

# 响应面法优化红曲米中凝乳酶高产菌株的发酵条件

于 振,李建科\*,马倩倩,李梦颖,张雅丽,乔彩云

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院,陕西西安 710062)

**摘要:**对从红曲米中分离得到的产凝乳酶能力强的菌株M5传代菌株的液态发酵培养基及产酶条件进行优化。首先进行单因素实验得到适宜的氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酪蛋白,无机盐为 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,适宜的接种量为1%,培养温度为 $30^\circ\text{C}$ ,培养时间为5d,发酵培养基初始pH为6.0。在此基础上通过Plackett-Burman实验筛选出对酶活影响显著的三个因素: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量、培养时间和培养温度。再用Box-Behnken响应曲面实验对三个显著因素进行优化。结果表明,产酶的最佳培养基组分: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.53%、 $\text{FeSO}_4$  0.05%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、干酪素0.5%、葡萄糖2%、接种量1%。最佳发酵条件为:培养温度 $31.3^\circ\text{C}$ 、摇床转速为180r/min、培养时间113h、pH6.0。基于响应曲面优化的产凝乳酶培养基组成与发酵条件效果显著,供试菌株M5传代菌株所产凝乳酶活性由45.34SU/mL提高到190.68SU/mL。

**关键词:**M5传代菌株,液态发酵,凝乳酶,响应曲面法,优化

## Optimization of the fermentation conditions of high chymosin-producing strain from red kojic rice with response surface methodology

YU Zhen, LI Jian-ke\*, MA Qian-qian, LI Meng-ying, ZHANG Ya-li, QIAO Cai-yun

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The chymosin-producing medium and fermentation conditions of M5 reproduction strain from red kojic rice was optimized. First, the single factor test showed that the suitable nitrogen source was  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and casein, inorganic salt was  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , inoculums was 1%, culture temperature was  $30^\circ\text{C}$ , incubation time was 5d, fermentation medium initial pH was 6.0. The main factors effected chymosin activity was  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  incubation time and culture temperature by Plackett-Burman method and the optimum conditions of the main factors were determined by means of response surface analysis. The highest yield of milk-clotting enzyme was achieved by using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.53%),  $\text{FeSO}_4$  (0.05%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.05%), casein (0.5%), glucose (2%), inoculums (1%). Fermentation conditions were: culture temperature  $31.3^\circ\text{C}$ , speed 180r/min, incubation time 113h, pH6.0. Results based on the response surface were obvious. Chymosin activity increased from 45.34SU/mL to 190.68SU/mL.

**Key words:** M5 reproduction strain; liquid fermentation; chymosin; response surface methodology; optimization

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0146-05

凝乳酶一般特指皱胃酶,是一种从未断奶的小牛胃中发现的天门冬氨酸蛋白酶,其主要的生物学功能是有限剪切Phe105-Met106连接的 $\kappa$ -酪蛋白,导致牛奶凝结,因此被广泛用于乳酪制造业,成为重要的酶制剂,其产值占全世界酶制剂的15%<sup>[1]</sup>。由于乳酪生产的需要,全球每年约屠宰5000万头小牛,造成全球性小牛短缺。为缓解小牛凝乳酶供应的紧张状态,人们一直寻找小牛凝乳酶的代用品。微生物种类繁多,资源丰富,在微生物细胞中几乎能找到所有功能的酶,因此,人们在寻找微生物凝乳酶方面展开了大量的研究。郑丽等<sup>[2]</sup>研究表明微小毛霉凝乳酶基因在毕

赤酵母中可进行有效的表达。吴进菊等<sup>[3]</sup>从中国曲中筛选出1株高产凝乳酶活力菌株*Rhizopus arrhizus* F34,凝乳酶活力达33.3U/mL。刘振民等<sup>[4]</sup>从酒药中分离出具有产凝乳性蛋白酶的根霉。叶为标等人<sup>[5-7]</sup>对根霉产凝乳酶的发酵条件和酶学性质进行了深入研究。范素琴等人<sup>[8]</sup>采用酪蛋白平板法和Arima时间法从红曲米微生物中筛选出了1株产生凝乳酶能力强的菌株M5。本研究采用响应曲面法对范素琴所筛选的菌株M5的传代菌株液体发酵培养基成分和培养条件进行了进一步的优化研究,确定了最佳的发酵培养基及培养条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试菌株 从红曲米中分离得到的凝乳酶高产

收稿日期:2011-11-29 \* 通讯联系人

作者简介:于振(1987-),男,硕士研究生,研究方向:食品营养与安全。

表1 PB实验设计因素水平表

Table 1 Level and code of variables chose for Plackett-Burman experimental design

编码水平	因子										
	A (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	B FeSO <sub>4</sub> (‰)	C 干酪素 (%)	D KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (‰)	E 葡萄糖 (%)	F 接种量 (%)	G 培养温度 (°C)	H 转速 (r/min)	J 初始pH	K 培养时间 (d)	
-1	0.35	0.05	0.5	0.35	1.5	0.75	25	140	5.5	3.5	
0	0.5	0.1	0.75	0.5	2.0	1.0	30	160	6.25	4.5	
1	0.65	0.15	1.0	0.65	2.5	1.25	35	180	7.0	5.5	

菌株M5传代菌株,山东轻工业学院食品科学教研室提供;100g/L脱脂乳溶液 每10mL 0.01mol/L CaCl<sub>2</sub>中加入1g脱脂乳配制而成;马铃薯葡萄糖培养基,玉米粉汁培养基<sup>[9]</sup>,麦芽汁培养基<sup>[10]</sup>,麸皮培养基,葡萄糖胰蛋白胨液体培养基<sup>[11]</sup>。

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶发酵培养 将菌种接入装有100mL发酵培养基的500mL锥形瓶中,8层纱布封口,置于旋转式摇床振荡培养。重复3次,取平均值。

1.2.2 粗酶液的制取 在500mL锥形瓶中装入培养基100mL,121°C条件下灭菌20min,冷却。取培养有供试菌株的斜面培养基,在无菌条件下注入无菌水,用接种针刮斜面制作成孢子悬浮液,接种于培养基中。在实验所需条件下振荡培养一定时间后滤去菌丝体,滤液即为所需的粗酶液。

1.2.3 凝乳酶活性的测定 采用Arima法<sup>[12]</sup>。

1.2.4 单因素实验设计 首先研究了马铃薯葡萄糖培养基、葡萄糖胰蛋白胨液体培养基、麸皮培养基、麦芽汁培养基、玉米粉汁培养基等不同基础培养基对产酶的影响。然后以上述筛选出的初始培养基为基础,研究了氮源、无机盐、摇瓶培养温度、发酵时间、接种量以及筛选出的最适氮源(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的量对产酶的影响。

1.2.5 Plackett-Burman实验设计 Plackett-Burman实验<sup>[13]</sup>就是筛选实验设计,主要针对因子数较多,且未确定众因子相对于响应变量的显著性时,采用的实验设计方法。应用软件Design Expert7.0,结合单因素实验以马铃薯葡萄糖培养基作为基础培养基,采用N为12的Plackett-Burman实验设计,考察了干酪素、摇瓶培养温度、发酵时间、接种量、无机离子、初始pH、葡萄糖、摇床转速、培养时间对产酶的影响。实验设计因素水平表见表1。

1.2.6 Box-Behnken法响应面实验设计 响应面法是用来对所感兴趣的响应受多个变量影响的问题进行建模和分析,目的是优化这个响应<sup>[14]</sup>。本实验选用的Box-Behnken法是一种较常用的响应面设计法,适用于2~5个因素的优化实验。本实验对经过Plackett-

表2 响应面实验因素与水平设计表

Table 2 Level and code of variables chose for response surface experiment

编码水平	因子		
	X <sub>1</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	X <sub>2</sub> 培养温度 (°C)	X <sub>3</sub> 培养时间 (d)
-1	0.35	25	3.5
0	0.5	30	4.5
1	0.65	35	5.5

Burman实验筛选出的3个显著因素:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、摇瓶培养温度、培养时间进行优化。响应面实验因素与水平设计见表2。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

首先研究了不同基础培养基对产酶的影响。在500mL三角瓶中分别加入各种培养基100mL,接种量为1%,于30°C,180r/min振荡培养4d后测定凝乳酶活力。然后以筛选出的马铃薯葡萄糖培养基为基础培养基(在500mL三角瓶中加入马铃薯葡萄糖培养基100mL),研究了氮源(加入量均为0.5%,接种量为1%,于30°C,180r/min振荡培养4d)、无机盐(加入量均为0.05%,接种量为1%,于30°C,180r/min条件下振荡培养4d)、摇床培养温度(接种量为1%,180r/min条件下振荡培养4d)、培养基不同初始pH(接种量为1%,于30°C,180r/min条件下振荡培养4d)、发酵时间(接种量为1%,于30°C,180r/min条件下振荡培养不同时间)、接种量(30°C,180r/min条件下振荡培养4d)以及筛选出的最适氮源(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的量(接种量为1%,于30°C,180r/min条件下振荡培养4d)对酶活的影响。单因素实验结果见表3。

表3 单因素对酶活的影响(SU/mL)

Table 3 The influence of single factors to enzyme activity (SU/mL)

因素	水平				
	1	2	3	4	5
培养基酶活	马铃薯葡萄糖	葡萄糖胰蛋白胨	麸皮	麦芽汁	玉米粉汁
酶活	43.09	27.09	4.23	7.64	13.06
氮源酶活	空白	蛋白胨	牛肉膏	干酪素	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 酶活	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%	1.25%
酶活	89.88	93.67	91.13	80.25	58.77
无机盐离子酶活	空白	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KCl	FeSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
酶活	36.78	42.79	34.28	39.77	31.25
培养温度酶活	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
酶活	25.73	31.11	56.33	52.17	13.45
接种量酶活	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%
酶活	25.08	34.73	34.68	30.25	31.60
pH酶活	4	5	6	7	8
酶活	37.28	40.37	47.88	36.23	19.76
培养时间酶活	3d	4d	5d	6d	7d
酶活	25.11	42.78	44.63	36.27	35.78

由表3可知,马铃薯葡萄糖培养基为最适发酵培养基;最适氮源为(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,最适含量为0.5%,同时有机氮源干酪素对酶活有促进作用;最适无机盐离子为KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、同时FeSO<sub>4</sub>对酶活也有一定的促进作用;培

养最适温度为30℃、接种量为1.0%、pH为6,培养时间为5d。

## 2.2 Plackett–Burman实验设计筛选对酶活影响显著的因素

选择N=12的Plackett–Burman实验考察10个因素对产酶的影响。各因素对凝乳酶活的影响显著分析见表4,由表4可知,对酶活产量影响显著的因子依次为培养时间( $p$ 值为0.0260<0.05)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量( $p$ 值为0.0273<0.05)、培养温度( $p$ 值为0.0279<0.05)。

表4 Plackett–Burman实验各因素的影响结果

Table 4 Effect of variables chose of Plackett–Burman experimental design

因子	F值	$p$ 值	显著性
模型	242.70	0.0499	*
A- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	552.03	0.0273	*
B- $\text{FeSO}_4$	30.88	0.1133	
C-干酪素	139.45	0.0505	
D- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	132.71	0.0551	
E-葡萄糖	101.30	0.0630	
F-接种量	106.86	0.0614	
G-培养温度	521.34	0.0279	*
H-摇床转速	55.35	0.0851	
J-初始pH	27.86	0.1192	
K-培养时间	600.78	0.0260	*
L-误差项	-	-	

注:\*为显著( $p$ <0.05)。

## 2.3 应用Box–Behnken响应面分析法确定显著因素的最佳水平

通过Plackett–Burman实验可知,影响凝乳酶活的10个因素中, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量、培养温度、培养时间对酶活的影响最为显著,因此在响应面实验中主要对三者的最佳水平进行优化。Box–Behnken响应面设计与结果见表5。

表5 响应面实验设计与结果

Table 5 Design and results of response surface experiment

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	凝乳酶活(SU/mL)
1	0	-1	-1	103.45
2	0	-1	1	132.15
3	0	0	0	196.21
4	0	0	0	193.85
5	0	1	1	135.59
6	0	0	0	189.29
7	0	0	0	190.45
8	1	1	0	161.43
9	1	0	1	168.97
10	-1	-1	0	113.39
11	-1	1	0	97.06
12	-1	0	1	103.02
13	1	-1	0	76.44
14	0	1	-1	148.15
15	1	0	-1	84.21
16	0	0	0	198.67
17	-1	0	-1	101.25

运用软件Design–Expert7.0对表5响应值与各因素进行回归拟合后得到凝乳酶活力对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

( $X_1$ )、培养温度( $X_2$ )和培养时间( $X_3$ )编码值的二次多项回归方程为:凝乳酶活=193.69+9.54 $X_1$ +14.60 $X_2$ +12.83 $X_3$ +25.33 $X_1X_2$ +20.75 $X_1X_3$ -10.32 $X_2X_3$ -48.54 $X_1^2$ -33.07 $X_2^2$ -30.79 $X_3^2$ 。对该模型进行方差分析,结果见表6,回归方程系数显著性检验结果见表7。

表6 回归模型方差分析表

Table 6 ANOVA analysis for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	$p$ 值	显著性
模型	29029.99	9	3225.55	28.55	0.0001	*
残差	790.74	7	112.96			
失拟项	729.71	3	243.24	15.94	0.0609	
纯误差	61.03	4	15.26			
总和	29820.73	16				

注:\*为显著( $p$ <0.05), $R^2=0.9735$ , $R^2_{\text{Adj}}=0.9394$ , $R^2_{\text{Pred}}=0.6053$ ,Adeq Precision=13.740。

表7 回归方程系数显著性检验表

Table 7 Regression coefficients and significance for the regression model

系数项	系数估计值	自由度	标准误差	F值	$p$ 值	显著性
$X_1$	9.54	1	3.76	6.45	0.0387	*
$X_2$	14.60	1	3.76	15.10	0.0060	**
$X_3$	12.83	1	3.76	11.66	0.0112	*
$X_1X_2$	25.33	1	5.31	22.72	0.0020	**
$X_1X_3$	20.75	1	5.31	15.24	0.0059	**
$X_2X_3$	-10.32	1	5.31	3.77	0.0934	
$X_1^2$	-48.54	1	5.18	87.83	<0.0001	**
$X_2^2$	-33.07	1	5.18	40.77	0.0004	**
$X_3^2$	-30.79	1	5.18	35.33	0.0006	**

注:\*为显著( $p$ <0.05),\*\*为极显著( $p$ <0.01)。

回归方程中各变量对响应值影响的显著性,由F检验来判定,概率 $p$ 的值越小,则相应变量的显著程度越高。由表6可以看出,模型( $p=0.0001$ <0.05)显著,其校正决定系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.9394$ ,表明仅有总变异的6.1%不能由该模型进行解释。相关系数 $R^2=0.9735$ ,且失拟性检验不显著( $p=0.0609$ >0.05),表明该模型拟合程度良好,实验误差小,回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该模型确定最佳培养基组成及发酵条件。Adeq Precision值为13.740,远大于4,说明模型完全可以用来对实验结果进行拟合。因此可以用此方程代替真实实验点进行分析和预测。

通过模型方程所作的三维响应面图见图1~图3,能比较直观地解释各变量和变量之间对响应值凝乳酶活的影响。

图1显示了当培养时间为中心水平4.74d时,硫酸铵含量和培养温度对凝乳酶活的交互影响效应。由图可以直观的看出此两因素的交互效应较显著。当温度在29.5~32.5℃、硫酸铵含量在0.50%~0.56%之间时,可获得所产凝乳酶的最大酶活为198.213SU/mL。

图2显示了当培养温度为中心水平31.34℃时,硫酸铵含量、培养时间对凝乳酶活力交互作用。由图可以直观的看出此两因素的交互效应较显著。当培养时间4.5~5d、硫酸铵含量在0.50%~0.56%之间时,可获得最大酶活为198.213SU/mL。



图3显示了当硫酸铵含量为中心水平0.53%时,培养温度、培养时间对凝乳酶活力的交互作用。由图可以直观的看出此两因素的交互效应较显著。当培养温度为29.5~32.5℃、培养时间在4.5~5d之间时,可获得所产凝乳酶的最大酶活为198.213SU/mL。

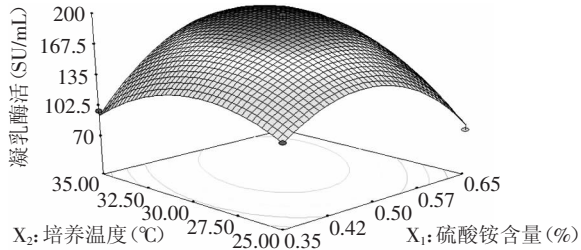


图1 硫酸铵、培养温度及其交互作用对凝乳酶活力影响的影响面图

Fig.1 Response surface plot of the effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and culture time and their mutual interactions on chymosin activity

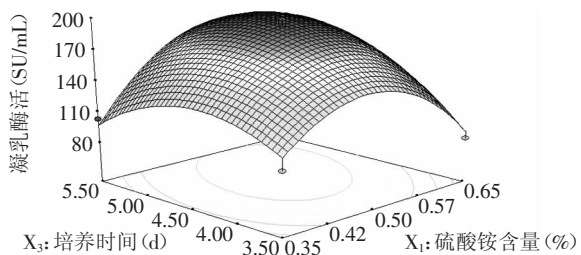


图2 硫酸铵、培养时间及其交互作用对凝乳酶活力影响的影响面图

Fig.2 Response surface plot of the effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and culture temperature and their mutual interactions on chymosin activity

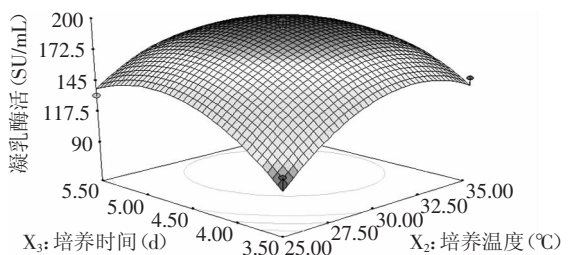


图3 培养温度、培养时间及其交互作用对凝乳酶活力影响的影响面图

Fig.3 Response surface plot of the effect of culture temperature and culture time and their mutual interactions on chymosin activity

运用Design-Expert7.0软件计算得出三个影响显著因素的最适值为:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量为0.53%, 培养温度为31.34℃, 培养时间为4.74d。综合考虑实际操作的便利, 将最适值修正为:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含量为0.53%, 培养温度为31.3℃, 培养时间为4.7d即113h。在此条件下进行发酵产酶, 由回归方程预测酶活力为198.213SU/mL。为检验响应曲面法所得结果的可靠性, 按照上述响应面分析法求得的最佳条件进行培养基的配制并进行液体发酵重复实验3次(以基础培养基作为空白), 实际测得的平均凝乳酶活力为190.68SU/mL, 与理论预测值198.213SU/mL相比, 误差为3.8%, 实验值在95%的置信区间符合预测值。因此, 基于响应曲面优化的产凝乳酶培养基组成与发酵条件参数准确可靠, 具

有实用价值。

### 3 讨论

本研究所用菌株M5为范素琴<sup>®</sup>从红曲米中所分离出菌株M5的传代菌株, 在基础培养基上其产凝乳酶活力为43.09SU/mL, 低于范素琴所用亲代菌株M5的80SU/mL。范素琴通过正交实验对M5亲代菌株培养条件进行了优化, 凝乳酶活力提升到150.68SU/mL。本研究对M5传代菌株培养基成分及培养条件优化后, 其凝乳酶活力可提升到190.68SU/mL, 相比基础培养基, 凝乳酶活力提高4倍多。这也说明本文优化的培养基成分较大程度上提升了M5传代菌株产凝乳酶的能力。

通过本研究可知, 通过优化培养基成分、延长发酵时间可提高M5传代菌株产凝乳酶的活力。故在使用传代次数过多的菌株M5进行生产凝乳酶时, 要相对延长其发酵时间, 否则需要对其进行随机突变, 定向筛选出产凝乳酶的活力强的M5变异菌株。

### 4 结论

由单因素实验得出马铃薯葡萄糖培养基是该凝乳酶高产菌株最适宜的发酵培养基; 通过单因素分析和响应曲面实验设计, 确定最佳发酵培养基组分为:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.53%、 $\text{FeSO}_4$  0.05%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、干酪素0.5%、葡萄糖2%、接种量1%; 最佳发酵条件为: 初始pH6.0、培养温度31.3℃、转速为180r/min、培养时间113h。凝乳酶活达190.68SU/mL。

### 参考文献

- [1] 曾剑超. 国内凝乳酶的研究应用及其替代品的研究进展[J]. 江苏调味食品, 2008, 25(1): 13-17.
- [2] 郑丽, 王昕, 王景会, 等. 小毛霉凝乳酶基因在毕赤酵母中的表达条件及其酶学特性研究[J]. 食品工业科技, 2011(7): 178-181.
- [3] 吴进菊, 徐尔尼, 张凤英, 等. 中国曲中凝乳酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 124-129.
- [4] 刘振民, 光辉. 酒药中凝乳酶菌株筛选及产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(5): 8-11.
- [5] 叶为标, 吴进菊, 陈卫平, 等. 根霉产凝乳酶发酵条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(8): 53-56.
- [6] 潘道东, 韩玲玲. 根霉凝乳酶的分离纯化及其酶学特性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(2): 53-59.
- [7] 韩玲玲, 潘道东. 根霉产凝乳酶的固态发酵条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 156-159.
- [8] 范素琴, 王成忠, 杨爱华, 等. 红曲米中凝乳酶产生菌的筛选及液态发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2009(9): 24-26.
- [9] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 266-267.
- [10] 张文治. 新编食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995: 380-381.
- [11] 董明盛, 贾英民. 食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 110-112.
- [12] 李子木, 陈强, 赵珂. 酒曲中凝乳酶产生菌的筛选及其培养条件研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(5): 32-35.

# 双醛氧化纤维素固定化木瓜蛋白酶 及酶学性质的研究

郭庆启<sup>1</sup>, 张娜<sup>2</sup>, 南雪<sup>1</sup>, 方桂珍<sup>3,\*</sup>

(1.东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040;

2.哈尔滨商业大学食品科学与工程黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150076;

3.东北林业大学生物质材料科学与技术教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:**以双醛氧化纤维素为载体固定化木瓜蛋白酶,研究了固定化酶的制备条件、微观结构及酶学性质。结果表明:固定化时间4h,固定化温度4℃,酶/载体=1:3000(g:g)时,固定化酶的活力最高为50.9U/g。红外光谱和扫描电镜对固定化酶的微观结构研究表明,双醛氧化纤维素的醛基与木瓜蛋白酶的氨基发生共价反应形成固定化酶。与游离酶相比,木瓜蛋白酶经过固定化后,热稳定性和耐酸性增强,与底物酪蛋白的亲和力降低,固定化酶重复使用5次后,相对酶活力为55.1%。

**关键词:**双醛氧化纤维素,木瓜蛋白酶,固定化,酶学性质

## Study on the immobilization of papain by dialdehyde oxycellulose and enzymatic properties

GUO Qing-qi<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>2</sup>, NAN Xue<sup>1</sup>, FANG Gui-zhen<sup>3,\*</sup>

(1.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2.Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Province, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

3.Key Laboratory of Bio-based Material Science and Technology of Education Ministry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Dialdehyde oxycellulose was prepared as the carrier to immobilize papain. The preparation conditions, microstructure and enzymatic properties of the immobilized enzyme were studied. The results showed that the maximum activity of immobilized papain was 50.9U/g under the optimal immobilization conditions: immobilization time 4h, 4℃ and 1:3000 enzyme/carrier ratio (w/w). The microstructure of immobilized enzyme, which was studied by infrared spectrum and scanning electron microscope analysis, showed that the aldehyde group of dialdehyde oxycellulose could react with the amino group of the papain to form immobilized enzyme. Compared with free enzyme, the heat stability and acid resistance of immobilized papain were increased; the affinity with substance casein of dialdehyde oxycellulose immobilized papain was decreased. After being reused five times, the relative enzyme activity was 55.1%.

**Key words:** dialdehyde oxycellulose; papain; immobilization; enzymatic properties

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0150-04

木瓜蛋白酶 (papain, E.C. 3.4.22.2) 是一种含巯基肽链的内切酶, 具有蛋白酶和酯酶的活性<sup>[1]</sup>, 对动

植物蛋白、多肽、酯、酰胺键等有较强的水解能力, 已广泛应用于医药、食品、酿酒、饲料、化妆品及轻纺工业<sup>[2-3]</sup>。木瓜蛋白酶存在对热、强酸、强碱、有机溶剂等不稳定, 难以从反应体系中回收、污染产物并给产物提纯造成困难, 导致生产成本提高等缺点, 限制了其在工业化中的应用。木瓜蛋白酶经过固定化后, 分离回收容易、可重复使用、操作连续及工艺可控、简便

收稿日期: 2011-09-19 \* 通讯联系人

作者简介: 郭庆启 (1978-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 天然产物化学。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (DL12BA04)。

[13] 冯培勇, 钟旭生, 杨立红, 等. 利用响应面法优化茶薪菇产纤维素酶的发酵条件[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 162-165.

[14] De Faria J T, Sampaio F C, Converti A. Use of response surface

methodology to evaluate the extraction of *Debaryomyces hansenii* xylose reductase by aqueous two-phase system[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877: 3031-3037.