

壳聚糖铜固定化多酚氧化酶的研究*



雷福厚

(广西民族学院化学化工系, 广西 南宁 530006)

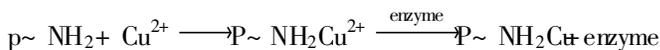
LEI F. H.

摘 要: 通过壳聚糖上的 $-NH_2$ 与 Cu^{2+} 生成不饱络合物, 以高分子配位键法, 对多酚氧化酶 (PPO) 固定化, 实验结果表明这种方法是可行的。固定化多酚氧化酶的最佳 pH 值为 6.24, 在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 25 min 后酶活力保留 31.1%。讨论了固定化酶的重复使用性、米氏常数及底物对固定化酶的影响。

关键词: 壳聚糖; 高分子络合物; 多酚氧化酶; 固定化

中图分类号: Q 554⁺. 9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2000)02-0023-04

壳聚糖是从蟹、虾等甲壳动物的外壳中提取的一种氨基多糖, 学名为 2-氨基-1, 4-葡聚糖。它来源丰富、制备简单、化学性质稳定, 耐热性好。壳聚糖作为固定化酶的载体已有一些报道^[1-3]。一般固定化酶方法是壳聚糖与戊二醛发生 Schiff 反应, 再以共价键的形式对酶固定化。本文研究的是壳聚糖制备成壳聚糖铜高分子络合物, 以配位键的形式对多酚氧化酶进行固定化, 其过程为:



壳聚糖上的 $-NH_2$ 可以与 Cu^{2+} 形成高分子络合物, 由于高分子键的刚性作用, 此络合物的 Cu^{2+} 配位未饱和, 可以进一步与酶中的游离氨基酸配位, 使酶以配位键的形式固定在壳聚糖上, 此方法称为高分子配位键法。这种方法制备简单, 固定化酶过程中酶损失少。

1 实验

1.1 材料与试剂

壳聚糖: 浙江玉环化工厂, 分子量 1.38×10^6 。脱乙酰度 87%, 其余试剂均为分析纯; 721 分光光度计: 上海第三分析仪器厂。

1.2 多酚氧化酶的提取

取市售香蕉果肉约 300 g, 捣碎成糊状, 移入烧杯, 加入缓冲溶液, 充分搅拌, 抽滤, 滤液

* 收稿日期: 1999-07-09

作者简介: 雷福厚(1965-), 男(土家族), 湖北建始人, 副教授, 硕士, 从事有机化学及天然高分子研究。

中加入硫酸铵,使之浓度为 35 g/100 mL,抽滤,滤液中再加硫酸铵至饱和,沉淀过滤。为进一步纯化酶,将沉淀用蒸馏水溶解,再加丙酮,沉淀抽滤,所得凝胶状沉淀即为多酚氧化酶(PPO),低温保存备用^[4]。

1.3 壳聚糖铜对多酚氧化酶的固定化

将壳聚糖粉碎,用 Cu^{2+} 溶液浸泡 4 h,洗涤除去未络合的铜离子,得绿色壳聚糖铜高分子络合物,加入酶和磷酸盐缓冲溶液,搅拌 24 h,过滤,蒸馏水反复冲洗,制得壳聚糖铜固定化多酚氧化酶。

1.4 游离酶的活性测试

称取一定质量的多酚氧化酶,配制成一定浓度的酶溶液,量取 0.5 mL 酶溶液,加入到由磷酸盐缓冲溶液、1.5% H_2O_2 和 0.160 mol/L 邻苯二酚乙醇水溶液(v/v 为 1:1)按体积比 2:1:1 配制的 4 mL 反应液中,以相同比例的缓冲溶液- H_2O_2 溶液-邻苯二酚溶液为参比液,在波长 470 nm 处用 721 分光光度计测定吸光度随反应时间的变化,活性表示为: $\Delta A/S^{[4-5]}$ 。

1.5 固定化多酚氧化酶的活性测试

称取一定质量的固定化多酚氧化酶,置于带过滤装置的反应器中,加 12 mL 由磷酸盐缓冲液、 H_2O_2 溶液,邻苯二酚溶液,按 2:1:1 配制成反应液恒温反应,以相同比例缓冲溶液- H_2O_2 溶液-邻苯二酚溶液为参比液,每隔一定时间取滤液在波长为 470 nm 处测吸光度,被测定液仍返回到反应器中,固定化酶活性表示为:吸光度变化值/时间·质量,即 $\Delta A/\text{min}\cdot\text{g}$ (wt)。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖铜固定化多酚氧化酶的重复使用性

称取一定质量固定化酶,用磷酸盐缓冲溶液- H_2O_2 -邻苯二酚溶液测定酶的活性,然后用蒸馏水洗涤,再测定固定化酶的活性,用第 n 次测定值与第一次测定值的比值表示固定化酶的相对活力,结果列于表 1 中。

表 1 固定化多酚氧化酶的重复使用性

Table 1 Reusability of immobilized polyphenol oxidases(PPO)

使用次数 times of use	1	2	3	4
固定化酶活力 activity of immobilized PPO($\Delta A/\text{g}\cdot\text{min}$)	0.188	0.0994	0.0537	0.0344
相对活力 relative activity(%)	100	52.87	28.57	18.29

2.2 溶液 pH 值对固定化酶活性的影响

多酚氧化酶与壳聚糖铜键合后,由于微环境发生了变化,导致固定化酶的最适宜 pH 值与游离酶相比发生偏移,结果列于表 2 中。

表 2 pH 值对多酚氧化酶和固定化多酚氧化酶活性的影响

Table 2 Effect of pH value on activity of free PPO and immobilized PPO

pH	5.29	5.59	5.91	6.24	6.47	6.64	6.81	6.98	7.17	7.38
多酚氧化酶 free PPO($\Delta A/S$)	0.0086	0.007	0.016	0.017	0.013	0.032	0.026	0.016	0.016	0.001
固定化多酚氧化酶($\Delta A/\text{min}\cdot\text{g}$) immobilized PPO	0.229	0.202	0.218	0.246	0.202	0.0846	0.0924	0.0672	0.132	0.0594

由表 2 可知,溶液 pH 值对多酚氧化酶和壳聚糖固定化多酚氧化酶的影响有如下特点:

(1) 最佳 pH 值发生偏移, 游离酶最佳 pH 值为 6.64, 而固定化酶的最适宜 pH 值为 6.24; (2) pH 值在 5.29~ 6.47 间, 固定化酶基本上能保持高活性, 与最佳 pH 值活性相比活性保持在 82.1% 以上。而游离酶的差别却较大, 均在最佳 pH 值的 53.1% 以下, 固定化酶对溶液酸碱的适应力增强; (3) 游离酶和固定化酶均有两个最适宜 pH 值, 前者为 6.24 和 6.64, 而后者为 6.24 和 7.17。

2.3 底物浓度对壳聚糖固定化多酚氧化酶活性的影响

有些酶催化反应, 当底物浓度增加时, 反应速度反而下降, 即受底物的抑制作用。在不同浓度的邻苯二酚溶液中测定多酚氧化酶的活性, 结果列于表 3。

表 3 底物浓度对酶活性的影响

Table 3 Effect of substrate concentration on activity of free PPO and immobilized PPO

浓度 concn. of substrate(mol/L)	4×10^{-3}	8×10^{-3}	0.02	0.04	0.08	0.16
多酚氧化酶 free PPO($\Delta A/\text{min}$)	0.086	0.156	0.18	0.246	0.25	0.230
固定化多酚氧化酶($\Delta A/\text{min} \cdot \text{g}$) immobilized PPO	0.502	0.936	0.780	0.786	0.375	0.347

由表 3 可知, 当底物浓度大于 8×10^{-3} (mol/L) 时, 底物对固定化酶的活性有抑制作用, 随浓度的增大, 酶的活性反而减小, 而在这段浓度范围内, 底物对游离酶的这种抑制作用不很明显。这是壳聚糖铜固定化多酚氧化酶呈现的一个新特点。

2.4 壳聚糖铜固定化多酚氧化酶的热稳定性

温度升高, 酶将发生变性, 失去活性。将多酚氧化酶和固定化酶置于恒温水浴槽中, 在不同的温度下放置 25 min, 取出测其活性, 结果列于表 4。

表 4 多酚氧化酶和固定化多酚氧化酶的热稳定性

Table 4 Heat stability of free PPO and immobilized PPO

温度 temperature($^{\circ}\text{C}$)	30	40	50	60	70
固定化酶 immobilized PPO					
活力 activity($\Delta/\text{min} \cdot \text{g}$)	0.270	0.196	0.153	0.128	0.084
保留活力 retained activity(%)	100	72.6	56.7	47.4	31.1
多酚氧化酶 free ppo					
活力 activity($\Delta A/s$)	0.100	0.027	0.020	0.020	0.0018
保留活力 retained activity(%)	100	27.0	20.0	20.0	1.8

由表 4 可知, 固定化多酚氧化酶的热稳定性比游离酶明显增强, 在 40°C 以上, 游离酶的活性下降很快, 而固定化酶是平稳下降, 在 70°C 仍保留了 31.1% 活性。

2.5 壳聚糖铜固定化多酚氧化酶的米氏常数

配制不同浓度的邻苯二酚乙醇溶液, 分别测定一定质量的固定化酶和游离酶的活性, 以底物浓度的倒数为横坐标, 反应速度的倒数为纵坐标作图, 其斜率和截距的比值为米氏常数, 求得壳聚糖铜固定化多酚氧化酶 $K_m = 2.61 \times 10^{-2}$ mol/L, 游离酶 $K_m' = 1.66 \times 10^{-2}$ mol/L。

3 结论

3.1 壳聚糖铜固定化多酚氧化酶的最佳催化反应条件为: 底物浓度 8×10^{-3} mol/L, 溶液 pH 为 6.24, 温度不超过 30°C 。与游离酶相比, 固定化酶的热稳定性和对酸碱的适应性增强, 而

底物对其有较大的抑制作用。

3.2 壳聚糖铜固定化多酚氧化酶在最佳 pH 值、热稳定性、底物对酶的抑制及米氏常数等方面均表现出酶催化特征。说明以功能高分子化合物为载体,以 Cu^{2+} 为配位中心,通过配位桥键的形式将酶固定在高聚物上(即高分子配位键法)是可行的。改变功能基和金属离子,可以将此方法应用到其它酶的固定化中,进行更广泛、深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 陈 盛,黄智跃,刘艳如.壳聚糖固定化纤维素的研究[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(3):250.
- [2] 周纪宁.壳聚糖固定 L-天冬酰胺酶的研究[J].功能高分子学报,1998,11(1):76.
- [3] 邵宁文.蛹皮壳聚糖的制备及其用作固定化酶载体的研究[J].天然产物研究与开发,1997,9(2):48.
- [4] 杨 萌,ROVEL B,METCHE M.高灌蓝越橘多酚氧化酶的提取和纯化[J].无锡轻工业大学学报,1998,17(3):54~57.
- [5] 塔卡基,杨方琪,高福成.广东芝麻香蕉加工中的酶褐变研究(I)[J].无锡轻工业学院学报,1994,13(1):10~20.

STUDY ON IMMOBILIZATION OF POLYPHENOL OXIDASES ON COORDINATED CHITOSAN- Cu^{2+}

LEI Fei-hou

(Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China)

Abstract: A method for immobilization of polyphenol oxidases (PPO) was introduced. The PPO was immobilized on the coordinated polymer chitosan- Cu^{2+} . The results showed that optimum pH value of immobilization PPO was 6.24. The activity of immobilization PPO was retained 31.1% in 70°C buffer solution for 25 minutes, much higher than that of free PPO. Besides, inhibition of substrate, reusability and Michaelis constant were discussed and showed that the method of immobilization of enzyme with coordinated polymer was practicable.

Key words: chitosan; coordinated polymer; polyphenol oxidases(PPO); immobilization.