

利用固定化黑曲霉单宁酶制备没食子酸的研究

郭鲁宏 杨顺楷

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘 要 用海藻酸钙载体包埋单宁酶, 制备出转化五倍子单宁成没食子酸能力较好的固定化酶。研究了固定化条件和固定化单宁酶的部分性质, 结果表明, 最佳固定化条件为海藻酸钠 90mg 包埋单宁酶 546u (3mL, 182u/mL), 在 1%~2% CaCl_2 中作硬化处理, 固定化单宁酶的最适温度为 45℃, 在 10~50℃ 范围内稳定, 其最适 pH 值为 6.5, 在 pH5~7 之间基本稳定, 在此基础上, 进行了没食子酸实验室微量级酶法制备实验, 3 次实验没食子酸产品的平均产率达到 61%。和目前所用工业生产没食子酸的硫酸水解法相当, 具有潜在的工业开发价值。

关键词 固定化单宁酶, 黑曲霉, 酶法转化, 五倍子单宁, 没食子酸

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0614-04

没食子酸(Gallic acid, GA)作为一种重要的化工产品, 用途广、用量大。它可以用于医药工业^[1], 又是食品、化妆品及饲料的抗氧化剂, 近年来还用作半导体感光树脂的原料等^[2]。目前 GA 大多是由五倍子单宁经硫酸水解生产的, 产率约 65% 左右。但是酸法生产 GA 存在着严重污染环境, 对设备要求高等问题, 而微生物酶法有助于解决上述弊端。一般情况下, 发酵水解五倍子单宁生成 GA 的反应是由产生单宁酶(Tannase)的黑曲霉等微生物完成的^[3, 12], 使用固定化酶及自然酶进行该水解反应制备 GA 迄今为止还未见报道, 本文报告以固定化单宁酶制备 GA 这一新的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 五倍子单宁为浸提五倍子所得的自制产品, 硅胶 GF254 由青岛海洋化工厂生产, 其他试剂均为国产分析纯级。

1.1.2 菌种 单宁酶高活性菌株黑曲霉 13-13-37 (*Aspergillus niger* 13-13-37)是由本实验室经诱变原生质体后筛选得到。

1.2 方法

1.2.1 单宁酶的制备 黑曲霉 13-13-37 接种于含 3% 五倍子单宁的察氏培养基中, 30℃ 培养 2d, 过

滤。菌丝磨碎后, 加入蒸馏水, 抽滤, 合并菌丝提取液和发酵清液, 然后添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 固体使单宁酶沉淀, 离心, 沉淀溶于蒸馏水, 再透析除去 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 即可用于酶的固定化。

1.2.2 没食子酸的检测 采用 TLC-UV 法。GA 样品和标准品经展开后(展开剂为苯:异丁醇:冰醋酸 = 10:4:1, V/V), 刮下含没食子酸斑点的硅胶, 加入甲醇, 离心, 弃去沉淀, 上清液置气流下使甲醇完全挥发, 制成水溶液, 适当稀释, 在 263nm 下测光吸收(A)值。根据标准曲线, 计算 GA 样品的浓度。由 GA 浓度的高低, 评价固定化单宁酶转化五倍子单宁成 GA 的能力。

1.2.3 固定化单宁酶制备方法 海藻酸钙法、聚丙烯酰胺法、聚乙烯醇(PVA)-硼酸法分别参考文献[4, 5, 6]。

1.2.4 固定化单宁酶酶法转化制备没食子酸实验 在 3% 的五倍子单宁溶液中, 加入一定量的固定化酶制剂, 45℃ 振荡反应后, 过滤, 取样做 GA 浓度测定。滤液上大孔吸附剂-CGA688 柱, 然后用 10% 的乙醇/水(V/V)洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩, 加少量活性炭脱色, 趁热以布氏漏斗抽滤, 冷却结晶, 过滤得到白色的 GA 晶体, 以国标 GB5309-85 介绍的方法测定其含量。

1.2.5 固定化单宁酶活性的测定、温度和 pH 值对

固定化酶活性和稳定性的影响 [参见文献 7]。

2 结果与讨论

2.1 单宁酶固定化方法及固定化酶转化结果的比较

用不同方法制备 3 种固定化酶的难易程度及其转化情况见表 1。由表可知海藻酸钙包埋法效果最佳,而 PVA 是一种很有潜质的包埋材料。但是在本研究中,由于其表面含游离羟基,所以具有较大的水溶膨胀性,导致载体本身体积变大,机械强度降低。最近有人通过在聚乙烯醇-硼酸聚合过程中引入丙烯酰胺聚合反应,有效改善了它的水溶膨胀性,这为今后进行包埋单宁酶的研究提供了一条很好的思路^[8]。

表 1 不同固定化方法及固定化酶转化结果的比较
Table 1 Comparison of different immobilized methods and the transformation results by the immobilized enzymes

Immobilized method	Immobilized tannase preparation	Concentration of GA (mg/mL)
Calcium alginate	Easy	20.3
Polyacrylamide	More difficult	15.7
PVA - Boric acid	Most difficult	19.4

2.2 海藻酸钙固定化单宁酶优化条件的选择

2.2.1 海藻酸钠浓度的选择 称取不同量的海藻酸钠,加入相同体积的单宁酶液,使混合物中海藻酸钠的浓度为 1%~5%,再将混合物滴入 CaCl₂ 溶液中制备固定化酶,然后加入 20mL 3% 的五倍子溶液中进行酶法转化,结果(表 2)表明:海藻酸钠浓度以 3% 为宜。当其浓度过低时,形成的载体机械强度差;当其浓度过高时,载体成球困难,均匀度差,形状不规则,上述两种情况均会影响固定化酶转化五倍子单宁生成没食子酸的能力。

表 2 海藻酸钠浓度对固定化单宁酶的制备及其转化的影响
Table 2 Effect of sodium alginate concentration on the immobilization of tannase and the enzymatic transformation

Concentration of Sodium alginate/%	Immobilized tannase preparation	Concentration of GA(mg/mL)
1	Easy	7.9
2	Easy	14.1
3	Easy	20.3
4	More difficult	16.2
5	More difficult	13.7

2.2.2 包埋酶量对固定化单宁酶转化的影响 制备 3% 的海藻酸钠,并使其中包含的酶量分别为 182、364、546、728、910u(182u/mL),固定化酶转化的结果见下表。表中数据说明,在一定范围内,随着包埋酶量的增加,固定化酶的转化能力也升高,但当包埋的酶量达 546u(3mL)以上时,固定化酶转化水平趋向不变,反应液中 GA 浓度也保持恒定。

表 3 包埋酶量对固定化单宁酶转化的影响
Table 3 Effect of embedding tannase amount on the enzymatic transformation

Embedding tannase amount(u)	Concentration of GA(mg/mL)
182	8.5
364	13.9
546	20.3
728	20.4
910	20.3

2.2.3 硬化剂 CaCl₂ 浓度对制备固定化单宁酶及其转化的影响:将海藻酸钠(90mg)——单宁酶(546u,即 3mL)溶液,分别滴入 0.5%~2.5% CaCl₂ 中作硬化处理,制成的固定化酶用于转化反应,结果(表 4)表明:上述固定化酶在机械强度及转化能力方面均无明显差别。

表 4 CaCl₂ 浓度对制备固定化单宁酶及其转化的影响
Table 4 Effect of CaCl₂ concentration on immobilized tannase preparation and the enzymatic transformation

Concentration of CaCl ₂ / %	Strength	Concentration of GA (mg/mL)
0.5	Good	19.3
1	Good	20.1
1.5	Good	19.9
2	Good	20.3
2.5	Good	19.7

2.3 固定化单宁酶的部分性质

2.3.1 固定化酶的最适温度及热稳定性 温度(10~70℃)对固定化单宁酶的活性和稳定性的影响如图 1。由图可知:该固定化酶的最适温度为 45℃,在 10~50℃ 范围内保持稳定。与自然酶(图 1)相比,单宁酶经固定化后,增强了对加热的抵抗能力。

2.3.2 固定化酶的最适 pH 及酸碱稳定性:pH 值(3~9)对固定化单宁酶活性及稳定性的影响如图 2。从图中可看出:固定化酶的最适 pH 为 6.5,在 pH 5~7 范围内基本稳定。表明固定化酶的最适 pH

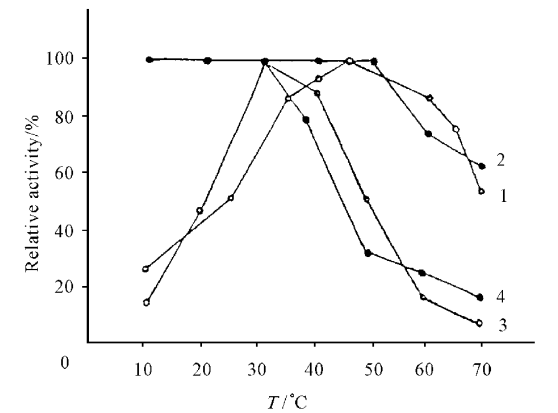


图 1 温度对固定化酶及自然酶活性和稳定性的影响
Fig.1 Effect of temperature on immobilized and native tannase activities and their stability
1. Immobilized tannase activity 2. Immobilized tannase stability
3. Native tannase activity 4. Native tannase stability

和对酸碱的稳定性与自然酶(图 2)相比,均发生了较大的变化。

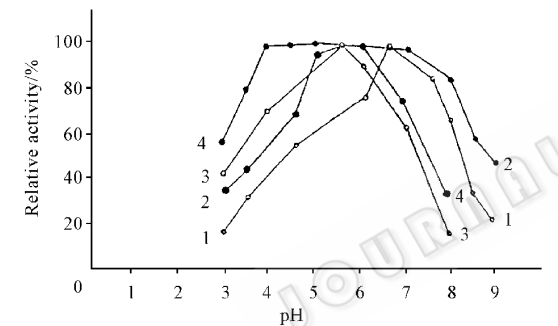


图 2 pH 值对固定化酶及自然酶活性和稳定性的影响
Fig.2 Effect of pH value on immobilized and native tannase activities and their stability
1. Immobilized tannase activity 2. Immobilized tannase stability
3. Native tannase activity 4. Native tannase stability

2.4 酶法制备没食子酸的反应进程

以固定化单宁酶催化水解五倍子单宁生成 GA 的时程曲线如图 3。从图中可得出,水解反应进行 36h 反应液中没食子酸积累的浓度最高。此时应终止反应,进行产物 GA 的分离回收,而固定化单宁酶则用于催化下一批次的反应。如以发酵法制备 GA 那么黑曲霉 13-13-37 生长 48h 时,发酵液中的 GA 浓度最大。以后随着时间的延长,GA 浓度明显降低(图 3)。

2.5 固定化单宁酶制备没食子酸

将包埋 8190 μ (即 45mL)单宁酶制成的固定化酶,加入 300mL 3% 五倍子单宁溶液中进行转化反

应,反应完成后,用大孔吸附剂 CGA-688 从反应液中提取 GA 产品,同一批固定化酶 3 次制备实验结果见表 5:

表 5 固定化单宁酶制备没食子酸的实验结果
Table 5 Experimental results of GA preparation by using immobilized tannase

Time No.	GA product/g	Percent of GA in product/%	Yield of GA/%
1	5.2	99.5	58
2	5.6	99.3	62
3	5.7	99.2	63

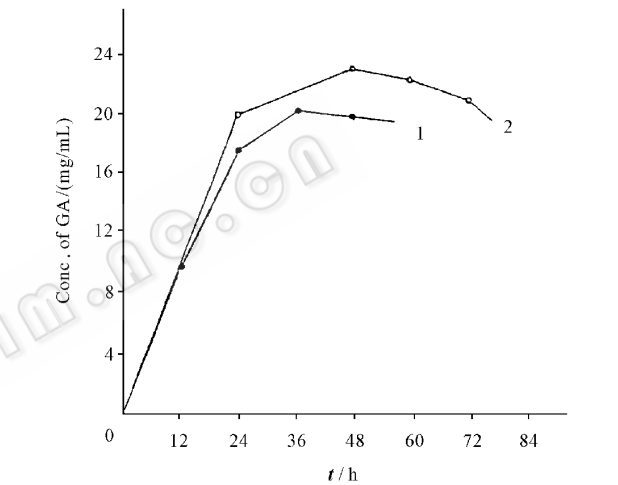


图 3 制备没食子酸的时程曲线
Fig.3 Time course of preparing GA
1. Immobilized tannase ; 2. *Aspergillus niger* fermentation

从表中数据可计算出,3 次实验没食子酸产品的平均产率约为 61%,说明固定化单宁酶经连续使用,转化能力并没有明显下降。以大孔吸附剂 CGA-688 吸附 GA(以前未见报道)进行产品的分离、制备,GA 产品的回收率可达到 90% 以上,表明该方法分离 GA 效果良好。在同样的条件下,用黑曲霉 13-13-37 发酵法制备 GA,产率约为 65%,比固定化酶法略高。但是由于固定化酶可多次重复使用,因此成本较低,而这对于工业化生产 GA 是有利的。

海藻酸钙来源丰富、无毒^[9],用以它作为载体制成的固定化单宁酶制备 GA,具有价格便宜,操作方便、使用时间较长以及转化能力较强的特点。经扩大实验和进一步完善后,该方法有望逐步取代目前的硫酸水解五倍子单宁生产 GA 的传统化学工艺,具有一定的工业应用价值。

参 考 文 献

- [1] 王正友,王爱荣.中国医药工业杂志,1994,25(12):559~563
- [2] 王蔚文,李务强.工业微生物,1990,20(4):1~5
- [3] Regerat F,Pourrat H,Pourrat A.J Am Leather Chem Assoc,1989,84(11):323~328
- [4] 陈九武,赵学慧,吴思方.工业微生物,1997,27(3):27~31
- [5] Morikavia Y,Karube I,Suzuki S.Biotechnol Bioeng,1980,22:1014~1016
- [6] 储瑞蔼,钱悦,李士云等.生物工程学报,1997,13(1):70~75
- [7] 郭鲁宏,杨顺楷,曾仲奎.四川大学学报(自然科学版),1999,36(3):578~582
- [8] 王建龙,施汉昌.工业微生物,1998,28(2):35~39
- [9] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册.北京:中国轻工业出版社,1994

Study on Gallic Acid Preparation by Using Immobilized Tannase from *Aspergillus niger*

GUO Lu-Hong YANG Shun-Kai

(Chengdu Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract Immobilized tannase which had higher ability of transforming tannin from Chinese gallotannin into GA was preped by embedding tannase with calcium alginate carrier. The immobilization conditions and some properties of the immobilized tannase were studied. The results showed that :The optimal immobilized parametres were 90mg sodium alginate, 546u(182u/mL) tannase and 1%~2% CaCl_2 . The optimum temperature and pH value of immobilized tannase were 45°C and 6.5, respectively. It was stable in the temperature range of 10~50°C and between pH5~7. Based on the optimum program, the laboratory gramme-grade preparation experiments of GA were done. The average yield of GA product in three preparations was upto 61%, and was about equivalent to the yield of acidic hydrolytic method which is used to produce GA industrially now. Thus, the research results possessed potential applied value.

Key words Immobilized tannase, *Aspergillus niger* enzymatic transformation, tannin from Chinese gallotannin, gallic acid

丙烯酰胺的微生物生产

丙烯酰胺(Acrylamide, $\text{CH}=\text{CHCONH}_2$)合成水溶性聚合物如聚丙烯酰胺,或其共聚物,很有实用价值,可用作土壤改良剂、絮凝剂、黏合剂、造纸工业的纸张增强剂以及用于涂料等等,作为一种吸附剂可用于核燃料生产,如吸附海水中所含的铀(U_3O_8)。因此,这种多用途的丙烯酰胺有着非常重要的价值。生产它无外乎采用化学合成与微生物催化或发酵这两条途径,而后者反映生物化工的发展方向,它与丙烯酰胺化学合成法比较有更大的优越性:微生物生产此类产品不论其品质或纯度都更高,且选择性好,转化率可达99%以上,微生物酶法的生产可节省投资50%,并降低成本,还由于微生物本身具有繁殖快的特点,又不受季节的限制。如果实施发酵工程与细胞(酶)固定化技术,或共固定化技术的有机结合,将会大大促进丙烯酰胺产业化发展,并展现出巨大潜力和优越性。

国外曾有报道,将某些微生物如绿藻、真菌、放线菌等固定于丙烯酰胺载体上,每克可吸附 $312\mu\text{g}$ 铀,吸附后用碳酸钠洗脱,可重复20次,这确实是一种较为理想的载体,而单宁酸树脂也可以作为一种有用的载体在微生物发酵工业得以应用。目前,对丙烯酰胺的开发颇为活跃。在日本,对丙烯酰胺的消费量每年达7万吨,主要用作水处理的絮凝剂。在韩国,丙烯酰胺被用作纸张增强剂和多层木板的黏合剂,需求量也在增长。

微生物发酵生产丙烯酰胺在我国也取得进展。我国80年代末开展这方面研究,获得过一种高活性的腐臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),其所产生的诱导酶如腈水合酶能有效地将丙烯腈(Acrylonitrile)转化成丙烯酰胺,也有选育生产高活性丙烯腈水合酶的菌株如诺卡氏菌(*Nocardia* sp. 163),对丙烯腈的转化效率非常高,达99%,且不生成副产物丙烯酸。还采用固定化酶技术生产丙烯酰胺的菌株,其产率为30%,而固定化细胞技术用于丙烯酰胺生产的稳定性尚需进一步研究。上海一家研究中心研究人员从泰山脚下土壤中分离到一种有效催化丙烯腈转为丙烯酰胺的菌株,通过中试生产后,已建成一套年产丙烯酰胺1500吨的试生产设备,生产所获的发酵产品优于化学合成法,目前在国内已建成4000吨级的工业化生产装置,并向万吨级工业装置攻关,这将为丙烯酰胺工业化生产创造有利条件。应该说,源于微生物的生物催化剂确有其巨大潜力,有专家称,自然界有99%的微生物资源尚未得到很好的研究和利用。因此,发掘这些微生物催化剂资源用于丙烯酰胺的生产是大有可为的,同时,提高其性能和生化操作性也是一个重要研究课题。