

漆酶固定化及其性质研究*

詹东风 杜予民 钱保功

(武汉大学资源开发与应用技术研究所)

摘要 本文介绍了用过渡金属水合氧化物固定化漆酶的方法. 考察了螯合法固定漆酶的最适条件. 对固定化前后漆酶的性质进行了比较, 并分析了造成固定化酶与游离酶性质差异的原因.

关键词 漆酶 过渡金属水合氧化物 固定化酶

漆酶的固定化大部分以真菌漆酶为对象^[1~5], 漆酶漆酶的固定化并不多见. 我们设想以过渡金属水合氧化物为载体对漆酶进行固定化, 使酶与载体的结合点主要集中在漆酶糖蛋白的含糖部分. 从而减少漆酶失活的可能性. 本文着重介绍过渡金属水合氧化物固定化漆酶的制备方法, 并对固定化前后漆酶的性质进行比较.

材料与方 法

1 材 料

漆酶: 根据 Reinhammar 的方法^[6], 从湖北利川毛坝漆中分离得到电泳纯漆酶, 并对其物理化学参数进行了测定(表 1)^[7].

表 1 漆酶理化参数^a

分子量	等电点	λ_{\max} (nm)	A_{280}/A_{616}	A_{280}/A_{250}	比活力 ^b (unit/g)
110 000	7.7	280, 616	15.6	2.1	2.8×10^4

a. A_{280} 、 A_{616} 和 A_{250} 分别表示样品在 280nm、616nm 和 250nm 处的吸光度;

b. 酶比活力单位为: 30℃时, 1g 漆酶加入 3mL 1.35×10^{-3} mol/L 对苯二胺底物溶液(用 0.1mol/L pH 7.5 的磷酸氢二钠/磷酸二氢钾缓冲溶液配制)中, 单位时间内催化反应使产物在 336nm 处吸光度发生的变化值.

对苯二胺: 化学纯, 用前经升华纯化. 磷酸盐缓冲液: 用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 配制. 其它试剂均为分析纯. 未经进一步纯化. 漆酶活性及动力学数据用 Shimadzu UV-300 仪测定.

2. 方 法

2.1 固定化漆酶的制备^[8] 以过渡金属氯化物(TiCl_4 、 ZrCl_4 、 FeCl_3 、 CuCl_2 、 ZnCl_2)为原料, 用 1mol/L 的盐酸配制成 0.65 mol/L 的溶液, 搅拌下用 2 mol/L 的氨水溶液中和至 pH 7.0. 随着氨水的加入体系中形成水合氧化物沉淀, 搅拌使之均匀悬浮. 冰水浴下慢慢滴加漆酶水溶液(10 mg/mL, 一般载体与酶量之比(W/W)控制在 100~200 为宜), 搅拌反应 2h 后滤去母液. 固定化酶分别用 0.5mol/L 的氯化钠溶液和蒸馏水洗至洗出液中无酶可检出为止. 合并反应上清液和洗涤液, 分别测定溶液和固定化酶的活力. 固定化漆酶用 0.1mol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液悬浮保存于冰箱中(5℃).

收稿日期: 1988-06-21. 联系人: 詹东风.

* 国家自然科学基金资助课题.

2.2 漆酶活性的测定 在 30℃下,于 1 cm 的检测池和参比池中分别加入 3mL 1.35×10^{-3} mol/L 对苯二胺溶液(用 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液配制).取 20 μ L 酶液(含 1.6 μ g 漆酶)加入检测池中,混均后 0.5 min,记录 336nm 处吸光度的变化.固定化漆酶测定与游离酶相同,每次测定时在检测池中加固定化酶悬浮液 100 μ L,同时在参比池中加入等量的热失活固定化酶(100℃下处理 30 min),记录 336 nm 处吸光度的变化.取等量的固定化酶悬浮液于称量瓶中 100℃下衡重,然后计算固定化酶的比活力.

2.3 固定化酶重复使用试验 取 6.5×10^{-2} 活力单位的水合氧化锆固定化漆酶于 10mL 的离心管中,加 1.35×10^{-3} mol/L 对苯二胺底物溶液(用 0.1 mol/L pH7.5 的磷酸盐缓冲液配制)8mL,充分混合后于 30℃水浴中恒温反应 25min(间隙搅动).离心分出反应液(5180 \times g, 10min),以未加酶的底物溶液(同样保温)为参比,测定反应液在 336nm 处的吸光度.重复以上操作观察固定化酶活性的变化.

结果与讨论

1 不同过渡金属对漆酶的固定化效果

过渡金属水合氧化物具有螯合蛋白质的能力,从而被成功地用作固定化酶的载体^[9].以锆为例,当 $ZrCl_4$ 溶于水时得到: $[Zr(H_2O)_8]^{4+}$ 、 $[Zr(H_2O)_7(OH)]^{3+}$ 、 $[Zr(H_2O)_6(OH)_2]^{2+}$ 和 $[Zr_2(H_2O)_{16}(OH)_8]^{8+}$.过渡金属上的配基(如 H_2O 、 OH 等)可以被新的配基所取代.多糖羟基以及蛋白质中游离的羟基、氨基、羧基、巯基团等都是过渡金属的有效配基.

漆酶是一种含糖量高达 45% 的糖蛋白.用过渡金属氧化物固定化漆酶,除通常的吸附力外,螯合对酶的固定化起着重要作用.在漆酶与过渡金属摩尔比一定(1:170000)时,考察不同过渡金属水合氧化物对漆酶的螯合效果(表 2).实验发现,以 $Ti(IV)$ 、 $Zr(IV)$ 、 $Fe(III)$ 的水合氧化物为载体,固定化效果较好,活力回收在 40% 以上.本方法能保持固定化酶具有良好的活力,这可能与固定化位点主要集中在酶的含糖部分,从而减少了漆酶活性中心参与固定化的可能性有关.从表 2 看,除 $Fe(III)$ 外,其它固定化酶活力回收与母液残留活力之和均不足 100%.其原因可能有以下几个方面:(1)漆酶活性中心参与了螯合反应;(2)固定化改变了酶分子的空间构型,上述两种情况都会导致漆酶活性的丧失;(3)漆酶分子被包埋在载体内部,阻碍了底物分子与酶的结合,表观上反映为固定化酶活力下降.类似情况在文献中也已见到^[10].

2 固定化条件对酶活的影响

改变固定化反应条件对固定化酶的活性影响很大.以水合氧化锆固定化漆酶为例,水合氧化锆的起始沉淀 pH 为 4, pH 为 9 时达到平衡^[9].不同 pH 条件下酶的空间构型不同,与载体的螯合力也有差异. pH 7.5~8 固定化酶的活力回收较好(图 1).比较不同温度下所得固定化酶发现(图 1)5~10℃时效果最佳,升高温度,固定化酶活力下降.在 pH 7.0 和 5℃时,以不同偶联时间取样分析母液中酶活力的残留量,发现 2 h 后上清液中残留的酶活力已降至 5% 以下,进一步延长固定化时间,偶联情况变化不大(图 2).文献[8]也表明 2 h 左右固定化酶活力最高,延长时间由于搅拌引起的摩擦和剪切力,使得固定化酶活力略有降低.

表 2 不同过渡金属水合氧化物对漆酶的固定化

过渡金属	母液残留活力 ^a (%)	固定化酶活力回收 ^b (%)
Ti(IV)	0	48.7
Zr(IV)	0	50.0
Fe(III)	60.0	40.0
Cu(II)	15.6	20.0
Zn(II)	0	4.0
V(V) ^c	0	7.5

a. (反应后母液残留活力/加入总活力) \times 100;

b. (固定化酶活力/加入总活力) \times 100;

c. 直接以 V_2O_5 为固定化载体.

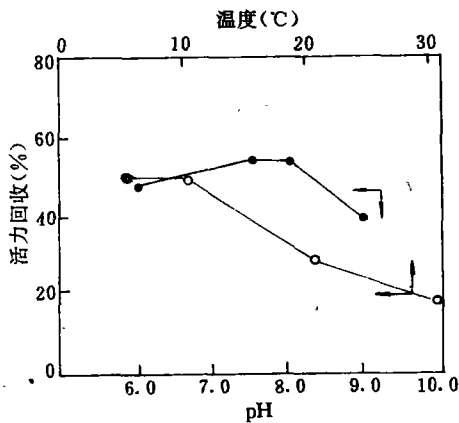


图1 水合氧化锆固定化漆酶活力回收
随偶联 pH 和温度的变化

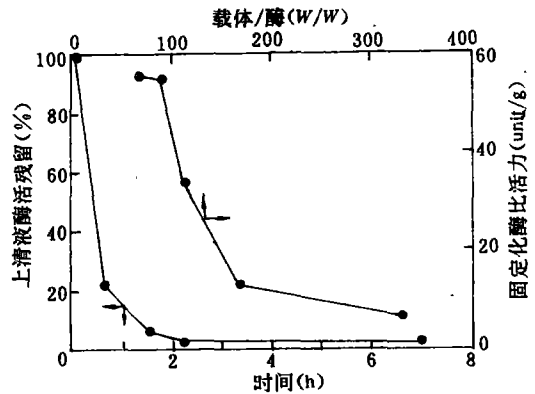


图2 水合氧化锆固定化漆酶上清液酶残留随时间的变化及载体/酶之比对固定化酶活性的影响

固定化时加入酶量与载体的比例一般根据需要而定. 水合氧化锆固定化酶的比活力随载体/酶之比降低而增大(图2), 当载体/酶比低于90后, 固定化酶比活力的增加减慢.

3 固定化前后漆酶性质的异同

3.1 最适 pH 漆酶与载体偶联后微环境发生了变化. 在 0.1 mol/L 不同 pH 的磷酸盐缓冲液中以对苯二胺为底物 (1.35×10^{-3} mol/L), 测定固定化前后漆酶的最适 pH. 结果表明水合氧化锆固定化漆酶比游离酶具有更宽的 pH 适用范围, 最适 pH 略向酸性位移(图3).

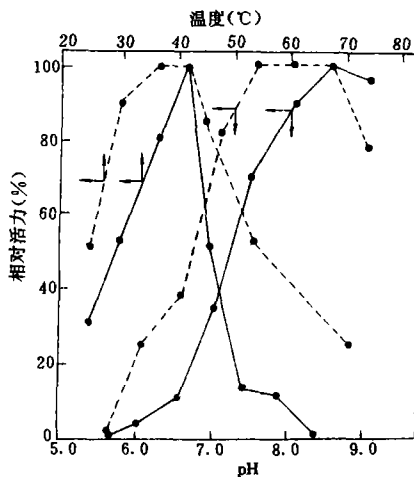


图3 固定化前后漆酶最适 pH 和最适温度的变化
实线: 游离酶, 虚线: 固定化酶(Zr).

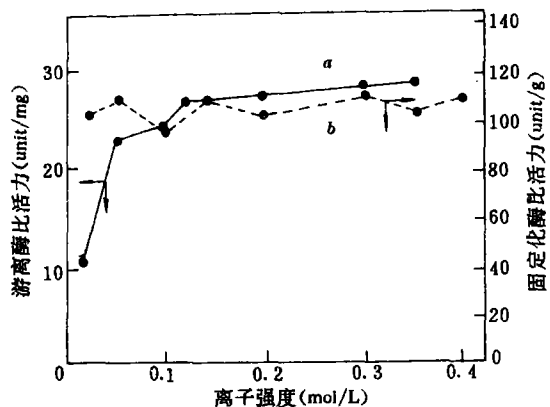


图4 缓冲液离子强度对游离酶和水合氧化锆固定化酶比活力的影响

3.2 最适温度 以对苯二胺为底物 (1.35×10^{-3} mol/L), 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液为介质(最适 pH 下底物的自然氧化很快, 不便测定), 测定不同温度下漆酶与固定化漆酶的活性. 从图3看出, 最适温度以下, 游离酶活性与温度成正比, 温度系数 Q_{10} 等于 1.8, 而水合氧化锆固定化漆酶的 Q_{10} 等于 1.76. 固定化酶对温度的适应范围也变宽.

3.3 缓冲液离子强度对酶活力的影响 保持温度 30°C 和 pH 7.5, 改变缓冲液的离子强度, 缓冲液离子强度的变化对固定化酶活性影响不大(图4).

3.4 固定化前后 K_m 值的变化 K_m 是当酶反应速度达到最大反应速度一半时底物的浓度,是酶的特征常数之一,它只与酶的性质有关,而与酶的浓度无关。 $1/K_m$ 可近似地表示酶与底物的亲和力, $1/K_m$ 愈大,亲和力愈大^[11]。30℃下,在 0.1mol/L pH7.5 的磷酸盐缓冲液中,以对苯二胺为底物,分别测定粗漆酶(丙酮粉末水溶液)和纯漆酶固定化前后的 K_m 值(表 3)。

经水合氧化锆固定后,粗漆酶和纯漆酶的 K_m 值分别增大到固定化前的 1.8 和 1.4 倍。

这是因为固定化之后酶所处的微环境发生了变化,同时底物和产物在反应区的扩散也与固定

化前不同。但比一般的固定化酶, K_m 值的变化并不算大^[5],说明底物与酶的相互作用并未因为酶的固定化而反主很大变化。

3.5 游离酶和固定化酶的耐热性 50℃下游离酶和水合氧化锆固定化酶的半衰期分别为 1.2 h 和 8.3 h。固定化使酶的热稳定性明显提高。

3.6 游离酶与固定化酶的储藏稳定性 将游离酶和水合氧化锆固定化酶用 0.1mol/L pH6.5 的磷酸盐缓冲液浸泡,于冰箱中保存(5℃),6 个月后测得游离酶活力损失 100%,而固定化酶活力损失为 20%。以对苯二胺为底物(1.35×10^{-3} mol/L),在 pH7.5 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中,水合氧化锆固定化酶重复使用 11 次后活力损失 30%。

参 考 文 献

- 1 Froehner S C *et al.* Acta Chemica Scandinavica B29,1975,6,691
- 2 Yaropolov A I *et al.* Zhurnal Analiticheskoi Khimii,1983,38,503
- 3 高阪彰等.日本公开特许公报,昭 59-156300,1984
- 4 和佐保等.日本化学会志,1984,9,1398
- 5 Shuttleworth K L *et al.* Enzyme Microb Technol,1985,8,171
- 6 Reinhammar B. Biochim Biophys Acta,1970,205,35
- 7 詹东风.武汉大学博士学位论文,1988,23
- 8 Kennedy J F *et al.* J Chem Soc Perkin 1, 1976,9,962
- 9 Kennedy J F. Chem Soc Rev, 1979,8,221
- 10 袁中一等.生物化学与生物物理学报,1981,13(3),291
- 11 沈 同等编著.生物化学.北京:人民教育出版社,1980,235

Study of Immobilized Laccase and Its Properties

Zhan Dongfeng, Du Yumin, Qian Baogong

(Institute of Resource Development and Applied Science, Wuhan University, Wuhan)

Abstract A method of *Rhus vernicifera* laccase immobilized by using hydrous transition metal oxides is introduced and a possible model of hydroxyl groups of polysaccharide, which is a part of the enzyme, complexed with transition metal ions is given. The optimal condition of immobilization of laccase by chelating method is investigated. The properties of the free laccase and the immobilized laccase are compared and the possible reasons for the differences of them are discussed.

Keywords Laccase, Hydrous transition metal oxide, Immobilized enzyme

(责任编辑:李桂英)