

# 纤维素膜固定化麦麸酯酶的工艺研究

## Study on immobilization of wheat bran esterase with fibre membrane

叶麟 姜露 申光辉 黎杉珊 吴贺君 张志清

YE Lin JIANG Lu SHEN Guang-hui LI Shan-shan WU He-jun ZHANG Zhi-qing

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**摘要:**以麦麸中的植物酯酶为酶源,通过交联、吸附方法比较,选择物理吸附法将其固定于玻璃纤维素膜上,以酶活回收率为指标,探索其固定化的最佳条件。在单因素试验的基础上,利用 Box-Behnken 试验,进一步研究了缓冲液 pH 值、固定化时间、固定化温度 3 个因素及交互作用对麦麸酯酶固定化效果的影响,确定最佳固定化条件为:磷酸盐缓冲液 pH 值 7.0,固定化时间 4 h,固定化温度 29 °C,该条件下酶活回收率的预测值为 28.21%,验证值为 27.51%。该研究为利用固定化麦麸酯酶快速检测有机磷和氨基甲酸酯类农药残留提供了技术参考。

**关键词:**吸附法;麦麸酯酶;固定化;纤维素膜

**Abstract:** Taking the plant-esterase from wheat bran as the enzyme source, comparing the physical adsorption method and the cross-linking with adsorption methods, and the glass fiber film as adsorption carrier, and then explored the optimum conditions for immobilization use enzyme activity recovery as the evaluation index. On the basis of single-factors experiments, the Box-behnken center-united experimental design principles were used to design the experiment and the response surface analysis of 3 factors (the buffer's pH, immobilized time and immobilized temperature) and the interactive effect on immobilization. The optimum immobilized conditions were confirmed as followed: phosphate buffer's pH 7.0, immobilized time 4 h, and immobilized temperature 29 °C. Based on these conditions, the detection value of the enzyme recovery rate was 28.21%, and its verified value was 27.51%. The study provides a technical reference for rapid determination of organophosphorus and carbamate pesticide residues use immobilized wheat bran esterase.

**Keywords:** adsorption method; wheat bran esterase; immobilization; fibre membrane

从麦麸中提取的植物酯酶(plant esterase, PE),属于羧

酸酯水解酶类,由于其活性可被有机磷和氨基甲酸酯类农药所抑制,可用于快速测定果蔬中有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的残留,且具有与动物酯酶相似的检测限而被越来越多的学者关注<sup>[1-3]</sup>。研究结果<sup>[4,9-11]</sup>表明,将植物酯酶固定化以后,对于有机磷和氨基甲酸酯类农药残留检测的灵敏度较游离态酶都有不同程度的提高,且可以重复使用多次,储存条件也较游离态酶随和。

目前,对于植物酯酶的固定化方法研究主要集中于交联法和吸附法<sup>[6-8]</sup>。范钦华等<sup>[9]</sup>以麦草秸秆为原料,经环氧氯丙烷和乙二胺改性,戊二醛交联,制备了固定化小麦酯酶,其对敌敌畏的检测下限为 0.06 μg/L。徐艳阳等<sup>[10]</sup>研究表明,当采用 717 强碱性阴离子交换树脂作为吸附载体,并对其进行酸碱处理后,利用得到的 Cl<sup>-</sup> 型交换树脂来吸附固定黑豆酯酶,此固定化黑豆酯酶对氧乐果的抑制程度与氧乐果的浓度变化呈现良好的线性关系。研究<sup>[11-13]</sup>表明,植物酯酶不是单一的酶系,而是有两种及以上同工酶共同组成,单一的同工酶还可能由不同的酶蛋白亚基构成,当这些同工酶共同存在的情况下往往要比单一的同工酶活性要好,所以对于植物酯酶的固定化往往选用植物酯酶的粗提液<sup>[6]</sup>。目前,关于植物酯酶的固定化研究主要集中于豆类中的酯酶<sup>[4,8-10]</sup>以及小麦粉中的酯酶<sup>[7]</sup>,而关于麦麸酯酶的固定化研究,还未见文献报道。因此,本研究拟选用麦麸酯酶的粗提液为酶源,将其固定于膜载体上,并优化其固定化条件,以期将麦麸酯酶固定化后用于果蔬中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

麦麸:雅安市售;

定性滤纸:杭州特种纸业公司;

硝酸纤维素膜(厚度 140 μm)、醋酸纤维素膜:成都康迪生物技术有限公司;

玻璃纤维素膜: Ahlstrom8964(厚度 0.41 mm,克重

作者简介:叶麟,男,四川农业大学在读硕士研究生。

通讯作者:张志清(1976—),男,四川农业大学教授,博士,博士生导师。E-mail: zqzhang721@163.com

收稿日期:2016-07-18

77.8 g/m<sup>2</sup>)、GL-b01(厚度 0.56 mm,克重 60 g/m<sup>2</sup>)、GL-b02(厚度 0.75 mm,克重 89 g/m<sup>2</sup>)、GL-b04(厚度 0.78 mm,克重 92 g/m<sup>2</sup>),上海杰一生物技术有限公司;

聚酯纤维素膜:MA0280(厚度 0.40 mm,克重68 g/m<sup>2</sup>)、fusion 3(厚度 0.39 mm,克重 95 g/m<sup>2</sup>)、Ahlstrom6613(厚度 0.42 mm,克重 100 g/m<sup>2</sup>),上海杰一生物技术有限公司;

尼龙膜(Hybond N<sup>+</sup>):美国 Sigma 公司;

$\alpha$ -乙酸萘酯:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

固兰 B 盐:分析纯,上海蓝季科技发展有限公司;

盐酸:分析纯,四川西陇化工有限公司;

牛血清白蛋白:分析纯,北京索莱宝科技有限公司;

$\alpha$ -萘酚、25% 戊二醛(GA)、醋酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇等:分析纯,成都市科龙化工试剂厂。

### 1.1.2 主要仪器设备

电子天平:CPA225D 型,德国赛多利斯股份公司;

高速万能粉碎机:FW-400A 型倾斜式,北京中兴伟业仪器有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-2 型,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;

紫外分光光度计:UV-3100PC 型,上海美谱达仪器有限公司;

冷冻离心机:ST16R 型,美国赛默飞世尔科技;

超纯水纯化系统:Milli-Q 型,美国密理博公司;

真空冷冻干燥机:SCIENTZ-12N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

真空干燥箱:DZF-6020 型,上海一恒科学仪器有限公司;

洁净工作台:SW-CJ 型,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;

医用冷藏箱:YC-280 型,澳柯玛股份有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 酯酶的提取 参考文献[14]的方法,并做适当修改。称取 5.0 g 粉碎后的小麦麸皮,加入 25 mL 磷酸氢钠缓冲液(pH 6.5)配制的 0.15 mol/L NaNO<sub>3</sub> 提取液,搅拌均匀后置入 35 °C 的水浴锅内水浴静置提取 60 min,纱布粗过滤后 8 000 r/min 冷冻离心 5 min,取上清液过滤即得粗酶液。

1.2.2 固定化酶的制备 分别将各载体膜裁剪成 1 cm × 1 cm 的正方形,用超纯水洗去表面残渣,室温晾干备用。取 1 mL 粗酶液于 25 mL 烧杯中,加入 3 mL 磷酸氢钠盐缓冲溶液摇匀,将膜片浸入固定化酶液中静置吸附 4 h 后取出置于玻璃板上,放进洁净工作台中打开排风扇,调至档位 2,通风 1 h 将膜片风干,以此制得固定化麦麸酯酶膜片。

1.2.3 酶活的测定 固定化前酶液酶活测定根据文献[14]修改如下:将吸收波长由 599 nm 换成 535 nm 测定吸光度,测定固定化酶的酶活时将固定化前酶液换为固定化酶膜片测定,将每分钟催化分解 1  $\mu$ mol  $\alpha$ -乙酸萘酯所需的酶量定义为 1 U。固定化前酶液酶活计算公式:

$$E = \frac{(b + k \times OD_{535 \text{ nm}}) \times V}{5 \times V_0} \times N, \quad (1)$$

式中:

$E$ ——每毫升固定化前酶液酶活力,U/mL;

$N$ ——酶液的稀释倍数;

$k$ ——某一 pH 下  $\alpha$ -萘酚的标准曲线的斜率;

$b$ ——标准曲线截距;

$OD_{535 \text{ nm}}$ ——反应后在波长 535 nm 处测得的吸光度;

$V$ ——反应体系总体积,mL;

$V_0$ ——测定酶活所用酶液体积,mL。

按式(2)计算固定化酶活:

$$E_0 = \frac{(b + k \times OD_{535 \text{ nm}}) \times V_1}{5 \times V_2} \times N_0, \quad (2)$$

式中:

$E_0$ ——每毫升固定化酯酶活力,U/mL;

$N_0$ ——酶液的稀释倍数;

$k$ ——某一 pH 下  $\alpha$ -萘酚的标准曲线的斜率;

$b$ ——标准曲线截距;

$OD_{535 \text{ nm}}$ ——反应后在波长 535 nm 处测得的吸光度;

$V_1$ ——反应体系总体积,mL;

$V_2$ ——固定化所用酶液体积,mL。

### 1.2.4 酶活回收率的计算 按式(3)计算酶活回收率:

$$R = \frac{E_0}{E} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

$R$ ——酶活回收率,%;

$E_0$ ——每毫升固定化酯酶活力,U/mL;

$E$ ——每毫升固定化前酶液酶活力,U/mL;

### 1.2.5 影响麦麸酯酶固定化效率的各项因素优化

(1) 固定化方法:控制酶用量为 1 mL 且酶液稀释倍数为 4 倍,载体膜为玻璃纤维素膜 GL-b04,将膜片浸入烧杯中的酶液后放进 4 °C 冰箱中静置吸附 4 h,取出膜片置于玻璃板上放进洁净工作台中风干,考察固定化方式分别为:1 mL E+1 mL GA+2 mL 1% BSA,1 mL E+1 mL GA+2 mL PBS,1 mL E+3 mL GA,1 mL E+3 mL PBS(pH 7.0)/1% BSA/超纯水时的酶活回收率。

(2) 膜种类:控制酶用量为 1 mL 且酶液稀释倍数为 4 倍,固定化方式为 E+PBS(pH 7.0),将不同膜片浸入烧杯中的酶液后放进 4 °C 冰箱中静置吸附 4 h,取出膜片置于玻璃板上放进洁净工作台中风干,考察载体膜为硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、聚酯纤维素膜、尼龙膜(Hybond N<sup>+</sup>)、定性滤纸时的酶活回收率。

(3) 稀释倍数:控制酶用量为 1 mL,固定化方式为 E+PBS(pH 7.0),载体膜为玻璃纤维素膜 GL-b04,将膜片浸入烧杯中的酶液后放进 4 °C 冰箱中静置吸附 4 h,取出膜片置于玻璃板上放进洁净工作台中风干,考察酶液稀释倍数为 2,3,4,5,6 倍时的酶活回收率。

(4) 缓冲液 pH 值:控制酶用量为 1 mL 且酶液稀释倍数为 4 倍,固定化方式为 E+PBS,载体膜为玻璃纤维素膜 GL-b04,将膜片浸入烧杯中的酶液后放进 4 °C 冰箱中静置吸附 4 h,取出膜片置于玻璃板上放进洁净工作台中风干,考察 PBS 缓冲液 pH 值为 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0 时的酶活回收率。

(5) 固定化温度:控制酶用量为 1 mL 且酶液稀释倍数为 4 倍,固定化方式为 E+PBS(pH 7.0),载体膜为玻璃纤维素膜 GL-b04,将膜片浸入烧杯中的酶液后放进 4 °C 冰箱以及不同温度水浴锅中静置吸附 4 h,取出膜片置于玻璃板上放进洁净工作台中风干,考察固定化温度为 4,10,20,30,40,50 °C 时的酶活回收率。

(6) 固定化时间:控制酶用量为 1 mL 且酶液稀释倍数为 4 倍,固定化方式为 E+PBS(pH 7.0),载体膜为玻璃纤维素膜 GL-b04,将膜片浸入烧杯中的酶液后放进 30 °C 水浴锅中静置吸附不同的时间,取出膜片置于玻璃板上放进洁净工作台中风干,考察固定化时间为 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 h 时的酶活回收率。

(7) 膜片干燥方式:控制酶用量为 1 mL 且酶液稀释倍数为 4 倍,固定化方式为 E+PBS(pH 7.0),载体膜为玻璃纤维素膜 GL-b04,将膜片浸入烧杯中的酶液后放进 30 °C 水浴锅中静置吸附 4 h,取出膜片置于玻璃板上,考察干燥方式为室温风干(约 25 °C,1 h)、真空干燥(0.09 MPa,25 °C,30 min)、真空冷冻干燥(<20 Pa,-50 °C,30 min)时的酶活回收率。

(8) 响应面法优化麦麸酯酶固定化试验:根据单因素试验结果,运用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,分别以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  表示关键因子,-1、0、+1 代表高、中、低水平。利用 Design Expert 10 软件设计响应面试验,得出各因素之间的最佳结合。以优化麦麸酯酶固定化的条件参数,选择最优的固定化条件。每个试验做 3 组平行,取平均值。

### 1.3 数据处理

本研究均采用 3 次平行重复试验,采用 Microsoft Excel 2013 对数据进行统计与作图,采用 Design Expert 10 设计响应面试验及其数据统计分析,采用 SPSS 22 对数据进行显著性分析与多重比较。 $0.01 < P < 0.05$  为差异显著。 $P < 0.01$ ,为差异极显著; $P > 0.05$  为差异不显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 各因素对麦麸酯酶固定化效率的影响

2.1.1 固定化方式对酶活回收率的影响 由图 1(a)可知,采用交联法将麦麸酯酶固定化,不管是否添加保护剂,随着戊二醛(GA)浓度的增加,酶活回收率不断减小。其中方式 1 当中 0.01% GA 的酶活回收率没有 0.05% GA 交联的方式高,但检测体系透过率要略高于 0.05% GA 交联,可能是 0.05% GA 交联了更多的牛血清白蛋白,造成反应液透过率下降,吸光度增加,从而导致酶活回收率增加。当戊二醛浓度增加到 0.5% 时,各交联方式所测得的酶活回收率都较低,而此时固定化酶液已经被氧化为了淡黄色,原因可能是戊二醛的化学性质非常活泼,不仅能与酶蛋白分子中的氨基进行交联,还会氧化氮原子形成淡黄色的聚合物,导致酶活性构象发生变化,从而使酶失去活性<sup>[15-16]</sup>。这与前人<sup>[17-18]</sup>的研究结果相似。图 1(b)是针对方式 1 和方式 4 中酶活回收率异常较大且测定酶活时,反应液肉眼可看见浑浊的几组数据测定其反应液的透过率。采用方式 4 即吸附法将酶固定化时,E+BSA 虽然酶活回收率最高,达到了(47.638 4±0.356 5)%,但此时反应体系肉眼可见大量的浑浊,透过率也仅为

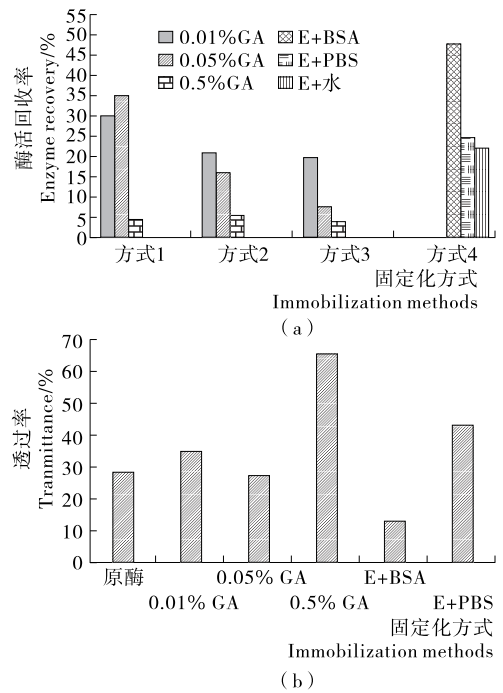
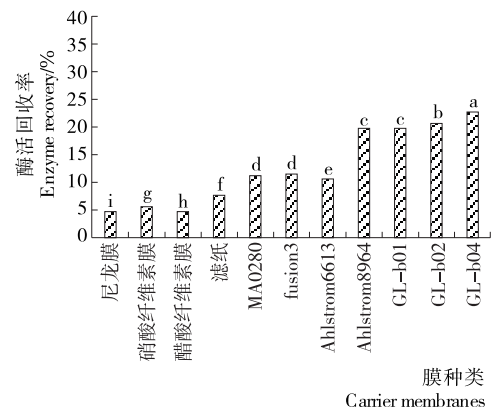


图 1 固定化方法对酶活回收率的影响

Figure 1 Effect of different method on the enzyme recovery of immobilized enzyme

(13.433 3±3.066 5)%。原因可能是膜片不仅吸附了酶,同时还吸附了作为保护剂的 BSA,当反应结束后加入了盐酸,使得 BSA 变性絮凝,从而导致检测体系浑浊,进而吸光度增加,酶活回收率增大。虽然采用方式 1 交联后的酶活要高于吸附法,但其检测体系的透过率远不如 E+PBS 高。因此,综合考虑酶活回收率和检测体系透过率,选择 E+PBS 的方式将麦麸酯酶吸附固定。

2.1.2 膜种类对酶活回收率的影响 由图 2 可知,采用毛细纤维结构明显的聚酯纤维素膜和玻璃纤维素膜载体固定化效果要显著高于普通的膜( $P < 0.05$ ),其中玻璃纤维素膜为载体的酶活回收率显著高于其他种类的膜( $P < 0.05$ )。原因可能是玻璃纤维素膜呈化学惰性,具有较多的毛细纤维结构,能吸附比同等纤维素膜更多的水分,流速快,耐高温,可



不同小写字母表示处理间差异达到显著水平( $P < 0.05$ )

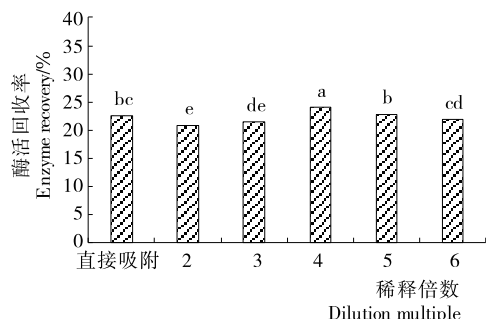
图 2 载体膜对酶活回收率的影响

Figure 2 Effect of different carrier membrane on the enzyme recovery of immobilized enzyme

用于细微颗粒的采集,且不含粘合剂,可单独作为固定化载体将酶较好地吸附固定<sup>[19]</sup>。而同类型玻璃纤维膜之间有一定差异,可能是膜的厚度、克重不同引起,其中GL-b04型号的玻璃纤维素效果最好,酶活回收率达到(22.855 7±0.027 0)%。因此,最终选择玻璃纤维素膜GL-b04作为麦麸酯酶固定载体。

**2.1.3 稀释倍数对酶活回收率的影响** 由图3可知,随着稀释倍数的增加,酶活回收率呈现先增加后降低的趋势。当酶浓度较低时,剩余的载体结合位点相对较多,固定化的酶量较少,总活力较低;当酶浓度较大时,载体上的结合位点趋向饱和,使大量的酶蛋白没有与载体结合,造成酶分子相互聚集成团,酶分子的活性中心有可能被遮盖<sup>[20-21]</sup>,尽管吸附的酶量较多,但酶的催化活性表现较低,同时一些酶分子进入载体的孔深处,使催化反应时底物和产物的扩散相对困难<sup>[22]</sup>,影响酶与底物的充分结合,固定化酶的催化效率降低,表现活力下降,这与孟玲等<sup>[7]</sup>采用离子吸附树脂吸附固定小麦酯酶的研究结果相一致。在本研究中当酶液稀释倍数为4倍时,酶活回收率达到最高,为(23.987 8±0.365 7)%。因此选择将酶液用磷酸氢钠盐缓冲溶液稀释4倍后再固定。

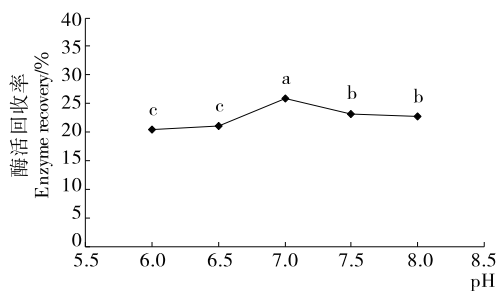
**2.1.4 缓冲溶液pH值对酶活回收率的影响** 由图4可知,随着磷酸氢钠盐缓冲液pH值的升高,酶活回收率呈现先增加后降低的趋势,在中性偏碱性缓冲液体系中的稳定性较偏酸性体系中好。分析原因可能是酶是一种蛋白质,有一NH<sub>2</sub>



不同小写字母表示处理间差异达到显著水平( $P<0.05$ )

图3 稀释倍数对酶活回收率的影响

Figure 3 Effect of different dilution multiple on the enzyme recovery of immobilized enzyme



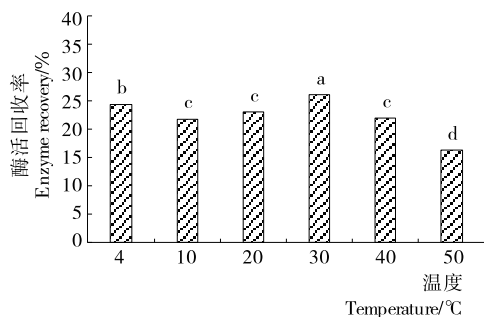
不同小写字母表示处理间差异达到显著水平( $P<0.05$ )

图4 pH值磷酸氢钠盐缓冲液对酶活回收率的影响  
Figure 4 Effect of different pH PBS on the enzyme recovery of immobilized enzyme

基团和—COOH基团,在低pH时,—NH<sub>2</sub>变为—NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,在高pH时,—COOH变为—COO<sup>-</sup>,而在中间范围形成两性离子,酶在不带电荷或带少量电荷时有利于载体与酶之间的相互吸附,一般在酶的最适pH值条件下固定的酶具有较高活性<sup>[23-24]</sup>,这与前人<sup>[25]75-82</sup>的研究结果相一致。由图4可知,当pH值为7.0时固定化酶的酶活回收率最大,为(25.890 7±0.868 3)%。因此,选用pH值7.0的磷酸氢钠盐缓冲液进行固定化。

**2.1.5 吸附温度对酶活回收率的影响** 由图5可知,随着固定化温度的升高,酶活回收率呈现先增加后降低的趋势,以4℃作为对照(即把酶液放入4℃冰箱中将其固定化),当固定化温度为30℃时酶活回收率达到最大,为(26.045 5±1.141 9)%。原因可能是在低温和高温时酶均遭到不同程度的破坏,当温度为30℃时,酶的空间构象没有遭到破坏或破坏很少,从而减少固定过程中的酶活损失。由于物理吸附是一个放热过程,随着温度增高,载体吸附的酶量降低;同时温度也影响着酶分子的运动、活力和稳定性<sup>[26]</sup>,一方面:升高温度,酶分子的布朗运动加快,酶易从载体表面脱出,使得反应加快,另一方面:温度升高,酶蛋白逐渐变性,超过一定范围则酶活下降。这与邵佳甲<sup>[27]</sup>关于大豆酯酶的固定化研究结果相一致。因此,在本研究中选择固定化温度为30℃。

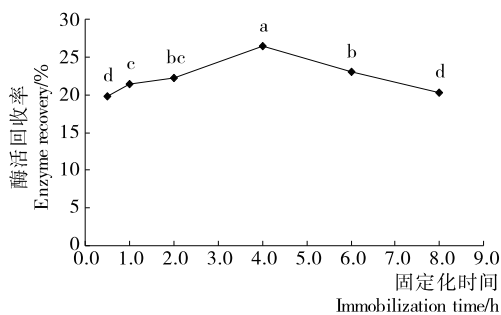
**2.1.6 吸附时间对酶活回收率的影响** 由图6可知,随着固定化时间的升高,酶活回收率呈现先增加后降低的趋势。原因可能是随着吸附时间增加,一方面玻璃纤维素膜载体的吸附空间接近饱和,无法再大量吸附酶液;另一方面游离酶在



不同小写字母表示处理间差异达到显著水平( $P<0.05$ )

图5 固定化温度对酶活回收率的影响

Figure 5 Effect of different immobilization temperature on the enzyme recovery of immobilized enzyme



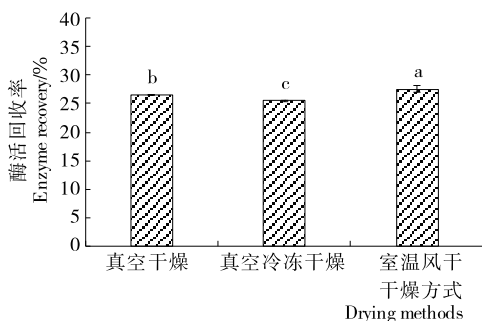
不同小写字母表示处理间差异达到显著水平( $P<0.05$ )

图6 固定化时间对酶活回收率的影响

Figure 6 Effect of immobilization time on the enzyme recovery of immobilized enzyme

缓冲溶液中放置时间过长导致一些酶的活力降低甚至丧失,同时随着蛋白载量的增加,会造成一定的空间位阻<sup>[28]</sup>,底物和产物扩散阻力变大,影响了酶的活力,使酶活回收率下降,这与前人<sup>[19][25]68-69</sup>的研究结果相似。由图 6 可知,当固定化时间为 4 h 时,酶活回收率达到最高,为(26.421 0 ± 0.708 9)%。因此,选择 4 h 作为固定化时间。

2.1.7 干燥方式对酶活回收率的影响 由图 7 可知,固定化酶的干燥方式为室温风干时酶活回收率最高,可能是因为真空干燥及真空冷冻干燥过程中,水分在低温及真空中迅速凝结成冰,导致一些结合不牢固的酶分子脱落而暴露在空气中被氧化导致酶活回收率降低<sup>[29]</sup>。因此,选择室温风干的方式将膜片干燥,即将膜片取出后置于玻璃板上,放入洁净工作台,打开排风扇 1 h 将膜片风干。



不同小写字母表示处理间差异达到显著水平( $P < 0.05$ )

图 7 干燥方式对酶活回收率的影响

Figure 7 Effect of different drying method on the enzyme recovery of immobilized enzyme

## 2.2 响应面法优化麦麸酯酶固定化条件

2.2.1 响应面法因素与水平的选择 根据单因素试验结果,选择连续变量中对酶活回收率影响显著的 pH、固定化时间、固定化温度作为影响因子,以酶活回收率作为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面法,因素编码及水平见表 1。

2.2.2 回归模型的建立与检验 响应面设计方案及结果见表 2,中心点试验重复 3 次,每个试验做 3 组平行,取其平均值。采用 Design Expert 10 软件对表 2 试验结果进行多元回归拟合,得到固定化麦麸酯酶酶活回收率对 pH、固定化时间、固定化温度的二元多项式回归模型为:

$$Y = 28.17 + 0.30X_1 - 0.34X_2 - 0.42X_3 - 0.46X_1X_2 + 0.12X_1X_3 - 0.34X_2X_3 - 2.44X_1^2 - 2.38X_2^2 - 2.50X_3^2 \quad (4)$$

由回归模型方差分析的结果(表 3)可知,该方程回归显著,模型的校正决定系数  $R_{adj}^2$  为 0.997 5 ( $> 0.80$ ) 和变异系数(CV)为 0.72%,说明该模型只有 0.25% 的变异,能由该模型

表 1 响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and their coded tested in response surface analysis

水平	X <sub>1</sub> pH	X <sub>2</sub> 固定化时间/h	X <sub>3</sub> 固定化温度/℃
-1	6.5	2	20
0	7.0	4	30
1	7.5	6	40

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken design and results for response surface analysis

试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	酶活回收率/%
1	1	0	1	23.18
2	-1	0	1	22.25
3	0	-1	1	23.72
4	1	-1	0	24.33
5	-1	-1	0	22.91
6	1	1	0	22.86
7	0	1	1	22.21
8	0	-1	-1	23.69
9	0	0	0	28.05
10	0	0	0	28.29
11	1	0	-1	23.97
12	0	0	0	28.16
13	-1	0	-1	23.51
14	0	1	-1	23.56
15	-1	1	0	23.29

解释。回归方程  $P < 0.000 1$ , 表明回归模型极显著。失拟项的  $P = 0.268 7$ , 为不显著,说明数据中没有异常点,不需要引入更高次数的项,模型合适,进一步说明模型拟合度较好,可用来对麦麸酯酶的固定化条件进行初步分析和预测。由表 3 可知,方程中  $X_2X_3$  对酶活回收率的影响达到显著水平,而方程中  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  对酶活回收率的影响达到极显著水平。表明试验因子对响应值的关系不是简单的线性关系,这和模型回归中的线性和平方项影响显著项相对应。对固定化麦麸酯酶酶活回收率影响的主次因素依次为固定化温度 > 固定化时间 > 缓冲液 pH。

2.2.3 麦麸酯酶固定化条件的确定及验证 根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程,利用 Design-Expert 10 软件获得了麦麸酯酶固定化的最佳条件为:磷酸盐缓冲液 pH 值 7.03、固定化时间 3.85 h、固定化温度 29.22 °C,此条件下酶活回收率的预测值为 28.21%。为了检验模型预测的准确性,考虑到实际操作的可行性,实际固定化工艺条件修订为:缓冲液 pH 值 7.0、固定化时间 4 h、固定化温度 29 °C。在该优化条件下进行 3 次验证实验,所得酶活回收率平均值为 27.51%,与预测值较为接近(相对误差为 2.48%),证明该模型能较好地预测固定化麦麸酯酶的实际酶活回收率。

通过响应面法优化麦麸酯酶固定化工艺之后,固定化酶活的回收率只有不到 30%,而通过测定固定化后酶液的酶活,还保留有(62.746 5 ± 2.660 8)% 的酶活,空白对照组(即取 1 mL 粗酶液于 25 mL 烧杯中用 pH 7.0 的 PBS 稀释 4 倍,置于 29 °C 水浴锅中静置 4 h 后)的酶活保留率还有(64.253 6 ± 2.985 6)%。因此,可以看出,酶液量已经远远超过载体膜片的吸附上限,使膜片吸附酶蛋白达到饱和而无法再吸附酶,造成酶液过量,此时可以考虑固定化酶液的再次利用,避免造成酶液浪费。当酶液在 29 °C 条件下存放 4 h 后

表3 回归方程方差分析及回归系数显著性分析

Table 3 Analysis of variance for the established regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P>F	显著性
模型	61.55	9	6.84	223.07	< 0.000 1	* *
X <sub>1</sub>	0.71	1	0.71	23.09	0.004 9	* *
X <sub>2</sub>	0.93	1	0.93	30.39	0.002 7	* *
X <sub>3</sub>	1.42	1	1.42	46.30	0.001 0	* *
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.86	1	0.86	27.91	0.003 2	* *
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.06	1	0.06	1.80	0.237 3	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.48	1	0.48	15.53	0.011 0	*
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	22.04	1	22.04	718.98	< 0.000 1	* *
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	20.84	1	20.84	679.80	< 0.000 1	* *
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	23.00	1	23.00	750.21	< 0.000 1	* *
残差	0.15	5	0.03			
失拟项	0.12	3	0.04	2.87	0.268 7	不显著
纯误差	0.03	2	0.01			
总方差	61.70	14				

† \* \* 表示差异极显著,  $P < 0.01$ ; \* 表示差异显著,  $0.01 < P < 0.05$ 。

酶活损失率约为 40%, 在不对酶液进行固定化时, 也就意味着有 40% 左右的酶活被浪费, 而对酶液进行固定化后, 在损失的 40% 里面有将近 30% 的酶活被保留, 能够进行再次利用。

### 3 结论

本研究在单因素试验的基础上, 运用 Box-Behnken 响应面设计优化得到吸附法固定麦麸酯酶的最佳条件为: 磷酸盐缓冲液 pH 值 7.0、固定化时间 4 h、固定化温度 29 °C, 此模型下酶活回收率的预测值为 28.21%, 验证值为 27.51%, 是预测值的 97.52%。试验证明响应面分析法可以有效优化吸附法固定麦麸酯酶的固定化条件, 这为进一步研究固定化麦麸酯酶的应用提供了科学数据。

#### 参考文献

[1] 王亚飞. 农药残留速测技术研究进展[J]. 世界农药, 2009, 31(1): 42-44.

[2] 江媛媛, 刘芳, 陈庆川, 等. 农药检测用植物酯酶的筛选及提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 69-73.

[3] 雷明, 张檀, 文建雷, 等. 农药残留检测用植物酯酶的筛选[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1): 183-187.

[4] 周艳利. 大豆酯酶同工酶分离纯化及其对有机磷和氨基甲酸酯类农药敏感性的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.

[5] 刘文君. 小麦酯酶农药速测卡的研制和应用[D]. 南宁: 广西大学, 2007: 34-36.

[6] 范钦华, 周小凡. 凹凸棒土固定化植物酯酶研究[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(1): 23-28.

[7] 孟玲, 夏泉, 刘长江. 小麦酯酶的固定化研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(2): 355-356.

[8] 夏文水, 谭丽. 壳聚糖固定化酶研究进展[J]. 食品与机械, 2007, 23(6): 7-10.

[9] 范钦华, 周小凡. 固定化植物酯酶的制备及应用[J]. 现代化工, 2015, 35(3): 112-118.

[10] 徐艳阳, 蔡森森, 陈珊珊, 等. 黑豆酯酶固定化条件的优化研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(7): 57-62.

[11] 江媛媛. 有机磷农药检测用植物酯酶的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012: 43-50.

[12] 穆随选. 有机磷及氨基甲酸酯类农药残留检测用豇豆酯酶的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 43-45.

[13] 胡晓燕. 有机磷农药对植物酯酶的抑制及应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009: 59-63.

[14] 杨雪, 张志清, 李青莲, 等. 响应面分析法优化麦麸酯酶双水相萃取的条件[J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 257-263.

[15] SASSOLAS A, BLUM L J, LECA-BOUVIER B D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 489-511.

[16] 农嘉仪, 李敏英, 叶剑威, 等. 交联酶聚集体法制备单宁酶及固定化酶性质研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 154-158.

[17] 朱松明, 周晨楠, 和劲松, 等. 基于酶抑制法的农药残留快速比色检测[J]. 农业工程学报, 2014, 30(6): 242-248.

[18] 张雪吟. 基于比色酶片与金标免疫层析试纸的食品安全快速检测技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 13-15.

[19] 曲慧, 车育, 姜爱莉, 等. 玻璃纤维壳聚糖膜固定乙酰胆碱酯酶的研究[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工版, 2013, 26(3): 178-181.

[20] LI Yan-rong, GAN Zhi-yong, LI Yan-fen, et al. Immobilization of acetylcholinesterase on one-dimensional gold nanoparticles for detection of organophosphorous insecticides[J]. Science China Chemistry, 2010, 53(4): 820-825.

[21] WANG Yu-hui, MA Qian-qian, LIU Li, et al. Can immobilized enzymes be applicable for homogeneous reaction? A novel technique of acetylcholinesterase immobilization for assaying carbaryl pesticide[J]. Colloid Journal, 2011, 73(1): 12-17.

[22] 王冕, 王如福, 张茜. 固定化酸性蛋白酶载体的选择及其性质[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 89-94.

[23] JESIONOWSKI T, ZDARTA J, KRAJEWSKA B. Enzyme immobilization by adsorption: a review[J]. Adsorption, 2014, 20(5/6): 801-821.

[24] HOU Chang-jun, HE Kun, YANG Li-min, et al. Catalytic characteristics of plant-esterase from wheat flour[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(2): 541-548.

[25] 孟玲. 辽春 9 号小麦酯酶的分离纯化、固定化研究及在有机磷农药残留快速检测中的应用[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2006.

[26] TÜMTÜRK H, ŞAHİN F, DEMIREL G. A new method for immobilization of acetylcholinesterase[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2007, 30(2): 141-145.

[27] 邵佳甲. 大豆酯酶的固定化及应用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008: 41-44.

[28] SUN Xia, WANG Xiang-you. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(12): 2 611-2 614.

[29] GUO Xi-shan, ZHANG Xue-yin, CAI Qiang, et al. Developing a novel sensitive visual screening card for rapid detection of pesticide residues in food[J]. Food Control, 2013, 30(1): 15-23.