

微生物药物与生化药物

文章编号: 1001-8255(2003)11-0549-04

单宁酶的固定化及性质研究

肖琳¹, 龚加顺², 姚建铭², 余增亮²

(1. 污染控制与资源化国家重点实验室、南京大学环境学院, 江苏南京 210093;

2. 中国科学院等离子体物理研究所, 安徽合肥 230031)

摘要: 比较几种固定化载体, 确定以壳聚糖为载体, 用戊二醛作交联剂制得固定化单宁酶。壳聚糖用量 0.1 g, 用 3% 戊二醛 5 ml 交联 4 h, 然后加入酶 58.4 u, 于 4 °C 反应 4 h, 固定化酶活回收率可达 73%。单宁酶经固定化后, 热稳定性、pH 稳定性及最适温度均有所提高, 最适 pH 降低。

关键词: 单宁酶; 壳聚糖; 固定化酶

中图分类号: Q814.2 **文献标识码:** A

单宁酶(tannase, TA, 1)是一种水解酶^[1], 主要由真菌类的曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、根霉属(*Rhizopus*)以及毛霉属(*Mucor*)等微生物产生。1 能够水解单宁的酯键, 最终生成没食子酸和葡萄糖, 前者既可作为医药中间体, 又可作为食品、化妆品及饲料的抗氧化剂, 近年来还用作感光树脂的原料, 应用广泛。1 价格昂贵, 使用寿命较短, 应用受到一定限制。现有对 1 进行固定化的研究存在载体成本高、难以制备, 或固定化酶的使用寿命较短等问题^[2~4]。

随着固定化技术的发展, 固定化载体种类越来越多, 如人造沸石、离子交换树脂、纤维素、活性炭、多孔玻璃等用来固定酶都取得了满意的效果。本文采用自制壳聚糖、人造沸石和活性炭等易得原料作为载体对 1 进行固定化研究, 以期找到适合的 1 固定化方法, 并对固定化 1 (immobilized tannase, 2) 的理化性质进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 1 酶液的制备

黑曲霉(*A. niger*)发酵后, 4 °C 离心收集发酵液, 用 80% 饱和度的硫酸铵沉淀, 将所得沉淀溶于 pH5.6 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液, 经透析和 PEG6000 浓缩得 1 酶液, 酶活力为 34.7 u/ml。

1.2 固定化载体的制备

壳聚糖载体的制备: 按文献^[5]操作, 研磨过 40 目筛备用。

收稿日期: 2002-07-29

作者简介: 肖琳(1973), 女, 讲师, 主要从事环境生物技术研究。

Tel: 025-3592841 * 602

E-mail: mascotxl@yahoo.com.cn

人造沸石载体活化处理: 将沸石置于 450 °C 电炉中灼烧 4 h, 冷却后用 pH4.5 的 0.05 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液反复洗涤, 于 50 °C 烘干。把干燥沸石浸在 0.35% 的氨基化合物(对氨基苯甲酸或对苯二胺)溶液中, 2 h 后滤出, 依次用 pH 4.5 的 0.05 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液和水洗涤, 50 °C 干燥备用。

活性炭活化处理: 40 目的活性炭 0.1 g, 加入 5% 戊二醛溶液 5 ml, 室温搅拌 3.5 h, 静置过夜, 离心(4000 r/min)15 min, 弃去上清液, 沉淀用水洗 3 次以除去残余的戊二醛, 50 °C 干燥备用。

1.3 2 的制备

吸附法: 取固定化载体 0.1 g, 加入 1 酶液 5 ml, 充分搅拌, 4 °C 保温 2 h, 离心收集沉淀, 真空冷冻干燥备用。

交联-吸附法: 取固定化载体 0.1 g, 加入 5% 戊二醛溶液 5 ml, 室温搅拌 3.5 h, 静置过夜, 离心收集沉淀, 水洗 3 次后于 50 °C 烘干备用。加入 1 酶液 5 ml, 充分搅拌, 4 °C 保温 2 h, 离心收集沉淀, 真空冷冻干燥备用。

吸附-交联法: 在吸附法制得的 2 中再加入 5% 戊二醛溶液 5 ml, 静置约 8 h, 离心收集沉淀, 水洗 3 次后真空冷冻干燥备用。

1.4 酶活力测定

溶液酶活力测定: 将单宁溶于 pH5.6 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液, 配制成浓度为 0.35% 的样品。取样品 4 ml, 加入 1 酶液 1 ml, 30 °C 反应, 沸水浴灭活。取反应液 0.1 ml, 加入 95% 乙醇 10 ml, 310 nm 比色。由下式计算 1 活性:

$$U = 114 \times \frac{E_{t_1} - E_{t_2}}{t_1 - t_2}$$

式中： E_{t_1} 、 E_{t_2} 为反应 t_1 、 t_2 时间后的吸收度。

1 单位酶活定义为：1 min 内能降解 1 μ mol 单宁酯键的酶量。

2 活力测定：按上法测定，只是将 1 酶液 1 ml 改为按“1.3”项制得的 2 0.1 g。

1.5 酶活力回收

$$\text{酶活力回收}/\% = \frac{\text{2 酶活}}{\text{总投入酶活}} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 不同载体采用不同方法制备 2 的效果比较

表 1 不同载体采用不同固定化方法得到的 2 酶活

载体	固定化方法	酶活 /u · g(干重) ⁻¹	酶活力回收 /%
壳聚糖	吸附	347.0	20.0
	吸附-交联	451.4	26.0
	交联-吸附	912.0	52.5
人造沸石-1 ¹⁾	吸附	775.2	40.1
	吸附-交联	22.8	4.2
	交联-吸附	853.0	49.1
人造沸石-2 ²⁾	吸附	118.6	6.8
	吸附-交联	91.0	5.2
	关联-吸附	292.0	16.8
活性炭	吸附	123.1	7.1
	吸附-交联	332.9	19.2
	交联-吸附	723.1	29.1

注：¹⁾用对氨基苯甲酸活化；²⁾用对苯二胺活化

由表 1 可见，以壳聚糖为载体的固定化效果较好，交联-吸附法的固定化效果总体上最优，其次是吸附法。这可能是因为交联-吸附法是先先将载体改性，再进行酶的固定化，而吸附-交联法中酶可能会吸附在微孔里，载体又被交联，从而影响溶剂的扩散效应，使酶不易与底物接触而发挥效力。

2.2 用壳聚糖作为载体制备 2 的条件优化

采用正交试验对用壳聚糖作为载体固定化 1 的条件进行优化。因素水平选择、实验安排见表 2、3。

从表 3 可以看出各因素对 1 固定化影响的次序为： $A > E > C > D > B$ ，最佳固定化条件为 $A_1B_1C_2D_1E_1$ 。在进行验证试验时发现，当戊二醛浓度选取 3% 时（酶活回收率 73%），1 固定化效果优于 1% 戊二醛（酶活回收率 69%），故选取的固定化条件为：壳聚糖 0.1 g，酶量 58.4 u，3% 戊二醛 5 ml，载体交联 4 h，酶与载体于 4 °C 反应 4 h。在固定化过程中，给酶量不宜太大，否则不利于酶活力回收。将本法投料适当扩大，壳聚糖用量 10 g 时，酶活回收率 70%。

表 2 $L_{16}(4^5)$ 各因素和水平

因素	A 酶总活力 /u	B 戊二醛 浓度/%	C 交联时间 (载体+戊二醛) /h	D 酶与载体 反应时间 /h	E 酶与载体 反应温度 /°C
1	58.4	1	2	4	4
2	116.9	3	4	8	15
3	175.3	5	6	12	30
4	233.7	7	8	16	40

表 3 壳聚糖 $L_{16}(4^5)$ 的试验安排及结果

编号	A	B	C	D	E	酶总 活力 /u	2 酶活 /u · g ⁻¹	2 酶活力 回收 /%
1	1	1	1	1	1	58.4	348	60.0
2	1	2	2	2	2	58.4	143	24.4
3	1	3	3	3	3	58.4	46	7.8
4	1	4	4	4	4	58.4	91	15.6
5	2	1	2	3	4	116.9	182	15.6
6	2	2	1	4	3	116.9	148	12.7
7	2	3	4	1	2	116.9	63	5.4
8	2	4	3	2	1	116.9	108	9.3
9	3	1	3	4	2	175.3	148	8.5
10	3	2	4	3	1	175.3	707	40.3
11	3	3	1	2	4	175.3	217	12.4
12	3	4	2	1	3	175.3	804	45.9
13	4	1	4	2	3	233.7	23	1.0
14	4	2	3	1	4	233.7	51	2.2
15	4	3	2	4	1	233.7	268	11.5
16	4	4	1	3	2	233.7	97	4.1
k_1	27.0	21.3	22.3	28.4	30.3			
k_2	10.8	19.9	24.4	11.8	10.6			
k_3	26.8	9.3	7.0	17.0	16.9			
k_4	4.7	18.7	15.6	12.1	11.5			
R	22.3	12.0	17.4	16.6	19.7			

2.3 温度对酶的影响

在 pH 5.6 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液中，每隔 10 min 取 1(60 °C 保温)、2(80 °C 保温)进样测酶活（用未经处理的酶作对照），直至 100 min，绘出 1 与 2 的热稳定性曲线，如图 1 所示。不同温度下分别测定 1 和 2 的酶活力，结果如图 2。

从图 1 可知，1 在 60 °C 时保温 30 min 酶活便完全丧失，而 2 在 80 °C 下保温 100 min 酶活才全部丧失。可见 2 的热稳定性优于 1。

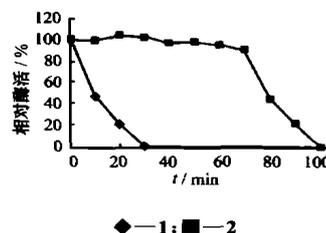


图 1 1 和 2 的热稳定性曲线

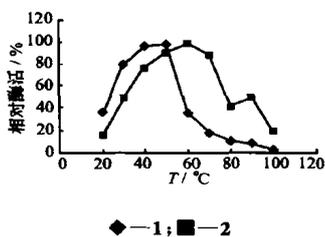


图2 不同温度下1和2的酶活力

从图2可知,2的最适反应温度为60℃,50~70℃酶活也较高。1的最适反应温度为40~50℃,50℃以上酶活急剧下降。这可能是因为随着温度的提高,导致结构破坏变性,从而使酶失活^[6];而酶经固定化后,蛋白质结构变得稳固,即使加热,肽链也不容易伸展,所以对热的稳定性较高。

2.4 pH对酶的影响

2.4.1 酶的pH稳定性

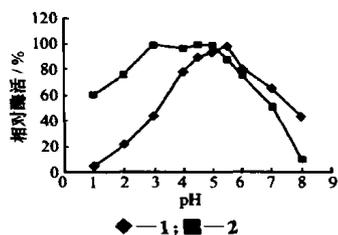


图3 固定化酶和游离酶的pH稳定性曲线

注:pH1、pH2为0.05 mol/L的氯化钾-盐酸溶液;其余为0.05 mol/L的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

2.0.1 g与1.1 ml分别在pH1~pH8的缓冲液中于4℃贮藏12 h后取出测酶活(图3)。可以看出,2的稳定pH范围比1宽,并且向酸性方向偏移。

2.4.2 1和2的最适pH

从图4可以看出1经固定化后,最适pH由5.0降至4.0,这对酶的实际应用很有意义。因为1在水解单宁时会产生没食子酸,使反应液pH降低,而最适pH的降低则可以减少因反应产物造成的酶失活。

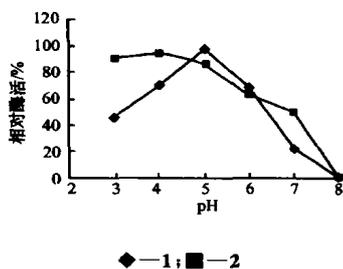


图4 1和2的最适pH曲线

注:0.05 mol/L的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

2.5 2的操作半衰期

茶多酚及其没食子酸酯等多酚类物质可以与蛋白质、咖啡碱等发生络合反应,生成茶乳凝,是造成

茶汤冷后发浑的主要原因。单宁酶能切断单宁中的酯键,释放的没食子酸阴离子能同茶黄素、茶红素竞争咖啡碱,形成分子量较小的水溶性物质,使茶汤的澄清度增加。

表4 2连续转化实验

t/h	澄清度/%	酶活/u·g ⁻¹
0.25	48.69	25.08
1	48.09	
2	44.45	
3	42.13	
4	42.10	
5	40.69	
6	39.45	
7	39.03	
8	37.93	
9	36.99	
10	36.27	
11	36.01	
12	35.93	
120	32.43	19.38

用茶汤这种实际底物考察固定化酶,进行了连续转化试验。用Φ1 cm×10 cm的直管玻璃反应器,内装2.1.4 g,将用蒸馏水配制的茶汤(2%的乌龙茶叶煮沸20 min,滤去茶叶,pH值自然)以0.5 ml/min的流速流入反应柱内,30℃下进行转化试验,于420 nm波长测定吸收度、计算得澄清度。澄清度越高,则相应的酶活越高。

$$\text{澄清度}/\% = \frac{A_{\text{对照}}^{420} - A_{\text{处理}}^{420}}{A_{\text{对照}}^{420}} \times 100$$

将连续进行了5 d转化试验的2取出,测酶活,按Weetall^[7]等的指数失活模型,以未进行转化试验的2作对照计算2的衰减常数和半衰期:

$$K_d = \frac{2.303}{t} \lg \left(\frac{E_0}{E} \right);$$

其中:K_d=衰减常数(h),t=酶柱操作时间(h),E₀=最初酶活,半衰期 $t_{1/2} = \frac{0.693}{K_d}$;

$$K_d = \frac{2.303}{t} \lg \left(\frac{E_0}{E} \right) = \frac{2.303}{120} \lg \left(\frac{25.08}{19.38} \right) = 2.15 \times 10^{-3} \text{h};$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_d} = \frac{0.693}{2.15 \times 10^{-3}} = 322.9 \text{h}.$$

3 讨论

通过对几种固定化载体的比较,认为壳聚糖作为载体固定化1的效果最好。

1经固定化后,热稳定性和pH稳定性提高,最适温度提高,最适pH降低。这些性质对于酶作为工业催化剂,连续进行催化反应是很有意义的。

参考文献:

- [1] Saddaaki I, Yasuji M, Koichi Y. Studies on a tanninacylhydrolase of microorganisms part I. A new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption[J]. *Agr Biol Chem*, 1967, **31**(5):513-518.
- [2] Sadaaki I, Yasuji M, Koichi Y. Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *Asp. oryzae* No. 7[J]. *Agr Biol Chem*, 1972, **36**(9):155-1562.
- [3] 程琦,程启坤,李名君. 单宁酶的固定化及其在酯型儿茶素水解反应中的应用[J]. 生物化学杂志, 1992, **12**(4):423-426.
- [4] 刘如石,谢达平,王革生,等. 单宁酶的固定化及其性质的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2000, **26**(5):386-388.
- [5] 陈盛,黄智跃,刘艳如,壳聚糖固定化纤维素酶的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(3):250-253.
- [6] 俞俊棠,唐孝宣. 生物工艺学[M]. 上海:华东化工学院出版社, 1991. 148-151.
- [7] Weetall HH, Detar CC. Immobilized tannase[J]. *Biotech Bioengi*, 1974, **16**(8):1095-1102.

Study on Tannase Immobilization and Its Characters

XIAO Lin¹, GONG Jia-Shun², YAO Jian-Ming², YU Zeng-Liang²

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment Science, Nanjing University, Nanjing 210093;
2. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

ABSTRACT: The studies on the immobilization of tannase indicated that when 0.1g chitosan reacted with 3% glutaraldehyde 5 ml for 4 h, then reacted with 58.4 u tannase for 4 h at 4 °C, the activity recovery of tannase was 73%. The thermostability, optimum temperature and pH stability of immobilized tannase were higher than those of soluble tannase but the optimum pH was lower than the latter.

Key Words: tannase; chitosan; immobilization

文章编号:1001-8255(2003)11-0552-03

螺旋霉素高产株的推理选育和工业生产

宋友礼¹, 屠小平², 胡巍¹, 黄根娣¹

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040; 2. 浙江绍兴制药厂, 浙江绍兴 312000)

摘要:产二素链霉菌 SIPI 9004 经自发或诱发的突变和推理选育, 得到若干耐药性变种。第六代一株变种 10-29, 产生螺旋霉素比原始菌株 SIPI 9004 增产约 6 倍。该变种应用于工业生产(30 m³ 发酵罐), 发酵效价、总单位和指数三项指标比原来生产菌株 F-16 分别提高 26.1%、33.3% 和 26.8%。

关键词: 产二素链霉菌; 螺旋霉素; 推理育种; 耐药性变种

中图分类号: TQ456 **文献标识码:** A

螺旋霉素(spiramycin, 1)的生物合成主要受到易利用碳源的调节、速用氮源的阻遏^[1]和终产物的反馈抑制^[2], 通过对 2-去氧葡萄糖、甲胺^[2]和 1^[3]抗性变种的选育, 得到不同的突变型菌株, 可分别解除对 1 生物合成的调节、阻遏和抑制作用, 使 1 得到增产。本文报道 1 产生菌氨基乙酸耐性和缬氨酸耐性突变型菌株, 以及自发突变型高产菌株 10-29 的理性化选育, 并成功地应用于工业生产, 取得了显著的

经济效益。

1 材料和方法

1.1 菌种

产二素链霉菌(*Streptomyces ambofaciens*)SIPI 9004。

1.2 培养基和培养条件

琼脂培养基/%: 葡萄糖 1.5, 黄豆饼粉 1.0, 麸皮 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, CaCO₃ 0.3, 琼脂 2.0; pH 7.0, 28°C 培养 12 d。

种子培养基: 葡萄糖, 淀粉, 黄豆饼粉, 酵母粉, NaCl, CaCO₃; pH 7.0, 斜面孢子挖块接种, 摇瓶置于旋转摇床(230 r/min), 28°C 培养 48 h。

收稿日期: 2003-05-06

作者简介: 宋友礼(1930), 男, 研究员, 从事工业微生物育种。

Tel: 021-63018361