

树脂固定化酶的制备及其在低 pH 值葡萄糖酸生产工艺中的应用

张云娟, 郑岚*, 杨俊慧, 梁洁, 赵永雷, 马耀宏, 刘庆艾, 公维丽, 王丙莲

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东济南 250103)

摘要: 分别利用强碱性大孔树脂、氨基树脂、环氧树脂作为葡萄糖氧化酶(GOD)和过氧化氢酶(CAT)固定化载体制备固定化酶,并研究其在低pH值葡萄糖酸生产工艺中的应用效果。耐酸性试验表明固定化酶较游离酶具有更强的耐酸性能。分别利用游离酶和3种固定化酶在低pH值(pH值3.5)条件下制备葡萄糖酸,强碱性大孔树脂、氨基树脂和环氧树脂固定化酶所需反应时间分别为40h、24h和27h,酶活损失率分别为46.44%、3.42%和21.84%,而游离酶在反应过程中完全失活。3种固定化酶反应液的澄清度及色度均显著优于游离酶反应液。正交试验进一步优化后氨基树脂固定化酶的制备工艺为混合酶液浓度10%、GOD:CAT=1.5:1、固定温度25℃。在该条件下,氨基树脂固定化酶的酶活回收率可达93.15%,转化100g/L葡萄糖溶液所需时间为23h,反应结束时葡萄糖酸:葡萄糖酸钠可达0.899:1(m/m)。并且氨基树脂固定化酶稳定性良好。因此,利用氨基树脂固定化酶可以建立低pH值固定化酶葡萄糖酸生产工艺,实现高品质葡萄糖酸产品的生产。

关键词: 固定化酶; 葡萄糖酸; 强碱性大孔树脂; 氨基树脂; 环氧树脂

文章编号: 1673-9078(2023)03-93-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0362

Preparation of Resin-immobilized Enzymes and Their Application in Low-pH Production of Gluconic Acid

ZHANG Yunjuan, ZHENG Lan*, YANG Junhui, LIANG Jie, ZHAO Yonglei, MA Yaohong, LIU Qing'ai, GONG Weili, WANG Binglian

(Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

Abstract: Immobilized enzymes were prepared by using strongly alkaline macroporous resin, amino resin, and epoxy resin as immobilized carriers of glucose oxidase and catalase, respectively, and their effect on low-pH gluconic acid production was assessed. The results of the acid resistance test showed that all the three immobilized enzymes had stronger acid resistance than did the free enzyme. The free enzyme and the three immobilized enzymes were used to prepare gluconic acid under low pH conditions (pH value 3.5). The reaction times required for the strongly alkaline macroporous resin-immobilized enzyme, amino resin-immobilized enzyme, and epoxy resin-immobilized enzyme were 40, 24, and 27 h respectively. The enzymatic activity loss rates were 46.44%, 3.42%, and 21.84%, respectively. The free enzyme was completely inactivated during the reaction. The clarity and chromaticity of the three immobilized enzyme reaction solutions were significantly better than those of the free enzyme reaction solutions. The preparation process of amino resin-immobilized enzyme-after further optimization through orthogonal experiments - was as follows: the concentration of mixed enzyme solution was 10%, the ratio of glucose oxidase to catalase was 1.5:1, and the fixation temperature was 25 °C. Under these conditions,

引文格式:

张云娟,郑岚,杨俊慧,等.树脂固定化酶的制备及其在低pH值葡萄糖酸生产工艺中的应用[J].现代食品科技,2023,39(3):93-101.

ZHANG Yunjuan, ZHENG Lan, YANG Junhui, et al. Preparation of resin-immobilized enzymes and their application in low-pH production of gluconic acid [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 93-101.

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 山东省科学院-商河县产学研协同创新基金项目(2019-CXY15); 国家自然科学基金项目(32102454); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程项目(2020CXGC010602)); 齐鲁工业大学生物及生物化学ESI培育学科开放课题(ESIBBC202012); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD15)

作者简介: 张云娟(1995-),女,在读硕士,研究方向:食品生物化学,E-mail: zyunj1995@163.com

通讯作者: 郑岚(1984-),女,博士,副研究员,研究方向:食品生物化学,E-mail: zhenglan24@163.com

the recovery rate of amino resin-immobilized enzyme was as high as 93.15%, and the conversion time of the 100 g/L glucose solution was 23 h. At the end of the reaction, the ratio of gluconic acid to sodium gluconate had reached 0.899:1 (*m/m*), and the amino resin-immobilized enzyme was stable. Based on these results, we conclude that the amino resin immobilized enzyme can be used to establish a low-pH immobilized enzyme gluconic acid production process, with the goal of producing high-quality gluconic acid products.

Key words: immobilized enzyme; gluconic acid; strongly alkaline macroporous resin; amino resin; epoxy resin

葡萄糖酸是制备葡萄糖酸内酯、多种葡萄糖酸盐（葡萄糖酸锌、葡萄糖酸亚铁等）的原料，葡萄糖酸及其系列产品在食品行业可用作蛋白质凝固剂、食品防腐剂、酸味剂、营养补充剂、色调补充剂等，因此葡萄糖酸在食品行业有着巨大的市场需求^[1,2]。但是由于葡萄糖酸的水溶液为酸性，其生产难度远远大于葡萄糖酸钠、葡萄糖酸钙等葡萄糖酸盐。

目前，酶法是生产葡萄糖酸的主流方法，但是酶法工艺并不成熟。酶法是指利用游离葡萄糖氧化酶（Glucose Oxidase, GOD）和游离过氧化氢酶（Catalase, CAT）生产葡萄糖酸和葡萄糖酸钠混合物，再利用双极膜装置将葡萄糖酸钠转化成葡萄糖酸的方法^[3,4]。其中 GOD 为工作酶，负责将葡萄糖转化为葡萄糖酸；CAT 为辅助酶，负责清除 GOD 反应副产物 H₂O₂，避免 H₂O₂ 对 GOD 的毒害作用。该工艺主要存在以下问题：①为避免游离酶在低 pH 环境中失活，葡萄糖酸生产体系中通常补加大量 NaOH 溶液，导致葡萄糖酸中混杂有高含量的葡萄糖酸钠，增加了后期转化葡萄糖酸的难度和成本；②游离酶为含有大量杂质的粗酶液，杂质与产物葡萄糖酸难以分离，不仅提高了纯化成本，而且导致葡萄糖酸的品质降低。

建立低 pH 值固定化酶法葡萄糖酸生产工艺是解决酶法工艺中存在问题的关键。低 pH 值生产工艺是指流加少量 NaOH 溶液，使反应体系的 pH 值控制在 3.5 左右，从而降低最终产物葡萄糖酸中的葡萄糖酸钠含量。而将 GOD 和 CAT 进行固定不仅可以实现酶的重利用，而且葡萄糖酸和固定化酶易于分离，便于提取和精制，从而提升葡萄糖酸品质^[5]。低 pH 值固定化酶法葡萄糖酸生产工艺具有机械剪切力大、酸度低的特点，该工艺对固定化酶载体的机械强度及稳定性提出了极高的要求。目前固定化酶法制备葡萄糖酸钠（pH 值 6.0 左右）已有相关报道，而固定化酶法制备葡萄糖酸工艺鲜有报道。

树脂材料由于其较强的机械性能及良好的酶活固定率有望应用于固定化酶法生产葡萄糖酸领域。不同种类的树脂材料由于机械性能和带有的化学基团差异较大，其适合的应用场景有所不同^[6-10]。本研究分别利用强碱性大孔树脂、氨基树脂、环氧树脂作为 GOD 和 CAT 的共固定载体，优化酶的共固定方法，并将其

应用于低 pH 值葡萄糖酸发酵罐小试生产工艺中。通过分别研究强碱性大孔树脂、氨基树脂、环氧树脂的酶活固定率，以及 3 种类型固定化酶在低 pH 值反应环境条件下生产葡萄糖酸的效率及酶活损失率，建立可应用于低 pH 值葡萄糖酸生产工艺的 GOD 和 CAT 共固定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

GOD、CAT，广东溢多利生物科技股份有限公司；LX-298 强碱性大孔树脂、LX-1000HA 氨基树脂、LX-103B 环氧树脂，西安蓝晓科技新材料股份有限公司；葡萄糖、戊二醛（50%），天津市大茂化学试剂厂；氢氧化钠、30%过氧化氢，国药集团化学试剂有限公司；改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司。其余试剂均为国产分析纯级试剂。

SGD-IV 全自动还原糖测定仪、SBA-40E 生物传感分析仪，山东省科学院生物研究所；KRH-BIO3000 型 10 L 发酵罐，江苏省科海生物工程设备有限公司；ZQZY-AF8 恒温振荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；5804R 离心机，德国 Eppendorf 公司；LE204E/02 电子天平、S220 pH 计，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；722G 可见分光光度计，上海仪电分析仪器有限公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 游离酶酶活和比酶活的测定

1.2.1.1 葡萄糖氧化酶酶活的测定

在 20 mL 葡萄糖溶液（3 mg/mL）中加入 1 mL GOD，置于磁力搅拌器中反应 10 min（30 r/min，36 ℃）。结束后立即吸取 200 μL 反应液于离心管中，煮沸 10 min 终止反应。冷却至室温后，加入 40 μL CAT，30 ℃水浴 10 min，结束后立即煮沸 10 min。离心（10 000 r/min，10 min）取上清液。利用 SBA-40E 生物传感分析仪测定葡萄糖含量。游离酶 GOD 酶活单位（U）定义：在上述条件下，GOD 每分钟消耗 1 μmol 的葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.1.2 过氧化氢酶活性的测定

采用钼酸铵法测定过氧化氢浓度^[11]。取 1 mL 过氧化氢溶液 (60 mmol/L) 于离心管中, 加入 0.6 mL 酶液, 混匀, 反应 10 min, 然后立即加入 1 mL 钼酸铵溶液 (32.40 mmol/L), 混匀, 在 405 nm 下测吸光值, 根据标准曲线计算过氧化氢浓度。游离酶 CAT 酶活单位 (U) 定义: 在上述条件下, CAT 每分钟消耗 1 μmol 的过氧化氢所需要的酶量为 1 个酶活单位。

1.2.1.3 游离酶比酶活的测定

使用改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白质浓度进行测定。

$$U_{比} = U/c \quad (1)$$

式中:

$U_{比}$ ——比酶活, U/mg;

U ——酶活, U/mL;

c ——蛋白质量浓度, mg/mL。

1.2.2 单因素试验优化固定化酶的制备工艺

1.2.2.1 固定化酶的基本制备工艺

强碱性大孔树脂固定化酶的制备^[12]: 准确称取 2 g 经过预处理的强碱性大孔树脂, 加入 27 mL 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 7) 和 3 mL 混合酶液 (GOD:CAT=1:2, V/V; 此时混合酶液浓度为 10%, V/V), 于 25 °C 恒温摇床 150 r/min 振荡 8 h (即固定温度、固定转速、固定时间分别为 25 °C、150 r/min、8 h)。振荡结束后静置过夜 (4 °C), 去离子水清洗 3 次, 抽滤, 即为强碱性大孔树脂固定化酶。

氨基树脂固定化酶的制备: 准确称取 2 g 氨基树脂, 加入 26.40 mL 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 7)、3 mL 混合酶液 (GOD:CAT=1:2, V/V; 此时混合酶液浓度为 10%, V/V) 和 0.60 mL 50% 的戊二醛 (即戊二醛浓度为 1%, V/V), 于 25 °C 恒温摇床 150 r/min 振荡 8 h (即固定温度、固定转速、固定时间分别为 25 °C、150 r/min、8 h)。振荡结束后静置过夜 (4 °C), 去离子水清洗 3 次, 抽滤, 即为氨基树脂固定化酶。

环氧树脂固定化酶的制备: 准确称取 2 g 环氧树脂, 加入 27 mL 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 7) 和 3 mL 混合酶液 (GOD:CAT=1:2, V/V; 此时混合酶液浓度为 10%, V/V), 于 25 °C 恒温摇床 150 r/min 振荡 8 h (即固定温度、固定转速、固定时间分别为 25 °C、150 r/min、8 h)。振荡结束后静置过夜 (4 °C), 去离子水清洗 3 次, 抽滤, 即为环氧树脂固定化酶。

1.2.2.2 单因素优化试验

分别基于“固定化酶的基本制备工艺 (1.2.2.1)”进行单因素优化试验。固定其他条件不变, 分别考察以下因素对固定化酶酶活的影响。①混合酶液浓

度: 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%; ②GOD:CAT: 0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1; ③固定温度: 20、25、30、35、40、45、50 °C; ④固定转速: 80、100、120、140、160、180 r/min; ⑤缓冲液 pH 值: 5、5.5、6、6.5、7、7.5、8; ⑥固定时间: 2、4、6、8、10、12、14 h。

1.2.2.3 固定化酶酶活测定

取 2 g 固定化酶, 加入 20 mL 葡萄糖溶液 (3 mg/mL), 在磁力搅拌器中反应 10 min (36 °C, 30 r/min), 取 200 μL 样品煮沸 10 min 终止反应, 冷却到室温后离心 (10 000 r/min, 10 min) 吸取上清液, 利用生物传感分析仪测定葡萄糖含量。固定化酶酶活单位 (U) 定义: 在上述条件下, 固定化酶每分钟消耗 1 μmol 的葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活单位^[13]。

1.2.2.4 单因素试验优化效果的测定

分别利用固定化酶的基本制备工艺 (1.2.2.1) 以及单因素优化试验得到的最优制备工艺制备强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶。测定单因素优化试验优化前后 3 种固定化酶的酶活和酶活回收率^[14]。

1.2.3 游离酶及 3 种固定化酶的耐酸性试验

游离酶耐酸性测定^[15]: 将 1 mL GOD 分别置于 5 mL 不同 pH 值 (3.0~7.0) 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 中, 静置 3 h; 固定化酶耐酸性测定: 分别将 1 g 强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶置于 5 mL 不同 pH 值 (3.0~7.0) 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 中, 静置 3 h, 结束后用去离子水洗涤至中性。测定游离酶和固定化酶的酶活。

1.2.4 利用游离酶及 3 种固定化酶制备葡萄糖酸比较

1.2.4.1 葡萄糖转化率及酶活损失率的测定

分别采用单因素试验优化后的最优条件制备强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶。分别将 270 mL 游离酶或 300 g 固定化酶与 3 L 葡萄糖溶液 (100 g/L) 混合后置于发酵罐中进行反应。反应条件为: 反应温度 30 °C, 搅拌速度 200 r/min; 通气量 20 L/min。通过流加 NaOH 溶液 (100 g/L) 使 pH 值稳定在 3.5 左右。反应过程中每隔 1 h 测定反应液中的葡萄糖浓度和葡萄糖酸浓度。反应结束后测定计算葡萄糖酸钠浓度、固定化酶酶活和固定化酶的酶活损失率。

葡萄糖浓度测定: 采用 SGD-IV 全自动还原糖测定仪测定反应液中的葡萄糖含量。用移液枪吸取 500 μL 待测样品注入反应池, 仪器自动完成样品测定。

葡萄糖酸浓度测定: 以酚酞为指示剂, 采用酸碱

滴定法测定^[16]。葡萄糖酸浓度的计算方法见公式(2)。

$$c_{\text{GlcA}} = (c_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{GlcA}}) / V_1 \quad (2)$$

式中:

c_{GlcA} ——葡萄糖酸浓度, g/L;

c_{NaOH} ——NaOH 溶液浓度, mol/L;

V_{NaOH} ——NaOH 溶液体积, mL;

M_{GlcA} ——葡萄糖酸摩尔质量, g/mol;

V_1 ——待测液体积, mL。

葡萄糖酸钠浓度测定: 根据葡萄糖酸制备过程中流加 NaOH 溶液的消耗量计算。葡萄糖酸钠浓度的计算方法见公式(3)。

$$c_{\text{SG}} = (c_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{SG}}) / V_2 \quad (3)$$

式中:

c_{SG} ——葡萄糖酸钠浓度, g/L;

c_{NaOH} ——NaOH 溶液浓度, mol/L;

V_{NaOH} ——消耗的 NaOH 溶液体积, mL;

M_{SG} ——葡萄糖酸钠摩尔质量, g/mol;

V_2 ——反应液体积, mL。

1.2.4.2 反应液的澄清度和色度的测定

取反应结束后的反应液, 用分光光度计分别测定 720、420 和 520 nm 处的吸光度值, 根据公式(4)、(5)计算澄清度和色度。

$$C_{\text{清}} = 10^{-A} \quad (4)$$

$$C_{\text{色}} = A_1 + A_2 \quad (5)$$

式中:

$C_{\text{清}}$ ——澄清度;

A ——720 nm 处的吸光度值;

$C_{\text{色}}$ ——色度;

A_1 、 A_2 ——分别为 420 nm 和 520 nm 处的吸光度值。

1.2.5 正交试验优化氨基树脂固定化酶的制备工艺

由 1.2.4 实验结果可知, 氨基树脂是较强碱性大孔树脂和环氧树脂更理想的固定化酶载体, 因此采用正交试验进一步优化氨基树脂固定化酶的制备工艺。选取混合酶液浓度(A)、酶比例(B)、固定温度(C)为优化因素, 正交试验的试验设计见表 1。

表 1 氨基树脂制备工艺正交试验因素表

Table 1 Orthogonal test factor table of preparation process of

amino resin immobilized enzyme			
项目	A	B	C
1	5	1:1	25
2	10	1.5:1	30
3	15	2:1	35

1.2.6 氨基树脂固定化酶制备葡萄糖酸的应用效果

采用正交试验优化后的条件制备氨基树脂固定化酶。将 300 g 氨基树脂固定化酶及 3 L 葡萄糖溶液(100 g/L)置于发酵罐中进行反应。反应条件及葡萄糖浓度、葡萄糖酸浓度及葡萄糖酸钠浓度的测定方法同 1.2.4。

1.2.7 氨基树脂固定化酶储存稳定性和重复性的测定

储存稳定性测定: 将氨基树脂固定化酶置于去离子水中, 置于 4 °C 条件下保存, 每隔 3 d 测定氨基树脂固定化酶酶活, 并计算相对酶活。使用重复性测定: 将 300 g 氨基树脂固定化酶及 3 L 葡萄糖溶液(100 g/L)置于到发酵罐中进行反应, 反应条件同 1.2.4。当反应液中的葡萄糖浓度降为 0 g/L 时, 将反应液移出, 然后重新加入 3 L 葡萄糖溶液(100 g/L), 重复上述反应过程。记录氨基树脂固定化酶酶活及相对酶活随使用次数的变化情况。相对酶活的计算方法见公式(6)^[14]。

$$U_{\text{相对}} = \frac{U_1}{U_2} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

$U_{\text{相对}}$ ——相对酶活, %;

U_1 ——反应后的固定化酶酶活, U/g;

U_2 ——初始的固定化酶酶活, U/g。

1.2.8 统计分析

试验数据采用 Excel 软件作图并进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。所有试验都进行平行试验 3 次, 结果以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 游离酶酶活和比酶活的测定结果

GOD 和 CAT 的酶活分别为 6.67 U/mL 和 3.15 U/mL。GOD 和 CAT 的比酶活分别为 116.50 U/g 和 64.39 U/g。

2.2 单因素优化实验结果

强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶制备工艺中混合酶液浓度、GOD:CAT、固定温度、固定转速、缓冲液 pH 值、固定时间对固定化酶酶活的影响见图 1。

由图 1 可知, 强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶制备工艺中的各种因素均对固定化酶酶活产生影响。由图 1a 可知, 最适混合酶液浓度均为 10%。在该酶液浓度下强碱性大孔树脂的吸附能力、氨基树脂和环氧树脂活性基团的结合

能力均达到饱和。由图 1b 可知, 最适的 GOD:CAT 均为 1.5:1。CAT 固定过少有害物质过氧化氢不能完全清除, CAT 固定过多影响 GOD 的固定率。由图 1c 可知, 强碱性大孔树脂、氨基树脂和环氧树脂的最适酶固定温度分别为 25、30 和 30 °C。在温度较低时, 酶不容易吸附或共价结合到树脂上, 而温度较高时酶容易失活。由图 1d 可知, 3 种树脂的最适固定转速分别为 120、

140 和 140 r/min。过低或过高的转速影响树脂与酶的充分接触以及两者的吸附或共价结合。由图 1e 可知, 3 种树脂的最适缓冲液 pH 值分别为 6.5、6 和 7。过高或过低的 pH 值影响酶的稳定性并影响酶与树脂的结合过程。由图 1f 可知, 3 种树脂的最适固定时间分别为 4、10 和 6 h。达到该固定时间时, 酶与树脂的吸附或共价结合过程基本完成。

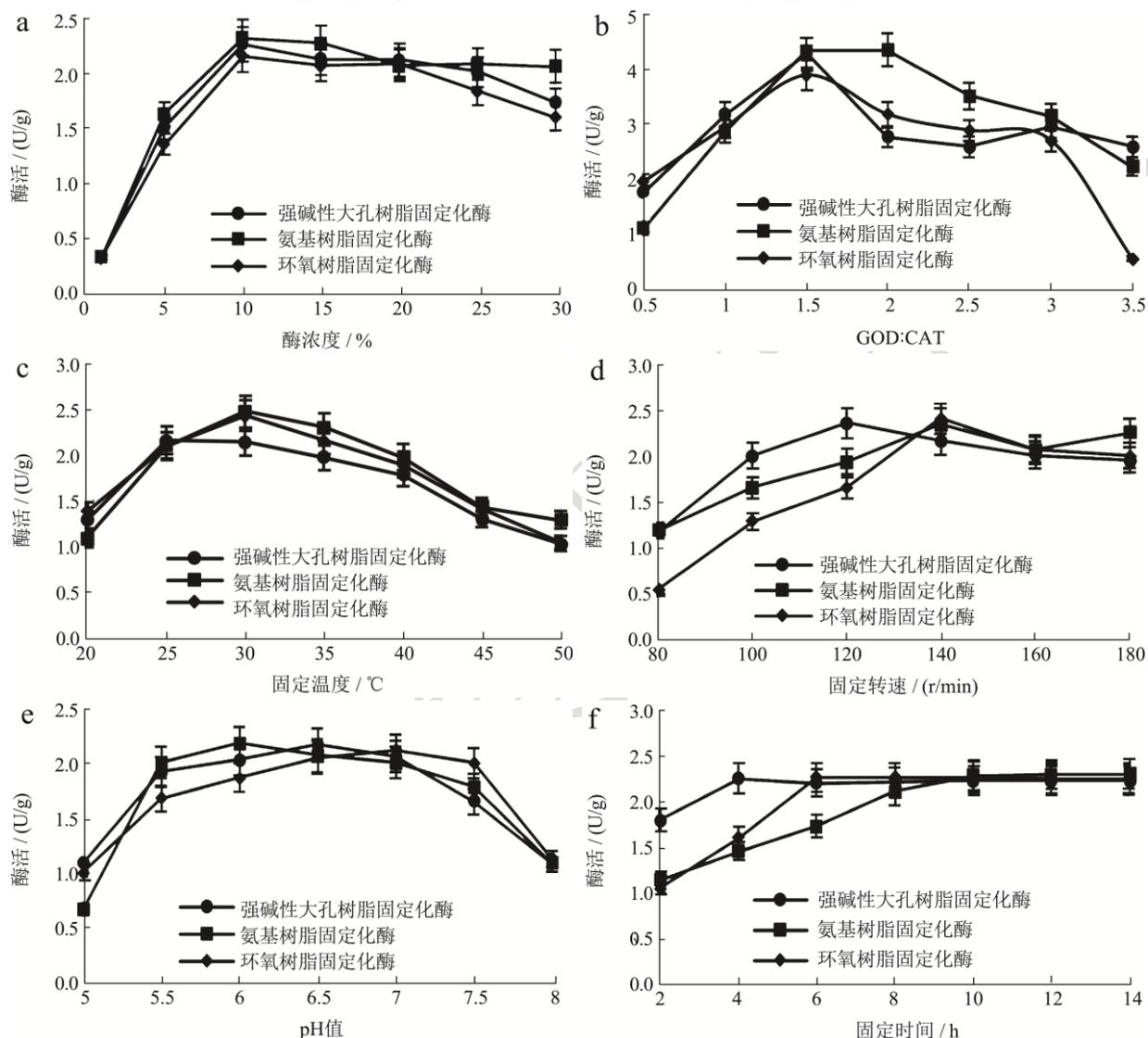


图 1 强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶制备工艺的优化

Fig.1 Optimization of preparation process of strong alkaline macroporous resin-immobilized enzyme, amino resin-immobilized enzyme and epoxy resin-immobilized enzyme

注: a: 混合酶液浓度; b: 酶比例; c: 固定温度; d: 固定转速; e: 缓冲液 pH 值; f: 固定时间。

2.3 单因素试验的优化效果

单因素试验优化前后固定化酶的酶活及酶活回收率见图 2。

由图 2 可知, 单因素试验优化前强碱性大孔树脂、氨基树脂和环氧树脂固定化酶的酶活分别为 2.03、2.08 和 2.05 U/g, 酶活回收率分别为 60.98%、

62.50%、61.42%。单因素试验优化后强碱性大孔树脂、氨基树脂和环氧树脂固定化酶的酶活分别为 5.19、5.27 和 5.22 U/g, 酶活回收率分别为 86.49%、87.86% 和 86.89%。强碱性大孔树脂、氨基树脂和环氧树脂固定化酶的酶活均较优化前显著提高 ($P < 0.01$), 分别较优化前提高了 155.67%、153.37% 和 154.63%。

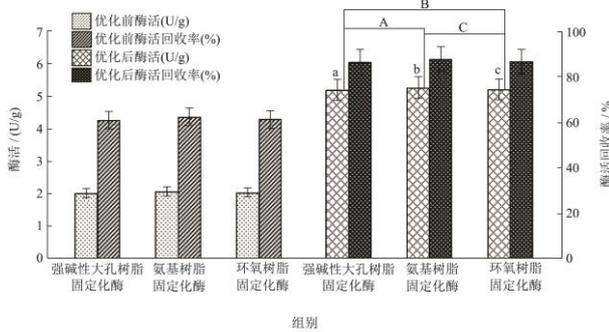


图2 单因素试验优化前后固定化酶的酶活及酶活回收率
Fig.2 Enzyme activity and enzyme activity recovery rate of immobilized enzyme before and after optimization by single factor experiment

注：图中 a、b、c, $P < 0.01$, 3种固定化酶优化后酶活分别较优化前差异极显著; A、B、C, $P > 0.05$, 优化后3种固定化酶酶活无显著差异。

2.4 游离酶及3种固定化酶的耐酸性试验结果

游离酶及强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶、环氧树脂固定化酶的耐酸性试验结果见图3。

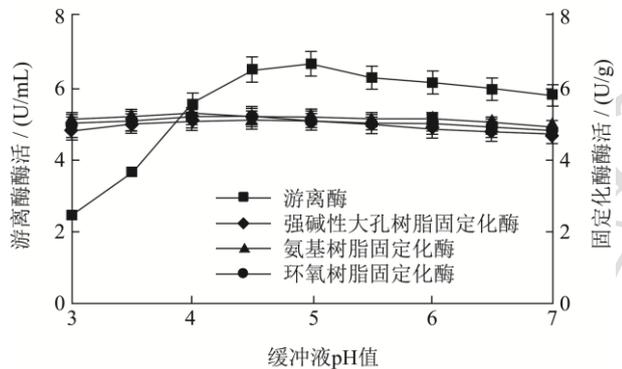


图3 游离酶及3种固定化酶的耐酸性测定

Fig.3 Acid resistance of free enzymes and three kinds of immobilized enzymes

由图3可知,当环境pH值小于4.5时,游离酶酶活急剧降低,而固定化酶酶活在低pH环境中较为稳定。强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶、环氧树脂固定化酶在pH值3.5的缓冲液中浸泡3h后的酶活分别为5.00、5.19和5.09 U/g,较浸泡前(5.14、

表2 固定化酶酶活及酶活损失率

Table 2 Enzyme activity and enzyme activity loss rate of immobilized enzyme

固定化酶类型	反应前酶活/(U/g)	反应后酶活/(U/g)	酶活损失率/%
强碱性大孔树脂固定化酶	5.19±0.31	2.78±0.17	46.44
氨基树脂固定化酶	5.27±0.26	5.09±0.25	3.42
环氧树脂固定化酶	5.22±0.29	4.08±0.22	21.84

5.28和5.21 U/g)均无显著差异($P > 0.05$)。而pH值3.5的环境会使游离酶的酶活显著降低($P < 0.01$),此时游离酶的酶活为3.68 U/mL,仅为处理前(6.67 U/mL)的55.17%。因此,3种固定化酶均较游离酶具有更强的耐酸性。

2.5 利用游离酶及3种固定化酶制备葡萄糖酸
的比较分析

2.5.1 葡萄糖转化率及酶活损失率的分析

利用游离酶及3种固定化酶制备葡萄糖酸过程中葡萄糖和葡萄糖酸浓度的变化见图4。

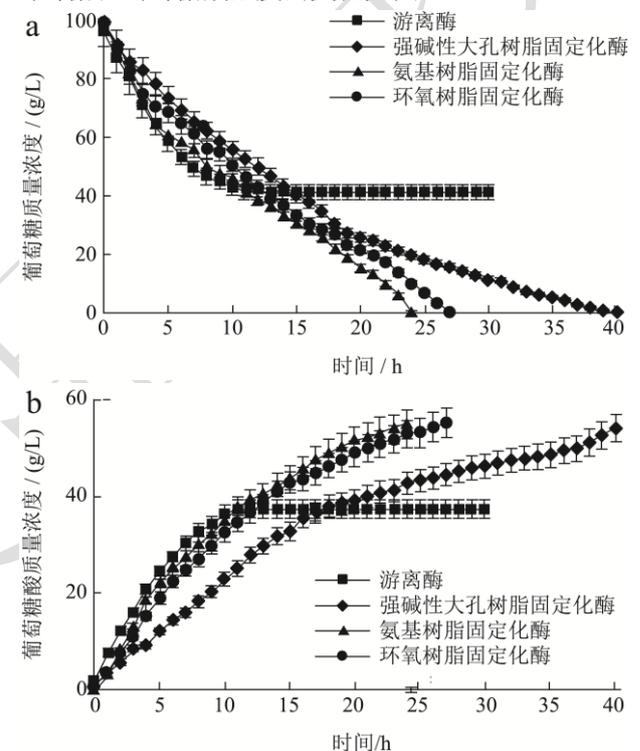


图4 葡萄糖酸制备过程中葡萄糖浓度(a)及葡萄糖酸浓度的变化(b)

Fig.4 Changes in glucose concentration (a) and gluconic acid concentration (b) during the preparation of gluconic acid

利用强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化酶和环氧树脂固定化酶分别制备葡萄糖酸,制备前后固定化酶的酶活及酶活损失率见表2。

由图 4 可知, 在利用游离酶制备葡萄糖酸的过程中, 当反应进行到 12 h 时反应液中葡萄糖的浓度不再降低, 葡萄糖酸的产量不再增加, 说明此时游离酶已经完全失活。因此, 游离酶在低 pH 环境中易失活, 无法应用于低 pH 值葡萄糖酸的制备工艺中。而利用强碱性大孔树脂、氨基树脂、环氧树脂作为固定化酶载体制备的固定化酶均可以实现低 pH 值条件下葡萄糖酸的固定化酶法生产, 转化 100 g/L 葡萄糖所需时间分别为 40 h、24 h 和 27 h, 葡萄糖的转化效率由高到低依次为: 氨基树脂固定化酶>环氧树脂固定化酶>强碱性大孔树脂固定化酶。

由表 2 可知, 反应结束时强碱性大孔树脂、氨基树脂与环氧树脂固定化酶的酶活损失率分别为 46.44%、3.42% 和 21.84%, 其原因因为葡萄糖转化为葡萄糖酸的反应需要较高的溶氧量, 因此葡萄糖酸的制备过程中机械搅拌的剪切力较大, 强碱性大孔树脂吸附的酶在剪切力的作用下脱落。虽然有报道表明 GOD 和 CAT 可以较好的共固定于强碱性大孔树脂上并实现实验室摇瓶条件下的葡萄糖酸钠固定化酶法生产^[12], 但是葡萄糖酸钠无需低 pH 值生产环境, 而且摇床实验条件的剪切力较实际生产条件更为温和。本研究表明强碱性大孔树脂作为低 pH 值固定化酶法生产葡萄糖酸的载体材料仍然存在酶结合不牢固的问题。而氨基树脂和环氧树脂利用共价键与酶连接, 酶可以较牢固的固定于氨基树脂与环氧树脂载体表面, 并且在低 pH 值、高剪切力的反应环境中, 氨基树脂与酶结合的更为牢固。

2.5.2 反应液的澄清度和色度的分析

利用强碱性大孔树脂固定化酶、氨基树脂固定化

酶和环氧树脂固定化酶分别制备葡萄糖酸, 反应结束时反应液的澄清度和色度见表 3。

表 3 反应结束时反应液的澄清度和色度

Table 3 The clarity and color of the reaction solution at the end of the reaction

反应液的酶类型	澄清度	色度
游离酶	0.825±0.041	1.219±0.049
强碱性大孔树脂固定化酶	0.951±0.038**	0.220±0.011###
氨基树脂固定化酶	0.964±0.029**	0.105±0.006###
环氧树脂固定化酶	0.985±0.010**	0.028±0.002###

注: ** $P<0.01$ 与游离酶的澄清度相比具有极显著差异性; ### $P<0.01$ 与游离酶的色度相比具有极显著差异性。

由表 3 可知, 固定化酶工艺制备的葡萄糖酸反应液澄清度和色度均显著优于游离酶工艺制备的反应液 ($P<0.01$)。固定化酶工艺制备的葡萄糖酸反应液杂质含量低, 极大的减轻了后续葡萄糖酸分离、纯化的难度和成本。

综合比较分析后可知, 氨基树脂固定化酶的葡萄糖转化效率高, 固定化酶酶活损失率低, 反应液色度及澄清度理想。氨基树脂是较强碱性大孔树脂、环氧树脂更理想的低 pH 值固定化酶法制备葡萄糖酸的载体材料。

2.6 氨基树脂固定化酶制备工艺的正交试验

优化结果

氨基树脂固定化酶的制备工艺正交试验的优化结果见表 4。

表 4 氨基树脂制备工艺正交试验结果

Table 4 Orthogonal test results of preparation process of amino resin-immobilized enzyme

序号	混合酶液浓度/%	GOD:CAT	吸附温度/°C	固定化酶酶活/(U/g)
1	5	1:1	25	2.04
2	5	1.5:1	30	2.59
3	5	2:1	35	2.50
4	10	1:1	30	4.44
5	10	1.5:1	25	5.56
6	10	2:1	35	5.37
7	15	1:1	35	4.54
8	15	1.5:1	25	5.28
9	15	2:1	30	5.19
K_1	7.13	11.02	12.88	
K_2	15.37	13.43	12.22	
K_3	15.01	13.06	12.41	
R	8.24	2.41	0.66	

由表 4 可知, 方差分析中的极差顺序排列表明各单因素对氨基树脂固定化酶酶活力大小影响的顺序为混合酶液浓度>GOD:CAT>固定温度, 正交优化试验获得的氨基树脂固定化酶的最佳制备工艺参数为混合酶液浓度 10%、GOD:CAT=1.5:1、固定温度 25 °C。利用该正交试验优化条件制备氨基树脂固定化酶, 其酶活和酶活回收率分别可达 5.59 U/g 和 93.15%。

2.7 氨基树脂固定化酶制备葡萄糖酸过程的测定结果

氨基树脂固定化酶转化完 100 g/L 的葡萄糖需要 23 h, 产生 54.88 g/L 葡萄糖酸和 61.04 g/L 葡萄糖酸钠, 葡萄糖酸:葡萄糖酸钠可达 0.899:1 (*m/m*)。正交试验优化后的氨基树脂固定化酶转化 100 g/L 葡萄糖的效率进一步提高, 转化时间较正交试验优化前缩短了 1 h。

2.8 氨基树脂固定化酶的储存稳定性和使用重复性

氨基树脂固定化酶储存稳定性和使用重复性试验结果见图 5。

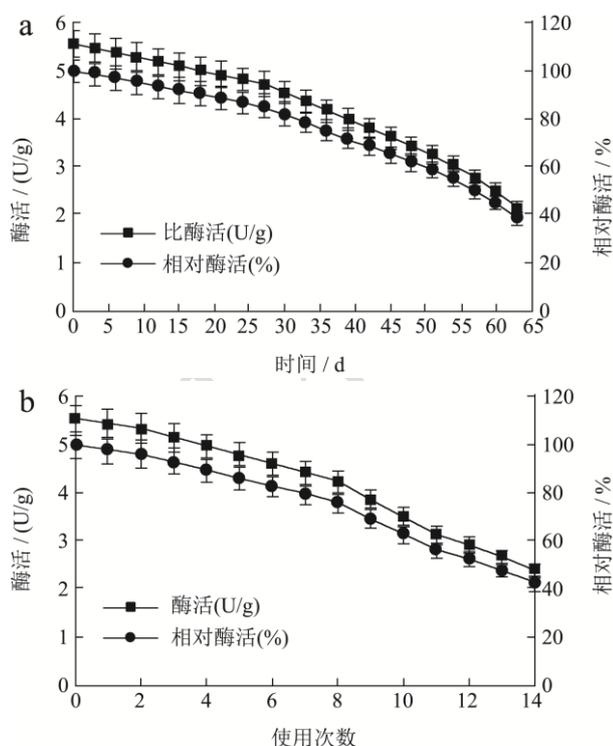


图 5 氨基树脂固定化酶的储存稳定性 (a) 和使用重复性 (b)

Fig.5 Stability (a) and repeatability (b) of amino resin immobilized enzyme

由图 5 可知, 虽然随着储存时间的延长或使用次数的增加, 氨基树脂固定化酶的酶活逐渐降低。但是

氨基树脂固定化酶储存 57 d 后仍可保留初始固定化酶酶活的 50.00%, 重复使用 12 次后仍可保留初始固定化酶酶活的 53.35%。因此, 氨基树脂固定化酶具有良好的储存稳定性和使用重复性。

3 结论

分别利用强碱性大孔树脂、氨基树脂、环氧树脂作为固定化酶载体制备 GOD 和 CAT 固定化酶, 并研究其在低 pH 值葡萄糖酸生产工艺中的应用效果。试验结果表明, 工艺优化后 3 种固定化酶的酶活回收率均可达 87% 左右, 并且均可以耐受 pH 值 3.5 的酸性环境。虽然 3 种固定化酶之间的酶活回收率及耐酸性无显著差异, 但其实际应用效果差异明显。应用效果试验表明, pH 值 3.5 反应条件下, 游离酶在反应过程中完全失活, 3 种固定化酶转化 100 g/L 葡萄糖的效率为: 氨基树脂固定化酶 (24 h) > 环氧树脂固定化酶 (27 h) > 强碱性大孔树脂固定化酶 (40 h)。综合分析可知, 氨基树脂固定化酶葡萄糖酸转化效率高, 酶活损失率低, 反应液澄清, 是较强碱性大孔树脂、环氧树脂更理想的固定化酶载体材料。利用正交试验进一步优化后, 氨基树脂固定化酶酶活回收率可达 93.15%, 转化 100 g/L 葡萄糖溶液所需时间为 23 h, 反应终产物中葡萄糖酸:葡萄糖酸钠可达 0.899:1 (*m/m*)。并且, 氨基树脂具有良好的使用重复性和储存稳定性。因此, 利用氨基树脂固定化酶可以实现低 pH 值葡萄糖酸的固定化酶法生产, 通过该工艺可以获得葡萄糖酸含量高、杂质少的高品质葡萄糖酸产物, 较目前普遍使用的游离酶法葡萄糖酸生产工艺具有显著进步。

参考文献

- [1] Banerjee S, Kumar R, Pal P. Fermentative production of gluconic acid: A membrane-integrated green process [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2018: 1-9.
- [2] Pinar K, Ravneet M, Jinesh C M, et al. Purification and immobilization of engineered glucose dehydrogenase: a new approach to producing gluconic acid from breadwaste [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 100.
- [3] Lei C X, Li Z C, Gao Q, et al. Comparative study on the production of gluconic acid by electro dialysis and bipolar membrane electro dialysis: effects of cell configurations [J]. Journal of Membrane Science, 2020, 608: 118192.
- [4] 王伟,傅荣强,刘兆明.双极膜电渗析由葡萄糖酸钠制备葡萄糖酸的实验研究[J].膜科学与技术,2017,37(1):107-113.

- [5] 惠明,董贞,田青,等.碳纤维共固定葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶的研究[J].中国食品学报,2018,18(3):135-140.
- [6] Wan D W, Tian L, Li X, et al. A versatile strategy for enzyme immobilization: Fabricating lipase/inorganic hybrid nanostructures on macroporous resins with enhanced catalytic properties [J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 139: 101-108.
- [7] Feng K L, Huang Z C, Peng B, et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil [J]. Bioresource Technology, 2020, 298: 122553.
- [8] Mao S, Chen Y, Sun J, et al. Enhancing the sustainability of KsdD as a biocatalyst for steroid transformation by immobilization on epoxy support [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 4: 109777.
- [9] Palomo J M, Munoz G, Fernandez-Lorente G, et al. Modulation of *Mucormiehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2003, 21(4-6): 201-210.
- [10] Li X X, Li D M, Wang W F, et al. Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin: Characterization and its application in synthesis of partial glycerides [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 133: 154-160.
- [11] 郎杰,朱银硕.大米过氧化氢酶活性的2种测定方法比较[J].中国粮油学报,2014,29(2):90-99.
- [12] 毕春元,任婷月,张金玲,等.离子交换树脂共固定葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶[J].食品与发酵工业,2015,41(7):13-18.
- [13] 朱衡,张继福,张云,等.基于羧基载体 LX-1000IDA 的脂肪酶固定化研究[J].广西师范大学学报(自然科学版),2020, 38(6):91-104.
- [14] 厉刚刚,阿合丽马 阿力木别克,冯雁,等.环氧树脂固定化环状芽孢杆菌糖氨基转移酶的研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2020,2:9-15.
- [15] 刘苑皓,赵兴秀,舒梨,等.多酚氧化酶的固定化及其酶学性质研究[J].中国调味品,2020,45(5):33-41.
- [16] 金可勇,胡鉴耿,金水玉,等.双极膜法制备葡萄糖酸工业化生产研究[J].水处理技术,2011,11:60-65.