螯合^[19],使得微环境中有效金属离子浓度进一步减少。

2.4 固定化单宁酶的热失活半衰期

将固定化酶与游离酶分别在 4℃ 和 25℃ 下放置 24 h 后,测定酶活力,计算固定化酶与游离酶的热失活半衰期,见表 3。结果表明,单宁酶经固定化后,热失活半衰期明显延长,应用价值增大。

表 3 固定化酶与游离酶的热失活半衰期

温度/℃	酶	E ₀ /%	E _t /%	t _{1/2} /h
4	固定化酶	100	95	324.25
	游离酶	100	62.5	35.39
25	固定化酶	100	91.6	189.56
	游离酶	100	56.6	29.22

2.5 不同底物对固定化单宁酶重复使用性的影响

以 0.1 mol/L 没食子酸甲酯溶液(用 pH5.0 0.05 mol/L 柠檬酸配制)为底物,30℃ 下连续反应 6 批次。以绿茶汤为底物,用 0.1 mol/L 柠檬酸将绿茶汤 pH 调节至 5.0,然后加入 1% 的固定化酶,30℃ 下连续反应 6 批次。以上每次反应时间均为 1 h,然后将固定化酶滤出,并用去离子水清洗、吸干、测定酶活,见图 3。

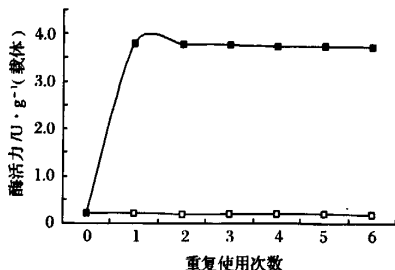


图 3 没食子酸甲酯溶液(□)和绿茶汤(■)为底物对固定化酶重复使用性的影响

结果表明,该固定化单宁酶具有良好的重复使

用性。以没食子酸甲酯为底物,反应 6 批次后酶活仍保留 87.2%。以绿茶汤为底物时,与初始酶活比较,反应后的酶活大幅增高,连续反应 6 批次后酶活仍为初始酶活的 17.23 倍。此现象尚未见报道,其原因有待进一步的实验探索。

2.6 固定化酶对绿茶汤澄清度与稳定性的影响

用固定化单宁酶澄清绿茶汤,澄清时间为 1 h,加酶量为 1%(W/V)、处理温度为 30℃。以未处理的茶汤为对照,比较 640 nm 下吸光值。

表 4 固定化酶处理对绿茶汤澄清度的影响

项目	A ₆₄₀
处理组	0.190±0.002 1
对照组	0.152±0.001 2**

注:5 次重复试验均值±标准差,**表示差异显著(P<0.01)。

将固定化酶处理过的茶汤分别装入 5 支试管,121℃、10 min 灭菌,然后于 4℃ 冷藏。在 1、3、5、10d 各打开 1 份测吸光值。对照茶汤同样分装 5 支试管,灭菌后 4℃ 冷藏,在 1、3、5、10d 各打开 1 份测吸光值,结果如图 4。在贮存期间,茶汤的吸光值均有增加,但对照组吸光值较同时间的处理组吸光值明显降低,10 天后,处理组茶汤的吸光值较对照组低 11%。

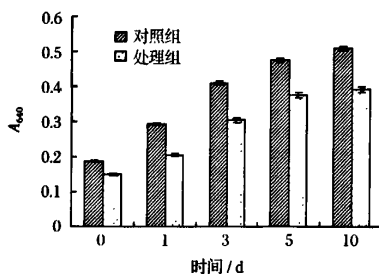


图 4 酶对茶汤贮存稳定性的影响

3 结 论

(1)壳聚糖海绵载体吸附性能强,固定化酶活力达 0.205 U/g 载体,固定化酶活力回收率达 53.9%,优于粉末和微球载体。

(2)经过固定化后,酶反应最适 pH 向酸性偏移 0.5 个单位,最适温度提高 5℃,体现出固定化酶良好

的工业应用性。

(3)固定化酶对金属离子和 EDTA 的敏感度下降。模拟茶汤中金属离子的溶出浓度, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 有激活作用, 随浓度增大, Ca^{2+} 对固定化酶由激活转向抑制。EDTA 无明显作用。

(4)4℃下, 固定化使酶的半衰期由 35.39 h 延长至 324.25 h。25℃下半衰期仍达 189.56 h, 稳定性明显增强。

(5)以没食子酸甲酯为底物, 连续 6 次酶反应后仍保持 87.2% 的酶活。以绿茶汤为底物, 连续 6 次酶反应后酶活仍达初始酶活的 17.23 倍, 具有良好的应用价值。

(6)30℃、pH5.0 条件下, 固定化单宁酶澄清茶汤的效果明显。将酶法澄清的绿茶汤灭菌后于 4℃存放 10 d, 其澄清度明显好于同时期的对照茶汤。

参 考 文 献

- 1 郑宝东, 曾绍校. 酶处理对绿茶浸提液成分及膜过滤通量影响的研究[J]. 农业工程学报, 2003, 19(6): 212~214
- 2 Belmares R, Contreras Esquivel J C. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry[J]. LWT Food Science and Technology, 2004, 37(8): 857~864
- 3 刘如石, 谢达平, 王革生, 等. 单宁酶的固定化及其性质研究[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(5): 386~388
- 4 Boadi D K, Neufeld. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(7,8): 590~595
- 5 肖琳, 龚加顺. 单宁酶的固定化及性质研究[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(11): 549~552
- 6 Krajewska Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(2,3): 126~139
- 7 Liang Zupei, Feng Yaqing, Meng Shuxian, et al. Preparation of glutaraldehyde cross-linked chitosan beads under microwave irradiation and properties of urease immobilized onto the beads[J]. Transactions of Tianjin University, 2005, 11(2): 79~84
- 8 Mao Xuepu, Guo Gangjun, Huang Jinfeng, et al. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81: 189~195
- 9 Karim M R, Hashinaga F. Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid glucosyltransferase[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 809~811
- 10 Li Jin, Du Yumin, Sun Liping, et al. Chitosaneous hydrogel beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2006, 101: 3 744~3 745
- 11 刘晨光, 陈微, 孟祥红, 等. 三种形态的壳聚糖固定化脲酶的研究[J]. 武汉大学学报, 2003, 49(2): 243~246
- 12 Shweta S, Bhat T K, Dawra R K. A Spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 279(1): 85~89
- 13 张树政. 酶制剂工业手册[M]. 北京: 科学出版社, 1998
- 14 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analyt Biochem, 1976, 72(1,2): 248~254
- 15 方元超, 赵晋府. 茶饮料生产技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001
- 16 宁井铭, 夏涛, 周天山. 酶澄清绿茶饮料研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 122~124
- 17 Krajewska B, Piwowarska Z. Free vs chitosan-immobilized urease: Microenvironmental effects on enzyme inhibitions[J]. Biocatalysis and biotransformation, 2005, 23(3,4): 225~232
- 18 艾志录. 橄榄绿链霉菌 E-86 木聚糖酶的固定化及低聚木糖制备研究[D]. 中国农业大学博士学位论文, 2004
- 19 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007

Immobilization of Tannase on Chitosan and Its Application in Clarification of Green Tea

Liu Guanhu¹, TuJie¹, Ma Haile², Bao Kun²

1(College of Biology and Environment Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China)

2(College of Food and Biology Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT The chitosan sponge was chosen to immobilize tannase by detecting total and recovered activity. The optimal pH dropped 0.5 units and the optimal reaction temperature increased 5℃ after immobilization. The enzyme showed higher stability as compared to the native enzyme against metal ions and EDTA. The half-life of enzyme was prolonged from 35.39 h to 324.25 h when stored at 4℃ and it reached 189.56 h when stored at 25℃. The activity of immobilized enzyme was durable after six consecutive reactions with methyl gallate solution or green tea extracts as a substrate. The clarity and stability of tea extract were obviously improved after enzymatic treatment.

Key words tannase, chitosan, immobilization, green tea extracts, clarification