

转谷氨酰胺酶的固定化及其在处理米糠废水中的应用

裴兴武¹, 汪 鸿¹, 高子雯¹, 袁泰增¹, 高 明¹, 姚 凯², 潘明喆^{1,*}, 于殿宇^{1,*}
(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.湖北天星粮油股份有限公司, 湖北 随州 441300)

摘 要: 制备醋酸纤维素-聚丙烯复合膜, 并将转谷氨酰胺酶(transglutaminase, MTG)固定在膜上, 制得了固定化MTG酶膜, 测得其酶活为17.6 U/g。然后将酶膜固定在不锈钢网框上, 并将其悬挂在烧杯中, 用来处理米糠废水中的蛋白质。利用单因素试验, 分别考察物料温度、物料pH值、转子转速以及酶膜面积对蛋白质聚合率的影响, 并在单因素试验基础上, 利用响应面试验优化, 得到最佳聚合条件为物料温度43 ℃、pH 6.6、转子转速124 r/min、酶膜面积与底物含量比例为80:1 (cm²/g)、反应时间1.8 h, 蛋白质聚合率为70%。固定化酶膜在使用5次后, 相对酶活力仍保持在74.3%以上, 为连续聚合米糠废水中的蛋白质以及保留营养物质提供理论基础。

关键词: 转谷氨酰胺酶; 复合酶膜; 米糠废水; 蛋白质聚合率; 重复使用

Immobilization of Transglutaminase and Its Application in the Treatment of Rice Bran Wastewater

PEI Xingwu¹, WANG Hong¹, GAO Ziwen¹, YUAN Taizeng¹, GAO Ming¹, YAO Kai², PAN Mingzhe^{1,*}, YU Dianyu^{1,*}
(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Hubei Tianxing Grain and Oil Co. Ltd., Suizhou 441300, China)

Abstract: In this study, cellulose acetate-polypropylene composite membrane was prepared, and microbial transglutaminase (MTG) was immobilized onto the membrane, yielding an MTG-immobilized membrane, whose enzymatic activity was determined to be 17.6 U/g. Then the enzyme-loaded membrane was fixed on a stainless steel mesh frame and suspended in a beaker in order to use it to treat protein in rice bran wastewater. The effects of material temperature, material pH, rotor speed and enzyme-loaded membrane area on protein polymerization rate were investigated by one-factor-at-a-time method. Furthermore, using response surface optimization, the optimum polymerization conditions were obtained as follows: material temperature 43 ℃, pH 6.6, rotor speed 124 r/min, ratio between enzyme-loaded membrane area and substrate amount 80:1 (cm²/g), and reaction time 1.8 h. Under these conditions, protein polymerization rate was 70%. The enzyme-immobilized membrane remained above 74.3% of the original activity after its fifth repeated use. This study provides a theoretical basis for the continuous polymerization of proteins in rice bran wastewater and the retention of nutrients.

Keywords: transglutaminase; enzyme-loaded composite membrane; rice bran wastewater; protein polymerization rate; repeated use

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190520-225

中图分类号: TS213.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 22-0110-08

引文格式:

裴兴武, 汪鸿, 高子雯, 等. 转谷氨酰胺酶的固定化及其在处理米糠废水中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 110-117.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190520-225. <http://www.spkx.net.cn>

PEI Xingwu, WANG Hong, GAO Ziwen, et al. Immobilization of transglutaminase and its application in the treatment of rice bran wastewater[J]. Food Science, 2019, 40(22): 110-117. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190520-225. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2019-05-20

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0401101)

第一作者简介: 裴兴武(1995—)(ORCID: 0000-0003-0572-8212), 男, 硕士, 研究方向为食品工程。

E-mail: peixw123@126.com

*通信作者简介: 潘明喆(1979—)(ORCID: 0000-0001-6434-8936), 男, 讲师, 博士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白。

E-mail: pmz_1223.student@sina.com

于殿宇(1964—)(ORCID: 0000-0002-4227-0784), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物油脂加工技术。

E-mail: dyu2000@126.com

米糠是稻谷碾米加工过程中的主要副产物, 约占整个糙米产量的8%~10%, 我国年产米糠1 000万 t以上^[1]。国内外研究表明米糠是最具开发潜力的一种高附加值的资源, 它不仅含有高含量的脂肪和蛋白质, 而且还含有抗微生物、抗癌和其他能促进健康的功能物质^[2], 如膳食纤维、维生素谷维素、矿物质、植酸、蛋白酶抑制剂、 α -淀粉酶抑制剂、丹宁等。米糠中蛋白质质量分数为12%~15%^[3], 其中赖氨酸含量比米胚乳中高, 也比其他谷物米糠蛋白中的含量高。米糠蛋白的效价比为2.0~2.5 (酪蛋白为2.5)^[4], 蛋白消化率达90%, 且米糠蛋白是低过敏性蛋白, 是唯一可以免于过敏实验的谷物蛋白。因而, 米糠蛋白被认为是一种理想的婴儿食品原料, 并将其添加到对一些食物过敏的儿童膳食中^[5-7]。虽然米糠的营养和药理特性已被广泛认可, 但目前米糠浓缩蛋白和分离蛋白并没有商品化, 主要原因是米糠蛋白溶解性差^[7-8]。因而, 如何提高米糠蛋白的溶出得率和改善其功能特性, 成为国内外研究热点。近年来, 我国提取米糠蛋白的工作已在不少地区得到大规模开展。在米糠蛋白的生产中, 会排出大量米糠废水, 采用传统的废水处理工艺对米糠废水的处理会使废水中含有的多种营养物质被浪费。

转谷氨酰胺酶(蛋白质-谷氨酰胺- γ -谷氨酰胺基转移酶, MTG; EC2.3.2.13)是一种能催化转酰基反应, 催化蛋白质中赖氨酸上的 ϵ -氨基和谷氨酸上的 γ -羟酰胺基之间的结合反应, 从而导致蛋白质(或多肽)之间发生共价交联形成共价化合物的聚合酶^[9-11], 所以它可催化蛋白质中多肽发生酰基转移反应, 从而使米糠废水中蛋白分离出来^[12]。经MTG交联形成的米糠蛋白聚合物具有良好的水溶性^[13]、乳化性以及稳定性^[14]而广泛应用于食品行业, 它一方面改善食品的物性, 另一方面优化食品的结构和感官。Clare等^[15]在花生蛋白粉中加入MTG, 促使花生蛋白发生交联, 使蛋白溶解性得到改善, 从而有利于消化吸收。刘颖等^[16]利用MTG研究大豆11S球蛋白聚合效果, 发现改善了聚合前的稳定性, 从37.78%提高到了79.28%。在研究过程中发现, 游离酶在高温、过酸和过碱条件下容易变性失活, 并且在实际生产中难以回收。酶的固定化技术很好的解决了很多问题, 例如使酶的最适温度范围变宽, 它也可以将酶从反应产物中分离, 提高重复使用性, 从而提高反应效率^[17-19]。

分离膜不仅能够对气体、有机物、各类生物制剂等进行有效的分离、浓缩和纯化, 而且还能作为固定化酶的载体, 实现酶的膜固定化^[20-21]。醋酸纤维素-聚丙烯复合膜具备良好的疏水性、吸附性以及化学稳定性等优点^[22], 并且能将酶的催化特性和膜的优良分离性能有机地结合起来, 构成酶膜生物反应器^[23], 在工业生产中被广泛使用。Merz等^[24]使用蛋白水解酶制剂Flavourzyme[®]在酶膜

反应器中进行了原始食品级连续长期水解过程, 在反应器中酶被重复使用, 与参考批处理相比, 酶生产率提高了450%。Baldassarre等^[25]利用连续膜酶生物反应器将洋葱皮酶解成果胶低聚糖, 研究其水解性能, 取得了良好的水解效果。Hang Hua等^[26]研究酶膜反应器与纳米过滤膜系统相结合, 研究菊粉转化的高浓度DFA III, 结果表明, EMR与NF膜结合的体系包含5 L的溶液体积, 超滤和纳米过滤膜的分子质量截止值为5 kDa和150 Da, DFA III质量浓度增加至约400 g/L。该系统可以提供稳定的操作并且可以持续运行8次, 可以满足工业化生产。

本实验通过制备醋酸纤维素-聚丙烯复合膜, 并将转谷氨酰胺酶进行膜固定化, 依据最佳条件制得固定化转谷氨酰胺酶膜, 对固定化酶膜进行表征分析。并且通过将制备好的固定化转谷氨酰胺酶膜固定在不锈钢网框上悬挂于烧杯中用来聚合米糠废水中的蛋白质。在一定转速条件下, 利用响应面确定物料温度、物料pH值、转子转速、酶膜面积与底物含量的比例和反应时间等最佳条件, 并以蛋白聚合率为指标, 研究固定化转谷氨酰胺酶催化米糠废水中米糠蛋白聚合率的影响, 为连续化保留米糠废水中的蛋白提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

米糠废水(蛋白质质量浓度0.51%) 湖北天星粮油股份有限公司; 微生物转谷氨酰胺酶 上海一鸣生物科技有限公司; N- α -CBZ-Gln-Gly 美国Sigma公司; 醋酸纤维素 北京惠宝联化科技有限公司; 聚丙烯膜(孔径0.1 μm) 郑州华美水处理器材有限公司; 丙酮 河南富达化工产品有限公司; 三氯乙酸、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 威海恒邦化工公司; L-谷氨酸 γ -单羟肟酸 深圳市迪肯科技有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-260紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司; 80-2高速离心机 上海浦东物理光学仪器厂; DF-1磁力加热搅拌器 江苏金坛市环宇科学仪器厂; SY-2-4恒温水浴锅 天津市欧诺仪器仪表有限公司; ZK-82B真空干燥箱 上海实验仪器总厂; SHB-III T循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; PHS-3C精密酸度计 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; S-3400N扫描电子显微镜 日本Hitachi公司。

1.3 方法

1.3.1 醋酸纤维素-聚丙烯复合膜的制备

准确称取10 g醋酸纤维素充分溶解于200 mL丙酮中, 等到一定时间形成均匀成型的膜液之后, 再将聚乙烯缓慢放到膜液当中, 等到其自然成膜, 然后用大量去离子水冲洗数次干燥备用^[27]。

1.3.2 转谷氨酰胺酶的固定化

采用吸附与交联相结合的固定化方法,取一定规格的醋酸纤维素-聚丙烯复合膜于烧杯中,加入质量浓度15 mg/mL的转谷氨酰胺酶液和pH 6.0的磷酸盐缓冲液中,吸附3 h。再加入质量浓度0.3 g/100 mL的戊二醛进行交联反应,4 h后将膜取出,用磷酸盐缓冲液冲洗除去多余的酶液并干燥^[28],并将干燥好的固定化酶膜固定在不锈钢网框上,浸入磷酸盐缓冲液中贮存备用。

1.3.3 扫描电镜分析

采用扫描电镜(放大倍数为5 000)分别对空白膜和酶固定化后的膜进行表面结构特征检测,然后进行比较。

1.3.4 固定化酶膜处理米糠废水单因素试验

将固定好酶膜的网框悬挂在1 000 mL的烧杯中,约在离杯口1/3处,将米糠废水通入到烧杯中,在磁力搅拌的作用下与酶膜充分接触2 h。分别选取物料温度34~50 °C,物料pH 5.5~7.5,转子转速95~155 r/min,酶膜面积与底物含量比例76:1~84:1 (cm²/g),反应时间0.5~2.5 h研究对酶解效果的影响,测定不同条件聚合前后的米糠废水的蛋白质含量,以蛋白聚合率为指标,每组实验平均做3次。

1.3.5 响应面优化试验

依据1.3.4节单因素试验结果,在此基础上采用Box-Behnken模型,分别对物料温度(A)、物料pH值(B)、转子转速(C)、酶膜面积与底物含量比例(D)和反应时间(E)5个因素进行优化,并以蛋白聚合率(Y)为响应值进行响应面分析,响应面因素与水平见表1。

表1 响应面因素与水平

Table 1 Coded values and corresponding actual values of independent variables used in response surface analysis

水平	因素				
	A物料温度/°C	B物料pH	C转子转速/(r/min)	D膜面积/底物含量 (cm ² /g)	E反应时间/h
-1	38	6	110	78	1
0	42	6.5	125	80	1.5
1	46	7	140	82	2

1.3.6 固定化酶膜重复使用次数

在响应面最佳条件下进行反应,在每一次使用结束后取一部分酶膜进行酶活力测定,考察重复使用次数对酶膜相对酶活力的影响。

1.3.7 测定方法

1.3.7.1 载酶量测定

转谷氨酰胺酶载酶量测定采用GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法^[29]。

采用凯氏定氮法分别测定固定化前后的醋酸纤维素-聚丙烯复合膜的蛋白质含量,以及清洗固定化酶膜所用磷酸盐缓冲溶液中的蛋白含量。根据公式(1)计算载酶量:

$$\text{载酶量}/\% = \frac{(C_0 - C) \times V - C_w \times V_w}{W} \times 100 \quad (1)$$

式中: C_0 为固定化之前酶溶液中蛋白质量浓度/(mg/mL); C 为固定化之后酶溶液中蛋白质量浓度/(mg/mL); C_w 为冲洗固定化酶膜之后,所用磷酸盐缓冲溶液中的蛋白质量浓度/(mg/mL); V 为固定化实验所用酶溶液体积/mL; V_w 为冲洗固定化酶膜之后,所用磷酸盐缓冲溶液体积/mL; W 为浸入酶溶液中的膜面积/cm²。

1.3.7.2 酶活力测定

采用Folk等^[30]的分光异羟肟酸分析法进行测定。一个酶活力单位表示为:37 °C时1 min催化1 μmol N-α-CBZ-Gln-Gly生成单羟肟酸所消耗酶量,单位为U/g。相对酶活力:每组中所测酶活力与该组中测得的最高酶活力二者的相对百分比表示。

1.3.7.3 蛋白质含量测定

采用GB 5009.5—2016中的凯氏定氮法测定。

1.3.7.4 蛋白质聚合率测定

废水处理前蛋白质质量浓度记为 C_1 /(mg/mL),废水处理前后蛋白质质量浓度记为 C_2 /(mg/mL),并利用公式(2)计算蛋白质聚合率:

$$\text{蛋白质聚合率}/\% = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (2)$$

1.3.7.5 酶膜面积的计算

根据预实验,需添加酶与蛋白比为1.1 U/g,酶膜经裁剪为长方形形状,并且根据公式(3)计算酶膜面积:

$$S = \frac{1.1 \times 0.51\% \times V}{A \times 10^3 \times B} \quad (3)$$

式中: S 为酶膜面积/cm²; V 为废水样体积/mL; A 为酶膜的酶活/(U/g); B 为酶膜单位面积载酶量/(mg/cm²)。

1.3.7.6 其他成分测定

化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)测定:采用Cr法测定废水中COD值;生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD)测定:根据测定的COD值,采用稀释接种法测定废水中BOD值。

1.4 数据处理

单因素试验数据处理用Origin 2017软件来整理与分析,用SPSS 17.0进行单因素方差分析,响应面用Design-Expert 8.0.6软件分析。

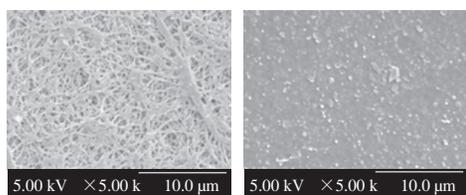
2 结果与分析

2.1 酶膜的酶载量以及酶活力

依据1.3.7节中相关酶载量以及酶活力测定的方法,测得单位面积酶载量为0.81 mg/cm²,酶活力为17.6 U/g。固定化酶的活力相较于游离酶的活力有所降低,主要是因为固定化过程会损伤一定的酶活。

2.2 酶膜的扫描电镜

分别对制得的空白膜及固定化转谷氨酰胺酶膜做扫描电镜, 结果如图1所示。



a.空白膜 b.固定化MTG酶的膜

图1 微孔膜和固定化酶膜电镜扫描图

Fig.1 Scanning electron microscopy images of microporous membrane and enzyme-immobilized membrane

从图1a可以看出, 空白醋酸纤维素-聚丙烯复合膜呈现纤维状, 纤维相互错乱交叉, 排列不规则, 但表面很平整光滑、致密、均匀, 代表稳定性好^[28]。从图1b可看出, 此时酶蛋白固定化后的膜表面由于交联了蛋白的基团, 存在一些颗粒或团状的物体而显得有些粗糙, 而且这些颗粒大小不一, 形状各异, 附着在纤维表面, 并且纤维表面大部分被酶覆盖^[31]。可以说明MTG已经固定在醋酸纤维素-聚丙烯复合膜上。

2.3 酶膜处理米糠废水的单因素试验

将固定有酶膜的网框悬挂在烧杯中, 控制米糠废水的反应pH 6.5、转子转速125 r/min、酶膜面积与底物含量比例80:1 (cm²/g)、反应时间1.5 h。

2.3.1 物料温度对蛋白质聚合率的影响

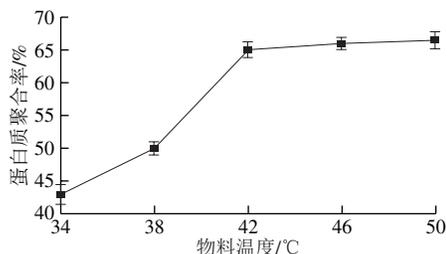


图2 物料温度对蛋白质聚合率的影响

Fig.2 Effect of material temperature on protein polymerization rate

由图2可知, 蛋白质聚合率随温度变化的趋势为先快速增高后趋于平稳。当物料温度小于42 °C时, 蛋白质聚合率很明显地随物料温度的升高而升高, 说明酶膜活性随温度的升高不断增强, 与废水中的蛋白充分聚合, 从而分离下来。但物料温度升至42 °C时蛋白质聚合率达到65%, 温度继续升高蛋白质聚合率趋势稳定, 并没有显著变化, 可能是此时的蛋白发生变性^[32], 蛋白质聚合率变化趋势不明显。因此本实验把物料温度确定在42 °C左右。

2.3.2 物料pH值对蛋白质聚合率的影响

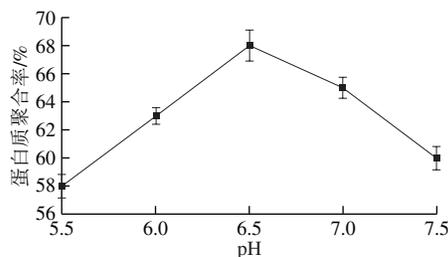


图3 物料pH值对蛋白质聚合率的影响

Fig.3 Effect of material pH on protein polymerization rate

由图3可知, 蛋白质聚合率随pH值的升高呈现先增大后减小的趋势。当pH值为5.5~6.5之间时蛋白质聚合率随pH值的升高而升高, pH值为6.5时蛋白质聚合率最高达68%, 而当pH值继续升高, 蛋白质聚合率下降。由此可见, 在强酸、强碱性条件下会破坏酶的活性位点, 从而使酶失活^[33], 不利于酶膜发挥聚合作用, 对米糠蛋白的聚合效果较差。从而得知酶膜的最佳反应pH值在中性条件附近, 所以选取pH值在6.5左右。

2.3.3 转子转速对蛋白质聚合率的影响

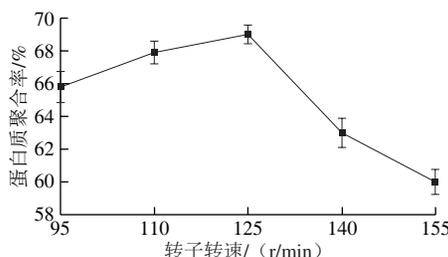


图4 转子转速对蛋白质聚合率的影响

Fig.4 Effect of rotor speed on protein polymerization rate

由图4可知, 当调节转子转速时, 蛋白质聚合率呈现先较上升后下降的趋势。当调节转速在95~125 r/min时, 蛋白质聚合率随转子转速的增大而增大, 因为适当的搅拌效果可以使废水中的蛋白与酶膜充分接触, 从而提高聚合率。当转子转速大于125 r/min时, 随着转子转速的增大, 蛋白质聚合率反而下降, 强力的搅拌使得废水中的蛋白还未与酶膜充分接触聚合, 从而造成聚合率降低。所以, 将转子转速确定在125 r/min附近。

2.3.4 酶膜面积与底物含量比例对蛋白质聚合率的影响

由图5可知, 蛋白质聚合率随其比例的增大呈现先增加后趋于平稳的趋势。当比例小于80:1 (cm²/g)时, 随着酶膜面积的增大, 会提供更多的聚合位点聚合废水中的蛋白质, 蛋白质聚合率相应地提高。当比例大于80:1 (cm²/g)时, 此时废水中的蛋白质含量一定, 过多的酶膜面积起不到聚合蛋白质的作用, 从而造成酶膜的浪费。所以, 选择酶膜面积与底物含量比例在80:1 (cm²/g)左右。

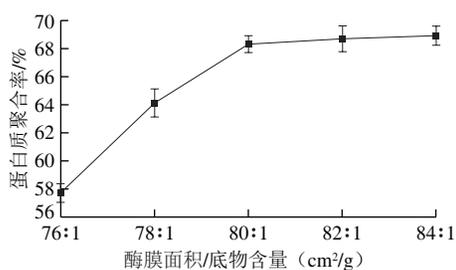


图5 酶膜面积与底物含量的比例对蛋白质聚合率的影响

Fig. 5 Effect of ratio between enzyme-loaded membrane area and substrate amount on protein polymerization rate

2.3.5 反应时间对蛋白聚合率的影响

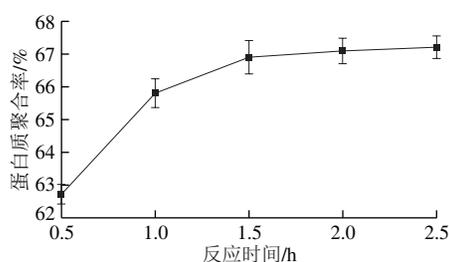


图6 反应时间对蛋白质聚合率的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on protein polymerization rate

由图6可知, 蛋白质聚合率随反应时间的增大呈现先增加后趋于稳定的趋势。当反应时间在1.5 h之前, 因为反应未达到充分, 样品中蛋白并没有被全部聚合, 所以出现随时间延长而增大的现象。当反应时间在1.5 h之后, 样品中蛋白被聚合完全, 蛋白聚合率趋于平稳, 继续增大反应时间并不能取得更好的效果, 所以, 选取反应时间在1.5 h左右。

2.4 响应面试验优化

2.4.1 响应面试验设计与结果

通过Design-Expert 8.0.6软件设计设定A(物料温度)、B(物料pH)、C(转子转速)、D(酶膜面积与底物含量比例)、E(反应时间)分别是影响因素, Y(蛋白聚合率)为响应值得到5因素3水平设计与结果, 如表2所示。

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Experimental design in terms of coded values with results for response surface analysis

试验号	A物料温度	B物料pH	C转子转速	D酶膜面积/底物含量	E反应时间	Y蛋白质聚合率/%
1	1	0	0	0	1	67.5
2	0	1	0	0	-1	67.2
3	0	0	1	0	1	65.0
4	-1	0	0	1	0	63.9
5	0	0	0	1	1	67.5
6	1	1	0	0	0	66.2
7	0	-1	0	1	0	61.3
8	0	0	0	-1	1	66.1

续表2

试验号	A物料温度	B物料pH	C转子转速	D酶膜面积/底物含量	E反应时间	Y蛋白质聚合率/%
9	0	0	-1	-1	0	62.2
10	0	0	-1	1	0	65.4
11	0	0	1	0	-1	64.0
12	0	0	0	0	0	69.4
13	0	0	0	0	0	69.1
14	0	0	0	-1	-1	63.6
15	0	0	0	0	0	69.5
16	0	-1	-1	0	0	68.7
17	0	-1	0	-1	0	60.5
18	-1	1	0	0	0	64.5
19	0	0	0	0	0	69.3
20	-1	0	0	0	1	63.8
21	-1	0	0	0	-1	64.0
22	-1	0	1	0	0	59.0
23	-1	0	-1	0	0	64.4
24	-1	0	0	-1	0	57.7
25	0	1	1	0	0	67.8
26	1	0	-1	0	0	65.5
27	0	0	-1	0	-1	66.9
28	0	0	0	1	-1	65.7
29	0	0	0	0	0	69.8
30	0	-1	1	0	0	57.5
31	1	0	0	0	-1	65.8
32	0	1	0	-1	0	63.4
33	0	-1	0	0	-1	63.0
34	0	0	1	1	0	62.6
35	0	0	1	-1	0	61.4
36	0	0	0	0	0	69.0
37	1	0	1	0	0	64.5
38	-1	-1	0	0	0	59.2
39	1	-1	0	0	0	63.5
40	0	1	0	0	1	67.9
41	0	1	-1	0	0	63.0
42	1	0	0	-1	0	64.8
43	0	-1	0	0	1	65.4
44	0	1	0	1	0	67.1
45	1	0	0	1	0	63.8
46	0	0	-1	0	1	68.2

2.4.2 模型方差与分析

利用Design Expert 8.0.6软件对2.4.1节中实验结果进行方差分析, 得到回归线方程为:

$$Y=69.35+1.57A+1.75B-1.41C+1.10D+1.70E-0.65AB+1.10AC-1.80AD+0.48AE+4.00BC+0.72BD-0.43BE-0.50CD-0.075CE-0.17DE-3.36A^2-2.69B^2-2.70C^2-3.46D^2-0.57E^2$$

由表3可知, 回归模型中以蛋白聚合率为响应值的 F 值为71.05, $P<0.0001$, 表明在利用回归方程描述各因素与响应值之间的关系时, 因变量与所有自变量之间的线性关系显著, 说明得到的回归方程可靠^[34]。通过方差分析失拟项大于0.05, 表明此差异不显著, 说明回归区域内拟合良好, 该模型选择正确。多元相关系数 $R^2=98.27\%>0.8$,

表明在此模型中各个因素和响应值之间相关性好^[35], 可以通过此模型分析和预测蛋白聚合率。

表3 回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance of regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	437.17	20	21.86	71.05	<0.000 1**
A物料温度	39.38	1	39.38	127.98	<0.000 1**
B物料pH值	49.00	1	49.00	159.26	<0.000 1**
C转子转速	31.64	1	31.64	102.84	<0.000 1**
D膜面积/底物含量	19.36	1	19.36	62.93	<0.000 1**
E反应时间	7.84	1	7.84	25.48	<0.000 1**
AB	1.69	1	1.69	5.49	0.027 3*
AC	4.84	1	4.84	15.73	0.000 5*
AD	12.96	1	12.96	42.12	<0.000 1**
AE	0.90	1	0.90	2.93	0.099 1
BC	64.00	1	64.00	208.02	<0.000 1**
BD	2.10	1	2.10	6.83	0.014 9*
BE	0.72	1	0.72	2.35	0.138 0
CD	1.00	1	1.00	3.25	0.083 5
CE	0.022	1	0.022	0.073	0.789 1
DE	0.12	1	0.12	0.40	0.533 8
A ²	98.80	1	98.80	321.12	<0.000 1**
B ²	63.13	1	63.13	205.20	<0.000 1**
C ²	63.52	1	63.52	206.47	<0.000 1**
D ²	104.25	1	104.25	338.85	<0.000 1**
E ²	2.86	1	2.86	9.31	0.005 3
回归	7.69	25	0.31		
失拟项	7.28	20	0.36	4.38	0.054 2
纯误差	0.42	5	0.083		
总回归	444.86	45			

注: *差异显著 (P<0.05); **差异极显著 (P<0.01)。

2.4.3 交互参数的等高线图

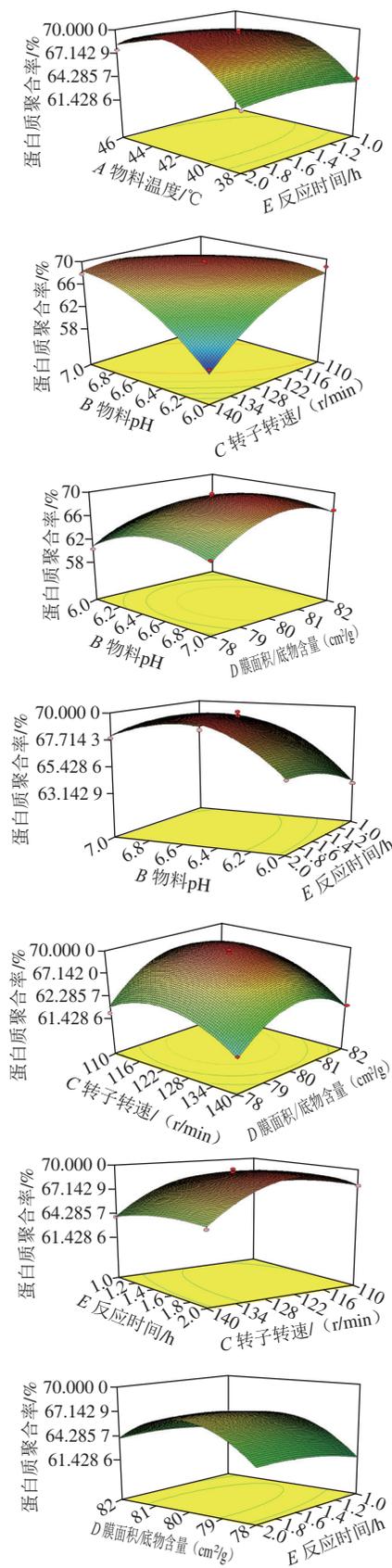
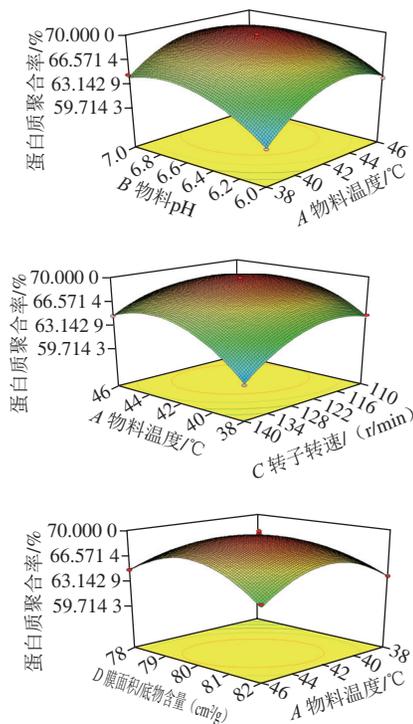


图7 交互参数对蛋白质聚合率的影响

Fig. 7 Response surface plots showing the interactive effect of various parameters on protein polymerization rate

交互项的交互曲线越陡,表明越显著,并且形成的曲面为较为规则的形态^[36]。由图7可知,物料温度、物料pH值、转子转速、酶膜面积与底物含量的比例以及反应时间5个变量在交互时,控制3个变量恒定,随着其他2个变量的增加,呈现先上升后下降的趋势。在交互结果中,AD、BC显示极显著,AB、AC、BD显著,即物料温度和酶膜面积与底物含量的比例、物料pH值和转子转速之间交互极显著,而物料温度和物料pH值、物料温度和转子转速、物料pH值和酶膜面积与底物含量的比例之间交互显著。通过响应面设计优化得到最佳条件为物料温度42.9℃、物料pH 6.60、转子转速123.7 r/min、酶膜面积与底物含量的比例80.23:1 (cm²/g)、反应时间1.81 h,在此条件下得到蛋白质聚合率为70.1%。根据实际情况得出整理值,整理值为物料温度43℃、物料pH 6.6、转子转速124 r/min、酶膜面积与底物含量的比例80:1 (cm²/g)、反应时间1.8 h。在此整理条件下,做3次平行试验,蛋白质聚合率平均值为70%,进一步说明此回归模型建立良好,与实际值相吻合,可以用来分析和预测蛋白质聚合率。

2.5 酶膜的重复使用次数

在2.4节响应面优化最佳条件下考察重复使用次数对固定化酶膜的相对酶活力的影响,如图8所示。

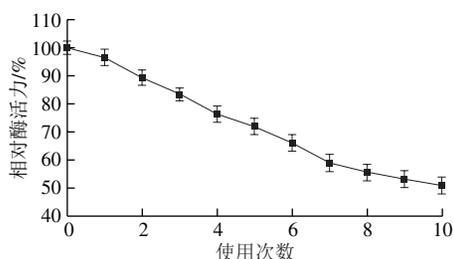


图8 酶膜的相对酶活力随使用次数变化

Fig. 8 Change in relative enzymatic activity of enzyme-loaded membrane after repeated use

由图8可知,酶膜的相对酶活力呈现随操作次数的增加而降低的趋势,经10次使用后,相对酶活力为51.5%。这可能是由于随着操作次数的增加,酶膜受到一定程度的机械损伤,致使相对酶活力降低。部分破损、部分固定化酶脱落等现象的出现,也会降低固定化酶的活性。酶本身的失活和酶活力低也会致使固定化酶活力降低。但在图中可以看出,酶膜在重复使用5次后,相对酶活力仍可保持在74.3%以上。

2.6 主要指标对比

表4 米糠废水处理前后成分含量对比

Table 4 Comparison of protein content, COD and BOD of rice bran wastewater before and after treatment with MTG-loaded membrane

指标	蛋白质质量分数/%	COD值/(mg/L)	BOD值/(mg/L)
处理前	0.51	17 983	11 084
处理后	0.15	3 859	1 982

米糠废水中主要指标在处理前后有一定的变化,成分变化如表4所示。处理后比处理前蛋白质、COD值和BOD值各个指标均有相对显著幅度的下降,表明此次实验良好,利用醋酸纤维素-聚丙烯膜固定转谷氨酰胺酶对米糠废水中蛋白的聚合起到了良好的效果。

3 结论

本实验首先制备了醋酸纤维素-聚丙烯复合膜,将转谷氨酰胺酶固定在复合膜上,制得了固定化转谷氨酰胺酶膜,其单位面积酶载量为0.81 mg/cm²,并对酶膜进行表征分析。然后将酶膜固定在网框上并悬挂于烧杯中,用来聚合米糠废水中的蛋白质,以米糠废水中的蛋白质聚合率为指标,分别考察物料温度、物料pH值、转子转速以及酶膜面积对蛋白质聚合率的影响,并利用响应面对各个条件进行优化,得到最佳条件。在物料温度43℃、pH 6.6、转子转速124 r/min、酶膜面积与底物含量比例80:1 (cm²/g)、反应时间1.8 h条件下,蛋白质聚合率可达70%,表明本实验有效保留了米糠废水中的蛋白质含量,相应米糠废水中相关指标也有所降低:COD值为3 859 mg/L, BOD为1 982 mg/L。与此同时,对酶膜重复使用性进行了实验,在使用5次后,酶膜的相对酶活力为74.3%。本实验为之后利用酶膜降低米糠废水中蛋白质含量从而保留更多营养物质提供一定的研究基础和理论依据。

参考文献:

- [1] 周麟依,孙玉凤,吴非. 丙二醛氧化对米糠蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 98-107. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180528-392.
- [2] SATOH R, TSUGE I, TOKUDA R, et al. Analysis of the distribution of rice allergens in brown rice grains and of the allergenicity of products containing rice bran[J]. Food Chemistry, 2019, 276(15): 761-767. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.10.080.
- [3] 李新华, 富艳鑫, 郑煜焱. 米糠蛋白提取工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 251-254. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201022053.
- [4] WATANABE M, MAEDA I, KOYAMA M, et al. Simultaneous recovery and purification of rice protein and phosphorus compounds from full-fat and defatted rice bran with organic solvent-free process[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(2): 206-211. DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.07.009.
- [5] 郑煜焱, 曾洁, 李新华. 米糠蛋白的组成及功能性[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 143-149.
- [6] RAFA A, SADEGHIAN A. Stabilization of Tarom and Domesiah cultivars rice bran: physicochemical, functional and nutritional properties[J]. Journal of Cereal Science, 2017, 74: 64-71. DOI:10.1016/j.jcs.2017.01.019.
- [7] HAN S W, CHEE K M, CHO S J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 766-769. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.127.
- [8] GUL K, YOUSUF B, SINGH A. K, et al. Rice bran: nutritional values and its emerging potential for development of functional food: a

- review[J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015, 6(1): 24-30. DOI:10.1016/j.bcdf.2015.06.002.
- [9] 于国萍, 岳崇慧, 陈媛, 等. 转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白乳状液冻融稳定性的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 22-27. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171207-081.
- [10] LI C, XIONG Y L. Mild oxidation promotes myosin S2 cross-linking by microbial transglutaminase[J]. *Food Chemistry*, 2019, 287: 390-397. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.02.097.
- [11] 王小花, 章绍兵, 娄丽丽. 转谷氨酰胺酶交联对食物蛋白改性作用的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2018, 31(3): 9-11.
- [12] 王强. 转谷氨酰胺酶的分离纯化及膜固定化的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2011: 2-4.
- [13] 臧学丽, 王迪, 范福祥. 转谷氨酰胺酶聚合大豆蛋白的研究进展[J]. *吉林农业*, 2016(17): 76. DOI:10.14025/j.cnki.jlly.2016.17.025.
- [14] 张海均, 贾冬英, 姚开. 转谷氨酰胺酶在大豆蛋白及制品中的应用[J]. *粮食与饲料工业*, 2012(9): 19-21.
- [15] CLARE D A, GHARST G, SANDERS T H. Transglutaminase polymerization of peanut proteins[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55(2): 432-438. DOI:10.1021/jf062309t.
- [16] 刘颖, 徐锦丽, 璩阿敏, 等. 转谷氨酰胺酶改善大豆11S球蛋白聚合的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(8): 180-183; 187. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.08.032.
- [17] LEI L, LIU X, LI Y, et al. Study on synthesis of poly(GMA)-grafted Fe_3O_4/SiO_x magnetic nanoparticles using atom transfer radical polymerization and their application for lipase immobilization[J]. *Materials Chemistry & Physics*, 2011, 125(3): 866-871. DOI:10.1016/j.matchemphys.2010.09.031.
- [18] ANSARI S A, HUSAIN Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(3): 512-523. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.09.005.
- [19] LIU X, LEI L, LI Y, et al. Preparation of carriers based on magnetic nanoparticles grafted polymer and immobilization for lipase[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 56(3): 142-149. DOI:10.1016/j.bej.2011.05.013.
- [20] 李中宾, 任悦, 邹德智, 等. 固定化酶辊多效酶解大豆胚片的工艺优化[J]. *食品科学*, 2017, 38(22): 67-73. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722011.
- [21] 徐桂敏, 杨瑞金, 张文斌, 等. 一种连续分离纯化酪蛋白磷酸肽的新工艺[J]. *食品科学*, 2011, 32(8): 24-28. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201108006.
- [22] 林繁华, 张庆庆, 汤斌, 等. 醋酸纤维素/聚丙烯复合膜固定化脂肪酶的研究[J]. *安徽工程科技学院学报(自然科学版)*, 2007(3): 16-19. DOI:10.3969/j.issn.2095-0977.2007.03.005.
- [23] 石陆娥, 应国清, 唐振兴, 等. 酶膜生物反应器中酶的固定化方法研究及其应用进展[J]. *药物生物技术*, 2006, 13(4): 310-314. DOI:10.3969/j.issn.1005-8915.2006.04.017.
- [24] MERZ M, EISELE T, CLAABEN W, et al. Continuous long-term hydrolysis of wheat gluten using a principally food-grade enzyme membrane reactor system[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 99: 114-123. DOI:10.1016/j.bej.2015.03.019.
- [25] BALDASSARRE S, BABBAR N, VAN ROY S, et al. Continuous production of pectic oligosaccharides from onion skins with an enzyme membrane reactor[J]. *Food Chemistry*, 2017, 267: 101-110. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.10.055.
- [26] HANG H, BAO S, ZHAO M, et al. Enzyme membrane reactor coupled with nanofiltration membrane process for difructose anhydride III from inulin conversion[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 276: 75-82. DOI:10.1016/j.cej.2015.04.018.
- [27] 林繁华, 张庆庆, 汤斌, 等. 醋酸纤维素/聚丙烯复合膜固定化脂肪酶的研究[J]. *安徽工程大学学报*, 2007, 22(3): 16-19. DOI:10.3969/j.issn.2095-0977.2007.03.005.
- [28] 时敏, 王雪, 马丽娜, 等. 醋酸纤维素-聚丙烯复合膜固定化转谷氨酰胺酶的研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 155-158. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201309032.
- [29] 李志豪, 周彬, 王萍, 等. 碱性电解水对籽瓜种仁蛋白质提取效果的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(7): 95-100. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180315-197.
- [30] FOLK J E, COLE P W. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1965, 240: 2951-2960.
- [31] 时敏, 周晓丹, 李越, 等. 醋酸纤维素/聚四氟乙烯复合膜固定化磷脂酶A₁的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(13): 127-130; 134.
- [32] 马永强, 韩春然, 张娜, 等. 聚丙烯微孔膜固定化转谷氨酰胺酶在大豆乳清废水处理中的应用[J]. *食品科学*, 2011, 32(20): 104-107. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201120022.
- [33] 邓红涛. 脂肪酶在聚丙烯微孔膜上的固定化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005: 145-146.
- [34] LAOHAKUNJIT N, SELAMASSAKUL O, KERDCHOECHUEN O. Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.)[J]. *Food Chemistry*, 2014, 158: 162-170. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.02.101.
- [35] YU D, MA Y, JIANG L, et al. Optimization of magnetic immobilized phospholipase A₁ degumming process for soybean oil using response surface methodology[J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 237(5): 811-817. DOI:10.1007/s00217-013-2057-z.
- [36] SARFARAZI M, JAFARI S M, RAJABZADEH G. Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology[J]. *Food Analytical Methods*, 2015, 8(9): 2273-2285. DOI:10.1007/s12161-014-9995-3.