

壳聚糖固定化红树莓超氧化物歧化酶的研究

宣景宏^{1,2}, 张春艳¹, 孟宪军¹

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 110161, 2. 辽宁省果蚕管理总站, 沈阳 110034)

摘要:研究了壳聚糖固定化超氧化物歧化酶的酶学性质。分别以不同方法对超氧化物歧化酶进行固定并比较其活力, 对固定化方法进行相应的优化, 对固定化超氧化物歧化酶进行酶学性质测定; 研究结果表明以壳聚糖为载体, 戊二醛交联法制备固定化超氧化物歧化酶, 优化条件下制备的固定化酶, 所得壳聚糖酶粉活力较高, 热稳定性和酸碱稳定性较游离酶有很大的提高, 且具有良好的贮存稳定性; 结论是壳聚糖—戊二醛交联法可用于制备性能较优的固定化超氧化物歧化酶。

关键词:超氧化物歧化酶; 壳聚糖; 固定化酶

中图分类号: S662.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)02-0031-03

树莓也称为覆盆子, 属蔷薇科悬钩子属植物。其中红树莓营养丰富, 各种生物活性物质含量较高, 具有较高的药用医用价值。目前我国各省区红树莓种植不断发展, 但红树莓活性物质应用方面进展较慢。红树莓中超氧化物歧化酶含量丰富, 有进一步研究价值。超氧化物歧化酶是广泛存在于生物体内的金属酶, 可专一清除细胞外液中存在的与一些疾病和发展密切相关的超氧阴离子(O_2^-), 具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、防辐射和延缓衰老等作用, 在化妆品、食品和医药等领域有着广泛的应用前景。将其固定化, 不但能保持原有酶活性, 而且稳定性也有所提高, 还兼有可回收和反复使用等优点。目前植物中提取SOD的固定化研究较少, 该研究以壳聚糖作为载体, 固定化从红树莓中提取的超氧化物歧化酶, 进行有关其对贮存、热、pH的稳定性等酶学性质研究的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 以下简称SOD): 红树莓中提取, 酶活力192U/mL; 壳聚糖:

上海伯奥生物科技有限公司, 脱乙酰度 $\geq 90.0\%$, 粘度 $< 100\text{cps}$; 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 SOD制备 取一定量红树莓果实, 加100 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 在冰浴条件下研磨, 9500r/min离心20min, 取上清液加50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在4℃下静置2h, 12000r/min离心30min去除沉淀, 留取上清液用90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析2h, 12000r/min离心40min, 弃去上清液, 沉淀用适量50 mmol/L 磷酸盐缓冲液溶解, 透析过夜, 透析液经浓缩后12000r/min离心30min, 得到SOD酶浓缩液, 酶浓缩液过Sephadex G-100, 收集酶活性部分。

1.2.2 SOD活力测定 NBT光还原法^[5,9], 以抑制NBT光还原的50%的酶液量为一个酶活力单位(U)。

1.2.3 固定化SOD的制备

1.2.3.1 壳聚糖—戊二醛交联法 精密称取2.0g壳聚糖粉, 加入25 mL 0.3%的戊二醛溶液, 室温下搅拌3h后, 置4℃下放置过夜, 抽滤, 并用50 mL 磷酸盐缓冲液分5次洗涤, 得到淡黄色活化的壳聚糖粉末; 取0.50g活化的壳聚糖粉末, 加入适量SOD酶液, 室温下搅拌1.5h, 于4℃下放置过夜; 抽滤, 用50 mL 磷酸盐缓冲液分5次洗涤, 即得到固定化SOD酶粉。

1.2.3.2 壳聚糖微球交联法 取适量壳聚糖溶于1%醋酸, 配成2.5%壳聚糖溶液, 用注射器注入凝结液(20%NaOH, 30%CH₃OH水溶液)中, 得粒度均匀、形状规整的壳聚糖微球, 水洗至中性, 湿态保存; 将壳聚糖微球置于6%戊二醛溶液中, 30℃下恒温振荡2h, 用大量水反复洗涤, 以去除残留的戊二醛溶液, 得到壳聚糖微球载体; 称取一定量壳聚糖微球载

第一作者简介: 宣景宏, 男, 1970年出生, 沈阳农业大学食品学院在职博士生, 研究员, 现任辽宁省果蚕管理总站果树科科长, 从事果树生产技术推广与管理和果品贮藏和保鲜方面的研究, 主持和参加了部省级10多项果业研究和推广课题, 其中获得省部级一等奖1项、二等奖4项、三等奖1项, 编制辽宁省地方标准8个, 农业行业标准1个, 编著书籍4部, 以第一作者发表论文50余篇, 现为中国园艺学会理事、中国果品流通协会梨分会常务理事、辽宁省果树学会理事、辽宁省新世纪“百千万人才工程”百人层次专家、辽宁金农热线首席专家。

收稿日期: 2006-11-11

体,加入适量 SOD 酶液, 30℃下恒温振荡 1 h, 于 4℃下放置过夜, 弃去上层溶液, 用大量双蒸水反复洗涤, 得固定化 SOD。以 U/g 载体表示固定化酶活力。

1.2.3.3 取一定量壳聚糖微球交联法制备的壳聚糖微球载体, 加入适量 SOD 酶液, 及一定浓度的戊二醛溶液, 25℃下恒温振荡 1.5 h, 室温放置 0.5 h, 弃去上层溶液, 用磷酸盐缓冲溶液反复洗涤载体, 得固定化 SOD。

1.2.3.4 珠状壳聚糖固定化 SOD 取 6mL 用 1% 醋酸配制成的 5% 壳聚糖溶液, 用注射器注入到 50mL 正丁醇中, 搅拌, 1 h 后加入 0.48mL 25% 戊二醛活化 3h, 过滤, 加入乙醇洗去正丁醇, 再用蒸馏水洗去乙醇, 抽滤, 即得均匀珠状壳聚糖载体; 取一定量载体, 加入 SOD 酶液, 4℃过夜, 磷酸盐缓冲液洗至滤液无酶, 得珠状壳聚糖固定化 SOD。

1.2.4 溶液酶和固定化酶的贮存稳定性测定 将等酶活力单位的溶液酶和固定化酶分别在室温下保存, 间隔取样测定相对酶活力。

1.2.5 固定化酶的热稳定性测定 固定化酶在 90℃水浴中保温, 定时取样测定 SOD 相对活性, 溶液 SOD 作为对照。

1.2.6 固定化酶的 pH 稳定性测定 固定化酶在极端 pH 值条件下, 30℃保温, 定时取样测定 SOD 相对活性, 溶液 SOD 作为对照。

2 结果与分析

2.1 固定化方法的筛选

2.1.1 壳聚糖微球交联法 由表 1 可知, 在固定化 SOD 活力测定结果中, 以壳聚糖微球交联法制备的固定化 SOD 微球在戊二醛用量不同时, 得到的固定化 SOD 活力不同, 当戊二醛浓度为 0.3% 时, 酶活力和酶活回收率相对较高。选取戊二醛浓度为 0.3% 制备固定化酶, 与其他固定化 SOD 制备方法制备的固定化酶比较酶活。

表 1 固定化 SOD 活力比较

戊二醛浓度(%)	酶活力(U/g)	酶活回收率(%)
0	6.8	1.2
0.3	57.23	10.09
5	31.22	5.51

2.1.2 固定化 SOD 活力比较 由表 2 可知, 在固定化 SOD 活力测定结果中, 以壳聚糖微球交联法制备的固定化 SOD 微球虽可得到酶活, 但酶活力及回收率相对较低, 以壳聚糖-戊二醛交联法制备的固定化 SOD 酶粉, 酶活力和酶活回收率均较理想。选择以

壳聚糖-戊二醛交联法制备的固定化 SOD 酶粉进行后序酶学性质测定。

表 2 不同种类固定化 SOD 比较

固定化 SOD 种类	酶活力(U/g)	酶活回收率(%)
固定化 SOD 酶粉	192	34
固定化 SOD 微球	57.25	10.1
珠状壳聚糖固定化 SOD	5.67	1.0

2.2 溶液酶和固定化酶的贮存稳定性

将等酶活力单位的溶液酶和固定化酶分别在室温下放置一定时间后, 相对酶活测定结果见图 1, 图 1 表明溶液酶常温保存易于失活, 而 SOD 经壳聚糖固定化后, 可以较长时间保持很高的活力。

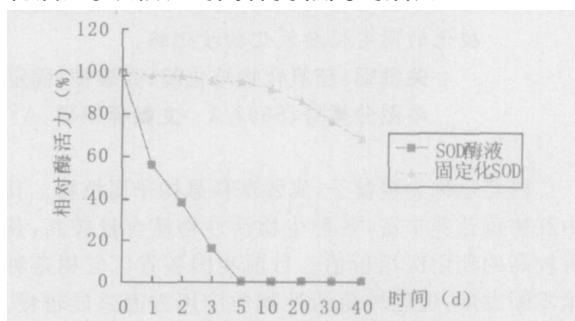


图 1 溶液酶与固定化酶贮存稳定性比较

2.3 固定化酶的热稳定性

固定化酶在 90℃中水浴保温, 定时取样测定 SOD 活性, 结果见图 2, 在测试的 90℃温度水平上, 固定化酶相对酶活力始终高于溶液酶 SOD, 尤其是在较长时间的情况下, 固定化酶的相对酶活力显著高于溶液酶。180 min 后, 溶液酶相对酶活力为 32.8%, 而固定化酶相对酶活力仍保持在 60% 以上。

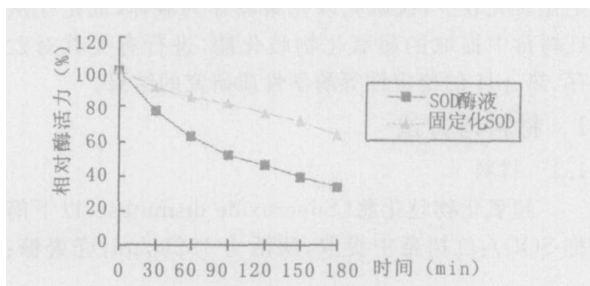


图 2 溶液酶与固定化酶热稳定性比较

2.4 固定化酶的 pH 稳定性

固定化酶在极端 pH 溶液条件下, 30℃保温, 定时取样测定 SOD 活性, 测定结果见图 3、图 4, 在 pH=2 的酸性条件下, 随着时间的延长, 固定化酶与溶液酶的相对酶活力逐渐降低, 且固定化酶的相对酶活力显著高于溶液酶; 在 pH=13 的碱性条件下, 随着时间的延长, 固定化酶与溶液酶的相对酶活力均呈下降趋势, 且固定化酶的相对酶活力始终高于溶液酶, 固定化酶在极端酸性和碱性条件下的稳定性均有所

增加。

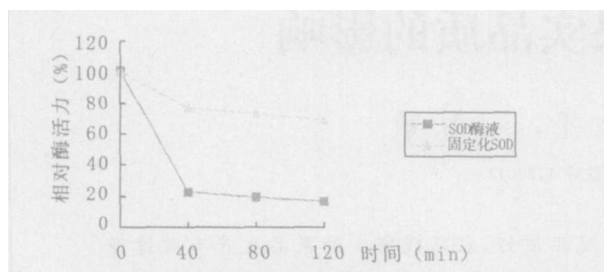


图3 溶液酶和固定化酶酸稳定性比较

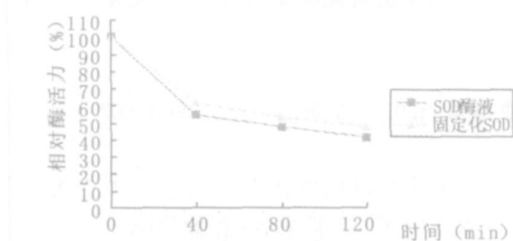


图4 溶液酶与固定酶碱稳定性比较

3 讨论与结论

我国树莓资源丰富, 开发应用前景广阔。壳聚糖来源丰富, 无毒, 无抗原性, 化学性质比较稳定, 是性能良好的固定化酶载体, 具备规模生产的条件。树莓中超氧化物歧化酶含量较高, 且酶金属构象不同于其它酶。因此将树莓超氧化物歧化酶进行固定化研究具有现实意义。

目前, 壳聚糖作为固定化酶载体应用于固定化SOD的研究较少。筛选适合的壳聚糖及处理方法对

SOD进行固定化, 制得壳聚糖固定化SOD的研究不但能保持原有酶活性, 而且酶稳定性也有所提高, 还兼有可回收和反复使用等优点, 固定化酶可进一步组装为SOD酶传感器, 用于清除超氧阴离子自由基药物的筛选。该研究比较了SOD固定化酶与溶液酶的酶学性质, 结果表明SOD经壳聚糖固定化后稳定性提高。这可能是由于SOD共价交联于壳聚糖表面后有效的保护了SOD的次级键, 经壳聚糖固定化后, SOD分子共价交联在壳聚糖上, 由于稳定酶分子构象的次级键被保护在里侧固定化酶能够稳定其构象从而得到了保护, 因此, SOD固定化后酶的温度稳定性、pH稳定性均有所提高。壳聚糖固定化SOD的这些酶学性质特点, 扩展了SOD的实用价值, 有利于它在食品、日化及药物等方面的实际应用。

参考文献:

- [1] 陈淮杨, 刘望夷. 从超氧化物歧化酶的分布和结构看其分子进化[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(5): 408-413.
- [2] 袁勤生, 邓碧玉, 杨中, 等. 用固定化方法研究超氧化物歧化酶的活性与结构的关系[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(3): 326-330.
- [3] 邹国林, 徐传斌, 胡萍, 等. 超氧化物歧化酶明胶微球的制备及性质[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1995, 41(4): 517-520.
- [4] 纪平雄, 侯瑶, 徐凤彩. 丝素-壳聚糖合金膜固定化超氧化物歧化酶的研究[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(2): 51-53.
- [5] 吕淑霞. 基础生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003. 49-52, 77-82.
- [6] GIANNOPOLITIS T, RIES S. Superoxide dismutase [J]. Plant Physiology, 1977, 59: 309-314.
- [7] 郑迎迎, 李大力. 壳聚糖载体的制备及脲酶的固定化研究[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 56-59.

Study on the Immobilization of Superoxide dismutase in Red Raspberry with Chitosan

XUAN Jing hong^{1,2}, ZHANG Chun yan¹, MENG Xian jun¹

(1. Shenyang Agriculture University Food Science College, Shenyang 110160; 2. Fruit and Silk Worm Administrative General Station of Liaoning Province, shenyang 110034)

Abstract: Studied the enzyme properties of immobilized superoxide dismutase with chitosan. Immobilized superoxide dismutase were prepared by different process. The methods were optimized by comparing their activities. Determined the enzyme properties of immobilized superoxide dismutase. Results showed superoxide dismutase on chitosan with glutaraldehyde as crosslinking agent showed highest activities and recovery rates. The temperature stability and the pH stability of the immobilized enzyme was much better than the free enzyme. And the immobilized enzyme also showed a good store stability. The immobilized superoxide dismutase can be prepared by crosslinking glutaraldehyde on chitosan, and possessed good properties.

Key words: Superoxide dismutase; Immobilized enzyme; Chitosan