

枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的固定化研究

张宇军, 曹慧*, 徐斐, 袁敏, 叶泰, 于劲松

(上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 采用酰胺交联法将葡萄糖酸洗必泰修饰在载体上,并优化了修饰后的载体对中性蛋白酶的结合条件及催化活性的影响。结果表明,葡萄糖酸洗必泰对载体的修饰条件及修饰后的载体对中性蛋白酶的固定条件为:葡萄糖酸洗必泰的添加量为 0.095 mmol、树脂活化时间为 1 h、载体羧基与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)摩尔比为 1:3、中性蛋白酶的添加量为 600 U,酶活化时 EDC 的添加量为 13.7 mg。在此条件下,固定化中性蛋白酶的酶活性可达 398 U/g 树脂。经傅立叶红外分析,枯草芽孢杆菌中性蛋白酶成功的交联到修饰有亲和配基的亲树脂载体上。经过固定后,固定化酶的米氏常数 K_m 值为 2.9 mg/mL,游离酶的 K_m 值为 1.7 mg/mL,随意固定化酶的 K_m 值为 7.1 mg/mL。

关键词: 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶;葡萄糖酸洗必泰;固定化酶

中图分类号:TS 209 文章编号:1673-1689(2019)10-0098-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.014

Studies on Immobilization of Neutral Protease from *Bacillus Subtilis*

ZHANG Yujun, CAO Hui*, XU Fei, YUAN Min, YE Tai, YU Jinsong

(School of Medical Instruments and Food Engineering, University of Shanghai for Science & Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Chlorhexidine was modified on carrier by cross-linking protocol and the effects of modified carriers on neutral proteases were studied. The reaction conditions were optimized. The additive amount of Chlorhexidine was 0.095 mmol; the activate time of resins was 1 h; the molar ratio of carboxyl to EDC was 1:3; the addition of neutral protease was 600 U and the addition of EDC was 13.7 mg on the process of activating enzymes. The maximal neutral protease activity was 398 U/g resin. The neutral protease was cross-linked to the affinity carrier through the Fourier transform infrared detection. The K_m values of immobilized, free and randomized immobilized neutral protease were 2.9, 1.7 and 7.1 mg/mL, respectively.

Keywords: neutral protease, chlorhexidine, immobilized enzyme

收稿日期: 2017-03-13

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102207)。

作者简介: 张宇军(1992—),男,硕士,主要从事食品工程研究。E-mail:zyj20200@163.com

* 通信作者: 曹慧(1976—),女,博士,副教授,博士研究生导师,主要从事食品安全快速检测技术,功能性食品配料及添加剂研究。
E-mail:caohuan@126.com

引用本文: 张宇军,曹慧,徐斐,等. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的固定化研究[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(10):98-104.

枯草芽孢杆菌中性蛋白酶可裂解蛋白质中亮氨酸、苯丙氨酸及酪氨酸形成的肽键,是温和的蛋白质水解内切酶,具有催化效率高、专一性强及污染低等优点。枯草芽孢杆菌中性蛋白酶已经在食品和生物制品行业中得到广泛的应用。但传统的游离酶存在成本高、不稳定及难回收等缺陷,这些缺陷在很大程度上限制了枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的应用^[1-2]。由于固定化酶比传统的自由酶更有优势,所以固定化酶的固定化技术^[3-5]引起化学生物学、生物工程医学及生命科学等领域研究者的高度重视,经过近几十年的研究,不仅提升了特性而且拓展了应用领域^[6-10]。因而,很多研究将枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定于载体之上,制成固定化酶,从而有效解决游离酶成本高及不稳定等问题。固定化载体的开发也日新月异,逐渐在生产中发挥不可替代的作用^[11-14]。

本课题组在前期的研究中采用 CASTp 蛋白表面三维结构计算平台确定了枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的亲和配基结合区域,该区域由 SER-358, LEU-359, ASP-360, ASP-399, GLU-401, GLU-407 和 ASP-408 组成,且位于活性区域的背面。再通过 AutoDock Vina 和 AutoDock 4.2 分子对接软件从 Zinc 数据库中筛选出了对该结合区域有特异性结合能力的小分子配基^[15-17]。经过两轮筛选,发现葡萄糖酸洗必泰对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶有较大的亲和力,其结合能达到-12.96 kcal/mol。因此,在前期实验的基础上,采用酰胺交联法将葡萄糖酸洗必泰偶联到弱酸性阳离子交换树脂上,制成亲和载体,再进一步将枯草芽孢杆菌中性蛋白酶偶联到亲和载体上,制备出固定化酶,并对其酶学性质进行研究。与传统方法相比,由该方法制备的亲和载体对酶的亲和力更高,酶的活性区域也得以充分暴露,因而具有稳定性好、催化效率高及操作简单等优点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌中性蛋白酶,湖北盛天恒创生物科技责任有限公司;丙烯酸型 DIAION WK40 树脂,北京绿百草科技有限公司;干酪素,国药集团化学试剂有限公司;葡萄糖酸洗必泰,美国 Alfa-Aesar 公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸

盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),2-(N-吗啉)乙磺酸(MES),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

酶反应器,自制;PHS-3E 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;UV-6000 PC 型紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;KW-1000DB 水浴恒温振荡器,金坛市科析仪器有限公司;EYELA A-3S 水流抽气机,上海爱明仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 弱酸性阳离子交换树脂的预处理 将弱酸性阳离子交换树脂置于 70 ℃ 双蒸水中搅拌清洗 3 次;按照 1:1.5 的比例在树脂中加入一定体积 0.55 mol/L 的盐酸溶液,置于 30 ℃,150 r/min 的水浴中振荡 45 min,反应完毕后用蒸馏水将树脂冲洗至中性;再按照上述步骤,依次采用相同浓度的氢氧化钠和盐酸进行处理;将预处理过的弱酸性阳离子交换树脂置于双蒸水中备用。

1.3.2 弱酸性阳离子交换树脂交换通量的测定 称取三份弱酸性阳离子交换树脂,分别置于干燥的具塞三角烧瓶中,向每个三角烧瓶中加入 100 mL、0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液,摇匀,将瓶盖盖严,放至在 60 ℃ 水浴锅中反应 2 h,反应完毕后取出,冷却至室温。从具塞三角烧瓶中取出 25 mL 反应液(不得吸出树脂颗粒)置于三角烧瓶中,再加入 50 mL 双蒸水和 3 滴酚酞指示剂。用 0.1 mol/L 的盐酸标准滴定反应液至微紫红色,且保持 15 s 不褪色,即为终点,同时进行空白试验。计算弱酸性阳离子交换树脂的交换通量为

$$Q_i = \frac{4(V_2 - V_1)C_{HCL}}{M} \quad (1)$$

式中: Q_i 为弱酸性阳离子交换树脂的交换通量,mmol/g; V_1, V_2 分别为空白组和实验组消耗的盐酸标准溶液的体积,mL; C_{HCL} 为盐酸标准溶液的浓度,mol/L; M 为弱酸性阳离子交换树脂的质量,g。

1.3.3 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶活力测定

1) 游离枯草芽孢杆菌中性蛋白酶活力的测定 酪氨酸标准曲线的建立:称取预先于 105 ℃ 干燥至恒重的 L-酪氨酸 0.1 g,用 60 mL、0.1 mol/L 盐酸溶解后定容至 100 mL,即得 1 mg/mL 酪氨酸母液。取酪氨酸母液,配成不同浓度的标准溶液(10, 20, 30, 40, 50 μg/mL),并于波长 275 nm 处测定其吸光值。以吸光值为纵坐标,酪氨酸浓度为横坐标,绘

制出标准曲线。

枯草芽孢杆菌蛋白酶活力的测定: 将 10 mg 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶溶于 100 mL、0.02 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 7.5)中, 各取 2 mL 酶液和酪蛋白溶液, 混匀, 并在 30 °C 条件下反应 10 min, 加入 4.00 mL 三氯乙酸, 静止过滤, 取滤液于波长 275 nm 处测定其吸光值为

$$X=A \times K \times 4 / 10 \times n \times E \quad (2)$$

式中: X 为酶活力, U/g (U/mL); A 为吸光值; K 为吸光常数; 4 为反应总体积, mL; 10 为反应时间 10 min; n 为稀释倍数; E 为紫外法与福林法的换算系数, 取 0.5。

2) 固定化枯草芽孢杆菌中性蛋白酶活力的测定 取 0.05 g 左右的固定化枯草芽孢杆菌中性蛋白酶, 将其置于 2 mL 的磷酸缓冲溶液(0.02 mol/L, pH 7.5)中; 再向其中添加 2 mL 酪蛋白溶液, 在 30 °C 下反应 10 min, 加入 4.00 mL 三氯乙酸, 静止过滤, 取滤液于波长 275 nm 处测定其吸光值为

$$X=A \times K \times 4 / 10 \times E / M \quad (3)$$

式中: X 为酶活力, U/g 树脂; M 为固定化酶质量, g; 其他同上。

1.3.4 葡萄糖酸洗必泰在载体上的修饰及表征

1) 葡萄糖酸洗必泰在载体表面的修饰 将 6 g 预处理好的弱酸性阳离子交换树脂载体加入到 30 mL 含有 10.00 g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 4.00 g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)缓冲溶液中(0.1 mol/L, pH 6.0), 并在 25 °C 条件下搅拌活化 0.5 h。活化完毕后, 以蒸馏水清洗树脂, 直至上清液无紫外吸收, 再抽干活化载体中的残余水分; 在活化的载体中加入 6.5 mL、0.725 mmol/L 的葡萄糖酸洗必泰溶液, 并在 25 °C、140 r/min 的恒温振荡水浴中反应 12 h。反应完毕后, 采用蒸馏水洗去未交联的葡萄糖酸洗必泰, 直至上清液无紫外吸收, 即获得修饰有葡萄糖酸洗必泰的亲载体。

在上述实验条件下, 考察葡萄糖酸洗必泰添加量(0.095、0.181、0.362、0.725、1.45、2.9 mmol/L)、载体活化时间(0.25、0.5、1、2 h)及载体羧基与 EDC 摩尔比例(1:1、1:2、1:3、1:4)对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响。

2) 修饰有葡萄糖酸洗必泰的载体表征 葡萄

糖酸洗必泰修饰量的测定: 树脂活化反应完成后取上清液, 利用紫外分光光度法测定上清液中葡萄糖酸洗必泰的浓度, 并根据反应前后的浓度差计算葡萄糖酸洗必泰的修饰量。

傅立叶变换红外光谱: 取适量冷冻干燥后的空白树脂和修饰有葡萄糖酸洗必泰的亲载体, 分别与溴化钾一起置于玛瑙研钵中, 研磨成粉后装样压片。采用红外光谱仪在 500~4 000 cm^{-1} 区间内对样品进行扫描, 获得傅立叶红外光谱图。

1.3.5 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶在亲和载体上的固定及表征 配置 600 $\mu\text{g/mL}$ 的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶液, 添加到 15 mL 含有 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的交联溶液中, 混合均匀。将溶液置于 25 °C、110 r/min 的恒温振荡器中反应 1 h, 再加入 0.5 g 修饰葡萄糖酸洗必泰的亲载体, 继续振荡反应 12 h。采用蒸馏水分别洗去未交联的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶、EDC 和 NHS, 即得固定化枯草芽孢杆菌中性蛋白酶。

在上述实验条件下, 研究加酶量(75、150、300、600、900、1 200、1 500 U), EDC 添加量(3.4、6.8、13.7、27.4、54.8、137 mg)对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响。

傅立叶变换红外光谱: 取适量游离枯草芽孢杆菌中性蛋白酶和固定化枯草芽孢杆菌中性蛋白酶, 分别与溴化钾一起置于玛瑙研钵中, 研磨成粉后装样压片。采用红外光谱仪在 500~4 000 cm^{-1} 区间内对样品进行扫描, 获得傅立叶红外光谱。

1.3.6 固定化酶、游离酶及随意固定化酶米氏常数(K_m)的测定 配置浓度为 0.1%、0.125%、0.2%、0.3%、0.4%和 0.5%的酪蛋白底物溶液。分别测定固定化酶、游离酶和随意固定化酶在各底物浓度下的反应初速度。按照 Lineweaver-Burk 双倒数法作图原理, 测出这几种酶的 K_m 值。

随意固定化酶的制备工艺: 称取 0.5 g 预处理好的弱酸性阳离子交换树脂, 将其加入到 15 mL、400 $\mu\text{g/mL}$ 的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶液中, 在 25 °C、110 r/min 水浴振荡器中反应 12 h。反应完成后, 以蒸馏水洗去未吸附的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶, 即得随意固定化枯草芽孢杆菌中性蛋白酶。

2 结果与分析

2.1 弱酸性阳离子交换树脂的交换通量的确定

采用酸滴定方法对弱酸性阳离子交换树脂的交换通量进行了测定。结果表明,弱酸性阳离子交换树脂的交换通量为 2.9 mmol/g 树脂,即每克弱酸性阳离子交换树脂含有 2.9 mmol 的羧基。

2.2 葡萄糖酸洗必泰在载体上的修饰

2.2.1 葡萄糖酸洗必泰添加量对亲和载体修饰量及固定化酶活的影响 在载体羧基与 EDC 的摩尔比例为 1:3,载体活化时间为 0.5 h,加酶量为 900 U 的条件下,考察了葡萄糖酸洗必泰添加量(0.095、0.181、0.362、0.725、1.45、2.9 mmol/L)对其在载体上的修饰量及固定化酶活力的影响。结果见图 1。

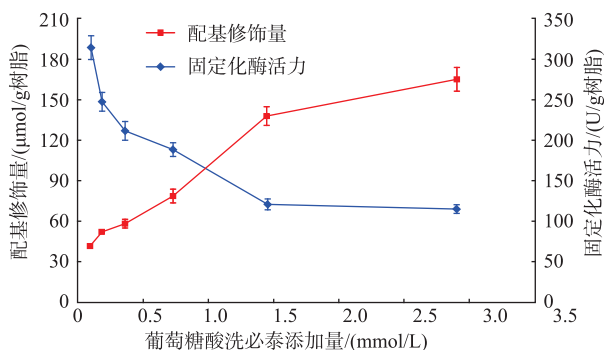


图 1 葡萄糖酸洗必泰添加量对载体配基修饰量及枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响

Fig. 1 Effects of Chlorhexidine concentration on ligands modify quantity of the carrier and the activity of oriented neutral protease

由图 1 可知,随着葡萄糖酸洗必泰添加量的增加,载体上葡萄糖酸洗必泰的修饰量也随之增加。当葡萄糖酸洗必泰的添加量达到 3 mmol/L 时,载体上配基修饰量达到最大,为 165 $\mu\text{g/g}$ 树脂。随着葡萄糖酸洗必泰添加量的增加,固定化酶酶活力呈减小的趋势,当葡萄糖酸洗必泰添加量为 0.095 mmol 时,即载体上修饰的配基量为 42 $\mu\text{mol/g}$ 时,固定化酶酶活力最大,达到 314 U/g 数脂。葡萄糖酸洗必泰的添加量与其固定的酶分子量并不成正比,这可能是由于随着葡萄糖酸洗必泰添加量的增加,载体上葡萄糖酸洗必泰的修饰量相应增大,过量修饰的配基反而形成空间位阻,使枯草芽孢杆菌中性蛋白酶不能充分与亲和载体交联,从而降低了酶活力。因此选取葡萄糖酸洗必泰的添加量为 0.095 mmol。

2.2.2 载体活化时间对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响 在葡萄糖酸洗必泰添加量 0.095 mmol/L,载体羧基与 EDC 摩尔比为 1:3,加酶量 900 U 的条件下。考察了载体活化时间(0.25、0.5、1、2 h)对其在载体上的修饰量及固定化酶活力的影响。结果如图 2 所示。

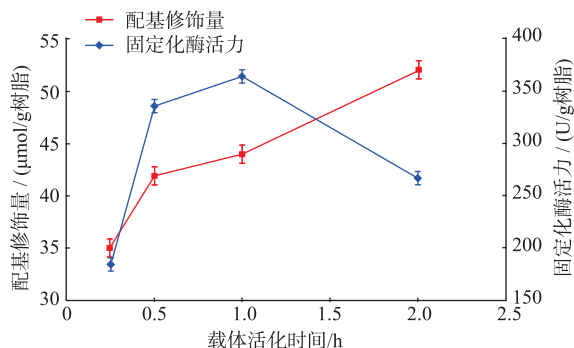


图 2 载体活化时间对载体配基修饰量及固定化效果的影响

Fig. 2 Effects of activation time on ligands modify quantity of the carrier and the activity of immobilized neutral protease

由图 2 可知,随着载体活化时间的增加,载体上葡萄糖酸洗必泰修饰量也随之增加;当载体活化时间为 2 h 时,葡萄糖酸洗必泰在载体上的修饰量达到最大,为 52 $\mu\text{g/g}$ 树脂。随着载体活化时间的增加,固定化酶活力呈先增加后减小的趋势。当载体活化时间为 1 h 时,固定化酶酶活力达到最大,为 364 U/g 树脂。载体的活化时间与其固定的酶分子量并不成正比。这是由于随着活化时间的增加,载体羧基活化生成的酯被水解,导致交联的酶分子量下降^[18]。因此选取树脂活化时间为 1 h。

2.2.3 载体羧基与 EDC 摩尔比对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响 在葡萄糖酸洗必泰添加量 0.095 mmol/L,载体树脂活化时间 1 h,加酶量 900 U 的条件下,考察载体羧基与 EDC 摩尔比(1:1, 1:2, 1:3, 1:4)对其在载体上的修饰量及固定化酶活力的影响。结果如图 3 所示。

由图 3 可见,随着 EDC 与载体羧基摩尔比例的增加,载体上葡萄糖酸洗必泰的修饰量也随之增加;随着 EDC 与载体羧基摩尔比例的进一步增加,葡萄糖酸洗必泰的修饰量呈平稳的趋势;当载体羧基与 EDC 摩尔比为 1:4 时,载体上修饰的配基量达到最大,为 46 $\mu\text{g/g}$ 树脂。随着载体羧基与 EDC 摩尔比例的增加,固定化酶活力呈先增加后减小的趋

势。在载体羧基与 EDC 摩尔比为 1:3 时固定化酶活力最大,达到 364 U/g 树脂。这是由于当 EDC 浓度较低时,活化的葡萄糖酸洗必泰较少,载体上固定化酶的量也较少;随着 EDC 浓度的增加,活化的葡萄糖酸洗必泰也随之增加,为中性蛋白酶的固定提供了较多的结合位点;随着 EDC 浓度的进一步增加,过量活化的葡萄糖酸洗必泰会使大量的酶结合在载体表面,酶分子之间相互挤压,导致酶的活性位点被覆盖,从而降低了固定化酶活力。因此选择载体羧基与 EDC 摩尔比为 1:3。

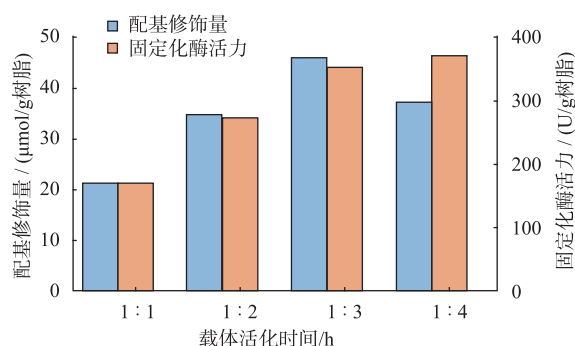


图3 载体羧基与 EDC 摩尔比对载体配基修饰量及枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响

Fig. 3 Effects of activation proportion on ligands modify quantity of the carrier and the activity of immobilized neutral protease

2.2.4 葡萄糖酸洗必泰修饰载体的傅立叶红外图谱 采用傅立叶红外波谱仪对葡萄糖酸洗必泰修饰的亲载体与空白树脂的结构进行了表征,结果如图 4 所示。

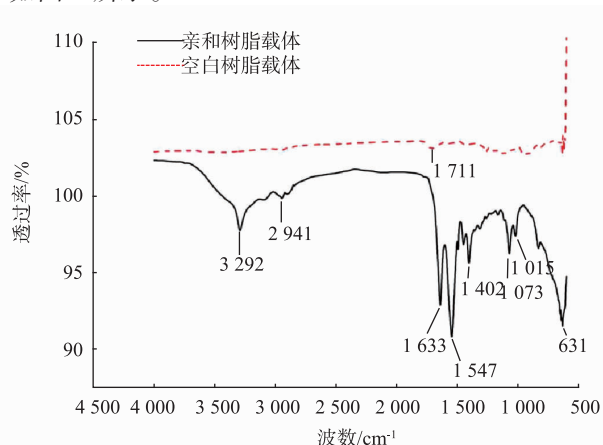


图4 亲和载体和空白载体的红外图谱

Fig. 4 Infrared spectrogram of affinity resin carrier and resin carrier

由图 4 可见,在空白载体红外图谱中的 1 711

cm^{-1} 处出现了羧酸 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动峰,当载体修饰上葡萄糖酸洗必泰后,其峰消失,说明载体中的羧基与葡萄糖酸洗必泰之间发生了酰胺化交联反应。此外,在亲和载体红外图谱中的 $1\,633\text{ cm}^{-1}$ 处出现了酰胺 II 带的 $\text{N}-\text{H}$ 变形振动峰, $3\,292\text{ cm}^{-1}$ 处出现了仲胺反对称伸缩振动峰,同时在亲和载体红外图谱中的 $2\,941\text{ cm}^{-1}$ 处出现了较强的 $-\text{CH}_2$ 振动峰,说明亲和树脂上引入了氨基和甲基,即葡萄糖酸洗必泰已修饰在载体上。

2.3 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶在亲和载体上的固定

2.3.1 加酶量对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响 在 EDC 添加量为 137 mg, NHS 添加量为 49.3 mg 的条件下,考察不同加酶量(75、150、300、600、900、1 200、1 500 U)对固定化酶活力的影响。结果如图 5 所示。可知,随着枯草芽孢杆菌中性蛋白酶添加量的增加,固定化酶的活力呈先增加后略微减小的趋势,这是由于当载体的载酶量达到一定程度后,再增加给酶量反而会增加固定化酶分子之间的拥挤程度,使之与底物结合时的空间位阻增大,造成固定化酶活力的降低。当枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的添加量为 600 U 时,固定化酶酶活力最大,达到 380 U/g 树脂,因此选择 600 U 作为最适的酶添加量。

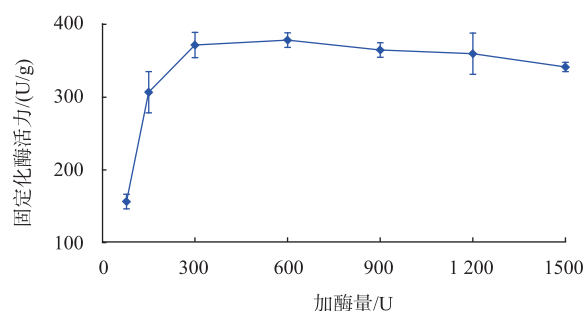


图5 酶添加量对固定化效果的影响

Fig. 5 Effects of enzyme concentration on the activity of immobilized neutral protease

2.3.2 EDC 添加量对枯草芽孢杆菌中性蛋白酶固定化效果的影响 在加酶量为 600 U (15 mL 400 $\mu\text{g/mL}$), NHS 添加量为 49.3 mg 的条件下,考察不同 EDC 添加量(3.4, 6.8, 13.7, 27.4, 54.8, 137 mg)对固定化酶活力的影响。结果如图 6 所示。

由图 6 可知,随着 EDC 添加量的增加,固定化酶酶活力呈先增加后略微减小的趋势。当 EDC 添加

量达到 13.7 mg 时,固定化酶的活力达到最大,为 398 U/g。这是由于当 EDC 添加量达到一定程度后,再增加 EDC 的量反而会抑制枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的活力,导致固定化酶活力降低。因此选取 EDC 添加量为 13.7 mg 为最佳水平。

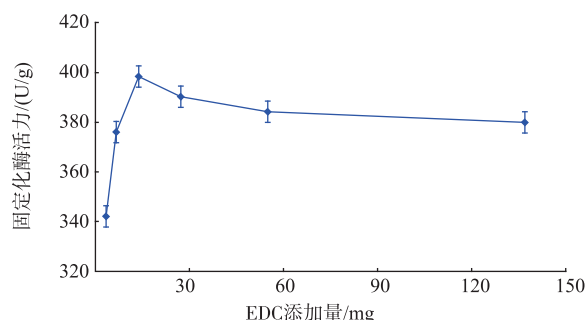


图 6 EDC 添加量对固定化效果的影响

Fig. 6 Effects of EDC concentration on the activity of immobilized neutral protease

2.4 枯草芽孢杆菌中心蛋白酶的傅立叶红外分析

通过傅立叶红外光谱仪测定固定化酶、游离酶及修饰配基的亲树脂载体的傅立叶红外图谱,结果如图 7 所示。

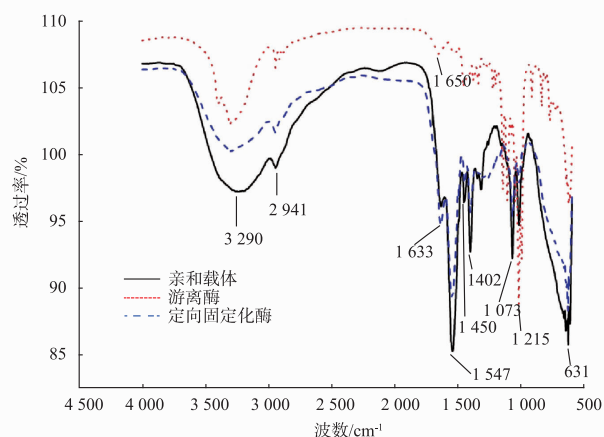


图 7 固定化酶、游离酶和亲和载体的傅立叶红外图谱

Fig. 7 Infrared spectrogram of oriented immobilized neutral protease, free neutral protease and affinity carrier

由图 7 可见,固定化酶、游离酶及亲和载体的红外图谱在 3 290 cm^{-1} 处都有 N-H 的伸缩振动吸收峰,说明三者都含有氨基。其中亲和载体 N-H 伸缩振动峰最强,表明亲和载体上具有最多的氨基,但随着亲和载体的氨基与枯草芽孢杆菌中性蛋白

酶的羧基之间酰胺化反应的进行,亲和载体上所含氨基减少。固定化酶及亲和载体的红外图谱在 1 633 cm^{-1} 处有酰胺 II 带(N-H 变形振动峰),且固定化酶在此处的振动频率更强,而游离酶红外图谱在此没有振动峰,说明酶分子与亲和载体之间发生酰胺化交联反应。固定化酶及亲和载体在红外图谱 1 547 cm^{-1} 处都有仲酰胺 II 带(N-H 的弯曲振动)峰,且振动频率不同,而游离酶无此振动峰,说明枯草芽孢杆菌中性蛋白酶与修饰小分子配基的亲载体发生反应^[19]。

2.5 固定化酶及游离酶的米氏常数

K_m 值是酶的特征常数,可以用来表示酶的专一性以及底物的亲和性,因而本研究根据米氏方程,采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测定了固定化酶、游离酶及随意固定化酶的米氏常数。结果表明,固定化酶、游离酶及随意固定化酶的 K_m 值分别为 2.9、1.7、7.1 mg/mL。根据文献,以传统方法制备的固定化酶的 K_m 值通常会增加 1.3~4.3 倍^[20-22]。在本研究中, K_m 值仅增加了 1.70 倍,表明该固定化方法对中性蛋白酶的构象和活性位点几乎没有影响,酶对底物蛋白具有较高的亲和力。而随意固定化酶的 K_m 值为 7.1,比游离酶高约 4.18 倍。随意固定化酶与底物亲和力的降低可能是由于酶构象发生了变化,活性位点形成的空间位阻对溶质分子的转运产生了阻力。

3 结 语

采用酰胺化偶联方法将葡萄糖酸洗必泰修饰到弱酸性阳离子载体上,再将枯草芽孢杆菌中性蛋白酶交联在亲和载体上以制备固定化酶。以固定化酶活力为指标,确定了固定化枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的最佳制备工艺:葡萄糖酸洗必泰添加量为 0.095 mmol/L,载体羧基:EDC(摩尔比)为 1:3,载体活化时间为 1 h,枯草芽孢杆菌中性蛋白酶添加量为 600 U,酶活化 EDC 添加量 13.7 mg。傅立叶红外光谱结果表明,枯草芽孢杆菌中性蛋白酶已经成功偶联到葡萄糖酸洗必泰修饰的亲和载体上。采用该法制备的固定化酶的 K_m 值为 2.9 mg/mL,表明其与底物具有较高的亲和力。

参考文献:

[1] SUN Xiaoming, WANG Ping, WU Xiangdong. Study on fermentation conditions of neutral protease from bacillus compatibility

- by response surface methodology [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2010 (2):117-124. (in Chinese)
- [2] HUANG Fan, CAI Jun. Optimization on the fermentation conditions of proteinase neutral produced by bacillus subtilis [J]. **Feed Industry**, 2012(2):49-51. (in Chinese)
- [3] LI Ye. Enzyme immobilization and its application[J]. **Journal of Molecular Catalysis**, 2008, 22(1):86-96. (in Chinese)
- [4] QIAO Deliang, HU Bing, ZENG Xiaoxiong. Immobilization of enzyme and its applications in food industry [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008(1):304-308. (in Chinese)
- [5] RU Chengye, ZHANG Juan, DU Guocheng, et al. Allergenicity investigation of hydrolyzed α s1-casein in bovine milk by immobilized protease[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(4):387-392. (in Chinese)
- [6] HUANG Lei, Cheng Zhenmin. Application of inorganic materials in enzyme immobilization [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2006, 25(11):1245-1250. (in Chinese)
- [7] YANG Yong, LI Yanfeng, BAI Yongxiao, et al. Progress in carrier materials employed in immobilization of enzymes [J]. **Chemistry Online**, 2007, 70(4):257-263. (in Chinese)
- [8] ZHANG Ping, HOU Hongping. Research progress in newly—developed enzyme immobilization techniques [J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2010(6):82-85. (in Chinese)
- [9] HU Y, TANG S, JIANG L, et al. Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15[J]. **Process Biochemistry**, 2012, 47(12):2291-2299.
- [10] YU W H, TONG D S, FANG M, et al. Immobilization of Candida rugosa lipase on MSU-H type mesoporous silica for selective esterification of conjugated linoleic acid isomers with ethanol [J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, 2015, 111:43-50.
- [11] SURINENAITE B, BENDIKENE V, IUODKA B. Immobilization of enzymes on carriers with magnetic properties; the search for optimum conditions for immobilization of alkaline phosphatase from the chicken gut [J]. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, 1995, 32(6):609-614.
- [12] GOMARA M, ERCILLA G, ALSINA M, et al. Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology[J]. **Journal of Immunological Methods**, 2000, 246(1):13-24.
- [13] WADU-MESTHRIGE K, AMRO N A, LIU G Y. Immobilization of proteins on self-assembled monolayers [J]. **Scanning**, 2000, 22(6):380-388.
- [14] MIYAZAKI M, KANENO J, UEHARA M, et al. Simple method for preparation of nanostructure on microchannel surface and its usage for enzyme-immobilization[J]. **Chemical Communications**, 2003, (5):648-649.
- [15] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: visual molecular dynamics [J]. **Journal of Molecular Graphics**, 1996, 14(1):33-38.
- [16] EWING T J, MAKINO S, SKILLMAN A G, et al. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases[J]. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 2001, 15(5):411-428.
- [17] TSAI C W, LIU C I, RUAANA R C. A novel strategy for oriented protein immobilization [J]. **International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering**, 2009, 3(5):262-266.
- [18] GILLES M A, HUDSON A Q, BORDERS C. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution [J]. **Analytical Biochemistry**, 1990, 184(2):244-248.
- [19] HUANG S H, LIAO M H, CHEN D H. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles [J]. **Biotechnology Progress**, 2003, 19(3):1095-1100.
- [20] LIU Ziqin, HUANG Huihua. Optimization of immobilization of lipase using response surface methodology and its performances in olive oil hydrolysis[J]. **Food Science**, 2012, 33(3):184-189. (in Chinese).
- [21] WANG Lirong, YONG Liangmin, LIU Shisheng. Enzymology properties of immobilized β -glucosidase enzymes from rubber seed [J]. **Food Science and Technology**, 2012, 33(3):184-189. (in Chinese)
- [22] ZHANG Weiyang, MA Ying, LI Lin, et al. Study on the properties of immobilized alcalase 2.4L alkaline protease [J]. **China Beet & Sugar**, 2015(1):13-16. (in Chinese)