

壳聚糖微球的制备及其固定化木瓜蛋白酶的研究

李 红, 王炜军, 徐凤彩

(华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642)

摘要: 用来源丰富且廉价, 并具有许多优良生物特性的壳聚糖为原料, 以简单易行的悬浮交联法制备壳聚糖微球, 并对其性状进行测定和分析. 结果表明: 它复合了壳聚糖与高分子微球的功能. 然后, 以壳聚糖微球为载体, 用吸附—交联的联合固定化方法制备固定化木瓜蛋白酶, 并研究了木瓜蛋白酶的最佳固定化条件. 结果显示: 木瓜蛋白酶的最佳固定化条件是给酶量为 1.92 mg/g, 4~8℃吸附 12 h, 再用体积分数为 0.5% 的戊二醛溶液于 4~8℃交联 3 h, 所得的固定化木瓜蛋白酶活力达 38.49 U/g, 酶活力回收率平均达 66.60%, 高于同类研究水平.

关键词: 壳聚糖微球; 木瓜蛋白酶; 固定化酶

中图分类号: Q 552.2

文献标识码: A

壳聚糖(聚-2-氨基-2-脱氧-D-β-1, 4-葡萄糖)是甲壳素的脱乙酰基产物, 甲壳素在自然界中广泛存在于节肢动物、软体动物、环节动物、原生动物、腔肠动物、海藻及真菌等生物体中. 壳聚糖作为甲壳素的重要衍生物, 被广泛地应用于医药、纺织工业、造纸、印染、日用化工、食品、农业、环保等领域^[1]. 由于壳聚糖来源丰富、廉价, 且具有良好的吸附性能和生物相容性、安全无毒等优良特性, 近年来, 壳聚糖作为酶固定化载体的研究引起了不少学者的重视^[2]. 但是, 由于天然状态的壳聚糖大部分为粉末状, 比表面积小, 作为酶的固定化载体, 则使固定化酶难以回收, 从而限制其应用. 本研究以壳聚糖为原料, 透平油为分散介质, 戊二醛溶液为交联剂, 采用悬浮交联法制备表面积大、吸附性能较强、微球性能优良、单分散窄分布的微米级壳聚糖微球, 为酶的固定化提供了良好载体. 同时, 木瓜蛋白酶是一种巯基蛋白酶, 主要用于防止啤酒冷浑浊、肉类的嫩化、蛋白质水解产物的制备等^[3]. 为了提高木瓜蛋白酶的使用效率, 降低生产成本, 国内外研究人员对木瓜蛋白酶的固定化进行了很多研究, 建立了各种固定化方法^[4, 5, 6]. 其中, 用壳聚糖微球为载体, 采用吸附—交联法固定化木瓜蛋白酶的研究罕见报道. 因此, 本研究以上述壳聚糖微球为载体, 采用吸附—交联的联合固定化方法制备固定化木瓜蛋白酶, 研究了木瓜蛋白酶的最佳固定化条件.

1 材料与方法

1.1 材料

药品与试剂: 壳聚糖(脱乙酰度的质量分数为 93.28%, 粘度≤50 mPa·s, 广州凯利生物制剂制品

厂); 戊二醛溶液的体积分数为 50% (Fluka 公司, 上海化学试剂公司分装); 30 # 透平油(新疆克拉玛依炼油厂); 木瓜蛋白酶(Papain, EC 3.4.22.2, 本实验室制备, 30 133 U/g); 酪蛋白(ICN Biochemical 公司); 考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司, 上海化学试剂公司分装); L-酪氨酸(层析纯, 上海伯奥生物科技公司); 其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂.

1.2 壳聚糖微球的制备方法

壳聚糖微球的制备参考李田士^[7]、丁明^[8]等方法, 并稍加改进. 称取一定量的壳聚糖并溶于体积分数为 2% 的醋酸溶液, 制得质量分数为 4% 的壳聚糖酸性溶胶. 在烧杯中加入透平油, 搅拌下, 缓慢加入质量分数为 4% 的壳聚糖酸性溶胶, 搅拌 15 min, 使溶胶液滴均匀分散, 然后滴入一定量体积分数为 25% 戊二醛溶液, 搅拌 10 min 后, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将其 pH 调至 9~10, 于 60~70℃水浴保温 3 h, 静置冷却后, 弃去上层油层, 再依次用石油醚(I)、丙酮、无水乙醇抽洗, 真空干燥后, 过筛(80 目), 最后用蒸馏水抽洗, 真空干燥, 备用.

1.3 壳聚糖微球的性状测定

用 XSP-16A 光学显微镜测定壳聚糖微球的粒径分布范围, 并用 Olympus 立体镜观察壳聚糖微球的颜色和性状. 用日本 JSM-25S 型的电子扫描电镜观察壳聚糖微球和已固定化木瓜蛋白酶的壳聚糖微球的超微结构. 将壳聚糖和壳聚糖微球分别与 KBr 混合压片, 以 KBr 为参比, 用美国 NICOLET 5DX 型的红外光谱仪分析其微观化学结构.

溶胀体积: 称取一定量的干壳聚糖微球置于量筒中, 在室温(20℃)下充分溶胀 5 d, 测定壳聚糖微球的溶胀体积.

吸附容量(牛血清蛋白):静态吸附实验.称取一定量的干壳聚糖微球置于烧杯中,加入适量的 5 mg/mL 的牛血清蛋白溶液,再将其 pH 调至中性,然后于 4~8℃静置 48 h,取上清液测 A_{280nm} . 根据下式计算其吸附容量: $q = (C_0 - C) V / W$,

C_0 : 起始蛋白浓度 (mg/L); C : 平衡液蛋白浓度 (mg/L); V : 牛血清蛋白溶液体积 (L); W : 壳聚糖微球重量 (g); q : 吸附容量 (mg/g).

耐酸、耐碱性:称取一定量的干壳聚糖微球置于试管中,分别加入适量的盐酸溶液(0.2 mol/L),质量分数为 10% 的醋酸溶液,氢氧化钠溶液(2 mol/L),蒸馏水等试剂,在不同温度(25、100℃)和不同作用时间(30、60 min)的条件下,观察壳聚糖微球的溶解性和溶剂的颜色变化.

1.4 木瓜蛋白酶的溶液酶的制备及其活力测定

称取 0.16 g 木瓜蛋白酶,溶于 0.1 mol/L 的 pH 7.2 的磷酸缓冲液并定容至 100 mL,过滤,制得 1.6 mg/mL 的木瓜蛋白酶溶液.

酶活力的测定方法按 Weetall^[9] 方法.在 0.1 mL 1.6 mg/mL 的木瓜蛋白酶溶液中加入 0.9 mL 激活剂(0.1 mol/L 的 pH 7.2 的磷酸缓冲液中含 20 mmol/L 半胱氨酸和 1 mmol/L EDTA,现配现用,下同),于 37℃水浴恒温 10 min,加入同样 37℃恒温的 5 mg/mL 的酪蛋白溶液 1 mL(0.1 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液配制),37℃下准确反应 10 min,立即加入三氯乙酸(TCA)溶液(含 0.11 mol/L TCA、0.22 mol/L 乙酸钠、0.33 mol/L 乙酸)2 mL 终止反应,对照则先加 TCA 溶液,再加 5 mg/mL 的酪蛋白溶液 1 mL,其余与测定管相同.静置 30 min 后,过滤,滤液于 275 nm 波长下测定光吸收值.在上述条件下,每 10 min 内增加 0.1 个光吸收单位所需的酶量为一个酶活力单位(U).

1.5 固定化木瓜蛋白酶的制备及其活力测定

将壳聚糖微球在 0.1 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液中浸泡 24 h,抽干.称取 0.5 g 壳聚糖微球置于试管中,加入 1.6 mg/mL 的木瓜蛋白酶溶液 0.6 mL,于 4~8℃吸附 12 h,并不时搅动,然后滴入体积分数为 0.6% 戊二醛溶液 3 mL(0.1 mol/L pH 8.0 的硼酸缓冲液配制),使戊二醛溶液的最终浓度(体积分数)达到 0.5%,于 4~8℃交联 3 h 后,用 0.1 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液洗去多余的戊二醛溶液,吸干水分.取 0.1 g 固定化酶测活力,除加入 1 mL 激活剂外,其活力测定均与溶液酶的相同.固定化酶活力以 U/g 表示,固定化酶活力回收率按下式计算:

固定化酶活力回收率(%) = 固定化酶总活力(U) / 溶液酶总活力(U) × 100%

1.6 蛋白质含量测定 按 Bradford^[10] 方法.

2 结果

2.1 壳聚糖微球的性状

制备的壳聚糖微球过 80 目筛后,占总的形成球粒的 80%. XSP-16A 显微镜(100×)测得:71% 的壳聚糖微球的粒径范围分布在 21~42 μm 之间,微球的粒径分布较为均匀.用 Olympus SZH 立体镜(50×)观察壳聚糖微球呈红棕色的球状微粒(图 1).

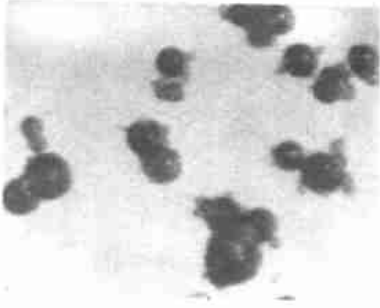


图 1 壳聚糖微球立体镜观察照片(50×)
Fig. 1 Stereomicroscope photo of chitosan microspheres (50×)

电镜观察到:壳聚糖微球表面有凹坑和小孔结构(图 2a),即有效地增大其比表面积,为其作为固定化酶的良好载体打下了一定的基础;同时观察到已固定化木瓜蛋白酶的壳聚糖微球具有良好的表观结构(图 2b).

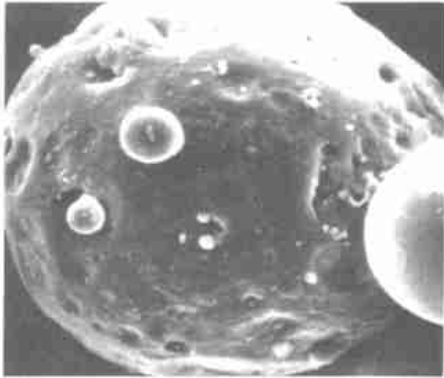


图 2a 壳聚糖微球的电镜照片(520×)

Fig. 2a Electron microscope photo of chitosan microspheres (520×)

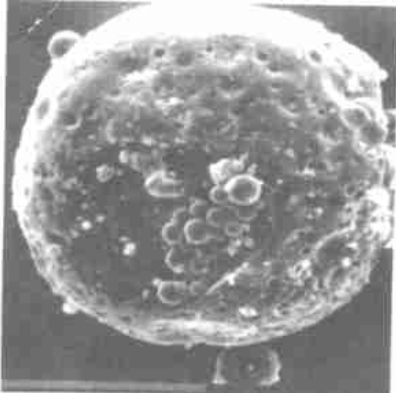


图 2b 已固定化酶的壳聚糖微球的电镜照片(338×)

Fig. 2b Electron microscope photo of chitosan microspheres with immobilized papain on them (338×)

将壳聚糖和壳聚糖微球分别与 KBr 混合压片, 进行红外光谱分析(图 3)。壳聚糖和壳聚糖微球的红外分析图谱很相似: 1 665 cm^{-1} 处的特征峰表明壳聚糖经交联生成 Schiff 碱, 但是量较少; 另外 1 560 cm^{-1} 处的特征峰表明壳聚糖分子中游离氨基的数量在交联后略有减少。结果说明: 在尽量不减少游离氨基数量的前提下, 能将不规则状的壳聚糖在双功能试剂的作用下制备成比表面积大的壳聚糖微球, 从而为酶的固定化提供了良好的载体。

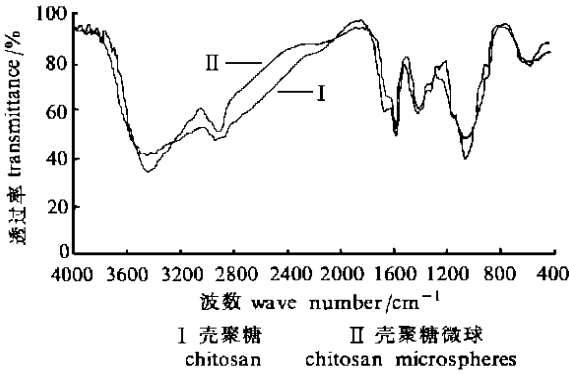


图 3 壳聚糖及壳聚糖微球的红外光谱分析图谱

Fig. 3 Infrared spectrum analysis of chitin and chitosan microspheres

在室温下, 将壳聚糖微球用蒸馏水充分溶胀 5 d, 测得其溶胀体积为 3.06 mL/g。

用静态吸附实验测得壳聚糖微球对牛血清蛋白的吸附容量为 50.0 mg/g。结果说明: 壳聚糖微球具有较好的吸附性能, 与 DEAE-纤维素等离子交换载体的吸附容量相当^[11]。因此在以其为载体, 进行酶的固定化时, 可充分利用这一特性, 从而提高酶的固定化效果。

壳聚糖微球耐酸、耐碱性的测定结果显示: 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 时, 壳聚糖微球与 0.2 mol/L 的盐酸溶液作用 30 min 的条件下, 壳聚糖微球部分降解, 溶剂变浑浊, 颜色由无色变为淡黄色; 而在其它实验条件下, 壳聚糖微球只出现溶胀现象, 无其它变化。以上结果说明: 壳聚糖微球具有较好的耐酸、耐碱性能。

2.2 壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的固定化条件

给酶量对酶固定化效果的影响: 恒定其它条件, 给酶量为 0.48 ~ 2.40 mg/g, 比活 190.72 U/mg, 分别制备固定化酶。结果(图 4)表明: 每克壳聚糖微球的最佳给酶量为 1.92 mg。

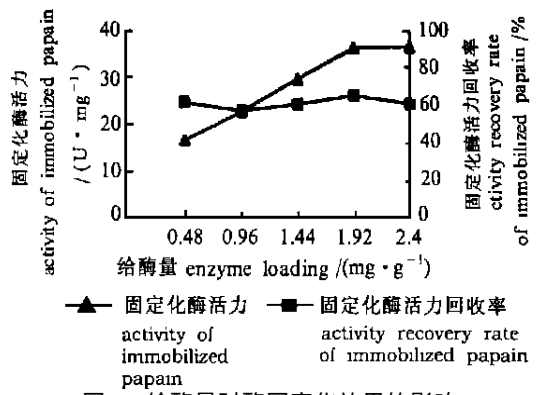


图 4 给酶量对酶固定化效果的影响

Fig. 4 Affection of enzyme loading on immobilization effect

吸附时间对酶固定化效果的影响: 恒定其它条件, 吸附时间为 4 ~ 24 h, 分别制备固定化酶。结果(图 5)表明: 当吸附时间达到 12 h 时, 固定化酶的活力回收率为最高(65.35%)。

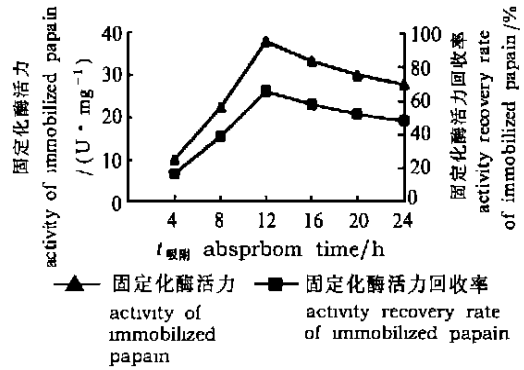


图 5 吸附时间对酶固定化效果的影响

Fig. 5 Affection of absorbing time on immobilization effect

吸附温度对酶固定化效果的影响: 恒定其它条件, 吸附温度依次为 4 ~ 8、20、30、40 $^{\circ}\text{C}$, 分别制备固定化酶。结果(图 6)表明: 当吸附温度为 4 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 时, 固定化酶的活力回收率为最高(63.45%)。

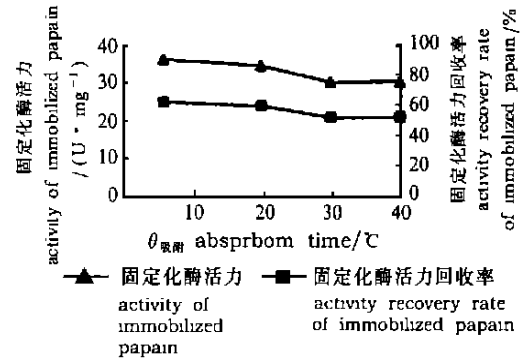


图 6 吸附温度对酶固定化效果的影响

Fig. 6 Affection of absorbing temperature on immobilization effect

戊二醛浓度对酶固定化效果的影响: 恒定其它条件, 戊二醛质量分数为 0.17% ~ 0.83%, 分别制备固定化酶。结果(图 7)表明: 当戊二醛质量分数为 0.5% 时, 固定化酶的活力回收率为最高(66.74%)。

戊二醛交联时间对酶固定化效果的影响: 恒定其它条件, 戊二醛交联时间为 1~5 h, 分别制备固定化酶. 结果(图 8)表明: 当戊二醛交联时间为 3 h 时, 固定化酶的活力回收率为最高(67.25%).

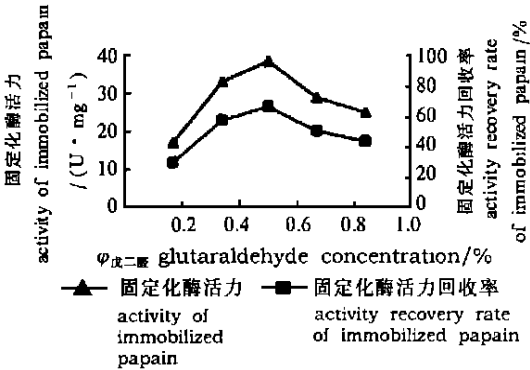


图 7 戊二醛浓度对酶固定化效果的影响
Fig. 7 Affection of glutaraldehyde concentration on immobilization effect

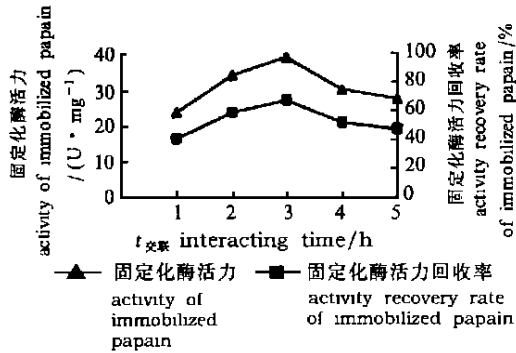


图 8 交联时间对酶固定化效果的影响
Fig. 8 Affection of interacting time on immobilization effect

戊二醛交联温度对酶固定化效果的影响: 恒定其它条件, 戊二醛交联温度依次为 4~8、20、30、40℃, 分别制备固定化酶. 结果(图 9)表明: 当戊二醛交联温度为 4~8℃时, 固定化酶的活力回收率为最高(63.45%).

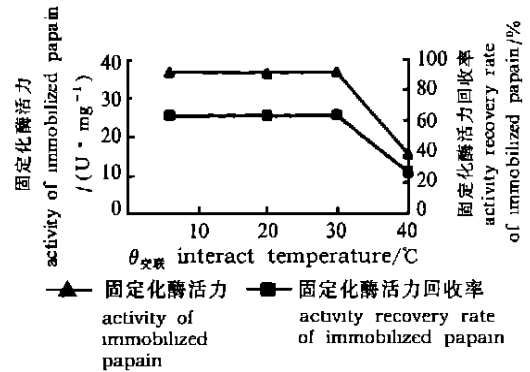


图 9 交联温度对酶固定化效果的影响
Fig. 9 Affection of interacting temperature on immobilization effect

综上所述, 在最佳固定化条件下制备壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶, 其活力回收率达到 62%~68%, 平均达到 66.60%, 高于同类研究的 36%~51%^[4,5,6].

3 讨论

固定化酶载体的研制与开发利用是酶工程的一项重要课题^[12]. 本研究以制备高效、廉价的酶固定化载体为基础, 分析和探讨了壳聚糖微球能作为酶的固定化载体所具备的良好特性. 结果显示: 与其它酶固定化载体, 如纤维素、甘蔗渣、壳聚糖等相比, 壳聚糖微球具有比表面积大、吸附性能较强、耐酸碱性能较好等特性. 然后以木瓜蛋白酶为例, 充分利用壳聚糖微球的特性, 用吸附-交联法固定化木瓜蛋白酶. 结果表明: 固定化酶的酶活力回收率高于同类研究水平的固定化酶. 另外, 本研究结果不仅证明了壳聚糖微球成功地固定化木瓜蛋白酶将提高木瓜蛋白酶的使用效率, 还证明了作为固定化酶良好载体的壳聚糖微球将具有重要的研究价值和应用价值. 关于壳聚糖微球固定化木瓜蛋白酶的酶学性质及其应用, 我们将另文报告.

参考文献:

[1] 崔小明. 壳聚糖的开发和利用[J]. 武汉化工, 1997, (1): 16~19

[2] 周纪宁, 汪体乾. 甲壳素/壳聚糖及其衍生物在固定化酶中的应用[J]. 化工新型材料, 1998, 26(5): 19~22

[3] 相沢孝亮. 酶应用手册[M]. 黄文涛, 等译. 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 113~116

[4] 徐凤彩, 李雪萍, 程京燕, 等. 壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(5): 608~613

[5] 姜涌明, 隋德新, 赵国骏, 等. 壳聚糖固定木瓜蛋白酶的研究[J]. 生物化学杂志, 1993, 9(4): 404~407

[6] 张明春, 陈庆森, 王 肱, 等. 壳聚糖固定化木瓜蛋白酶的研究[J]. 天津商学院学报, 1998, (2): 40~44

[7] 李田土. 珠状壳聚糖凝胶的合成[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1990, 6(1): 69~74

[8] 丁 明, 施建军, 皇甫立霞, 等. 壳聚糖微球的制备研究[J]. 化学世界, 1998, (12): 636~640

[9] WEETALL H, MASON R. Studies on immobilized papain[J]. Biotechnol, 1973, 15(3): 455~460

[10] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, (72): 248~254.

[11] 陈石根, 周润琦. 酶学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987. 335~370.

[12] 陈 声, 居乃琥, 陈石根. 固定化酶理论和应用[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987. 76~108.

Studies on Preparation of Chitosan Microspheres
and Immobilization of Papain on Them

LI Hong , WANG Wei-jun, XU Feng-cai
(College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China)

Abstract: Using chitosan as a source, the chitosan microspheres were prepared by suspension-crosslinking technique. Their properties were determined and analysed. The results indicated that they complexed functions of chitosan with those of macromolecule microspheres. Then as the carrier, the chitosan microspheres were used to immobilize papain by absorption-crosslinking method. The optimum conditions for immobilization were studied. The results were as follows: the optimum load of enzyme was 1.92 mg enzyme/g carrier, the absorbing time was 12 h and the temperature 4~8 ℃; then interacted for 3 h at 4~8 ℃with 0.5% glutaraldehyde. The activity and the activity recovery of the immobilized papain were 38.49 U/g carrier and 66.60% respectively.

Key words: chitosan microspheres; papain; immobilization

【责任编辑 李 玲】

(上接第 45 页)

[10]

SMITH I. K. Characterization of sulfate transport in culture tobacco cells[J]. Plant Physiol. 58: 358~362.

[11]

陈因良, 陈志宏. 细胞培养工程[M]. 上海: 华东化工学院出版社 1992 49: 265~267.

[12]

董教望, 叶和春. 新疆紫草细胞悬浮培养和发酵培养的研究[J]. 植物学报, 1993 95(1): 57~61.

[13]

钟建江. 生物学因子对紫苏悬浮培养细胞生长和花色素形成的影响[J]. 植物工程学报, 1995, 11(2): 153~156

[14]

MATSUMOTO T, OKUNISICAL K. Effects of physical factors and antibiotics on the growth of higher plant cells in suspension culture[J]. Agri. Biol. Chem. 1972 36: 2 177

Effects of Suspension-Culture Conditions on Tobacco Cell
Growth and CoQ₁₀ Production

YE Guo-hong¹, MU Hong², XU Feng-cai²
(1. Adult Educational College, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;
2. Department of Biotech, South China Agri. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The culture conditions affecting HHDJY tobacco cell growth and the formation of CoQ₁₀ were studied. The results showed that tobacco cell could grow in the pH range from 4.0~8.0(before autoclaving). The optimal pH for the cell growth and the formation of CoQ₁₀ was 6.0. The inoculum amounts affected the whole cell growth circle but not affected the formation of CoQ₁₀. The cell growth lag phase was shortened when the inoculum amounts increased. Between 16~32 ℃, the formation of CoQ₁₀ was enhanced with the temperature increased, but the biomass of tobacco cell decreased when the culture temperature was higher than 28 ℃. The effects of shaking speeds on the formation of CoQ₁₀ and cell growth were due to the shearing stress and concentration of dissolved O₂. When the shaking speeds were 100~150r/min, the tobacco cell grew well and the contents of CoQ₁₀ were highest. The optimal Kd value for the growth of tobacco cell was 1.74 pmol (mL. min. Pa) — 1

Key words: Suspension culture; cell growth; content of CoQ₁₀

【责任编辑 李 玲】