# 包埋固定化酶降解牛奶 αs1-酪蛋白过敏性研究

汝成业[1,2,5]，张 娟[2,5]，堵国成[4,5]，陈 坚[3,5]，李江华[*2,5]

（1. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江苏 无锡 214122；4. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；5. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

**摘要**：利用海藻酸钠固定化蛋白酶，探求其对牛奶过敏原 αs1-酪蛋白的特异性降解。以固定化酶的活力回收率为指标，探究了固定化的条件、固定化酶的部分性质以及固定化酶在去除牛奶过敏原蛋白的应用。结果表明：最优固定化条件为，海藻酸钠质量分数为 4.0%，$CaCl_2$ 的质量分数为 3.0%，固定化时间 0.5 h，固定化酶量为 $V$（海藻酸钠）:$V$（酶液）为 1:3，固定化效率达到 67.5%；固定后的酶最适反应温度 70 ℃，最适反应 pH 10.0，连续使用 6 次后剩余酶活达到 40.0%以上；将固定化酶作用于 2.0%脱脂奶粉溶液中，60 ℃条件下反应 25 min 过敏原 αs1-酪蛋白得到特异性降解。

**关键词**：海藻酸钠；固定化酶；αs1-酪蛋白；过敏原

**中图分类号**：TS 252　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)04—0387—06

# Allergenicity Investigation of Hydrolyzed αs1-Casein in Bovine Milk by Immobilized Protease

*RU Chengye*[1,2,5]，*ZHANG Juan*[2,5]，*DU Guocheng*[4,5]，*CHEN Jian*[3,5]，*LI Jianghua*[*2,5]

（1. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 5. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

**Abstract**: Protease was immobilized using sodium alginate as the carrier. The specific degradation of milk allergen (α s1-casein) was investigated. The immobilization conditions of protease, properties of immobilized enzyme and application in milk allergen removal were studied using the immobilized enzyme activity recovery rate as an index. The immobilization efficiency reached up to 67.5% under the optimal condition of immobilization achieved with 4.0% sodium alginate (ratio of mass to volume), 3% $CaCl_2$ (ratio of mass to volume), the volume of sodium alginate and protease of

**收稿日期**：2014-11-25

**基金项目**：国家 863 计划项目(2011AAl00905)；国家 973 计划项目(2013CB733902)；国家自然科学基金项目(31470160)；江苏省自然科学基金项目(BK2012553)；中国博士后科学基金项目(114957)。

* **通信作者**：李江华(1966—)，男，江西九江人，工学博士，教授，主要从事酶技术、发酵过程优化与控制研究。
E-mail.lijianghua@jiangnan.edu.cn

1:3 and 0.5 h for immobilization reaction at pH 10.0 under 70 ℃. The activity of immobilized enzyme was retained over 40% used after six cycles. The milk allergen α s1-casein was specifically degraded when the immobilized protease adding to 2.0% wt skim milk solution at pH 10.0 under 60 ℃ for 25 minute.

**Keywords**: sodium alginate, immobilized enzyme, α s1-casein, allergy

牛奶是一种营养丰富的全蛋白质,是优质的营养食品。牛奶蛋白主要是由酪蛋白和乳清蛋白组成,其中酪蛋白约占牛乳蛋白的 80.0%。而 αs1-酪蛋白是牛乳中主要酪蛋白,在脱脂乳中约占全酪蛋白)的 38.0%。αs1-酪蛋白由 199 个氨基酸组成,并可与钙、铁、铜、锌等金属离子结合形成可溶性物质,促进金属离子在体内的吸收[1]。由于母乳中不含有 αs1-酪蛋白,使得其成为牛乳中重要的过敏原蛋白之一,而且牛奶过敏婴儿存在着发生哮喘、湿疹、过敏性鼻炎等特应性疾病的风险[2-3]。基于此,寻求合适的降解牛奶过敏原的方法日益重要。目前常用于去除牛奶过敏原蛋白的热处理、糖基化、发酵等方法对牛奶营养和风味具有一定的影响,同时其对过敏原蛋白的降解特异性不强[4]。采用酶法降解具有相对专一性并且作用迅速,但主要集中在对 α-乳清蛋白和 β-乳球蛋白的降解[5]。作者组前期筛选得到一株优先降解 αs1 -酪蛋白的菌株,但其游离酶稳定性差,难以回收[6],易混入牛奶溶液中难以去除等,使得应用受到一定的限制。采用固定化酶技术不仅保留了游离酶的优点,而且可以克服游离酶催化反应不连续化以及不易回收的缺点,因而具有更加广阔的前景[7]。

目前固定化酶的制备方法主要有包埋法、交联法、共价键结合法和吸附法等[8],其中包埋法反应条件温和,不需要化学修饰蛋白酶的氨基酸残基,而且对酶分子结构改变少,酶活力损失小等优点。在固定化酶常用的包埋材料中海藻酸钠最为常见,具有固化、成形方便,材料安全等优势。由于 $Ca^{2+}$可与海藻酸钠反应生成海藻酸钙微凝胶,安全无毒并具有有良好的生物相溶性,可以在温和条件下实现对酶的固定,有助于保持酶的生物活性。此外海藻酸钠原材料价格低廉、材料易得等特点[9],因而受到广泛重视,已应用于食品加工、药物缓释、生物工程等领域。

作者利用海藻酸钠为载体对已纯化获得的碱性蛋白酶进行固定化,分析固定化条件对蛋白酶活性的影响,同时对固定化酶的酶学性质进行初步探讨,并研究固定化酶对牛奶过敏原 αs1-酪蛋白的特异性降解,为获得低敏牛奶制品提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

**1.1.1 试剂** 酪蛋白:分析纯,上海生工生物工程技术服务有限公司产品;海藻酸钠:化学纯,中国医药(集团)上海化学试剂公司产品;氯化钙:分析纯,中国医药(集团)上海化学试剂公司产品;三氯乙酸等试剂为国产分析纯。

**1.1.2 仪器** 紫外分光光度计(UV2450):日本岛津公司产品;电热恒温水浴锅:江苏省医疗器械厂产品;PHS-3C 型酸度计: 杭州亚美电子仪器厂产品;电泳仪:美国 Bio-Rad 公司产品。

**1.1.3 碱性蛋白酶** *Bacillus Licheniformis* CN1 菌株经发酵后纯化获得。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 蛋白酶的活力测定**

1) 游离酶活性测定 采用福林—酚试剂法测定蛋白酶活力[10]。酶活力单位定义:一个酶活力单位是指在一定实验条件下 ( pH 10.0,60 ℃时,2.0 g/L 酪蛋白作底物,反应时间 10 min )水解酪蛋白产生 l μg 酪氨酸时所需要的酶量,单位 U/mL。

2) 固定化酶活力测定 一定体积的酶液经固定化后加入一定体积 pH 10.0 的硼酸钠缓冲液,使其处于 pH 10.0 的体系中, 方法与游离酶活力测定相同。酶活力回收率= (固定化酶的总活力/游离酶的总活力) × 100%。固定化酶的相对酶活是指在同组试验中以活性最高为 100%。

**1.2.2 固定化碱性蛋白酶的制备** 参照文献[11]制备固定化蛋白酶。首先称取一定量的海藻酸钠溶于一定体积的蒸馏水溶液中,加热完全溶解后放置室温,冷却至 35 ℃左右,加入一定比例的碱性蛋白酶

混匀，4 ℃冰箱静置一段时间至溶液混合均匀，用 5 mL 注射器滴入到一定浓度的 $CaCl_2$ 溶液中，磁力搅拌一定时间后，用去离子水洗涤 3 次，滤纸滤干水分。4 ℃冰箱保存备用。

**1.2.3** *固定化酶在牛奶蛋白中的应用* 利用蛋白电泳直观检测牛奶过敏原蛋白条带的消失程度。通过在质量分数 2.0%的脱脂奶粉溶液里添加一定量的固定化酶，调节脱脂奶粉溶液的 pH 值以及反应温度，反应不同时间后高温终止反应，然后进行 SDS-PAGE 电泳[12]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化酶的制备

**2.1.1** *海藻酸钠质量分数的确定* 将一定量酶液与不同质量分数的海藻酸钠溶液混合，测定固定化酶的活性。

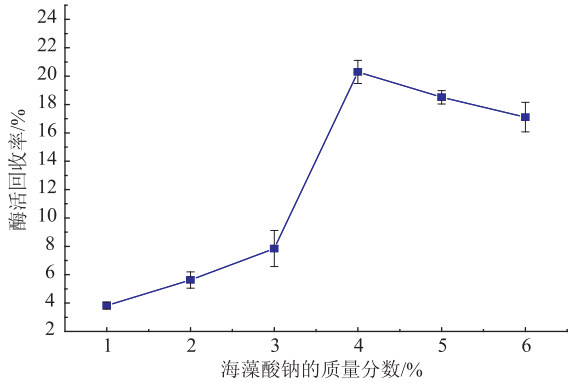



**图 1 海藻酸钠质量分数对固定化酶活性的影响**

**Fig. 1 Effects of sodium alginate concentration on the relative activity of immobilized enzyme**

由图 1 可知，当海藻酸钠质量分数为 4.0% 时，固定化酶活力最大。当海藻酸钠质量分数达到 5.0% 后，其黏度很大，难以挤成球状，影响凝胶成型，同时凝胶的孔径也小，影响酶与底物的结合。反之海藻酸钠质量分数太小，凝胶的孔径较大，固定化酶容易流失。因此选择机械强度适宜的凝胶，同时有利于底物和产物从凝胶微孔扩散通过，保证酶促反应速度，结合图 1，选择海藻酸钠质量分数为 4.0%。

**2.1.2** *$CaCl_2$ 质量分数的确定* $CaCl_2$ 的质量分数对形成凝胶的机械强度有重要影响。当 $CaCl_2$ 质量分数达到 5.0% 后，形成的凝胶表面将会分布的 $Ca^{2+}$ 较多，由于 $Ca^{2+}$ 会与酶作用位点竞争性结合，从而降低酶活性，若太少又导致凝胶强度太小，包埋不够彻底，使其包埋在内部的部分蛋白酶流失，影响酶的活性。由图 2 可知，当 $CaCl_2$ 质量分数为 3.0% 时，固定化酶活性达到最佳。

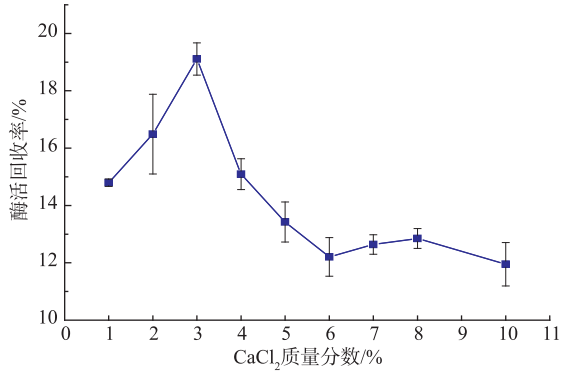



**图 2 $CaCl_2$ 的质量分数对固定化酶活性的影响 $CaCl_2$**

**Fig. 2 Effects of $CaCl_2$ concentration on the relative activity of immobilized enzyme**

**2.1.3** *固定化时间的确定* 固定化时间是指海藻酸钠与固定化酶的混合液滴落到 $CaCl_2$ 溶液中的反应时间。按照上述实验条件，取酶液与海藻酸钠溶液混匀，滴入 3.0%的 $CaCl_2$ 溶液中，固定不同时间，测定固定化酶活力，结果如图 3 所示。随着固定化时间的延长，其回收率逐渐降低，酶在 $CaCl_2$ 溶液中固定化时间的最佳选择为 0~1.0 h，以便保证得到较高的固定化酶酶活。固定化时间越长，海藻酸钠与氯化钙的反应就越完全，形成的海藻酸钙凝胶珠就越致密，对固定化蛋白酶的活性起到了部分抑制的作用[13]。

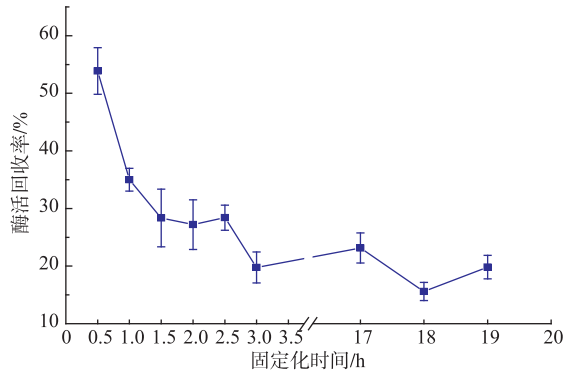



**图 3 固定化时间对固定化酶活性的影响**

**Fig. 3 Effects of immobilized time on the relative activity of immobilized enzyme**

**2.1.4** *固定化酶量的确定* 用于固定化的酶量直接关系到固定化酶的活力，酶的加入量亦有一最佳值，将酶液量与质量分数为 4%海藻酸钠溶液按不

同体积比进行固定,固定化时间选择为 0.5 h,测定固定化酶的活力,结果如图 4 所示。海藻酸钠与酶液按照体积比 1:3 的比例进行固定化,酶活回收率最高,过多的酶液会导致游离酶的浪费,而少量的海藻酸钠则不能与酶液充分结合,造成固定化酶的效率下降。

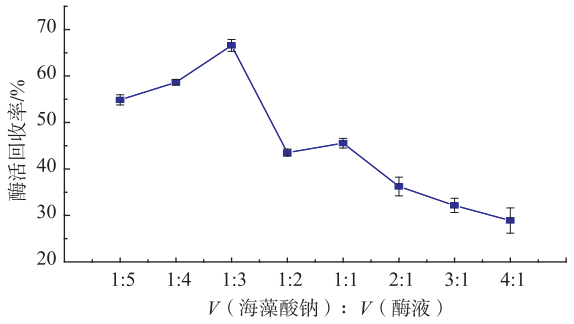



图 4 固定化酶量对固定化酶活力的影响

**Fig. 4 Effects of different enzyme amounts on the relative activity of immobilized enzyme**

## 2.2 固定化碱性蛋白酶的酶学性质

**2.2.1 pH 对固定化酶和游离酶活力的影响** 控制反应温度为 60 ℃,在不同 pH 的磷酸缓冲溶液中测定固定化酶和溶液酶活力,结果如图 5 所示。图 5 中 pH 对固定化酶和游离酶活力的影响不大,其最适 pH 均在 10.0 左右,但固定化酶对 pH 的稳定性减弱,对 pH 相对更敏感。将固定化酶放置于不同 pH 缓冲液中常温 1 h 后测定其残余酶活,以固定化酶在 pH 10.0 测定的酶活为 100%,固定化酶在不同 pH 体系中放置 1 h 后其酶活几乎不变,说明固定化酶具有一定的 pH 耐受性。

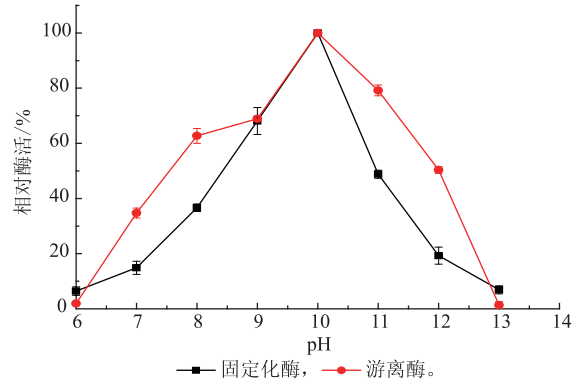



图 5 pH 对固定化酶和游离酶活力的影响

**Fig. 5 Effects of pH on the relative activity of immobilized and liquid enzyme**

**2.2.2 温度对固定化酶和游离酶活力的影响** 温度对固定化酶和游离酶活力影响较大,固定化酶的最适反应温度较游离化酶提高 10 ℃,耐热性增强。在较高温度下保持酶活具有一定的优势。对于在中高温条件下进行的反应,固定化酶具有一定的优势。在 50、60、70 ℃ 下测定固定化酶的热稳定性,在 50、60 ℃ 的条件下反应 1 h 后其酶活损失较少,基本保持一致,但在 70 ℃ 的条件下,酶活在 10 min 后迅速下降,由此可以认定固定化酶的最适反应温度应控制在 60 ℃ 左右,此温度对于中高温的反应具有一定的优势。结果见图 6。

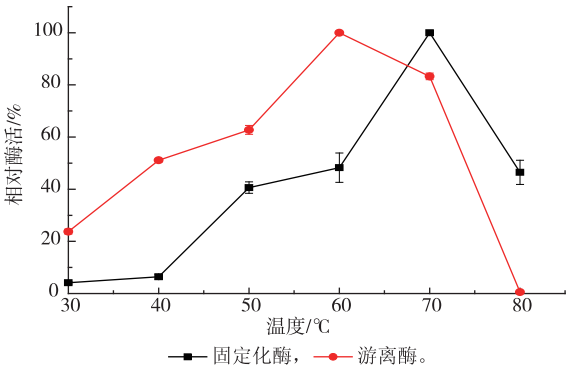



图 6 温度对固定化酶和游离酶活力的影响

**Fig. 6 Effects of temperature on the relative activity of immobilized and liquid enzyme**

**2.2.3 固定化酶的低温稳定性** 将固定化酶放于 4 ℃冰箱中,每隔 2 d 分别测定酶活,结果见图 7。由图 7 可以看出:固定化酶放置 10 d 后酶活下降到原来的 85.2%,放置 20 d 后保留 78.5%,说明在 4 ℃ 下,固定化酶相对稳定,有利于进行短期保存,并且相对于游离酶而言具有更久的储存能力。

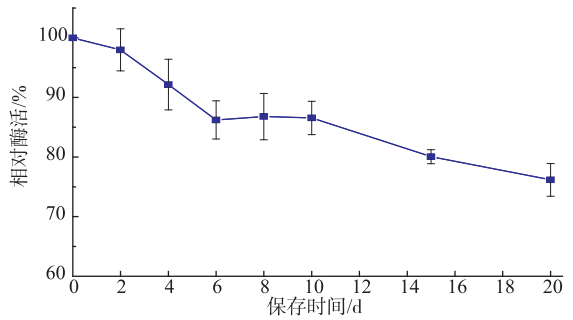



图 7 贮存时间对固定化酶的影响

**Fig. 7 Effects of storage stability on the relative activity of immobilized enzyme**

**2.2.4 固定化酶的操作重复性** 测定循环使用固

定化酶的酶活来计算固定化酶的操作稳定性。将每次反应后的固定化酶利用pH 10.0 的缓冲液冲洗干净,并用滤纸吸干其水分后进行后续测定,连续测定 7 次,结果如图 8。随着循环次数的增加,相对酶活力降低,连续使用 7 次后酶活保留原来的 21.0 %。造成酶活力损失的原因可能是,载体受到磨损,酶从海藻酸钠载体上脱落,或是酶的作用位点随着水解酪蛋白的不断进行而逐渐暴露,容易遭到破坏。实验结果表示,固定化酶循环使用 5 次后,酶活力仍可保持原来的 53.8%。相对游离酶而言其总酶活得到提高,降低了酶的生产成本。

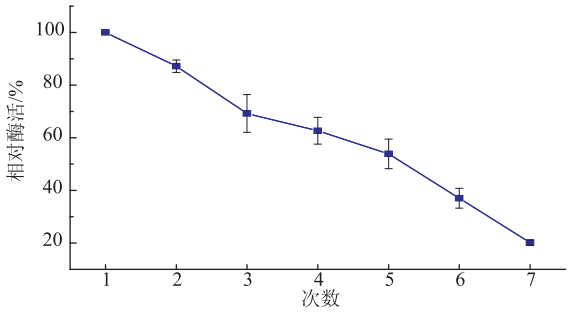



**图 8　利用次数对固定化酶的影响**

**Fig. 8　Effects of repeat times on the relative activity of immobilized enzyme**

### 2.3　固定化酶在降解牛奶 αs1-酪蛋白的应用

将固定化的蛋白酶按照一定比例添加到质量分数 2.0%脱脂奶粉溶液中进行反应,以未添加的脱脂奶粉溶液作为对照,定时取样进行 SDS-PAGE 电泳,控制反应温度在不同的温度条件下进行反应,获得其优先性降解牛奶过敏原的最佳温度,使其能够对过敏原蛋白具有最大的降解,同时保留牛奶中其他蛋白营养成分。选取了温度为 50、60、70 ℃进行反应,结果如图 9 和图 10。固定化酶在 pH 10.0 的碱性条件下对脱脂奶粉溶液的降解能力优于 pH 7.0 的中性条件,与以酪蛋白为底物测得的最适 pH 保持一致。在 pH 10.0 的条件下,固定化酶对酪蛋白的降解顺序为优先降解 αs1-酪蛋白和 β-酪蛋白,而在 pH 7.0 的条件下其主要降解 β-酪蛋白,对 αs1-、αs2-酪蛋白几乎不降解,说明 pH 对固定化酶对 αs1-酪蛋白的降解具有重要作用。在 pH 10 的脱脂奶粉溶液中控制反应温度 60 ℃,反应 25 min 的时间范围内,达到对牛奶 αs1-酪蛋白的优先性降解,达到特异性降解牛奶过敏原 αs1-酪蛋白的效果。

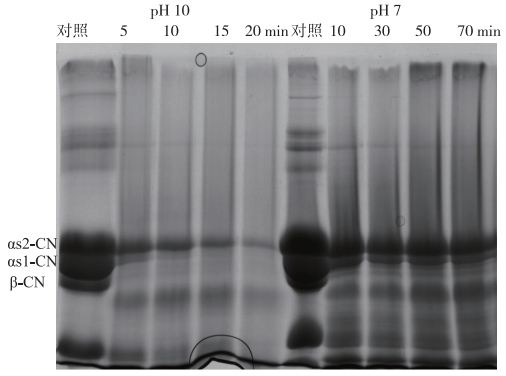



**图 9　50 ℃下固定化酶对脱脂牛奶蛋白的降解**

**Fig. 9　SDS-PAGE profile of skim milk hydrolyzed by immobilized enzyme at different pH values under 50 ℃**

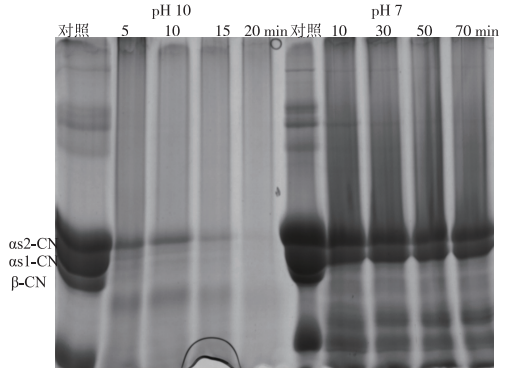



**图 10　70 ℃下固定化酶对脱脂牛奶蛋白的降解**

**Fig. 10　SDS-PAGE profile of skim milk hydrolyzed by immobilized enzyme at different pH values under 70 ℃**

## 3　结　语

用包埋法固定此蛋白酶应用于降解牛奶过敏原蛋白中,所用载体海藻酸钠安全无毒,而且价格低廉,同时制备过程简单,成本低,条件温和。将固定化酶应用到牛奶蛋白溶液中,不影响牛奶制品的使用,而且可以实现多次使用并方便回收,并能够达到对牛奶过敏原 αs1-酪蛋白的特异性降解,具有较好的应用前景。但是此方法距离工业化应用还具有一段距离,今后将通过分子改造的手段以及与不同的改性技术相结合,以达到更好地特异性降低 αs1-酪蛋白致敏性的效果。

## 参考文献:

[1] 岳喜庆,吴超,郭晨. 牛乳中主要蛋白过敏原研究现状[J]. 食品研究与开发,2008,29(10):147-150.
YUE Xiqing, WU Chao, GUO Chen. Process review on major protein allergen s of cow milk [J]. **Food Research and Developent**, 2008, 29(10): 147-150. (in Chinese)

[2] Szwajkowska M, Wolanciuk A, Barlowska J, et al. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system-a review[J]. **Anim Sci Pap Rep**, 2011, 29: 269-280.

[3] 罗曾玲,高金燕,陈红兵. 牛乳中主要过敏原的研究进展[J]. 食品科学,2007,28(2):346-350.
LUO Zengling, GAO Jinyan, CHEN Hong bin. Process review on major allergen s of cow milk [J]. **Food Science**, 2007, 28(2): 346-350. (in Chinese)

[4] KUANG H, Bi-yuan G A O, Vissers Y, et al. 热处理对食物致敏性的影响及其体外细胞学评价 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(9).
KUANG H, Bi-yuan G A O, Vissers Y, et al. Food allergenicity influenced by thermal processing and in vitro cellular assay[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(9). (in Chinese)

[5] 王淼,范崇东,徐榕榕. 转谷氨酰胺酶对牛乳酪蛋白功能性质的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2002,21(5):499-502.
WANG Miao, FANG Congdong, XU Rongrong. The effects of transglutaminase on functional properties of casein in milk [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industy**, 2002, 21(5): 499-502. (in Chinese)

[6] 吴召慧,田亚平. 包埋吸附法固定化酒用酸性脲酶的研究[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(3):437-441.
WU Zhaohui, TIAN Yaping. Immobilization of acid urease via adsorption and embedded [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3): 437-441. (in Chinese)

[7] Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007, 40(6): 1451-1463.

[8] 张琛,张宽朝,章琛,等. 海藻酸钠包埋法制备固定化菠萝蛋白酶[J]. 生物加工过程,2009,7(6):31-34.
ZHANG Chen, ZHANG Kuanchao, ZHANG Chen, et al. Immobilization of bromelain by embedding in sodium alginate [J]. **Chinese Joumal of Bioprocess Engineering**, 2009, 7(6): 31-34. (In Chinese)

[9] 汤鸣强,陈颉颖. 海藻酸钠固定化米曲霉产果胶酶及其性质[J]. 食品研究与开发,2010,31(9):167-170.
TANG Mingqiang, CHEN Jieying. Immobilization of pectinase from aspergillus oryaze by sodium alginate [J]. **Food Research and Developent**, 2010, 31(9): 167-170. (in Chinese)

[10] 范方宇,吴长苹,刘代现. 海藻酸钠固定化碱性蛋白酶的研究[J]. 农业机械,2013,3:20.
FAN Fangyu, WU Changping, LIU Daixian. Study on immobilization of alkaline protease by sodium alginate[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, 2013, 3: 20. (in Chinese)

[11] 王刚强,王维香,赵金梅,等. 海藻酸钠固定化胰蛋白酶的研究[J]. 西华大学学报:自然科学版,2011,30(4):109-112.
WANG Gangqiang, WANG Weixiang, ZHAO Jinmei. Immobilization of trypsin on sodium alginate [J]. **Joumal of Xihua University Natural Science**, 2011, 30(4): 109-112. (in Chinese)

[12] El-Ghaish S, Dalgalarrondo M, Choiset Y, et al. Characterization of a new isolate of Lactobacillus fermentum IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity[J]. **European Food Research and Technology**, 2010, 230(4): 635-643.

[13] Ma J, Zhang L, Liang Z, et al. Immobilized enzyme reactors in proteomics [J]. **Trends in Analytical Chemistry**, 2011, 30(5): 691-702.