

壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理 酚类污染物的研究*

肖亚中^{1,2} 张书祥² 胡乔彦² 江 维² 蒲春雷¹ 施蕴渝^{1* * *}

(¹ 中国科学技术大学 中国科学院结构生物学开放实验室 合肥 230026)

(² 安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

摘 要: *Trametes* sp. AH28-2 在液体培养条件下经邻甲苯胺诱导能有效合成漆酶同工酶 A。以壳聚糖为载体,戊二醛为交联剂进行了漆酶 A 的固定化研究,确定酶固定化适宜条件为:0.1 g 壳聚糖与 15 mL 5% 戊二醛交联 8 h 后,加入 30.0 U 酶固定 12 h。在此条件下获得的固定化漆酶催化能力为 176.4U/g 载体,酶活回收率 58.5%。与游离酶相比,固定化漆酶与作用底物愈创木酚的亲合力降低,但固定化酶的稳定性有明显改善。固定化漆酶的最适温度为 55℃,比游离酶提高 5℃,70℃ 条件下保温 8 h,固定化酶保留酶活 56.5%,而在相同条件下游离酶酶活明显下降。使用固定化漆酶反应装置进行酚类化合物转化实验,连续进行 12 批次操作,固定化酶酶活仍保持 60% 以上,漆酶使用效率明显提高。

关键词: 壳聚糖,固定化,真菌漆酶,酚类污染物

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)02-0245-06

漆酶(E.C.1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化酶,它能催化许多酚类化合物发生氧化反应,并使用分子氧作为电子受体将其还原成水^[1]。漆酶作用的底物相当广泛,包括多酚、甲基替代单酚、芳香胺、苯硫醇、聚甲氧基苯,以及其它容易氧化的化合物^[2]。由于具有相当宽泛的底物专一性和较好的稳定性,漆酶在废水处理、生物漂白、芳香化合物转化、生物传感器构建等方面具有重要应用价值^[3]。漆酶主要产生于真菌,在酚类污染物的处理方面,真菌漆酶作为生物催化剂已经显示了良好的应用前景^[4]。但是,因为环境条件变化而导致漆酶在使用过程中变性失活,特别是游离酶与反应产物混合在一起,难以实现重复利用等都限制了漆酶制剂的产业化应用。因此,改善漆酶稳定性,并使酶制剂重复连续使用显得尤为重要。

酶固定化技术是实现酶重复连续使用和稳定性改善的有效手段。近年来,国际上对真菌漆酶的固定化进行了较深入研究,使用的固定化载体包括特制的多空性玻璃(controlled porosity glass)、环氧乙烷丙烯酸颗粒(oxirane acrylic beads)和亲水性微滤膜(hydrophilic PVDF microfiltration membrane)等^[5,6],但以壳聚糖为载体固定化漆酶则鲜见报道。漆酶 A(简写 Lac A)是担子菌 *Trametes* sp. AH28-2 菌株经诱导产生的漆酶同工酶之一,分子量约 62 kD,前期研究表明,该酶能有效转化氯酚和部分多环芳烃类化合物,在环境保护和酚

* 安徽省“十五”科技攻关项目(01013018)和省教委自然科学基金资助项目(2000J1013, 2002KJ034zd)

** 通讯作者。Tel: 86-0551-3607464; Fax: 86-0551-3603754; E-mail: yys@ustc.edu.cn

作者简介:肖亚中(1963-),男,安徽省临泉县人,中国科学技术大学博士,安徽大学生命科学学院教授,从事专业为生物生化与分子生物学。E-mail: xiaoyazh@sina.com

收稿日期:2002-09-18,修回日期:2002-12-02

类污染物治理等方面有潜在应用价值。为了更好的利用 Lac A, 我们使用壳聚糖对该酶进行了固定化研究。本文报道对漆酶 Lac A 固定化的影响因素和固定化酶性质研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *Trametes* sp. AH28-2 本室保藏。壳聚糖(脱乙酰度 60% ~ 70%), 安徽大学化学化工学院林宏云先生惠赠。2, 6-二氯酚和 2, 4, 6-三氯酚, 为美国 Acros organics 产品, Acrylamide 为 Bio-Rad 产品, Bisacrylamide 系 Fluka 公司出品, 戊二醛(25%)和其它试剂为国产分析纯或色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 真菌漆酶的合成及纯化 漆酶生产菌株 *Trametes* sp. AH28-2 经活化培养 72 h 后被匀浆(3 000 r/min, 30 s), 按 5% 接种量接入摇瓶, 28℃ 通气培养 3 d, 加入诱导剂, 定时检测漆酶酶活, 至峰值时停止发酵, 离心收集发酵上清液。该上清液首先被超滤浓缩 50 倍, 经透析、离心、过滤后上 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱(已被预平衡), 通过 0 ~ 0.3 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -10 mmol/L citrate- Na_2HPO_4 (pH 6.0) 缓冲液进行梯度洗脱, 收集酶活性部分, 超滤浓缩后再进行凝胶过滤层析。凝胶过滤柱为 Hiload 26/60 Superdex 200 prep grade column (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), 上样前已预平衡。层析后酶活洗脱峰为单峰, 经浓缩、透析后, 样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.2 漆酶的固定化 称取一定量壳聚糖溶于 1% 冰醋酸, 用 2 mol/L NaOH 使壳聚糖沉淀, 水洗至中性, 抽滤脱水制成湿状壳聚糖载体。使用两种方法进行酶固定化: (1) 先加入适量戊二醛, 在室温下搅拌静置, 洗去多余戊二醛, 抽滤。再加入 50 mmol/L 琥珀酸缓冲液(pH 4.5) 和一定量酶液, 搅拌一定时间, 静置、抽滤, 得固定化漆酶。(2) 先加入缓冲液和酶样, 再加入戊二醛进行处理, 制备固定化酶。

1.2.3 酶活测定 以愈创木酚为底物。游离酶测定: 在 4 mL 50 mmol/L (含 1 mmol/L 愈创木酚) 琥珀酸缓冲液(pH 4.5) 中加入 1 mL 适当稀释的酶液, 混合均匀后置于 25℃ 水浴保温反应 30 min, 于 465 nm 处测光吸收值。愈创木酚消光系数为 $\epsilon = 12000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, 定义在上述条件下, 每分钟氧化 1 μmol 愈创木酚的酶量为一个酶活力单位。固定化酶酶活测定反应体系同游离酶, 取 1 mL 固定化酶悬浮液与底物混合, 搅拌反应 30 min, 离心后取上清, 于 465 nm 处测光吸收值。固定化酶的催化能力(酶活)用每克载体被测试的酶活单位(U/g)表示。

1.2.4 蛋白质浓度测定 使用 BCA 试剂盒(HyClone-PIERCE, USA), 按厂商提供的测试程序进行, 以牛血清白蛋白作标准对照。

1.2.5 SDS-PAGE 分离胶 10%, 积层胶 5%, 电泳体系为甘氨酸-NaOH。

1.2.6 酚类污染物的处理 将固定化漆酶装入 1 cm × 10 cm 玻璃柱中, 该反应柱通过硅胶管与储液瓶和蠕动泵相连, 构成固定化漆酶反应装置。底物溶液通过蠕动泵被输入反应柱, 经固定化漆酶作用后返回储液瓶, 并在此系统中反复循环。酶催化 2, 6-二氯酚和 2, 4, 6-三氯酚反应的体系为: 200 $\mu\text{mol/L}$ 底物, 20% 乙醇, 50 mmol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液(pH 5.0), 总体积 50 mL。定时取样, 检测底物残留量, 至底物被完全氧化后去净反应混合

物。用不含底物的上述缓冲液洗涤反应柱 3 次,去净氧化反应混合物后,从柱中取出适量固定化漆酶,测定残留酶活力,并重新装入新鲜底物溶液,进行氧化循环。系统对照使用相同条件,但反应柱中的固定化酶在使用前已被失活。

1.2.7 HPLC 分析:使用 Waters 650 型 HPLC 系统,分析柱为 C18 反向柱 (Symmetry 300™ C18 5 μm 3.9×150 mm, Waters)。氯酚分析条件:流动相为乙晴:水:乙酸(75:25:0.125),等梯度洗脱,流速 0.8 mL/min,柱温 40℃,进样量 2 μL,检测波长 254 nm。

2 结 果

2.1 漆酶制备

制备的 Lac A 分子量约 62 kD,SDS-PAGE 均一(图 1),酶液在 600 nm 有光吸收,呈兰色,以愈创木酚为底物测得比活性为 65.7 U/mg。将批量制备的该酶用于后续固定化研究。

2.2 漆酶的固定化

2.2.1 酶固定化程序的选择:分别用先交联后吸附和先吸附后交联两种不同方法对 Lac A 进行固定,测定固定化漆酶活性。发现先用戊二醛交联,使壳聚糖载体功能化后再吸附固定酶蛋白,能获得较高的酶活回收率(数据未显示)。若酶先被吸附固定于载体后在行戊二醛交联,由于戊二醛的变性作用而使酶活回收率降低。因此,以下实验均采用先交联后吸附法固定 Lac A。

2.2.2 戊二醛浓度的影响:分别取 0.1 g 壳聚糖与 15 mL 不同浓度的戊二醛(1%~6%)溶液混合,搅拌反应后静置过夜,抽滤、洗干至中性,制成固定化载体。加入等量酶液,25℃搅拌 1 h,4℃静置过夜,抽滤水洗得固定化漆酶。结果表明固定化漆酶活力随戊二醛浓度增大而增加,当戊二醛浓度达到 5%,固定化漆酶活力达最大值。

2.2.3 戊二醛处理时间:将 0.1 g 壳聚糖加入 15 mL 5%戊二醛溶液中,搅拌后分别交联处理 2、4、6、8 和 12 h,同上操作制备固定化酶。实验表明,戊二醛与壳聚糖交联 8 h 时制备的载体固定化漆酶效果最佳。

2.2.4 给酶量与固定化酶活力的关系:取等量处理好的载体分别加入不同酶活单位的酶样品(10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 U),其他条件不变,制备固定化漆酶。结果表明,0.1 g 壳聚糖与 5%的戊二醛交联后,固定 30.0 U 的漆酶相对较好。

2.2.5 固定化时间:当戊二醛浓度 5%,处理温度 25℃,交联时间为 8 h 时,各加入 30.0 U 的酶样品,固定化时间分别取 8、12、16 和 20 h。结果表明,延长固定时间,固定化漆酶活力升高,但到一定时间后趋于稳定。当固定时间为 16 h 时,相对酶活达最大值,酶活回收率也最高,为初始酶活的 58.5%。

2.3 固定化漆酶性质

2.3.1 固定化漆酶的最适温度:在 30℃~60℃的范围内,测定不同温度下游离酶和固定

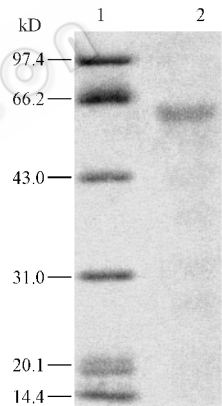


图 1 漆酶 A 的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE of the purified Lac A
1. Standard molecular mass markers ;
2. The purified Lac A.
(Protein was stained with Coomassie brilliant blue R-250)

化酶氧化愈创木酚的活性,结果表明游离酶的最适温度为 50℃ 左右,固定化漆酶的最适温度为 55℃ 左右,固定化酶的热稳定性较好。

2.3.2 固定化漆酶的最适 pH 值:以柠檬酸-磷酸氢二钠为缓冲体系,在 pH3 ~ 7 范围内测定游离酶和固定化酶活力变化。结果显示固定化漆酶的最适 pH 值在 4.3 左右,而游离酶的最适 pH 值在 4.5 左右。因此,漆酶经固定化后其最适 pH 值比游离酶有所降低。

2.3.3 固定化漆酶的热稳定性:分别将固定化酶和游离酶置于 70℃ 水浴中保温,定时取样检测其氧化愈创木酚的活性,结果见图 2。游离酶在 70℃ 水浴中保温 1 h 后,酶活力明显下降,4 h 后酶活损失达到 99% 以上。而固定化漆酶在相同条件下保温 4 h 酶活仅损失 19%,8 h 时仍保留酶活 56.5%,显示酶经固定化后其热稳定性得到明显提高。

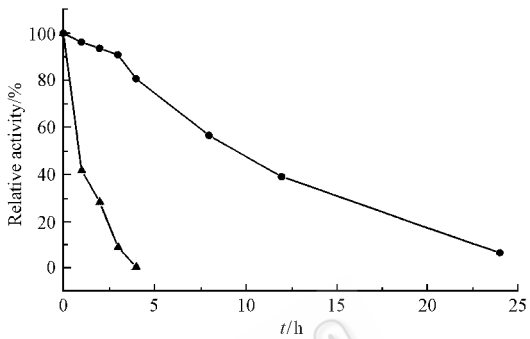


图 2 固定化漆酶的热稳定性

Fig.2 Thermal stability of immobilized Lac A
—●— Immobilized enzyme ; —▲— Free enzyme.

2.3.4 固定化漆酶的 pH 稳定性:取适量的固定化漆酶,分别悬浮于 pH 值不同的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液中,25℃ 保温,每隔一段时间取出测定酶活性。结果表明,在 pH4.0 ~ 7.0 范围内,固定化漆酶有较好的稳定性;当缓冲液 pH 低于 3.0 时,固定化漆酶活性减少较快,酶的稳定性较差。

2.3.5 固定化漆酶的贮存稳定性:将固定化漆酶在 4℃ 保藏 1、2、3、4 和 6 周后,测定酶活未见明显下降,说明固定化漆酶有良好的贮存稳定性。

2.3.4 固定化漆酶米氏常数:取固定化漆酶,分别与含有不同浓度愈创木酚 (0.1 ~ 0.7 mmol/L) 的琥珀酸盐缓冲液 (pH4.5),25℃ 搅拌反应 30 min,测定酶活力。用双倒数作图法,求得 K_m 为 0.559 mol/L,同样条件下测得游离酶的 K_m 为 0.420 mol/L,这表明漆酶在固定化后,表观米氏常数增大,与底物的亲和力有所减小。

2.4 固定化漆酶转化酚类污染物

将 2.5 g 的固定化漆酶装入玻璃反应柱中,构建的固定化酶反应装置如图 3。使用该装置在 25℃ 条件下半连续处理酚类污染物,氧化 2,4-二氯酚和 2,4,6-三氯酚的反应动态如图 4。当反应循环进行 1 h 后,有 73.7% 的 2,4-三氯酚和 47.9% 的 2,4-二氯酚被氧化,2 h 后 98.7% 的 2,4,6-三氯酚和 71.6% 的 2,4-二氯酚被去除。使用该固定化酶反应装置连续

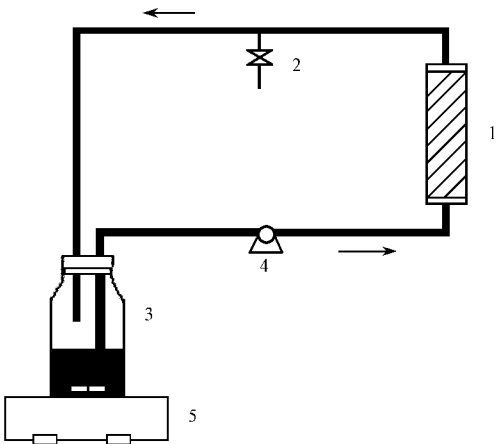


图 3 固定化漆酶半连续反应装置

Fig.3 Process scheme for the continuous oxidation of phenolic effluents by immobilized Lac A

- 1. Semi-bed reactor with immobilized Lac A ;
- 2. Sampling valve
- 3. Vessel ;
- 4. Peristaltic pump
- 5. Blender.

进行 12 批次反应操作后 ,固定化漆酶酶活仍保持 60% 以上(图 5)。因此 ,漆酶使用效率明显提高。

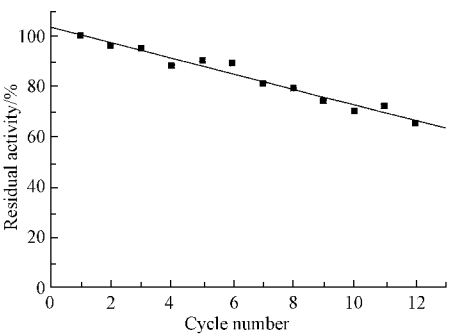
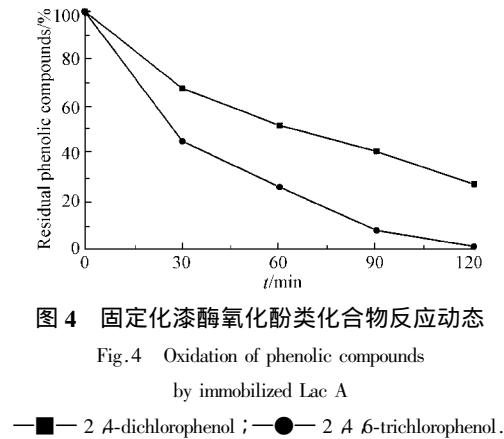


图 4 固定化漆酶氧化酚类化合物反应动态

Fig.4 Oxidation of phenolic compounds
by immobilized Lac A

—■— 2,4-dichlorophenol ; —●— 2,4,6-trichlorophenol.

图 5 固定化漆酶的操作稳定性

Fig.5 Operation stability of immobilized Lac A

3 讨 论

壳聚糖是由来源于虾、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 ,其化学名称为(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖 ,能溶解于稀酸 ,分子结构中含有丰富的游离氨基。选用其作为漆酶固定化载体是基于它在自然界中资源丰富 ,价格低廉 ,化学性质稳定 ,与其它天然材料相比更抗拒微生物分解 ,具有良好的热稳定性和机械操作性等优点。壳聚糖作载体已成功应用于固定化阿拉伯呋喃糖苷酶、酪氨酸酶和葡萄糖苷酶等酶制剂^[7]。以壳聚糖为材料 ,通过戊二醛对其进行功能化处理后固定漆酶 A ,确定的固定化适宜条件为 0.1 g 壳聚糖与 15 mL 5% 戊二醛交联 8 h 后 ,加入 30.0 U 酶室温吸附固定 12 h。在此条件下获得的固定化漆酶催化能力为 176.4 U/g 载体 ,酶活回收率达 58.5 %。与游离酶相比 ,固定化漆酶与愈创木酚的亲合力降低 ,其 K_m 值从 0.420 增至 0.559 mol/L ,但固定化漆酶的稳定性有明显改善 ,这与 Spagna 等人报道的使用壳聚糖固定化 α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶等结果相类似。由于固定化过程中酶与载体分子之间会形成静电或共价作用 ,一定程度上能改变或影响酶活性中心区域空间结构 ,使得其与底物之间的结合变得困难 ,实验上即表现为酶催化反应的 K_m 值增加。固定化漆酶 A 的最适温度为 55℃ ,比游离酶提高了 5℃ ,70℃ 条件下保温 8 h ,固定化漆酶保留酶活 56.5 % ,而在相同条件下游离酶酶活明显下降。这可能是由于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 ,因而抗拒热变性作用能力增加所致^[8] ,游离酶由于缺乏这些作用力 ,较容易因为去折叠而变性。

使用固定化漆酶反应装置进行酚类化合物转化实验 ,连续进行 12 批次操作 ,固定化酶酶活仍保持 60% 以上 ,漆酶的使用效率明显提高。

参 考 文 献

[1] Thurston C F. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology* , 1994 , 140 :19 ~ 20.

[2] Xu F. Oxidation of phenols , anilines and benzenethiols by fungal laccases : correlation between activity and redox potentials

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

as well as halide inhibition . *Biochemistry* , 1996 , **35** :7608 ~ 7614.

- [3] Abadulia E , Tzanov T , Costa S , *et al.* Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** (8) : 3357 ~ 3362.
- [4] Hublik G , and Schinner F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme Microbiol Technol* , 2000 , **27** : 330 ~ 336.
- [5] D 'Annibale A , Stazi S R , Vinciguerra V , *et al.* Oxirane-immobilized *Lintinula edodes* laccase : stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J Biotech* , 2000 , **77** : 265 ~ 273.
- [6] Jolivalt C , Brenon S , Caminade E , *et al.* Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane : characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. *J Membrane Sci* , 2000 , **180** : 103 ~ 113.
- [7] Wu F C , Tseng R L , Juang R S. Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads color removal and tyrosinase immobilization. *J Hazardous materials* , 2001 , **B 81** : 167 ~ 177.
- [8] Mozhaev V V , Martinek K. Structure stability relationship in protein : a guide to approaches to stabilizing enzymes. *Advan Drug Delivery Re* , 1990 , **4** : 387 ~ 419.

Immobilization of Fungal Laccase on Chitosan and Its Use in Phenolic Effluents Treatment *

Xiao Yazhong^{1 2} Zhang Shuxiang² Hu Qiaoyan² Jiang Wei² Pu Chunlei¹ Shi Yunyu^{1 * *}

(¹ Laboratory of Structure Biology , School of Life Sciences , University of Science and Technology of China , Hefei 230026 , China)

(² School of Life Sciences , Anhui University , Hefei 230039 , China)

Abstract : Laccase isozyme (Lac A) can be efficiently synthesized by *Trametes* sp. strain AH28-2 cultivated in liquid medium with the induction of *o*-tolidine. Lac A was immobilized on chitosan by means of covalent coupling to a glutaraldehyde-pretreated support. The conditions of immobilization of Lac A were optimized , which could be specified as : 0.1 g chitosan and 5 % glutaraldehyde 15 mL crosslinked for 8 h , then added 30.0 U enzyme to immobilize for 12 h. In this way , 176.4 U/g of catalytic activity of immobilized enzyme was available , and the recovery of enzyme activity was 58.5 % . Compared with the free enzyme , the affinity of immobilized enzyme decreased toward substrate guaiacol , but its stability was considerably improved. The optimal temperature for immobilized enzyme was 55 °C , 5 °C higher than the free enzyme. 56.5 % of initial enzyme activity could remained , if kept at a temperature of 70 °C for 8 h. Free enzyme would be greatly affected under the same conditions. The oxidation of phenolic compounds , carried out in the reaction system of immobilized enzyme , showed the activity of immobilized enzyme still remained over 60 % after 12 cycles of operation. Thus the catalytic efficiency of laccase was greatly improved.

Key words : Chitosan , Immobilization , Fungal laccase , Phenolic effluents

* This work was supported by grant from the National Natural Science Foundation of Anhui Province (01013018) and the Anhui Provincial Education Committee (2000J1013 , 2002KJ034zd)

** Corresponding author. Tel 86-551-3603464 ; Fax 86-551-3603754 ; E-mail yyshi@ustc.edu.cn