京尼平交联制备枯草杆菌碱性蛋白酶聚集体

叶芊芊[1]，谌凯[1]，张玲[2]，肖凯军[1]，朱良[1]
（1. 华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）
（2. 广东石油化工学院食品科学与工程系，广东茂名 525000）

摘要：本研究利用新型交联剂京尼平制备了枯草杆菌碱性蛋白酶交联聚集体（BAP-CLEAs）。以酶活回收率为指标，确定了BAP-CLEAs制备的最佳条件为：交联剂质量浓度0.50%，交联温度35 ℃，交联时间12 h，此时BAP-CLEAs的酶活回收率为55.04%。采用扫描电镜及红外光谱对BAP-CLEAs进行表征，结果证明枯草杆菌碱性蛋白酶在京尼平的作用下成功交联。与游离酶相比，BAP-CLEAs的最适pH值向碱性方向偏移，由9.4变为10.3，在较宽的pH范围和温度范围内保持较高的酶活。另外，在2%浓度的酪蛋白底物中重复使用5次后，BAP-CLEAs还能保持86.42%的酶活性。以上催化特性的结果表明，枯草杆菌碱性蛋白酶在京尼平的作用下可成功交联形成酶聚集体，且该交联酶聚集体具有比游离酶更优越的pH稳定性、温度稳定性和重复使用稳定性，有良好的工业应用前景。

关键词：枯草杆菌碱性蛋白酶；无载体固定化；京尼平；交联酶聚集体
文章篇号：1673-9078(2020)08-95-101 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.1006

Preparation of *Bacillus subtilis* Alkaline Protease Aggregates by Crosslinking with Genepin

YE Qian-qian[1], CHEN Kai[1], ZHANG Ling[2], XIAO Kai-jun[1], ZHU Liang[1]
(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2.School of Food Science and Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China)

Abstract: In this study, Genipin as a novel crosslinking agent was used to prepare the crosslinked *Bacillus subtilis* alkaline protease aggregates (BAP-CLEAs). Using the recovery rate of enzyme activity as the main indicator, the optimal processing conditions for the preparation of BAP-CLEAs were determined: mass concentration of the crosslinking agent 0.50%, crosslinking temperature 35 ℃ and crosslinking time 12 h. The recovery rate of the enzyme activity of the BAP-CLEAs prepared under the optimum condition was 55.04%. The characterization results of the BAP-CLEAs by SEM and FTIR showed that *Bacillus subtilis* alkaline protease was successfully crosslinked with the aid of genipin. Compared with the free enzyme, the optimal pH of BAP-CLEAs shifted towards the alkaline direction (from 9.4 to 10.3), and a relatively high enzyme activity was maintained in wide pH and temperature ranges. In addition, BAP-CLEAs still had 86.42% of the initial enzyme activity after 5 repeated uses in a casein substrate at 2%. The above catalytic characteristics indicated that the *Bacillus subtilis* alkaline protease could be successfully crosslinked to form CLEAs with the aid of genipin. The BAP-CLEAs had superior pH stability, temperature stability and repeatability compared with the free enzyme, thus has a good industrial application prospect.

Key words: *Bacillus subtilis* alkaline protease; non-carrier immobilization; genipin; crosslinking enzyme aggregates
引文格式：
叶芊芊,谌凯,张玲,等.京尼平交联制备枯草杆菌碱性蛋白酶聚集体[J].现代食品科技,2020,36(8):95-101
YE Qian-qian, CHEN Kai, ZHANG Ling, et al. Preparation of *Bacillus subtilis* alkaline protease aggregates by crosslinking with genepin [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 95-101

收稿日期：2019-10-19
基金项目：广东省应用型科技研发专项资金项目（2015B020230001）；国家重点研发计划项目专项（2016YFC0400702-5）；广东省重点领域研发计划项目（2019B020222001）

作者简介：叶芊芊（1996-），女，硕士研究生，研究方向：食品加工与分离技术
通讯作者：肖凯军（1969-），男，博士，教授，研究方向：食品膜分离材料制备及其应用，纳米生物催化，食品加工保藏技术

碱性蛋白酶来源于细菌，酵母菌、真菌等微生物，具有催化水解蛋白质的氨基酸酰胺键、酯键，并具有转酯和转肽的能力，能将一些蛋白质水解成多肽或氨基酸，且具有较高的酶活力和广泛的 pH 稳定性[1]，是一种重要的生物催化剂[2]。

游离碱性蛋白酶存在不可回收、稳定性差等缺点，阻碍了其在工业上的应用，而对游离酶的固定化技术可以克服这些缺点。目前酶的固定化技术分为载体固定化技术和无载体固定化技术。载体固定化技术中所采用的固定化技术、载体、介质条件等会在一定程度上导致酶的催化性能或保留活性降低，其中载体所带来的分配效应、空间障碍效应和扩散限制效应是影响固定化酶催化效率的主要因素[3,4]。交联酶聚集体（Crosslinking Enzyme Aggregates，CLEAs）是一种无载体固定化酶技术，与传统固定化方法相比，其作为生物催化剂具有一些优势：制备过程简单[5]；不需要载体，成本低；有广泛的适用范围，例如合成氨苄青霉素[6]，对映选择性合成氯霉[7]，酯化合成[8]和丙烯酰胺的生产[9]等；具有宽泛的 pH 和温度稳定性，良好的重复使用性。CLEAs 技术广泛应用在食品、制药、化工等领域，如 *Cerrena* sp. HYB07 的漆酶 CLEAs 与游离漆酶相比，不仅可以回收利用，且对 RB 亮蓝和孔雀绿有较好的降解效果，2 h 内降解率达到 90%[10]。贺雪珊[11]等研究发现，绿豆环氧水解酶 CLEAs 可以保持较高活性，并且可以重复使用而没有明显的活力损失。基于碱性蛋白酶在食品行业的广泛需求，如生产小分子肽等，将碱性蛋白酶通过交联剂形成交联酶聚集体，能够使其更广泛的应用于食品工业生产中。

交联剂通常在制备固定化酶的过程中起重要作用[12]。常见的交联剂如戊二醛、甲醛等具有生物相容性差，细胞毒性大等缺点。在制备 CLEAs 的过程中，一般应用戊二醛为交联剂，但使用戊二醛为交联剂对酶活回收率的影响较大，区晓阳[13]等以戊二醛为交联剂制备碱性蛋白酶 CLEAs，最大酶活回收率仅为 22.6%。而京尼平是栀子苷经葡萄糖苷酶水解后的产物，是一种优良的天然生物交联剂，不但能够形成稳定的交联制品，且细胞实验表明其毒性低于戊二醛 10000 倍[14]。唐荣华[15]等采用磁性壳聚糖微球为载体，京尼平为交联剂，对脂肪酶进行固定化，在京尼平浓度为 0.6 g/L，交联温度为 55 ℃交联时间 8 h 时，固定化酶的比活力最大，为 4.31 U/g，效果优于使用戊二醛为交联剂的情况。在制备 CLEAs 的过程中，尚未见到有采用京尼平作为交联剂的相关文献，而京尼平分子能够自发与氨基反应，生成一种蓝色素[15]，适用于蛋白的交联，所以本研究选用京尼平作为交联剂。

本研究采用新型交联剂京尼平对枯草杆菌碱性蛋白酶（*Bacillus subtilis alkaline* protease，BAP）进行交联，制备高效的无载体固定化酶 BAP-CLEAs，并对制备过程中的影响因素进行系统研究；研究 BAP-CLEAs 水解催化酪蛋白的酶学性质，并与游离枯草杆菌碱性蛋白酶的催化性质进行比较，为进一步研究 CLEAs 开发和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶（BAP），购于诺维信（日本）有限公司；京尼平，购于之信生物科技有限公司；其他所有化学品纯度均为分析纯，并购买于天津市大茂化学试剂厂。

1.1.2 仪器

DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器，上海凌科实业发展有限公司；DHG-9030A 型电热鼓风干燥箱，上海一恒科技有限公司；VERTEX 70 型傅里叶变换红外光谱仪，德国 Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 交联碱性蛋白酶聚集体（BAP-CLEAs）的制备

取 1 mL 的酶液（40 mg/mL），加入一定量的饱和度为 90%的饱和硫酸铵溶液，将混合物在室温下用磁力搅拌器以 200 r/min 的速度搅拌沉淀 20 min，加入适量的交联剂京尼平，反应一段时间溶液变蓝，对其进行离心分离，用蒸馏水反复离心洗涤 3 次，得到 CLEAs，平行 3 次。将离心后的洗液和滤液合并在一起，测定上清液剩余的蛋白质含量，以计算碱性蛋白酶的结合量；收集离心所得的沉淀测定 BAP-CLEAs 的酶活性，计算 BAP-CLEAs 的酶活性回收率。

1.2.1.1 交联温度对 BAP-CLEAs 影响的研究

以 BAP-CLEAs 的酶活性回收率作为优化指标，探讨不同温度对 BAP-CLEAs 的影响。取 1 mL 40 mg/mL 的碱性蛋白酶于离心管中，并加入 5 mL 饱和度为 90%的饱和硫酸铵溶液，200 r/min 的条件下搅拌沉淀 10 min，加入一定量的交联剂京尼平，使其体系质量浓度为 0.25%，分别在 25 ℃、35 ℃、45 ℃、55 ℃、65 ℃的条件下搅拌反应 12 h。然后对其进行离心分离，利用蒸馏水反复洗涤干净，收集洗液和滤液测定蛋白质含量，同时收集 BAP-CLEAs 沉淀测定其酶活性。

1.2.1.2 交联时间对 BAP-CLEAs 影响的研究

以 BAP-CLEAs 的酶活性回收率作为优化指标，探讨不同交联时间对 BAP-CLEAs 的影响。取 1 mL 40 mg/mL 的碱性蛋白酶于离心管中，并加入 5 mL 饱和度为 90%的饱和硫酸铵溶液，200 r/min 的条件下搅拌沉淀 10 min，加入一定量的交联剂京尼平，使其体系质量浓度为 0.25%，在 35 ℃的条件下分别搅拌反应 6、10、12、16、20、24 h。然后对其进行离心分离，利用蒸馏水反复洗涤干净，收集洗液和滤液测定蛋白质含量，同时收集 BAP-CLEAs 沉淀测定其酶活性。

1.2.1.3 交联剂浓度对 BAP-CLEAs 影响的研究

以 BAP-CLEAs 的酶活性回收率作为优化指标，探讨不同交联剂浓度对 BAP-CLEAs 的影响。取 1 mL 40 mg/mL 的碱性蛋白酶于离心管中，并加入 5 mL 饱和度为 90%的饱和硫酸铵溶液，200 r/min 的条件下搅拌沉淀 10 min，加入一定量的交联剂京尼平，使其体系质量浓度分别为 0.1%、0.25%、0.50%、0.75%、1%，在 35 ℃的条件下搅拌反应 12 h。然后对其进行离心分离，利用蒸馏水反复洗涤干净，收集洗液和滤液测定蛋白质含量，同时收集 BAP-CLEAs 沉淀测定其酶活性。

1.2.2 蛋白质浓度和酶活性的测定

蛋白质浓度根据 Bradford[16]法进行测定，使用牛血清白蛋白作为标准品。以酪蛋白为底物，测定游离酶和 BAP-CLEAs 的酶活性，用紫外分光光度计测定 660 nm 下酪氨酸的释放量，在 40 ℃下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸，定义为 1 个蛋白酶活力单位[17]，酶活回收率和相对酶活力计算方法分别见式（1）和式（2）。

$$\text{酶活性回收率}/\%=\frac{\text{固定化酶活力}}{\text{加入酶的总活力-剩余酶活力}}\times 100\% \quad (1)$$

$$\text{相对酶活力}/\%=\frac{\text{某一条件下的酶活力}}{\text{该系列条件下的酶活力}}\times 100\% \quad (2)$$

1.2.3 多肽含量的测定[18]

以 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽为标准品制作标准曲线，用 10%(*m*/*V*)的三氯乙酸沉淀蛋白水解液中的大分子蛋白质，经离心过滤后，在上清液中加入双缩脲试剂，于 540 nm 下测定其 OD 值，继而在 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线上查出样品中的多肽含量。

1.2.4 BAP-CLEAs 的结构表征

SEM 观测：以水为分散剂，制备一定浓度的 BAP-CLEAs 溶液，分别将其滴在铝箔制样台上面，自然条件下干燥，进行喷金处理，然后进行 SEM 观察形貌。

FTIR 测定：按照与 KBr 为 1:100 的比例分别将 BAP 与 BAP-CLEAs 进行压片处理，空白对照为 KBr，设置分辨率为 4 cm^{-1}，测定波长为 400~4000 cm^{-1}，扫描次数为 32 次，进行 FTIR 扫描。

1.2.5 游离酶与 BAP-CLEAs 的酶学特性研究

以酪蛋白为模型底物，经碱性蛋白酶水解成为酪氨酸。研究游离酶和 BAP-CLEAs 的酶学特性，包括酶的最适 pH，最适温度和重复使用稳定性。

1.2.5.1 最适 pH

取游离酶和上述最佳条件制备的 BAP-CLEAs 置于 pH 分别为 5.5、6.5、7.5、8.5、9.4、10.3、11.0 的缓冲溶液体系（pH 5.5，6.5~7.5，8.5，9.4~10.3，11.0 分别为 20 mmol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸，磷酸氢二钠-磷酸二氢钠，Tris-盐酸，碳酸钠-碳酸氢钠、碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲溶液）中，底物溶液 pH 值也对于为相应的反应 pH 值，不改变酶活力测定的其他条件，对游离酶与 BAP-CLEAs 的酶活力进行测定。

1.2.5.2 最适温度

取游离酶和制备的 BAP-CLEAs，分别在 25 ℃、35 ℃、45 ℃、55 ℃、65 ℃、75 ℃、85 ℃下，不改变酶活力测定的其他条件，对游离酶与 BAP-CLEAs 的酶活力进行测定。

1.2.5.3 BAP-CLEAs 的重复使用稳定性

测试 BAP-CLEAs 的重复使用性能。酶解条件设置为：pH 9.5，温度 35 ℃时间 1.5 h，底物浓度 2%，酶添加量 0.9 mg/mL。酶解结束后立即进行 9000 r/min，10 min 离心，取上清液进行多肽含量测定来评价酶解效率。BAP-CLEAs 沉淀重复酶解步骤，共循环反应 5 次。

1.2.6 数据处理

每组实验重复测定 3 次，结果表示为平均值±标准偏差 SD。采用 SPSS 19.0 及 Origin 8.5 软件对实验数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 BAP-CLEAs 的制备优化

2.1.1 交联温度对 BAP-CLEAs 的影响

图 1 为不同交联温度对 BAP-CLEAs 的酶活回收率的影响。从图中可以看出，在 25 ℃~35 ℃的范围内，BAP-CLEAs 的酶活回收率逐渐上升，超过 35 ℃后，BAP-CLEAs 的酶活回收率逐渐降低。在 25 ℃时的条件下，BAP-CLEAs 交联程度较低。超过 45 ℃后，在温度较高的条件下交联反应速度加快，形成的 BAP-CLEAs 聚集体过大，空间传质受阻，底物不能充分与活性位点接触，从而造成酶活回收率迅速降低。

因此，将制备碱性蛋白酶 BAP-CLEAs 的最佳交联温度确定为 35 ℃。

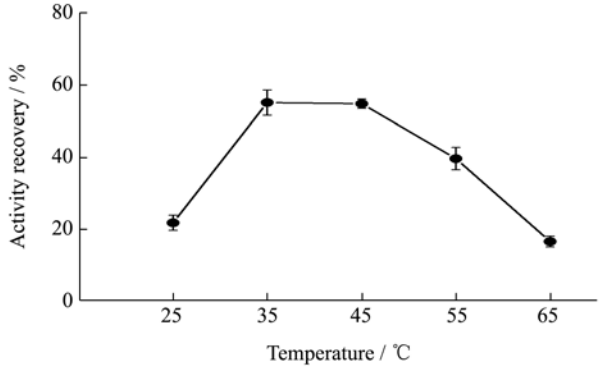


图 1 不同交联温度对 BAP-CLEAs 酶活回收率的影响

Fig.1 Effect of different temperature on enzyme activity recovery

2.1.2 交联时间对 BAP-CLEAs 的影响

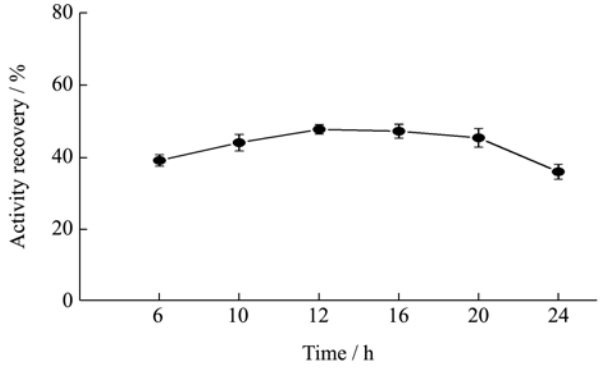


图 2 不同交联时间对 BAP-CLEAs 酶活回收率的影响

Fig.2 Effect of different cross-linking time on enzyme activity recovery

图 2 为不同交联时间对 BAP-CLEAs 的酶活回收率的影响。从图中可以看出，在 4~12 h 的范围中，随着时间的增加，BAP-CLEAs 的酶活回收率不断上升，这是因为随着时间的增加，通过京尼平交联起来的酶聚集体越来越多，操作稳定性增强，从而造成酶活回收率的上升。交联时间超过 12 h 后，虽然总体的酶结合率上升，但酶活回收率却逐渐下降，这是因为过多的酶聚集在一起，造成 BAP-CLEAs 的空间位阻大，许多活性位点被包埋在交联聚集体内部，底物不能充分与活性位点接触，从而造成酶活回收率逐渐降低。因此，碱性蛋白酶 BAP-CLEAs 制备的最佳交联时间为 12 h。这一结果与孙立梅[19]等的研究结果相似。

2.1.3 交联剂浓度对 BAP-CLEAs 的影响

图 3 为不同交联剂浓度对 BAP-CLEAs 酶活回收率的影响。从图中可以看出，在较低的京尼平浓度下，酶活回收率较低，这是因为在这时低浓度的京尼平对酶聚集体交联不完全或不牢固，易发生酶泄露，不溶性聚集体较少；随着京尼平浓度逐渐增加到 0.50%时，BAP-CLEAs 的酶活回收率不断升高；但京尼平浓度进一步升高超过 0.50%后，酶活回收率开始降低，这可能是因为高浓度的京尼平会导致酶分子的硬化，从而使酶的柔韧性丧失[10]，且使用过量的京尼平会造成资源浪费。因此，碱性蛋白酶 BAP-CLEAs 制备的最佳交联剂浓度为 0.50%。

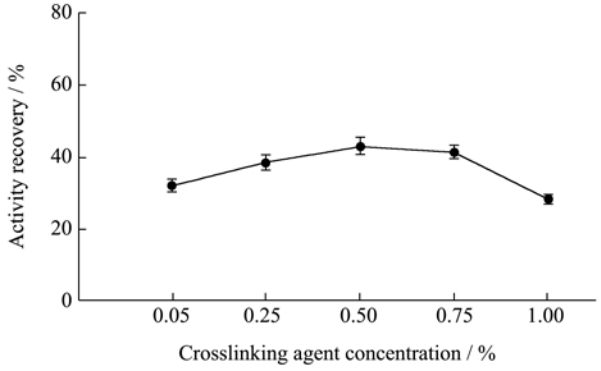


图 3 不同交联剂浓度对 BAP-CLEAs 酶活回收率的影响

Fig.3 Effect of different cross-linking agent concentration on enzyme activity recovery

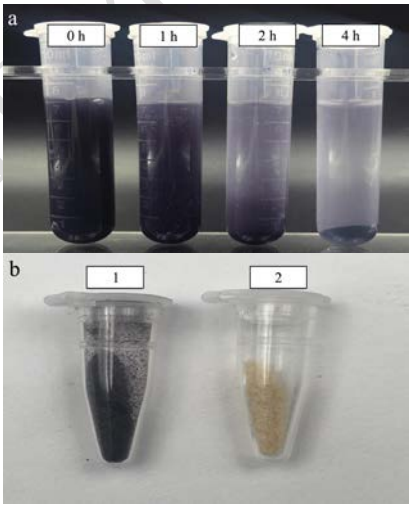


图 4 样品图

Fig.4 Sample diagram

注：a：BAP-CLEAs 0-4h 沉淀图；b：BAP-CLEAs 和 BAP 冻干样品图。

对碱性蛋白酶 BAP-CLEAs 制备过程中的影响因素分析表明，以 90%的饱和硫酸铵溶液作为沉淀剂，沉淀时间为 20 min，交联剂浓度为 0.50%，交联温度为 35 ℃，交联时间为 12 h 时，BAP-CLEAs 的酶活回收率达最大值，为 55.04%。范方宇[20]等以海藻酸钠为载体，采用包埋法固定化碱性蛋白酶，在氯化钙浓度为 3.0%、海藻酸钠溶液与酶液体积之比为 1:1、海藻酸钠质量分数为 3.0%和固定化时间为 2 h 下获得最大固定化酶酶活回收率为 23.6%。李扬等[21]用 3-氨丙基三乙氧基硅烷对四氧化三铁磁性纳米粒子表面进行修饰，以戊二醛作为交联剂固定化碱性蛋白酶，在酶

添加量为 7000 U/g、反应温度为 40 ℃、时间为 1.5 h 时获得最大酶活回收率为 48%，在反复使用 5 次以后，依然能保持 34.2%的酶活力。相对于其它碱性蛋白酶的固定化，本实验制备的 BAP-CLEAs 无载体成本，固定化步骤简单，酶活回收率高，可于较高温度下进行固定化。

图 4a 为 BAP-CLEAs 0~4 h 的沉淀图，从右往左每隔 2 h，1 h，1 h 对离心管内的悬浮液重悬一次，可以看出 0 h 时 BAP-CLEAs 很好的分散在水中，溶液为深蓝紫色，随着时间的推移逐渐沉淀，到 4 h 时 BAP-CLEAs 已完全沉淀，上清液透明。图 4b 分别为 BAP-CLEAs（1 号）与枯草杆菌蛋白酶 BAP（2 号）冷冻干燥得到的实物图，可以看到 BAP-CLEAs 为深蓝紫色，枯草杆菌蛋白酶为土黄色，上述两图结合表明利用京尼平进行的无载体固定化酶 BAP-CLEAs 成功交联。

2.2 BAP-CLEAs 与 BAP 的表征结果

2.2.1 BAP-CLEAs 的 SEM 分析

CLEAs 是一种多孔结构聚合物，所制备的交联体结构直接影响到酶的催化活性，如交联体的孔道直径会直接影响到酶与底物的接触面积和底物与产物进出孔道的快慢。为了更直接观察所制备的 BAP-CLEAs 形态特征，使用 SEM 对所制备的 BAP-CLEAs 表面特征进行观察。

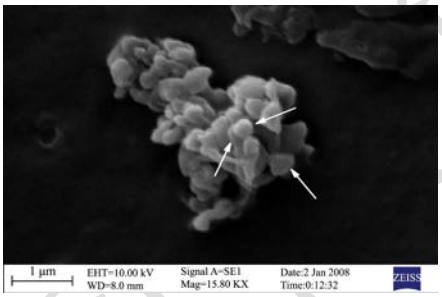


图 5 BAP-CLEAs 的 SEM 图

Fig.5 SEM images of BAP-CLEAs

图 5 为通过 SEM 观察 BAP-CLEAs 的形貌特征图。由图中可以看出本研究制备的 BAP-CLEAs 符合常规 CLEAs 所应具有的形貌，是一个多孔结构聚合物，且表面有许多层次分明的球状重叠结构(白色箭头所示)，可以说明有大量的酶分子聚集在一起，有许多大小不一的孔道，表明所制备的 BAP-CLEAs 表面积大，有利于酶与底物的接触。董守利[22]等采用 SEM 对脂肪酶 CLEAs 进行形貌表征，结果呈现出一定的脂肪酶分子堆积的现象，不规则形状的 CLEAs-PFL 由一个个粒径较小的聚集体组成，孔径空隙能让反应底物与酶催化位点接触，保证催化反应的顺利进行，粒径大部分在 20~45 μm 范围内，本研究 BAP-CLEAs 粒径较小，传质阻力较小，更能保证催化反应的顺利进行，更加利于保持较高的酶活。

2.2.2 红外图谱分析

对游离枯草杆菌蛋白酶（BAP）和经京尼平交联的 BAP-CLEAs 进行红外光谱分析，结果如图 6 所示。1680~1630 cm^{-1}、1570~1515 cm^{-1}、1350~1310 cm^{-1} 分别是蛋白质的酰胺Ⅲ带(C=O)、酰胺Ⅱ带(N-H)及酰胺Ⅰ带(C-N)吸收峰[23,24]。BAP 和 BAP-CLEAs 在这三个波长处均有明显吸收，证明两者均为含有典型蛋白质结构。BAP-CLEAs 经京尼平交联后在 1730 cm^{-1} 处出现一个新的吸收峰，这是京尼平分子上 C11 位上的酯化羧基（-$COOCH_3$）由于不完全交联而被引入 BAP-CLEAs 分子中所导致的[25]。BAP-CLEAs 在 1463 cm^{-1} 和 1310 cm^{-1} 处的吸收显著强于 BAP，表明部分京尼平分子完成对多个 BAP 分子进行交联。这两个波长的吸收增强分别代表京尼平分子 C11 位酯基取代反应（向 BAP-CLEAs 分子中引入-CONH-）[26]以及 O2 位氨基取代反应（向 BAP-CLEAs 分子中引入 N-H）[27]。综上所述，京尼平成功实现了对枯草杆菌蛋白酶的交联。

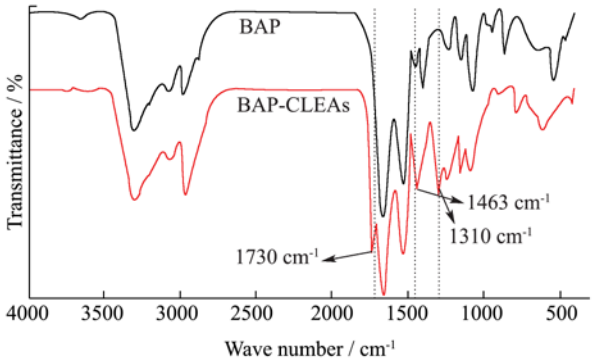


图 6 红外光谱图

Fig.6 Infrared spectrum

2.3 BAP 及 BAP-CLEAs 的特性分析结果

酶的催化活性与反应温度和 pH 值密切相关，过高过低都会影响酶的催化效率，因此，探索酶的最适催化 pH 和温度对更好发挥 BAP-CLEAs 的催化性能及其应用具有重要意义。

2.3.1 最适催化 pH

pH 值是影响酶活性的主要参数之一。酶的固定化通常会导致酶的构象变化，从而导致最优 pH 的变化[13]。pH 对游离酶和 BAP-CLEAs 活性的影响见图 7，在 pH 5.5~9.4 范围内，游离酶与交联后的 BAP-CLEAs 的相对酶活性均随着 pH 的增加而增加，游离酶的最适 pH 为 9.4，交联后的 BAP-CLEAs 的最适 pH 略向

碱性偏移，在 pH 值为 10.3 下最好。在 pH 5.5~9.4 范围内 BAP-CLEAs 的相对酶活性均高于游离酶，说明通过京尼平交联形成的 BAP-CLEAs 比游离酶的 pH 的耐受性更高，且具有较宽的 pH 范围。

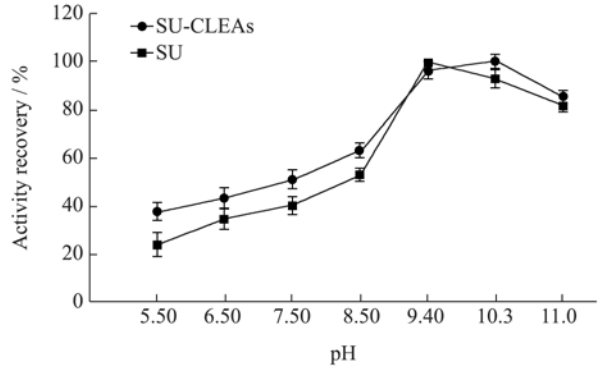


图 7 反应 pH 对游离酶 BAP 与 BAP-CLEAs 活性的影响

Fig.7 Influences of various pH value on activity of free enzyme and BAP-CLEAs

2.3.2 最适催化温度

温度对游离酶和 BAP-CLEAs 活性的影响见图 8，在 25~45 ℃范围内，游离酶与固定化酶的酶活性均随温度的升高而增大，在 45 ℃时两者酶活性均达到最高值，当温度大于 45 ℃时，游离酶的酶活性迅速下降，且在 85 ℃时接近为 0，而固定化酶在 85 ℃时仍具有 16.85%的酶活回收率。在整个温度范围内固定化酶的相对酶活性均高于游离酶，这可能是由于京尼平引起了蛋白质间共价键的形成，增加了酶构象的刚性，进而防止酶因热交换而引起扭曲或破坏[28,29]，说明通过京尼平交联的 BAP-CLEAs 相比起游离酶具有较宽的温度范围，在高温下更稳定，不易失活。

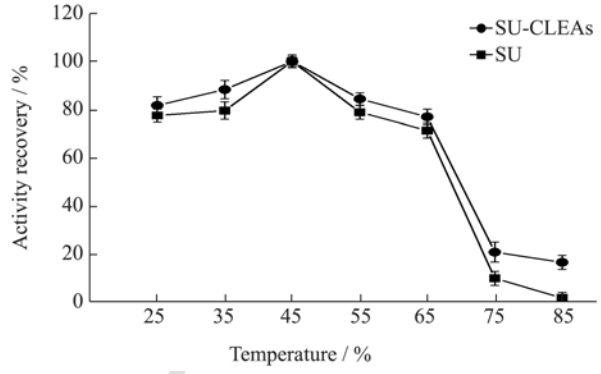


图 8 反应温度对游离酶 BAP 与 BAP-CLEAs 活性的影响

Fig.8 Influences of various temperature on activity of free enzyme and BAP-CLEAs

2.3.3 BAP-CLEAs 的重复使用稳定性分析

BAP-CLEAs 的重复使用稳定性是衡量无载体固定化酶优劣的关键因素，因此生物催化剂的重复使用性能是固定化酶的一个重要指标。以生物催化水解酪蛋白为模型反应，研究了 BAP-CLEAs 的重复使用稳定性，结果见图 9。图 9 表明，BAP-CLEAs 在重复使用 5 批次后，剩余酶活性仍然有 86.42%。由于 BAP-CLEAs 具有易分离、稳定性好、可重复利用等特点，在生物水解工业上将具有更大应用潜力。范方宇[21]等以海藻酸钠为载体，采用包埋法固定化碱性蛋白酶，在氯化钙浓度为 3.0%、海藻酸钠溶液与酶液体积之比为 1:1、海藻酸钠质量分数为 3.0%和固定化时间为 2 h 下获得最大固定化酶酶活回收率为 23.6%。李扬等[22]用 3-氨丙基三乙氧基硅烷对四氧化三铁磁性纳米粒子表面进行修饰，以戊二醛作为交联剂固定化碱性蛋白酶，在酶添加量为 7000 U/g、反应温度为 40 ℃、时间为 1.5 h 时获得最大酶活回收率为 48%，在反复使用 5 次以后，依然能保持 34.2%的酶活力。相对于其它碱性蛋白酶的固定化，本实验制备的 BAP-CLEAs 无载体成本，固定化步骤简单，酶活回收率高，可于较高温度下进行固定化。

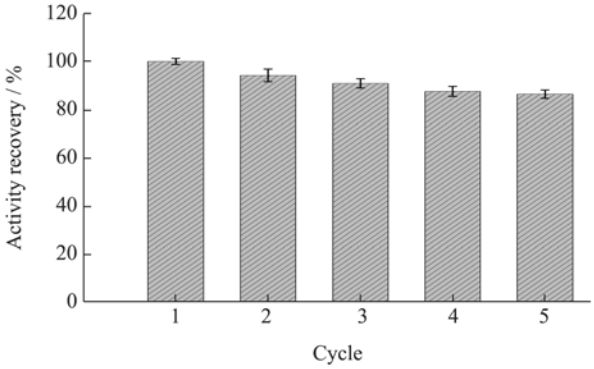


图 9 BAP-CLEAs 水解酪蛋白的重复使用稳定性

Fig.9 Reuse stability of BAP-CLEAs for enzymatic hydrolysis of casein

3 结论

本文采用新型生物交联剂京尼平对 BAP 进行交联聚集体的制备，在交联温度为 35 ℃，交联剂浓度为 0.50%，交联时间为 12 h 时，BAP-CLEAs 的最大酶活回收率为 55.04%。BAP-CLEAs 的对 pH 和温度的耐受性明显优于游离酶，这表明所制备的固定化酶更符合工业用酶的苛刻要求。此外，BAP-CLEAs 具有良好的重复使用稳定性，重复使用 5 批次后，BAP-CLEAs 的剩余酶活性还能保持 86.42%以上。所制备的 BAP-CLEAs 在食品、医药等行业的具体应用有待进一步研究，但其简单的制备和回收步骤，优异的催化性能和稳定的操作性都表明，碱性蛋白酶 CLEAs 的优越性要高于游离酶，这将会使其在生物催化工业上具有更大的应用潜力。

参考文献

[1] Shankar S, Laxman R S. Biophysicochemical characterization of an alkaline protease from *Beauveria* sp. MTCC 5184 with multiple applications [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175(1): 589-602

[2] Hatta E, Matsumoto K, Honda Y. Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread [J]. Journal of Cereal Science, 2015, 61: 41-47

[3] Huizhi Fan, Huimin Bao, Luyan Zhang, et al. Immobilization of trypsin on poly (urea-formaldehyde) coated fiberglass cores in microchip for highly efficient proteolysis [J]. Proteomics, 2011, 11: 3420-3423

[4] Zhenyuan Qu, Kaimin Chen, Hongchen Gu, et al. Covalent immobilization of proteins on 3D poly (acrylic acid) brushes: mechanism study and a more effective and controllable process [J]. Bioconjugate Chem, 2014, 25: 370-378

[5] 陈翠翠,何腊平,郑佳,等.交联酶聚集体性能改善研究进展[J].食品工业科技,2018,39(22):298-303,308
CHEN Cui-cui, HE La-bing, ZHENG Jia, et al. Progress in improving the performance of crosslinking enzyme aggregates [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 298-303, 308

[6] Cao L Q, Langen L M V, Rantwijk F V, et al. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: Robust catalysts for the synthesis of β-lactam antibiotics [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2001, 11(4): 665-670

[7] Cabirol F L, Hanefeld U, Sheldon R A. Immobilized hydroxynitrile lyases for enantioselective synthesis of cyanohydrins: sol-gels and cross-linked enzyme aggregates [J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2006, 348(1213): 1645-1654

[8] Devi B L A P, Guo Z, Xu X. Characterization of cross-linked lipase aggregates [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009, 86(7): 637-642

[9] Pelt S V, Quignard S, Kubac D, et al. Nitrile hydratase CLEAs: the immobilization and stabilization of an industrially important enzyme [J]. Green Chemistry, 2008, 10(4): 395-400

[10] Yang J, Xu X, Yang X, et al. Cross-linked enzyme aggregates of cerrena laccase: preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of remazol brilliant blue reactive [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 65: 1-7

[11] 贺雪珊,张艳梅,张祥,等.绿豆环氧水解酶交联聚集体(CLEAs)的制备[J].山东化工,2018,47(3):19-20
HE Xue-shan, ZHANG Yan-mei, ZHANG Xiang, et al. Preparation of epoxy hydrolase cross-linked aggregates (CLEAs) from mung bean [J]. Shandong Chemical Industry, 2018, 47(3): 19-20

[12] Wang M F, Jia C X, Qi W, et al. Porous-CLEAs of papain: application to enzymatic hydrolysis of macromolecules [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 3541-3545

[13] 区晓阳,曾英杰,彭飞,等.碱性蛋白酶交联聚集体的制备及其催化性能研究[J].食品科学技术学报,2019,37(3):33-40
QU Xiao-yang, ZENG Ying-jie, PENG Fei, et al. Preparation and catalytic performance of alkaline protease crosslinked aggregates [J]. Chinese Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(3): 33-40

[14] 曹峥,胡蕴玉,潘纬敏,等.交联温度对京尼平交联胶原/壳聚糖组织工程支架的影响[J].中国矫形外科杂志,2009,17(3):217-220
CAO Zheng, HU Yun-yu, PAN Wei-min, et al. Effect of crosslinking temperature on tissue engineering scaffold of collagen/chitosan [J]. Chinese Journal of Orthopedic Surgery, 2009, 17(3): 217-220

[15] 唐荣华.京尼平交联磁性壳聚糖微球的制备及酶的固定化[D].长沙:湖南师范大学,2013
TANG Rong-hua. Preparation of genepin cross-linked magnetic chitosan microspheres and immobilization of enzymes [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2013

[16] Sun S Q, Wang S J, Qiu-Shun L I, et al. Coomassie brilliant blue method based protein content determination in milk [J]. Shandong Science, 2011, 24(6): 53-55

[17] SB/T 10317-1999,蛋白酶测定国家标准[S]
SB/T 10317-1999, National Standard for Protease Determination [S]

[18] 鲁伟,任国谱,宋俊梅.蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J].食品科学,2005,26(7):169-171
LU Wei, REN Guo-pu, SONG Jun-mei. Determination of polypeptide in hydrolysate of protein [J]. Food Science, 2005, 26(7): 169-171

[19] 孙立梅,李连连,崔建东.牛血清白蛋白辅助交联对苯丙氨酸解氨酶交联酶聚体影响的研究[J].食品工业科技,2013,34(13):66-69,74
SUN Li-mei, LI Lian-lian, CUI Jian-dong. Effect of bovine serum albumin assisted crosslinking on phenylalanine ammonia-lyase crosslinking enzyme polymer [J]. Food Industry Science and Technology, 2013, 34(13): 66-69, 74

（下转第 152 页）