

文章编号:1673-1689(2007)03-0046-05

壳聚糖微球固定化胰蛋白酶的研究

谭丽¹, 夏文水^{1,2}

(1. 江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 武汉工业学院 食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要:以壳聚糖为载体,将胰蛋白酶固定化,通过优化其制备条件提高活力回收。首先利用反相悬浮交联法制得壳聚糖微球并用于胰蛋白酶的固定,后采用中心复合设计及响应面分析法优化固定化条件,结果表明,戊二醛体积分数为16.2%,分散时间为98 min,给酶量1 mg/g载体时,固定化胰蛋白酶的活力和活力回收率可达到42.02 u/g和73.32%。

关键词:胰蛋白酶;壳聚糖;微球;固定化

中图分类号:Q 55

文献标识码: A

The Immobilization of Trypsin on Chitosan Microspheres

TAN Li¹, XIA Wen-shui^{1,2}

(1. The Key Lab of Food Science and Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214036, China; 2. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract:In this manuscript, Trypsin was immobilized on chitosan and the preparing conditions was optimized to achieve higher activity recovery. The chitosan microspheres were prepared by the inverse suspension crosslinking technique and applied to the immobilization of trypsin. Then, the central composite design and response surface analysis were adopted to determine the optimal levels. The optimum conditions were as follows:16.2% solution glutaraldehyde, dispersing for 98 minutes and 1mg of enzyme per g wet carrier and under which the activity and activity recovery of immobilize trypsin could reach 42.02 u/g and 73.32%.

Key words: trypsin; chitosan; microspheres; immobilization

胰蛋白酶(Trypsin, EC 3. 4. 21. 4)是一种蛋白水解酶(Protease),它具有蛋白水解酶的通性。在食品加工中,胰蛋白酶被广泛用于水解蛋白质。由于在蛋白水解液中要将胰蛋白酶分离去除,并希望提高催化效率,多次使用降低生产成本。因此,有必要将该酶制成固定化酶^[1]。目前已经将胰蛋白

酶固定化于多种载体上^[2,3],但由于载体材料和形态的限制,载体的负载酶量较少,回收率不高。

作者以壳聚糖(Chitosan)作为固定化胰蛋白酶的载体材料。作为一种天然高分子生物材料,壳聚糖是一种氨基多糖,具有良好的生物相容性和生物降解性,安全可靠,对人类无害并且对环境无污染。

收稿日期:2006-10-12.

基金项目:湖北省教育厅科研项目计划(D200518008).

作者简介:谭丽(1981-),女,黑龙江牡丹江人,食品科学与工程硕士研究生, Email:tanli0818@yahoo. com. cn

通讯作者:夏文水(1958-),男,江苏南京人,教授,工学博士,博导,主要从事食品科学与加工技术研究。

Email:xiassytu@yahoo. com

壳聚糖具有很好的成胶性质,易于形成膜、多孔微球、凝胶,可加工成粉、纳米粒子等多种形态,可作为一类性能优良的固定化酶载体。Krajewska^[4]在过去10年研究了壳聚糖在固定化酶方面的应用,以多种形态的壳聚糖作为载体,已经用于63种酶的固定化。选用壳聚糖制备成微球载体固定化胰蛋白酶,旨在提高固定化酶的负载酶量,易于酶与水解产物分离,提高固定化酶活及其回收率。

1 材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖:实验室自制,脱乙酰度91%;胰蛋白酶:杭州三叶生物化工厂产品;体积分数25%戊二醛水溶液:中国医药集团上海化学试剂公司产品;酪蛋白:中国医药集团上海化学试剂公司产品;酪氨酸:上海长江生化制药厂生产;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化活性载体的制备 称取一定量的壳聚糖溶于体积分数为4%的醋酸溶液,制得质量分数为4%的壳聚糖酸性溶胶。在烧杯中加入液体石蜡,并加入适量乳化剂span-80和致孔剂乙酸乙酯,在800 r/min转速下,缓慢加入壳聚糖凝胶,继续保持高速搅拌一定时间,使溶胶液滴均匀分散,然后缓慢加入一定量的戊二醛溶液,40℃水浴加热反应1 h。静置冷却后,将所得乳液倒入10%NaOH/无水乙醇(体积比为1:1)的混合液中,充分混合振荡。而后静置,弃去油层和水层,最后用去离子水反复洗涤抽滤至中性后,得到固形微粒,4℃冰箱存放。

1.2.2 固定化活性载体的性状测定 壳聚糖微球载体的外观及表面结构用麦克奥迪公司生物显微镜MoticB5放大100倍拍照观察。壳聚糖微球载体的悬挂醛基含量测定参照文献^[5]。

1.2.3 胰蛋白酶的固定化 称取一定量上述所制的活性载体,加入一定量的胰蛋白酶液,混合后4℃冰箱固化一定时间后,用pH值为8.0的磷酸缓冲液反复洗涤,4℃冰箱存放。

1.2.4 固定化胰蛋白酶活力的测定及评价指标 固定化胰蛋白酶活力的测定:基本同游离酶的测定^[6],取一定质量的固定化酶(保证最后吸光值在0.15~0.6之间),吸干水分,加入2 mL磷酸缓冲液(pH 8.0),与2 mL酪素底物在40℃回转式水浴恒温振荡器内反应10 min。其余步骤同游离酶。

酶活回收率% = 固定化酶总活力/加入的总酶

活×100

1.2.5 固定化酶条件优化 采用响应面分析方法,根据中心复合设计(Central Composite Design, CCD)原理^[7],设计了以戊二醛体积分数 X_1 、分散时间 X_2 、给酶量 X_3 为自变量,以固定化酶活 y_1 和活力回收 y_2 为响应值的三因素五水平实验。实验以随机次序进行,结果用SAS统计分析软件进行分析。

实验因素水平及其编码见表1,中心复合设计及其实验结果见表3。

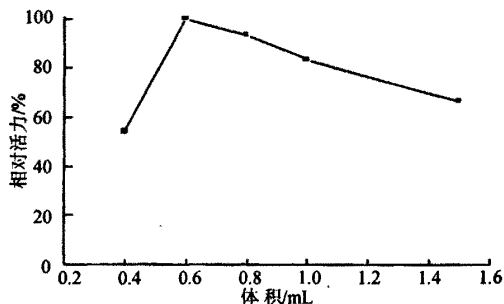


图1 戊二醛用量对固定化酶活的影响

fig. 1 Effect of glutaraldehyde amounts on immobilization

表1 中心复合设计实验因素水平表

Tab. 1 Level of variables chosen for CCD

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
戊二醛体积分数 X_1	6.6	10	15	20	23.4
分散时间/min X_2	39.5	60	90	120	140.5
给酶量/(mg/g)载体 X_3	0.66	1	1.5	2	2.34

2 结果与分析

2.1 固定化条件的研究

2.1.1 戊二醛用量对固定化酶活的影响 在实验中,戊二醛既是载体制备过程中的交联剂也是固定化反应中的交联剂。在悬浮聚合体系中,当戊二醛上的醛基与壳聚糖上的氨基摩尔比大于1/2时壳聚糖就可以聚合成球,戊二醛加入的越多越容易成球。因为醛基和氨基反应较快,并且受壳聚糖分子链的空间位阻和微球内扩散的限制,很多醛基不能及时和氨基交联,成球之后成为悬挂醛基。

测定戊二醛用量对固定化酶活的影响,结果见图1(以最大值为100%计,其它图同),固定化胰蛋白酶的活力先随着戊二醛用量的增加而上升,达到最大值后则随着戊二醛用量的增加而下降。这是因为开始随着戊二醛用量的增加,微球的悬挂醛基随之增多(悬挂醛基含量见表2),即提供交联酶的

醛基增加,而达到一定量后,剩余的戊二醛又成为了酶的变性剂,酶活又开始下降。

表2 悬挂醛基含量

Tab.2 The amounts of suspending aldehyde in chitosan microspheres

25%戊二醛用量/mL	悬挂醛基量/mmol/g
0.2	0.084
0.4	0.142
0.6	0.184
0.8	0.227
1.0	0.239

2.1.2 分散时间对固定化酶活的影响 分散时间主要是影响微球粒径的大小,图2和图3为分散60 min(a)和120 min(b)的显微镜照片($\times 100$),微球半径由 $51\ \mu\text{m}$ 减小到 $29\ \mu\text{m}$ 。

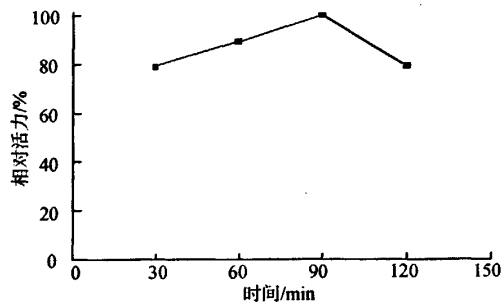


图2 壳聚糖微球a的显微照片($100\times$)

Fig.2 Micrograph of chitosan microspheres a ($100\times$)

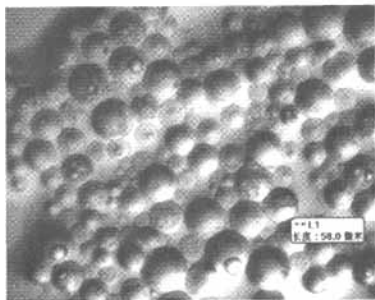


图3 壳聚糖微球b的显微照片($100\times$)

Fig.3 Micrograph of chitosan microspheres b ($100\times$)

由图4可知,在开始的一段时间内,随着分散时间的增加,酶活呈现上升的趋势,这是因为分散时间越长,粒径越小也就是增加了载体的表面积,提高了固定化率,而达到一定时间后,又开始下降。这是因为戊二醛加入量是一定的,粒径减小,壳聚糖表面氨基增加,作为载体之间的交联剂的醛基增加,使悬挂醛基减少即与酶交联反应的基团减少,固定化酶活随之下降。

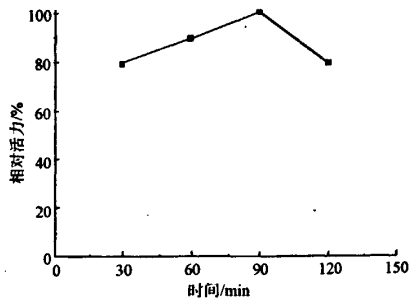


图4 分散时间对固定化酶活的影响

Fig.4 Effect of dispersing time on immobilization

2.1.3 固定化pH对固定化酶活的影响 pH值固定化过程中既影响酶的活力也影响反应的进行,对固定化酶活力的影响如图5所示。首先,活性载体与酶的反应属于 schiff 反应,此反应一般在弱酸性催化下进行。故随着 pH 值下降,酶活力上升,而 pH 值达到6以后又开始下降,这是因为游离的胰蛋白酶在 pH 值为6以下活性开始缓慢下降。

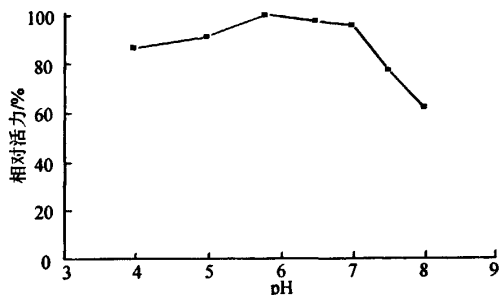


图5 pH对固定化酶活的影响

Fig.5 Effect of pH on immobilization

2.1.4 固定化时间对固定化酶活的影响 固定化时间对酶活的影响如图6所示。随着固定化时间的延长,固定化酶的活力逐渐增加,时间达1 h后又出现下降的趋势。这可能是因为反应1 h后反应已经达到了平衡,过长时间的操作会使酶逐渐失活,同时酶与载体的连接也趋向多点连接导致酶的不可逆失活。

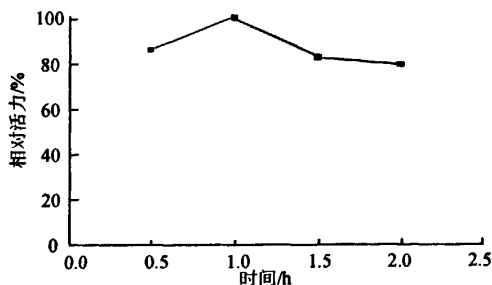


图6 固定化时间对固定化酶活的影响

Fig.6 Effect of immobilized time on immobilization

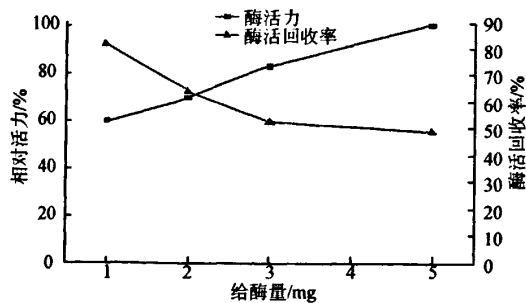


图 7 给酶量对固定化酶活的影响

Fig. 7 Effect of enzyme amounts on immobilization

2.1.5 给酶量对固定化酶活及回收率的影响 相同质量的载体加入不同量的酶液,固定化酶活力和酶活回收率如图 7 所示。随着给酶量的增加,酶活逐渐增加而酶活回收率逐渐下降,均衡两项指标选择加酶量 1.5 mg/g 载体左右。

2.2 固定化条件的优化

2.2.1 中心复合设计实验结果 中心复合设计及其实验结果见表 2。

表 3 中心复合设计及其实验结果

Tab. 3 CCD experimental design matrix with experimental values

实验号	X_1	X_2	X_3	固定化酶活(y_1)/(u/g)	酶活回收率(y_2)/%
1	-1	-1	-1	39.49	65.82
2	1	-1	-1	35.93	59.88
3	-1	1	-1	37.25	62.08
4	1	1	-1	41.36	68.93
5	-1	-1	1	49.79	41.49
6	1	-1	1	50.91	42.43
7	-1	1	1	47.52	39.60
8	1	1	1	55.63	46.36
9	-1.682	0	0	36.31	40.34
10	1.682	0	0	41.66	46.29
11	0	-1.682	0	45.06	50.07
12	0	1.682	0	41.44	46.04
13	0	0	-1.682	31.91	80.58
14	0	0	1.682	57.87	41.22
15	0	0	0	51.00	56.67
16	0	0	0	50.15	55.72
17	0	0	0	49.36	54.84
18	0	0	0	48.24	53.60
19	0	0	0	52.18	57.98
20	0	0	0	50.04	55.60

2.2.2 实验分析 根据实验数据,用 SAS RSREG

程序进行二次多项式回归,回归模型方程为:

$$y_1 = -7.274 + 2.555x_1 + 0.193x_2 + 22.933x_3 - 0.134x_1^2 - 0.002x_2^2 - 5.064x_3^2 + 0.012x_2 \times x_1 + 0.434x_3 \times x_1 - 0.006x_3 \times x_2$$
$$y_2 = 78.796 + 2.919x_1 + 0.231x_2 - 54.314x_3 - 0.152x_1^2 - 0.002x_2^2 + 9.752x_3^2 + 0.016x_2 \times x_1 + 0.340x_3 \times x_1 - 0.027x_3 \times x_2$$

式中 x_1 、 x_2 、 x_3 分别为戊二醛体积分数、分散时间、给酶量的真实值。

进一步对回归模型进行方差分析。两回归模型都极显著 ($p < 0.0001$),复相关系数分别为 0.9447 和 0.9720,表明模型与实际情况拟和很好。同时,方差分析表明,各因素对两方程的线性效应和曲面效应皆显著;且存在着一定的交互效应。从因子检验结果可以得出, X_1 、 X_3 对方程影响显著, X_2 在实验范围内对响应值的作用较弱。

根据回归方程,当 $x_3 = 1$ 时, y_1 和 y_2 的响应曲面图分别如图 8、9 所示:

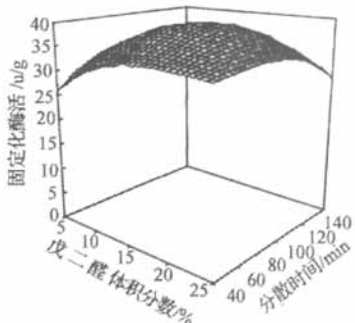


图 8 戊二醛体积分数和分散时间交互影响固定化酶活的响应面图

Fig. 8 Response surface plot of concentration of glutaraldehyde and dispersing time on enzyme activity

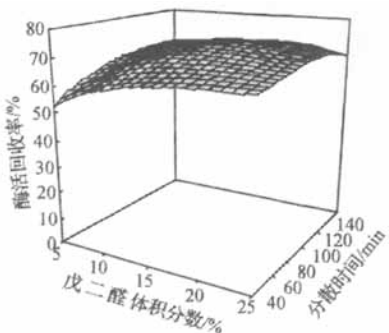


图 9 戊二醛体积分数和分散时间交互影响回收率的响应面图

Fig. 9 Response surface plot of concentration of glutaraldehyde and dispersing time on enzyme activity recovery

将由图8和图9得出的等值线图叠加得图10,由图中相交部分可知,当戊二醛体积分数为16.2%,分散时间98 min,给酶量1 mg/g载体时,固定化胰蛋白酶的活力和活力回收可达到42.02 u/g和73.32%。

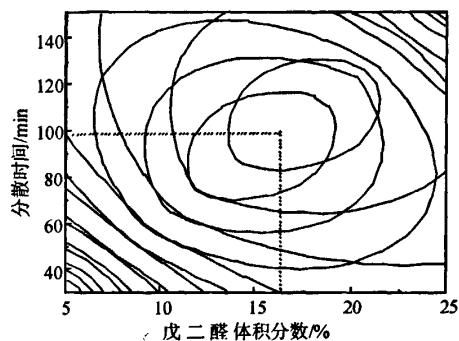


图10 戊二醛体积分数和分散时间交互影响固定化酶活和回收率的等值线图

Fig. 10 Contour plot of concentration of glutaraldehyde and dispersing time on enzyme activity and its recovery

3 结论

本文采用反相悬浮交联法,以液体石蜡为分散介质、戊二醛为交联剂制得活性壳聚糖微球载体,用于胰蛋白酶的固定化。在单因素实验基础上,采用响应面分析法优化固定化条件,得出最优固定化条件:戊二醛体积分数为16.2%,体系分散98 min,固定化pH为6,给酶量1 mg/g载体,于4℃固定化1 h,此时固定化胰蛋白酶的活力和活力回收率可达到42.02 u/g和73.32%。

参考文献(References):

- [1] Xi F N, Wu J M. Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead[J]. *Pro Biochem*, 2005, 40(8): 2833—2840.
- [2] Goradia D, Cooney J. The adsorption characteristics, activity and stability of trypsin onto mesoporous silicates[J]. *J Mol Cata*, 2005, 32(5-6): 231—239.
- [3] Kang K, Kan C Y, Yeung A, et al. The immobilization of trypsin on soap-free P(MMA-EA-AA) latex particles[J]. *Mat Sci Engi: C*, 2006, 26(4): 664—669.
- [4] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations; a review[J]. *Enzy Micro Tech*, 2004, 35(2-3): 126—139.
- [5] Juang R S. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization[J]. *Adv Env Res*, 2002, 6(2): 171—177.
- [6] 全国食品发酵标准化中心. QB/T 1803-1993 工业酶制剂通用试验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1993.
- [7] Ahmadi M. Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation[J]. *J Haz Mat*, 2005, 123(1-3): 187—195.

(责任编辑:杨萌)