

# 海藻酸钠固定化中性蛋白酶的研究

张富新,张媛媛,党亚丽,于月英

(陕西师范大学 食品工程系,陕西 西安 710062)

**[摘要]** 探讨了中性蛋白酶在海藻酸钠中的固定化技术,并对影响固定化酶的固定化率和固定化酶活性的因素进行了研究。结果表明,固定化酶的质量受海藻酸钠浓度、固定化酶量、固定化时间以及  $\text{CaCl}_2$  浓度的影响,其最佳工艺条件为:海藻酸钠浓度 3.0%,固定化酶液量与海藻酸钠体积比 1:2,固定化时间 2.5 h,  $\text{CaCl}_2$  浓度 3.0%,由此制得的固定化酶的固定化率可达 97.5%,固定化酶活性为 3 600 U/g,其热稳定性、pH 值稳定性均极显著高于游离酶。

**[关键词]** 海藻酸钠;固定化;中性蛋白酶

**[中图分类号]** Q814.2; TQ925-.2

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2005)11-0089-05

酶的固定化是利用化学或物理手段将游离酶定位于限定的空间区域,并使其保持活性和可反复使用的一种技术<sup>[1]</sup>。固定化方法主要有吸附、包埋、共价键结合、肽键结合和交联法等,其中包埋法不需要化学修饰酶蛋白的氨基酸残基,反应条件温和,很少改变酶结构<sup>[2]</sup>,应用最为广泛。包埋法对大多数酶、粗酶制剂甚至完整的微生物细胞都适用,包埋材料主要有琼脂、琼脂糖、卡拉胶、明胶、海藻酸钠、聚丙烯酰胺、纤维素等,其中海藻酸钠具有无毒、安全、价格低廉、材料易得等特点,是食品酶工程中常用的包埋材料之一<sup>[3]</sup>。

中性蛋白酶是一种来源于枯草杆菌的胞外蛋白水解酶,它能迅速水解蛋白质生成肽类和部分游离氨基酸<sup>[4]</sup>。近年来,许多研究者致力于中性蛋白酶的固定化研究,但由于固定化条件不同,其固定化酶的稳定性较差,不能在实际生产中广泛应用<sup>[5]</sup>。因此,本试验对影响海藻酸钠固定化中性蛋白酶的主要因素进行了研究,确定了中性蛋白酶固定化的最佳条件,并对固定化酶的稳定性进行了研究,以为固定化中性蛋白酶的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中性蛋白酶,北京奥博星生物技术责任有限公司;海藻酸钠(Sodium Alginate),中国医药(集团)上海化学试剂公司;Casein(干酪素),生化试剂,Sig-

ma 公司;L-酪氨酸,生化试剂,上海生物化学制剂厂;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

UNICO™ 2000 分光光度计,HHW-21CU-600 电热恒温水浴槽,SHB-Ⅲ 循环水式多用真空泵,78HW-1 型恒温磁力搅拌器,TSHZ-台式水浴恒温振荡器,10 mL 注射器,8# 针头,PHS-3C 精密 pH 计,手提式压力蒸汽灭菌器,CS101<sub>2</sub> 型电热鼓风干燥箱,电子调温电热套等。

### 1.3 中性蛋白酶的固定化

**1.3.1 中性蛋白酶的固定化方法<sup>[6]</sup>** 称取一定量的中性蛋白酶粉,用 0.02 mol/L, pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液稀释 250 倍,制成中性蛋白酶溶液。取适量酶液加入到一定浓度的海藻酸钠溶液中,充分搅拌均匀。用灭菌后的注射器吸入上述混合液,以约 5 滴/s 注入  $\text{CaCl}_2$  溶液中制成凝胶珠,将形成的凝胶珠在 0~4 °C 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中放置一段时间使其进一步硬化。然后抽滤得到硬化的凝胶珠,用无菌生理盐水洗涤 3~5 次,以洗去表面的  $\text{CaCl}_2$  溶液,即得到直径为 1.5~2.0 mm 的球状固定化中性蛋白酶。

**1.3.2 酶活性的测定** 游离中性蛋白酶和固定化中性蛋白酶活性测定均采用福林酚法<sup>[7]</sup>。游离中性蛋白酶是用 0.02 mol/L, pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液溶解后测定,活性单位为 U/mL;固定化中性蛋白酶是分别测定固定化前酶的活性和固定化后上清液酶

**[收稿日期]** 2005-03-23

**[基金项目]** 陕西省自然科学基金项目(2003C134)

**[作者简介]** 张富新(1962—),男,陕西武功人,教授,博士,主要从事动物产品加工技术的研究。

的活性,然后计算固定化酶活性,单位为 U/g。

1.3.3 固定化率测定 分别测定固定化过程中加入游离酶的总活性以及固定化后上清液酶的总活性,计算固定化率<sup>[8]</sup>。

固定化率/%=(加入游离酶的总活性-上清液酶的总活性)/加入游离酶的总活性×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化条件的确定

2.1.1 海藻酸钠浓度对中性蛋白酶固定化效果的影响 海藻酸钠浓度不仅影响凝珠的机械强度,还影响底物及产物的扩散,进而影响到固定化酶的活性<sup>[9]</sup>。酶液量与海藻酸钠溶液用量的体积比为 1:

4,CaCl<sub>2</sub> 浓度为 2.0%时,不同海藻酸钠浓度的固定化效果见表 1。

由表 1 可知,随着海藻酸钠浓度的增加,溶液粘度逐渐增大,在相同挤压孔径下,挤压越来越难,当海藻酸钠浓度为 1.0%时,形成的凝胶强度较弱,有明显的拖尾现象,且凝珠脆弱,易破壁;当海藻酸钠浓度为 4.0%时,由于溶液粘度较高,固定化时不易成球。从固定化率和固定化酶活性看,随着海藻酸钠浓度的增加,酶的固定化率极显著提高( $P<0.01$ ),而固定化酶活性在海藻酸钠浓度为 2.0%时最高( $P<0.01$ ),这可能是由于海藻酸钠浓度为 2.0%时,凝珠的机械强度适宜,在酶促反应期间底物和产物易通过凝珠微孔,反应速度较快。

表 1 海藻酸钠浓度对中性蛋白酶固定化效果的影响

Table 1 Effect of sodium alginate concentration on the immobilization of proteinase

| 海藻酸钠浓度/%<br>Alginate sodium concentration | 凝珠强度<br>Intensity of gel balls | 成球难易程度<br>Condition of forming gel balls | 凝珠形状<br>Shape of gel balls | 固定化率/%<br>Rate of immobilized enzyme | 固定化酶活性/<br>(U·g <sup>-1</sup> )<br>Activity of immobilized enzyme |
|-------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1.0                                       | 较弱<br>Weaker                   | 较容易<br>Easier                            | 偏圆形<br>Near ball           | 91.97 a                              | 2 180 a                                                           |
| 2.0                                       | 适中<br>Median                   | 适中<br>Median                             | 圆形<br>Ball                 | 92.96 b                              | 2 468 c                                                           |
| 3.0                                       | 适中<br>Median                   | 较难<br>Difficulty                         | 圆形<br>Ball                 | 95.07 c                              | 2 305 b                                                           |
| 4.0                                       | —                              | 不成球<br>Very difficulty                   | —                          | —                                    | —                                                                 |

注:不同字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

Note:The different letter indicates very significant ( $P<0.01$ ).

2.1.2 固定化酶量对固定化效果的影响 固定化酶量直接关系到固定化酶的活性。酶液浓度越高,反应所需时间越短,反应速度越快<sup>[10]</sup>。用 2.0%海藻酸

钠,将固定化酶液量与海藻酸钠溶液用量体积比调整为 1:4,1:3,1:2,1:1 进行固定化后,测定固定化酶的固定化率和固定化酶活性,结果见图 1。

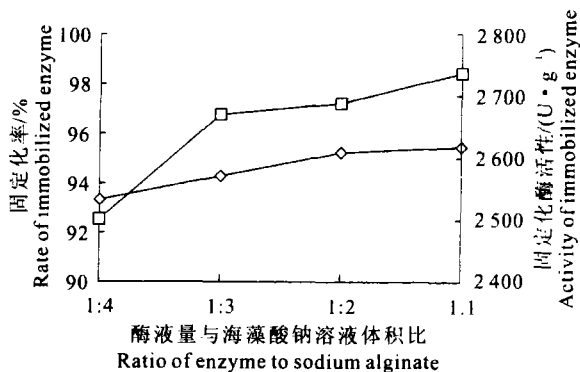


图 1 固定化酶量对固定化率和固定化酶活性的影响  
—□—, 固定化率; —○—, 固定化酶活性

Fig.1 Effect of different enzyme amounts on rate of immobilized enzyme and activity of immobilized enzyme

—□—, Rate of immobilized enzyme;  
—○—, Activity of immobilized enzyme

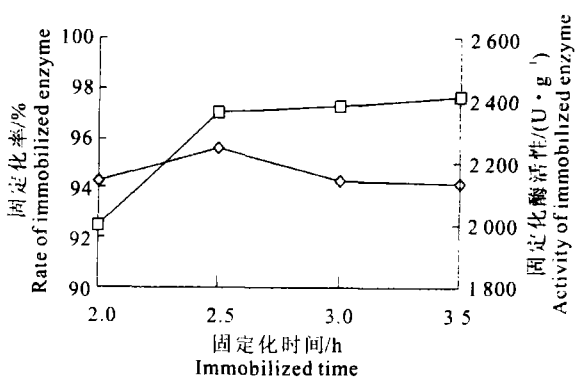


图 2 固定化时间对固定化率和固定化酶活性的影响  
—□—, 固定化率; —○—, 固定化酶活性

Fig.2 Effect of immobilized time on rate of immobilized enzyme and activity of immobilized enzyme

—□—, Rate of immobilized enzyme;  
—○—, Activity of immobilized enzyme

由图 1 可知,在其他条件不变时,随着酶液量的增加,固定化率逐渐升高,当酶液量与海藻酸钠溶液用量体积比大于 1:2 时,固定化率趋于稳定,且与 1:1 时差异不显著( $P>0.05$ )。从图 1 还可以看出,当酶液量与海藻酸钠溶液用量体积比从 1:4 增加到 1:3 时,固定化酶活性极显著提高( $P<0.01$ ),之后,固定化酶活性变化不大( $P>0.05$ ),但当体积比从 1:2 增加到 1:1 时,固定化酶活性又逐渐增加。

2.1.3 固定化时间对固定化效果的影响 固定化时间是海藻酸钠与固定化酶的混合液滴落到  $\text{CaCl}_2$  溶液后的反应时间。固定化时间对固定化率和固定化酶活性的影响见图 2。

由图 2 可知,固定化时间在 2.0~2.5 h 时,固定化率随固定化时间的延长逐渐上升( $P<0.05$ ),固定化时间从 2.5 h 增加到 3.0 h 时,固定化率又有所下降,但当固定化时间超过 3.0 h 时,固定化率趋于稳定( $P>0.05$ )。同时由图 2 还可以看出,固定化时间较短时,固定化酶活性较低,固定化时间在 2.0~2.5 h 时,固定化酶活性随固定化时间的延长迅速提高,当固定化时间大于 2.5 h 时,固定化酶活性趋于稳定。海藻酸钠与  $\text{CaCl}_2$  形成凝胶是  $\text{Ca}^{2+}$  通过海藻酸钠胶囊由外向内置换  $\text{Na}^+$  而形成海藻酸钙,置换过程需要时间。若固定化时间较长,交联程度高,高分子链结较致密,底物扩散阻力增加,固定化酶活性降低。同时,随着固定化时间延长,已固定化酶在海藻酸钠胶囊中会由内向外扩散,造成酶泄露,导致固定化率和固定化酶活性降低<sup>[11,12]</sup>。

2.1.4  $\text{CaCl}_2$  浓度对固定化效果的影响 中性蛋白酶  $\text{CaCl}_2$  与海藻酸钠反应形成海藻酸钙凝胶是包埋法固定化酶的一个重要过程,同时  $\text{CaCl}_2$  对形成凝胶的机械强度也有重要影响<sup>[12,13]</sup>。将  $\text{CaCl}_2$  浓度调整为 1.0%,2.0%,3.0% 进行固定化,测定固定化酶固定化率和固定化酶活性,结果见图 3。

图 3 结果表明,在其他条件不变时, $\text{CaCl}_2$  浓度从 1.0% 增加到 2.0% 时,固定化率极显著提高( $P<0.01$ ),之后趋于稳定;但当  $\text{CaCl}_2$  浓度大于 3.0% 时,固定化率又极显著下降( $P<0.01$ )。固定化酶活性也有类似的变化趋势,当  $\text{CaCl}_2$  浓度从 1.0% 增加到 3.0% 时,固定化酶活性极显著提高( $P<0.01$ );但当  $\text{CaCl}_2$  浓度大于 3.0% 时,固定化酶活性又极显著下降( $P<0.01$ )。

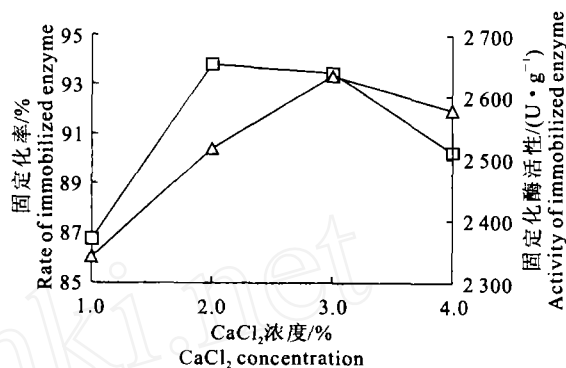


图 3  $\text{CaCl}_2$  浓度对固定化率和固定化酶活性的影响

—○—, 固定化率; —□—, 固定化酶活性

Fig. 3 Effect of  $\text{CaCl}_2$  concentration on rate of immobilized enzyme and activity of immobilized enzyme

—○—, Rate of immobilized enzyme;

—□—, Activity of immobilized enzyme

2.1.5 中性蛋白酶固定化工艺参数的确定 在前面单因素试验的基础上,为了考察不同因素之间的综合效应,用海藻酸钠浓度、固定化酶量、固定化时间和  $\text{CaCl}_2$  浓度 4 个因素的不同水平进行正交试验,结果见表 2。由表 2 可以看出,不同因素对中性蛋白酶固定化效果有明显的影响。极差分析结果表明,从固定化率看,固定化时间极差最大,为 9.31,其次为海藻酸钠浓度,酶液量与海藻酸钠体积比和  $\text{CaCl}_2$  浓度影响最小,说明在试验范围内固定化时间影响最大,其次是海藻酸钠浓度,酶液量与海藻酸钠体积比和  $\text{CaCl}_2$  浓度影响最小,其最佳组合为  $A_3B_2C_3D_3$ 。从固定化酶活性看,其最佳组合为  $A_3B_2C_1D_3$ ,即海藻酸钠浓度为 3.0%,酶液量与海藻酸钠体积比 1:2,固定化时间为 2.0 h,  $\text{CaCl}_2$  浓度 3.0%。综合考虑固定化率和固定化酶活性,其优化组合为  $A_3B_2C_2D_3$ ,即海藻酸钠浓度为 3.0%,酶液量与海藻酸钠体积比 1:2,固定化时间 2.5 h,  $\text{CaCl}_2$  浓度 3.0%,以此组合进行试验,其固定化率为 97.5%,固定化酶活性为 3 600 U/g。

## 2.2 固定化酶的稳定性

2.2.1 固定化酶的热稳定性 取一定量的游离酶和固定化酶,加入 pH 7.5 磷酸盐缓冲液,分别于 30,40,50 和 60 °C 保温 12 h,测定酶活性,结果见图 4。由图 4 可知,游离酶和固定化酶在 40 °C 时酶活性最高,温度高于 40 °C 时活性迅速下降,但固定化酶的活性均极显著高于游离酶( $P<0.01$ ),说明中性蛋白酶固定化后的热稳定性有所提高。这可能是由

于载体与酶之间形成的共价键稳定了酶分子的构象,从而使酶的临界变性温度提高<sup>[5,14]</sup>。

表 2 不同因素对中性蛋白酶固定化效果的影响

Table 2 Effects of different factors on the immobilization of proteinase

| 试验号<br>Test No                        | 海藻酸钠<br>浓度(A)/% | 酶液量/海藻<br>酸钠量(B)<br>Enzyme/<br>alginate<br>sodium | 固定化<br>时间(C)/h<br>Immobilized<br>time | CaCl <sub>2</sub><br>浓度(D)/%<br>CaCl <sub>2</sub><br>concentration | 固定化率/%<br>Rate of<br>immobilized<br>enzyme | 固定化酶活性<br>(U·g <sup>-1</sup> )<br>Activity of<br>immobilized<br>enzyme |
|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 1                                     | 1(1.0)          | 1(1:1)                                            | 1(2.0)                                | 1(1.0)                                                             | 79.13                                      | 3 703                                                                  |
| 2                                     | 1(1.0)          | 2(1:2)                                            | 2(2.5)                                | 2(2.0)                                                             | 89.89                                      | 2 760                                                                  |
| 3                                     | 1(1.0)          | 3(1:1)                                            | 3(3.0)                                | 3(3.0)                                                             | 95.80                                      | 1 926                                                                  |
| 4                                     | 2(2.0)          | 1(1:1)                                            | 2(2.5)                                | 3(3.0)                                                             | 93.08                                      | 1 750                                                                  |
| 5                                     | 2(2.0)          | 2(1:2)                                            | 3(3.0)                                | 1(1.0)                                                             | 97.38                                      | 1 330                                                                  |
| 6                                     | 2(2.0)          | 3(1:1)                                            | 1(2.0)                                | 2(2.0)                                                             | 88.53                                      | 3 215                                                                  |
| 7                                     | 3(3.0)          | 1(1:1)                                            | 3(3.0)                                | 2(2.0)                                                             | 96.31                                      | 3 097                                                                  |
| 8                                     | 3(3.0)          | 2(1:2)                                            | 1(2.0)                                | 3(3.0)                                                             | 93.92                                      | 3 836                                                                  |
| 9                                     | 3(3.0)          | 3(1:1)                                            | 2(2.5)                                | 1(1.0)                                                             | 93.93                                      | 1 330                                                                  |
| 固定化率 Rate of immobilized enzyme       |                 |                                                   |                                       |                                                                    |                                            |                                                                        |
| k <sub>1</sub>                        | 88.27           | 89.51                                             | 87.19                                 | 90.15                                                              |                                            |                                                                        |
| k <sub>2</sub>                        | 93.00           | 93.73                                             | 92.30                                 | 91.58                                                              |                                            |                                                                        |
| k <sub>3</sub>                        | 94.72           | 92.75                                             | 96.50                                 | 94.27                                                              |                                            |                                                                        |
| R                                     | 6.45            | 4.22                                              | 9.31                                  | 4.12                                                               |                                            |                                                                        |
| 固定化酶活性 Activity of immobilized enzyme |                 |                                                   |                                       |                                                                    |                                            |                                                                        |
| k <sub>1</sub>                        | 2 464           | 2 850                                             | 5 251                                 | 2 121                                                              |                                            |                                                                        |
| k <sub>2</sub>                        | 2 098           | 4 309                                             | 1 947                                 | 3 024                                                              |                                            |                                                                        |
| k <sub>3</sub>                        | 4 421           | 1 824                                             | 1 785                                 | 3 838                                                              |                                            |                                                                        |
| R'                                    | 2 323           | 2 485                                             | 3 466                                 | 1 717                                                              |                                            |                                                                        |

2.2.2 固定化酶的 pH 值稳定性 在游离酶和固定化酶中分别加入 pH 值 5.5,6.5,7.5,8.5 磷酸盐缓冲溶液,在 40 ℃ 下分别处理 12 h 后测定酶活性,结果见图 5。

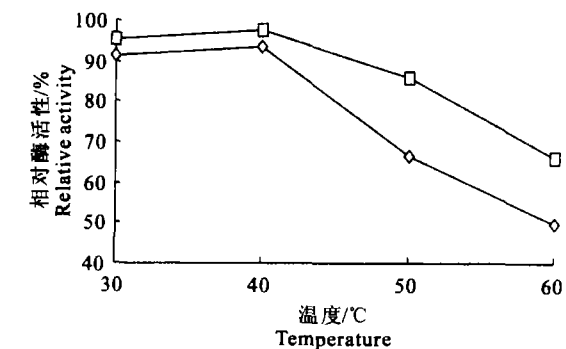


图 4 固定化酶热稳定性

— —, 游离酶; — —, 固定化酶

Fig. 4 Stabilities of immobilized enzyme to heat

— —, Free enzyme; — —, Immobilized enzyme

图 5 结果表明,游离酶在 pH 7.5 时活性最高, pH 大于 7.5 时活性下降;固定化酶在 pH 5.5~7.5,随着 pH 的提高,酶活性逐渐上升, pH 大于 7.5 时酶活性变化不大( $P>0.05$ )。但在相同 pH 下固定化酶活性均极显著高于游离酶( $P<0.01$ ),说明中性蛋白酶固定化后 pH 稳定性明显提高,这可能是由于酶固定化后所处的微环境发生了改变,活性中心受到载体的影响,活性基团的解离性发生变

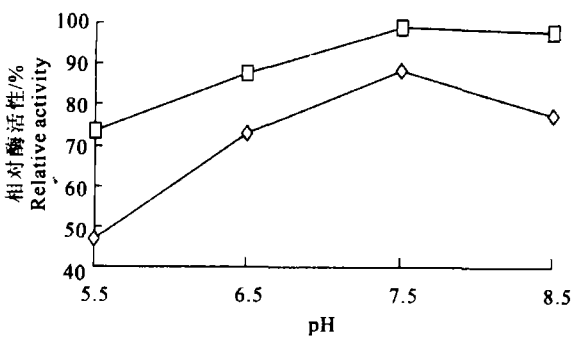


图 5 固定化酶的 pH 稳定性

— —, 游离酶; — —, 固定化酶

Fig. 5 Stabilities of immobilized enzyme to pH

— —, Free enzyme; — —, Immobilized enzyme

化<sup>[8,14]</sup>。

3 结 论

本研究结果表明,以海藻酸钠为载体,固定化中性蛋白酶的工艺是可行的。海藻酸钠与 Ca<sup>2+</sup>形成亲水的多孔性海藻酸钙凝胶,其体系较为稳定,且相容性良好,凝胶过程温和。固定化酶的质量受海藻酸钠浓度、固定化酶量、固定化时间以及 CaCl<sub>2</sub> 浓度的影

响,其最佳工艺条件为:海藻酸钠浓度 3.0%,固定化酶液量与海藻酸钠体积比 1:2,固定化时间 2.5 h,  $\text{CaCl}_2$  浓度 3.0%,由此制得的固定化酶的固定化率可达 97.5%,固定化酶活性为 3 600 U/g,且酶的热稳定性和 pH 值稳定性均极显著高于游离酶。

### [参考文献]

- [1] 王洪祚,刘世勇.酶和细胞的固定化[J].化学通报,1997,(2):22-27.
- [2] 刘秀伟,司芳,郭林,等.酶固定化研究进展[J].化工技术经济,2003,(4):12-16.
- [3] 郑婉玲,邹云珍,臧向莹.强化海藻酸钠凝胶制备固定化酶[J].工业微生物,1998,(3):15-18.
- [4] 江龙法,范莽,桑占池. AS1.398 中性蛋白酶在球形壳聚糖上的固定化研究[J].淮海工学院学报,2000,(2):47-49.
- [5] 唐祥进,肖俊方.固定化中性蛋白酶 AS1.398 特性研究[J].食品科学,1995,(6):6-9.
- [6] 王树宁,刘玺,潘润淑,等.乳酸菌固定化技术研究[J].山西食品工业,1998,(1):25-29.
- [7] 姜锡瑞.酶制剂应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,2002.
- [8] 丁丽俐,翁屹,张阳荣,等.氨基末端磁性载体固定化中性蛋白酶的研究[J].生物化学与生物物理进展,2001,(5):691-694.
- [9] 孔健,庄绪亮,马桂荣.固定化乳酸乳球菌连续生产 Nisin 的研究[J].微生物学报,2001,(6):731-734.
- [10] 王亚林,严建芳,吴灵英,等.产纤维素酶细胞固定化研究[J].武汉工业学院学报,1999,(4):1-3.
- [11] 王康,何志敏,范庆军.有机相中壳聚糖-海藻酸固定化脂酶的特性[J].化学工程,2001,(5):39-43.
- [12] 邱广亮,邱广明.磁性载体固定化中性蛋白酶的研究[J].山东生物医学工程,1994,(1):18-24.
- [13] 柳萍,王建龙.固定化乳杆菌细胞的离子交换吸附发酵生产乳酸[J].离子吸附与发酵,1994,(5):384-389.
- [14] 刘德富,董文彦.几丁质固定化无花果蛋白酶的研究[J].食品科学,1994,(11):3-6.

## A study of the neutral proteinase's immobilization in sodium alginate

ZHANG Fu-xin, ZHANG Yuan-yuan, DANG Ya-li, YU Yue-ying

(Department of Food Engineering, Shanxi Normal University, Shuanxi, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The technology of neutral proteinase's immobilization in sodium alginate was illustrated, and some factors affecting the gel's quality were investigated. The result showed that the quality of immobilized proteinase was affected by sodium alginate concentration, the amount of immobilized enzyme, immobilized time and  $\text{CaCl}_2$  concentration. The optimum conditions selected by orthogonal experiments were 3.0% sodium alginate, the ratio of enzyme solution to sodium alginate 1:2, 2.5 h immobilization and 3.0%  $\text{CaCl}_2$ . Finally the rate of immobilized enzyme and the activity of immobilized enzyme were as high as 97.5% and 3 600 U/g respectively, and its stabilities of the heat and of the pH value were higher than those of free enzyme.

**Key words:** sodium alginate; immobilization; neutral proteinase