

# 漆酶在磁性壳聚糖微球上的固定及其酶学性质研究

姜德生 龙胜亚 黄俊\* 肖海燕 周菊英

( 武汉理工大学光纤传感技术研究中心 光纤传感技术与信息处理教育部重点实验室 武汉 430070 )

**摘 要** :以磁性壳聚糖微球为载体 ,戊二醛为交联剂 ,共价结合制备固定化漆酶。探讨了漆酶固定化的影响因素 ,并对固定化漆酶的性质进行了研究。确定漆酶固定化适宜条件为 50 mg 磁性壳聚糖微球 ,加入 10mL 0.8mg/mL 漆酶磷酸盐缓冲液( 0.1mol/L ,pH 7.0 )在 4℃ 固定 2h。固定化酶最适 pH 为 3.0 ,最适温度分别为 10℃ 和 55℃ ,均比游离酶降低 5℃。在 pH 3.0 温度 37℃ 时 ,固定化酶对 ABTS 的表现米氏常数为 171.1 $\mu$ mol/L。与游离酶相比 ,该固定化漆酶热稳定性明显提高 ,并具有良好的操作和存储稳定性。

**关键词** :磁性壳聚糖微球 ,漆酶 ,固定化 ,稳定性

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209 ( 2005 ) 04-0630-04

壳聚糖( Chitosan ,  $\beta$ -1,4-氨基葡萄糖)是甲壳素的脱乙酰化产物 ,具有生物降解性 ,生物相容性 ,生物亲和性和无毒等特性 ,其分子链上大量存在的羟基和氨基又使其易于进行化学改性 ,所以具有很高的应用价值 ,被广泛应用于废水处理、酶固定、药物传递、纺织等领域<sup>[1-3]</sup>。漆酶是一类含铜的多酚氧化酶( Laccase ,  $p$ -diphenoloxidase , E. C. 1.10.3.2 ) ,按其来源可分为真菌漆酶和漆树漆酶两大类。漆酶作用的底物包括多酚、苯硫醇、甲基替代单酚、聚甲氧基苯、芳香胺、二茂铁等<sup>[4,5]</sup>。由于具有较好的底物专一性和稳定性 ,漆酶在废水处理、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<sup>[6,7]</sup>。但随环境的变化 ,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。将漆酶固定在磁性壳聚糖微球上 ,既提高固定化漆酶的稳定性和 ,同时还具有易分离 ,可连续重复使用和提高固定化酶催化效率等优点 ,可以实现生产工艺和检验操作的连续化和工业化。本文以磁性壳聚糖微球为载体进行漆酶固定 ,探讨了漆酶的固定化条件以及固定化漆酶的性质。基于漆酶催化的耗氧型光纤生物传感器在临床医学检测和早期疾病诊断等方面具有十分重要的应用前景 ,使用该固定化漆酶可望提高这类传感器的性能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

血红密孔菌漆酶( 分子量 64kD )由北京中科院微生物研究所馈赠 ,纯度经电泳测试 ;2,2'-连氮-双( 3-乙基并噻-6-磺酸 )( ABTS Sigma 公司 ) ;壳聚糖( 武汉天源生物技术有限公司 ) ;脱乙酰度 80% 25% 戊二醛( A. R ,中国医药集团上海化

学试剂公司 ) ,其余试剂均为分析纯 ,实验用水为蒸馏水。

### 1.2 磁性壳聚糖微球的制备

参照文献 8 的方法制备磁流体。

### 1.3 载体的测试与表征

利用 SX-40 型( 日本 )扫描电子显微镜观察磁性壳聚糖微球的形貌。利用 LB-550 激光粒径仪( 日本 )测定磁性壳聚糖微球的粒径与粒径分布。

### 1.4 漆酶的固定化

称取 50mg 磁性壳聚糖微球 ,用磷酸盐缓冲液( 0.1mol/L , pH7.0 )溶胀 20h 抽滤后加入 10mL 具有不同漆酶浓度的磷酸盐缓冲液( 0.1mol/L ) 25℃ 在摇床上震荡 1h 后 4℃ 静置一定的时间 ,用磁铁将微球沉淀 ,倒掉上清液 ,用 pH7.0 的磷酸盐缓冲液( 0.1mol/L )反复洗涤 ,所得的固定化酶在 4℃ 保存。

### 1.5 酶活力测定

用紫外-可见分光光度法 ,以 ABTS 为底物测定漆酶活力。游离漆酶活力的测定 :3mL 含 0.05mmol/L ABTS 的酒石酸缓冲液中加入 8 $\mu$ L 17 $\mu$ g/mL 的酶液 ,在一定温度下 ,使用 UV-2450 紫外可见分光光度计测定反应体系 5min 内在 420nm 处的吸光度变化 ,求出反应初速度。固定化漆酶活力的测定 :3mL 含 0.05mmol/L ABTS 的酒石酸缓冲液中加入 20mg 固定化酶 ,在一定温度下 ,使用 UV-2450 紫外可见分光光度计测定反应体系 5min 内在 420 nm 处的吸光度变化 ,求出反应初速度。ABTS 消光系数为  $\epsilon = 36000$  L / mol  $\cdot$  cm ,以每分钟氧化 1 $\mu$ mol ABTS 的酶量定义为一个酶活单位。

## 2 结果

### 2.1 磁性壳聚糖微球的形貌

壳聚糖分子链上带有大量自由氨基 ,可利用戊二醛与其

基金项目 国家自然科学基金资助项目( 60377032 )

\* 通讯作者。Tel 86-27-87651850 ; E-mail : fosrewut@public.wh.hb.cn

作者简介 姜德生( 1949 - )男 ,湖北武汉 ,教授 ,主要从事光学敏感材料、光电子材料与器件研究。

收稿日期 2004-12-09 ,修回日期 2005-03-24

反应,交联包裹  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子,制得磁性壳聚糖微球。悬挂在微球表面的-CHO可与酶分子上的 $-\text{NH}_2$ 反应,用于酶的固定。图1为磁性壳聚糖微球的扫描电镜图片。如图所示,壳聚糖与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子形成的复合微粒呈球状,且微球表面较平滑,单分散性好,有利于漆酶的固定。该微球的平均粒径为  $5.0\mu\text{m}$ ,粒径分布范围窄,利于微球在反应体系中分散和磁分离。小粒径的微球具有更大的比表面积,可以共价结合更多的酶,同时也可以降低底物和产物扩散限制的影响。

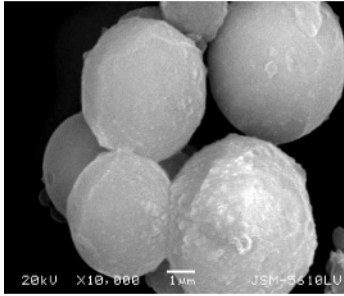


图1 磁性壳聚糖微球扫描电镜照片(10000×)

Fig.1 SEM micrograph of magnetic chitosan microspheres(10000×)

## 2.2 酶的固定化条件

在固定酶之前,载体进行充分溶胀,可使其分子链松散,有利于酶分子进入载体网络与载体上的活性基团发生反应;另一方面,溶胀性能较好的载体还有利于底物由载体表面向内部的扩散,使酶促反应进行得更为彻底。漆酶固定化的因素影响包括:加酶量、戊二醛浓度、pH和固定化时间。

**2.2.1 加酶量对酶固定化的影响:**平行称取5份50mg磁性壳聚糖微球,分别加入10mL不同浓度的漆酶磷酸盐缓冲液(pH 7.0)进行固定,并对固定化酶进行活力测试。结果表明,当所加酶液的浓度低于0.8mg/mL时,随酶液浓度的增加,固定化酶的活力随之增大,而当酶液浓度高于0.8mg/mL时,随酶液浓度的增加,固定化酶的活力反而下降。这是因为一定量交联后的载体,其活性基团的数量是一定的,在其结合位点达到饱和以前,固定化酶的数量随给酶量的增加而增加,固定化酶的活力也随之增大,当结合位点达到饱和后,有些酶分子进入载体孔深处,使底物扩散相对困难,因而,酶分子发挥作用的能力减弱,另一方面,当固定的酶数量过高时,酶分子自身的空间构象可塑性减小,从而不能充分发挥其催化功能。在本实验条件下,50mg载体固定浓度为0.8mg/mL的酶液效果最佳。

**2.2.2 戊二醛浓度对酶固定化的影响:**平行称取5份50mg不同浓度(6%~10%)戊二醛交联的磁性壳聚糖微球,分别加入10mL浓度为0.8mg/mL的漆酶磷酸盐缓冲液(pH 7.0)进行固定,并对固定化酶进行活力测试。结果表明,当戊二醛浓度低于8%时,固定化酶活力随戊二醛浓度的增加而增大;当戊二醛浓度高于8%时,固定化酶活力则有所下降。因为当戊二醛浓度较低时,微球的机械强度差,酶在微球内容易脱落,而当戊二醛的浓度过高时,除了过量的戊二醛自身发

生羟醛缩合,固化成不规则物附在产物表面,影响微球的表面孔结构,使得酶不易被固定外,还可能会产生微球上过量的醛基与漆酶反应,易引起酶的构象发生变化,造成酶活力下降。实验结果说明在本实验条件下,戊二醛浓度为8%为宜。

**2.2.3 pH对酶固定化的影响:**平行取5份50mg磁性壳聚糖微球,分别以10mL不同pH值的漆酶磷酸盐缓冲液(酶液浓度0.8mg/mL)进行固定,并对固定化酶进行活力测试。结果表明,在pH 7.0条件下进行固定,所得的固定化酶活力最高。磁性壳聚糖微球对漆酶具有静电吸附作用,而溶液的酸度的改变会影响微球表面的带电基团的电性,同样也会对漆酶所带的电荷产生影响,从而影响漆酶在微球表面的吸附量。

**2.2.4 固定化时间对酶固定化的影响:**平行取5份50mg磁性壳聚糖微球,各加入10mL浓度为0.8mg/mL的漆酶磷酸盐缓冲液(pH 7.0),在25℃搅拌反应1h后,分别于4℃静置1h、1.5h、2h、2.5h、3h、4h、6h、8h进行固定化,并对固定化酶进行活力测试。结果表明,在本实验条件下,静置2h,固定化酶的活力便达到最高,再延长吸附时间,固定化酶活力开始下降,这可能是因为延长固定化时间有利于酶分子与载体充分接触,从而与载体上的活性基团发生共价偶联,而当载体偶联的酶量逐渐增大时,载体网络上的酶分子之间较为拥挤,于是载体孔径相应变细,在酶促反应过程中,底物不易与酶充分接触,故使酶整体的活力有所下降<sup>[9]</sup>。

由上可知,确定漆酶固定化适宜条件为:50mg 8%戊二醛交联的磁性壳聚糖微球,加入10mL 0.8mg/mL漆酶磷酸盐缓冲液(0.1mol/L pH 7.0),在4℃固定2h。在此固定化条件下,酶的固定化效率为24%。

## 2.3 固定化酶的酶学性质

**2.3.1 温度对酶活力的影响:**在不同温度下分别对游离酶和固定酶活力进行测定。结果表明,游离酶有两个最佳催化温度,分别为15℃和60℃,固定化酶的最佳催化温度比游离酶的低了5℃,分别出现在10℃和55℃,并且固定酶对温度较敏感,在25℃活力下降了90%(10℃时的酶活力按100%计算)。游离与固定化漆酶均具有两个最佳催化温度,这可能是由于该漆酶在低温低pH条件下不稳定,从而导致其催化活性发生变化所致。

**2.3.2 pH对酶活力的影响:**在不同pH条件下分别对游离酶和固定酶活力进行测定。结果表明,固定酶与游离酶的最适pH均为3.0,这是因为吸附固定化漆酶之后,磁性壳聚糖微球表面的带电基团与漆酶结合,载体的电荷变为中性,所以缓冲液pH值对固定化酶活力影响不大<sup>[10]</sup>。

**2.3.3 游离酶与固定化酶的米氏常数  $K_m$ :**以ABTS为底物在不同浓度下测定游离酶和固定化酶的反应初速度。按Lineweaver-Burk的方法作图。由图2求得在pH 3.0,温度37℃时,游离酶与固定化酶对ABTS的表现米氏常数分别是为36.8 $\mu\text{mol/L}$ 和171.1 $\mu\text{mol/L}$ 。表观米氏常数变大说明固定化后,漆酶对底物的亲和力有所降低,这可能是由于干内扩散

限制,壳聚糖微球附近底物的浓度要比溶液中低,导致底物与酶的接触几率变小,亲和力降低<sup>[1]</sup>。

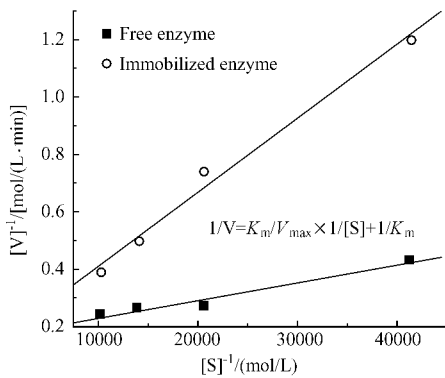


图2 游离酶和固定化酶的米氏常数

Fig. 2 Determination of Michaelis constant of free and immobilized enzymes

**2.3.4 酶的热稳定性** 将固定酶和游离酶置于 60℃ 水浴中,每半小时分别取 20mg 固定酶和 8μL 游离酶测定其活力(图 3)。游离酶在 60℃ 保温 30min 后,其活力下降很明显,210min 后,残余活力仅为最初的 19.4%。而固定酶在 60℃ 保温,其活力下降缓慢,210min 后,活力仍为原来的 74%,可见固定酶具有更好的热稳定性。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,因而抗拒热变性作用能力增加所致,游离酶由于缺乏这些作用力,较容易因为去折叠而变性。

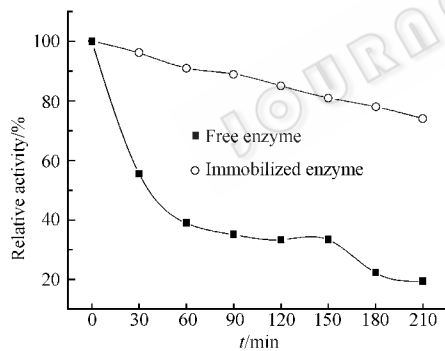


图3 酶的热稳定性

Fig. 3 Thermal stability of the enzyme

**2.3.5 固定化酶的操作稳定性** 将 20mg 固定酶置于比色皿中,加入 3mL 含 0.05mmol/L ABTS 的酒石酸缓冲液 (pH=3.0) 在 55℃ 下反应,在 UV-2450 紫外可见分光光度计测定反应体系 5min 内在 420nm 处的吸光度变化,计算出固定化酶活力。至底物被完全氧化后用磁铁分离固定化酶,20mg 固定化漆酶用 0.1mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次后,重新装入新鲜底物溶液,再次测定固定化酶活力。这样进行多次氧化循环,来测定固定化酶操作稳定性。结果表明,固定化酶的活力基本保持不变,在反应 10 次后,其活力仍保持最初的 80% 以上,可见固定化酶具有良好的操作稳定性。

**2.3.6 固定化酶的贮存稳定性** 将固定酶和游离酶在 4℃ 分别保存 1, 2, 3, 4 周后,测定酶活力。结果表明,固定酶活力

没有明显下降,保存一个月后酶活力仍在 70% 以上,而在相同条件下,游离酶仅保留 30% 的活力,说明固定化后漆酶有更好的贮存稳定性。

### 3 讨论

壳聚糖分子链上含有大量的氨基,可与戊二醛反应生成壳聚糖微球,悬挂在微球表面的 -CHO 可与酶分子上的 -NH<sub>2</sub> 反应,用于酶的固定。制得的壳聚糖微球表面平滑,单分散性好,平均粒径为 5.0μm,粒径分布范围窄,小粒径的微球具有更大的比表面积,可以共价结合更多的酶,同时也可以降低底物和产物扩散限制的影响。另外微球的磁性能利于固定酶的分离,可连续重复使用提高利用效率。确定的固定化适宜条件为 50 mg 磁性壳聚糖微球,加入 10mL 0.8mg/mL 漆酶磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L, pH 7.0),在 4℃ 固定 2h。在此条件下酶的固定化效率为 24%。固定化酶最适温度分别为 10℃ 和 55℃,均比游离酶降低 5℃,游离与固定化酶最适 pH 均为 3.0,这是因为吸附固定化漆酶之后,磁性壳聚糖微球表面的带电基团与漆酶结合,载体的电荷变为中性,所以缓冲液 pH 值对固定化酶活力影响不大。与游离酶相比,固定化漆酶与 ABTS 的亲和力降低, K<sub>m</sub> 值从 36.8μmol/L 增至 171.1μmol/L,这可能是由于内扩散限制,壳聚糖微球附近底物的浓度要比溶液中低,导致底物与酶的接触几率变小,亲和力降低,实验上即表现为酶催化反应的 K<sub>m</sub> 值增加。固定化后漆酶的稳定性有明显改善,60℃ 条件下保温 210min,固定化漆酶保留酶活 74%,而在相同条件下游离酶活力明显下降,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,因而抗拒热变性作用能力增加所致,游离酶由于缺乏这些作用力,较容易因为去折叠而变性。固定化漆酶与底物 ABTS 在相同条件下连续进行 10 批次操作,固定化酶活力仍保持 80% 以上,漆酶的使用效率明显提高。保存一个月后酶活力仍在 70% 以上,说明固定化后漆酶有较好的贮存稳定性。

### 参考文献

- [1] 王小红,马建标,何炳林. 甲壳素、壳聚糖及其衍生物的应用. 功能高分子学报, 1999, 11(2): 197-202.
- [2] 鲁从华,罗传秋,曹维孝. 壳聚糖的改性及其应用. 高分子通报, 2001 (6): 46-53.
- [3] Boadi D K, Neufeld R J. Encapsulation of tannase for hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 28(7-8): 590-595.
- [4] 刘淑珍,钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究. 微生物学报, 2003, 43(1): 73-78.
- [5] 钞亚鹏,叶军,钱世钧. 担子菌组成型漆酶产生特性的研究. 微生物学报, 2000, 40(6): 628-632.
- [6] 季立才,胡培植. 漆酶的结构、功能及其应用. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(1): 25-29.
- [7] Xu F. Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 1996, 35: 7608-7614.

- [ 8 ] 黄俊, 官建国, 袁润章.  $Fe_3O_4$  纳米复合粒子研究. 复合材料学报, 1999, 16(4): 35-39.
- [ 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. 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 II 磁性壳聚糖微球对脲酶的吸附及其酶学性质的研究. 离子交换与吸附, 2001, 17(2): 152-158.
- [ 11 ] Cresswell P, Sanderson A R. Preparation, properties and substrate exclusion effects of an insoluble pronase derivative. *Biochem J*, 1970, 119: 447-451.

## Immobilization of laccase on magnetic chitosan microspheres and study on its enzymic properties

JIANG De-sheng LONG Sheng-ya HUANG Jun\* XIAO Hai-yan ZHOU Ju-ying

(Key Laboratory of Fiber Optic Sensing Technology and Information Processing, Ministry of Education, Fiber Optic Sensing Technology Research Center, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Laccase was immobilized on magnetic chitosan microspheres by using glutaraldehyde as cross-linking reagent. The immobilization conditions and characterization of the immobilized enzyme were investigated. The optimal immobilization conditions for laccase were: 10mL of 0.8mg/mL of laccase in phosphate buffer(0.1mol/L, pH 7.0) reacted with 50mg of magnetic chitosan microspheres at 25°C for 1h and subsequently was kept at 4°C for 2h. The immobilized enzyme exhibited the maximal activity at pH 3.0. The optimal temperatures for immobilized enzyme were 10°C and 55°C. The  $K_m$  value of immobilized laccase for ABTS was 171.1 $\mu$ mol/L in pH 3.0 phosphate buffer at 37°C. Compared with free enzyme, the thermal, operational, and storage stabilities of the enzyme were increased after the immobilization.

**Key words:** Chitosan, Immobilization, Laccase, Immobilization, Stability

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund(60377032)

\* Corresponding author. Tel: 86-27-87651850; E-mail: fosrewut@public.wh.hb.cn

Received date: 12-09-2004

## 科学出版社生命科学编辑部新书推介

蛋白质芯片(影印版) Protein Microarrays

Mark Schena 7-03-014321-3/Q. 1476 2005.5 65 元

生物芯片技术是一种高通量检测技术,它包括基因芯片、蛋白芯片及芯片实验室三大领域。蛋白质芯片以蛋白质代替DNA作为检测目的物,比基因芯片更接近生命活动的物质层面,能直接测定蛋白质的相对水平及与其他分子的交互作用情况,以量化的方式反映基因的活动情况,因而蛋白质芯片有着比基因芯片更加直接的应用前景。本书对蛋白质芯片技术进行了全面细致的阐述,包括技术原理、生产方法、表面化学、检测策略,以及抗原、抗体数据分析,同时全书图文并茂,提供了许多生物学应用实例及实验草案。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街16号科学出版社科学分社 联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目 010-64012501