

固定化果胶酶的酶学性质研究

林耀辉 刘新民 沈育芬 陈移亮 陈松河
(福建省亚热带植物研究所, 厦门, 福建, 361006)

摘要 介绍明胶固定化果胶酶的酶学性质及其和原酶比较的结果. 固定化酶反应的最适 pH 为 3.5, 最适温度为 60 ℃, 而原酶则分别为 pH 4.0 和 55 ℃. 研究结果还表明, 固定化酶对 pH、温度、金属离子等的稳定性都比原酶有了提高. 这对于固定化酶的重复回收使用和储存更为有利. 而固定化酶的 K_m 值比原酶的 K_m 值低, 这将使物质的转化反应更为完全.

关键词 明胶; 果胶酶; 固定化; 酶学性质

果胶酶广泛应用于食品工业, 对提高果汁出汁率和果酒的澄清度有良好的效果. 但至今果胶酶的使用都是一次性的. 固定化果胶酶的最大优点是酶的稳定性得到明显的提高, 使其达到重复回收多次使用的目的. 继而有利于提高果汁果酒的质量, 降低产品成本, 便于工艺操作的连续化和自动化. 关于果胶酶固定化方法的探索和比较研究已做过报道^[1]. 本文主要介绍明胶法固定化果胶酶的酶学性质的研究结果.

1 材料与方法

1.1 材料

果胶酶(德国 SERVA 公司产品); 果胶(美国 SIGMA 化学公司产品); 明胶(天津化学试剂二厂产品); 戊二醛(上海化学试剂采购供应站国产分装产品).

1.2 方法

1.2.1 固定化果胶酶的制备^[1]

在果胶酶固定化方法研究的基础上, 选择以明胶法来制备固定化果胶酶. 其方法如下: 15%的明胶溶液 10 mL 加入 1 mL(含 100 mg 果胶酶)的酶液. 搅拌均匀后, 加入 5%浓度的戊二醛 1 mL, 充分搅拌, 凝固后置 0 ℃冰箱保存 4 h, 取出切成约 3 mm 见方的小方块, 用 0.5%浓度的戊二醛溶液浸泡 16 h, 取出用蒸馏水洗涤数次, 干后保存备用(明胶、酶液、戊二醛均用 pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制或稀释). 所制备的固定化酶酶活力一般可达 200 单位/g 以上, 其酶活回收率可达 50%以上.

1.2.2 果胶酶活力的测定^[2, 3]

固定化果胶酶活力测定 1%果胶溶液(pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制)10 mL, 加入蒸馏水 10 mL 于大号试管中, 50 ℃水浴预热 15 min, 加入固定化酶 0.5 g, 调 pH 到 3.5. 50 ℃水浴保温反应 1 h(间歇搅动 10 次以上), 回收固定化酶. 反应液置沸水中灭活 10 min, 冷却后滴定.

本文收到日期: 1996-04-09

林耀辉, 男, 1941 年出生, 高级工程师

果胶酶活力测定 1%果胶溶液(pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制)10 mL, 加入蒸馏水 5 mL. 50 ℃水浴预热 15 min, 加入 1%果胶酶溶液 5 mL, 调节 pH 为 3.5、50 ℃水浴保温反应 1 h, 反应液置沸水中灭活 10 min, 冷却后滴定.

滴定 取 5 mL 反应液于碘瓶中, 加入 0.5 mol Na₂CO₃ 1 mL, 接着加入 0.1 mol I₂-KI 溶液 5 mL, 摇匀. 加塞室温下放置暗处 20 min, 加入 1 mol H₂SO₄ 2 mL, 用 0.025 mol Na₂S₂O₃ 溶液滴定至淡黄色, 加入 0.5%淀粉指示剂 1 mL, 再滴定至兰色消失为终点. 空白用蒸馏水代替酶液, 其余操作同前. 记录所消耗的 Na₂S₂O₃ 毫升数. 计算酶活力单位.

酶活力单位定义 在上述条件下, 果胶酶每小时酶促反应生成 1 μg 当量游离的半乳糖醛酸的酶量为 1 个酶活力单位, 以 u 表示.

2 酶的活力

2.1 酶反应的最适 pH

以 1%浓度果胶为底物, 在不同 pH 条件下进行酶反应, 测定酶活力. 结果见图 1. 结果表明, 固定化果胶酶的最适 pH 为 3.5, 果胶酶原酶的最适 pH 为 4.0.

2.2 酶反应的最适温度

以 1%浓度果胶为底物, 在不同温度条件下进行酶反应, 测定酶活力, 结果见图 2. 图 2 表明, 固定化果胶酶最适反应温度为 60 ℃, 果胶酶原酶的最适反应温度为 55 ℃.

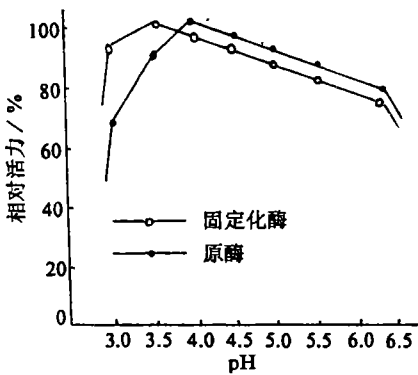


图 1 pH 对酶活力的影响

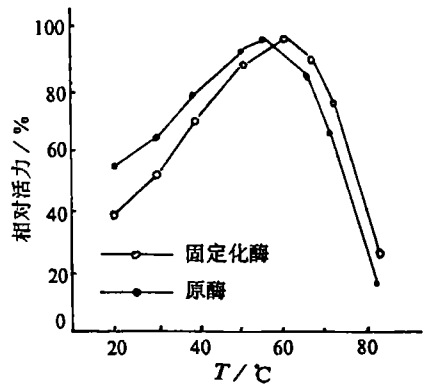


图 2 温度对酶活力的影响

2.3 酶的稳定性^(4, 5)

2.3.1 对 pH 的稳定性

固定化果胶酶和原酶在无底物情况下, 于不同 pH 的缓冲液分别在 60 ℃ 和 55 ℃ 下保温 2h, 而后测定酶活力, 结果见图 3. 图 3 表明, 固定化酶在 pH 2.0~6.5 比较稳定, 而原酶在 pH 2.5~6.5 比较稳定. 超过此范围, 酶活力很快下降.

2.3.2 对热的稳定性

固定化果胶酶和原酶分别在 pH 3.5 和 pH 4.0 的缓冲液中, 于不同温度下保温 2 h 后测定酶活力, 结果见图 4. 在无底物情况下, 固定化酶在 70 ℃ 以下稳定, 原酶在 65 ℃ 以下稳定.

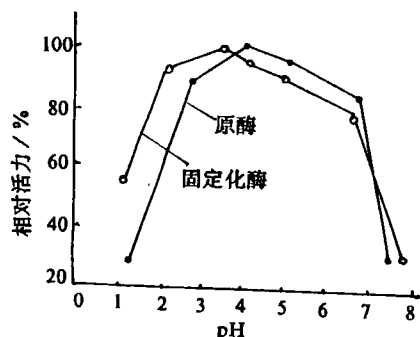


图 3 pH 对酶稳定性的影响

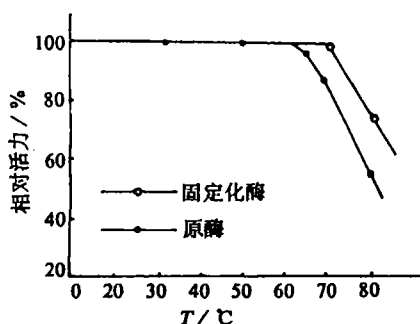


图 4 温度对酶稳定性的影响

2.3.3 对金属离子的稳定性

在酶活力测定的反应液中分别定量加入 1 mmol/L 浓度的 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子溶液, 测定其酶活力. 结果见表 1. 从表 1 可见 K^+ 和 Mg^{2+} 对固定化果胶酶和原酶的酶力没有影响; Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 对固定化果胶酶和原酶的酶活力有不同程度的抑制作用.

表 1 金属离子对酶力的影响

离子类型	固定化酶的相对酶活性	原酶的相对酶活性
对照	100	100
K^+	100	100
Fe^{2+}	90	88
Pb^{2+}	90	70
Cu^{2+}	72	96
Mg^{2+}	100	100

2.3.4 明胶固定化果胶酶的工作稳定性

以 1% 的果胶为底物, 在确定的固定化酶反应条件下, 用间歇法重复使用固定化酶对底物进行水解反应. 结果见表 2. 由表 2 可见, 明胶固定化果胶酶连续使用 9 次其酶活力保持在 80% 以上, 连续使用 20 次其酶活力可保持在 60% 以上.

表 2 固定化果胶酶的工作稳定性

次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酶活力/u	221.76	224.44	220.91	213.89	218.11	209.86	207.66	192.98	185.65	159.23
相对酶活/%	100	101.2	99.62	96.45	98.35	94.63	93.64	87.02	83.67	71.80

次数	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
酶活力/u	166.38	167.29	157.11	163.12	154.63	146.56	148.50	142.35	138.11	136.85
相对酶活/%	75.02	75.43	70.84	73.55	69.72	66.19	66.96	64.19	62.48	67.71

2.3.5 明胶固定化果胶酶储存的稳定性

在确定的酶反应条件下, 对存放在冰箱(10 °C)中和室温(28 °C)下的固定化酶, 每 15 d

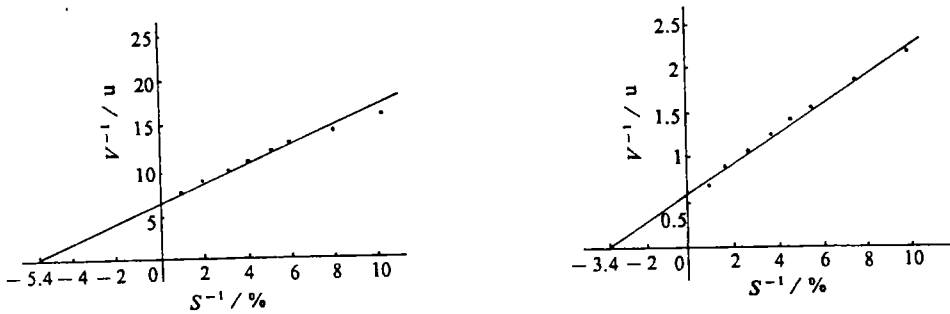
测定一次酶活力, 结果见表 3. 由表 3 可见, 在冰箱中存放 3 个月的固定化酶其酶活力不变, 存放在室温下 3 个月的固定化酶其酶活力可保留 80% 以上.

表 3 固定化酶储存的稳定性

储存方式	储存时间 / d							
	0	15	30	45	60	75	90	105
冰箱中(10 ℃)的相对酶活 / %	100	100	99.7	101	99.5	100	100	93
室温下(28 ℃)的相对酶活 / %	100	100	95	96	90	88	83	78

2.4 明胶固定化果胶酶和原酶的米氏常数(K_m 值)

以不同浓度的果胶为底物, 分别测定固定化酶和原酶的酶促反应速率, 按双倒数作图法(Lineweaver-Burk 两氏法)作图^[6, 7], 结果见图 5, 固定化酶和原酶的 K_m 值分别为 0.185% 和 0.294%.



$$K_m = -\frac{1}{- [S]^{-1}} = -\frac{1}{-5.4} = 0.185\%$$

(a) 固定化果胶酶的 K_m 值

$$K_m = -\frac{1}{- [S]^{-1}} = -\frac{1}{-3.4} = 0.294\%$$

(b) 果胶酶(原酶)的 K_m 值

图 5 赖-白两氏法作图求 K_m 值

([S]为底物浓度, 以百分浓度表示; V 为反应速度, 以酶活力单位表示)

从以上几方面酶学性质的比较可以看出, 果胶酶在固定化后, 其稳定性得到提高. 固定化酶耐受 pH 和温度的范围比原酶更广, 这将对固定化酶的应用, 特别是固定化酶的重复回收使用有利. 固定化方法和载体的性质可能是影响固定化酶稳定性的重要因素. 固定化酶的 K_m 值比原酶的 K_m 值低, 对固定化酶在实际生产上的应用也是十分有利的. K_m 值的减少, 可以使物质的转化反应更为充分和完全.

参考文献

- 1 刘新民, 林耀辉, 陈砾亮, 等. 果胶酶固定化方法的研究. 亚热带植物通讯, 1995, 24(2): 10~15
- 2 中山大学生物系微生物教研室. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1981, 64~65
- 3 颜颂真. 果胶酶活力测定方法的初步研究. 工业微生物, 1988, 18(5): 38~40
- 4 马建华, 那安, 崔福绵, 等. 黑曲霉果胶酶液体发酵及酶作用条件. 微生物学通讯, 1985, 12(2): 62~64
- 5 袁中一, 刘树煌, 袁静明. 固相酶与亲和层析. 北京: 科学出版社, 1975, 27~47
- 6 张来群, 高天慧. 尼龙网固定化果胶酶的制备及其性质研究. 生物化学杂志, 1992, 8(4): 462~467

7 南京药学院. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1979, 53~57

Researches on Enzyme Properties of the Immobilized Pectinase

Lin Yaohui Liu Xinmin Shen Yufen Chen Yiliang Chen Songhe

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian, 361006)

Abstract Enzyme properties of the immobilized pectinase by gelatin have been studied and compared with the native enzyme(soluble enzyme) in this paper. The results showed that the reaction optimal pH for the immobilized enzyme was 3.5, and its optimal temperature was 60℃. Optimal pH and temperature for native enzyme were 4.0 and 55℃ respectively. The results showed again that the stabilities to pH, temperature and metal ions etc of the immobilized enzyme were higher than the soluble enzyme. It is more advantageous to recovery use again and store for the immobilized enzyme. And the K_m value of the immobilized enzyme was lower than the soluble enzyme. This could make matter transform reaction more complete for the immobilized enzyme.

Keywords gelatin; pectinase; immobilization; enzyme properties