单宁酶固定化及其降低蓝靛果汁口腔染色作用的研究

韩春然[1]，张家成[1,*]，王鑫[1]，那治国[2]，戴传荣[1]，王佳宁[1]，谢静南[1]
(1.哈尔滨商业大学，黑龙江省 哈尔滨 150076；2.黑龙江东方学院，黑龙江省 哈尔滨 150066)

摘 要：为研究固定化单宁酶对催化蓝靛果单宁水解中的影响，本文对单宁微球固定单宁酶的最佳工艺条件、单宁固定化酶固定前后结构表征及在蓝靛果果汁水解的应用进行了研究。结果表明，经响应面试验得到单宁酶固定化最佳工艺条件为酶浓度 0.03mg/mL，戊二醛质量分数 0.10%，pH 5.4，固定化时间 40min，此条件下的酶活力回收率为 71.78%，比活力为 724.72U/mg；SEM 图谱和红外图谱显示经单宁微球固定化后的单宁酶很好的固定在单宁微球上。果汁中添加固定化单宁酶水解后，果汁中鞣花酸含量明显提高了 29.12%。通过固定化酶添加量为 4mg 时ΔE*ab 为 3.49；着色能力明显减弱。显微镜观察表明经过固定化酶处理后的果汁能明显降低对舌头黏膜的着色能力。

关键词：单宁酶；固定化；蓝靛果；着色

The tannin immobilized enzyme and Study on reducing oral staining effects of Lonicera edulis Turcz juice

HAN Chunran[1],ZHANG Jiacheng[1,*],WANG Xin[1],NA Zhiguo[2],DAI Chuanrong[1] ,WANG Jianing[1],XIE Jingnan[1]
(1. Harbin University of Commerce,Key, Harbin, Heilongjiang Province 150076, China;
2. East University of Heilongjiang College, Harbin, Heilongjiang Province 150066, China)

Abstract: The optimum conditions were researched for the immobilization of tannins by tannin microspheres, the structure was characterized by the fixation of mononing immobilized enzyme and application of hydrolysis of Lonicera edulis fruit juice.The effects of immobilized tannins on the hydrolysis of indigo fruit were studied. The results showed that the optimum technological conditions for the immobilization of tannase were the enzyme concentration, the quality fraction of glutaraldehyde, pH and immobilization time of 0.03mg/mL, 0.10%, 5.4 and 40min respectively, the recovery rate of enzyme activity and the specific activity was 71.78% and 724.72U/mg respectively in these conditions. The tannin was immobilized on tannin microspheres through SEM and IR spectrum. The content of ellagic acid in fruit juice increased by 29.12% after adding immobilized tanninase in juice. Δ E * ab was 3.49 by immobilized enzyme additives was 4 mg; The shading ability was significantly reduced. The juice of immobilized enzyme can significantly reduce the colouring ability of the mucous membrane of the tongue by microscopic observation.

Key words: Tannase, Immobilized, Lonicera edulis, Coloration
中图分类号：TS27 文献标志码：A 文章编号：

单宁酶（Tannin，EC3.1.1.20），又称单宁酰基水解酶，是在单宁酸等条件下合成的诱导酶。单宁能被单宁酶水解成葡萄糖和没食子酸[1-2]，主要用来处理单宁所引起的涩味等不好影响。由于单宁

基金项目：黑龙江省应用技术研究与开发计划项目，GC13B204
作者简介：韩春然（1970－），女，教授，博士, 研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail:hanchunran@yeah.net
通信作者：张家成（1992－），男，哈尔滨商业大学硕士。E-mail:zjcnha1@163.com

酶的大量生产较为困难、使用率低，稳定性差等原因，从而导致其价格昂贵[3-4]。应用固定化技术对其进行研究，并经过酶的固定化后不仅可以重复使用，还提高酶的各方面性质，这对于将单宁酶进行连续化催化反应将很有意义[5-7]。单宁微球具有多孔、易回收、比表面积大和可再生等特点[8]，可显著加强单宁的工业应用，并因单宁酸在蓝靛果中含量较高的一种酚类化合物，从而制得的单宁微球易于分散和吸收[9-12]。

蓝靛果中含有大量的单宁，但在果汁生产中的缩合单宁可影响口感、色泽和澄清度，也因其可与口腔黏膜和唾液蛋白结合生成沉淀，产生涩味，造成舌头表皮膜染色现象，这是广大果汁、饮料中所共同存在的问题之一[13-17]。而水解单宁中的鞣花酸具有抗肿瘤、降脂、抗氧化等多种生物活性，对心脑血管疾病和糖尿病等具有一定的抑制作用[18]。因此，果汁生产中对单宁的水解以获得高含量的鞣花酸对果汁产品质量的改善具有极其重要的生产价值和理论基础。

本研究得到了固定化单宁酶的制备条件，将固定化单宁酶利用在蓝靛果果汁单宁水解中，并对猪舌上层黏膜的染色进行研究，考察了添加固定化酶的蓝靛果果汁对猪舌黏膜的染色能力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝靛果（忍冬科，忍冬属） 大兴安岭百盛蓝莓科技有限公司；单宁酶（酶活力为 10 万） 安徽中旭生物科技有限公司；猪舌头 哈尔滨朝阳大市场；鞣花酸（标准品） 上海源叶生物科技有限公司；单宁酸 山东浩中化工科技有限公司；液体石蜡、司班 85 天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-5200 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司；SU8000 日立新型扫描电镜 天美（中国）科学仪器有限公司；Spetrum 100 傅立叶红外光谱仪 美国 Thorlabs 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 单宁微球固定单宁酶的制备

1.3.1.1 单宁微球的制备

参考卢玉栋[19]的方法进行制备单宁微球：将 5%（w/v）单宁酸水溶液称取 20g，缓慢搅拌加入到装有 1g 司班 85 和 40g 液体石蜡的 250mL 锥形瓶中，调节 pH 值至 10，搅拌 30min 后加入 1g 37%（w/v）的甲醛溶液，在水浴 80℃中反应 1h；再将反应物静置，冷却、抽滤，依次用丙酮和蒸馏水反复充分洗涤滤物至其滤液到中性为止；将滤物在室温下晾干后，70℃真空中干燥，最终获得单宁微球。

1.3.1.2 化学交联法制备固定单宁酶

将上述制备好的单宁微球称 0.05g 放入 20mL 0.03mg/mL 的单宁酶溶液中，调节溶液 pH 值至 5.5，25℃下恒温震荡 20min 后加入 0.10%（w/v）戊二醛 0.1g，恒温固化震荡 40min 后过滤，分别得到固定单宁酶（滤渣）和酶滤液，滤渣取出用大量蒸馏水和缓冲液洗涤后，放入真空干燥器干燥 4h 后取出，测酶固定化率。

1.3.2 酶活力的测定

取 0.0020g 的固定化单宁酶参考保玉心[20]的方法。固定化酶的活力回收率计算方法如下：

$$\text{酶的活力回收率（\%）}=\frac{\text{固定化酶的总活力}}{\text{酶液总活力-残酶液的活力}}\times 100\%$$

1.3.3 固定化条件的单因素试验

在锥形瓶中加入 0.05g 单宁微球，再加入一定量（0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06mg/mL）的单宁酶液，调 pH 值（3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5），震荡后加入一定量（0.00、0.05、0.10、0.15、0.20、0.03%）（w/v）戊二醛，固化一段时间（20、30、40、50、60、70min），固定化处理步骤同 1.2.1.2 节。测定固定化酶的活力回收率。

1.3.4 固定化工艺条件优化响应面试验

通过单因素的试验结果从而确定响应面试验的因素和水平区间，进行响应面试验设计与分析，以确定固定化单宁酶的最佳工艺条件。选取酶浓度、戊二醛质量分数和 pH 这 3 个因素进行响应面试验设计，因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Factors and levels in response surface analysis

水平	因素		
	A	B	C
	酶浓度（mg/mL）	戊二醛质量分数（%）	pH
-1	0.02	0.05	5.5
0	0.03	0.10	6.5
1	0.04	0.15	7.5

1.3.5 固定化前后酶的表征

1.3.5.1 扫描电镜（SEM）分析

将干燥的固定化前后单宁酶及载体单宁微球样品均匀地撒在贴有双面导电胶的座上，将未粘上的粉末用洗耳球吹去，再喷金处理后放入电镜样品室，调节观察倍数并选择最佳视野进行拍照观察[21]。

1.3.5.2 红外光谱（FTIR）分析

采用将 SP1 和 SP1 置于干燥器内充分干燥，取 0.05 样品与 KBr 粉末 0.5g 一起放入玛瑙研钵内，混合研磨，烘干 10min 后压片，用 Spetrum 100 红外光谱仪在 4000cm^{-1}~400cm^{-1}、分辨率为 4cm^{-1}、波数精度为 0.01cm^{-1}，环境温度设为 25℃，经 32 次扫描测定样品红外光谱图[22]。

1.3.6 蓝靛果果汁的制备

将蓝靛果解冻、漂烫，破碎搅拌，将得到的蓝靛果果浆离心（4000r/min，15min），滤液过滤后灭菌将所得原汁放入冰箱 4℃保存备用。

1.3.7 蓝靛果果汁中鞣花酸含量的研究

1.3.7.1 标准曲线的绘制

参考陈箝鸿等[23]研究的方法测定鞣花酸的含量。称取 10mg 鞣花酸标准品，缓慢加入 0.1mol/L NaOH 溶液共 3.5mL，定容至 100mL。分别从稀释液中取 1、5、10、15、20mL 至 100mL 容量瓶中，定容，配成浓度分别为 1、5、10、15、20mg/L 的溶液，以蒸馏水为空白，测其在 357nm 处的吸光度值。

1.3.7.2 鞣花酸含量的测定

取 1mL 样液加入 3.5mL 的 0.1mol/L NaOH 溶液，常温下反应 15min（颜色由浅黄色变为深棕色）后，在 357nm 处测其吸光度值，以蒸馏水为空白测定，所有测试都进行三个重复。根据标准曲线求出样液中所含有的鞣花酸含量。

1.3.7.3 固定化酶在蓝靛果果汁中的水解

于 50mL 蓝靛果果汁中加入 0.2g 固定化单宁酶（121U），在 50℃和 40℃下、100rpm 振荡反应 1h 后，过滤，取样进行鞣花酸含量的测定，以未加酶的蓝靛果汁为对照组。比较鞣花酸含量的高低，评价固定化酶在蓝靛果果汁中水解后提高鞣花酸含量的能力。

1.3.8 猪舌膜染色应用研究

1.3.8.1 原料的处理

选用 4 条大小一致、表面膜完整的新鲜猪舌头，洗净后沿舌根向舌尖切取表面黏膜，其下层肉全部切除，处理完成后将黏膜均切成形状一致的小块，放入盛有 0.9%生理盐水和微量叠氮钠的烧杯中，再在 4℃冰箱中封膜保存备用。

1.3.8.2 人工唾液的配制

分别加入 0.78g 磷酸氢二钠、0.795g 氯化钙、0.005g 硫化钠、1g 尿素、0.4g 氯化钠和 0.4g 氯化钾，用蒸馏水定容至成 1L，然后用 NaOH 调 pH 值为 6.8 即配制完成[24]。

1.3.8.3 染色试验

取处理后的猪舌头表皮黏膜，放入盛有人工唾液的烧杯中浸泡 30min，然后在 25mL 蓝靛果果汁中加入 4mg 固定化单宁酶按 1.2.9.2 节中的方法进行处理，再用 NaOH 调 pH 为 4.5 后，将沾有唾液的猪舌黏膜完全浸入其中，室温下染色 5min 后放入人工唾液中 30min，观察着色能力。

1.3.8.4 色差分析

取染色完成后的猪舌黏膜样品采用 CS-800 型分光测色仪进行测定。首先使用黑板和白板分别校准色差仪，再直接将样品置于光源上进行测量，读取仪器显示的数值（ΔL*、Δa*、Δb*和ΔE*ab），其中ΔL*值为所测物体与标准白板间的亮度（L）差，ΔL 值增大亮度越高；Δa 值为所测物体与标准白板间的 a 值差，+Δa 方向红度加强，-Δa 方向绿度加强；Δb 值为所测物体与标准白板间的 b 值差，+Δb 方向黄度增加，-Δb 方向蓝度增加；ΔE*ab 为色差，表示为所测物体的 L、a、b 值与标准白板间的色差值[25]。以此确定其颜色的色调和明亮度，对染色效果进行分析。

1.3.8.5 固定化酶添加量对色差的影响

蓝靛果果汁中分别加入 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5mg 的固定化单宁酶，并按 1.2.9.3 节中的方法进行处理。以未加酶果汁的染色为对照，分别测定ΔL*、Δa*、Δb*和ΔE*ab 值。

1.3.8.8 显微镜分析

将猪舌黏膜在加有固定化酶的果汁中按条件进行染色，然后在 40 倍显微镜下观察猪舌黏膜表面的染色现象，与未加固定化单宁酶的果汁染色相比较研究其着色能力。

1.4 数据统计分析

将得到的数据进行三次重复的平均值，采取 SPSS13.0 数据统计分析进行方差分析，响应面所得数据使用 Design-Expert.V7.0.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 酶浓度对固定化酶活力的影响

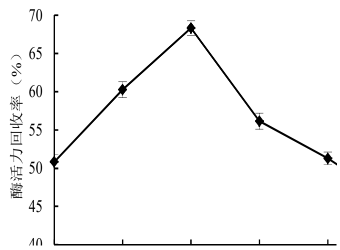


图 1 酶浓度对固定化酶活力的影响

Fig.1 Effects of tannase concentration on the activity of immobilized enzyme

由图 1 可知，酶浓度为 0.03mg/mL 时，固定化酶的活力回收率最大；当酶浓度低于 0.03mg/mL 时，所制备的单宁微球表面能够吸附住大部分单宁酶，从而使得酶固定化活力回收率随酶浓度的增多而提高；但当酶浓度大于 0.03mg/mL 后，达到一定的酶浓度时载体的负载量已到达饱和状态，相反会由于空间位阻等一些因素，最终导致固定化酶活力回收率降低。

2.1.2 戊二醛质量分数对固定化酶活力的影响

单宁通过改性成为单宁微球后与戊二醛发生交联反应，引入醛基官能团，其可与单宁酶发生 Schiff 反应，连接酶与载体以此实现游离酶的固定化[26-28]。

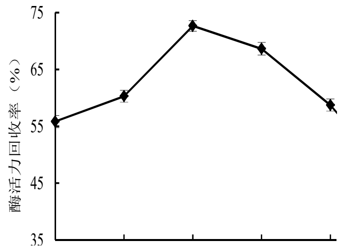


图 2 戊二醛质量分数对固定化酶活力的影响

Fig.2 Effects of glutaraldehyde mass fraction on the activity of immobilized enzyme

由图 2 可知，戊二醛的质量分数对单宁酶活力有一定的影响。当戊二醛质量分数小于 0.1%时，固定化酶的活力回收率随其质量分数的升高而增大；当戊二醛质量分数为 0.1%时，固定化酶活力回收率达到最大值；当戊二醛质量分数在 0.1%~0.3%范围内，固定化酶活力回收率随戊二醛质量分数的升高而逐渐降低，这是由于戊二醛质量分数很小时易造成酶的流失，但当质量分数过大时，会造成与酶蛋白交联过度以此改变了活性中心，同时也会限制酶与底物之间的接触和扩散并能较大程度的影响酶活性。

2.1.3 pH 对固定化酶活力的影响

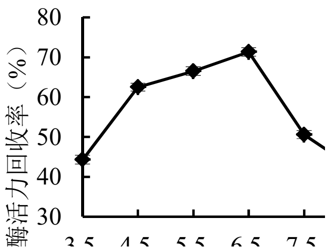


图 3 pH 对固定化酶活力的影响

Fig.3 Effects of pH on the activity of immobilized enzyme

在固定化酶的过程中，pH 值的变化会引起酶的微观结构改变。由图 3 可知，当 pH 值为 3.5~6.5 时，固定化酶的活力回收率呈上升趋势；当 pH 值为 6.5 时，酶回收率最高；pH 值为 6.5~8.5 时，酶活力回收率呈下降趋势，这可能是因为当溶液的 pH 值超过一定的范围时，单宁酶分子的结构特性产生了改变，从而导致酶变性活力下降。这表明单宁酶的固定化受 pH 值影响程度大。这可能是因为固定化的介质其酸碱性在酶结构上受到的影响是根据酶的净电荷由介质的等电点所决定的。载体的性质受到影响是由于其能够改变其带电荷量；酶的微观结构特征的变化会造成酶特性的改变，从而使酶失去酶活力[29]。

2.1.4 固定化时间对固定化酶活力的影响

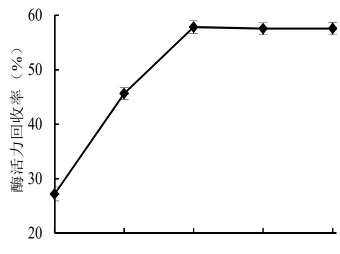


图 4 固定化时间对固定化酶活力的影响

Fig.4 Effects of immobilization time on the activity of immobilized enzyme

由图 4 可知，随着固定化时间的延长，固定化酶活力回收率逐渐上升，当达到为 40min 时酶固定

化回收率最大，40min 后固定化酶活力回收率趋于稳定状态。这一现象可能是由于交联时间过短会影响到反应的完成程度，随着固定化时间延长，载体交联越紧密，固定化效果逐渐提升；且一定质量的载体对固定酶要有一定的时间，但被载体所吸附的单宁酶量已到达饱和状态时就不能吸附多余的酶[30]，所以酶活力也就保持相对的稳定状态。因此，选取固定化时间为 40min 为最佳。

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 模型的建立及显著性检验

响应面实验方案及结果见表 2。通过 Design Expert 7.0.0 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合，得到酶活力回收率对酶浓度 A、戊二醛质量分数 B 和 pH C 的二次多项回归方程：$Y=70.87-1.23A+0.12B-0.37C-0.17AB+0.41AC-0.092BC-2.33A^2-3.56B^2-3.01C^2$。根据实验结果进行方差分析，见表 3。

表 2 响应面分析方案与实验结果

Table 2 Experimental scheme and results of central composite design

实验号	A 酶浓度	B 戊二醛质量分数	C pH	酶活力回收率（%）
1	-1	-1	0	65.90
2	1	-1	0	63.78
3	-1	1	0	66.52
4	1	1	0	63.71
5	-1	0	-1	67.51
6	1	0	-1	64.26
7	-1	0	1	65.99
8	1	0	1	64.36
9	0	-1	-1	64.48
10	0	1	-1	64.87
11	0	-1	1	63.91
12	0	1	1	63.93
13	0	0	0	70.89
14	0	0	0	70.96
15	0	0	0	70.76

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of the regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	101.61	9	11.29	2315.99	< 0.0001	**
A	12.03	1	12.03	2467.59	< 0.0001	**
B	0.12	1	0.12	23.63	0.0046	**
C	1.07	1	1.07	220.13	< 0.0001	**
AB	0.12	1	0.12	24.42	0.0043	**
AC	0.66	1	0.66	134.58	< 0.0001	**
BC	0.034	1	0.034	7.02	0.0454	*
A^2	20.05	1	20.05	4111.83	< 0.0001	**
B^2	46.86	1	46.86	9612.43	< 0.0001	**
C^2	33.45	1	33.45	6862.09	< 0.0001	**
残差	0.024	5	4.875E-003			

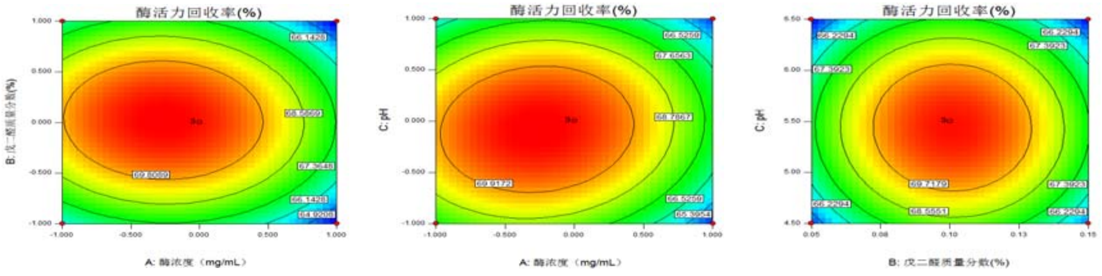
失拟项	3.775E-003	3	1.258E-003	0.12	0.9391
纯误差	0.021	2	0.010		
总和	101.64	14			

注：R^2=0.9998，R^2_{Adj}=0.9993，**为极显著（P<0.01），*为显著（P<0.05）

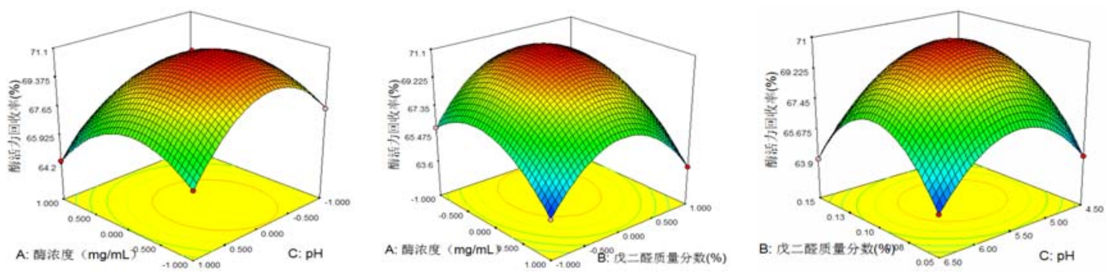
由表 3 可知，模型的复相关系数的平方值 R^2=0.9998，表明精简模型可用于解释约 99.98%的试验数据，其与实际情况拟合度良好。整体模型 F 值为 2315.99，P＜0.0001，二次方程模型极显著。方程的一次相中 A、B、C 对响应值 Y（酶活力回收率%）的影响极显著（P＜0.01），二次项 A^2、B^2、C^2 对 Y 的影响极显著（P＜0.01），交互项 AB、AC 对响应值 Y 的影响极显著（P＜0.01），BC 对 Y 的影响显著（P＜0.05）。

2.2.2　因素间的交互影响

如图 5 所示，综合反映了各变量与两个响应之间、变量与变量之间和响应与响应之间的关系。根据表 3 可知各影响因素对酶活回收率的影响均不是简单的线性关系。且从等高线图中可知其表明了交互能力的强弱，椭圆形说明两个因素间交互程度显著，而圆形则不显著。酶浓度与戊二醛质量分数的交互作用较显著，而其他因素间的交互作用较小。根据回归模型通过 Design Expert 软件分析得出最佳工艺参数为：酶浓度 0.03mg/mL，戊二醛质量分数 0.10%，pH 5.42，酶活力回收率预测值为 71.05%。



1（a）A 与 B 的等高线图　　2（a）A 与 C 的等高线图　　3（a）B 与 C 的等高线图



1（b）Y=f(A，B)　　2（b）Y=f(A，C)　　3（b）Y=f(B，C)

图 5 酶浓度、戊二醛质量分数与 pH 交互作用的三维曲面图

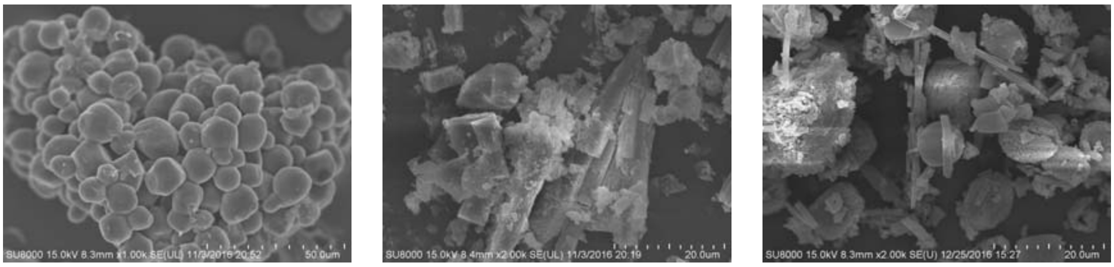
Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of Tannase concentration、 Glutaraldehyde mass fraction and pH

2.2.3　验证试验

优化响应面分析得到的最佳条件为：酶浓度 0.03mg/mL，戊二醛质量分数 0.10%，pH 5.4，在此条件下进行验证实验，酶活力回收率实测值为 71.78%，与预测值相对误差为 1.02%，而此时的比活力为 724.72U/mg。表明模型与实际实验结果相符，该结果可适用于单宁微球固定化单宁酶的工艺条件。

2.3　固定化前后酶的表征结果

2.3.1　扫描电镜结果



a—游离酶 b—单宁微球 c—固定化单宁酶

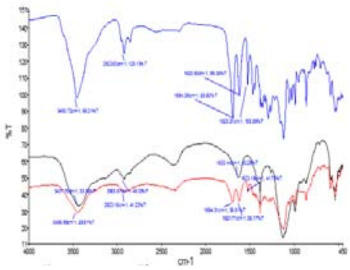
图 6 固定化前后单宁酶 SEM 图

Fig. 6 SEM images of tannase before and after immobilization

由图 6 可知，（a）给出了游离酶的 SEM 形貌，显示了固定化前单宁酶经分离纯化后的球形结构较为规整、表面较致密光滑，粒径分布较均匀。（b）显示了单宁微球的 SEM 形貌，表明制备的单宁微球为杆状结构，形状不规则、组织致密，表面较粗糙。（c）是固定化单宁酶的 SEM 图。可以看出经单宁微球固定的单宁酶由最初的致密转为疏松，表面比较粗糙，结构由球形变为杆和球的交联状态；且其表面含有部分的絮状物，这可能由于单宁微球有较强的结合能力，结合过程中高分子链受单宁酶的络合作用重新聚集的结果。

2.3.2 红外图谱结果

单宁酶及单宁微球有不同基团，红外吸收因而具有差异，固定化单宁酶是游离单宁酶和单宁微球的结合，红外吸收具有相同的特性，三者红外分析光谱图如图 7 所示。



—单宁微球 —单宁酶 —固定化酶

图 7 单宁微球、单宁酶和固定化单宁酶的红外图谱

Fig. 7 FT-IR spectra of tannin microspheres,tannase and immobilized tannase

游离单宁酶的红外图谱中在 3437cm^{-1} 处出现较强的吸收，是单宁酶上有氨基伸缩振动引起的吸收峰，2923cm^{-1} 处的吸收峰为亚甲基的伸缩振动峰，1630cm^{-1} 处吸收峰为 C-O 的伸缩振动峰。而归属分子间氢键 O-H 的伸缩振动吸收峰由单宁微球的 3458cm^{-1} 略低移至固定化单宁酶的 3456cm^{-1}，且固定化单宁酶在此的峰变强变宽，说明分子间含有较强的氢键。在单宁微球和固定化单宁酶上均出现了单宁酶在 2923cm^{-1} 处的特征吸收峰，表明吸收峰的细微变化是可信的。同时，单宁微球和固定化单宁酶都在 1694cm^{-1} 处出现羧酸的 C=O 伸缩振动峰，并在 1523cm^{-1} 处的吸收峰为 C=C 伸缩振动峰；单宁微球在 1620cm^{-1} 处因与戊二醛发生交联反应生成 Schiff 碱使 C=N 伸缩振动得以加强，而在固定化单宁酶中，由于单宁酶中的氨基与戊二醛中的一个醛基发生反应，所有在 1621cm^{-1} 处的吸收峰减弱，这都表明单宁酶很好的固定在单宁微球上。而 1630cm^{-1} 处的吸收峰没有在固定化酶中出现，可能是由于该峰是粗单宁酶杂质的吸收峰，并没有被单宁微球载体所吸附，故固定化单宁酶上没有出现相应的吸收峰。

2.4 鞣花酸标准曲线的绘制

鞣花酸浓度与其 357nm 下的吸光值成正比，随着鞣花酸浓度的升高，其吸光值也逐渐升高。其线性回归方程为 y=0.024x+0.0366，R^2=0.9937。其中 x 为所测溶液中鞣花酸浓度（mg·L^{-1}），y 为所测定的吸光度值 A。

2.5 固定化酶在蓝靛果果汁中的水解

通过在蓝靛果果汁中各自加入固定化单宁酶和游离单宁酶后，经过反应后过滤，取样进行鞣花酸含量的测定，以未加酶的蓝靛果汁为对照组，得到的结果见表 4。

表 4 酶在蓝靛果果汁中水解后鞣花酸含量的变化

Table 4 Changes of ellagic acid content after enzymatic hydrolysis in blueberry juice

样品	果汁中鞣花酸浓度（g/L）	果汁中所含鞣花酸含量（%）
原果汁	0.663	9.47
加游离酶的果汁	1.053	15.04
加固定化酶的果汁	2.702	38.59

由表 4 可知，在蓝靛果果汁中分别添加游离单宁酶和固定化单宁酶水解后，果汁中鞣花酸含量分别明显提高了 5.57%和 29.12%，这表明果汁中加入单宁酶后水解转化成鞣花酸这一过程成功，能有效增加鞣花酸的含量，且固定化酶的水解程度明显高于游离酶，所以根据固定化酶的水解能力、稳定性、贮藏性和重复使用性等性质可完全替代游离酶在果汁饮料等工业生产中进行使用。

2.6 固定化酶添加量对色差的影响

蓝靛果果汁中分别加入 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5mg 的固定化单宁酶，并按 5.3.3.3 节中的方法进行处理，分别测定 ΔL*、Δa*、Δb*和 ΔE*ab 值，以未加酶果汁的染色为对照进行比较。结果如表 5 和图 9 所示。

表 5 固定化酶添加量对色差的影响

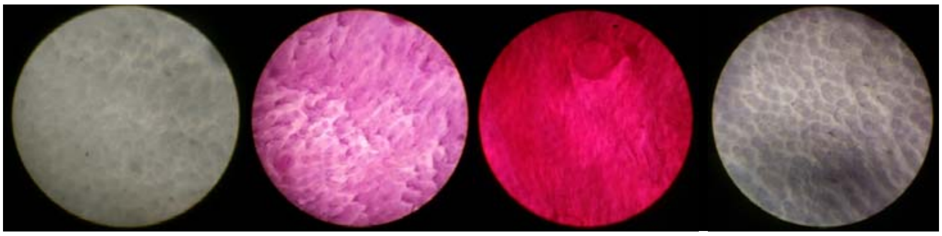
Table 5 Effect of immobilized tannase addition on chromatic aberration

固定化酶添加量（mg）	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔE*ab
0（原果汁）	-0.44	8.02（偏红）	2.08（偏黄）	8.30
1	2.35	7.37（偏红）	-0.1	7.74
1.5	2.51	5.32（偏红）	-0.07	5.88
2	2.09	5.51（偏红）	-0.71	5.94
2.5	2.85	4.68（偏红）	-0.93	5.56
3	2.78	2.30（偏红）	-2.14（偏蓝）	4.15
3.5	3.16	-0.33	-2.14（偏蓝）	3.83
4	2.95	-1.51	-1.1	3.49
4.5	3.02	-1.33	-1.14	3.49

由表 5 可知，随着固定化酶添加量的增加，ΔE*ab 值逐渐降低，表明色差下降。当固定化酶添加量<4mg 时，根据 ΔL*、Δa*、Δb*三个值表明整体果汁偏亮深红色，ΔE*ab>3.83；当固定化酶添加量为 4mg 时，果汁颜色偏亮深红蓝色，ΔE*ab 为 3.49，与原果汁色差值相差较大；当添加量为 4.5mg 时，果汁颜色偏亮红色，且 ΔE*ab 值不变。根据色差值的变化说明了较原果汁相比，固定化酶的添加对颜色变化起到一定的作用。

2.9 显微镜分析

将猪舌黏膜在加有固定化酶的果汁中按条件进行染色，然后在 40 倍显微镜下观察猪舌黏膜表面的染色现象，与未加固定化单宁酶的果汁染色相比较研究其着色能力。如图 8 所示。



A B C D

图 8 猪舌黏膜染色前后显微镜图

Fig.8 SEM images of tannase before and after immobilization

由图 8 所示，A 为猪舌黏膜染色前，B 为猪舌黏膜经果汁（加入固定化酶）染色后，C 为猪舌黏膜经原果汁染色再人工唾液浸泡后，D 为猪舌黏膜经果汁（加入固定化酶）染色再人工唾液浸泡后。由此可看出来猪舌黏膜经染色前后变化明显，实际上经过原果汁染色后与 C 图一样，没有明显变化，所以原果汁对猪舌黏膜的着色能力强，色素几乎完全沉着在舌头表层黏膜上。而 B 图中经过加入固定化单宁酶的蓝靛果果汁染色后，对猪舌黏膜的着色现象明显低于 C 图的着色现象，这说明固定化酶的添加对舌头黏膜的着色能力大为降低。D 图中加入固定化酶的果汁染色后再经唾液浸泡后，其颜色较 B 图明显变浅，较 C 图颜色相差巨大，与 A 图相比颜色仅较深些，这是因为加有固定化酶的果汁使果汁中的单宁水解为鞣花酸，提高水解能力从而降低着色能力，且此果汁经唾液的浸泡或浸入，使得色素、沉淀被从猪舌表层黏膜上脱落下溶解到唾液中，从而对舌头黏膜的着色现象有所减弱。

3 结论

以单宁微球为固定化酶载体，固定化单宁酶的研究，得到的单宁酶固定化最佳工艺条件：酶浓度 0.03mg/mL，戊二醛质量分数 0.10%，pH 5.4，固定化时间 40min，此条件下的酶活力回收率为 71.78%，比活力为 724.72U/mg；SEM 图谱显示游离酶球形结构表面较致密光滑，单宁微球为杆状结构，表面较粗糙，而酶固定化后结构疏松，表面较粗糙，结构由球形变为杆和球的交联状态，表明酶以固定到载体上；红外图谱显示经单宁微球固定化后的单宁酶很好的固定在单宁微球上。

此外，通过对固定化酶在蓝靛果果汁水解中应用的研究表明，在果汁中添加固定化单宁酶水解后，果汁中鞣花酸含量明显提高了 29.12%。通过固定化酶添加量为 4mg 时 ΔE^*ab 为 3.49；着色能力明显减弱。显微镜观察表明经过固定化酶处理后的果汁能明显降低对舌头黏膜的着色能力。

参考文献：

[1] Gaikaiwari R P, Wagh S A, Kulkarni B D. Extraction and purification of tannase by reverse micelle system[J]. Separation & Purification Technology, 2012, 89(2):288-296. DOI：10.1016/j.seppur.2012.01.043

[2] Raghuwanshi S．Tannase from penicillium charlesii，process optimization purification characterization，scale up and industrial applications [J]．New Delhi，2012：3-5．

[3] 张帅，陈遂，黄景晟，等．黑曲霉 T3-5-1 高活力单宁酶的制备及其性质研究[J]．现代食品科技，2014(3)：137-143．DOI：10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.03.031

[4] Xiao L, Wei-Wei B. Preparation and Adsorption Properties of Chitosan Immobilized Tannin Microspheres[J]. Fine Chemicals, 2006, 23(8):733-737. DOI：10.13550/j.jxhg.2006.08.002

[5] 曹建兰，吴鑫颖，王晓丹，等．单宁酶固定化技术的研究[J]．食品工业，2014(2)：25-28．

[6] Bolivar J M, Eisl I, Nidetzky B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts[J]. Catalysis Today, 2015. DOI：10.1016/j.cattod.2015.05.004

[7] Mohy Eldin M S, Mita D G. Immobilized Enzymes: Strategies for Overcoming the Substrate Diffusion- Limitation Problem[J]. Current Biotechnology, 2014, volume 3:207-217(11). DOI: 10.1016/j.molcatb.2015.02.005

[8] 卢玉栋，柯金炼，叶琳，等．单宁微球对 Cr 的吸附性能[J]．广州化学，2011，36(3)：22-27．DOI：10.16560/j.cnki.gzhx.2011.03.004

[9] Shun Rong He,Xin Ying Wu,Shu Yi Qiu,Xing Huang,Fu Li Li,Ji Ying Feng. Study on Immobilization of Tannase[J]. Advanced Materials Research,2013,2606(781):. DOI：10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.774

[10] Nur Royhaila Mohamad,Nur Haziqah Che Marzuki,Nor Aziah Buang,Fahrul Huyop,Roswanira Abdul Wahab. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment,2015,29(2):. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192

[11] Deniz Aktaş Uygun,Begüm Akduman,Murat Uygun,Sinan Akgöl,Adil Denizli. Immobilization of alcohol dehydrogenase onto metal-chelated cryogels[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,2015,26(7):. DOI: 10.1080/09205063.2015.1023241

[12] 卢玉栋，林晨霞，叶琳，等．单宁微球固载α-淀粉酶及其催化性能[J]．高分子材料科学与工程，2011(9)：157-160．DOI：10.16865/j.cnki.1000-7555.2011.09.041

[13] Srivastava A，Kar R．Application of immobilized tannase from Aspergillus niger for the removal of tannin from myrobalan juice [J]．Indian Journal of Microbiology，2010，50(1)：46-51．DOI: 10.1007/s12088-010-0029-6

[14] 马婧，袁春龙，杨丽，等．红葡萄酒呈涩物质的化学分析[J]. 食品科学,2016, 37(4):132-138. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201604024.

[15] 罗昱，梁芳，李小鑫，等．单宁酶对刺梨果汁单宁的脱除作用[J]．食品科学，2013，34(18)：41-44．DOI:10.7506/spkx1002-6630-201318009

[16] 张瑜，罗昱，刘芳舒，等．不同脱苦涩处理刺梨果汁风味品质分析[J]．食品科学，2016，37(4)：115-119．doi:10.7506/spkx1002-6630-201318009

[17] 田密霞,胡文忠,李亚东,刘程惠,姜爱丽. 不同品种蓝莓花色苷稳定性的比较研究[J]. 食品工业科技,2015,36(13):60-65+71. DOI：10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.004

[18] 陆晶晶，丁轲，杨大进．保健品功能因子鞣花酸研究进展[J]．食品科学，2010，31(21)：451-454．

[19] 卢玉栋，戴妙霞，吴柳芬，等．单宁微球固定化酶的应用性能[J]．福建师大学报(自然科学版)，2012，28(5)：62-66．

[20] 保玉心，邱树毅，李秩针，等．一种胞外单宁酶的活力检测方法[J]．精细化工，2008，25(6)：621-624．DOI：10.13550/j.jxhg.2008.06.019

[21] 工业和信息化部电子第五研究所组．扫描电镜和能谱仪的原理与实用分析技术[M]．电子工业出版社，2015：24-36．

[22] 胡皆汉．实用红外光谱学[M]．科学出版社，2011：35-286．

[23] 陈�鸿，吴冬梅，汪咏梅，等．紫外分光光度法测定鞣花酸含量的研究[J]．生物质化学工程，2007，41(3)：18-20．

[24] 吴海庭，朱国威．人工唾液在口腔医学研究中的应用[J]．遵义医学院学报，2007，30(1)：91-93．

[25] 于静静，毕金峰，丁媛媛．不同干燥方式对红枣品质特性的影响[J]．现代食品科技，2011，27(6)：610-614．DOI：10.13982/j.mfst.1673-9078.2011.06.009

[26] 刘冠卉，马海乐，屠洁，等．海绵态壳聚糖固定化单宁酶及其酶学性质研究[J]．食品科学，2008，29(7)：231-234．

[27]曹建兰,吴鑫颖,王晓丹,周鸿翔,邱树毅,王广莉. 单宁酶固定化技术的研究[J]. 食品工业,2014,35(02):25-28.

[28]农嘉仪,李敏英,叶剑威,曹庸. 交联酶聚集体法制备单宁酶及固定化酶性质研究[J]. 食品与机械,2012,28(01):154-158.

[29] 刘媛媛．脂肪酶的固定化及其酶学性质研究[D]．齐齐哈尔大学，2014：20-25．

[30] 范超，黎继烈，王挥，等．玉米芯固定化单宁酶的工艺条件优化[J]．食品科学，2011，32(11)：123-128．