

研究简报

磁性聚乙烯醇微球固定化  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶

钱斯日古楞, 王红英, 刘 阳, 耿金峰, 朱婧莹, 崔茂欣  
(大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

关键词: 磁性微球; 聚乙烯醇;  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶; 固定化酶

中图分类号: Q 814.2

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 08-2062-05

**$\alpha$ -Acetolactatedecarboxylase immobilized onto magnetic  
polyvinyl alcohol microspheres**

QIAN Siriguleng, WANG Hongying, LIU Yang, GENG Jinfeng, ZHU Jingying, CUI Maoxin

(School of Biology & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

**Abstract:** Magnetic polyvinyl alcohol (PVA) microspheres with 8—64  $\mu\text{m}$  in diameter were prepared from PVA by dispersion and copolymerization with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  as magnetite. There were more functional groups, such as hydroxyl and carboxyl *etc.* on the microsphere surface. 1, 1'-Carbonyldiimidazole (CDI), a carbonylating agent, was used for the activation of hydroxyl groups of PVA, and  $\alpha$ -acetolactatedecarboxylase (ALDC) was immobilized onto the magnetic PVA microspheres by covalent bonding through the amino group. The results showed that total activity, protein binding, specific activity and activity retention of the immobilized enzyme were  $63293 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $72.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $870.96 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  and 48.71%, respectively. The optimum temperature of immobilization enzyme was  $50^\circ\text{C}$  and the optimum pH was 6.0. Compared with the free enzyme of ALDC, the thermal, operational and pH stability of the immobilized enzyme were improved. After being stored at  $4^\circ\text{C}$ , pH 6.0 for 31 days, the immobilized ALDC retained 95.7% of its initial activity which was 8% higher than the free enzyme.

**Key words:** magnetic microsphere; polyvinyl alcohol;  $\alpha$ -acetolactatedecarboxylase; immobilized enzyme

引 言

在啤酒酿造过程中,  $\alpha$ -乙酰乳酸非酶氧化脱羧形成双乙酰, 双乙酰含量超过  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 啤酒产生类似馊饭味, 所以双乙酰含量高低已成为啤酒质量标准的重要标志之一。除去或降低啤酒中双乙酰时, 传统啤酒酿造采用低温储存方法, 让酵母本身的双乙酰还原酶还原双乙酰为乙偶姻, 最终

还原为 2,3-丁二醇, 而乙偶姻和 2,3-丁二醇几乎不影响啤酒风味, 此过程叫啤酒熟化过程, 时间一般 3~6 周左右, 有时甚至长达 3 个月。

$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 ( $\alpha$ -acetolactatedecarboxylase, EC. 4.1.1.5, 简称 ALDC) 能将  $\alpha$ -乙酰乳酸直接脱羧转化成乙偶姻, 不经双乙酰这个中间产物, 从而能使发酵周期缩短到 10 d 左右。啤酒发酵中使用 ALDC, 不仅大大缩短啤酒生产周期, 而

2006-12-05 收到初稿, 2007-02-28 收到修改稿。

联系人及第一作者: 钱斯日古楞 (1969—), 男, 副教授。

基金项目: 大连市科技攻关项目 (2004B3SF175)。

Received date: 2006-12-05.

Corresponding author: QIAN Siriguleng, associate professor.

E-mail: srgl2000@163.com

Foundation item: supported by Science & Technology Department of Dalian City (2004B3SF175).

且提高设备的利用率40%。目前国外啤酒生产普遍采用熟化期添加ALDC的方法。我国使用的ALDC依赖国外进口,因其价格昂贵,所以啤酒生产一般采用传统的低温储存方法<sup>[1-3]</sup>。

以磁性微球为载体,采用共价结合法,使酶固定到载体表面,制备出具有磁响应性的固定化酶。它既可稳定地分散于水相或有机相中,又可借助外部磁场快速回收,可达到重复利用酶和降低酶成本的目的<sup>[4-7]</sup>。通过固定化,可增加ALDC各方面的稳定性,使酶更适合现在的啤酒生产工艺,具有广阔的应用前景。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

ALDC,活力为8240 U·ml<sup>-1</sup>,丹麦诺维信公司产品;聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA), $M_w$  50000, Aldrich Chemical Co. (USA); Tween 20 和 1,1'-羰基二咪唑(1,1'-carbonyldiimidazole, CDI), Sigma Company (USA); 戊二醛,天津市天河化学试剂厂;磁流体( $Fe_3O_4$ ),纳米级,本实验室自制;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 磁性聚乙烯醇微球的制备

用蒸馏水充分溶解PVA,在90℃温度下,搅拌,制成9%的PVA水溶液。将0.5 g磁流体( $Fe_3O_4$ )倒入40 ml PVA溶液中混匀,在圆底烧瓶中与分散介质混合,然后在50℃水浴中搅拌(700 r·min<sup>-1</sup>) 10 min。依序加入0.75 ml 25%戊二醛、0.6 ml 浓盐酸和0.6 ml 2%海藻酸钠,继续搅拌1 h。最后用磁场分离沉淀,沉淀依次用50%酒精和蒸馏水反复洗涤,干燥,最终得到磁性聚乙烯醇微球<sup>[8-9]</sup>。分散介质由80 ml 食用油、10 ml Tween 20 和 20 ml 正丁醇混合而成。

### 1.3 磁性微球的激活

为了使酶更牢固地固定到微球表面上,先用CDI羧基化磁性微球表面的羟基。将5 g磁性微球加入到10 ml 20% CDI丙酮溶液中,在室温条件搅拌(700 r·min<sup>-1</sup>) 24 h,然后用磁场分离沉淀。沉淀用丙酮反复洗涤,最后真空干燥得到激活的磁性聚乙烯醇微球。

### 1.4 磁性微球固定化ALDC

将1.5 ml酶液加入到30 ml含有0.1 g磁性聚乙烯醇微球的pH 6.0的磷酸缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup>),在4℃温度下搅拌(700 r·min<sup>-1</sup>) 24 h

后,用10 ml NaCl溶液(0.5 mol·L<sup>-1</sup>)洗脱未被固定化的ALDC,然后用磷酸缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup>, pH 6.0)反复洗涤固定化酶至上清液无蛋白质洗出为止<sup>[10-11]</sup>。

### 1.5 酶活力测定

酶活测定按文献[12-13]所述的方法进行。酶活定义为:在反应条件下,每分钟从 $\alpha$ -乙酰乳酸水解产生1  $\mu$ mol乙偶姻的酶量(U)。

### 1.6 固定化ALDC在啤酒发酵液中的操作稳定性

取0.5 ml固定化ALDC加入到100 ml的啤酒发酵液中(麦汁与酵母比例为100:0.5),在8℃条件下培养6 d后,用磁场分离固定化酶。上清液用双乙酰蒸馏仪蒸馏双乙酰,用紫外分光光度计测定发酵液中的剩余双乙酰含量。分离的固定化酶用于下一轮啤酒发酵,这样重复5次,每次按以上方法测定发酵液中的剩余双乙酰含量。通过计算发酵液中的双乙酰转化率,观察ALDC的操作稳定性变化情况。

### 1.7 磁性固定化ALDC的储存稳定性

将一定量的自由酶和固定化ALDC,在4℃, pH 6.0, 0.2 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液中保存31 d。在酶活测定条件下测定它们的活力,比较它们酶活降低情况。

### 1.8 磁性固定化ALDC的温度稳定性

将一定量的固定化酶和自由酶,分别于30、40、50、60和70℃的水浴中保育2 h,然后在30℃和pH 6.0的条件下,测定它们的活力,比较它们的温度稳定性。

### 1.9 磁性固定化ALDC的pH稳定性

将一定量的固定化酶和自由酶,分别置于pH为4.0、5.0、6.0、7.0和8.0的缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup>)中,4℃下保育2 h,然后在30℃和pH 6.0条件下,测定它们的活力,比较它们的pH稳定性。

### 1.10 磁性固定化ALDC的理化特性

通过改变反应条件,观察自由酶和固定化酶的活力变化情况,确定固定化酶的最适温度、最适pH值等理化性质。

## 2 结 果

### 2.1 磁性聚乙烯醇微球的特性

用扫描电子显微镜(SEM, JSM-6460LV, 日本电子产品公司)观察磁性微球的微观形貌,并

测量微球粒径。磁性聚乙烯醇微球为黑色球状颗粒，表面光滑，微球粒径范围 8~64 μm，其中 22~47 μm 的微球占总微球的 52%，有较好的粒径分布。

用红外光谱仪 (Spectrum One-B, 美国铂金埃尔默仪器有限公司产品) 测定磁性微球红外吸收情况，分析其组成特性和表面特性，结果见图 1。

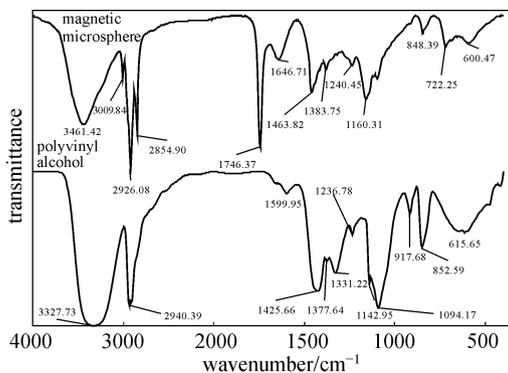


图 1 磁性 PVA 微球的红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of magnetic PVA microspheres

磁性微球的红外光谱图与聚乙烯醇的比较相似，而且有较明显的 580 cm<sup>-1</sup> 的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、1640 cm<sup>-1</sup> 的羟基和 3450 cm<sup>-1</sup> 的羧基特征吸收峰。这些说明，此方法制备的磁性微球主要由 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和聚乙烯醇构成，且其表面富含羟基和羧基等官能团。因此，该方法制备的磁性聚乙烯醇微球具有磁响应性，可回收利用，而且利用它具有的羟基和羧基等特点，可用于酶、细胞和核酸等活性物质的固定化和修饰。

## 2.2 磁性微球固定化 ALDC 的总活力、蛋白载量、比活和活性回收率

利用 CDI 使微球表面的羟基羧基化，然后微球羧基与酶分子的氨基之间产生共价键，使酶共价结合到微球表面，得到磁性固定化 ALDC。同时测定固定化酶的总活力、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、比活和活性回收率  
Table 1 Total activity, protein binding, specific activity and activity retention of immobilized enzyme

Total activity /U · g <sup>-1</sup>	Protein binding /mg · g <sup>-1</sup>	Specific activity /U · mg <sup>-1</sup>	Activity retention /%
63293	72.67	870.96	48.71

## 2.3 固定化 ALDC 在啤酒发酵液中的操作稳定性

在啤酒发酵液中添加一定量的固定化 ALDC,

在 8℃ 条件下发酵 6 d 后测定上清液中的双乙酰含量。用此酶重复催化发酵液 5 次后，发酵液中的双乙酰转化率如图 2 所示。

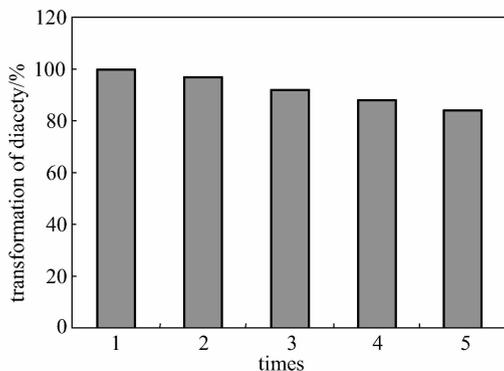


图 2 固定化酶在啤酒发酵中的操作稳定性  
Fig. 2 Operational stability of immobilized enzyme during beer fermentation

图 2 表明，固定化 ALDC 连续作用啤酒发酵液 5 次后，它的双乙酰转化率仍保持 83% 以上。用 CDI 激活磁性微球表面，采用共价结合法固定化的 ALDC 与微球表面的官能团有较强的亲和力，酶分子随操作过程不易脱落，固定化 ALDC 具有较高的操作稳定性。由于啤酒发酵液较黏稠，而且酶分离磁场力较弱，回收过程中固定化酶会损失一部分，如果增加磁场力，延长回收时间，其活力保持情况将更高。

## 2.4 磁性固定化 ALDC 的储存稳定性

在 pH 6.0, 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液中，分别测定 4℃ 下保存 31 d 后的固定化酶和自由酶的剩余活力。结果表明，固定化酶的活力为最初活力的 95.7%，而自由酶的活力为 87.6%。这说明，ALDC 被固定化后，其储存稳定性提高。

## 2.5 磁性固定化 ALDC 的温度稳定性

分别在 30、40、50、60 和 70℃ 的水浴中保育 2 h 后，在 30℃ 和 pH 6.0 条件下测定固定化酶和自由酶的活力情况，见图 3。

从图 3 中可看出，在 30~70℃ 范围内，在水介质中固定化 ALDC 的热稳定性比自由酶高，尤其在 40~60℃ 范围内，固定化酶均保持 78% 以上的酶活，而自由酶在 60℃ 时其活力下降明显，活力仅占固定化酶的 50%。

取一定量的固定化酶和自由酶，在 pH 6.0 条件下，分别于 20、30、40、50 和 60℃ 水浴中测定它们的酶活力，结果见图 4。

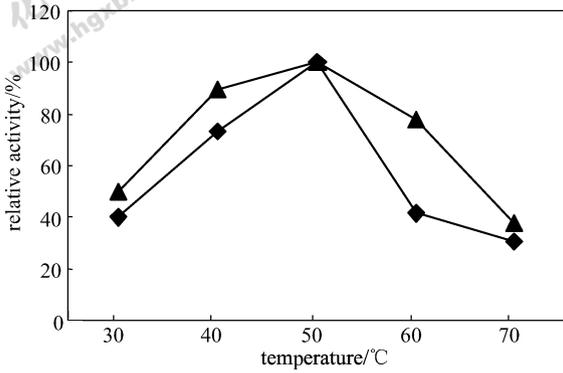


图 3 温度对固定化酶稳定性的影响

Fig. 3 Influence of temperature on stabilities of free and immobilized enzyme  
◆ free enzyme; ▲ immobilized enzyme

从图 4 中看出，固定化 ALDC 的最适温度为 50℃，比自由酶的最适温度提高 10℃，而且在 20~80℃ 范围内，均保持 55% 以上的活力。固定化 ALDC 的该特性有利于啤酒的低温发酵。

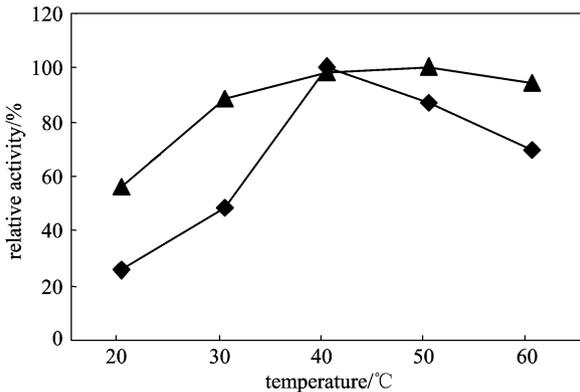


图 4 自由酶和固定化酶的最适温度

Fig. 4 Optimum temperatures of free and immobilized enzyme  
◆ free enzyme; ▲ immobilized enzyme

### 2.6 磁性固定化 ALDC 的 pH 稳定性

分别在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的缓冲液 ( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中 4℃ 保育 2 h 后，在 30℃ 和 pH 6.0 条件下，测定固定化酶和自由酶的酶活力，结果见图 5。

图 5 表明，固定化 ALDC 在 pH 4.0~8.0 范围内，其酸碱稳定性比自由酶有所提高，在酸性环境中这种特点较为明显，pH 4.0 时固定化酶的活力比自由酶的高出近 10%。酶被固定化后，其稳定性提高与固定化能使酶构象更加稳定有关。

取一定量的固定化酶和自由酶，分别在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 条件下，在 60℃ 水浴

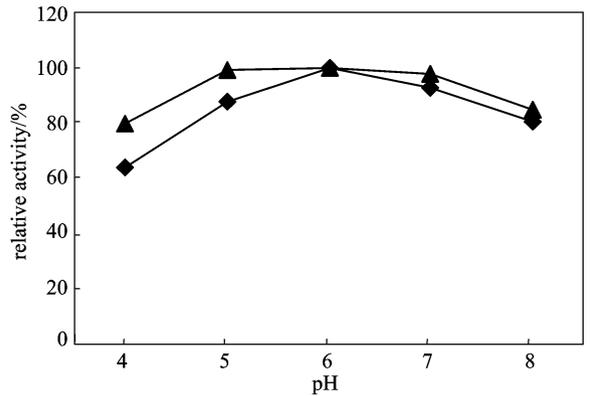


图 5 pH 对固定化酶稳定性的影响

Fig. 5 Influence of pH on stabilities of free and immobilized enzyme  
◆ free enzyme; ▲ immobilized enzyme

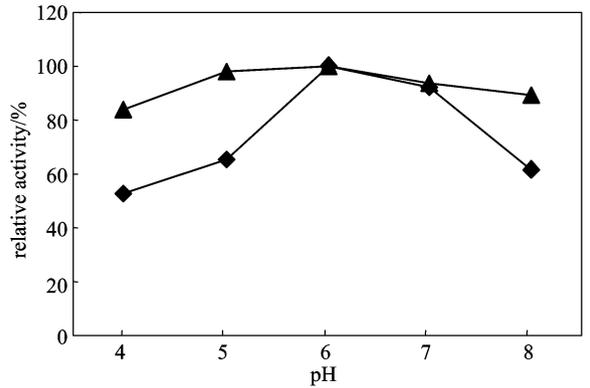


图 6 自由酶和固定化酶的最适 pH 值

Fig. 6 Optimum pH of free and immobilized enzyme  
◆ free enzyme; ▲ immobilized enzyme

中测定它们的酶活，结果见图 6。

从图 6 中看出，固定化 ALDC 的最适 pH 值与自由酶的一样，均为 6.0。但固定化酶在 pH 4~8 范围内的活力保持率均在 80% 以上，固定化 ALDC 的使用 pH 范围比自由酶的明显变宽。

### 3 结 论

(1) 采用分散聚合法制备的磁性聚乙烯醇微球，其粒径分布和分散性较好，表面富含羟基和羧基等官能团，具有磁响应性，是可回收利用的微米级微球；微球采用的主要组成成分为无毒的，且制备过程中没有采用有毒物质，所以是一种无毒无副作用、成本低廉的磁性微球，可用于食品和医药行业。

(2) 先用 CDI 激活微球，然后通过共价结合

法固定化 ALDC, 固定化酶的活性回收率达到 48.71%, 而且在啤酒发酵液中, 使用 5 次后的双乙酰转化率仍保持 83% 以上, 是一种操作稳定性较高的固定化酶。

(3) 固定化 ALDC 的热稳定性、操作稳定性、储存稳定性均比自由酶的明显提高, 这能扩大 ALDC 的适用范围和使用环境。固定化 ALDC 的最适温度为 50℃, 比自由酶的提高 10℃; 固定化酶的最适 pH 值与自由酶的一样, 均为 6.0。

(4) 固定化 ALDC 在 pH 6.0 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 31 d 后, 其活力仍保持 95.7%, 这比自由酶的 87.6% 提高 8 个百分点。储存时间延长时, 固定化 ALDC 的这个优势将会更为明显。

## References

- [1] Li Guanghong (李广红). Study on the application of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. *Liquor-making Science & Technology* (酿酒科技), 2003, **116** (2): 62-64
- [2] Chen Naiyong (陈乃用). Progress in studies and application of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase for accelerating maturation of beer. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 2001, **31** (3): 54-57
- [3] Wang Chuanrong (王传荣), Zhang Anning (张安宁), Xu Dahao (徐大好). The application of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase during beer brewing. *China Brewing* (中国酿造), 2003, **125** (2): 35-36
- [4] Bickerstaff G F. Immobilization of Enzymes and Cells. London: Humana Press Inc., 1997: 133
- [5] Arica M Y, Yavuz H, Patir S, Denizli A. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *J. Molecular Catalysis B*, 2000, **11**: 127-138
- [6] Bahar T, Celebi S S. Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR). *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **26**: 28-33
- [7] Pieter B R, Bardeletti G, Coulet P R. Glucoamylase immobilization on magnetic microparticle for the continuous hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1992, **32**: 37-53
- [8] Tan Tianwei (谭天伟), Zhang Hua (张华), Wang Fang (王芳). Preparation of PVA/chitosan lipase membrane and its application in synthesis of monoglyceride. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2000, **51** (5): 682-683
- [9] Uhlich T, Ulbricht M, Tomaschewski G. Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinylalcohol. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **19**: 124-131
- [10] Rittich B, Spanova A, Ohlshenny Y. Characterization of deoxyribonuclease I immobilized on magnetic hydrophilic polymer particles. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, **1**: 25-31
- [11] Yu Shaoming (于少明), Cheng Jun (程俊), Zuo Peng (左鹏), Chen Tianhu (陈天虎), Shi Tiejun (史铁钧). Immobilization of horseradish peroxidase to pillared clay as carrier. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2006, **57** (12): 3021-3024
- [12] Ren Yongxin (任永新). Research on the application of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. *Liquor-making Science & Technology* (酿酒科技), 2004, **122** (2): 69-70
- [13] He Xiuping (何秀萍), Huai Wenhui (怀文辉), Guo Wenjie (郭文洁), Zhang Borun (张博润). Study on physiological and biochemical properties of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylases from different microbes. *Microbiology* (微生物学通报), 2001, **28** (2): 18-21