

磁性壳聚糖微球固定化碱性蛋白酶的酶学性质

李丹丹¹, 江连洲^{2,3,*}, 李 杨^{2,3}, 王胜男², 王 梅², 李 丹^{2,4}

(1.江苏省宿迁市宿豫区食品药品监督管理局, 江苏 宿迁 223801; 2.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3.国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4.宁德师范学院, 福建 宁德 352100)

摘 要: 以 Fe_3O_4 和壳聚糖为原料, 以戊二醛为交联剂制备磁性壳聚糖微球, 固定化碱性蛋白酶, 并对其品貌及结构性质进行观察和分析。结果表明: 壳聚糖微球具有良好的球形外貌, 大小约为15nm, 固定化后粒子大小约为20nm; 红外光谱分析证实 Fe_3O_4 已被壳聚糖包裹; 固定化酶前后粒子晶形完整, 均具有良好的磁响应能力和超顺磁性。固定化酶与游离酶相比, 最适温度从60℃下降到50℃; 最适pH值从10升至11; 固定化酶的 K_m 为 $5.85 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$, 游离酶的 K_m 为 $6.06 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$ 。

关键词: 壳聚糖; 磁性; 固定; 碱性蛋白酶; 酶学性质

Enzymatic Properties of Magnetic Chitosan Microsphere-Immobilized Alkaline Protease

LI Dan-dan¹, JIANG Lian-zhou^{2,3,*}, LI Yang^{2,3}, WANG Sheng-nan², WANG Mei², LI Dan^{2,4}

(1. Food and Drug Administration of Suyu Region of Suqian City, Suqian 223801, China; 2. College of Food Science, Northeast

Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. National Research Center of Soybean Engineering and Technology,

Harbin 150030, China; 4. Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

Abstract: Alkaline protease was immobilized onto magnetic chitosan microspheres prepared from Fe_3O_4 and chitosan by crosslinking with glutaraldehyde and its appearance and structural properties were analyzed. The results showed that the magnetic chitosan microspheres had spherical appearance with a particle size increasing from 15 to 20 nm after immobilization. FT-IR analysis revealed that Fe_3O_4 was well wrapped up in the magnetic chitosan microspheres. The magnetic chitosan microspheres had complete crystal structure, good magnetic response and strong superparamagnetic behaviors before and after immobilization of alkaline protease. The optimal reaction temperature and pH for the immobilized enzyme were 50 °C and 11 compared with 60 °C and 10, respectively, for the free enzyme. The K_m was $5.85 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$ for the immobilized enzyme and $6.06 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$ for its free counterpart.

Key words: magnetism; chitosan; immobilization; alkaline protease; enzymatic property

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0249-04

碱性蛋白酶是一类适宜在碱性条件下水解蛋白肽键的酶类, 具有较强的水解能力、耐酸碱能力、耐热能力^[1]。随着人们对碱性蛋白酶认识的不断深入, 其被广泛应用在水解植物蛋白中, 例如: 大豆蛋白、玉米蛋白、大米蛋白等^[2-4]。但是酶反应大多数在液相中进行, 很难从体系中回收, 只能使用一次, 造成不必要的浪费, 因而将碱性蛋白酶进行固定化可以解决这一问题^[5]。

壳聚糖是自然界中存在的唯一的碱性多糖, 资源丰富安全无毒, 具有独特的分子结构易于化学修饰^[6], 这些优势可作为传统的固定化酶和细胞的载体^[7]。而磁性壳聚糖微球克服了传统的壳聚糖微球的结构松散、孔径较大等缺点; 相比之下具有更强的机械性能, 在外加磁场的条件下很容易从体系中回收, 可以随磁场的变化定向

运动。由于是纳米级别, 有着巨大的比表面积, 可以为其他活性基团提供更多的结合位点^[8-9]; 此外即使载体失效, 还可以回收通过一定的手段重复利用, 提高了经济效益。正是这些优点使得磁性纳米壳聚糖微球这一新兴的绿色材料有着更广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Fe_3O_4 磁性纳米粒子、福林酚、酪氨酸、酪蛋白美国Sigma公司; 戊二醛、壳聚糖(脱乙酰度90%以上)、液体石蜡、硬脂酸镁、吐温-80、丙酮、三氯乙酸、碳酸钠、氢氧化钠、四硼酸钠、无水乙醇 天津迪博化工股

收稿日期: 2011-08-23

基金项目: 黑龙江省科技攻关计划项目(GA09B401-6); 国家现代农业产业技术体系建设专项(nycyt-x-004)

作者简介: 李丹丹(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: yami0104@163.com

*通信作者: 江连洲(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: jlzname@163.com

份有限公司;碱性蛋白内切酶Protex-6L(液体, 200000U/mL)杰能科(中国)生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

KQ-50E超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; DZKW-S-4电热恒温水浴箱 北京市用光明医疗器械厂; JT-160W电动搅拌机 金坛市医疗器械厂; FA2004分析天平 上海市舜宇恒平科学仪器有限公司; UV759CRT紫外-可见分光光度计 上海佑科仪器有限公司; VFD-2000真空冷冻干燥机 上海比郎仪器有限公司; pH5-3C酸度计 上海雷磁仪器厂; H7650透射电子显微镜 日本Hitachi公司; Magna-IR 560 E.S.P型傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR) 美国Nicolet公司; D/MAX 2200型X射线衍射仪 日本理学公司; VSM7410振动样品磁强计 美国Lakeshore公司。

1.3 方法

1.3.1 磁性壳聚糖微球的制备

按照文献[10],取0.3g壳聚糖溶解在20mL体积分数1.5%的乙酸溶液中,再加入0.5g Fe_3O_4 ,超声分散均匀。在250mL三颈瓶中加入80mL液体石蜡、6mL吐温-80和0.05g硬脂酸镁,在40℃水浴中搅拌混匀,然后将 Fe_3O_4 -壳聚糖缓慢加入到三颈瓶中。搅拌1h左右加入5%的戊二醛溶液10mL,继续反应1h,然后用0.5mol/L的NaOH调节体系的pH值为10左右,升温至60℃,继续反应2h。反应完毕后抽滤,依次用乙醚、丙酮、乙醇和超纯水清洗数次,真空冷冻干燥得 Fe_3O_4 -磁性壳聚糖微球。

1.3.2 固定化碱性蛋白酶

取上述制备的磁性壳聚糖微球0.50g置于三角瓶中,加入一定量的pH9.5硼砂-氢氧化钠缓冲溶液,使之充分溶胀,然后加入10mL 1%的碱性蛋白酶缓冲液,吸附一定时间后加入5%的戊二醛溶液5mL,室温振荡过夜。反应后用磁铁进行分离,倾出上层液体,用超纯水清洗直至上清液中无紫外吸收。磁性壳聚糖微球进行真空冷冻干燥得到固定化酶,置于-20℃保存备用。

1.3.3 固定化碱酶酶活力测定和固定化酶催化特性

取固定化酶20mg,加入1mL pH10的硼砂-氢氧化钠缓冲液,其余步骤按照SB/T 10317—1999《蛋白酶活力测定法》测定碱性蛋白酶酶活力。

固定化酶的最适温度测定:取20mg固定化酶分别置于30、40、50、60、70、80℃水浴中按上述方法测定其活力大小。

固定化酶的最适pH值测定:取20mg固定化酶分别置于pH值为8、9、10、11、12的缓冲液中,其余方法同上。

反复使用固定化酶水解酪蛋白5次,反应完成后用磁铁将固定化酶回收,洗涤干燥。按照1.3.3节测得其剩余酶活力。

1.3.4 米氏常数的测定

配制不同质量浓度的酪氨酸溶液0.0625~1g/100mL,绘制酪氨酸标准曲线,标准方程为 $y=0.0087x+0.0115$ ($R^2=0.9992$)。

分别取20mg固定化酶和1mL游离酶稀释液在一定的

温度和pH值条件下反应2min,测定固定化酶和游离酶的 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 值,根据酪氨酸标准曲线计算生成物的质量,算出酶反应的初速率,然后以底物浓度和反应速率的双倒数作图,求出米氏常数(K_m)。

1.3.5 粒子的表征

1.3.5.1 粒子大小和品貌

利用透射电子显微镜观察粒子的大小和外部形态,将粉末样品先在乙醇溶液中稀释,并用超声波分散30min,再将分散好的液体滴在铜网上,放入真空干燥箱中干燥48h后待试。

1.3.5.2 粒子晶体结构

利用X射线衍射测试粒子的晶体结构,测试采用铜靶,射线波长为0.154nm,扫描角度范围为10°~90°,扫描速率为5°/min,步距为0.02°,管电压为40kV,管电流为30mA。

1.3.5.3 粒子基团

利用FTIR傅里叶变换红外光谱仪测定粒子基团,取少量试样,加入KBr做稀释剂,在玛瑙研钵里研磨至粒子细小而均匀,压片成型,分辨率设置为 4cm^{-1} ,扫描次数40次。

1.3.5.4 粒子磁性性能

利用振动样品磁强计通过磁滞回线测定粒子的磁性性能,300K条件下记录干燥后的 Fe_3O_4 样品的磁滞回线,并得出样品的磁化强度和矫顽力,在施加的磁场强度为-7000~7000Oe。

2 结果与分析

2.1 固定化酶的酶活力

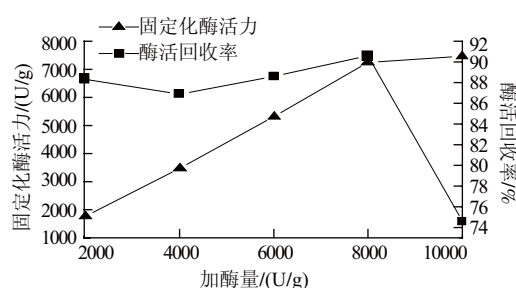


图1 固定化酶酶活力和酶活回收率

Fig.1 Effect of enzyme-to-carrier ratio on the activity and activity recovery of immobilized alkaline protease

由图1可知,加酶量在2000~8000U/g的情况下,固定化酶活力逐渐增加,酶活回收率同时呈上升趋势。加酶量为8000U/g时,固定化酶活力达到最大为7248U/g,同时酶活回收率也达到最大为90.6%。当加酶量大于8000U/g时酶活力增加不明显,原因是底物微球与酶结合的位点是有限的,逐渐达到饱和后,游离酶不能再被固定,所以固定化酶酶活力不再增加,同时酶活回收率下降。

2.2 固定化酶的最适温度

由图2可知,固定化酶的最适温度为50℃,而游离

酶的最适温度为60℃, 相对于游离酶固定化酶的最适温度明显降低, 这可能是由于酶的活性中心在交联后部分活化, 降低了反应所需要的活化能。另外, 固定化酶的最适温度曲线在60~80℃时也较游离酶相对平缓, 在80℃游离酶相对酶活力为10.85%, 而固定化酶的为36.47%, 可见载体对酶有一定的热保护能力。

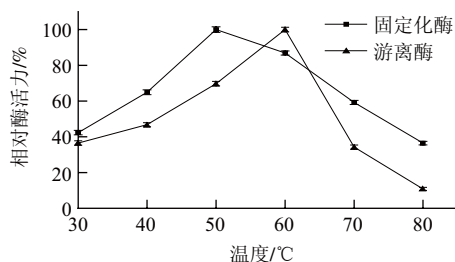


图2 游离酶和固定化酶的最适温度

Fig.2 Determination of optimal reaction temperature for free and immobilized alkaline protease

2.3 固定化酶的最适pH值

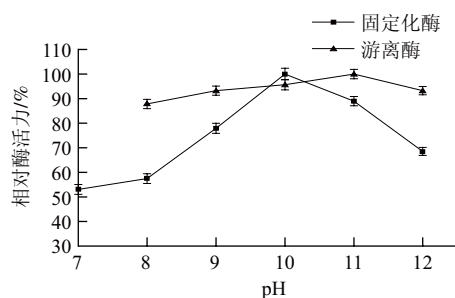


图3 游离酶和固定化酶的最适pH值

Fig.3 Determination of optimal reaction pH for free and immobilized alkaline protease

由图3可知, 游离酶的最适pH值为10, 而固定化酶的最适pH值为11, 碱性蛋白酶经固定化后最适pH值向碱性方向移动, 其可能原因是载体需要在更强的碱性环境下对酶的活性中心构想产生一定影响。此外, 固定化酶的最适pH值曲线较游离酶平滑, 可以说明在水解过程中对其pH值影响不是很显著, 并且载体对酶有一定的过碱保护能力。

2.4 固定化酶的米氏常数

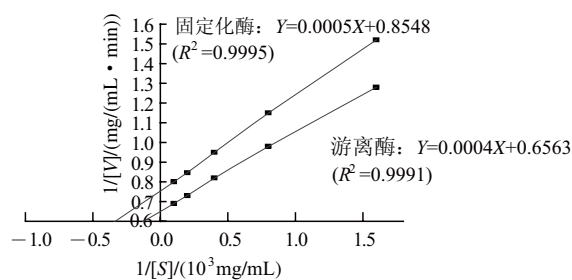


图4 游离酶和固定化酶的米氏常数

Fig.4 Lineweaver-Burk plots for free and immobilized alkaline protease

由图4可知, 分别作出游离酶和固定化酶的Lineweaver-

Burk的双倒数曲线, 固定化酶的 K_m 为 5.85×10^{-4} mg/mL, 游离酶的 K_m 为 6.06×10^{-4} mg/mL。碱性蛋白酶经固定化后 K_m 值降低, 说明固定化酶较游离酶对底物的亲和力大。其可能的原因是, 载体活化酶某部分的空间构象, 使酶与底物接触的阻碍减小, 进而增大了酶对底物的亲和力^[11-12]。

2.5 固定化酶的操作稳定性

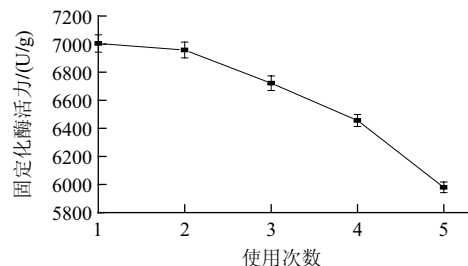


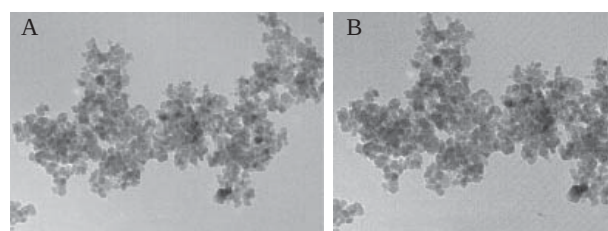
图5 固定化酶的操作稳定性

Fig.5 Repeated usability of immobilized alkaline protease

由图5可知, 使用5次后固定化酶活力分别为7004、6958、6721、6456、5980 U/g。固定化酶使用5次后酶活力依然为初始的82.5%, 说明固定化酶具有良好的操作稳定性。

2.6 粒子的表征

2.6.1 透射电子显微镜(TEM)



A. Fe_3O_4 微球; B. 磁性壳聚糖微球。

图6 Fe_3O_4 和磁性壳聚糖微球的TEM图($\times 200000$)

Fig.6 TEM micrographs of Fe_3O_4 and magnetic chitosan microspheres($\times 200000$)

由图6可知, 粒子大小在10~20nm之间, 平均大小在15nm左右。磁性壳聚糖微球中的粒子略大于 Fe_3O_4 中的粒子, 形貌基本为球状, 有轻微的团聚现象, 这是因为这些颗粒本身带有较强的磁性, 增强了分子间作用力而聚集在一起。

2.6.2 X射线衍射物相分析

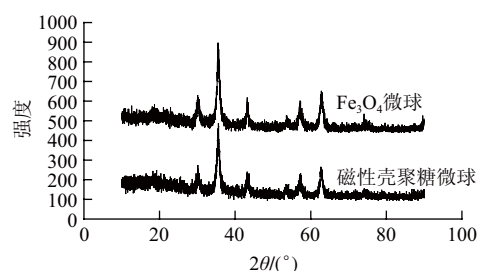


图7 Fe_3O_4 和磁性壳聚糖微球的X射线衍射图谱

Fig.7 XRD patterns of Fe_3O_4 and magnetic chitosan microspheres

由图7可知, Fe_3O_4 主要衍射峰分布在 $2\theta=30.073^\circ$ 、 35.649° 、 43.212° 、 53.577° 、 57.299° 、 62.847° , 磁性壳聚糖微球主要衍射峰分布在 $2\theta=30.390^\circ$ 、 35.649° 、 43.571° 、 53.831° 、 57.468° 、 62.987° , 特征峰分别对应反尖晶石型面心立方相 Fe_3O_4 的(220)、(311)、(400)、(422)、(511)、(440), 晶面位置与标准 Fe_3O_4 的特征衍射峰一一对应, 说明磁性壳聚糖微球固定化酶对晶型没有影响。Debye-Scherrer公式:

$$D_{hkl}=k\lambda/\beta\cos(2\theta/2)_{hkl}$$

式中: D_{hkl} 是垂直于晶向方向上晶粒的粒度; k 是常数; λ 为X射线波长/nm; β 是晶面衍射峰的半高宽/mm; θ 是晶面的Bragg衍射角/°。

根据此公式可以算出 Fe_3O_4 微球、磁性壳聚糖微球的平均粒径为16.53、22.04nm, 说明磁性壳聚糖微球固定化酶对粒径的大小有一定影响, 这是因为壳聚糖在粒子表面发生了交联作用, 增大了粒子的粒径^[13-14], 这与透射电子显微镜的结果相符合。

2.6.3 红外光谱分析

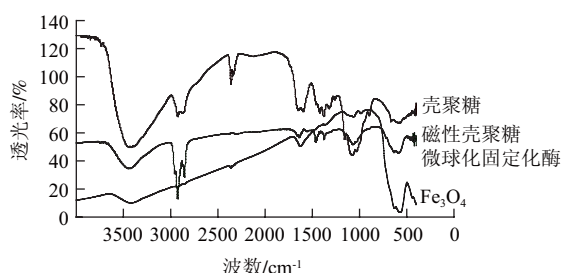


图8 Fe_3O_4 、壳聚糖、磁性微球的红外图谱

Fig.8 FT-IR spectra of Fe_3O_4 and magnetic chitosan microspheres

由图8可知, Fe_3O_4 谱线中具有明显的 Fe_3O_4 的特征峰 565.64 、 3417.52cm^{-1} , 是—OH的伸缩振动峰。壳聚糖谱线中 2922.87 、 2872.29cm^{-1} 是脂肪族C—H振动峰, 1599.98 、 1651.99cm^{-1} 是N—H、N—C的伸缩振动峰, 1378.56cm^{-1} 是 CH_3 的C—H变形振动峰, 这是因为壳聚糖没有完全去乙酰基所致^[15-16], 1077.90 、 1032.63cm^{-1} 是伯醇和仲醇的C—O振动峰, 896.77cm^{-1} 是D-吡喃糖的特征峰。磁性壳聚糖微球谱线中除了具有壳聚糖谱线中的特征峰外, 在 2942.22 、 2584.16cm^{-1} 处不但C—H峰值增大, 还发生了偏移, 壳聚糖谱线不但有 Fe_3O_4 谱线中具有明显的 Fe_3O_4 的特征峰, 说明 Fe_3O_4 与壳聚糖发生了吸附作用, 此外还在 1641.42cm^{-1} 处出现了明显的Schiff碱的特征吸收峰, 是由C=N基团的伸展造成的, 说明戊二醛与— NH_2 发生了反应。壳聚糖谱线中 1077.90cm^{-1} 处的C—OH在形成复合物后偏移到了磁性微球谱线中的 1067.46cm^{-1} , 说明壳聚糖中—OH参与了与Fe的配位, 可以说明包裹是成功的^[17]。

2.6.4 磁响应分析(VSM)

由图9可知, Fe_3O_4 的饱和磁强度为 33.8274emu/g , 磁性壳聚糖微球固定化酶的饱和磁强度为 24.0095emu/g 。磁性壳聚糖微球固定化酶和 Fe_3O_4 相比有所下降, 这是因为首先饱和磁强度与物质的含量有关, 随着壳聚糖的加入 Fe_3O_4 的含量减少, 导致饱和磁强度下降^[18]; 其次包裹在 Fe_3O_4 表面的

壳聚糖阻碍了磁场对粒子的取向作用导致饱和磁强度下降。

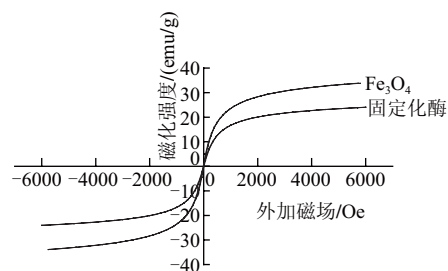


图9 Fe_3O_4 、磁性微球固定化酶的VSM图谱

Fig.9 VSM curves of Fe_3O_4 and magnetic chitosan microspheres

3 结论

磁性纳米壳聚糖微球其具有良好的球形外貌, 大小约为15nm, 固定化后粒子大小约为20nm; 固定前后有一定变化, 可能的原因是耦合作用增大了粒径。红外光谱分析证实 Fe_3O_4 已被壳聚糖包裹; 固定化酶前后粒子晶形完整, 均具有良好的磁响应能力和超顺磁性。固定化酶与游离酶相比, 最适温度从 60°C 下降到 50°C 、最适pH值从10升至11; 固定化酶的 K_m 为 $5.85 \times 10^{-4}\text{mg/mL}$, 游离酶的 K_m 为 $6.06 \times 10^{-4}\text{mg/mL}$ 。

参考文献:

- [1] 林敏刚. 碱性蛋白酶在水解制取蛋白中的应用[J]. 中国油脂, 2009, 34(12): 30-33.
- [2] 杨柳, 江连洲, 李杨, 等. 蛋白酶对水酶法提取大豆油脂及蛋白质的影响研究[J]. 食品工业科技, 2009(10): 240-243.
- [3] 陈冬梅, 陈明星, 衣海龙, 等. 碱性蛋白酶水解玉米蛋白粉的研究[J]. 农产品加工, 2011(4): 70-72.
- [4] 赵丛丛, 曾里, 宋娜, 等. 碱性蛋白酶提取大米水解蛋白的研究[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(1): 85-88.
- [5] 刘建龙, 王瑞明, 刘建军, 等. 酶的固定化技术研究进展[J]. 中国酿造, 2005(9): 4-6.
- [5] 袁定重, 张秋禹, 侯振宇, 等. 固定化酶载体材料的最新研究进展[J]. 材料导报, 2006, 20(1): 69-72.
- [6] 杨晋青, 叶盛权, 郭祀远, 等. 磁性壳聚糖微球的制备及其应用[J]. 现代食品科技, 2008, 24(10): 1079-1082.
- [7] 刘静娜, 黄印强, 钱鑫. 壳聚糖的制备及其对脂肪酶的固定化研究[J]. 中国酿造, 2010(8): 109-112.
- [8] 郭伟利, 侯红萍. 磁性壳聚糖微球固定化糖化酶研究[J]. 酿酒科技, 2010, 189(3): 17-19.
- [9] XIE Wenlei, MA Ning. Immobilized lipase on Fe_3O_4 nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production[J]. Energy Fuels, 2009, 23(3): 1347-1353.
- [10] 费颖. 磁性壳聚糖微球固定化乳糖酶及其在乳糖制备中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [11] 张海真. 磁性壳聚糖微球的表面改性表征及吸附行为研究[D]. 武汉: 中南民族大学, 2008.
- [12] WANG Ying. Luminescent CdTe and CdSe semiconductor nanocrystals: preparation, optical properties and applications[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2008, 8(3): 1068-1091.
- [13] 龙胜亚. 磁性壳聚糖微球的制备及其在漆酶固定化中的应用[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2005.
- [14] LIU Xiangqiao, GUAN Yueping, SHEN Rui, et al. Immobilization of lipase onto micron size magnetic beads[J]. J Chromatogr B, 2005, 822(1/2): 91-97.
- [15] 李桂银. 磁性纳米壳聚糖微球的制备及其固定化酵母细胞的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [16] WEI Yang, PETERS J I, WILLIAMS R O. Inhaled nanoparticles: a current review[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 356(1/2): 239-247.
- [17] 谢玮玮. 磁性壳聚糖复合材料的制备及性能研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- [18] CORR S A, RAKOVICH Y P, GUNKO Y K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications[J]. Nanoscale Research Letters, 2008, 3(3): 87-104.