

磁性聚乙烯醇微球固定化 $\beta$ -淀粉酶的研究\*

钱斯日古楞,任舒燕,王红英

(大连轻工业学院 生物与食品工程学院,辽宁大连,116034)

**摘 要** 磁性聚乙烯醇微球为载体,采用戊二醛交联法固定化 $\beta$ -淀粉酶,并对固定化酶的理化性质等进行了研究。结果表明,磁性固定化 $\beta$ -淀粉酶的总活力、蛋白载量、比活、活性回收率分别为 7207.62 U/g, 157.21 mg/g, 45.85 U/mg 和 52.38%;固定化 $\beta$ -淀粉酶的反应最适温度和最适 pH 分别为 70℃和 5.0; $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 对 $\beta$ -淀粉酶有较强的抑制作用,而 $\text{Zn}^{2+}$ 对其有很强的激活作用, $\text{Mg}^{2+}$ 则不影响 $\beta$ -淀粉酶的活性; $\beta$ -淀粉酶被固定化后其热稳定性(在水介质中)、操作稳定性、pH 稳定性均比自由酶的明显提高。固定化 $\beta$ -淀粉酶在 4℃,pH 4.5 的缓冲液中保存 31 d,其活力仍保持最初活力的 98.3%,这比其自由酶的提高 26%。

**关键词** 磁性聚乙烯醇微球, $\beta$ -淀粉酶,固定化酶,共价交联法,理化性质

$\beta$ -淀粉酶( $\beta$ -amylase, EC 3.2.1.2)是一种重要的糖化酶,是在饴糖、啤酒、饮料等工业生产中普遍采用的糖化剂。它从淀粉 $\alpha$ -1,4-糖苷键的非还原性末端顺次切下麦芽糖单位,但不能水解 $\alpha$ -1,6-糖苷键,遇到 $\alpha$ -1,6键的分支点,则停止不前,是一种外切酶。因此,当其水解支链淀粉时,直链部分生成麦芽糖,而分支点附近及内侧因不能被水解而残留下来,其分解产物为麦芽糖及大分子的 $\beta$ -界限糊精。在该酶作用于底物时,同时发生沃尔登转位反应(Walden inversion),使产物由 $\alpha$ 型变为 $\beta$ 型麦芽糖,因此,称为 $\beta$ -淀粉酶<sup>[1~3]</sup>。

然而,由于 $\beta$ -淀粉酶的价格偏高和稳定性差等问题,使其在某些领域中的应用受阻。磁性固定化酶技术,不仅能提高酶的各方面的稳定性,扩大酶的应用范围,而且能够回收利用,降低酶的使用成本<sup>[4~6]</sup>。因此,利用此项技术,制备一种稳定性提高,重复利用的磁性 $\beta$ -淀粉酶制剂的研发,具有很高的应用和经济价值。关于 $\beta$ -淀粉酶磁性固定化方面的研究,在国内外还未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

$\beta$ -淀粉酶,诺维信生物公司产品,活力为 87 535.18 U/g;戊二醛,沈阳市新西试剂厂;聚乙烯醇(1750 $\pm$ 50),进口分装,广州市化学试剂玻璃仪器厂购买;可溶性淀粉,宜兴市第二化学试剂厂产品;3,5-二硝基水杨酸(DNS),北京市双华精细化工厂出

品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 磁性聚乙烯醇微球的制备<sup>[7]</sup>

称取 2.67 g 聚乙烯醇溶于 30 mL 蒸馏水中,90℃下搅拌 2 h。量取 15 mL 5%的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁流体,用超声波细胞粉碎机中粉碎 20 min,倒入溶后的聚乙烯醇溶液中,在 90℃下搅拌约 30 min。将混合物倒入分散介质中(分散介质为 90 mL 食用油,1.5 mL 吐温 80 和 15 mL 正丁醇)在 70℃下搅拌 4 h。加入 25%的戊二醛 0.75 mL 搅拌约 1 min 后,加入浓 HCl 0.5 mL 和 2%的海藻酸钠 0.6 mL,搅拌 10 h 后用 50%的乙醇和蒸馏水洗涤,得到磁性聚乙烯醇微球。

#### 1.2.2 $\beta$ -淀粉酶的固定化及酶活力测定<sup>[8~10]</sup>

在 30 mL 含有 0.1 g 磁性聚乙烯醇微球的 pH 7.0 的磷酸缓冲液中,加入 1.5 mL 酶液,振荡 2 h 后加入 0.38 mL 4%的戊二醛(戊二醛的最终质量分数为 0.05%),继续振荡 4 h 后置 4℃冰箱中过夜。取出,用磁场收集固定化酶,用蒸馏水反复洗涤至在紫外分光光度计 280 nm 处,以蒸馏水作空白对照,上清液 OD 值读数小于 0.05 为止。在 60℃pH 4.5 的条件下,采用 DNS 测定方法,测定酶活。

酶活单位定义为,在反应条件下,每分钟水解产生 1  $\mu\text{mol}$  麦芽糖的酶量(U)。

#### 1.2.3 固定化 $\beta$ -淀粉酶的理化性质

通过比较不同因素对酶活性的影响,确定固定化酶的最适温度、最适 pH 值、温度稳定性、操作稳定性和 pH 稳定性等特性,并与其自由酶的特性进行比较。

#### 1.2.4 金属离子对固定化酶活力的影响

用重蒸水配制 10~200 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、

第一作者:博士,副教授。

\* 大连市科技攻关项目(批准号:2004B3SF175)

收稿日期:2007-08-29

ZnSO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub> 溶液,然后分别加入到酶液中,置于冰箱中作用 24 h 后,用常规法分别测定活力。

2 结果与讨论

2.1 磁性固定化 β-淀粉酶的总活力、蛋白载量、比活以及活性回收率

0.1g 磁性微球上加 1.5 mL 原酶液,在 0.05% 的戊二醛添加量的条件下,制备磁性固定化 β-淀粉酶。通过测定酶活和蛋白质含量,计算固定化 β-淀粉酶的总活力、蛋白载量、比活和活性回收率,结果见表 1。

表 1 固定化酶的总活力、蛋白载量、比活、活性回收率

	总活力 /U · g <sup>-1</sup>	蛋白载量 /mg · g <sup>-1</sup>	比活 /U · mg <sup>-1</sup>	活性回收率 /%
固定化酶	7207.62	157.21	45.85	52.38

2.2 固定化 β-淀粉酶的最适温度

取一定量的固定化酶和自由酶,pH 4.5 条件下,分别在 40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃和 80 ℃与底物反应 5 min 后测定酶活力,结果见图 1。

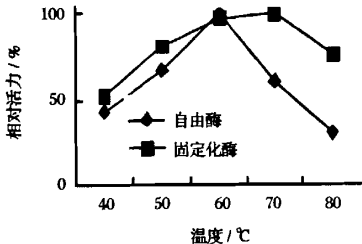


图 1 自由酶和固定化酶的最适温度

图 1 表明,固定化酶的最适温度为 70 ℃,比自由酶的提高 10 ℃。在 40~80 ℃,固定化酶仍保持较高的酶活力。大于 70 ℃的环境内,虽然固定化酶的活力逐渐下降,但比自由酶的明显缓慢,固定化 β-淀粉酶的催化温度范围比自由酶的明显增大。

2.3 固定化 β-淀粉酶的最适 pH 值

取一定量的固定化酶和自由酶,分别在 pH 3.5、4.0、4.5、5.0 和 5.5 条件下,在 60 ℃水浴中与酶底物反应 5 min 后测酶活力,结果见图 2。

图 2 表明,固定化 β-淀粉酶的最适 pH 值为 5.0,比自由酶的提高 0.5。在 pH 大于 5.0 的环境中,固定化酶仍保持较高活力,但自由酶的活力下降明显。

2.4 金属离子对固定化 β-淀粉酶活力的影响

浓度分别为 10 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L 和 200 mmol/L 的 Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 的溶

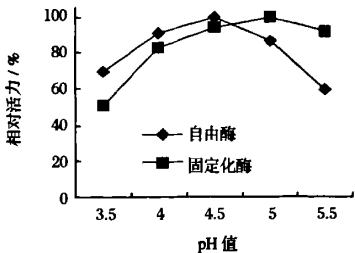


图 2 自由酶和固定化酶的最适 pH 值

液配置底物,在 60 ℃,pH 4.5 的条件下,与底物反应,测定不同浓度的 Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 对固定化酶和自由酶的活力影响情况。以不加金属离子的底物为对对照,结果见表 2。

表 2 金属离子对固定化酶和自由酶活力的影响

金属离子	离子浓度 /mmol · L <sup>-1</sup>	相对活力/%				
		0	10	50	100	200
Fe <sup>2+</sup>	自由酶	100	90.2	61.2	16.3	5.98
	固定化酶	100	99.0	66.8	37.2	10.0
Cu <sup>2+</sup>	自由酶	100	85.5	63.8	41.8	13.8
	固定化酶	100	93.9	63.2	49.4	12.1
Zn <sup>2+</sup>	自由酶	100	105.8	111.5	120.8	125.2
	固定化酶	100	108.0	117.9	124.9	127.0
Mg <sup>2+</sup>	自由酶	100	101.1	95.9	90.1	85.6
	固定化酶	100	101.2	97.7	96.3	95.5

分析表 2 可知,Fe<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对 β-淀粉酶的活力有明显抑制作用,而且抑制作用随离子浓度的增加而增强,但对固定化酶的抑制作用有小于其自由酶;Zn<sup>2+</sup> 对 β-淀粉酶有激活作用,而 Mg<sup>2+</sup> 对 β-淀粉酶的活力没有太大影响。

2.5 固定化 β-淀粉酶的 pH 稳定性

将一定量的固定化酶和自由酶,分别置于 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 的缓冲液中,4 ℃下保育 2 h,然后在 60 ℃和 pH 4.5 条件下,测定它们的酶活力,结果见图 3。

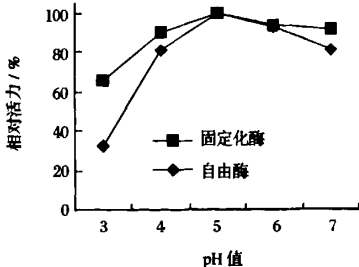


图 3 pH 值对固定化酶、自由酶稳定性的影响

图 3 表明,固定化 β-淀粉酶在 pH 3.0~7.0 范围内均保持较高的酶活力,与之相比,自由酶在 pH

3.0左右环境内,其活力较低。这说明 $\beta$ -淀粉酶被固定化后,其酸忍耐性明显增强,这可能与酶被固定化后,其构象更加稳定有关。

## 2.6 固定化 $\beta$ -淀粉酶在水介质中的热稳定性

将一定量的固定化酶和自由酶,分别于40℃、50℃、60℃、70℃和80℃的水浴中保育2h,然后在60℃和pH 4.5条件下,测定酶活力,结果见图4。

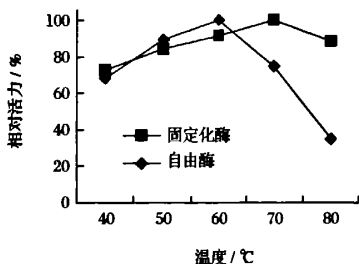


图4 温度对固定化酶、自由酶热稳定性的影响

从图4中可看出,在40~80℃,在水介质中固定化 $\beta$ -淀粉酶能保持70%以上的活力,显示出较高的热稳定性,而其自由酶在超过60℃时其活力迅速下降,80℃时只保持35%的活力。

## 2.7 固定化 $\beta$ -淀粉酶的贮存稳定性

将固定化酶和自由酶,4℃下,在pH 4.5,0.2mol/L磷酸缓冲液中分别保存31d后测它们的酶活力。结果,固定化 $\beta$ -淀粉酶的活力为最初活力的98.3%,而自由酶的活力为72%。这说明, $\beta$ -淀粉酶被固定化后,其贮存稳定性明显提高。

## 2.8 固定化 $\beta$ -淀粉酶的操作稳定性

用一定量的磁性固定化 $\beta$ -淀粉酶,在70℃和pH 5.0条件下,与底物连续反应7次,每次测定它的酶活力,观察酶活力的下降情况,结果见图5。每次酶的回收是在磁场下进行。

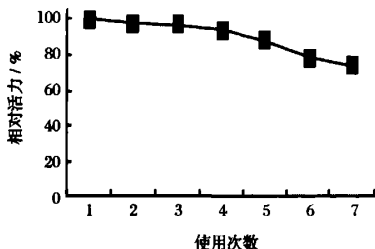


图5 固定化酶的操作稳定性

图5表明,固定化 $\beta$ -淀粉酶连续催化底物7次后,其酶活力仍保持74%以上,这说明利用戊二醛交联法固定化的 $\beta$ -淀粉酶与磁性聚乙烯醇微球表面官

能团有较强的亲和力,酶随操作过程不易脱落,固定化 $\beta$ -淀粉酶具有较高的操作稳定性。由于酶分离磁场力较弱,而且微球粒径较小,回收过程中会损失一部分,如果增加磁场力,延长回收时间,其活力保持情况将更为理想。

## 3 结论

(1)利用戊二醛交联法,可以得到活性回收率达到52.38%的固定化 $\beta$ -淀粉酶。如果采用共价结合法进行固定化,可以提高固定化 $\beta$ -淀粉酶的活性回收率。采用的载体无毒无副作用、成本低廉,可以广泛用于食品行业。

(2)固定化 $\beta$ -淀粉酶的使用温度和pH范围均比其自由酶变宽,而且其热稳定性、pH稳定性、操作稳定性、贮存稳定性均比自由酶有明显提高。这可能是酶被固定化后其刚性增加的缘故。

(3)用磁场很容易地把固定化 $\beta$ -淀粉酶从其反应体系中分离出来,稍作处理后可以连续使用。连续使用7次,其催化活力仍保持74%以上,这样可以大大降低酶的使用成本。

(4)固定化 $\beta$ -淀粉酶对金属离子的抗抑制作用比其自由酶有所提高,关于其它离子对它活力的影响有待于进一步研究。

## 参考文献

- 孟庆红. 淀粉酶的作用机理及在面包和饲料中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 1997, (6): 34~34
- 王璋编. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 139~153
- 戴经铨. 淀粉酶研究及应用进展[J]. 淀粉与淀粉糖, 1991, (1): 21~31
- 武金霞, 王沛, 李晚明. 糖化酶研究进展及趋势[J]. 自然杂志, 2003, 25(3): 161~163
- Bickerstaff G. F. Immobilization of Enzymes and Cells [M]. London: Humana Press Inc, 997. 133~139
- 蒋中华. 生物分子固定化技术及应用[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 1998. 19~28
- Sinan Akgol, Yase min Kacar, Adil Denizli, et al. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres [J]. Food Chemistry, 2001, 74: 281~288
- Rittich B, Spanovaa, Ohlashennyy Y. Characterization of deoxyribonuclease I immobilized on magnetic hydrophilic polymer particles [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 774 (1): 25~31
- Pieters B R, Bardeletti G, Coulet P R. Glucoamylase immobilization on a magnetic microparticle for the continuous hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor [J].

Appl Biochem Biotechnol, 1992, 32: 37~53

北京大学出版社, 1994. 311~312

10 李建武, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:

Study on Immobilized  $\beta$ -Amylase on Magnetic Polyvinylalcohol Microspheres

Qian Siriguleng, Ren Shuyan, Wang Hongying

(College of Bio. &amp; Food Technol., Dalian Inst. of Light Ind., Dalian 116034, China)

**ABSTRACT**  $\beta$ -Amylase was immobilized by crosslinking with glutaraldehyde onto magnetic polyvinylalcohol microsphere and the physical and chemical properties of the magnetic immobilized enzyme were studied. The results shown that total activity, protein binding, specific activity and activity retention of the immobilized enzyme were 7207.62U/g, 157.21mg/g, 45.85U/mg and 52.38% respectively. Its optimum temperature was 60°C and optimum pH was 4.5. Ions  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  inhabited the enzyme,  $\text{Zn}^{2+}$  was an activator of the enzyme, and  $\text{Mg}^{2+}$  hardly had any influence on the enzyme activity. Compared with the  $\beta$ -amylase in a free state, the operational, thermal and pH stability of the immobilized enzyme were improved significantly. After stored at 4°C, pH 4.5 for 31 days, the immobilized  $\beta$ -amylase retained 98.3 percent of its initial activity, which was 26 percent more than the free enzyme.

**Key words** magnetic polyvinylalcohol microsphere,  $\beta$ -amylase, immobilized enzyme, covalent crosslinking, physical and chemical property

信息窗

## 长时间蒸煮保持清澈透明的火锅鸡精配方

北京博邦食品配料有限公司专门研发了适用于火锅用的鸡精。该火锅专用鸡精生产配方(100%)为:食盐 22%、味精 56%、I+G 2.8%、蔗糖 6%、成型剂 2%、博邦专用鸡肉粉 2%、姜黄色素少许、肉香原料 F01 0.1%、肉香原料 F022 0.1%、填充剂 9%。

博邦专用鸡肉粉,在溶解过程中都不会出现悬浮、沉淀、分层、上浮、混浊、浑汤现象,这是此产品的关键。博邦专用鸡肉粉添加 2%即可使鸡精复合调味料达到鸡精行业标准 SB/T10371-2003 中其他氮 $>0.2\%$ ,还可以提高肉鲜、增强厚味、提升回味。

对于生产性能较差的制粒设备,用以上配方进行生产时会比较困难,可以通过少量加料,保持旋转叶片和压片之间空隙死料在 1~2kg 即可,也可以调整旋转叶片和压片来实现,也可通过改变设备的功率实现。死料,是指经过 2 次或 2 次以上重复挤压仍未从筛孔挤出的鸡精复合调味料物料。它的热量很高,主要是成型剂和配料之间在快速旋转和挤压的过程中产生的,合理控制制粒槽中的死料成为关键(北京博邦食品配料有限公司技术顾问斯波供稿)。

## 赛默飞世尔鼎力支持中国教育业——Thermo Fisher 奖学金在复旦大学颁发

2008 年 5 月 20 日,复旦大学生命科学学院—Thermo Fisher 奖学金颁奖典礼,暨赛默飞世尔科技 2008 年暑期实习项目校园宣讲会,在复旦大学光华楼隆重举行。经过院系推荐,学校严格评审,共计有 6 名本科生和 7 名研究生喜获该项奖学金。

“复旦大学生命科学学院—Thermo Fisher 奖学金”是由世界科学服务领域的领导者赛默飞世尔科技在 2006 年出资设立的。复旦大学生命科学学院是其在我国第一个设立奖学金的院校。颁奖仪式上,复旦大学副校长,兼生命科学学院院长金力先生作了热情洋溢的讲话,不仅表达了对赛默飞世尔的感谢,同时也对同学们寄予了殷切希望。

赛默飞世尔科技投资中国教育与赛默飞世尔科技在亚洲的整体发展计划是分不开的,其目的在于奖励品学兼优、德智体全面发展的优秀人才;营造学术氛围,鼓励学生投身于生物领域的研究和工作。“赛默飞世尔科技一直十分重视自己的社会责任,并致力于通过发展教育来促进社会进步。

赛默飞世尔科技宣布已经与复旦大学达成协议,从 2008 年开始向复旦的优秀学生提供暑期实习机会,并开展具体的校园招聘项目。