

改良壳聚糖固定化真菌漆酶的研究

高千千, 朱启忠, 杨志国, 杨列健, 白朝阳

(山东大学威海分校, 山东 威海 264209)

摘要:以改良壳聚糖-壳聚糖铜为载体, 戊二醛为交联剂对真菌漆酶进行了固定化研究, 探讨了其固定化条件及固定化酶的部分性质。结果表明: 戊二醛最适浓度为 0.5%。交联最佳时间 14 h, 最佳给酶量约 1.3 mg, 固定时间 12 h 或 0.5 h。在此条件下获得的固定化漆酶酶活回收率分别为 56.4%与 51.2%。与游离酶相比, 固定化漆酶与作用底物邻联甲苯胺的亲合力降低, 但固定化漆酶的稳定性有明显改善。最适温度分别为 40℃和 80℃, 分别比游离酶提高 10℃和 50℃; 90℃条件下保温 5 h 后固定化酶活保留率分别为 57.4%和 40%, 而相同条件下游离酶酶活明显下降。

关键词: 改良壳聚糖; 固定化; 真菌漆酶

中图分类号: Q 949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0031-04

漆酶(Laccase, p-diphenoloxidase, E. C. 1. 10. 3. 2)是一类含 4 个铜离子的多酚氧化酶, 1883 年由 Yoshida 在漆树生漆中发现^[1]。它广泛存在于自然界的多种植物和菌类分泌物中, 可分为真菌漆酶和漆树漆酶两大类^[2]。真菌漆酶是在 19 世纪 90 年代被发现的, 其重要的生产者是担子菌中的白腐菌(White rot fungi)。

漆酶可以催化空气中的氧气, 直接氧化分解各种酚类染料、取代酚、氯酚、硫酚、双酚 A、芳香胺等。由于漆酶具有较好的底物专一性和稳定性, 在废水处理、造纸、芳香化合物转化、环境监测、生物传感器构建等方面具有重要应用价值^[3]。但游离酶在使用过程中易随环境的变化而变性失活, 且不易从反应体系中分离达到重复使用的目的, 在一定程度上限制了漆酶的工业化应用。酶固定化技术是实现酶重复连续使用和改善酶稳定性的有效手段。近年来, 国际上对真菌漆酶的固定化进行了较深入研究; 国内这方面的研究是近几年才开始的^[4]。使用的固定化载体包括特制的多孔性玻璃(controlled porosity glass)、环氧乙烷丙烯酸颗粒(oxirane acrylic beads)和亲水性滤膜(hydrophilic PVDF microfiltration membrane)等^[5]。

以壳聚糖铜和壳聚糖戊二醛为载体固定化真菌漆酶已见报道, 然而以改良壳聚糖为载体、戊二醛为交联

剂固定真菌漆酶却鲜见报道。该试验以改良壳聚糖-壳聚糖铜为载体, 戊二醛为交联剂来固定真菌漆酶, 探讨其固定化条件, 为固定化漆酶的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 菌株采自威海市玛珈山, 并经分离纯化而得, 经培养初步鉴定为白毒鹅膏菌(*Amanita verna*), 测定发现具有较高漆酶活性。

1.1.2 主要仪器及试剂 邻联甲苯胺, 考马斯亮蓝, 氯化钠, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钾, 醋酸, 醋酸钠, 硫酸铜, 壳聚糖, 戊二醛, 琼脂, 硫酸镁, 酵母膏, 麸皮, 维生素 B。所用试剂均为分析纯。紫外分光光度计, 灭菌锅, 超净工作台, 离心机, 抽滤机, pH 计, 摇床, 恒温培养箱等。

1.2 方法

1.2.1 培养基 综合马铃薯固体培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, VB_1 0.01 g/L, 琼脂 20 g/L。液体培养基: 固体培养基中去掉琼脂, 加入 0.5%的酵母膏。

1.2.2 培养方法 250 mL 三角瓶中装液体培养基 50 mL, 接入 7~8 日龄平板菌种 4 片(10 mm) 130 r/min, 27℃, 恒温震荡培养。

1.2.3 粗酶液制备 培养 7~8 d 的液体培养基, 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为粗酶液, 冰箱保存备用。

1.2.4 载体的制备 改良壳聚糖的制备: 将壳聚糖用 2%的醋酸水溶液配成溶液, 取适量 $5\text{H}_2\text{O} \cdot \text{CuSO}_4$, 加一定量蒸馏水溶解, 将两溶液混合, 置于摇床上络合 12 h, 静置 0.5 h, 加入 95%的乙醇沉淀, 然后抽滤, 用蒸馏水反复洗涤沉淀, 直至用 Na_2S 溶液检测抽滤液中没有铜离子, 制得浅绿色壳聚糖铜。将所制载体置于冰箱中冷藏备用。载体的制备: 取 1 g 壳聚糖铜与 15 mL 一定浓

第一作者简介: 高千千(1988-), 女, 山东省济宁邹城市人, 本科, 研究方向为生物化学。E-mail: duoduo19881016@163.com。

通讯作者: 朱启忠(1957-), 男, 教授, 硕士研究生导师, 现从事酶工程研究工作。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn。

基金项目: 国家青少年创新性资助项目(07-30); 山东大学威海分校 2008 年科技立项资助项目(A080172)。

收稿日期: 2008-12-20

度的戊二醛混合搅拌均匀,静置 16 h 后抽滤,用蒸馏水反复洗涤沉淀,至抽滤液为中性,得载体。

1.2.5 漆酶的固定化 取 0.6 g 载体,加入 6 mL pH 5.0 的磷酸缓冲液,搅拌均匀后与一定量的粗酶液混合,震荡放置过夜后抽滤。反复洗涤沉淀,至用邻联甲苯胺溶液检测抽滤液中没有游离酶。制得固定化漆酶。

1.2.6 酶活的测定 游离酶酶活测定^[6]:取 3.5 mL 0.2 mol/L、pH 4.6 的醋酸缓冲液和 0.5 mL 3.36 mmol/L 邻联甲苯胺溶液与 0.5 mL 的粗酶液混合,于室温下反应 5 min 后,于 595 nm 处比色。以 1 min 使 OD₅₉₅ 增加 0.01 为 1 个酶活力单位。固定化漆酶酶活测定:取 0.3 g 固定化酶,与 5 mL pH 4.6 的醋酸缓冲液混合均匀后,加入 1 mL 3.36 mol/L 邻联甲苯胺溶液,于室温下反应 5 min 后,以 5 000 r/min 离心,取上清液在 595 nm 处比色。固定化酶酶活保持率=固定化后酶的活力/固定化时加入的酶的活力×100%,固定化酶比活力(U/mg)=固定化酶活力/固定化酶干重^[7]。

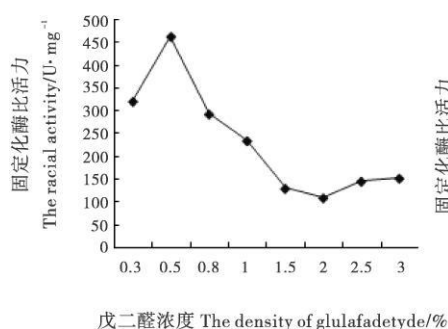


图 1 戊二醛浓度对固定化酶活的影响

Fig.1 The effect of the density of glutaraldehyde on the activity of laccase

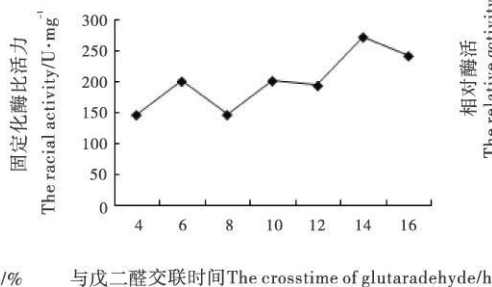


图 2 戊二醛交联时间对固定化酶活的影响

Fig.2 The effect of the crosstime on the activity of the laccase

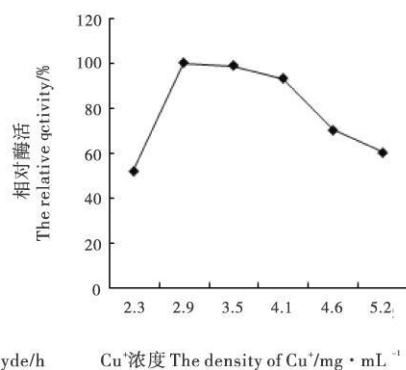


图 3 Cu²⁺ 浓度对固定化酶活的影响

Fig.3 The effect of the density of Cu²⁺ on the activity of the laccase

2.1.2 戊二醛交联时间 取 7 份 1.0 g 的壳聚糖铜,与 15 mL 0.5% 的戊二醛溶液混合,搅拌均匀后,分别静置 4、6、8、10、12、14、16 h。抽滤,洗至中性。按上述方法制备固定化酶并测其活性。戊二醛交联时间与固定化酶活力的关系见图 2。由图 2 可看出,随交联时间的加长,固定化酶比活变化不太规则。这是由于改良壳聚糖上交联的戊二醛的量的增加与其对酶的变性作用综合的结果。当交联时间为 14 h 时,固定化酶比活达到最大,表明戊二醛对酶的两种相反作用达到平衡。

2.1.3 Cu²⁺ 浓度 称 6 份 0.3 g 的壳聚糖,用 2% 的醋酸水溶液配成 1.25% 的溶液,分别与用 3 mL 蒸馏水溶解的 0.24、0.30、0.36、0.42、0.48、0.54 g CuSO₄·5H₂O 络合 12 h。静置 0.5 h,抽滤、洗涤,制得改良壳聚糖铜。各取 1 g 上述壳聚糖铜,分别与 15 mL 0.5% 的戊二醛交联 14 h,抽滤、洗涤,得载体。按上述方法制备固定化酶并测酶活。Cu²⁺ 浓度与固定化酶活的关系见图 3。随

1.2.7 蛋白质浓度测定 考马斯亮蓝法^[8]—牛血清蛋白做标准曲线。

2 结果与分析

2.1 固定化条件对固定化酶活性的影响

2.1.1 戊二醛浓度 分别取 8 份 1.0 g 的壳聚糖铜与 15 mL 浓度分别为 0.3%、0.5%、0.8%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的戊二醛溶液混合,搅拌均匀后静置过夜。抽滤、洗涤至中性,制成固定化载体。加入 6 mL 1/15 mol/L pH 5.0 的磷酸缓冲液和等量酶液,震荡过夜后,静置 0.5 h,抽滤水洗得固定化漆酶。分别测固定化漆酶活性,戊二醛浓度与固定化酶活性关系见图 1。由图 1 可看出,随戊二醛浓度的增加,改良壳聚糖上交联的戊二醛的量也不断增加,固定的酶量也在增加,固定化酶比活力呈现明显增大的趋势。当戊二醛浓度达到 0.5% 时,固定化酶比活达到最大。之后,随着戊二醛浓度的再增加,由于戊二醛的变性作用而使固定化酶活降低。

Cu²⁺ 浓度增加,壳聚糖上络合的铜量不断增加,固定化酶活逐渐升高。当 Cu²⁺ 浓度为 2.9 mg/mL 时,酶活最大,壳聚糖上的铜量达到饱和。随后,Cu²⁺ 浓度虽然增加,但酶活在逐渐下降,这可能是因为,再增加的 Cu²⁺ 增加了固定化酶分子之间的拥挤度,使之与底物结合的空间阻碍增大。

2.1.4 给酶量对酶活的影响 称 6 份 0.6 g 的载体,各加入 6 mL pH 5.0 的磷酸缓冲液搅拌均匀后,分别与体积为 3.7、4.4、5.1、5.8、6.5、7.2 mL,蛋白质浓度为 201.8 μg/mL 的粗酶液混合,震荡过夜。抽滤、洗涤,得固定化酶并测酶活。给酶量与固定化酶活的关系见图 4。随给酶量增加,固定化酶活不断上升,在 0.75~1.31 mg 内增加较明显。给酶量为 1.31 mg 时,固定化酶活最大。

2.1.5 固定化时间 分别取 8 份 0.6 g 的载体,各加入 6 mL pH 5.0 的磷酸缓冲液,搅拌均匀后分别与 6.5 mL 的粗酶液混合,震荡 2、4、6、8、10、12、14、16 h。静置 0.5 h

后, 抽滤、洗涤, 得固定化酶, 并测酶活。固定化时间对酶活影响见图 5。由图 5 可看出, 0.5 h 时固定化酶活最大。随着固定化时间的增加, 固定化酶活先是逐渐下降, 后又上升, 在 12 h 时, 又出现一略小于 0.5 h 时的峰。这可能是因为在短时间内载体即可吸附较多的酶, 且所吸附的酶在短时间内基本不受外界环境(氧气、pH 等)

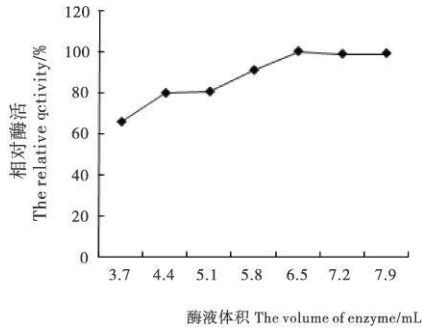


图 4 给酶量对固定化酶活的影响

Fig.4 The effect of the quantities of the laccase

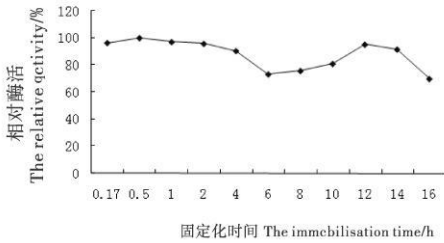


图 5 固定化时间对固定化酶活影响

Fig.5 The effect of the immobilization time

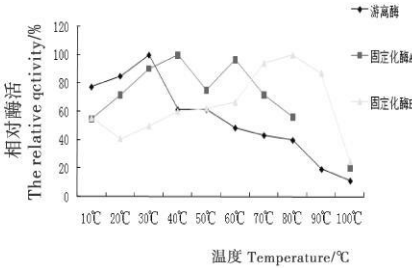


图 6 游离酶与固定化酶的最适温度

Fig.6 The optimal temperatures of free enzyme and immobilized enzyme

2.2 固定化漆酶性质

在研究固定化时间对固定化酶活的影响时, 由图 5、6 可以看到, 0.5 h 和 12 h 分别有一高峰。考虑到在工业生产时, 不同的生产流程对固定化酶的要求也不同, 有时对固定化酶的制备时间有严格要求, 有时对固定化酶的稳定性有严格要求。基于此, 同时研究了固定化时间分别为 0.5 h 和 12 h 的固定化酶。为方便叙述, 分别把这 2 种固定化时间不同的酶叫做固定化酶 A 和酶 B。

2.2.1 固定化漆酶的最适温度 在 10~90℃范围内, 分别测定不同温度下游离酶、固定化酶 A 和酶 B 的活性

的影响, 故 0.5 h 时固定化酶活较高。随固定化时间增加, 虽然酶吸附量也增加, 但受外界的影响也越来越大, 故酶活逐渐降低, 直至 6 h 时达到最低。随后, 随固定化时间增加, 酶吸附量的影响超过环境对酶活的影响, 故固定化酶活又逐渐回升, 在 12 h 时, 出现一高峰。之后, 环境的影响又进一步占优势, 酶活降低。

(见图 6)。由图 6 知, 游离酶最适温度为 30℃, 固定化酶 A 的最适温度有 2 个, 分别为 40℃和 60℃, 固定化酶 B 的最适温度最高, 为 80℃。这是因为固定化酶比起游离酶, 稳定性增加, 尤其是固定化酶 B, 耐热性大幅提高^[9]。

2.2.2 固定化漆酶的热稳定性 分别将游离酶、固定化酶 A 和固定化酶 B 置于 90℃水浴中保温, 定时取样检测其酶活(见图 7)。由图 7 知, 游离酶在 90℃水浴中保温 1 h 后, 酶活明显下降, 保温 5 h 后, 酶活损失 99%以上。固定化酶稳定性较好, 尤其是固定化酶 B, 保温 5 h 后, 酶活仍保持为原来的 57.4%。

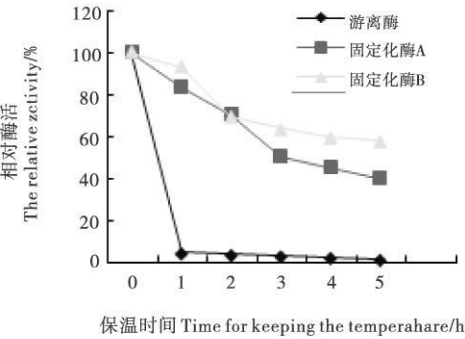


图 7 热稳定性

Fig.7 Hot stability

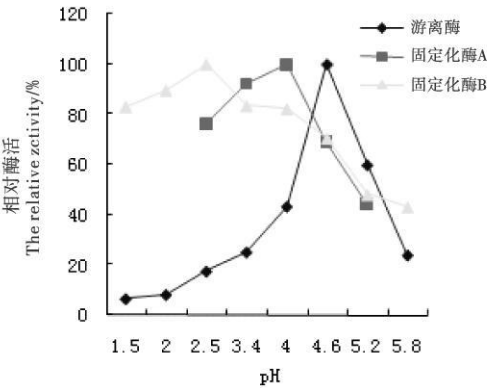


图 8 游离酶和固定化酶的最适 pH

Fig.8 The optimal pH of free enzyme and the immobilized enzyme

2.2.3 最适 pH 以 HAc-NaAc 为缓冲体系, 在 pH 1.5~6.3 范围内, 分别测定游离酶和固定化漆酶的酶活变化(见图 8)。由图 8 可知, 游离酶最适 pH 在 4.6 左右, 固定化酶 A 最适 pH 在 4.0 左右, 固定化酶 B 的最适 pH 大约为 2.5。经固定的酶的最适 pH 明显向酸性偏移, 耐酸性明显增强^[10]。

2.2.4 米氏常数 取固定化漆酶, 分别与含有不同浓度(0.05~0.3)的邻联甲苯胺的醋酸缓冲液(pH 4.6), 搅拌反应 5 min, 离心后测吸光值。用双倒数法作图 9。由图 9 求得游离酶的 K_m 为 0.359 mmol/L, 固定化酶 A 和固定化酶 B 的 K_m 分别为 0.443 mmol/L 和 0.540 mmol/L。固定化酶对底物的亲和力都降低了^[11]。

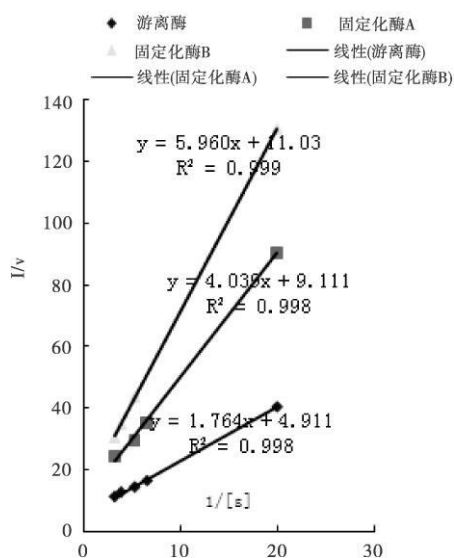


图9 游离酶和固定化酶的 K_m

Fig. 9 K_m of free enzyme and the immobilized enzyme

2.2.5 贮存稳定性 固定化酶和游离酶在 4℃分别保存 6 周后, 酶活测定见表 1。保存 1 个月后, 游离酶仅保留 25%, 而固定化酶均保留 80% 以上。固定化酶具有较好的贮存稳定性。

表 1 固定化酶的贮存稳定性 %

	1周	2周	3周	4周	5周	6周
游离酶	95	92	58	25		
固定化酶 A	96	93	87	83	75	73
固定化酶 B	97	93	89	86	80	72

3 讨论

壳聚糖化学名称为(1, 4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖, 是由来源于虾、蟹等甲壳类动物外壳的几丁质物质经脱乙酰化制备的氨基多糖。由于其在自然界中资源丰富, 价格低廉, 化学性质稳定^[8], 故被广泛应用。以改良壳聚糖为材料, 戊二醛为交联剂来对真菌漆酶进行固定化, 确定最适固定化条件为: 1 g 壳聚糖糊(0.3 g 壳聚糖

用 2% 的醋酸缓冲液配成 1.25% 的壳聚糖溶液, 与用 3 mL 的水溶解的 5H₂O · CuSO₄ 络合 12 h, 抽滤、洗涤)与 15 mL 0.5% 的戊二醛溶液搅拌均匀后交联 14 h, 加入约 1.31 mg 的粗酶液震荡放置固定 0.5 h 或 12 h。得到的固定化酶酶活回收率分别为 56.4% 与 51.2%, 但与底物的亲和力都有所降低, K_m 从游离酶的 0.359 mmol/L 分别增至 0.443 mmol/L 和 0.540 mmol/L, 但稳定性比游离酶均有很大提高, 尤其是固定 12 h 的漆酶。这可能是因为固定化后酶分子之间、以及酶与载体分子之间的相互作用, 使得酶分子结构刚性增强, 因而抗拒热、酸变性作用能力增强所致^[8], 游离酶由于缺乏这些作用力, 较易因去折叠而变性、失活。

参考文献

- [1] 张晓昱, 黄慧艳. 漆酶在食品工业中的研究与应用进展[J]. 食品科技, 2003(4): 4-7.
- [2] 季立才, 胡培植. 漆酶的结构、功能及应用氨基酸和生物资源[J]. 氨基酸和生物资源, 1996 18(1): 25-29.
- [3] 孟庆强, 陈凌云, 赵镜浩. 用自由漆酶和固定漆酶处理 2, 4-二氯苯酚土壤污染的研究[J]. 水土保持科技情报, 2003(4): 33.
- [4] Thurston C F. The structure and function of fungilaccase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994 14(1): 19-20.
- [5] 王宜磊, 邓振旭, 朱陶, 等. 彩绒革盖菌 CV-8 漆酶活性的初步研究[J]. 微生物学杂志, 1998 18(4): 60-62.
- [6] 张伟, 杨秀山. 酶的固定化技术及应用[J]. 自然杂志, 2000 22(5): 282-286.
- [7] 肖亚中, 张书祥, 胡乔彦, 等. 壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理酚类污染物的研究[J]. 微生物学报, 2003 43(2): 245.
- [8] Mozhaev V V, Martinek K. Structure stability relationship in protein: a guide to approaches to stabilizing enzymes[J]. Advan Drug Delivery Re, 1990(4): 387-419.
- [9] 黄家贤, 李悦, 霍岩丽, 等. 含环碳酸酯基新型聚合物载体的合成及固定化葡萄糖淀粉酶研究[J]. 高等学校化学学报, 2002(8): 1605-1609.
- [10] 任广智, 李振华, 何炳林. 磁性壳聚糖微球用于酶的固定化研究: 磁性壳聚糖微球对脲酶的吸附及其酶学性质的研究[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(2): 152-158.
- [11] Cresswell P, Sanderson A R. Properties and substrate exclusion effects of an insoluble pronase derivative[J]. Biochem j, 1970 119.

(该文作者还有邓丽莉, 张乐樟 单位同第一作者)

Studies on Fungal Laccase Immobilized by Improved Chitosan

GAO Qian-qian, ZHU Qi-zhong, YANG Zhi-guo, YANG Lie-jian, BAI Zhao-yang, DENG Li-li, ZHANG Le-tong

(Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

Abstract: Laccase from *Amanita vermg* was immobilized on chitosan complexed by Cu⁺ by means of covalent coupling to a glutaraldehyde-pretreated support. The condition for immobilizing and part of the qualities of the immobilized enzyme was studied. The optimal conditions of immobilization could be specified as: 0.5% glutaraldehyde crosslinked for 14 h, added about 1.3 mg free enzyme to immobilized for 12 h or 0.5 h, the recovery of which were 56.4% and 51.2%. Compared with the free enzyme, the affinity of immobilized enzymes decreased to otoluidine while the stability of them was greatly improved. The optimal temperature were 40℃ and 80℃, semperately improving 10℃ and 50℃; placed in 90℃ for 5 h, the remaining activity of the immobilized enzyme were 57.4% and 40%, while that of the free enzyme obviously decreased.

Key words: Improved chitosan; Immobilization; Fungal laccase