

[文章编号] 1007-7405(2017)02-0016-09

琼脂硫酸酯酶酶制剂的制备工艺及其贮藏性能

田友明¹, 孙元亨¹, 肖琼^{1,2,3,4}, 朱艳冰^{1,2,3,4}, 吴昌正^{1,2,3,4}, 肖安风^{1,2,3,4}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 4. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以重组大肠杆菌(*Escherichia. coli*)发酵获得的能特异性水解琼脂硫酸酯的重组芳香基硫酸酯酶为研究对象,以酶活力为指标,利用单因素试验对喷雾干燥法制备琼脂硫酸酯酶酶制剂的工艺参数进行优化,并对琼脂硫酸酯酶贮藏过程中各影响因素进行了研究。结果表明,最佳的喷雾干燥工艺条件为:利用麦芽糊精作为助干剂,海藻糖为保护剂,麦芽糊精质量分数25%,进风温度130℃,进料速度400 mL/h,热风流量3.5 m³/min,喷雾压力0.25 MPa。然后对制备得到的琼脂硫酸酯酶酶制剂的贮藏稳定性进行考察,发现温度、空气对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂的贮藏稳定性影响较大。分别在4℃和28℃贮藏91 d,4℃贮藏的固体酶制剂的酶活力保留率为71.6%,而在28℃贮藏的固体酶制剂酶活力保留率为63%。真空条件下28℃贮藏91 d,酶活力保留率为65.2%,而敞口条件下为38.3%。光照对琼脂硫酸酯酶酶制剂贮藏也有一定的影响,4℃下避光保存91 d,酶活力保留率为72.3%;而不避光贮藏的酶活力保留率只有48.2%。说明,琼脂硫酸酯酶固体酶制剂适宜在4℃、真空、避光条件下贮藏。

[关键词] 琼脂硫酸酯酶; 喷雾干燥; 酶制剂; 酶活力; 贮藏性能

[中图分类号] Q 814.4

Production of Solid Agar Sulfatase and Storage Stability of Enzyme Preparation

TIAN Youming¹, SUN Yuanheng¹, XIAO Qiong^{1,2,3,4}, ZHU Yanbing^{1,2,3,4},
WU Changzheng^{1,2,3,4}, XIAO Anfeng^{1,2,3,4}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China;

4. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: Arylsulfatase specifically hydrolyzing agar sulfate was obtained from recombinant *Escherichia coli*. Then, the spray-drying process for enzyme preparation was optimized by the single factor experiments. The optimum spray-drying conditions were determined as follows: 25% maltodextrin as drying aid, inlet air temperature 130℃, hot air flow rate 3.5 m³/min, feeding rate 400 mL/h, and spray pressure 0.25 MPa, respectively. Then, the appropriated storage method of enzyme preparation was investigated. It showed that

[收稿日期] 2016-11-17

[修回日期] 2016-12-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31401632); 国家海洋公益行业科研专项(201505033); 福建省高校产学研合作项目(2016N5008); 福建省科技重大专项/专题(2015NZ0001-1); 福建省海洋高新技术产业发展专项项目(闽海洋高新[2016]08号)

[作者简介] 田友明(1992—),男,硕士生,主要从事食品生物技术研究。通信作者:肖安风(1973—),男,教授,博士,主要从事食品生物技术研究, E-mail:xxaaffeng@jmu.edu.cn。

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

the facts of temperature, and air had great influence on the storage stability of enzyme preparation. The solid enzyme was stored at 4 ℃ and 28 ℃ for 91 d separately, and the residual enzyme activities were 71.6% and 63%, respectively. The activity of solid enzyme remained 65.2% kept at 28 ℃ with sealed for 91 d, while the residual activity of exposed enzyme was 38.3%. In addition, the storage stability of enzyme preparation also was affected by light. The activity of solid enzyme remained 72.3% after stored at 4 ℃ in dark place for 91 d, whereas the residual activity of exposed enzyme was only 48.2%. Based on the experimental results, the solid enzyme was suited to be stored at 4 ℃, vacuum and dark place.

Keywords: agar sulfatase; spray-drying; enzyme preparation; enzyme activity; storage performance

0 引言

芳香基硫酸酯酶 (arylsulfatase) 能催化裂解硫酸酯键生成相应的醇和无机硫酸根, 它对硫酸酯的转化具有重要作用^[1]。研究表明^[2-5], 某些芳香基硫酸酯酶可以用来脱除琼脂上的硫酸基团, 提高琼脂的凝胶强度。Shukla 等^[4]从印度海域的海藻 (*Gracilaria dura*) 中直接分离纯化出了芳香基硫酸酯酶, 经分离纯化及底物验证试验, 发现该酶可以脱除琼脂的硫酸基团。王爱梅^[5]从麒麟菜 (*Betaphycus gelatinus*) 中分离提取出硫酸酯酶, 并用于卡拉胶的凝胶改性。此外, 硫酸酯酶还可用于脱除硫酸软骨素上的硫酸根^[6]。

为了脱除琼脂分子基团上的硫酸根, 提高琼脂的凝胶强度, 目前, 国内外普遍采用高温稀碱法生产高凝胶强度卡拉胶^[7]。但是这种方法也存在诸多不足, 如胶质得率低、耗碱量大、能耗高、环境污染严重等^[8-9]。相对高温稀碱法, 酶法作为新型琼脂生产技术的发展方向, 因其具有反应条件温和、特异性高、产品质量高、环境污染小等优点而受到广泛关注。虽然采用琼脂硫酸酯酶脱除硫酸基团的方法优于高温稀碱法, 但是由于琼脂硫酸酯酶热稳定性不高, 并且当以液态形式贮藏时, 液体酶制剂体积大, 不便于保存、运输和使用^[10]。而将发酵液直接浓缩干燥制成固体酶制剂, 具有易于保存、酶的稳定性较好等优点^[11]。固体酶制剂的制备方法有很多种, 如真空干燥、冷冻干燥、喷雾干燥、气流干燥和吸附干燥等^[12]。冷冻干燥法对于有生物活性的酶蛋白是一种比较好的干燥方法, 干燥过程中物料中的水分在真空低温的条件下不经过液态直接变成气态蒸发, 所有的过程都在低温下进行, 所以可以最大限度保留酶蛋白的生物活性^[13]。但是冷冻干燥法具有干燥速率低、干燥时间长等缺点, 因此不适宜大规模制备酶制剂^[14-15]。相比之下, 喷雾干燥具有干燥过程迅速、干燥效率高等优点, 特别适用于热敏性物料的干燥。同时, 喷雾干燥得到的物料为粉末, 具有良好的分散性和溶解性。因此, 喷雾干燥制备干粉态的酶制剂在工业生产过程中得到了广泛应用。

在本实验室的前期研究中^[16], 从 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 菌株中克隆芳香基硫酸酯酶基因 (arylsulfatase gene) 并在大肠杆菌 (*Escherichia. coli*) BL21 (DE3) 中表达, 经发酵得到重组芳香基硫酸酯酶, 该酶具有水解人工底物对硝基苯硫酸钾 (*p* - NPS) 和脱除琼脂硫酸基团的活力。在此基础上, 本文以酶活力回收率作为评价指标, 对喷雾干燥法制备琼脂硫酸酯酶固体酶制剂的工艺参数进行优化, 确定琼脂硫酸酯酶制剂的制备工艺, 并考察了温度、空气和光照对琼脂硫酸酯酶制剂贮藏稳定性的影响, 为琼脂硫酸酯酶制剂的贮藏和保存提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 产琼脂硫酸酯酶菌种

以 pET - 28a 为表达载体, 从 *Pseudoalteromonas carrageenovora* 菌株中克隆芳香基硫酸酯酶基因 (arylsulfatase gene) 至大肠杆菌 BL21 (DE3)^[10]。

1.2 琼脂硫酸酯酶粗酶液的制备

从含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上挑取含有芳香基硫酸酯酶基因的 BL21 (DE3) 单菌落,

接种至 2 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的液态 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12 h, 取 1 mL 种子液转接于装有 50 mL LB 培养基 (含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素) 的 250 mL 三角瓶中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至初始诱导菌浓度 D_{600} 达到 0.6, 加入诱导剂 α -乳糖至终质量浓度为 4 g/L, 于 21 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 24 h。发酵完毕后, 取 50 mL 发酵液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 $\times g$ 下离心 10 min, 收集菌体, 用 15 mL 预冷的缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.0) 重悬菌体。冰水浴超声破壁后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times g$ 下离心 20 min, 获得上清液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 层析柜中贮藏备用。上清液依次经过 0.8、0.45 和 0.22 μm 孔径的无菌水相膜抽滤, 即得到琼脂硫酸酯酶粗酶液。

1.3 琼脂硫酸酯酶固体酶制剂的制备

真空冷冻干燥: 将粗酶液放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥 4 d, 得到固体酶制剂。

喷雾干燥: 向除菌过滤后的粗酶液中按照一定的固液比加入填充料如麦芽糊精、脱脂奶粉、蔗糖等进行喷雾干燥。喷雾干燥初始条件为: 进风温度 130 $^{\circ}\text{C}$, 进料速度 100 mL/h, 热风流量 3.5 m^3/min , 喷雾压力 0.15 MPa。

1.4 琼脂硫酸酯酶喷雾干燥单因素试验

1.4.1 进风温度对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

将离心破壁后的粗酶液用麦芽糊精调整固形物质量分数至 20%, 在进料速度 100 mL/h、热风流量 3.5 m^3/min 、喷雾压力 0.15 MPa 的条件下, 考察不同进风温度时琼脂硫酸酯酶的回收率。

1.4.2 进料速度对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

将离心破壁后的粗酶液用麦芽糊精调整固形物质量分数至 20%, 喷雾压力 0.15 MPa, 热风流量 3.5 m^3/min , 按照 1.4.1 中的方法, 在最适进风温度条件下, 考察不同进料速度时琼脂硫酸酯酶的回收率。

1.4.3 热风流量对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

将离心破壁后的粗酶液用麦芽糊精调整固形物质量分数至 20%, 喷雾压力 0.15 MPa, 按照 1.4.2 中的方法, 在最适进风温度和最适进料速度的条件下, 考察不同热风流量时琼脂硫酸酯酶的回收率。

1.5 酶制剂贮藏稳定性

1.5.1 不同形态的琼脂硫酸酯酶贮藏稳定性

将制备好的固体酶制剂样品分装于锡箔袋, 真空包装, 每袋 1 g。吸取粗酶液 1 mL 到灭菌的 1.5 mL 离心管中, 分别贮藏于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 每隔 7 d 取出一份样品, 进行酶活力测定。

1.5.2 温度对琼脂硫酸酯酶贮藏稳定性的影响

将制备好的固体酶制剂样品分装于锡箔袋, 真空包装, 每袋 1 g, 分别储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱和 28 $^{\circ}\text{C}$ 的生化培养箱中, 每隔 7 d 取出一份样品进行酶活力测定, 考察不同温度对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂贮藏稳定性的影响。

1.5.3 贮藏中空气对酶制剂稳定性的影响

将制备好的固体酶制剂样品分装于锡箔袋, 敞口, 每袋 1 g, 贮藏于 28 $^{\circ}\text{C}$ 的生化培养箱中, 每隔 7 d 取出一份样品进行酶活力测定, 考察空气对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂贮藏稳定性的影响。

1.5.4 温度和光照的复合作用对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂贮藏稳定性的影响

将制备好的固体酶制剂样品分装于锡箔袋, 真空包装, 每袋 1 g, 分别见光贮藏于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱和 28 $^{\circ}\text{C}$ 的生化培养箱中, 每隔 7 d 取出一份样品进行酶活力测定, 考察温度和光照对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂贮藏稳定性的影响。

1.6 琼脂硫酸酯酶酶活力测定

采用 p -NPS 法测定酶活力^[17]。液体酶活力的测定: 取 20 μL 酶液, 加入 80 μL 20 mmol/L p -NPS (以 50 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.0) 缓冲液配制), 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 后, 加入 25 μL 1 mol/L

NaOH 终止反应, 以预冷蒸馏水补足体积至 1 mL, 在波长 410 nm 下测定吸光度值, 以灭活的酶液为对照。

固体酶活力的测定: 称取 0.1 g 酶制剂, 用缓冲液 (50 mmol/L Tris - HCl, pH = 7.0) 充分溶解后定容至 10 mL, 取 20 μ L 酶液, 80 μ L 20 mmol/L *p* - NPS (以 50 mmol/L Tris - HCl (pH = 7.0) 缓冲液配制), 在 50 $^{\circ}$ C 温育 10 min 后, 加入 25 μ L 1 mol/L NaOH 终止反应, 以预冷蒸馏水补足体积至 1 mL, 在波长 410 nm 下测定吸光度值, 以灭活的酶液为对照。

琼脂硫酸酯酶的活力 (U) 定义为: 在上述条件下, 每分钟催化生成 1 μ g 对硝基苯酚 (*p* - NP) 所需的酶量。酶粉回收率/% = 喷雾干燥后酶粉质量/加入的助干剂含量 \times 100; 酶活力回收率/% = (收集的酶制剂质量 \times 酶制剂单位酶活力) / 干燥前酶液总酶活力 \times 100; 酶活力保留率/% = 贮藏后酶制剂的酶活力/贮藏前酶制剂的酶活力 \times 100。

2 结果与分析

2.1 琼脂硫酸酯酶制剂的制备工艺优化

2.1.1 喷雾干燥中助干剂的选择

根据初始工艺条件, 分别选择质量分数 20% 的麦芽糊精、蔗糖、脱脂奶粉、可溶性淀粉和全脂奶粉作为助干剂进行试验, 测定酶活力回收率, 得到的结果如图 1 所示。

从图 1 中可以看出, 使用麦芽糊精和脱脂奶粉作为助干剂制备琼脂硫酸酯酶固体酶制剂, 酶活力回收率在 30% 以上; 使用蔗糖的试验组酶活力回收率相比较低, 原因是由于蔗糖易吸潮, 导致其粘在喷雾干燥机的回收管内壁上, 使酶活力回收率降低; 添加了可溶性淀粉的酶液在干燥的时候, 干燥出的固体酶制剂粘在收集瓶的壁上, 无法收集进行酶活力测定^[11]; 添加全脂奶粉的干燥样品溶解时会出现颗粒状不溶物, 并且有油脂分层现象, 酶活力无法检测^[18]。因此, 选择麦芽糊精作为助干剂进行后续的喷雾干燥工艺优化。

2.1.2 麦芽糊精含量对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

分别选择麦芽糊精质量分数为 15%、20%、25%、30% 和 35% 的梯度进行喷雾干燥试验, 结果如图 2 所示。

从图 2 中可以看出, 酶粉回收率随着麦芽糊精含量的增加而逐渐降低, 在麦芽糊精含量最低时, 酶粉回收率达到最大值 57.3%, 在麦芽糊精含量最高时, 酶粉回收率最低, 只有 47.9%。这是因为麦芽糊精的量增加后, 料液的粘度也在不断增大, 造成喷嘴堵塞和挂壁, 导致收集到的产物减少, 降

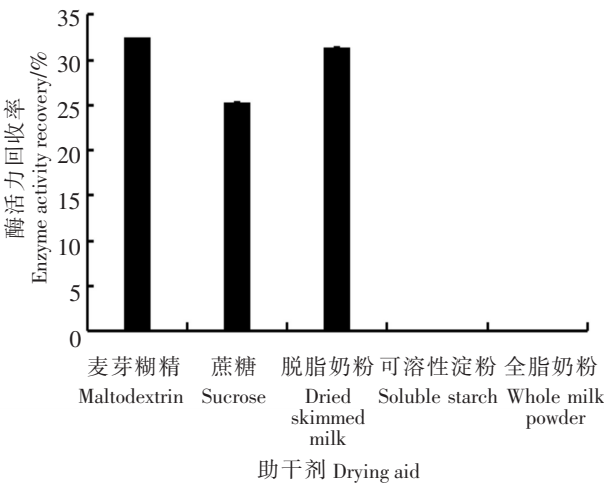


图 1 助干剂对酶活力回收率的影响

Fig.1 Effect of drying aid on recovery of enzyme activity

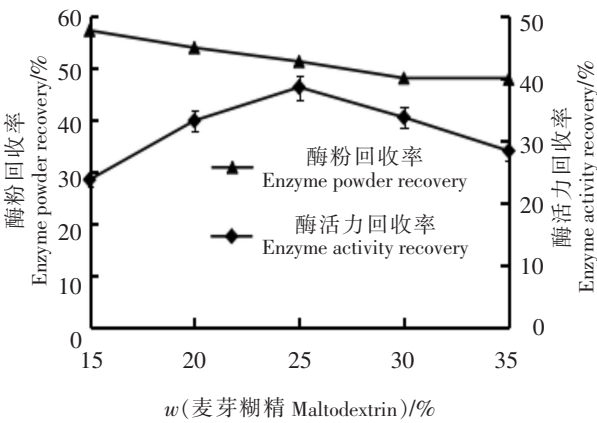


图 2 麦芽糊精含量对酶粉回收率和酶活力回收率的影响

Fig.2 Effect of maltodextrin content on recoveries of enzyme powder and enzyme activity

低了回收率^[19]。麦芽糊精质量分数在 15% ~ 25% 时，酶制剂的酶活力回收率呈现上升趋势，麦芽糊精质量分数在 25% 时，酶活力回收率最大为 38.6%，麦芽糊精质量分数大于 25% 时，酶制剂酶活力回收率呈现下降趋势。这是因为固形物含量增加，在喷雾干燥时有利于形成较大的颗粒粒径，酶液吸附充分，对琼脂硫酸酯酶起到更好的保护作用。不过，麦芽糊精浓度升高到一定程度时，其在料液中的溶解度越来越差，其粘性也越来越大，不仅入料变得困难，也很容易堵塞喷头，不适合喷雾。基于上述结果，后续干燥中选择料液的麦芽糊精质量分数为 25% 作为干燥的条件。

2.1.3 进风温度对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

喷雾干燥过程中，进风温度会直接影响物料干燥的效果。对于干燥具有生物活性的酶蛋白，进风温度过高会使酶蛋白的空间结构发生变化而导致酶活力降低，引起酶的失活。当进风温度太低时，会导致物料的水分含量过高，使物料易于粘附在管道和干燥罐中，引起出粉率降低，导致酶活力回收率降低，甚至在收料罐中出现小液滴而影响全部产品的干燥。

考察进风温度对琼脂硫酸酯酶回收率的影响，结果见图 3。由图 3 可知，随着进风温度的升高，酶粉回收率没有明显变化。当温度达到 150 ℃ 时，酶粉回收率达到最大为 63.7%。在 110 ~ 130 ℃ 时，随着温度的升高，喷雾干燥制备的酶制剂酶活力回收率逐渐增高，但是随着进风温度的继续升高，酶活力回收率又下降，这是因为进风温度过高，酶失活的速度也加快。由图 3 可知，最佳进风温度为 130 ℃，酶活力回收率达到 33%。

2.1.4 进料速度对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

喷雾干燥中进料速度对产品的生产效率有重要影响，进料速度过快会导致产物干燥不充分，收集量减少；而进料速度过慢，又会增加能耗。考察不同进料速度对喷雾干燥制备琼脂硫酸酯酶酶制剂的影响，其结果如图 4 所示。

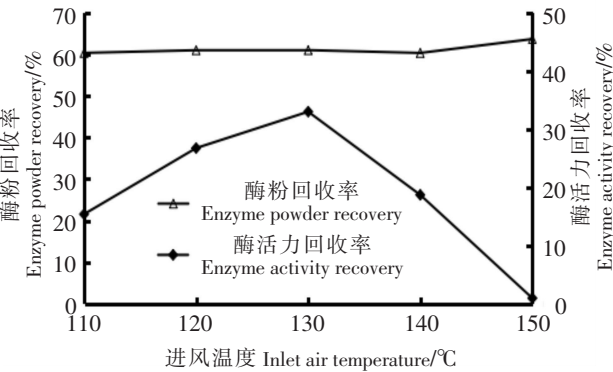


图 3 进风温度对酶活力回收率和酶粉回收率的影响
Fig.3 Effect of inlet air temperature on recoveries of enzyme activity and enzyme powder

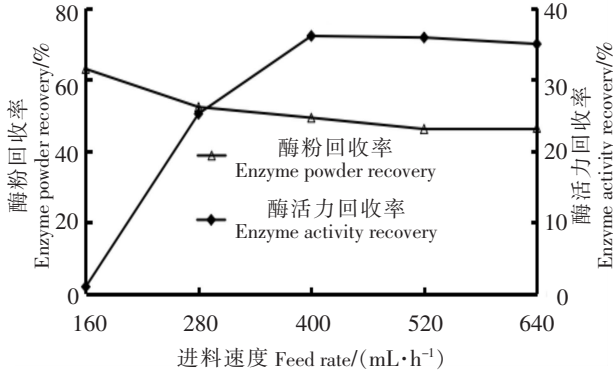


图 4 进料速度对酶粉回收率和酶活力回收率的影响
Fig.4 Effect of feeding rate on recoveries of enzyme powder and enzyme activity

由图 4 可以看出，进料速度对酶粉回收率的影响十分显著，进料速度慢，酶粉回收率高。这是由于进料速度影响了水分的干燥速率，单位时间内干燥的酶液增加，酶粉就会变多，导致酶粉回收率随着进料速度的增加一直呈现下降趋势。进料速度在 160 ~ 400 mL/h，随着进料速度的增加，酶活力回收率呈现上升趋势，进料速度在 400 mL/h 时，有最大的酶活力回收率为 36.1%；进料速度在 400 ~ 640 mL/h 时，随着进料速度的增加，酶活力回收率几乎没有变化。当进料量过低时，琼脂硫酸酯酶会因温度过高而失活，导致比较低的酶活力回收率；而当进料流量太高时，雾化形成的液滴粒径较大，降低了与热空气的传热效率，造成部分雾滴来不及干燥便粘壁。此外，雾滴粒径增大，雾滴在干燥室内滞留时间增加，受热时间相对延长^[20]，导致酶活力回收率降低。综上所述，适宜的进料速度

为 400 mL/h。

2.1.5 热风流量对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

热风流量会对喷雾干燥时物料中水分蒸发的速度产生重要影响。对进风量与酶粉回收率、酶活力回收率的关系进行研究, 其结果如图 5 所示。由图 5 可以看出, 酶粉回收率随着热风流量的增加而增加, 这是由于热风流量增加, 会将更多粘在机器内壁的酶粉吹到回收器皿中, 增大酶粉回收率。热风流量在 3~3.5 m³/min, 酶活力回收率随着热风流量的增大而增大, 热风流量在 3.5 m³/min 时, 酶粉回收率达到最大值 38.6%; 随着热风流量的继续增大, 酶活力回收率开始下降, 这是因为热风流量增大, 液滴和热空气气流在干燥室内停留时间变短, 因此水分蒸发不完全, 含水率增大, 并且导致颗粒互相粘附结块, 使得酶活力回收率降低^[21]。

2.1.6 喷雾压力对琼脂硫酸酯酶回收率的影响

喷雾干燥过程中, 喷雾压力会直接影响物料干燥时喷雾头喷出酶液多少, 从而间接影响物料干燥的效果。在干燥具有生物活性的酶蛋白时, 喷雾压力过高会引起酶的失活, 而太低时, 物料不能很好地干燥, 导致酶活力回收率降低。喷雾压力对琼脂硫酸酯酶回收率的影响结果见图 6。

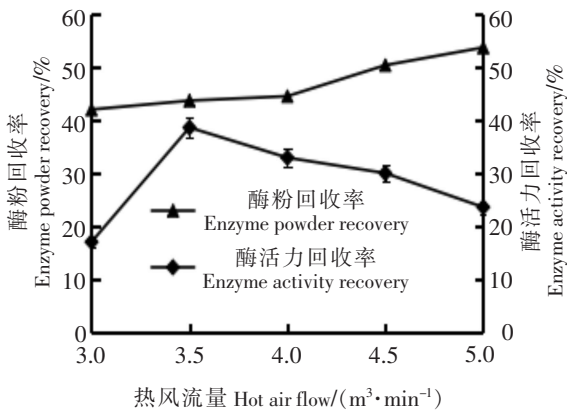


图 5 热风流量对酶活力回收率和酶粉回收率的影响
Fig.5 Effect of hot air flow rate on recoveries of enzyme activity and enzyme powder

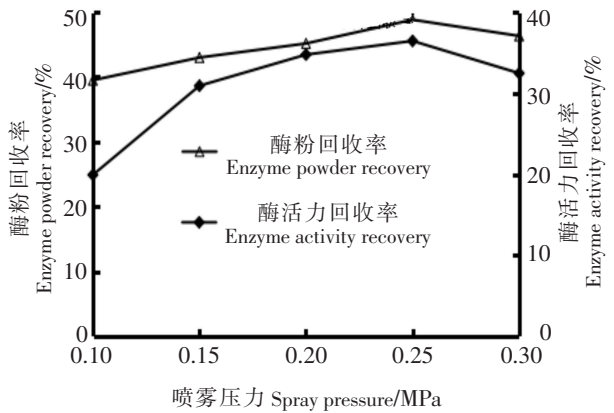


图 6 喷雾压力对酶活力回收率和酶粉回收率的影响
Fig.6 Effect of spray pressure on recoveries of enzyme activity and enzyme powder

由图 6 可以看出, 喷雾压力在 0.1~0.25 MPa 时, 随着喷雾压力的变大, 酶粉回收率和酶活力回收率都增大, 在 0.25 MPa 时达到最大的酶活力回收率 36.5%, 而在 0.25~0.30 MPa 时, 酶粉回收率和酶活力回收率都随着压力变大而减小。这是由于喷雾压力偏小时, 雾化形成的液滴粒径较大, 降低了与热空气的传热效率, 造成部分雾滴来不及干燥, 导致粘壁; 而喷雾压力过大时, 液滴很快干燥, 干燥的颗粒在干燥室滞留时间过长, 导致酶容易失活。

2.1.7 保护剂对喷雾干燥酶活力保留的影响

由于酶是蛋白质, 在喷雾干燥的过程中, 会改变其空间结构而失去酶原有的生物活性。为减少活性物质在受热过程中的损失, 通常还可以在物料中添加一些少量的保护剂。试验中选择的保护剂有: 甘油、海藻糖、NaCl、蔗糖, 添加量都控制在 0.5% (质量体积比), 料液的固形物质量分数用麦芽糊精调整到 25.0%, 试验结果如图 7 所示。

由图 7 可以发现, 甘油对于酶液的活性只有少量的保护作用, 效果并不明显, 而海藻糖对酶活力的保护作用明显, 但 NaCl 和蔗糖对于酶活力却有抑制现象。所以, 在喷雾干燥过程中选择添加 0.5% 的海藻糖作为保护剂。

2.2 琼脂硫酸酯酶制剂的贮藏性能考察

2.2.1 不同形态酶制剂贮藏的稳定性

酶制剂通常以液体和固体两种方式存在, 液体酶制剂体积大, 不便于保存、运输和使用。若将酶

液制成干燥的固体产品，可大大减小酶制剂的体积，便于储存和运输，且干燥的固体酶因为含水量低也不容易滋生细菌，提高了酶在贮藏过程中的稳定性^[15,20]。从图 8 中可以看出，在 35 d 时固体酶制剂的酶活力保留率有 94.6%，而液体的只有 69.3%，远低于固体酶制剂的酶活力保留率。与固体酶制剂相比，液体酶制剂稳定性较差，难以长期保存。而将琼脂硫酸酯酶制成固体酶制剂，既能提高其稳定性，又能方便其贮藏和运输。

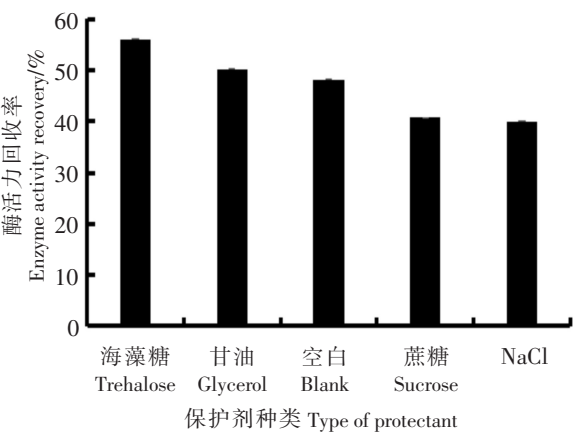


图 7 保护剂对喷雾干燥酶活力的影响

Fig.7 Effect of protectant on spray dried enzyme activity

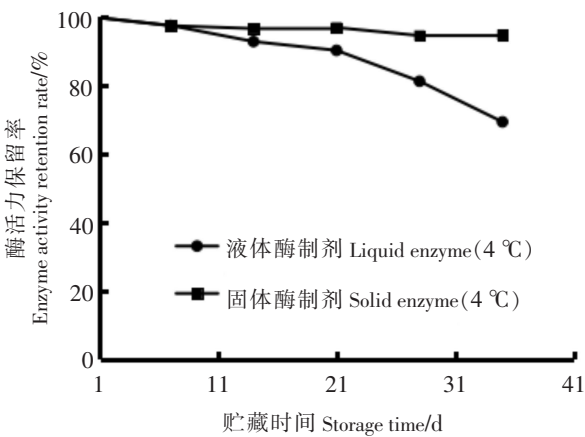


图 8 酶制剂形态对贮藏稳定性的影响

Fig.8 Effect of enzyme form on enzyme storage stability

2.2.2 温度、空气、光照对酶制剂贮藏稳定性的影响

酶制剂作为一种生物活性物质，在贮藏过程中其活力及稳定性受诸多因素影响^[22]。选择不同温度条件下的真空、避光贮存琼脂硫酸酯酶固体酶制剂，酶活力变化曲线如图 9a 所示。从图 9a 中可以看出，温度对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂的贮藏稳定性影响很大：随着贮藏时间的延长，琼脂硫酸酯酶酶活力保留率都明显下降，而且随着温度的升高，酶活力保留率下降速度也逐渐增大；酶制剂在 4 °C 的酶活力回收率略高于 28 °C 酶制剂的，在第 91 d 时，4 °C 贮藏的酶制剂的酶活力保留率有 71.6%，而在 28 °C 贮藏的酶活力保留率只有 63.0%。由此可见，琼脂硫酸酯酶酶制剂在 4 °C 的贮藏稳定性较好。

除了受温度影响之外，空气也会对酶制剂贮藏稳定性产生影响。琼脂硫酸酯酶固体酶制剂在使用时会接触空气，而空气中氧气与二氧化碳会与很多生物活性物质发生反应，从而降低产品的活性。由图 9b 可以看出，敞口、避光条件保存的酶制剂样品的酶活力保留率随着贮藏时间的延长而逐渐降低。在 28 °C，真空贮藏的酶制剂在 91 d 时，酶活力保留率为 65.2%，而敞口保存的酶制剂酶活力保留率只有 38.3%。表明，空气对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂贮藏稳定性有较大的影响，在任意时刻敞口避光条件下的酶活力保留率都小于真空避光条件。因此，琼脂硫酸酯酶固体酶制剂应真空贮藏。

酶制剂在贮藏过程中，其活力稳定性不仅受到温度的影响，还会受到光照的影响，因此，试验考察了温度和光照的复合作用对琼脂硫酸酯酶稳定性的影响。由图 9c 和图 9d 可以看出，避光保存的酶制剂的酶活力保留率高于不避光保存的，并且同一温度下，真空、避光贮藏的酶制剂样品的酶活力与真空、见光贮藏的酶制剂样品的酶活力损失速度存在明显的差异。在 28 °C 贮藏的酶制剂在 91 d 避光保存的酶活力保留率有 64.1%，而不避光贮藏的只有 57.1% 的酶活力保留率。在 4 °C 冰箱中贮藏的酶制剂，在 91 d 时，避光贮藏的酶活力保留率有 72.3%，而不避光贮藏的酶活力保留率只有 48.2%。表明，琼脂硫酸酯酶在避光和 4 °C 条件下贮藏稳定性更好。

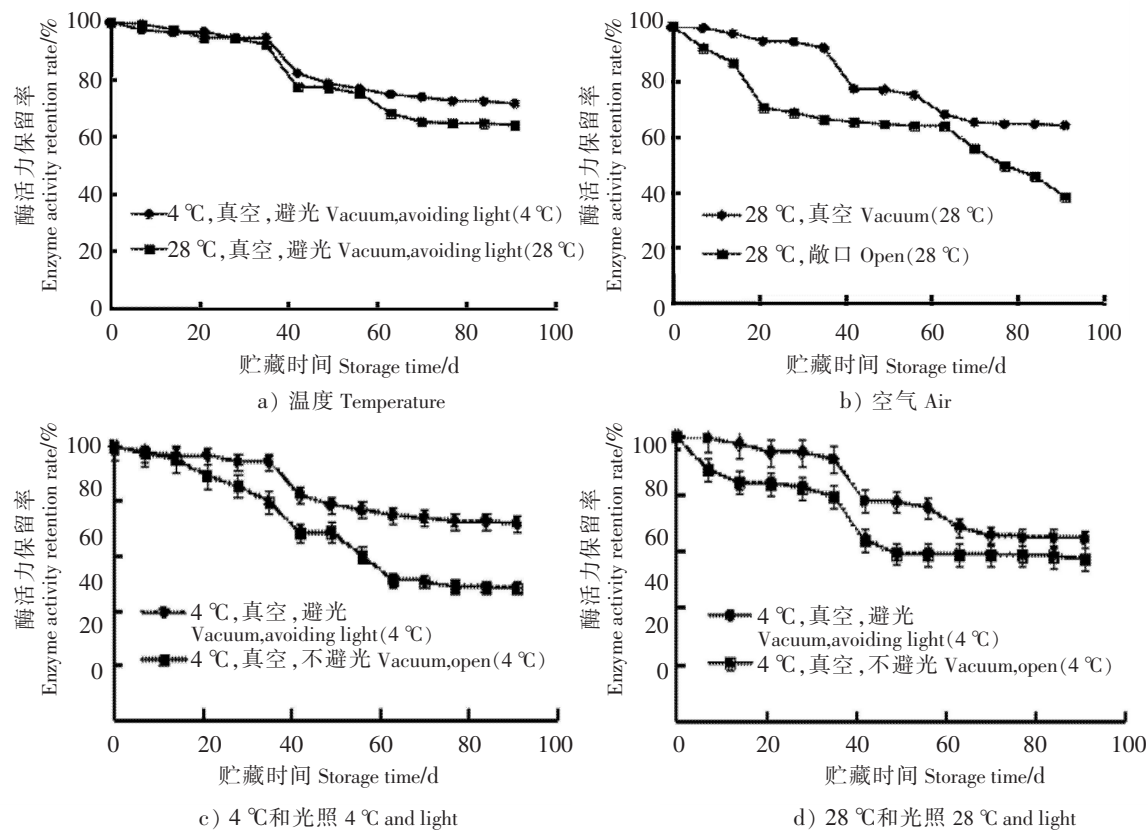


图 9 温度、空气、光照对固体酶制剂贮藏稳定性的影响

Fig.9 Effects of temperature,air,and light on the storage stability of solid enzyme preparation

3 结论

1) 本文首先通过单因素试验对喷雾干燥制备琼脂硫酸酯酶制剂的工艺参数进行了优化, 建立了最佳的喷雾干燥工艺, 其条件为: 选择麦芽糊精为助干剂, 海藻糖为保护剂, 麦芽糊精质量分数 25%, 进风温度 130 °C, 热风流量 3.5 m³/min, 进料速度 400 mL/h, 喷雾压力 0.25 MPa。

2) 对琼脂硫酸酯酶制剂的贮藏稳定性进行了考察, 结果表明: 琼脂硫酸酯酶固体酶制剂在贮藏过程中其活力稳定性受诸多因素影响, 其中温度、空气影响最为显著。在不同温度下储存的酶制剂, 随着时间的延长酶活力回收率逐渐降低, 而且随温度的升高酶活力降低速率增大; 空气对琼脂硫酸酯酶固体酶制剂的贮藏稳定性有较大影响, 在 28 °C 和避光条件下, 真空和敞口贮藏酶制剂 91 d, 酶活力保留率分别为 65.2% 和 38.3%。光照对琼脂硫酸酯酶制剂贮藏也有一定的影响, 4 °C 下避光保存 91 d, 酶活力保留率为 72.3%; 而不避光贮藏的酶活力保留率只有 48.2%。因此, 琼脂硫酸酯酶固体酶制剂适宜在 4 °C、真空、避光条件下长期贮藏。

[参考文献]

[1] 王志朋. 产芳香基硫酸酯酶菌株的筛选及酶学性质的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 6-7.

[2] WALLNER S R, POGOREVE M, TRAUTHWEIN H, et al. Biocatalytic Enantio-Convergent preparation of sec-alcohols using sulfatases [J]. Engineering in Life Sciences, 2004, 4(6): 512-516. DOI:10.1002/elsc.200402151.

[3] HAGELUEKEN G, ADAMS T M, WIEHLMANN L, et al. The crystal structure of SdsAl, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfarases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(20): 7631-7636. DOI:10.1073/pnas.0510501103.

- [4] SHUKLA M K, KUMAR M, PRASAD K, et al. Partial characterization of sulfohydrolase from *Gracilaria dura* and evaluation of its potential application in improvement of the agar quality [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(1): 157-163. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.02.009.
- [5] 王爱梅. 琼脂麒麟菜硫酸化酶的提取纯化及卡拉胶的改性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014: 5-6.
- [6] MURATA K, YOKOYAMA Y, YOSHIDA K. The application of chondro-2-sulfatase for identification of the products generated from chondroitin sulfate isomers by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Biochemical & Biophysical Methods, 1987, 15(1): 23-32. DOI:10.1016/0165-022X(87)90059-5.
- [7] 龙梦娴. 琼脂降解相关酶类及酶法制备新寡糖的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 49.
- [8] SOUZA B W S, CERQUEIRA M A, BOURBON A I, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae* [J]. Food Hydrocolloid, 2012, 27(2): 287-292. DOI:10.1016/j.foodhyd.2011.10.005.
- [9] GARCIA C A, ALNAIEF M, SMIRNOVA I. Polysaccharide-based aerogels-promising biodegradable carriers for drug delivery systems [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1425-1438. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.06.066.
- [10] 殷勤, 肖安风, 朱艳冰, 等. 酶解龙须菜粗多糖硫酸基工艺优化 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2015, 20(3): 173-178.
- [11] 肖安风, 王芳, 倪辉, 等. 单宁酶固体酶制剂的喷雾干燥制备工艺优化 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 144-151. DOI:10.16429/j.1009-7848.2013.07.027.
- [12] 谭莹. 葡萄糖氧化酶发酵条件的优化、纯化及酶制剂研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2012: 6-7.
- [13] 祝彦忠. 黑曲霉 U γ -2 菊粉酶酶制剂的生产工艺 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(8): 113-117. DOI:10.16429/j.1009-7848.2011.08.013.
- [14] 王芳. 利用茶叶梗固态发酵单宁酶及其酶制剂的制备 [D]. 厦门: 集美大学, 2012: 34-35.
- [15] 丁涛. 柚苷酶发酵放大技术及酶制剂的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2011: 27-28.
- [16] LIM J M, JANG Y H, KIM H R, et al. Overexpression of arylsulfatase in *E. coli* and its application to desulfatation of agar [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2004, 14(4): 777-782.
- [17] JUNG K T, KIM H W, YOU D J, et al. Identification of the first archaeal arylsulfatase from *Pyrococcus furiosus* and its application to desulfatation of agar [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 17(6): 1140-1146. DOI: 10.1007/s12257-012-0228-6.
- [18] 肖安风, 丁涛, 倪辉, 等. 喷雾干燥法制备柚苷酶固体酶制剂的工艺优化 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(3): 92-100. DOI:10.16429/j.1009-7848.2013.03.013.
- [19] 陈致印, 张盛贵, 牛黎莉, 等. 喷雾干燥枸杞粉助干剂研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 80-82. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2010.02.043.
- [20] 刘春泉, 宋江峰, 章英, 等. 甘薯叶提取物喷雾干燥工艺研究 [J]. 食品科学, 2011, 32(6): 45-48.
- [21] 陈启聪, 黄惠华, 王娟, 等. 香蕉粉喷雾干燥工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2010, 26(8): 331-337.
- [22] 肖安风, 王芳, 倪辉, 等. 单宁酶固体酶制剂的制备及其贮藏稳定性的研究 [J]. 食品科技, 2013, 38(2): 237-241. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2013.02.068.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)