

固定化Neutrase中性蛋白酶的研究

刘大川¹, 杨国燕², 万楚筠¹, 张 蕾¹, 熊雪婷¹

(1. 武汉工业学院, 湖北 武汉 430023)

2. 武汉肽类物质应用研究中心, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂固定化Neutrase中性蛋白酶。通过单因素实验, 分析了壳聚糖浓度、戊二醛浓度、交联时间对微球制备的影响及戊二醛加入量对酶固定的影响。由正交实验确定制备固定化酶的最佳工艺参数为: 壳聚糖浓度为3%、戊二醛与葡胺糖残基摩尔比为1:2、制备微球交联时间为1h, 微球与酶振荡吸附12h, 再加入2.5%戊二醛交联, 使戊二醛最终浓度达到0.9%, 制备得固定化中性蛋白酶活力为112.69U/g。固定化蛋白酶的热稳定性和对酸碱的稳定性均较游离中性蛋白酶有所提高。

关键词: 壳聚糖; 中性蛋白酶; 固定化

Studies on Immobilization of Neutrase

LIU Da-chuan¹, YANG Guo-yan², WAN Chu-yun¹, ZHANG Lei¹, XIONG Xue-ting¹

(1. Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

2. Wuhan Application Research Center for Peptide Substance, Wuhan 430023, China)

收稿日期: 2004-11-22

作者简介: 刘大川(1943-), 男, 教授, 主要从事油脂和植物蛋白的科研与教学工作。

红凤菜提取物浓度为750 μg/ml时, 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率即可达到73.04%, 是同等浓度维生素C清除作用的73.18%。

超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)是氧气在生物体内的电子传递和一些生物分子的还原作用下得到一个电子而生成的, 有着很强的活性, 可直接导致细胞内的DNA损伤, 还能转化为氧化性更强的羟基自由基, 从而引发含有大量不饱和脂肪酸的细胞膜的脂质过氧化, 形成链式反应, 破坏膜结构, 造成细胞损伤^[3, 4], 因此, 寻找抗氧化剂就与人们得健康密切相关。以上实验表明红凤菜的水提取物中富集了高浓度的活性物质, 对 $O_2^{\cdot-}$ 有较强的清除作用, 可以作为天然的抗氧化剂, 并且红凤菜在我国资源丰富, 价格便宜, 应极具有开发价值, 可以作为即食方便食品、调味品、保健食品等多种产品, 但有关于红凤菜的成分的报道还很少, 有文献曾报道红凤菜含有花青素^[9, 10], 需要我们做进一步的研究, 重点在于: 红凤菜提取物的成分, 抗氧化机理、化学结构与抗氧化性以及与其它抗氧化剂的协同作用等。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第七十

七卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977. 988-989.

[3] 赵晶, 白云. 自由基相关疾病研究进展[J]. 生物学教学, 2003, 28(4): 6-9.

[4] 崔剑, 李兆陇, 洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2000, 40(6): 9-12.

[5] 吴鹤群. 自由基生物学理论与运动性疲劳[J]. 三明师专学报, 2000, (1): 75-77.

[6] 徐淑云, 等. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 502-504.

[7] 马庆一, 张霞, 熊卫东, 等. 红薯梗中清除自由基活性成分的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 145-148.

[8] 曾小玲. 马齿苋水提取物对氧自由基清除作用的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(2): 133-135.

[9] Tsai Tsun-chung, Chen Chung-wen, Yang Cheng-hsien. Two major anticyanin in General bicolor [J]. Shipin Kexue (Taipei), 1995, 22 (2): 149-160.

[10] Yoshitama Kunihiro, Masahiko Kaneshige, Nariyuki Ishikura. A stable reddish purple anthocyanin in the leaf of Gynura aurantiacav. 'Purple Passion' [J]. Journal of Plant Research, 1994, 107: 209-214.

Abstract: Synthetic method of immobilized Neutrase enzyme prepared by reacting glutaraldehyde with chitosan was studied. The effects of chitosan concentration, addition of glutaraldehyde and crosslinking time on preparation of beads and on concentration of glutaraldehyde immobilization were analysed. Through perpendicular experiment, the optimized conditions of immobilization were determined as follows: chitosan concentration 3%, mol ratio of glutaraldehyde and glucosamine residue 1:2, crosslinking time 1h for preparation of chitosan beads, and adsorption time 12h. The final concentration of 2.5% glutaraldehyde was 0.9%. The activity of the immobilized Neutrase prepared under the optimal conditions was 112.69U/g. The thermostability and pH stability of immobilized enzyme were higher than those of soluble enzyme.

Key words: chitosan; neutrase; immobilized

中图分类号 Q55

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0081-05

用游离蛋白酶对大豆蛋白改性的优点已被人们广泛认识,但游离蛋白酶精制困难、保存期短、不能回收等缺点,使其在工业上的应用受到一定的限制。20世纪60年代出现了酶的固定化技术,该技术很好的解决了这个问题。酶的固定化技术就是指采用吸附交联法、偶联法,把酶固定于特定载体上的技术手段。酶固定化以后,既能保持酶的催化活性,又能克服游离酶的一些不足。它能提高酶分子结构的稳定性,延长酶的使用期和保管期;能与反应物分开,有效地控制生产过程;能与产物分开,可省去热处理使酶失活的步骤,简化生产工艺,使食品等产品更好地保持营养成分;能在生产中反复、连续使用,提高了酶的利用率。固相酶具有一定的机械强度,可以用搅拌器或装柱的形式作用于底物溶液,从而使酶反应得到革新。固定化酶的这些优点为其在各领域中的应用开辟了新途径。若能研制出经济性、可靠性良好的固定化蛋白酶,则将迅速推进大豆蛋白酶解技术的产业化、规模化。

壳聚糖类载体是近年来国内外研究最热门的固定化材料之一。壳聚糖,即(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖,是甲壳素的脱乙酰基产物。甲壳素彻底水解可获得葡萄糖。甲壳素在自然界中广泛存在于节肢动物、软体动物、环节动物、原生动物、腔肠动物、海藻及真菌等生物体中。壳聚糖作为甲壳素的重要衍生物,被广泛地运用于医药、纺织工业、造纸、印染、日用化工、食品、农业、环保等领域。壳聚糖来源丰富廉价,且具有良好的吸附性能和生物相容性,安全无毒。近年来,壳聚糖作为酶固定化载体的研究引起了不少学者的重视。张所信^[1]以中空球形壳聚糖为载体,用戊二醛交联来固定化红酵母用于L-苯丙氨酸的生产,转化率为82.3%。雷福厚^[2]利用壳聚糖上的-NH₂与Cu²⁺生成不饱和络合物,以高分子配位键法,对多酚氧化酶固定化,所得固定化多酚氧化酶的最佳pH值为6.24,在70℃放置25min后酶活力保留31.1%。李泰明^[3]对壳聚糖固定化AS1.398中性蛋白酶进行了研究,发现其固定化效果优于卡拉胶、海藻酸钠、琼脂等载体,固定化酶

的最适作用温度和最适作用pH分别为55℃和8.0,且稳定性有显著提高。

本文以壳聚糖为原料,透平油为分散介质,戊二醛溶液为交联剂,采用悬浮交联法制备表面积大、吸附性能较强、性能优良的壳聚糖微球,进行Neutrase中性蛋白酶的固定化研究。讨论了固定化工艺条件,并对固定化酶的性质进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白酶制剂: Neutrase 1.5mg 诺和诺德(Novo Nordisk)北京办事处 壳聚糖(脱乙酰度>90%) 上海海旗生物化学制品有限公司提供; 戊二醛溶液(50%) 新大地公司; 30#透平油 新疆克拉玛依炼油厂。

1.2 仪器

LD5-10型离心机; JB90-D型强力电动搅拌机; HH-S型恒温水浴锅; 奥立龙868型酸度计; SHA-C型水浴恒温振荡器 江苏恒丰仪器厂; SHZ-III型循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂; HITACHI S-450型的电子扫描电镜。

1.3 实验方法

1.3.1 壳聚糖微球的制备方法

参考李红、王炜军等^[4]方法,并稍加改进。称取一定量的壳聚糖并溶于体积分数为2%的醋酸溶液,制得一定质量分数的壳聚糖酸性溶胶。在锥形瓶中加入透平油,搅拌下缓慢注入一定质量分数的壳聚糖酸性溶胶,搅拌10min,使溶胶液滴均匀分散,然后滴入一定量体积分数为25%的戊二醛溶液,搅拌10min后,加入一定量1mol/L NaOH溶液,于60~70℃水浴保温1h,静置冷却后,弃去上层油层,再依次用石油醚,丙酮,无水乙醇抽洗,真空干燥后,过筛(80目),最后用蒸馏水冲洗,真空干燥,备用。

1.3.2 中性蛋白酶的溶液酶的制备及其活力测定^[5]

称取0.5g中性蛋白酶,溶于0.02mol/L的pH7.0的

磷酸缓冲溶液并定容至 50ml, 制得 10mg/ml 的中性蛋白酶溶液。再从中取 1ml 酶液用 pH7.0 的磷酸缓冲溶液定容至 100ml, 制得 0.1mg/ml 的中性蛋白酶溶液。

酶活力的测定方法用紫外分光光度法。取 1ml 0.1mg/ml 的中性蛋白酶溶液, 于 40℃ 水浴中恒温 2min, 加入同样 40℃ 恒温 2min 的 2% 的酪蛋白溶液 1ml (0.02mol/L pH7.0 的磷酸缓冲溶液配制), 40℃ 下准确反应 10min 后, 立即置于高温沸水中灭酶 10min, 再加入 2ml 三氯乙酸 (TCA) 终止反应。空白则先在高温沸水中灭酶 10min, 立即加入 2ml TCA 溶液终止反应, 再置于 40℃ 水浴中加入 1ml 2% 酪蛋白溶液反应 10min。静置 10min 后, 过滤, 滤液于 275nm 波长的紫外光下测定吸光值。

1.3.3 固定化中性蛋白酶的制备及其活力测定

称取 0.5g 壳聚糖微球置于锥形瓶中, 加入 5ml 10mg/ml 中性蛋白酶溶液, 置于摇瓶器中振荡吸附 12h, 然后滴入一定量体积分数为 2.5% 戊二醛溶液, 使戊二醛溶液的最终浓度 (体积分数) 达到 0.5%, 交联 3h 后, 用 0.02mol/L pH7.0 的磷酸缓冲溶液洗去多余的戊二醛溶液, 吸干水分, 取 0.15g 固定化酶测酶活, 除加入 1ml 激活剂外, 其活力测定均与溶液酶的相同。固定化酶活力以 U/g 表示。

2 结果与讨论

2.1 固定化中性蛋白酶的制备

2.1.1 壳聚糖浓度对固定化酶的影响

恒定其它条件, 制备微球时戊二醛与葡胺糖残基摩尔比为 1:3, 交联时间为 3h, 吸附时间为 12h, 固定化时戊二醛最终浓度为 0.5%, 用浓度为 2.5%~4.5% 的壳聚糖分别制备固定化酶。从图 1 可以看出: 用浓度为 3% 的壳聚糖制备的固定化酶的活力最高 (67.05U/g)。当壳聚糖浓度很小时, 过量的醋酸不能完全用丙酮等有机溶剂除去, 制得的小球呈胶状, 影响了酶的固定, 故酶活下降; 当壳聚糖的浓度过大时, 溶液粘度高, 操作不方便, 滴入透平油易结成大块, 不利于搅拌均匀。因而壳聚糖浓度在 3% 最合适。

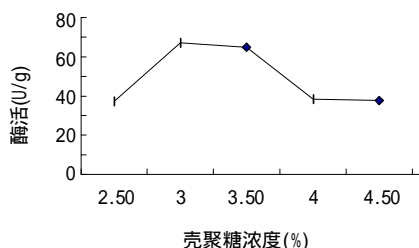


图1 壳聚糖浓度对酶固定化效果的影响

Fig.1 The effect of chitosan concentration on immobilized enzyme

2.1.2 戊二醛浓度加入量对酶固定化的影响

为了获得最佳的反应条件, 研究了戊二醛与葡胺糖残基的摩尔比对壳聚糖微球形成的影响。按照下式计算摩尔比:

$$\frac{0.9945 \times C \times V}{100} : \frac{W \times 9.09\%}{16} = 1 : a$$

0.9945——戊二醛的密度

C——戊二醛的体积百分数

V——戊二醛的取用体积

W——壳聚糖质量

9.09%——壳聚糖氨基含量

100——戊二醛的分子量

16——氨基的分子量

1:a——戊二醛与葡胺糖残基摩尔数之比

恒定其它条件, 制备微球时壳聚糖浓度为 3%, 交联时间为 3h, 吸附时间为 12h, 固定化时戊二醛最终浓度为 0.5%, 使戊二醛与葡胺糖残基摩尔比为 1:1~1:5, 分别制备固定化酶。从图 2 可以看出: 当比例为 1:2 时, 固定化酶的活力最高 (112.14U/g)。当戊二醛含量较小时, 小球交联不足; 当戊二醛含量较高时, 小球易结块, 比表面积减小, 不利于酶的吸附。所以本实验取戊二醛加入量与葡胺糖残基比为 1:2。

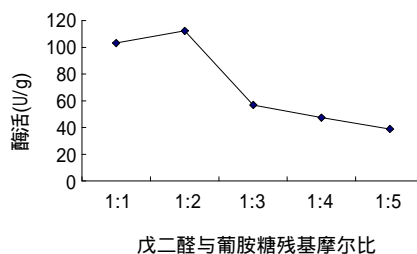


图2 戊二醛与葡胺糖残基摩尔比对酶固定化效果的影响

Fig.2 The effect of mol ratio of glutaraldehyde and glucosamine residue on immobilized enzyme

2.1.3 交联时间对酶的固定化效果的影响

恒定其它条件, 壳聚糖浓度为 3%, 戊二醛与葡胺糖残基摩尔比为 1:2, 吸附时间为 12h, 固定化时戊二醛最终浓度为 0.5%, 使交联时间依次为 0.5~4h, 分别制备固定化酶。由图 3 可见, 交联时间为 1h, 制备的固定化酶有最高的酶活。

2.1.4 2.5% 戊二醛终浓度对酶固定化效果的影响

恒定其它条件, 制备微球时壳聚糖浓度为 3%, 戊二醛与葡胺糖残基摩尔比为 1:2, 交联时间为 1h, 吸附时间为 12h, 固定化时使戊二醛最终浓度为 0.3%~1.1%, 分别制备固定化酶。由图 4 可见: 2.5% 戊二醛最终浓度为 0.9% 时, 固定化酶的活力最高 (220.86U/g)。当戊

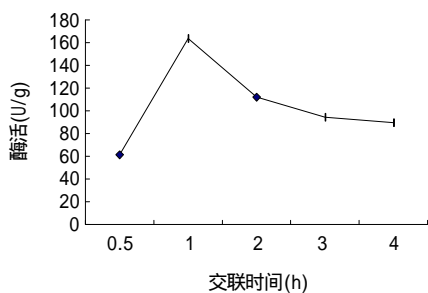


图3 微球制备交联时间对酶固定化效果的影响

Fig.3 The effect of crosslinking time on immobilized enzyme

二醛含量较小时, 酶与载体之间的交联不足, 被固定的酶数量少, 故酶活下降; 又由于它是酶的抑制剂, 当戊二醛含量较高时, 也使得酶活力降低。

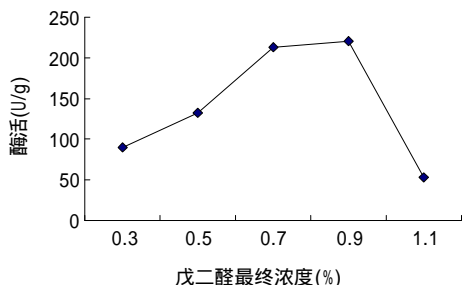


图4 戊二醛最终浓度对酶固定化效果的影响

Fig.4 The effect of the final concentration of glutaraldehyde on immobilized enzyme

2.1.5 壳聚糖固定化中性蛋白酶的正交实验

表1 正交实验结果
Table 1 Result of orthogonal experiments

序号	戊二醛与葡胺糖 残基摩尔比	壳聚糖浓度 (%)	时间 (h)	戊二醛终浓度 (%)	酶活 (U/g)
1	1:1	2.5%	2	0.9	106.48
2	1:1	3%	0.5	0.7	100.27
3	1:1	3.5%	1	1.1	104.83
4	1:2	2.5%	1	0.7	109.67
5	1:2	3%	2	1.1	110.23
6	1:2	3.5%	0.5	0.9	103.46
7	1:3	2.5%	0.5	1.1	97.78
8	1:3	3%	1	0.9	103.64
9	1:3	3.5%	2	0.7	98.57
K ₁	103.86	104.643	100.503	102.837	
K ₂	107.787	104.713	106.047	104.527	
K ₃	99.997	102.287	105.093	104.28	
R	7.79	2.426	5.544	1.69	

综合以上正交实验结果分析, 对固定化酶活力影响最大的是制备小球时戊二醛用量, 交联时间和壳聚糖浓度次之, 2.5% 戊二醛用量的影响最小。确定了中性蛋白酶固定化的优化条件为: 壳聚糖浓度为3%, 2.5% 戊二醛加入量与葡胺糖残基的摩尔比为1:2, 制备微球交联时间为1h, 微球与酶振荡吸附12h, 再加入2.5% 戊

表2 方差分析结果($\alpha=0.1$)

Table 2 Anova analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
1	11.447	2	2.289	9.000	
2	91.028	2	18.206	9.000	*
3	52.705	2	10.541	9.000	*
4	5.000	2	1.000	9.000	
误差	5.000				

二醛交联, 使戊二醛最终浓度达到0.9%。按此条件下制备得到的固定化酶活力为112.69U/g。

2.2 壳聚糖微球及固定化酶的性状

用HITACHI S-450型的电子扫描电镜观察优化工艺制备的壳聚糖微球及固定化酶的超微结构。电镜观察到: 壳聚糖微球表面有很深的褶皱(图5), 即有效地增大微球的比表面积, 为成为吸附蛋白酶的载体提供有利的条件。微球吸附了蛋白酶后, 表面趋于光滑(图6)。

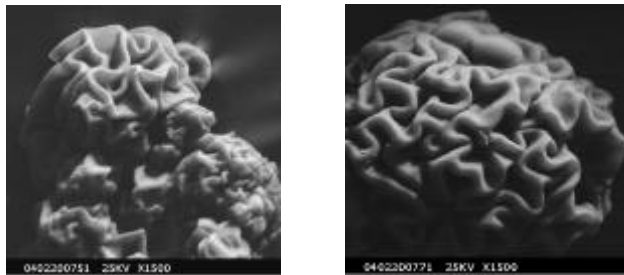


图5 壳聚糖微球的电镜照片

Fig.5 Electron microscope photo of chitosan microspheres

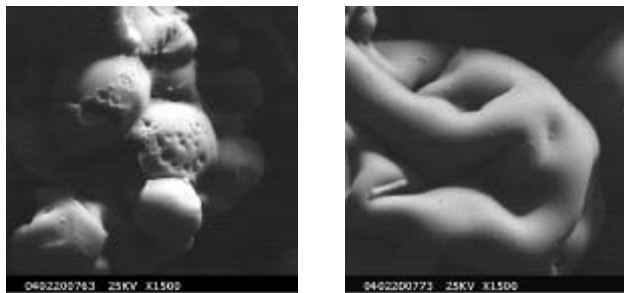


图6 固定化酶的电镜照片

Fig.6 Electron microscope photo of immobilized enzyme

2.3 固定化酶和游离酶性质比较

2.3.1 热稳定性

参考王海英等^[6]的方法, 分别将0.15g 固定化酶和1mL 溶液酶(0.1mg/ml, pH7.0)置于不同温度下(35、45、55、65、75、85℃)保温30min, 流水冷却测定酶活力, 由图7可知: 溶液酶在55℃以下, 固定化酶在65℃以下比较稳定, 温度高于此值则酶活力将显著下降。这说明所制备的固定化酶的热稳定性较游离酶有很大的提高。这是由于戊二醛的交联作用稳定了酶分子的构象,

因而使得固定化酶的临界变性温度升高;也有可能是由于载体为酶蛋白提供的微环境,更近似于酶的天然条件,能起保护作用。

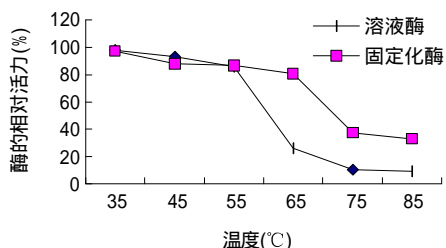


图7 固定化酶和溶液酶的热稳定性

Fig.7 The thermostability of immobilized enzyme and liquid enzyme

2.3.2 酸碱稳定性

参考王海英等^[6]的方法,分别取0.15g固定化酶和0.5ml溶液酶(10mg/ml)在不同的pH介质中于室温下静置1h后调pH至7.0测定酶活力。由图8可知:固定化酶和溶液酶分别在pH7.0和pH6.0以下稳定。这可能是由于固定化后酶的空间结构受载体的影响,pH对酶空间结构的影响变弱,使得固定化酶对pH改变不很敏感。

3 结论

本文确定了制备壳聚糖微球的中工艺条件为:壳聚糖浓度为3%,25%戊二醛加入量与葡胺糖残基的摩尔比为1:2,交联时间1h。酶固定时,微球与酶振荡吸附12h,再加入2.5%戊二醛交联,使戊二醛最终浓度达到0.9%,制备得固定化中性蛋白酶的酶活力为112.69U/g。本文还研究了壳聚糖微球固定化中性蛋白酶的

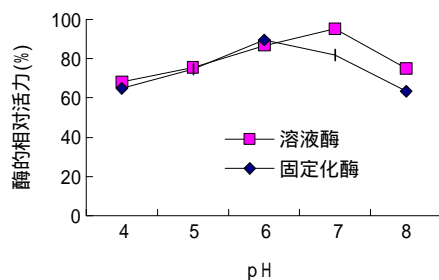


图8 固定化酶和溶液酶的酸碱稳定性

Fig.8 pH stability of immobilized enzyme and liquid enzyme

外观、形态和以壳聚糖微球为载体的固定化中性蛋白酶与中性蛋白酶的溶液酶在部分酶学性质上的差异,中性蛋白酶经固定化后热稳定性和酸碱稳定性均较游离中性蛋白酶有所提高。

参考文献:

- [1] 张所信,杨宁波.中空球形壳聚糖的制备及在固定化红酵母生产L-苯丙氨酸中的应用[J].淮海工学院学报,2000,9(2):39-41.
- [2] 雷福厚.壳聚糖铜固定化多酚氧化酶的研究[J].林产化学与工业,2000,20(2):23-26.
- [3] 李泰明,徐秀兰. AS1.398中性蛋白酶固定化条件的初步研究[J].药物生物技术,1998,5(4):214-218.
- [4] 李红,王炜军.壳聚糖微球的制备及其固定化木瓜蛋白酶的研究[J].华南农业大学学报,2000,21(2):49-53.
- [5] WEETALL H, MASON R. Studies on immobilized papain [J]. Biotechnol, 1973, 15(3): 455-460.
- [6] 王海英,林洪,叶眉,等.固定化木瓜蛋白酶的研究及其应用[J].青岛海洋大学学报,2001,31(5):689-694.

彩色印刷 欢迎订阅

中国食品质量报

政策法规宣传主媒体

“食品药品放心工程”指定宣传媒体

中国食品工业协会机关报

★是您经营管理的顾问

★是您扶优打假的先锋

★是您决胜市场的军师

★是您获得资讯的信使

★是您选购食品的向导

★是您养生保健的医生

每周两期,二、四出版,对开八版,彩色印刷,全年定价60元(另有三种周刊自办发行,直接向报社订阅)。

国内统一刊号 CN11-0177

邮发代号 1-222

国外代号 D4694

地址 北京市海淀区五棵松路91号

邮编 100039

电话 (010)51881546

经常阅读本报

饮食安全可靠