

磁性壳聚糖微球固定化褐藻酸酶的研究

王 斌, 谢 苗, 曾竞华, 邓海燕, 甘纯玟

(福建农林大学 生物技术中心, 福建 福州, 350002)

摘要: 利用反相悬浮交联法制备磁性壳聚糖微球 (magnetic chitosan microspheres, M-CS), 并对褐藻酸酶进行固定化研究。结果表明, M-CS 呈规则的圆球形, 具有较好的磁响应性, 可稳定地保存在弱酸和弱碱中。其弱碱交换量随着戊二醛用量的增加而减少, 悬挂醛基则相应地增加。M-CS 对褐藻酸酶的吸附动力学实验表明, M-CS 容易吸附褐藻酸酶, 但吸附的酶量受载体与酶的比例、溶液的离子浓度、戊二醛的用量、溶液 pH 的影响明显, 而温度对吸附的酶量的影响则相对较弱。酶学性质研究表明, 相对于游离的褐藻酸酶, 固定化酶的最适温度略有升高, 可明显改善其热稳定性和酸碱稳定性, 与底物的亲和力也有所增强。

关键词: 磁性壳聚糖微球 (M-CS); 褐藻酸酶; 固定化

中图分类号: Q986.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)03-0253-07

高分子微球作为性能优异的功能高分子材料在医学免疫、生物工程、化学化工、分析化学及微电子技术等领域有着广阔的应用前景, 而磁性高分子微球则具有磁分离、引导、标记和固定等功能, 因而在功能材料、细胞生物学、分子生物学及医学、分离工程等方面显示出强大的生命力。近年来, 磁性壳聚糖微球 (M-CS) 制备技术及其应用也进行了初步的研究, 丁明^[1] 探讨了 M-CS 及其内核的制备方法。Emir^[2] 探讨了 M-CS 制备过程中的影响因素。Ming-Shen Chiou^[3] 探讨了 M-CS 吸附活性染料的动力学模型和影响因素, 但是对于固定化酶的吸附动力学过程的研究未见报道。

本研究利用反相悬浮交联聚合制备 M-CS, 对 M-CS 的性质进行表征; 利用该 M-CS 对褐藻酸酶进行固定化, 对其吸附动力学进行较为深入的探讨, 并对固定化酶的性质进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

壳聚糖 (浙江玉溪, 脱乙酰度为 90%, 粘度为 70 mpa·s), 九孔鲍鱼褐藻酸酶 (自制), 褐藻酸钠 (福鼎化工厂, 相对分子质量为 230 000), 磁流体 (自制), 其他试剂均为国产分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 M-CS 的制备^[2] 将 2 mL 磁流体、20 mL 2% 的壳聚糖溶液 (用 3% 乙酸溶液配制)、80 mL 液体石蜡、5 mL Span-80 加入 200 mL 锥形瓶中, 于 40 °C 下充分搅拌 15 min, 然后加入 4 mL 18.5% 戊二醛, 调 pH 至 9.0, 反应 2 h, 分别用异丙醇、乙醚、丙酮和水充分洗涤后, 冻干, 用磁铁将产物分离, 得到 M-CS。

1.2.2 固定化酶的制备 取一定量的 M-CS 加入到 100 mL 的锥形瓶中, 用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 充分溶胀, 加入 2 mg/mL 褐藻酸酶磷酸缓冲溶液, 4 °C 下在恒温摇床上于设定时间内振荡, 用磁铁将 M-CS 沉淀, 倾出上清液, 用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗至洗出液无紫外吸收, 将洗出液定容。所得的固定化酶于 4 °C 保存。

1.2.3 M-CS 的形态 扫描电镜法。

1.2.4 M-CS 弱碱交换量和悬挂醛基的测定^[4]

(1) 弱碱交换量的测定: 取 0.1 g M-CS, 加入 20 mL 0.05 mol/L 的盐酸, 在摇床上震荡 1 h 使其反应完全, 取 15 mL 的上清液用 0.05 mol/L 的氢氧化钠滴定, 酚酞为指示剂, 按下式计算弱碱交换量。

$$\text{弱碱交换量 (mmol/g)} = \frac{(N_1 V_1 - N_2 V_2 \times 20/15)}{W}$$

收稿日期: 2003-10-27; 修订日期: 2004-01-24。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (JAC0110009)。

作者简介: 王 斌, 男, (1977-), 硕士研究生, E-mail: binwang4159@hotmail.com

通讯作者: 甘纯玟, Tel: (0591) 3789170, E-mail: ganchunji@hotmail.com

式中: N_1 - 标准盐酸的浓度 (mol/L); V_1 - 标准盐酸的体积 (mL); N_2 - 标准氢氧化钠的浓度 (mol/L); V_2 - 标准氢氧化钠的体积 (mL); W - M-CS 的质量。

(2) M-CS 悬挂醛基的测定: 用羟胺法测定不同交联度 M-CS 的悬挂醛基含量。

1.2.5 M-CS 的酸碱稳定性 采用邻菲罗啉法^[5]测定 M-CS 在不同 pH 的溶液中铁离子浓度随时间的变化。

1.2.6 磁响应性的测定 测定有无磁场的条件下, M-CS 悬浮溶液的透光率随时间的变化来考察磁流体的磁响应性。

1.2.7 褐藻酸酶的定量分析 构成蛋白质的某些氨基酸 (如色氨酸、苯丙氨酸等) 在紫外具有吸收峰, 通过对褐藻酸酶磷酸盐缓冲溶液的全波长扫描发现其最大吸收峰在 270 nm, 配置不同浓度的褐藻酸酶溶液, 以磷酸盐缓冲液为参比测定 270 nm 吸光值, 绘制标准曲线, 通过测定洗出液中的吸光值, 对照标准曲线计算出吸附的褐藻酸酶的量。

1.2.8 固定化酶活力的测定 采用改进的 3,5-二硝基水杨酸^[6]法测定酶活力, 具体操作方法如下: 于试管中先后加入褐藻酸钠溶液 1 mL、磷酸缓冲液 4 mL, 加热至 45 °C, 加入固定化酶 200 mg, 于 45 °C 保温 30 min 后取出冷却, 用磁铁将固定化酶沉淀, 倾出上清液, 过滤, 取 1 mL, 加入 3,5-二硝基水杨酸溶液 3 mL, 沸水浴中显色 15 min, 冷却、摇匀后于 550 nm 测定吸光值。酶活力定义为 550 nm 波长下每升高 1 个吸光值为 1 个酶活力单位 (UA), 比活力定义为每毫克褐藻酸酶所含的酶活力单位数 (u/mg)。

2 结果与分析

2.1 M-CS 的表征

2.1.1 M-CS 的外部形态 通过扫描电镜观察发现 (图 1), M-CS 呈规则圆球状, 表面较光滑。

2.1.2 M-CS 悬挂醛基和弱碱交换量的测定 图 2 阐明了不同交联度的 M-CS 的悬挂醛基和弱碱交换量的变化, 表明随着戊二醛用量的增加, 悬挂醛基的含量逐渐增加, 而弱碱交换量却逐渐减少。

2.1.3 M-CS 的酸稳定性 在酸性环境中, M-CS 内的 Fe_3O_4 易与 H^+ 发生反应而分解, 导致磁性的丧失, 因此 M-CS 在溶液中的稳定性对 M-CS 的应用有着重要的影响。为考察 M-CS 的磁稳定

性, 选择干重为 100 mg 的 M-CS 分别浸没于 100 mL 的 1 mol/L HCl (pH 1)、0.01 mol/L HCl (pH 2) 和 H_2O (pH 7) 溶液中, 观察溶液中铁离子含量随时间的变化, 结果如图 3 所示, M-CS 在 1 mol/L HCl 中不稳定, 大部分的 Fe_3O_4 在较短的时间内被溶解, 而在 pH 2 的酸溶液中, 开始时有部分 Fe_3O_4 溶解, 在 24 h 后溶液中的铁离子含量趋于稳定, 在中性水溶液中, 几乎不存在铁离子。M-CS 主要应用于弱酸弱碱环境中, 所以本方法制备的 M-CS 在其应用 pH 范围内, 具有较好的酸碱稳定性。

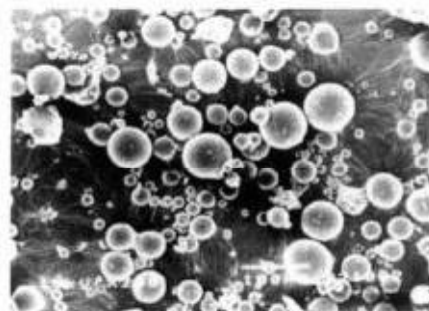


图 1 M-CS 的扫描电镜照片

Fig. 1 SEM image of magnetic chitosan microspheres

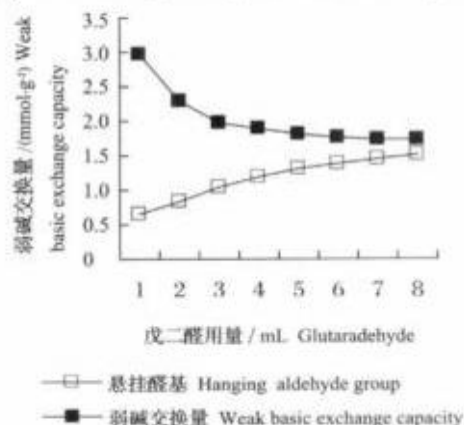


图 2 戊二醛用量对 M-CS 悬挂醛基和弱碱交换量的影响
Fig. 2 Effect on hanging aldehyde group and weak basic exchange capacity by quantities of glutaraldehyde

2.1.4 M-CS 的磁响应性 图 4 为 M-CS 悬浮于水溶液中, 在外界磁场作用下不同的沉降时间对溶液透光率的影响。结果表明, M-CS 经磁分离 10 min 后溶液透光率可超过 90%, 基本达到完全分离; 而无磁场时, 即使自然沉降 100 min, 溶液透光率也只能达到约 40%, 因此可以认为, M-CS 的磁分离

效果比对照组理想。

2.2 固定化条件对 M-CS 吸附动力学的影响

2.2.1 戊二醛用量对吸附量的影响 戊二醛用量的不同,将使 M-CS 的机械强度和交联度产生差异,从而导致固定化褐藻酸酶的效果差异。图 5 表明在 18.5% 的浓度下,加入 4 mL 戊二醛固定化褐藻酸酶的效果最好。

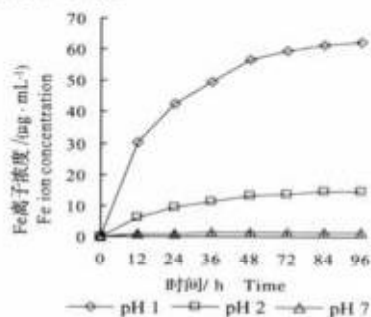


图3 不同 pH 溶液中铁离子随时间的变化曲线

Fig.3 Change of Fe concentration in acid solution with time at different pH

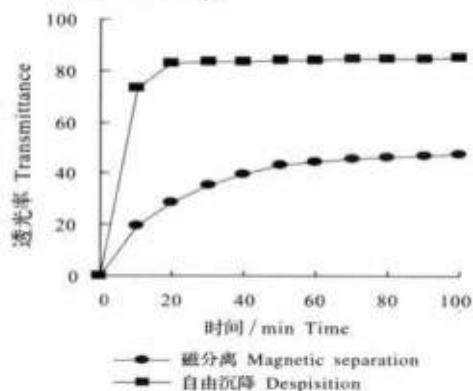


图4 磁分离和自由沉降中透光率与时间的关系曲线

Fig. 4 Transmittance-time curves of suspension of heres chitosan microsp

2.2.2 酶液浓度对吸附量的影响 图 6 阐明了不同的酶液浓度对 M-CS 的影响,结果表明,随着酶液浓度的增加,M-CS 吸附的酶量逐渐增加。但是当酶液浓度增加到 0.2 mg/mL 时,M-CS 吸附的酶量增加缓慢。当酶液浓度增加到 0.25 mg/mL, M-CS 吸附的酶量已无明显的增加,这表明 M-CS 的吸附基团对酶的吸附量已经基本达到饱和,因此在本实验的条件下,酶溶液的浓度为 0.25 mg/mL 时固定化效果比较理想,M-CS 吸附的酶量在 40% 左

右。

2.2.3 缓冲液离子强度对吸附量的影响 图 7 阐明了加入不同离子强度的缓冲溶液对褐藻酸酶固定化的影响,结果表明,随着缓冲溶液离子强度的提高,M-CS 吸附的酶量逐渐下降,这是因为随着离子强度的增加,离子和 M-CS 表面功能基团的相互

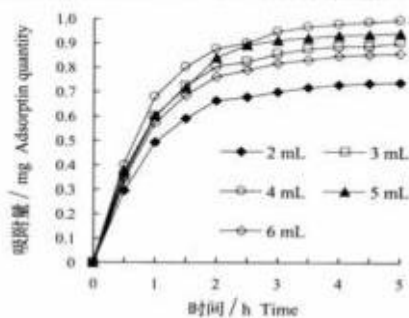


图5 戊二醛(18.5%)用量对 M-CS 吸附动力学的影响

Fig.5 Adsorption kinetic of alginate lyase on cross-linked chitosan with glutaraldehyde (18.5%)

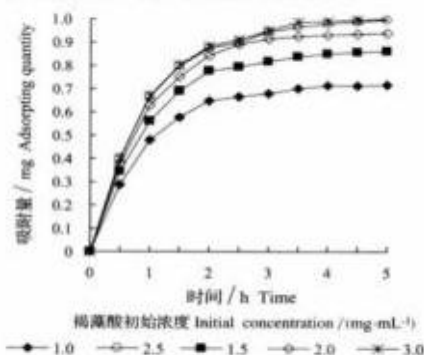


图6 褐藻酸酶的初浓度对 M-CS 吸附动力学的影响

Fig.6 Adsorption kinetic of alginate lyase on cross-linked chitosan beads with different initial concentrations

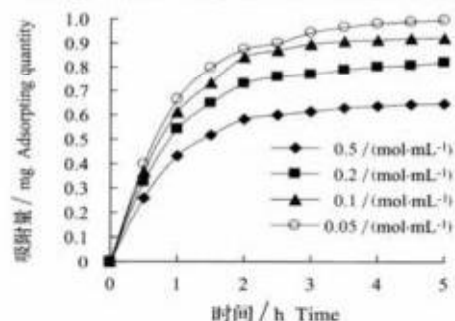


图7 不同的离子强度对 M-CS 吸附动力学的影响

Fig.7 Adsorption kinetic of alginate lyase on cross-linked chitosan beads with different Fe concentrations

作用增强,削弱了 M-CS 的氨基与酶分子基团之间的相互作用。

2.2.4 pH 对吸附量的影响 图 8 阐明了褐藻酸酶缓冲溶液的 pH 值对酶固定化的影响。结果表明,在中性缓冲溶液中, M-CS 对褐藻酸酶具有最大的吸附量。

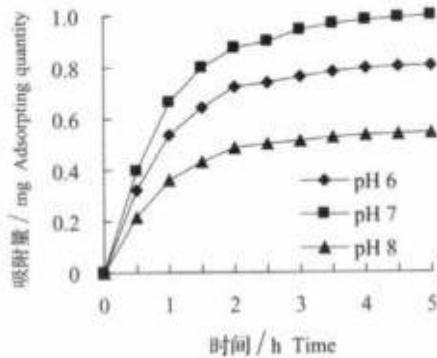


图 8 不同的 pH 对 M-CS 吸附动力学的影响

Fig. 8 Adsorption kinetic of alginate lyase on cross-linked chitosan beads with different pH

2.2.5 温度对酶吸附量的影响 图 9 阐明了不同温度对酶吸附量的影响,结果表明:随着温度的升高,吸附的酶量有所增加,但是增加的比较缓慢,这说明温度不是影响 M-CS 吸附酶量的主要因素,同时考虑到酶的活力的保存,因此在该实验条件下,吸附温度在 4℃ 比较理想。

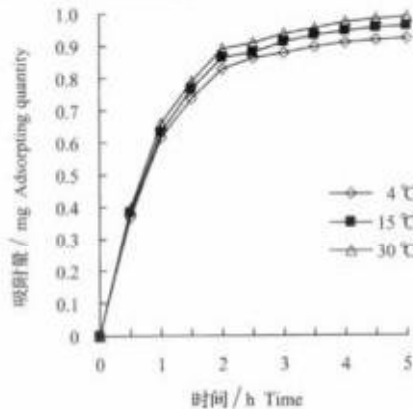


图 9 不同的温度对 M-CS 吸附动力学的影响

Fig. 9 Adsorption kinetic of alginate lyase on cross-linked chitosan beads with different temperature

2.3 磁性壳聚糖固定化褐藻酸酶的理化性质

2.3.1 温度对酶活力的影响 图 10 阐明了固定化后对褐藻酸酶的最适温度的影响,结果表明,酶经 M-CS 固定化后,最适温度略有提高,处于 45~50℃ 之间。图 11 阐明了固定化酶保存于不同温度的溶液中保存 30 min 对酶活力的影响。结果表明固定化酶的热稳定性明显增加,这可能是由于 M-CS 的物理吸附和共价交联作用,使得蛋白质的构象发生改变,从而对酶的结构起到了保护作用,使其不容易被破坏。

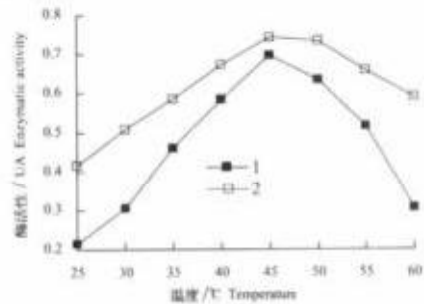


图 10 固定化酶和溶液酶的最适温度

1. 溶液酶; 2. 固定化酶

Fig. 10 Optimal temperature of immobilization alginate lyase

1, Solution enzyme; 2, Immobilization enzyme

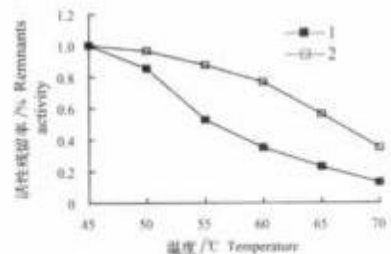


图 11 固定化酶和溶液酶的热稳定性 (30 min)

1. 溶液酶; 2. 固定化酶

Fig. 11 Change of thermal stability of immobilization alginate lyase with different temperature preincubation for 30 min

1, Solution enzyme; 2, Immobilization enzyme

2.3.2 固定化酶的最适 pH 图 12 表明固定化褐藻酸酶和溶液酶的最适 pH 基本相同,都为 7.0,固定化对酶的最适 pH 没有明显的影响,但是在碱性溶液中的活力却有明显的提高。图 13 阐明了在不同 pH 的溶液中放置 30 min 后,酶活力的变化。结果表明褐藻酸酶经固定化后,无论在碱性还是酸性

溶液中酶的稳定性都有明显的提高。

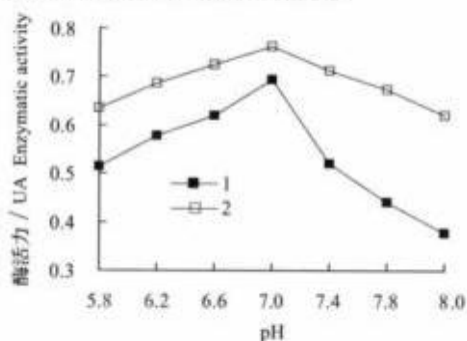


图 12 固定化酶褐藻酸酶和溶液酶的最适温度

1, 溶液酶; 2, 固定化酶

Fig. 12 Optimal pH of immobilization alginate lyase

1, Solution enzyme; 2, Immobilization enzyme

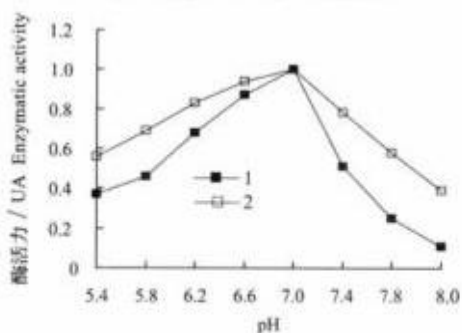


图 13 固定化酶和溶液酶的酸碱稳定性 (30 min)

1, 溶液酶; 2, 固定化酶

Fig. 13 Change of pH stability of immobilization alginate lyase with different temperature preincubation for 30 min

1, Solution enzyme; 2, Immobilization enzyme

3 讨论

3.1 M-CS 的性质表征

本研究以 M-CS 为载体,采用吸附交联法固定化九孔鲍褐藻酸酶,实验结果表明, M-CS 呈规则的圆球状,具有较好的磁响应性,可稳定地保存在弱酸、弱碱环境中。M-CS 吸附酶的量受载体与酶的比例、溶液的离子浓度、戊二醛的用量和溶液的 pH 影响比较明显,而温度对酶的吸附量的影响则相对较弱。

不同交联度的 M-CS 的悬挂醛基和弱碱交换量的变化,表明随着戊二醛用量的增加,悬挂醛基的含量逐渐增加,而弱碱交换量却逐渐减少。这是因为体系中醛基比例的增加,和氨基反应的醛基也随之增多,而氨基的量一定,所以部分醛基不能及时和

氨基交联,成球之后成为悬挂醛基。但是戊二醛用量的增加,使得氨基和醛基接触和反应的几率增大,因此弱碱交换量随之减少,达到一定程度后, M-CS 的弱碱交换量不再减少,说明 M-CS 中始终保持了一定的氨基含量,这是因为醛基与氨基反应较快,而壳聚糖分子链的空间位阻和 M-CS 内的扩散限制部分氨基和醛基的反应,所以 M-CS 能保持一定的弱碱交换量。

M-CS 对褐藻酸酶的吸附是多种作用力共同影响的结果,主要有 3 个方面:悬挂醛基的含量、弱碱交换量和 M-CS 的机械强度。戊二醛的用量少,一方面弱碱交换量比较大,有利于酶的固定化;另一方面悬挂醛基含量比较少,疏水作用差。另外, M-CS 的机械强度差,酶容易脱落,又不利于酶的固定化;当戊二醛的用量增加时,虽然悬挂醛基含量比较多,疏水作用强,有利于酶和 M-CS 的接触,但是由于过多的醛基,其自身发生羟醛缩合,产物附着在 M-CS 表面,影响吸附的酶量。而过多的醛基还会和褐藻酸酶反应,造成酶构象的变化,影响酶的活性。

在中性缓冲溶液中, M-CS 对褐藻酸酶具有最大的吸附量,这是因为 M-CS 对褐藻酸酶具有静电吸附作用,而溶液的酸碱度的改变,会影响 M-CS 表面的带电基团的电性,同样也会对褐藻酸酶所带的电荷产生影响;同时,不同的 pH 也会影响褐藻酸酶的稳定性,特别是在碱性条件下,褐藻酸酶比较容易变性失活,这也在酸或者碱性溶液中 M-CS 吸附量减少的原因之一。

3.2 吸附等温线的测定

吸附平衡是指吸附质在流动相中达到的平衡状态,吸附等温线是指在一定的温度下,单位吸附剂的吸附容量 (Q) 和与流体相中吸附质的浓度 (C) 的关系。Freundlich 等温方程是液相吸附中一个成功的经验方程,通过该方程可以了解吸附剂对吸附质的吸附能力。方程如下:

$$Q = KC^{1/n} \quad (1)$$

式中: $Q = (C_0 - C) \times V/W$ (mg/g); K 为与吸附剂种类、特征、温度等有关的常数; n 为与温度有关的常数,当 $1/n$ 处于 0.1~0.5 时,是表示吸附容易进行,当 $1/n$ 大约为 2 时表示吸附很难进行。

对方程(1)取对数,可得方程(2):

$$\lg Q = \lg C/n + \lg K \quad (2)$$

从图 6 可以看出, M-CS 吸附的酶量与酶液的浓度并不呈线性关系,当褐藻酸酶的浓度达到 2.5

mg/mL时,吸附量的增加开始变缓,表明M-CS对褐藻酸酶的吸附趋于饱和。

图14为吸附等温实验结果对方程(2)所做的线性拟合,表明 $\lg Q - \lg C$ 呈现较好的线性关系,线性方程为 $\lg Q = 0.960 + 0.169 \lg C$,其中 K 和 $1/n$ 分别为9.12和0.169,因此M-CS对褐藻酸酶的吸附比较容易进行。

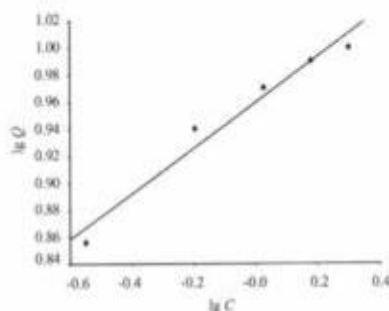


图14 M-CS吸附褐藻酸酶的Freundlich等温线

Q - 吸附容量 (mg/g); C - 吸附质浓度 (mg/L)

Fig. 14 Freundlich isotherm of adsorption of *Haliotis diversicolors* aquatilis lyase on cross-linked chitosan beads at 4 °C and pH 7.0

Q - Quantity of adsorption capacity (mg/g); C - Concentration of adsorbing solution (mg/L)

3.3 米氏常数 K_m 的测定 图15、16阐明了褐藻酸酶和固定化褐藻酸酶的 K_m 。结果表明,自由酶的 K_m 为0.018 9 mg/mL,最大反应速度为0.258 UA/min;固定化酶的 K_m 为0.013 35 mg/mL,最大反应速度为0.121 0 UA/min。与溶液酶相比,固定化酶的 K_m 减小,表明酶和底物的亲和力有所增加。这是因为M-CS对底物具有吸附作用,导致了固定化酶的周围具有相对较高的浓度,结果表现为 K_m 的降低。

酶学性质研究表明,相对于游离的酶,固定化酶的热稳定性、酸碱稳定性有了明显的提高,和底物的亲和力也有所增强。原因可能是M-CS在酶的周围形成一个对酶蛋白起到保护作用的微环境,减弱了因溶液改变而对酶蛋白构像和活性基团的破坏作用,使得固定化褐藻酸酶有一个更宽的pH范围。

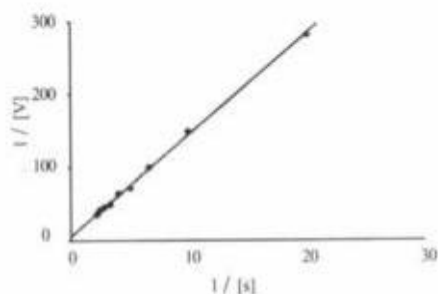


图15 溶液酶的米氏常数 K_m

Fig. 15 Lineweaver-Burk Plots for *Haliotis diversicolors* aquatilis lyase acting on alginate

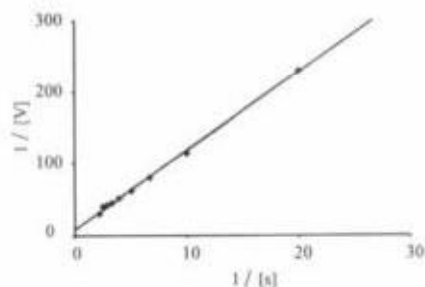


图16 固定化酶的米氏常数 K_m

Fig. 16 Lineweaver-Burk Plots for immobilization of *Haliotis diversicolors* aquatilis lyase acting on alginate

参考文献:

- [1] 丁明,孙虹. Fe_3O_4 /壳聚糖核壳磁性微球的制备及特性[J]. 磁性材料及器件, 2001, 32(6): 1-3.
- [2] Denkbas E B, Kilicay E, Birlıkseven C, et al. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization[J]. Reactive & Functional Polymers, 2002, 50: 225-232.
- [3] Ming-Shen Chio, Hsing-Ya Li. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads[J]. J Hazard Mater, 2002, B93: 233-248.
- [4] 陈盛,李柱来. 壳聚糖固定化酶研究II[J]. 生物工程进展, 1992, 12(5): 40.
- [5] 陈国珍,黄贤智. 紫外-可见分光光度法[M]. 北京:原子能出版社, 1987. 164.
- [6] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1999. 168.

Study of immobilization of alginate lyase on cross-linked magnetic chitosan microspheres

WANG Bin, XIE Miao, ZENG Jing-hua, DENG Hai-yan, GAN Chun-ji

(Biotechnology Center of Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Some researches on magnetic chitosan microsphere (M-CS) have been studied on its preparation and the influence factors during the preparing process, as well as the equilibrium and kinetic modeling of absorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads. In this experiment, the M-CS was prepared by reverse-phase suspension cross-linking, and used to immobilize the alginate lyase. Under scan microscope, the M-CS shows regular spheroid. It had magnetic response characteristic, and was stable in weak basic and weak acid solutions. The weak basic exchange capacity was reduced with the increasing of the glutaraldehyde amount, but the hanging aldehyde group ability was accordingly increased. Fe_3O_4 in M-CS was easily decomposed, and M-CS lost the magnetism in acid solution, therefore the stability of M-CS in solution was important for its application. The M-CS suspended in H_2O solution was easily precipitated and separated by magnetic field. Mechanical strength and crosslinking degree of M-CS were influenced by the amount of pentanedia, and even-tuated in different activity of immobilized alginate lyase. The amount of alginate lyase immobilized in M-CS reached 40% with 0.25 mg/mL concentration of the lyase in solution. The amount of alginate lyase immobilized in M-CS gradually decreased with the increase of ion strength in buffer. The immobilization of alginate lyase by M-CS depended on neutral buffer. The immobilization was slightly influenced by the reaction temperature. The suitable temperature of immobilized alginate lyase was 45–50 °C, and the suitable pH of immobilized alginate lyase was 7.0. The immobilization would improve its thermal, and basic-resistant, and acid-resistant stability. It would enhance its appetency for the substrate. The adsorptive isothermal measurement indicated the adsorptive isothermal equation was as following: $\lg Q = 0.960 + 0.169 \lg C$. Therefore, the alginate lyase was easily immobilized by M-CS. The adsorption kinetics of the alginate lyase on M-CS indicated that the adsorption of the alginate lyase on M-CS was easy, but the adsorption affinity was defected by the amount ratio of the carrier to the enzyme. It was showed the K_m was 0.018 9 mg/mL and 0.013 35 mg/mL in free enzyme and immobilized enzyme, respectively. The most reactive rate were 0.258 UA/min and 0.121 0 UA/min in free enzyme and immobilized enzyme, respectively.

Key words: magnetic chitosan microspheres (M-CS); alginate lyase; immobilization

Corresponding author: GAN Chun-ji. E-mail: ganchunji@hotmail.com