

丝素-壳聚糖合金膜固定化超氧化物歧化酶的研究

纪平雄¹, 侯 1002, 徐凤彩³, 陈芳艳²

(1 华南农业大学 理学院, 广东 广州510642; 2 华南农业大学 艺术设计学院, 广东 广州510642;

3 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州510642)

摘要:采用富含自由氨基的丝素-壳聚糖合金膜为载体, 吸附固定从柞蚕蛹提取分离的超氧化物歧化酶(SOD), 研究并确定了固定化的最佳条件, 分别为酶浓度38 U/mL, pH 6.3, 温度4~8 °C、时间15 h. 制得的固定化酶活力为89.1 U/g 载体, 酶的活力回收达到35.9%.

关键词:丝素-壳聚糖合金膜; 超氧化物歧化酶; 固定化

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)02-0051-03

酶的固定化是当前酶工程的热门课题之一. 超氧化物歧化酶(SOD)能对生物体内由各种途径产生的有毒性、对细胞有很大破坏力的自由基 $O_2^{\cdot-}$ 进行歧化作用而解除其毒性, 在化妆品、食品和医药等领域有着广阔的应用前景. 国内外有关的研究报道很多, 但在寻找酶固定化的载体方面, 仍未有理想的结果^[1]; 丝素-壳聚糖合金膜集合了丝素和壳聚糖2种高分子物质的优点, 对于固定荷电负性酶尤其以荷电负性的物质为底物的酶具有独特的作用^[2]. 本研究以丝素-壳聚糖合金膜为载体, 固定化从柞蚕蛹制备的超氧化物歧化酶^[3], 研究了超氧化物歧化酶固定化的最佳条件, 为今后的实用化提供了基础资料.

1 材料与方法

1.1 材料

柞蚕蛹SOD和丝素-壳聚糖合金膜载体的制备按纪平雄等^[2,3]方法进行; L-甲硫氨酸, 上海伯奥生物科技有限公司进口分装. 其余试剂均为市售生化试剂或分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 溶液酶活力测定 在含2.5 mL L-甲硫氨酸、250 μ L NBT和200 μ L核黄素的溶液中加入50 μ L SOD酶液, 对照加入0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸钾缓冲液50 μ L, 摇匀后照光10 min, 以不照光的溶液作空白, 于560 nm波长下测定光密度^[4,5]. 在上述条件下以抑制NBT光化还原50%的酶量为1个酶活力单位(U).

1.2.2 固定化SOD的制备及其活力测定 称取0.05 g丝素-壳聚糖合金膜, 加入浓度为38 U/mL、蛋白质含量为9.7 μ g/mL、pH 6.3的自制SOD酶液

1 mL, 4~8 °C吸附15 h, 用0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸钾缓冲液洗至280 nm波长处无光吸收. 固定化酶和残留酶的活力测定方法与溶液酶的测定方法相同. 以U/g载体表示固定化酶活力, 计算酶活力和活力回收.

1.2.3 溶液酶浓度对酶固定化效果的影响 称取5组各0.05 g丝素-壳聚糖合金膜, 分别加入1 mL pH 6.3、浓度为13、25、38、50、63 U/mL的SOD酶液, 4~8 °C吸附固定15 h, 再用0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸钾缓冲液洗至280 nm波长处无吸收, 吸干水分测定固定化酶活力.

1.2.4 溶液酶pH对酶固定化效果的影响 称取8组各0.05 g丝素-壳聚糖合金膜, 分别加入1 mL浓度为38 U/mL, pH依次为5.3、5.8、6.3、6.8、7.3、7.8、8.3、8.8的SOD酶液, 4~8 °C吸附固定15 h, 再用0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸钾缓冲液洗至280 nm波长处无吸收, 吸干水分测定固定化酶活力.

1.2.5 固定化温度对酶固定化效果的影响 称取3组各0.05 g丝素-壳聚糖合金膜, 均加入1 mL浓度为38 U/mL、pH 6.3的SOD酶液, 分别于4~8、20、30 °C吸附固定15 h, 再用0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸钾缓冲液洗至280 nm波长处无吸收, 吸干水分测定固定化酶活力.

1.2.6 固定化时间对酶固定化效果的影响 称取4组各0.05 g丝素-壳聚糖合金膜, 均加入1 mL浓度为38 U/mL、pH 6.3的SOD酶液, 4~8 °C分别吸附5、10、15、20 h, 再用0.05 mol/L、pH 7.8的磷酸钾缓冲液洗至280 nm波长处无吸收, 吸干水分后测定固定化酶活力.

2 结果与分析

2.1 固定化时间对酶固定化效果的影响

在固定化条件溶液酶浓度、pH 值、温度相同的情况下,以不同的固定化时间,在同量的载体上制备固定化酶,测定了酶的活力和活力回收.图 1a 显示,随着吸附时间的延长,载体吸附的酶量增加,固定化酶活力增大,直至载体被酶饱和,固定化酶活力达到最大.即当固定化时间达到 15 h 时,固定化酶活力与酶的活力回收都达到最大值,分别为 89.1 U/g 和 35.9%.之后随着时间的延长,固定化酶活力和酶的活力回收下降.因而选取 15 h 作为最佳的固定化时间.

2.2 溶液酶浓度对酶固定化效果的影响

不同浓度的溶液酶在同量的载体,相同的 pH 值、温度、时间等固定化条件情况下制备固定化酶,测定固定化酶活力和活力回收,结果如图 1b.可见随着溶液酶浓度的增加,载体吸附的酶量增多,固定化酶活力增高,当溶液酶浓度达 50 U/mL 时,固定化酶活力最高.但随着酶浓度的继续增加,固定化酶

活力反而下降.另一方面,随溶液酶浓度的增加,未吸附的酶量增多,导致酶的活力回收下降.结合两方面的因素,溶液酶浓度为 38 U/mL 时固定化效果最佳,固定化酶活力达 84.7 U/g,活力回收 39.6%.

2.3 溶液酶 pH 对酶固定化效果的影响

在同量的载体,溶液酶浓度、温度和时间等固定化条件相同,pH 不同的情况下制备固定化酶,测定相应的酶活力和酶活力回收,结果如图 1c 所示.可知溶液酶 pH 值为 5.3 以上时,固定化酶的酶活力和酶活力回收增加最快,pH 6.3 时达到最大,之后随 pH 的增高而下降.因而在 pH 6.3 时,酶的固定化效果最好.

2.4 固定化温度对酶固定化效果的影响

用同量的载体,采用不同的固定化温度,相同的溶液酶浓度、pH 值和时间等固定化条件制备固定化酶,测定相应固定化酶活力和酶活力回收.结果表明,只有在 4~8 °C 的吸附温度下,固定化酶才有活性,酶活力与酶的活力回收分别为 89.1 U/g 和 35.9%.所以,温度 4~8 °C 是超氧化物歧化酶固定化的最佳温度.

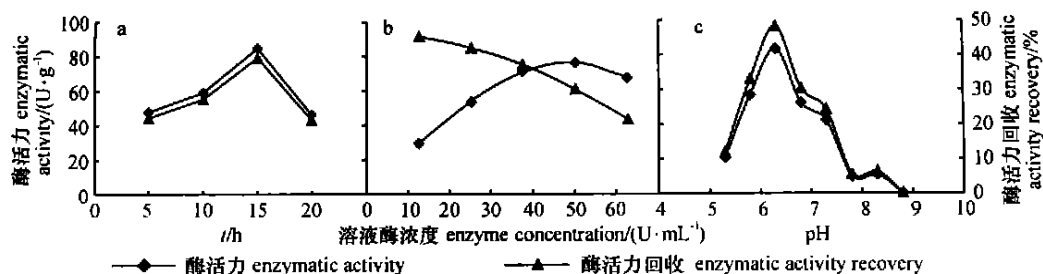


图 1 不同条件对酶固定化的影响

Fig. 1 The influence of different conditions on enzymatic immobilization

3 讨论与结论

由于丝素-壳聚糖含有较多的自由氨基,克服了载体的负电性,对 SOD 有很好的固定作用,而且有利于带负电荷的底物与酶的接触,有效地提高了酶与底物的结合能力,从而大大地提高了酶的活力.袁勤生等^[6,7]用海藻酸钠、聚丙烯酰胺、戊二醛等为载体固定化 SOD,固定化酶不表现活力、活力回收率低.在国内外 SOD 固定化鲜见有理想结果的报道.

本研究在比较多种固定化方法优缺点的基础上,结合载体和 SOD 的独特性质,采用条件温和、操作简便的物理吸附法固定化 SOD,取得了比较满意的固定化效果.并就溶液酶浓度、溶液酶 pH 值、固定温度、固定时间等重要的固定化条件进行了试验,

分析和确定.

随着溶液酶浓度的升高,丝素-壳聚糖合金膜载体吸附的酶量增多,固定化酶活力增高.当达到一定程度后,由于载体吸附的酶量有限及产生了空间阻碍等因素,固定化酶活力逐渐下降.同时,酶的活力回收随着溶液酶浓度的增加,未吸附的酶量增多,酶的损失加大而下降.综合考虑两方面的因素,确定采用溶液酶浓度为 38 U/mL 作为固定化的最佳溶液酶浓度.

由于吸附法在不适宜的 pH 条件下容易解吸脱落,因此需要对固定化的 pH 值加以确定.试验的结果表明,当溶液酶的 pH 值为 6.3 时,固定化酶活力和酶的活力回收达到最大.可能是低于这个值,酶分子表面带正电荷,不易被丝素-壳聚糖合金膜载体上

的自由氨基吸附; 高于这个值, 酶分子表面带负电荷, 又阻碍了底物 $O_2^{\cdot-}$ 与酶的结合. 因此确定溶液酶 pH 值为 6.3 作为固定化的最佳条件.

在 4~8、20、30 $^{\circ}C$ 个不同的温度下制备固定化酶, 结果发现, 只有在 4~8 $^{\circ}C$ 条件下吸附, 固定化酶才有活性, 因而确定固定化的最佳温度条件为 4~8 $^{\circ}C$.

在载体中的自由氨基的吸引下, 随着吸附时间的延长, 被吸附的酶量增多, 固定化酶的活力增大, 直至达到一个最大值. 这时, 载体中的自由氨基趋于吸附饱和. 之后, 随着时间的继续延长, 引起固定化酶活力和酶的活力回收下降. 所以确定以吸附 15 h 作为固定化的最佳固定时间.

综上所述, 丝素-壳聚糖合金膜固定化 SOD 的最佳条件为酶浓度 38 U/mL、pH 6.3、温度 4~8 $^{\circ}C$ 、固定时间 15 h. 制得的固定化酶活力为 89.1 U/g, 酶的活力回收达 35.9%.

参考文献:

[1] 陈淮杨, 刘望夷. 从超氧化物歧化酶的分布和结构看其分子进化[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(5): 408—413.

[2] 纪平雄, 侯 , 徐凤彩. 壳聚糖—丝素合金膜的制备及其性状研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 59—61.

[3] 纪平雄, 侯 , 徐凤彩. 柞蚕蛹粉提取超氧化物歧化酶[J]. 蚕业科学, 2001, 27(4): 332—334.

[4] GIANNOPOLITIS C, RIES S. Superoxide dismutase[J]. Plant Physiol, 1977, 59: 309—314.

[5] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983, 9(1): 77—83.

[6] 袁勤生, 邓碧玉, 杨 中, 等. 用固定化方法研究超氧化物歧化酶的活性与结构的关系[J]. 生物化学杂志, 1992, 8(3): 326—330.

[7] 邹国林, 徐传斌, 胡 萍, 等. 超氧化物歧化酶明胶微球的制备及性质[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1995, 41(4): 517—520.

Studies on the Immobilization of Superoxide Dismutase in Hemolymph of Tussah Pupa on Fibroin-Chitosan Blend Membranes

Ji Ping-xiong¹, Hou Jun², Xu Feng-cai³, Chen Fang-yan²

(1 College of Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 2 College of Art Design,

South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 3 College of Life of Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Taking fibroin-chitosan blend membranes that contained abundant amino groups as carrier, superoxide dismutase(SOD) extracted from the Tussah pupa was immobilized. The optimal conditions for immobilization of the enzyme were obtained. The optimal conditions were enzyme concentration 38 U/mL, pH 6.3, temperature 4~8 $^{\circ}C$ and time 15 h, respectively. The activity of immobilized enzyme was 89.1 U/g, and enzymatic activity recovery reached 35.9%.

Key words: fibroin-chitosan blend membranes; superoxide dismutase; immobilization

【责任编辑 李晓丹】