

提高 α -半乳糖苷酶稳定性的研究刘彩琴^{1,2}, 阮 晖¹, 傅明亮¹, 陈启和¹, 何国庆¹

1(浙江树人大学生物与环境工程学院, 浙江杭州, 310015) 2(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州, 310029)

摘 要 研究了臭曲霉 ZU-G1 产 α -半乳糖苷酶的热稳定性提高方法及其相应措施。针对提高 α -半乳糖苷酶制剂热稳定性的问题, 研究了添加物质对酶热稳定性的影响。结果表明, 甘露醇对 α -半乳糖苷酶的保护效果最好, 其次是棉籽糖、海藻糖和蜜二糖; L-半胱氨酸、黄原胶和甘油也起到了较好的保护作用。采用正交实验设计优化出最佳保护剂配方, 即 1.75 mmol/L 的海藻糖, 1.5 mmol/L 的甘露醇和 2 mmol/L 的棉籽糖。复合保护剂的添加使 α -半乳糖苷酶在 30~60℃ 时酶活保留率提高 11.6%~21.7%; 在 pH 3.0 时酶活保留率提高 52%。 α -半乳糖苷酶在 28℃、36.2℃ 和 45℃ 下贮存, 添加保护剂组酶活损失 50% 的时间分别为 89.5 d、38.4 d 和 8.4 d, 对照组分别为 40.9 d、23.3 d 和 7.79 d。

关键词 α -半乳糖苷酶, pH 稳定性, 热稳定性

α -半乳糖苷酶 (α -galactosidase, EC3.2.1.22) 可特异性水解半乳糖类寡糖和多聚半乳—(葡)甘露聚糖的非还原性末端 α -1,6-半乳糖苷键^[1], 广泛应用于食品加工、饲料工业和医药等领域^[2]。目前, 国内外对 α -半乳糖苷酶的研究主要侧重于生产、纯化和应用等方面, 对稳定性的研究报道较少, 而 α -半乳糖苷酶的结构与其热稳定性有直接相关性^[3], 为适应商业化生产和应用要求, 本研究筛选并优化了臭曲霉 ZU-G1 产 α -半乳糖苷酶在热和酸性环境中稳定性的安全复合保护剂, 为液态 α -半乳糖苷酶制剂的有效生产和应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 α -半乳糖苷酶粗酶液的制备

采用 *Aspergillus foetidus* ZU-G1 (CGMCC No. 1628) 发酵生产 α -半乳糖苷酶。

发酵培养基为 (g/L): 豆粕粉 32.8; 麦麸 20; K_2HPO_4 1; $FeSO_4$ 0.5, 起始 pH 6.3, 250 mL 三角瓶中装液量 30 mL, 在转速为 200 r/min 的摇床上 28℃ 培养 96 h。培养结束后用高速冷冻离心机将发酵液离心 15 min, 收集上清液, 分级盐析 (硫酸铵饱和度 30%~70%), 收集沉淀, 用少量 pH 5.0 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液溶解, 装入透析袋, 蒸馏水透析 (4℃), 直至透析外液检测不到 SO_4^{2-} 为止, 收集 α -半乳糖苷酶粗酶液。

1.2 保护剂的筛选

将不同类型保护剂以一定比例与 α -半乳糖苷酶粗酶液混合, 60℃ 水浴 1 h, 立即冰浴, 稀释后测定酶活力。以 4℃ 放置的未处理, 未加保护剂酶的酶活力作为 100%, 计算酶活力保留率 (%)。

1.3 复合保护剂的添加对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响

将添加保护剂 (处理组)、未添加保护剂 (对照组) 的 2 组酶液 (pH 5.0) 分别置于 30、40、50、60℃ 和 70℃ 的水浴, 保温 1 h 后, 立即冰浴, 适度稀释后, 测定其酶活力。以 4℃ 放置未处理, 未加保护剂酶液的酶活力作为 100%, 计算酶活力保留率 (%)。

1.4 复合保护剂的添加对 α -半乳糖苷酶 pH 稳定性的影响

将添加保护剂 (处理组)、未添加保护剂 (对照组) 的 2 组酶液 (pH 5.0) 分别稀释于 0.2 mol/L 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中, pH 为 2、3、4、5、6、7 和 8, 28℃ 放置 24 h, 取出立即用 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液调到 pH 5.0, 测定酶活力。以 4℃ 放置未处理, 未加保护剂酶液的酶活力作为 100%, 计算酶活保留率 (%)。

1.5 α -半乳糖苷酶制剂的保存实验

将 α -半乳糖苷酶制剂于 28℃、36.2℃ 和 45℃ 保存, 在不同的保存时间取样并测定酶活保留率。以初始酶活力为 100%。

1.6 检测方法

见参考文献 [2]。

1.7 数据分析

采用 Minitab v14 软件进行数据的统计分析。

第一作者: 博士 (何国庆教授为通讯作者)。

收稿日期: 2006-10-10, 改回日期: 2007-02-02

2 结果与分析

2.1 不同物质对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响

将可能具有保护作用的几种物质添加到 α -半乳糖苷酶粗酶液中,比较添加物质对酶热稳定性的影响。试验结果见表 1。

表 1 不同保护剂对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响

物质类型	浓度	酶活保留率/%
白蛋白	2%	71.28
	0.1%	69.26
明胶	1%	69.34
	0.05%	61.16
黄原胶	0.3%	76.04
	0.2%	78.32
甘油	20%	68.47
	10%	78.44
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mmol/L	76.61
	1 mmol/L	74.01
山梨酸钾	0.5%	42.76
	0.1%	39.13
NaCl	2 mmol/L	62.53
	0.4 mmol/L	60.71
L-半胱氨酸	2 mmol/L	78.57
	1 mmol/L	77.08
巯基乙醇	2 mmol/L	73.66
	1 mmol/L	76.95
甘露醇	2 mmol/L	79.55
	1 mmol/L	74.71
海藻糖	2 mmol/L	79.27
	1 mmol/L	71.59
乳糖	2 mmol/L	66.04
	1 mmol/L	64.83
抗坏血酸	2 mmol/L	64.36
	1 mmol/L	60.34
棉籽糖	2 mmol/L	78.71
	1 mmol/L	76.58
蜜二糖	2 mmol/L	78.85
	1 mmol/L	76.58
热处理未加保护剂		52.48
未处理未加保护剂		100.00

从表 1 可见,对 α -半乳糖苷酶热稳定性保护效果最好的是甘露醇,其次是海藻糖、蜜二糖、棉籽糖、L-半胱氨酸、甘油和黄原胶。添加白蛋白、明胶、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、巯基乙醇、乳糖、抗坏血酸和 NaCl 组的酶活保留率也都在 60% 以上,高于对照组(52.48%)。添加山梨酸钾反而使酶活保留率低于对照,原因待探究。

从表 1 也可见,有保护作用的物质具有浓度依赖性,如添加 2 mmol/L 的甘露醇、海藻糖、蜜二糖、棉籽糖、L-半胱氨酸的组,其酶活保留率高于 1 mmol/L 的组;10% 的甘油保护效果好于 20%,添加 0.2% 黄原胶组其酶活保留率高于添加 0.3% 的。试验得知,SDS 对酶具有破坏作用(数据未列出),推测酶的活

性部位可能有疏水基团,试验表明,甘露醇对酶稳定性起一定的保护作用,进一步证明了酶的活性部位有疏水基团,因为一些醇类的对酶的稳定机理可能是羟基基团和酶分子的相互作用或是醇类减少了介质的介电常数,加强了酶分子的疏水作用^[4],从而提高了酶的稳定性。

2.2 保护剂浓度对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响

甘露醇、海藻糖、蜜二糖、棉籽糖、L-半胱氨酸和黄原胶对 α -半乳糖苷酶的保护效果随着浓度而变化,有必要进一步考察不同浓度的保护剂对其热稳定性的影响。由于蜜二糖价格较高,保护效果与棉籽糖的相差不大,故未被列为保护剂。

以未经热处理未加保护剂的酶活力为 100%,不同浓度的甘露醇、海藻糖、棉籽糖和黄原胶的保护结果见图 1(a)、(b)、(c)、(d)。

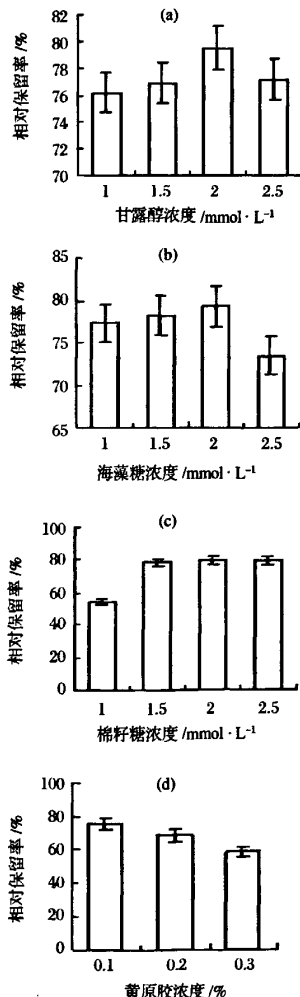


图 1 不同保护剂浓度对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响

从图 1 可见,随着甘露醇浓度的升高, α -半乳糖苷酶酶活保留率升高,当甘露醇浓度达到 2% 时,酶活保留率达到最高(79.5%),继续增加甘露醇浓度为 2.5% 时,酶活保留率反而有所下降,故 2% 的甘露醇的最佳使用浓度。添加海藻糖、棉籽糖和 L-半胱氨酸组与添加甘露醇组有相似的曲线。比较而言,酶液中添加 2 mmol/L 的甘露醇、海藻糖和棉籽糖,有助于酶的稳定。随着黄原胶浓度升高, α -半乳糖苷酶的保留率逐渐降低,可能是随着黄原胶浓度的升高,溶液越粘稠,妨碍了酶与底物的结合^[5]。

2.3 复合保护剂配方的优化

根据以上单因素实验结果可知,甘露醇、海藻糖和棉籽糖是较好的保护剂,在此基础上通过正交实验来优化复合保护剂浓度,以发挥各保护剂之间的协同作用,进一步提高 α -半乳糖苷酶的热稳定性。实验选用 $L_9(3^4)$,选取的因素、水平和结果见表 2。

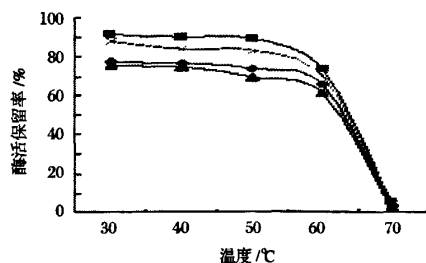
表 2 复合保护剂的正交实验设计及实验结果

序号	海藻糖 /mmol·L ⁻¹	甘露醇 /mmol·L ⁻¹	棉籽糖 /mmol·L ⁻¹	酶活保留 率 ¹⁾ /%
1	1(1)	1(1)	1(1.5)	67.95
2	1(1)	2(1.5)	2(2)	72.71
3	1(1)	3(2)	3(2.5)	64.19
4	2(1.75)	1(1)	2(2)	70.39
5	2(1.75)	2(1.5)	3(2.5)	71.31
6	2(1.75)	3(2)	1(1.5)	65.41
7	3(2.5)	1(1)	3(2.5)	66.99
8	3(2.5)	2(1.5)	1(1.5)	67.14
9	3(2.5)	3(2)	2(2)	67.34

注:1) 以未经热处理未加保护剂的酶活力为 100%。

通过 Minitab v14 对结果进行方差分析表明,甘露醇的影响最大,其次是棉籽糖,海藻糖的影响较小,复合保护剂的最佳配方为 $A_2B_2C_2$,即 1.75 mmol/L 的海藻糖,1.5 mmol/L 的甘露醇和 2 mmol/L 的棉籽糖。

2.4 不同温度下复合保护剂对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响(图 2)



◆ 没加保护剂组热处理 30 min; ■ 加保护剂组热处理 30 min;
▲ 没加保护剂组热处理 60 min; × 加保护剂组热处理 60 min

图 2 复合保护剂对 α -半乳糖苷酶热稳定性的影响

从图 2 可以看出,在 30℃~60℃,保护剂的添加能使酶活保留率提高 11.6%~21.7%。

2.5 复合保护剂对 α -半乳糖苷酶 pH 稳定性的影响

复合保护剂对 α -半乳糖苷酶 pH 稳定性的影响实验结果如表 3。从表 3 可见,无保护剂组以 pH5.0 的酶活保留率最高,在 pH3.0 时检测不到酶活;而添加保护剂组以 pH4.0 的酶活保留率最高,在 pH3.0 时酶活保留率仍然较高(52%);无论是否含有复合保护剂,该酶在 pH 4~6 都保持良好的相对稳定性,这利于酶的应用。

表 3 复合保护剂对 α -半乳糖苷酶酸碱稳定性的影响

	pH	3	4	5	6	7	8
酶活保	添加保护剂	52	75	71	49	38	30
留率/%	没添加保护剂	—	65	79	72	54	32

注:— 没有检测到酶活。

2.6 α -半乳糖苷酶的保存实验

对热敏感的酶制剂通常在低温下贮藏。根据多点等稳稳定性实验方法^[6]可知,升高温度可以加快贮藏寿命的估算。实验中为了快速考察复合保护剂对于 α -半乳糖苷酶保存期限的影响,采用 28℃, 36.2℃, 45℃ 的贮藏温度,确定其酶活损失 50% 所需要的时间。结果表明,在 28℃、36.2℃ 和 45℃ 贮藏温度下,其酶活损失 50% 的时间分别为:对照组:40.9 d、23.3 d 和 7.79 d;添加保护剂组:89.5 d、38.4 d 和 8.4 d。

3 讨论

酶活力很大程度上依赖于酶分子构象的稳定性,酶分子的构象和催化部位的微环境的变化均影响到酶的催化活力,周围温度和 pH 会导致酶的空间结构破坏从而丧失其原有的生物活性。酶在纯的溶液中比在不纯的溶液中更易变性,因此酶溶液一般在保护试剂的存在下于低温下保存。糖类、多元醇、氨基酸及其衍生物、甘油、多聚物等一般被称为蛋白质的共溶剂。近几年的研究表明,共溶剂对酶的保护作用机制实际上是共溶剂的加入改变了溶液的热力学性质,使得酶的稳定性得到增强,理论上称优先排阻作用^[7]。

Portera 等(1992)^[3]报道,棉籽糖和水苏糖因与 α -半乳糖苷酶的活性位点结合,对其热稳定性有较好的保护作用。由于水苏糖价格较高,本研究没有将其作为保护剂进行研究。试验中发现,棉籽糖和蜜二糖对 α -半乳糖苷酶有较好的保护作用,甘露醇和海藻糖对 α -半乳糖苷酶也具有较好的保护作用,可能是

因为这些物质的介入,加强了酶分子的疏水作用从而提高了酶的稳定性^[4]。

复合保护剂的添加能使 α -半乳糖苷酶在30℃~60℃范围内的酶活保留率提高11.6%~21.7%,但是在60~70℃范围内,保护作用不大;说明该复合保护剂在一定的温度范围内对 α -半乳糖苷酶有较好的保护效果。该复合保护剂能使 α -半乳糖苷酶在pH3.0的环境中保留52%的活性,拓宽了该酶在酸性环境中的应用。据 α -半乳糖苷酶的保存实验可推测出低温保存会使含有保护剂的酶制剂的保存期限更长。

参 考 文 献

- Gregg L F Wallis, Richard L Easton, Karen Jolly, et al. Galactofuranoic-oligoman nose N-linked glycans of α -galactosidase A from *Aspergillus niger* [J]. Eur J Biochem, 2001, 268: 4 134~4 143
- 刘彩琴,何国庆,陈启和,等.一株产 α -半乳糖苷酶菌株的分离与选育[J].食品与发酵工业,2006,32(11):33-36
- Portera J E, Sarikayaa A, Herrmannb K M, et al. Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1992, 14: 609~613
- Michèle Asther, Jean Claude Meunier. Increased thermal stability of *Bacillus licheniformis* α -amylase in the presence of various additives [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1990, 12: 902~90
- 徐莹,何国庆,李景军,等.菌源性弹性蛋白酶稳定性提高方法的研究[J].科技通报,2006,22(1):56~60
- Greiff D, Rightsel W A, An accelerated storage test for predicting the stability of suspensions of measles virus dried by sublimation in *cacuo* [J]. J Immunol, 1965, 94 (3):369~400
- 苏俊,张国政,刘忠华,等.蛋白质在分离纯化中保持稳定方法及应用[J].天津轻工业学院学报,2002,(1):21~24

Method for Increasing Stability of α -Galactosidase

Liu Caiqin^{1,2}, Ruan Hui¹, Fu Mingliang¹, Chen Qihe¹, He Guoqing¹

1(Biotechnology and Environmental Engineering of zhejiang shuren University, Hangzhou 310015, China)

2 (College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

ABSTRACT This study was to investigate the methods of increasing the thermostability of α -galactosidase from *Aspergillus foetidus* ZU-G1. In order to increase α -galactosidase heat stability, effect of different protectors was studied. The result demonstrated that mannitol was the best protective substance, followed by raffinose, trehalose and melibiose, L-cysteine, xanthan gum and glycerol showed slightly protective ability. The best formula of different protectors optimized by orthogonal experiment design consist of trehalose 1.75 mmol/L, mannitol 1.5 mmol/L and raffinose 2.0 mmol/L. The residual activity of α -galactosidase preparation containing multiplex protectors was increased by 11.6%~21.7% at 30~60℃, and the residual activity at pH 3.0 was increased by 51.6%. The half-life of preparation containing multiplex protectors was 89.5 days, 38.4 days and 8.4 days at 28℃, 36.2℃ and 45℃, respectively; the controlled ones was 40.9 days, 23.3 days and 7.8 days, respectively.

Key words α -galactosidase, pH stability, thermostability

《酱腌菜》行业标准正式公布

中华人民共和国商务部发布第72号公告,由中国调味品协会和北京市六必居食品公司共同起草的《酱腌菜》国内贸易行业标准正式发布,标准号为SB/T10439-2007。新标准将代替原有的行业标准,标准正式实施日期为2008年3月1日。中国调味品协会再此提请各个酱腌菜生产企业对此予以关注,在实际生产过程中严格执行新标准,保证产品的质量和水平,维护消费者的消费权益,以此推动中国酱腌菜行业的发展。