

Fe₃O₄-SA/CS 微球固定菠萝蛋白酶 及其酶学性质研究

王 丹^{1,2} 耿丽晶^{1,2} 黄 薇^{1,2} 付 航^{1,2} 刘晓宇^{1,2}

Muhammad Zain Ul Aabideen^{1,2} Mbinga Isequias Elamba Tertulliano^{1,2}

周 围³

(1. 锦州医科大学食品与健康学院, 辽宁 锦州 121000; 2. 辽宁省肉类加工与质量安全控制专业技术创新中心, 辽宁 锦州 121000; 3. 锦州医科大学分子细胞生物学与新药重点实验室, 辽宁 锦州 121000)

摘要: [目的] 对稳定性较差的菠萝蛋白酶(Bromelain)进行固定化技术改良, 提高其利用率、稳定性和贮藏性。[方法] 通过响应面法优化磁性壳聚糖/海藻酸钠固定菠萝蛋白酶(Fe₃O₄-SA/CS-Br)的最佳制备工艺。对 Fe₃O₄-SA/CS-Br 进行表征并测定其 K_m 值、操作稳定性、热稳定性、贮藏稳定性及应用效果。[结果] Fe₃O₄-SA/CS-Br 的最佳制备条件为 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为 1:4, Fe₃O₄ 质量浓度为 10 mg/mL, CaCl₂ 质量浓度为 32 mg/mL, 固定时间为 106 min, pH 为 7.0, 酶质量浓度为 1.0 mg/mL。扫描电镜、红外光谱及 X 衍射光谱结果表明, Bromelain 的主要基团被成功固定至 Fe₃O₄-壳聚糖/海藻酸钠(Fe₃O₄-SA/CS)微球上。经固定化处理后的 Bromelain 与底物的亲和性增强, 提高了稳定性和应用效果。[结论] Fe₃O₄-SA/CS-Br 可有效增强 Bromelain 的稳定性。

关键词: 磁性微球; 壳聚糖; 海藻酸钠; 固定化; 菠萝蛋白酶; 酶学性质

Immobilization of bromelain on Fe₃O₄-SA/CS microspheres and its enzymatic properties

WANG Dan^{1,2} GENG Lijing^{1,2} HUANG Wei^{1,2} FU Hang^{1,2} LIU Xiaoyu^{1,2}

Muhammad Zain Ul Aabideen^{1,2} Mbinga Isequias Elamba Tertulliano^{1,2} ZHOU Wei³

(1. College of Food and Health, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Liaoning Province Meat Processing and Quality Safety Control Professional Technology Innovation Center, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 3. Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: [Objective] To improve the immobilization technology of bromelain which has poor stability to enhance its utilization, stability, and storage performance. [Methods] The preparation process of magnetic chitosan/sodium alginate immobilized bromelain (Fe₃O₄-SA/CS-Br) is optimized by the response surface methodology. The Fe₃O₄-SA/CS-Br is characterized and its K_m value, operational stability, thermal stability, storage stability, and application effectiveness are determined. [Results] The optimal preparation conditions for Fe₃O₄-SA/CS-Br are as follows: $m_{\text{chitosan}}:m_{\text{sodium alginate}}$ ratio of 1:4, Fe₃O₄ mass concentration of 10 mg/mL, CaCl₂ mass concentration of 32 mg/mL, immobilization time of 106 min, pH value of 7.0, and enzyme mass concentration of 1.0 mg/mL. According to the results from scanning electron microscopy, infrared spectrum, and X-ray diffraction spectrum, the main functional groups of bromelain are successfully immobilized on Fe₃O₄-chitosan/sodium alginate (Fe₃O₄-SA/CS) microspheres. The affinity of bromelain for the substrate is enhanced after immobilization.

基金项目: 辽宁省应用基础研究计划(编号:2023JH2/101300172); 锦州医科大学大学生创新创业项目(编号:X202410160009X); 辽宁省省级大学生创新创业项目(编号:S202310160003X)

通信作者: 耿丽晶(1981—), 女, 锦州医科大学教授, 博士。E-mail: gengli777@126.com

收稿日期: 2024-10-07 **改回日期:** 2025-03-13

引用格式: 王丹, 耿丽晶, 黄薇, 等. Fe₃O₄-SA/CS 微球固定菠萝蛋白酶及其酶学性质研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(5): 27-35.

Citation: WANG Dan, GENG Lijing, HUANG Wei, et al. Immobilization of bromelain on Fe₃O₄-SA/CS microspheres and its enzymatic properties[J]. Food & Machinery, 2025, 41(5): 27-35.

[Conclusion] Fe_3O_4 -SA/CS-Br can effectively enhance the stability of bromelain.

Keywords: magnetic microsphere; chitosan; sodium alginate; immobilization; bromelain; enzymatic property

菠萝蛋白酶(Bromelain)是一种蛋白水解酶^[1],含有多种氨基酸,且有一个低聚糖链与蛋白肽相连,具有嫩化肉质、制备蛋白肽、消炎等作用^[2],但在高温和长期贮藏后,其操作稳定性较差,无法重复利用^[3]。因此,需要对菠萝蛋白酶进行固定化技术改良,从而提高其利用率、稳定性和贮藏性^[4]。常见的固定化技术分为吸附法、包埋法、共价法和交联法。由于菠萝蛋白酶多用于食品中,选择的固定化载体要求简单、无毒。作为天然聚合物的壳聚糖、海藻酸钠不仅满足无毒要求,还具有较高的降解性和聚合性。田秀悦^[5]以壳聚糖—明胶—海藻酸钠作为复合材料固定化漆酶,以没食子酸为反应底物时,能显著提高漆酶的荧光特性。Shi等^[6]利用海藻酸钠壳聚糖制作凝胶珠固定 α -葡萄糖苷酶,其耐温性增强,具有高稳定性和重复利用性,且对地榆葡萄糖苷酶的抑制活性最强。

Fe_3O_4 作为一种磁性材料,通过亚铁(Fe^{2+})和铁离子(Fe^{3+})的相互作用,均匀地分散于水中并与酶相互交联为固定化酶^[7]。采用 Fe_3O_4 包覆成功的固定化乳糖酶,其 K_m 值小于游离酶,使酶和底物的亲和力变大,从而加快酶促反应,增加酶的稳定性^[8]。此外,科学家们通过研究生物酶的酶促反应动力学,可更加充分地了解生物酶的生物调控方法及生物控制结构,更好地判断酶的分子构型^[9]。

研究拟采用磁性壳聚糖—海藻酸钠(Fe_3O_4 -SA/CS)微球为载体原料,将 Fe_3O_4 中的磁性铁离子与菠萝蛋白酶包埋在一起,再滴入 CaCl_2 溶液使酶硬化制成固定化菠萝蛋白酶 Fe_3O_4 -SA/CS-Br。通过响应面法优化 Fe_3O_4 -SA/CS-Br制备工艺,利用扫描电镜(SEM)、红外光谱(FTIR)及X衍射光谱(XRD)对该酶固定微球进行表征,测定其米氏常数 K_m ,探究其操作稳定性、热稳定性和贮藏稳定性等酶学性质,并初探 Fe_3O_4 -SA/CS-Br对牛肉多肽提取率的影响,以期为提高菠萝蛋白酶的重复利用率及稳定性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菠萝蛋白酶:3 000 U/g,纯度 $\geq 95\%$,晟发生物科技有限公司;

四氧化三铁:分析纯,天津市光复科技有限公司;

壳聚糖、海藻酸钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

溴化钾:光谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

扫描电镜:Zeiss evo 18型,卡尔蔡司光学有限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:FTIR-850型,天津港东科技股份有限公司;

X射线衍射仪:D8 advance型,德国布鲁克衍射荧光事业部;

酶标仪:Readmax 1900型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 Fe_3O_4 -SA/CS-Br的制备工艺 参考原卉卉等^[10]的方法并修改。将菠萝蛋白酶溶于PBS(0.01 mmol/L)中配制成酶液,取适量壳聚糖和海藻酸钠,加入25 mL蒸馏水,加热搅拌至完全溶解,加入适量 Fe_3O_4 低速搅拌30 min,冷却至室温,加入5 mL酶液再次搅拌10 min,用5 mL注射器将混合凝胶挤入 CaCl_2 溶液中,常温下匀速搅拌固定,形成 Fe_3O_4 -SA/CS-Br,用蒸馏水清洗2~3遍,4℃下保存备用。

1.2.2 单因素试验 以 Fe_3O_4 -SA/CS-Br微球成型状态(形态、聚集状态、拖尾等)为指标,筛选壳聚糖与海藻酸钠($m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为1:2,1:3,1:4,1:5,1:6)的最佳配比。固定 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为1:4, Fe_3O_4 质量浓度为10 mg/mL、 CaCl_2 质量浓度为30 mg/mL、固定时间90 min、pH 7.0、酶质量浓度为1.0 mg/mL,分别考察 Fe_3O_4 质量浓度(5, 10, 15, 20, 25 mg/mL)、 CaCl_2 质量浓度(10, 20, 30, 40, 50 mg/mL)、固定时间(30, 60, 90, 120, 150 min)、pH(5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)、酶质量浓度(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL)对固定化酶相对酶活的影响。

1.2.3 Box-Behnken 响应面试验 以 Fe_3O_4 -SA/CS-Br相对酶活为考察指标,以 Fe_3O_4 质量浓度、 CaCl_2 质量浓度、固定时间为自变量,进行三因素三水平响应面优化试验。

1.2.4 Fe_3O_4 -SA/CS-Br相对酶活测定

(1) 蛋白浓度:参考陈伟杰^[11]的方法,绘制酪蛋白质量浓度—吸光度线性关系标准曲线 $Y=0.0543X-0.0105$, $R^2=0.9974$,根据线性方程求出菠萝蛋白酶浓度。

(2) 吸光度:参考Ma等^[12]的方法并修改。向5 mL Bromelain酶液中加入20 mL PBS(pH为7.0~7.2),与2%酪蛋白溶液于40℃水浴10 min,加入4 mL 0.4 mol/L三氯乙酸溶液,37℃水浴10 min,空白对照组先加入三氯乙酸溶液并在沸水中加热10 min后加酪蛋白溶液,其他步骤相同。用定性滤纸过滤,取上清液测定275 nm处吸光度。

(3) 相对酶活:测定固定化酶活时,用含有相同酶活力的 Fe_3O_4 -SA/CS-Br代替Bromelain,其他步骤相同。每克酶每分钟水解酪蛋白生成1 μL 酪氨酸定义为一个酶活力单位(U)。分别按式(1)、式(2)计算酶活力及相对酶活。

$$U = \frac{A - A_0}{A_s} \times M_s \times \frac{V}{t} \times \frac{D}{m}, \quad (1)$$

式中:

U ——酶活力, U/mL;

D ——稀释倍数;

A 、 A_0 ——上清液和空白对照组在 275 nm 处的吸光度;

M_s ——每毫升酪标准溶液中所含酪氨酸的微克数, μg ;

V ——反应体积, mL;

t ——反应时间, min;

m ——酶的质量, g。

$$RA = \frac{U_g}{U_b} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

RA ——相对酶活, %;

U_g ——Fe₃O₄-SA/CS-Br 活力, U/mL;

U_b ——Bromelain 活力, U/mL。

1.2.5 Fe₃O₄-SA/CS-Br 的表征

(1) 扫描电镜 (SEM): 将 Fe₃O₄-SA/CS-Br 冷冻干燥, 真空下进行喷金处理, 使用扫描电镜进行表面分析, 加速电压为 3.0 kV。

(2) 傅里叶红外变换光谱 (FTIR): 将 Fe₃O₄-SA/CS-Br 冷冻干燥, 用玛瑙研钵充分研磨, 添加 KBr 混合后压片, 以 KBr 为空白对照, 对 Bromelain、Fe₃O₄-SA/CS 微球和 Fe₃O₄-SA/CS-Br 进行表征。

(3) X-衍射光谱 (XRD): 分别称取 50 mg Bromelain、Fe₃O₄-SA/CS 微球和 Fe₃O₄-SA/CS-Br, 研磨, 通过 XRD 布鲁克 D8 advance 以 10 (°)/min 的速率对样品进行表征。

1.2.6 米氏常数测定 用 PBS 分别配制质量浓度为 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 g/L 的酪蛋白标准溶液, 并以此作为底物, 分别加入 1.0 g Bromelain 和相等酶活的 Fe₃O₄-SA/CS-Br, 摇匀, 40 °C 水浴 10 min, 测定其 OD_{275 nm} 值。采用 Lineweaver-Burk 作图法制作双倒数曲线获得 Fe₃O₄-SA/CS-Br 的米氏常数 K_m 值, 并与 Bromelain 进行对比。

1.2.7 Fe₃O₄-SA/CS-Br 的酶学性质

(1) 操作稳定性: 将 Fe₃O₄-SA/CS-Br 用 20 mL PBS 浸泡并于 40 °C 水浴 10 min, 重复操作 5 次, 以同等酶活的 Bromelain 为对照, 以相对酶活为指标检测其操作稳定性。

(2) 热稳定性: 将 Fe₃O₄-SA/CS-Br 与 Bromelain 分别于 30, 40, 50, 60, 70 °C 酶解 10 min, 以相对酶活为指标检测其热稳定性。

(3) 贮藏稳定性: 将 Fe₃O₄-SA/CS-Br 与 Bromelain 于 4 °C 下分别贮藏 40, 45, 50, 55, 60 d, 以相对酶活为指标检测其贮藏稳定性。

1.2.8 Fe₃O₄-SA/CS-Br 对牛肉多肽提取率的影响 参考 Zeng 等^[13-14]的方法并修改。

(1) 酶解: 将 Bromelain 和含有相同酶克数的 Fe₃O₄-

SA/CS-Br 溶解至 20 mL PBS 中, 定容至 100 mL, 得到酶最终添加量为 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5% 的酶液, 分别加入 20.0 g 搅碎的牛肉。37 °C、150 W 超声酶解 90 min。煮沸 10 min 灭酶, 抽滤, 冷冻干燥, 得牛肉多肽粉末备用。

(2) 牛肉多肽提取率: 参考朱清清等^[15]的方法。多肽浓度—吸光度标准曲线为 $Y=0.0149X+0.0138$, $R^2=0.9942$ 。将冻干的多肽粉末配制成 5 mg/mL 的样品溶液, 取 0.5 mL 与 0.5 mL 三氯乙酸溶液混匀, 4 000 r/min 离心多肽 15 min, 取上清液定容至 10 mL, 加入 3 mL 双缩脲试剂, 静置 10 min, 2 000 r/min 离心 15 min, 测定 540 nm 处吸光度, 代入标准曲线计算蛋白含量, 并参考邹佳琪^[16]的方法确定牛肉多肽提取率。

1.3 数据处理

采用 Design-Expert 13、Origin 2022 和 SPSS 27.0.1 软件进行数据处理、绘图和统计分析。单因素用方差分析、多重比较用 LSD 法检验数据间的差异显著性。所有试验均重复 3 次, 结果以 $\bar{X} \pm S$ 表示。字母不同表示差异显著 ($P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

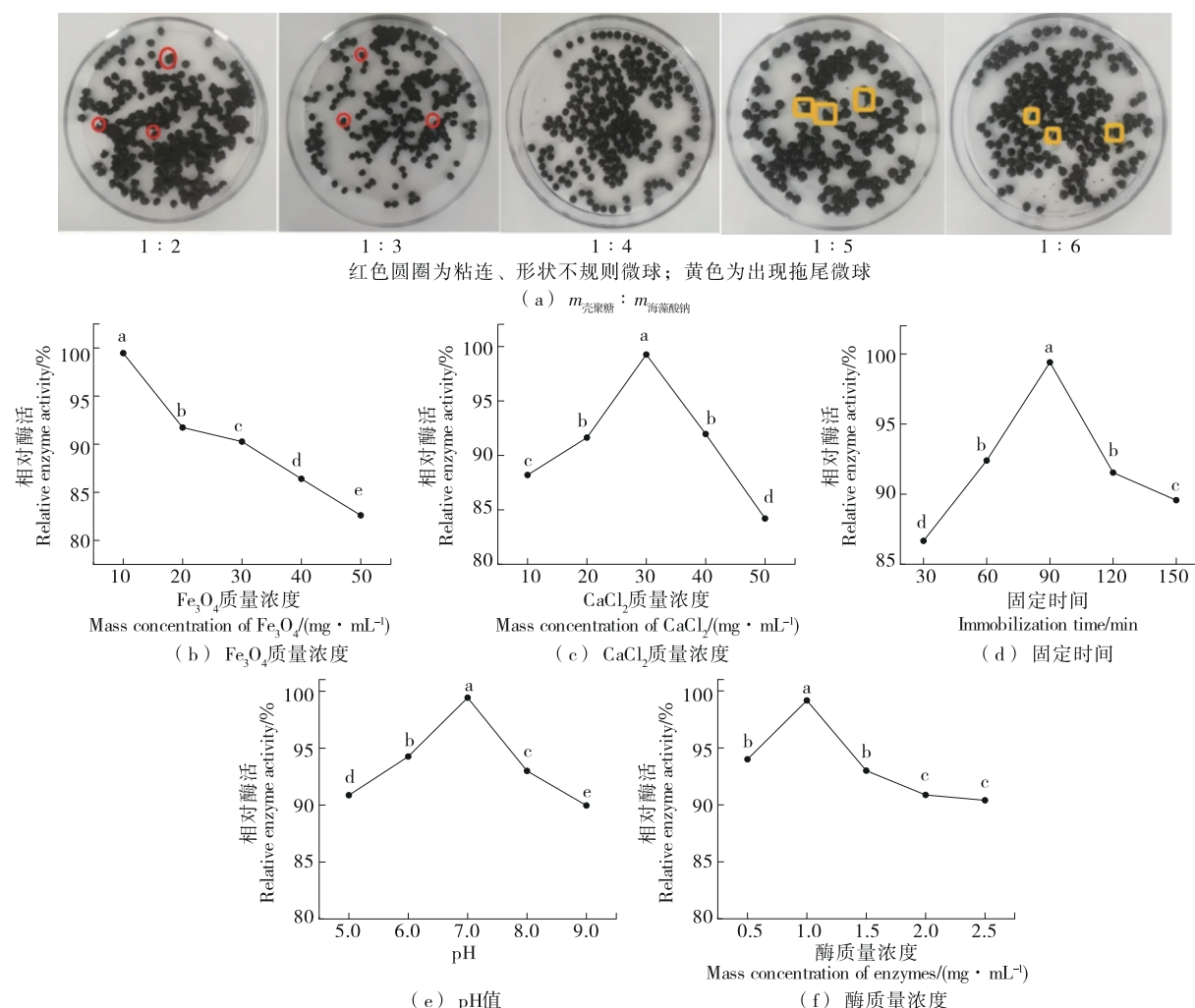
2.1 Fe₃O₄-SA/CS-Br 的制备工艺优化

2.1.1 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 对微球形态的影响 由图 1(a) 可知, 当 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为 1:2, 1:3 时, 微球形状不规则, 不易聚集; 当 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为 1:4 时, 微球呈球形且形状规则, 弹性适中; 当 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为 1:5, 1:6 时, 微球黏度过大不易挤出, 且出现轻微拖尾现象。故选择最适的 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}$ 为 1:4。

2.1.2 Fe₃O₄ 质量浓度对 Fe₃O₄-SA/CS-Br 相对酶活的影响 由图 1(b) 可知, 当 Fe₃O₄ 质量浓度为 10 mg/mL 时, Fe₃O₄-SA/CS-Br 的相对酶活最高 ($P < 0.05$), 可能是此时 Fe₃O₄ 能够利用范德华力、氢键、配位键和共价键等作用方式有效地与其他材料相结合, 使酶相对活性最高。当 Fe₃O₄ 质量浓度 > 10 mg/mL 时, Fe₃O₄-SA/CS-Br 的相对酶活较低, 可能是过量的 Fe₃O₄ 磁性吸附效果较差, 导致微团出现团聚, 无法充分与酶结合, 促使酶相对活性降低^[17], 且质量浓度 > 10 mg/mL 后, Fe₃O₄ 在壳聚糖/海藻酸钠混合胶体中分散不均匀, 出现结块现象, 导致所需搅拌时间延长。

2.1.3 CaCl₂ 质量浓度对 Fe₃O₄-SA/CS-Br 相对酶活的影响 由图 1(c) 可知, 当 CaCl₂ 质量浓度为 30 mg/mL 时, Fe₃O₄-SA/CS-Br 的相对酶活最高 ($P < 0.05$), 表明壳聚糖和海藻酸钠微珠能够受到 CaCl₂ 的影响, 且添加 30 mg/mL 的 CaCl₂ 可显著促进力学性能更强的微球形成, 可充分发挥出 SA/CS 载体的最大吸附效果^[18]。

2.1.4 固定时间对 Fe₃O₄-SA/CS-Br 相对酶活的影响 由图 1(d) 可知, 当固定时间为 90 min 时, Fe₃O₄-SA/CS-Br 相

图1 各因素对 Fe_3O_4 -SA/CS-Br相对酶活的影响Figure 1 Effects of various factors on the relative enzyme activity of Fe_3O_4 -SA/CS-Br

对酶活力最高,表现出最优的固定效果($P < 0.05$),当固定时间 $< 90 \text{ min}$ 时,其相对酶活力较低,可能是固定时间过短,微球的网络结构还较为松弛,无法将活性发挥到最优。当固定时间 $> 90 \text{ min}$ 时,相对酶活显著下降($P < 0.05$),可能是固定时间过长,酶的网络结构过密而产生位阻效应,导致酶活降低^[19]。

2.1.5 pH 值对 Fe_3O_4 -SA/CS-Br 相对酶活的影响 由图1(e)可知,当pH为7.0时, Fe_3O_4 -SA/CS-Br相对酶活力最高($P < 0.05$),这是由于pH值会影响酶和载体间的电荷性质,影响其固定化时的吸附程度^[20]。当pH为7.0时,菠萝蛋白酶与 Fe_3O_4 -SA/CS微球吸附效果最佳。

2.1.6 酶质量浓度对 Fe_3O_4 -SA/CS-Br 相对酶活的影响

由图1(f)可知,当酶质量浓度为1.0 mg/mL时, Fe_3O_4 -SA/CS-Br表现出最强的相对酶活力($P < 0.05$),酶添加量过多会影响酶与底物的有效接触,进而影响固定化酶活力。

2.1.7 Box-Behnken 响应面试验设计及分析 通过单因素试验,筛选出3个主要的制备条件,利用响应面软件Design-Expert 13.0.5.0进行试验方案设计,试验因素水平见表1,试验设计及结果见表2。得到回归方程为

$$Y = 32.47 + 28.24A + 24.15B + 0.25C + 2.00AB - 0.05AC + 0.10BC - 13.81A^2 - 5.82B^2 - 2.49C^2 \quad (3)$$

由表3可知,模型 $P = 0.0048 < 0.01$,回归模型差异极显著;失拟项 $P = 0.1344 > 0.05$,回归模型有意义,可进行响应值预测。

2.1.8 响应面试验优化 由图2可知,各因素间交互作用大小依次为 $BC > AB > AC$ 。各交互因素在响应面图中弯曲程度均呈先上升后下降趋势,与单因素试验结果相同。软件预测 Fe_3O_4 -SA/CS-Br的最佳工艺为 Fe_3O_4 质量浓度10.6 mg/mL, CaCl_2 质量浓度32.2 mg/mL,固定时间106.83 min,此时相对酶活预测值为98.20%。考虑到实际操作的可行性,将最佳工艺参数调整为 Fe_3O_4 质量浓度

表1 响应面试验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment design

水平	A Fe ₃ O ₄ 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	B CaCl ₂ 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	C 固定时 间/min
-1	5	20	60
0	10	30	90
1	15	40	120

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

试验号	A	B	C	相对酶活/%
1	-1	1	0	90.00
2	1	0	-1	95.47
3	0	0	0	99.62
4	0	0	0	100.00
5	0	0	0	99.23
6	-1	0	-1	89.43
7	0	-1	-1	90.94
8	0	-1	1	90.57
9	0	1	-1	85.28
10	-1	-1	0	90.00
11	1	1	0	91.66
12	0	1	1	97.36
13	0	0	0	96.60
14	1	0	1	95.85
15	0	0	0	100.00
16	-1	0	1	92.83
17	1	0	0	87.66

10 mg/mL, CaCl₂质量浓度 32 mg/mL, 固定时间 106 min。此最佳条件下制备的 Fe₃O₄-SA/CS-Br 的相对酶活为 (98.87±0.39)%, 与预测值结果基本一致, 说明此条件为最佳条件, 响应面试验结果准确。

2.2 固定化酶的特征

2.2.1 SEM 由图 3(a)和图 3(b)可知, 同一放大倍数下, Fe₃O₄-SA/CS-Br 的表面粗糙度比 Fe₃O₄-SA/CS 微球的大, 说明 Bromelain 成功固定在微球上, 且经过 600 倍扫描电镜的对比, Fe₃O₄-SA/CS-Br 比 Fe₃O₄-SA/CS 微球表现出更紧密度和均匀的结果, 而固定化酶表现出块状团聚体, 说明酶与载体的紧密性大大增加, 从而达到固定的目的。

2.2.2 FTIR 由图 3(c)可知, Bromelain 在 2 904 cm⁻¹ 处有明显的 C—H 伸缩键吸收峰, 而载体 Fe₃O₄-SA/CS 微球中没有, 但酶与载体结合体 Fe₃O₄-SA/CS-Br 在 2 851 cm⁻¹ 处有与 Bromelain 相似的 C—H 伸缩键吸收峰, 说明 Bromelain 可通过 C—H 键成功固定至 Fe₃O₄-SA/CS 微球

表3 方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	320.98	9	35.66	8.64	0.004 8	**
A	8.78	1	8.78	2.13	0.188 2	
B	3.29	1	3.29	80.00	0.401 7	
C	29.99	1	29.99	7.26	0.030 9	*
AB	4.00	1	4.00	0.97	0.357 8	
AC	2.28	1	2.28	55.00	0.481 6	
BC	38.75	1	38.75	9.38	0.018 2	*
A ²	50.15	1	50.15	12.15	0.010 2	*
B ²	142.07	1	142.07	34.40	0.000 6	**
C ²	21.20	1	21.20	5.13	0.057 8	
残差	28.91	7	4.13			
失拟项	20.75	3	6.92	3.39	0.134 4	
纯误差	8.16	4	2.04			
总离差	349.88	16				

† *表示显著差异 ($P < 0.05$); **表示极显著差异 ($P < 0.01$)。

载体上。Fe₃O₄-SA/CS-Br 只在 3 716 cm⁻¹ 处出现一个特殊的一NH 多重吸收峰, 同时 Fe₃O₄-SA/CS 微球在 3 595 cm⁻¹ 处的 C—H 的伸缩振动峰消失^[21], 这可能是由于 Bromelain 中含有氨基, 可与 Fe₃O₄-SA/CS 微球中的氢原子以一NH 化学键结合, 故在固定后的 Fe₃O₄-SA/CS-Br 中一NH 多重吸收峰增强。此外, Bromelain 中 3 309 cm⁻¹ 处吸收峰在 Fe₃O₄-SA/CS-Br 中消失, 1 423, 1 024, 621 cm⁻¹ 处吸收峰在固定化后减弱, 说明酶在固定化后, 其一NH、C—H、C—O 或 C—O—C 反对称的伸缩运动均减弱, 酶趋于更加稳定的状态。Fe₃O₄-SA/CS 微球中存在的特征吸收峰 (如 1 616, 1 634 cm⁻¹ 处的伯氨基团吸收峰等) 在固定化后基本都存在, 说明该微球作为固定 Bromelain 的载体很稳定。

2.2.3 XRD 由图 3(d)可知, Fe₃O₄-SA/CS 微球和 Fe₃O₄-SA/CS-Br 特征衍射峰在 35.63°, 43.34° 处分别对应 Fe₃O₄ 晶面的 (311) 和 (400), 可以确定在酶固定过程中, Fe₃O₄-SA/CS 微球结构未发生改变, 与文献[22]的研究结果一致。此外, Fe₃O₄-SA/CS-Br 在 30.09° 处出现一个特征衍射峰, 同 Bromelain 的 30.87° 特征衍射峰均对应 C₆H₁₂O₆ 的 (231) 晶面, 说明酶成功负载至 Fe₃O₄-SA/CS 微球上, 且与 Fe₃O₄SA/CS 相互作用结合形成新的结构。

2.3 米氏常数的测定

K_m 值可以近似地反映底物与酶分子之间的亲和力, 且 K_m 值大小与亲和力成反比^[23]。由图 4 可知, Bromelain 的 V_{max} 为 0.26 mol/(L·min), Fe₃O₄-SA/CS-Br 的为 0.17 mol/(L·min), 固定化前后酶的 V_{max} 变化不大, 说明利用 Fe₃O₄-SA/CS 微球作为固定化载体对 Bromelain 的活性

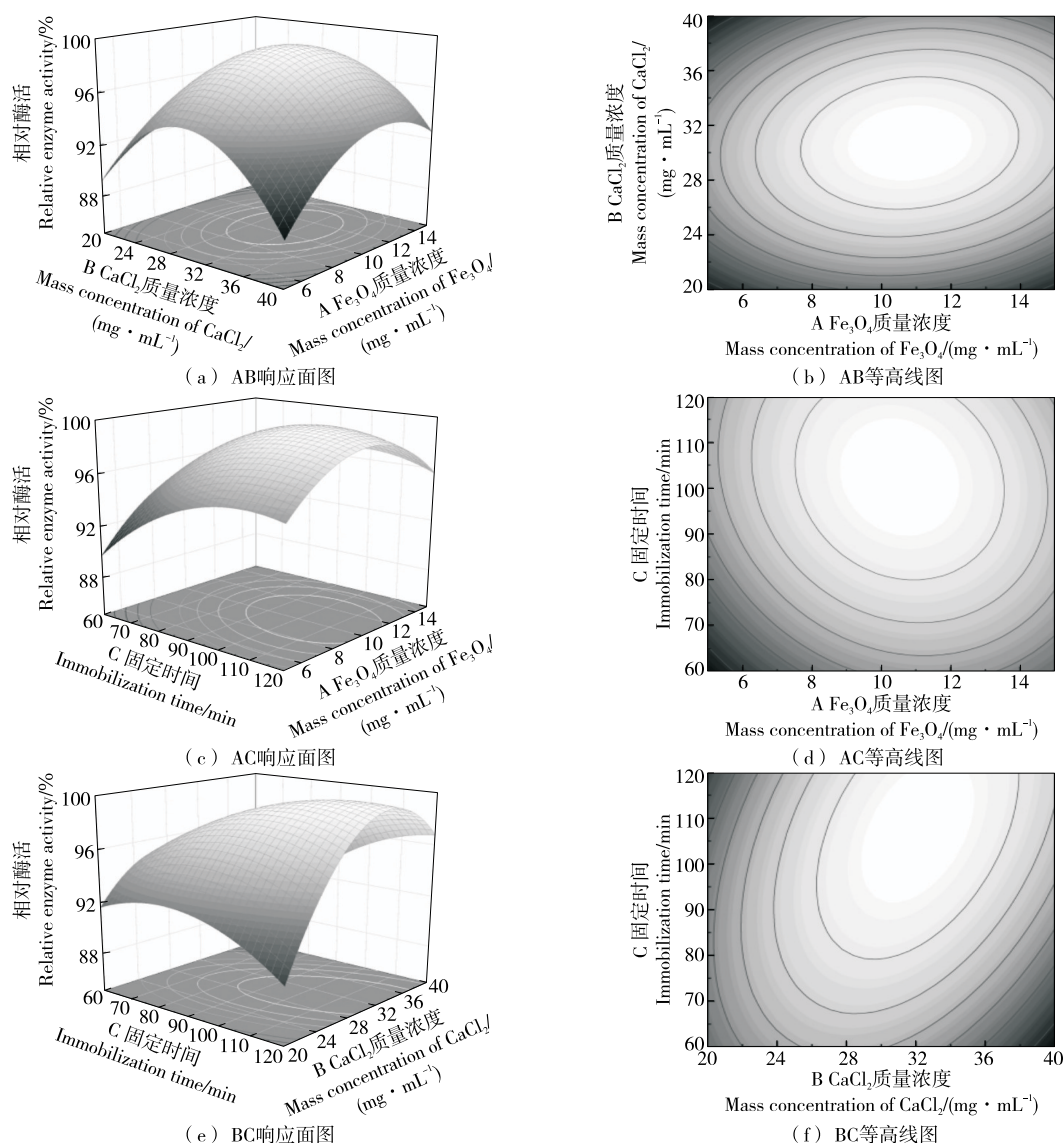


图2 各因素间交互作用对固定化酶相对酶活影响的响应面和等高线图

Figure 2 Response surface and contour map of the interaction among three factors on the relative activity of immobilized enzymes

影响较小。Bromelain 的 K_m 值为 6.65 mol/L , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 的为 4.99 mol/L , K_m 值降低, 说明固定化后酶与底物的亲和力增大。此外, 固定化过程可能会使酶分子构象更加稳定, 而 Bromelain 经 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS}$ 微球固定化处理后, 其结合能力和作用方式更强, 抑制酶活性中心的氨基酸残基如赖氨酸残基在载体上的固定, 改变空间位阻效应^[24], 使底物的转化效率增加, 同时也提高了酶的稳定性。

2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 的酶学性质

2.4.1 操作稳定性 由图 5(a) 可知, 经连续操作 5 次后, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 的相对酶活仍为 79.53%, 而 Bromelain 只能作用一次, 说明酶的使用次数得到了提高, 酶的回收利

用率较高, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 的操作稳定性显著增强 ($P < 0.05$)。重复操作 5 次后, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 微球仍保持良好的外观, 具有较好的机械性能以及重复利用率。固定化处理使得 Bromelain 与载体之间形成了多个连接点, 不仅强化了它们之间的结合力, 还提升了酶分子结构的稳定性。此外, 这种处理减缓了酶活性的释放速率, 并为酶提供了保护, 使其不易受到外部环境变化的影响而失活^[25]。

2.4.2 热稳定性 由图 5(b) 可知, 当热处理温度 $> 40^\circ\text{C}$ 时, 两种酶的相对酶活呈下降趋势, 但 Bromelain 的下降幅度显著大于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 的 ($P < 0.05$)。当热处理温度为 70°C 时, Bromelain 的相对酶活下降至 80.7%, 而

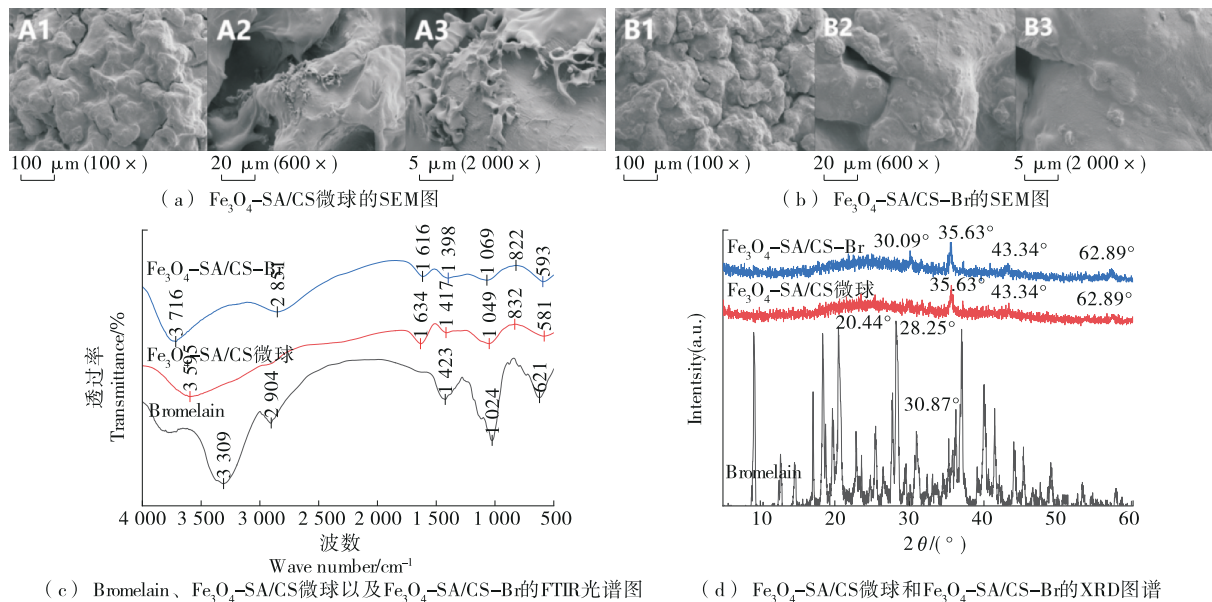
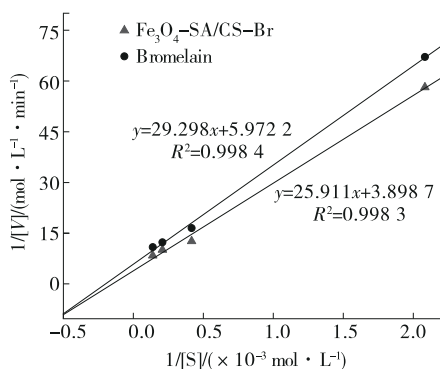


图3 固定化酶的特征

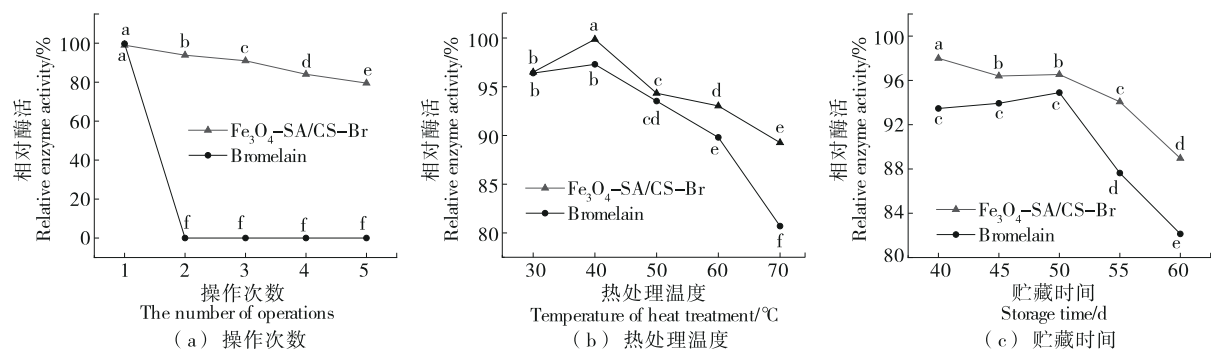
Figure 3 Characterization of immobilized enzymes

图4 Bromelain和Fe₃O₄-SA/CS-Br水解酪蛋白的双倒数图Figure 4 Double-reciprocal plot of casein hydrolyzed by bromelain and Fe₃O₄-SA/CS-Br

Fe₃O₄-SA/CS-Br的相对酶活仍维持在90%左右,显著高于Bromelain的($P<0.05$)。此外,试验制备的Fe₃O₄-SA/

CS-Br的相对酶活也显著高于陈至立^[26]的Bromelain(45%左右),说明经过固定化后酶的耐热稳定性远远大于游离酶的($P<0.05$)。这是由于酶受有机相的疏水作用影响,当酶长时间暴露于疏水表面时,通常对其热稳定性不利,而酶经过固定化处理后,酶与水的接触面积减小,延长了酶完全暴露的时间,从而达到增加酶耐热稳定性的效果。

2.4.3 贮藏稳定性 由图5(c)可知,4℃下贮藏60 d后,Bromelain的相对酶活为82.1%,而Fe₃O₄-SA/CS-Br的为88.4%,显著高于Bromelain的($P<0.05$)。同等贮藏温度下,试验制备的Fe₃O₄-SA/CS-Br的相对酶活显著高于以磷酸钙为载体固定的Bromelain的,说明Fe₃O₄-SA/CS固定材料能有效延长Bromelain的贮藏时间($P<0.05$)。由于载体的保护作用,固定化酶更能抵御环境变化的影响,这有助于保持酶的结构和活性位点。此外,固定化还能提

图5 Fe₃O₄-SA/CS-Br酶学性质Figure 5 Enzymatic properties of Fe₃O₄-SA/CS-Br

升酶对变性剂的抵抗力,从而在低温环境中维持其稳定性^[27]。

2.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 对牛肉多肽提取率的影响

由图 6 可知,菠萝蛋白酶固定前后对牛肉多肽提取率的影响整体呈先上升后下降趋势,且提取率均在酶添加量为 10.0% 时最高,说明经固定化处理后并未改变菠萝蛋白酶的基本生物活性。用 Bromelain 制备牛肉多肽的最大提取率为 63.21%,而 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 的为 70.72%,显著高于 Bromelain 的 ($P<0.05$)。这可能是用 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS}$ 微球作为酶的固定载体,稳定了酶活性,促进了酶活力的提高,使酶在多肽提取过程中活性保持更久,同时,固定化酶极易与反应体系分离,减少了提取过程中的损失,最终提高了多肽提取率^[28]。

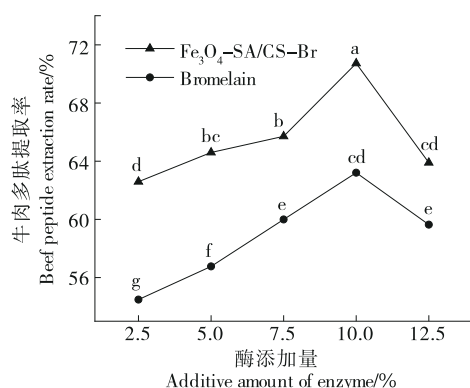


图 6 Bromelain 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ 对牛肉多肽提取率的影响

Figure 6 Effects of Bromelain and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SA/CS-Br}$ on the extraction rate of beef peptide

3 结论

研究将壳聚糖/海藻酸钠充分融合并加入 Fe_3O_4 制作磁性微球以达到对菠萝蛋白酶的固定作用。结果表明,磁性壳聚糖/海藻酸钠固定菠萝蛋白酶的最佳工艺条件为 $m_{\text{壳聚糖}}:m_{\text{海藻酸钠}}=1:4$, Fe_3O_4 质量浓度 10 mg/mL, CaCl_2 质量浓度 32 mg/mL, 固定时间 106 min, pH 7.0, 酶质量浓度 1.0 mg/mL。磁性壳聚糖/海藻酸钠固定菠萝蛋白酶的扫描电镜、红外光谱及 X 衍射光谱表征结果表明,酶与微球紧密结合,固定化酶与游离酶具有同一晶面的特征衍射峰,说明游离酶负载成功。酶促反应动力学显示固定化酶的 K_m 值小于游离酶,说明固定化处理后,酶的亲和力增加,活力增强。固定化后,磁性壳聚糖/海藻酸钠固定菠萝蛋白酶的可使用次数明显延长,热稳定性和贮藏稳定性显著增加。磁性壳聚糖/海藻酸钠固定菠萝蛋白酶能够有效提高牛肉多肽的提取率,且高于菠萝蛋白酶的。后续可研究磁性壳聚糖/海藻酸钠固定菠萝蛋白酶在其他方面的实践应用效果。

参考文献

- [1] 陈辉, 黄惠华. 菠萝皮渣羧甲基纤维素/海藻酸钠复合水凝胶珠固定化菠萝蛋白酶的制备及稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 131-134, 141.
- [2] CHEN H, HUANG H H. Preparation and stability of bromelain immobilization with pineapple peel residue carboxymethyl cellulose, sodium alginate composite hydrogel beads[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 131-134, 141.
- [3] KUMAR V, MANGLA B, JAVED S, et al. Bromelain: a review of its mechanisms, pharmacological effects and potential applications[J]. Food & Function, 2023, 14(18): 8 101-8 128.
- [4] MUHAMMAD Z A, AHMAD T. Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care: a review[J]. JPMA the Journal of the Pakistan Medical Association, 2017, 67(1): 121-125.
- [5] 段昌园, 姜雪, 曾宏威, 等. 表面偶极离子亲水磁珠固定化异柠檬酸裂解酶及其表征[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(1): 20-28.
- [6] DUAN C Y, JIANG X, ZENG H W, et al. Immobilization of isocitrate lyase on amphoteric Ion-Rich hydrophilic magnetic beads and its characterization[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(1): 20-28.
- [7] 田秀悦. 海藻酸钠-明胶-壳聚糖复合材料固定化漆酶的光吸收和荧光特性研究[D]. 太原: 山西大学, 2023: 36-40.
- [8] TIAN X Y. Study on light absorption and fluorescence properties of laccase immobilized on sodium alginate-gelatin-chitosan composite[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2023: 36-40.
- [9] SHI X Y, WAN G Z, XIE N, et al. α -Glucosidase immobilization on calcium-sodium alginate-chitosan gel beads for inhibitory activity evaluation from traditional Chinese medicines[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2024, 685: 133286.
- [10] XIAO M L, LV S S. Self-assembled regenerated silk fibroin microsphere-embedded Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for immobilization of zymolyase[J]. ACS Omega, 2019, 4(25): 21 612-21 619.
- [11] 张勇, 李青, 郑志豪, 等. 榆黄蘑菌渣中漆酶的提取、酶学性质及应用[J]. 食品与机械, 2024, 40(10): 188-194.
- [12] ZHANG Y, LI Q, ZHENG Z H, et al. Extraction, enzymatic properties and application of laccase from *Pleurotus citrinopileatus* residue[J]. Food & Machinery, 2024, 40(10): 188-194.
- [13] JAN A, ALI SHAH R, BILAL H, et al. Dynamics and stability analysis of enzymatic cooperative chemical reactions in biological systems with time-delayed effects[J]. Partial Differential Equations in Applied Mathematics, 2024, 11: 100850.
- [14] 原卉卉, 杨孝成, 葛武鹏, 等. Fe_3O_4 @海藻酸钠-壳聚糖固定

- 化乳糖酶技术及其酶学性质研究[J]. 中国乳品工业, 2023, 51(2): 4-9, 20.
- YUAN H H, YANG X C, GE W P, et al. Fe₃O₄@ sodium alginate-chitosan immobilized lactase technology and its enzymatic properties[J]. China Dairy Industry, 2023, 51(2): 4-9, 20.
- [11] 陈伟杰. 菠萝蛋白酶的制备、特性及应用的研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2016: 17-19.
- CHEN W J. Study on preparation, properties and its application of pineapple peel protease[D]. Jinzhou: Jinzhou Medical University, 2016: 17-19.
- [12] MA X N, CHEN Z L, HAN J, et al. Fabrication of immobilized bromelain using cobalt phosphate material prepared in deep eutectic solvent as carrier[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022, 210: 112251.
- [13] ZENG S R, WANG Y P, BAI X J, et al. Determination of meaty peptide in enzymatic hydrolyzate of beef protein by HPLC-MS[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2008, 25(5): 1120-1124.
- [14] 罗小婵, 张永东, 孔祥颖, 等. 发酵牛肉香肠肽的抗氧化稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 28-34.
- LUO X C, ZHANG Y D, KONG X Y, et al. Antioxidant stability of peptides extracted from fermented beef sausages[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(10): 28-34.
- [15] 朱清清, 马瑞娟, 陈剑锋, 等. 响应面法优化鲑鱼皮蛋白肽的制备工艺及其理化性质分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(7): 217-226.
- ZHU Q Q, MA R J, CHEN J F, et al. Optimization of preparation process of squid skin peptides by response surface methodology and its physicochemical properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(7): 217-226.
- [16] 邹佳琪. 燕麦多肽的酶法制备及其降血糖活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023: 10-11.
- ZOU J Q. Enzymatic preparation of oat polypeptide and study on its hypoglycemic activity[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023: 10-11.
- [17] 汤琦龙, 傅晶依, 窦信, 等. 改性壳聚糖磁性纳米材料的研究进展[J]. 复合材料学报, 2022, 39(3): 1017-1025.
- TANG Q L, FU J Y, DOU X, et al. Research progress of modified chitosan magnetic nanomaterials[J]. Acta Materialia Composita Sinica, 2022, 39(3): 1017-1025.
- [18] WANG Y W, CHEN H X, WANG J, et al. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate-chitosan beads[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(10): 1682-1690.
- [19] 张曦文, 宋昕祺, 李鹤宾, 等. Fe₃O₄磁性纳米粒子固定化微泡菌褐藻胶裂解酶Alg L17的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 23-27.
- ZHANG X W, SONG X Q, LI H B, et al. Immobilization of alginate lyase Alg L17 from microbulbifer sp. ALW1 with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 23-27.
- [20] 万娟娟, 刘旭峰, 戎海波, 等. 酶固定化技术及固定化酶应用的研究进展[J]. 现代化工, 2024, 44(S1): 73-79.
- WAN J J, LIU X F, RONG H B, et al. An overview of enzyme immobilizing technologies and application of immobilized enzymes[J]. Modern Chemical Industry, 2024, 44(S1): 73-79.
- [21] 阳钰祺, 颜培洲, 程云辉, 等. 大米蛋白酶解物—黄原胶纳米载体的制备及性质研究[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 37-42, 136.
- YANG Y Q, YAN P Z, CHENG Y H, et al. Preparation and properties of rice protein hydrolysate-xanthan gum nanocarriers[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 37-42, 136.
- [22] 涂鸿铁. Fe₃O₄/β-环糊精基复合载体固定化青霉素G酰化酶的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2022: 32-33.
- TU H Y. Study on immobilization of penicillin G acylase on Fe₃O₄/β-cyclodextrin based composite carrier[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2022: 32-33.
- [23] LI J M, YAN F, HUANG B B, et al. Preparation, structural characterization, and enzymatic properties of alginate lyase immobilized on magnetic chitosan microspheres[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024, 196(8): 5403-5418.
- [24] 于晓婷, 陈晓艺, 李苗, 等. 海藻酸钙/硅胶/羧甲基壳聚糖复合微球固定化柚苷酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(1): 93-101.
- YU X T, CHEN X Y, LI M, et al. Study on immobilization of naringinase on calcium alginate/silica gel/carboxymethyl chitosan composite microspheres[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(1): 93-101.
- [25] RODRIGUES R C, BERENGUER-MURCIA Á, CARBALLARES D, et al. Stabilization of enzymes via immobilization: multipoint covalent attachment and other stabilization strategies[J]. Biotechnology Advances, 2021, 52: 107821.
- [26] 陈至立. 不同溶剂体系中磷酸钴的合成及其对β-葡萄糖苷酶/菠萝蛋白酶的亲和吸附固定化[D]. 镇江: 江苏大学, 2021: 56-58.
- CHEN Z L. Synthesis of cobalt phosphate in different solvent systems and its application in the immobilization of β-Glucosidase/bromelain by affinity adsorption[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021: 56-58.
- [27] LEE C, JANG S H, CHUNG H S. Improving the stability of cold-adapted enzymes by immobilization[J]. Catalysts, 2017, 7(4): 112.
- [28] 伍津瑶, 殷明月, 杨美花, 等. 茶树菇降压肽制备工艺优化[J]. 食品与机械, 2024, 40(11): 172-179.
- WU J Y, YIN M Y, YANG M H, et al. Optimization of the preparation process of hypotensive peptide of *Agrocybe cylindracea*[J]. Food & Machinery, 2024, 40(11): 172-179.