

文章编号: 1000-5471(2008)03-0090-05

海藻酸钠-壳聚糖固定化漆酶的研究^①

徐国英, 朱启忠, 董学卫, 吕新萍, 于涛, 曲悦闻

山东大学威海分校海洋学院, 山东威海 264209

摘要: 采用海藻酸钠包埋法和海藻酸钠-壳聚糖包埋-交联法固定化漆酶, 探讨了固定化条件、固定化漆酶及游离酶的酶学性质, 结果表明: 包埋法和包埋-交联法固定化漆酶的最佳条件分别为海藻酸钠浓度 3%、CaCl₂ 浓度 1.5% 和海藻酸钠浓度 2%、CaCl₂ 浓度 2%、壳聚糖浓度 1.5%、戊二醛浓度 1%。两种固定化漆酶的最适 pH 和最适温度相同, 分别为 5.0 和 30 °C, 游离酶 pH 为 4.6, 温度 20 °C。包埋法固定化漆酶、包埋-交联法固定化漆酶和游离酶的米氏常数分别为 3.3, 2.8, 1.22 mmol/L。

关键词: 包埋法; 包埋-交联法; 固定化; 漆酶

中图分类号: Q814

文献标识码: A

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化酶^[1], 因具有较好的底物专一性和稳定性, 漆酶在食品工业、染料脱色、生物传感器、环境保护等方面具有重要应用价值^[2,3]。但随着环境的变化, 游离漆酶在使用过程中易变性失活, 且不易从反应体系中分离达到重复使用的目的, 这在一定程度上限制了漆酶的工业化应用^[4]。

海藻酸钠是由 β -(1, 4)-D 甘露糖醛酸(M)和 α -(1, 4)-L 古洛糖醛酸(G)组成的线性高聚物。海藻酸盐分子链 G 块很易与 Ca²⁺ 作用, 两条分子链 G 块间形成一个洞, 结合 Ca²⁺ 形成“蛋盒”模型, 形成热不可逆凝胶, 从而将漆酶固定化在凝胶网络中, 这就是包埋法固定化酶^[5]。

壳聚糖的氨基在适当的 pH 下容易质子化而形成阳离子聚电解质, 海藻酸钠的羧基在水中易离子化形成阴离子聚电解质, 聚阳离子和聚阴离子可以相互吸引而形成稳定的聚电解质化合物^[6]。另外, 壳聚糖胺基可与戊二醛基形成 Schiff 碱, 在胶囊表面形成一层致密的保护膜, 可增加微胶囊球的强度^[7], 这就是包埋-交联法固定化酶。

通过包埋法和包埋-交联法对漆酶进行固定化, 并对固定化漆酶的酶学性质进行研究, 对漆酶固定化的理论研究及实际应用均有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试 剂

漆酶: 实验室自制; 海藻酸钠: 化学纯 CP, 上海埃彼化学试剂有限公司; 壳聚糖(DAC, 90%, 80 目): 济南海得贝公司; 邻联甲苯胺: 天津市光复精细化工研究所; 25% 戊二醛: 分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司。

① 收稿日期: 2007-05-31

作者简介: 徐国英(1985-), 女, 山东东营人, 硕士研究生, 主要从事酶工程的研究。

通讯作者: 朱启忠, 教授。

1.1.2 实验仪器

PHSJ-4A型实验室pH计(上海精密科学仪器有限公司),722E可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司).

1.2 方法

1.2.1 漆酶活力测定

1.2.1.1 游离漆酶活力的测定

于2 mol/L、pH 5.0的醋酸缓冲液3.5 mL中加入 3.36×10^{-3} mol/L的邻联甲苯胺0.5 mL,再加入适当稀释的酶液0.5 mL,室温反应5 min后于595 nm处比色.以每分钟使OD₅₉₅增加0.01为一个酶活力单位^[8].

1.2.1.2 固定化漆酶活力的测定

于2 mol/L、pH 5.0的醋酸缓冲液3.5 mL中加入 3.36×10^{-3} mol/L的邻联甲苯胺0.5 mL,再加入固定化漆酶1 g,室温反应10 min后于595 nm处比色.以每分钟使OD₅₉₅增加0.01为一个酶活力单位.

1.2.2 固定化漆酶的制备

1.2.2.1 包埋法

称取一定量海藻酸钠加水50 mL,加热使其溶解,然后加入5 mL粗酶液搅拌均匀,用5号注射器加在一定质量分数的CaCl₂溶液中并拉成管状,凝固2 min,用蒸馏水洗涤固定好的管状固定化漆酶数次,置于4℃冰箱中冷藏备用.

1.2.2.2 包埋-交联法

称取一定质量的海藻酸钠加水50 mL,加热溶解,加入5 mL粗酶液继续搅拌均匀,用5号注射器加在含有一定浓度壳聚糖的一定浓度的CaCl₂溶液中并拉成管状,凝固2 min,用蒸馏水洗涤固定好的固定化漆酶数次,然后将固定酶加入一定浓度的戊二醛溶液中进行交联,隔夜(10 h)后用水洗涤数次,将残余戊二醛洗去置于4℃冰箱中冷藏备用.

2 结果与分析

2.1 固定化漆酶制备条件对固定化漆酶活力的影响

2.1.1 包埋法

2.1.1.1 不同浓度的海藻酸钠对活力的影响

漆酶固定化的最适海藻酸钠浓度为3%(图1).海藻酸钠浓度增加,包埋的漆酶的量会逐渐增加,与此同时,载体的强度增加,表面更加致密,底物扩散更加困难.

2.1.1.2 不同浓度的CaCl₂溶液对海藻酸钠固定化漆酶活力的影响

当CaCl₂浓度为1.5%时酶活最高(图2).“蛋盒”模型中,凝胶强度与钙离子浓度成正比,同时,高浓度的钙离子对漆酶有抑制作用,因此酶活会先升高后降低.

117

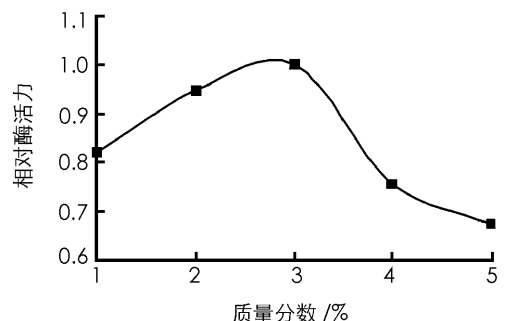


图1 包埋法最适海藻酸钠浓度曲线

图2 包埋法最适CaCl₂浓度曲线

2.1.2 包埋-交联法

2.1.2.1 不同质量分数的海藻酸钠对包埋-交联法固定化漆酶活力的影响

包埋-交联法固定化漆酶的最适海藻酸钠浓度为 2%(图 3). 由于戊二醛会在载体表面形成一层致密的保护膜, 可增加微胶囊球的强度, 可阻止底物的扩散, 表现为酶活力的降低.

2.1.2.2 不同浓度的 CaCl_2 溶液对包埋-交联法固定化漆酶活力的影响

最适 CaCl_2 浓度为 2%(图 4). 海藻酸钠与 Ca^{2+} 形成的“蛋壳”模型中, 凝胶强度与钙离子浓度成正比, 同时, 钙离子对漆酶有抑制作用, 随着钙离子浓度的增大, 会逐渐抑制漆酶的活性.

2.1.2.3 不同浓度的壳聚糖对包埋-交联法固定化漆酶活力的影响

最适壳聚糖浓度为 1.5%(图 4). 因为高浓度的壳聚糖使得载体表面的聚电解质膜更加致密, 造成底物扩散困难, 从而造成固定化酶活力回收降低.

2.1.2.4 戊二醛浓度对包埋-交联法固定化漆酶活力的影响

如图 4 所示, 随着戊二醛浓度增加, 固定化酶活力先增加后降低, 在 1%处酶活达到最高. 随着戊二醛浓度的增加, 戊二醛、壳聚糖、漆酶发生强烈的交联反应, 形成致密的聚电解质膜, 抑制了底物的扩散. 这与 Ida Genta^[9]研究戊二醛对药物在微胶囊释放影响一致.

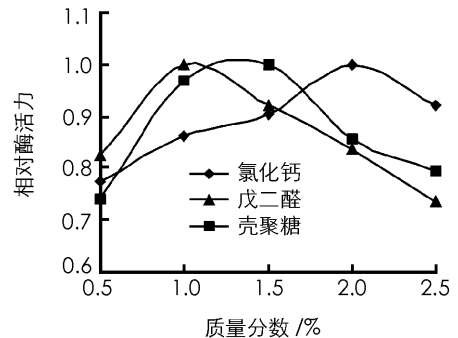


图 3 包埋-交联法最适海藻酸钠浓度

图 4 包埋-交联法最适 CaCl_2 、戊二醛、壳聚糖浓度

2.2 固定化漆酶性质的研究

2.2.1 pH 对酶活性的影响

两种固定化酶的最适 pH 都为 5.0, 与游离酶的最适 pH 值 4.6 相比, pH 值向碱性方向偏移(图 5). 固定化酶在 pH 为 4.6~5.4 范围内, 有较高的活力. 相对于包埋-交联法固定化酶来说, 包埋法固定化酶 pH 稳定性更好.

2.2.2 温度对酶活力的影响

如图 6 所示, 两种固定化酶的最适温度均为 30 °C, 而游离酶的最适温度为 20 °C; 另外, 包埋法固定化酶和包埋-交联法固定化酶分别在 20~60 °C 和 20~40 °C 范围内保持较高的酶活力回收, 而游离酶的操作温度是 10~30 °C, 说明漆酶经固定化后, 热稳定性明显提高. 这是因为固定化酶中有 Ca^{2+} 存在, 据文献^[10]报道, Ca^{2+} 可与磷脂、蛋白质形成复合物, 可显著防止蛋白质受热引起变性.

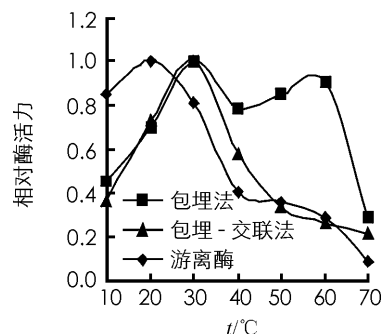


图 5 固定化酶和游离酶的最适 pH

图 6 固定化酶和游离酶的最适温度

2.2.3 固定化漆酶的操作稳定性

两种固定化酶酶活均出现多次升高和降低,包埋法固定化酶酶活出现三个峰,而包埋-交联法固定化酶酶活出现4个峰(图7),包埋交联法固定化漆酶在重复操作18次后,酶活不再上升,而包埋法固定化酶在重复操作12次以后,酶活逐渐降低.海藻酸钠包埋法制备的固定化酶机械强度较小,漆酶容易泄露,而包埋-交联法用戊二醛进行表面修饰,增强了固定化酶的机械强度,延长反应重复次数,提高了操作稳定性.

2.2.4 酶反应动力学

分别以不同浓度的邻联甲苯胺为底物,于30℃、pH 5.0的条件下测游离酶/固定化酶的活性.按Lineweaver-Burk作图法,以 $1/v$ 对 $1/[s]$ 作图(图8),并求 K_m 值.游离酶、包埋法固定化酶和包埋-交联法固定化酶的 K_m 值分别为1.22,2.86,3.30 mmol/L.由此可见,固定化漆酶对底物的亲和力都不同程度的降低.漆酶被固定化后,底物需要经扩散作用才能与漆酶接触从而发生作用,包埋-交联法中戊二醛的交联作用会使底物的扩散更加困难,而且戊二醛与漆酶的交联作用会使漆酶的结构发生改变,从而影响漆酶与底物的亲和力.

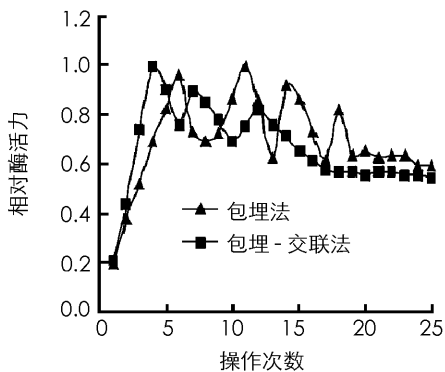


图7 固定化漆酶的操作稳定性

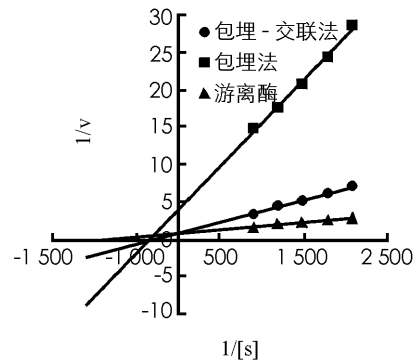


图8 酶反应动力学关系

3 结 论

包埋法固定化漆酶耐热性增加,操作稳定性增加,固定化酶制备成本低,过程简单,条件温和,为其工业应用提供了可能性.包埋-交联法固定化漆酶耐热性增加,机械强度增加,操作稳定性增加,使得固定化酶的重复利用率更高,但是其操作过程比包埋法复杂,成本较高,而且由于戊二醛与漆酶的交联作用使得固定化漆酶的酶活有所降低.

致谢:感谢导师朱启忠教授的悉心指导,感谢柴迎梅老师、康香玲老师提出的宝贵建议.

参考文献:

- [1] Eggert C, Temp U, Eriksson K E. The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus Cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1151 - 1158.
- [2] 李洪臣,于秀俊,杨秀艳. 漆酶及其应用 [J]. *沧州师范专科学校学报*, 2005, 21(4): 91 - 92.
- [3] Gianna Palmieri, Paola Giardina, Giovanni Sannia. Laccase-Mediated Remazol Brilliant Blue R Decolorization in a Fixed-Bed Bioreactor [J]. *Biotechnol*, 2005, 21(5): 1436 - 1441.
- [4] 姜德生,龙胜亚,肖海燕,等. 磁性壳聚糖微球的制备及其用作漆酶固定化载体 [J]. *应用化学*, 2005, 22(10): 1122 - 1126.
- [5] 王家东,姜子明,曹 彬,等. 固定化糖化酶的研究 [J]. *中国调味品*, 2006, 3: 14 - 16.
- [6] Filiz Kara, Gökhan Demirel, Hayrettin Tümtürk. Immobilization of Urease by Using Chitosan-Alginate and Poly (Acrylamide-

- co-Acrylic Acid)/ κ -Carrageenan Kupperts [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2006, 29(3): 207 – 211.
- [7] 孙万成, 宋龄瑛, 蒋笃孝, 等. 微胶囊法和交联法固定化磷脂酶 A1 的比较 [J]. *暨南大学学报*, 2004, 25(5): 637 – 641.
- [8] 朱启忠, 王宜磊. 毛茛菌胞外酶的纯化及部分性质研究 [J]. *生物技术*, 2000, 10(2): 11 – 13.
- [9] Ida Genta, Monica Costantini, Annalia Asti, Bice Conti, Luisa Montanari. Influence of Glutaraldehyde on Drug Release and Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres [J]. *Carbohydrate polymers*, 1998, 36(2): 81 – 88.
- [10] Fangjun Wu, Carol R. Flach, Barbara A. Seaton, Tanya R. Mealy, Richard Mendelsohn. Stability of Annexin V in Ternary Complexes with Ca^{2+} and Anionic Phospholipids: IR Studies of Monolayer and Bulk Phases [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(2): 792 – 799.

Studies on Immobilization of Laccase by Sodium Alginate/Chitosan

XU Guo-ying, ZHU Qi-zhong, DONG Xue-wei,
LÜ Xin-ping, YU Tao, QU Yue-wen

Marine College of Shandong University (Weihai Campus), Weihai Shandong 264209, China

Abstract: Laccase was immobilized with the methods of sodium alginate embedding or sodium alginate-chitosan embed-cross-linking. The immobilization conditions and the characterizations of the immobilized enzyme and the free laccase were investigated. The results showed that the optimal conditions of immobilizing laccase with the embedding method and the embed-crosslinking method were 3% sodium alginate + 1.5% CaCl_2 and 2% sodium alginate + 2% CaCl_2 + 1.5% chitosan + 1% glutaraldehyde, respectively. The two kinds of immobilized laccase exhibited the same optimal pH-value (5.0) and action temperature (30 °C); however, the optimal pH-value and action temperature of the free enzyme were 4.6 and 20 °C. Michaelis constant of the immobilized laccase by these two methods and of the free enzyme were 3.3 mmol/L, 2.8 mmol/L and 1.22 mmol/L, respectively.

Key words: embedding method; embed-cross-linking method; immobilization; laccase

责任编辑 胡 杨