

微胶囊化提高生物传感器中固定化鸡肝酶操作稳定性的研究

郑艺华, 王芳芳, 徐 斐, 许学勤, 华泽钊
(上海理工大学食品科学与工程研究所, 上海 200093)

摘 要: 离子交换吸附固定化酶方法, 简单、便宜, 但稳定性较差。为了提高采用离子交换树脂固定化酶生物传感器的操作稳定性, 在保证较小酶活损失的前提下, 利用海藻酸盐对固定化鸡肝酶进行微胶囊化, 研究了不同浓度海藻酸钠和氯化钙溶液等条件对酶活保留率的影响。在生物传感器实际操作条件下, 对微胶囊化前后的固定化酶活保留率进行了比较。结果表明, 使用质量比0.2%的海藻酸钠和0.1mol/L的氯化钙溶液进行微胶囊化并静置30min时, 操作稳定性得到了明显的提高, 同时固定化酶活力损失较少。另外, 采用在Tris缓冲液中加入0.025mol/L钙离子的方式对防止胶囊的破坏进行了尝试, 这进一步提高了稳定性。

关键词: 操作稳定性; 固定化酶; 微胶囊化; 离子交换吸附法

Study on Biosensor Encapsulation for Improving the Operational Stability of Immobilized Chicken Liver-esterase

ZHENG Yi-hua, WANG Fang-fang, XU Fei, XU Xue-qin, HUA Ze-zhao
(Institute of Food Science and Engineering, Shanghai University of Science and Technology,
Shanghai 200093, China)

Abstract: Immobilizing enzyme by ion exchange adsorption is easy and inexpensive, but its stability is poor. For improving operational stability of immobilized enzyme by biosensor encapsulation resin the chicken liver-esterase was encapsulated by alginate. Influences on activity rate of enzyme in different SA (Sodium alginate) concentrations, CaCl_2 (calcium chloride) concentration and other operational conditions have been investigated. Activity rate of immobilized enzyme was compared with the entrapped calcium alginate under real condition. The results showed that the operational stability was obviously enhanced in 0.2% SA, 0.1mol/L CaCl_2 and 30 minutes standing. Moreover, attempt of adding 0.025mol/L Ca^{2+} into Tris buffer would also improve the stability of alginate gel.

Key words: operational stability; immobilized enzyme; encapsulating; ion exchange adsorption

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)04-0032-05

当前, 各地正加大对食品中农药残留的检测和监督
管理, 开发快速检测农药残留的方法和仪器具有十分重要
的现实意义^[1,2]。酶抑制法是常用的农药残留检测方法。
由于纯酶不够稳定且价格昂贵, 其应用受到了限制。固
定化酶^[3,4]提供了酶应用的新途径, 促进了酶在生物传感器
中的应用。固定化酶生物传感器在农药残留的快速检测中
具有较大的应用潜力^[5,6]。农药对酶的抑制是不可逆的,

因此无论从成本还是操作上来说, 用于农药检测的固定化
酶不必重复使用, 要求固定化方法成本低廉, 对酶固定
化的一个重要的考虑是为了获得稳定的反应效果。

离子交换吸附固定化酶方法^[4]具有操作简单, 成本
低, 反应条件温和等特点, 符合农药检测用固定化酶
的要求, 但使用离子交换吸附法固定的酶结合力相对较
弱, 酶易脱落。在使用中遇到的一个难题是如何提高

收稿日期: 2004-04-06

基金项目 国家自然科学基金资助项目(50176032); 上海市科技兴农重点攻关项目(2001 II-4);

上海市教委青年基金项目(02Q021); 上海市科委启明星计划资助项目(02QF14030)

作者简介: 郑艺华(1973-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事食品安全检测的研究。

其操作稳定性。微胶囊化^[7]是提高稳定性的常用方法,通过微胶囊包埋可以保护芯材料免受外界影响,并且微胶囊的壳膜能够容许小分子底物和产物自由出入膜内外。海藻酸钙凝胶包埋法^[8]具有条件温和、使用方便、价格低廉、对酶损害小等优点,并且凝胶强度能够通过调节海藻酸盐的浓度被控制。

在参阅相关文献^[9~12]的基础上,本文使用微胶囊化方法,利用海藻酸盐将固定化酶的树脂包埋在凝胶结构中,寻求不同处理条件的影响。在较少的酶活力损失条件下,通过微胶囊化处理来提高固定化鸡肝酶在生物传感器中的操作稳定性,为研制快速检测农药残留量的生物传感器所作的应用化研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

量热式生物传感器(自制); 722S分光光度计 上海分析仪器厂; 90-1型离心机 北京通用离心机厂; XW-80A旋涡混合器 上海医科大学仪器厂; SHZ-88 台式水浴恒温振荡器 江苏太仓实验设备厂; 95-1磁力搅拌器 上海司东仪器厂; DS-1型组织捣碎机 上海标本模型厂。

新鲜鸡肝 上海市大江食品公司; D113树脂 上海亚东核树脂公司; 海藻酸钠(SA); 氯化钙; Tris; 乙酸; 乙酸- α -萘酯; 丙酮; 固兰B盐; 柠檬酸钠; 柠檬酸(均为国产分析纯)去离子为二次蒸馏水。

1.2 制备方法

1.2.1 固定化鸡肝酶制备

对D113树脂进行处理。用自来水浸泡树脂并静置数小时,然后去除悬浮颗粒。利用0.5mol/L HCl和0.5mol/L NaOH分别对树脂进行酸碱处理。最后用去离子水洗涤树脂至中性,浸放在去离子水中待用。

鸡肝酶的提取。用组织捣碎机将新鲜鸡肝与0.025mol/L, pH6.4的柠檬酸缓冲溶液的混合物打成匀浆。所得匀浆以5000r/min的转速离心10min,然后取上清液,贮于-18℃冻藏备用。

采用离子交换吸附法制备固定化酶。将处理后的D113树脂与鸡肝酶液混合,利用磁力搅拌器,通过搅拌对酶进行固定。数小时后倒掉酶液,用去离子水洗涤,至检不出酶活为止,浸放在去离子水中备用。

1.2.2 微胶囊化方法

配制一定浓度的海藻酸钠溶液,利用磁力搅拌器进行搅拌,使其均质。将固定化酶缓慢放入不断搅拌的海藻酸钠溶液中,待混合均匀后,使用移液枪取出固定化酶。利用离心机离心1min,然后立即放入不断搅拌的氯化钙溶液中,均匀混合后,移出固定化酶,使用去离子水洗涤数遍,浸放在去离子水中,备用。

1.3 测定方法

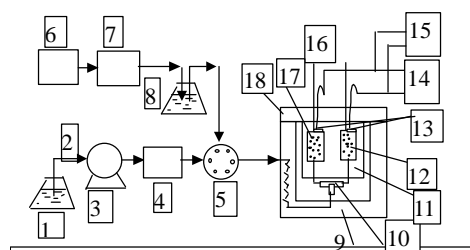
1.3.1 固定化酶活力的测定

对固定化酶进行离心脱水(转速:4000r/min,时间5min)。称取约0.25g的固定化酶,并加入盛有20ml柠檬酸缓冲液(0.025mol/L, pH6.4)的广口试剂瓶中。试剂瓶中加入50 μ l的40mmol/L底物(α -乙酸萘酯),在30℃恒温振荡水浴反应5min。从试剂瓶中各吸出3ml反应液加到三支试管中,同时加入0.5ml显色液(固兰B液),使用旋涡混合器摇均后,在30℃显色5min,取出并转移到干净的比色皿中。使用去离子水作为空白液,在595nm波长处的测量吸光度(OD值),按下式^[13]计算固定化酶的活力。

$$E_s(U/g) = \frac{L \times K \times A}{T \times W} \times 10^{-3} \quad (1)$$

式中, E_s —固定化酶活力, U/g; L —反应液的体积, ml; T —显色时间, min; W —固定化酶质量, g; K — α -萘酚标准曲线的斜率, 10^{-6} mol/L \cdot OD(在pH=6.4时, $K=32 \times 10^{-6}$ mol/L \cdot OD); A —反应液的吸光度, OD; U —国际酶活单位, 10^{-6} mol/min。

1.3.2 流出曲线的测定



1、缓冲液容器2、导管3、蠕动泵4、脉冲阻尼器5、六通阀6、样品前处理器7、过滤器8、样液容器9、恒温器外胆10、三通管11、恒温器内胆12、参考酶柱13、温差热电偶14、信号监控处理及显示单元15、微机16、排液管17、样品酶柱18、恒温器盖。

图1 量热式生物传感器工作原理示意图

Fig.1 Scheme of thermal biosensor

利用图1所示的量热式生物传感器^[14,15],使用0.025mol/L, pH6.4的柠檬酸缓冲液,流过酶柱的流量为1.4ml/min,通过半导体恒温器来设定不同温度,用试管收集固定化酶柱后的流出液2min,作为测试液,等待3min后继续用试管收集流出液2min,依次进行。即,每5min收集一个2.8ml的流出液作为样品。

在装有流出液的试管中加入50 μ l的40mmol/L底物(α -乙酸萘酯),在30℃恒温反应5min。再加入0.5ml显色液(固兰B液),摇均后在30℃保温5min。取出并转移到干净的比色皿中,使用去离子水作为空白液,在595nm波长处测量吸光度(OD值)。

1.4 处理方法

1.4.1 酶活保留率

为了对固定化酶的处理损失进行量化和比较, 定义酶活保留率为

$$f(\%) = \frac{E_2}{E_1} \times 100 \quad (2)$$

式中, E_1 —酶活保留率, %; E_1 —处理前固定化酶活力, U/g; E_2 —处理后固定化酶活力, U/g。

1.4.2 微胶囊化处理

依照 1.2.2 方法进行。根据 1.3.1 方法, 分别测定微胶囊化前后的固定化酶活力。酶活保留率按式(2)进行计算。

1.4.3 操作处理

利用图 1 所示量热式生物传感器, 使用 0.025 mol/L、pH 6.4 的柠檬酸缓冲液, 流过酶柱的流量为 1.4 ml/min, 温度设定在 40℃, 冲刷 1 h。根据 1.4.1 方法, 分别测定操作前后的酶活力。酶活保留率按式(2)进行计算。

2 结果与分析

2.1 不同条件下固定化鸡肝酶的流失情况

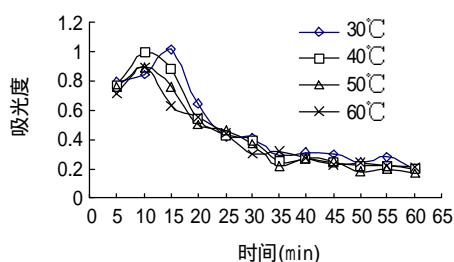


图2 不同温度下的流出曲线

Fig.2 Outflow curves at different temperatures

为了考察固定化鸡肝酶的操作流失情况, 按照 1.3.2 所述方法, 对流出曲线进行了测试。图 2 给出了不同温度时的流出曲线。表 1 列出了操作处理前后的酶活力情况。可以看到, 不同温度条件下流出液的酶活力变化趋势基本一致, 固定化酶产生了较大的活力损失, 1h 后的酶活力保留率仅接近 30%。在前 20 min 内, 流出液的酶活力较高, 表明此时间段内固定化酶的活力大量流失。

表1 不同温度下 1h 操作处理前后酶活力比较

Table 1 Comparison of enzyme activity

温度(℃)	操作前酶活力(U/g)	1h后酶活力(U/g)	酶活力保留率(%)
30	0.43	0.13	29.4
40	0.41	0.11	27.2
50	0.41	0.095	23.4
60	0.35	0.096	27.4

作为生物敏感元件, 固定化鸡肝酶将被应用到检测农药残留的量热式生物传感器(见图 1)中。它测量的是热

信号, 测试前应达到相对的稳定(热平衡)状态, 一般需要十几分钟。这与酶活力流失的实际情况产生了矛盾。需要加强固定化鸡肝酶的抗失活能力, 以保证操作稳定性, 这对提高量热式生物传感器的测试精度和重现性, 均有重要的意义。

2.2 不同条件下固定化鸡肝酶的酶活保留率

2.2.1 不同海藻酸钠浓度的影响

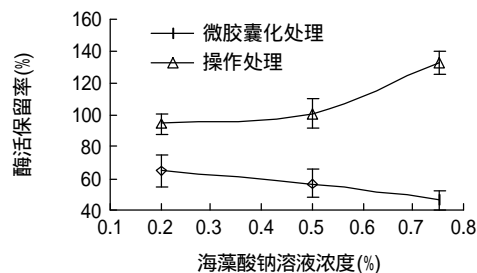


图3 不同海藻酸钠溶液浓度的影响

Fig.3 Influences at different SA concentration

图 3 给出了 0.1 mol/L 氯化钙溶液时, 变化海藻酸钠溶液浓度(质量百分比)得到的结果。可以得到, 海藻酸钠浓度越大, 酶活保留率越低。这是由于微胶囊化后, 酶与底物的反应是通过凝胶网络的孔隙扩散传质来进行的。海藻酸钠浓度越大, 形成的海藻酸钙的网络结构越紧密, 被包埋的固定化酶与底物更加不易相互接触和扩散。

对微胶囊化固定化酶处理后的酶活保留率没有随海藻酸钠浓度的升高保持恒定或降低, 而是增大。并且在较高浓度时, 酶活保留率高于 100%。推测这是由于形成的凝胶被缓冲液冲刷损坏, 而使固定化酶裸露的缘故。在 SA 浓度低时, 凝胶网络较松散, 固定化酶较早地被裸露, 此时, 酶无保护, 在短时间内便产生了流失。海藻酸钠浓度高时, 凝胶网络较紧密, 固定化酶会经历更长的时间后被裸露。完成 1 h 操作时, 无保护的酶没有完全流失, 会出现酶活保留率上升现象。这在图 7 中也得到了体现。

2.2.2 不同氯化钙浓度的影响

海藻酸钠浓度为 0.2% (质量百分比) 时, 不同氯化

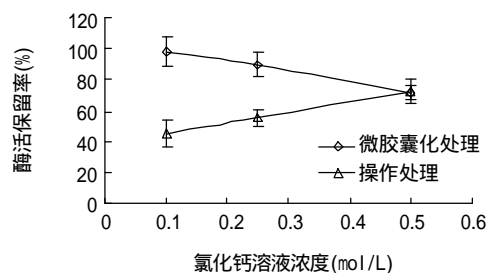


图4 不同氯化钙溶液浓度的影响

Fig.4 Influences at different CaCl₂ concentration

表2 有无微胶囊化的固定化酶活力比较

Table 2 Comparison of enzyme activity with and without encapsulating

	无微胶囊化			微胶囊化		
	固定化酶活力 (U/g)	冲刷后酶活力 (U/g)	冲刷后酶活保留率(%)	微胶囊后酶活力 (U/g)	微胶囊后酶活保留率(%)	冲刷后酶活保留率(%)
30℃	1.15	0.35	30.3	0.97	84.3	0.61
60℃	1.4	0.34	24.3	1.25	89.3	0.77

钙浓度对酶活保留率的影响见图4所示。微胶囊化后,酶活保留率随氯化钙浓度上升而下降。因为随氯化钙浓度升高,溶液中单位体积内所含钙离子数量多,形成的凝胶强度大,阻碍扩散,酶与底物更难接触。冲刷后的酶活保留率随氯化钙浓度上升而增大。可以使用2.2.1中酶活保留率随SA浓度的升高而增大的机理来解释这种现象的发生。

2.2.3 静置时间的影响

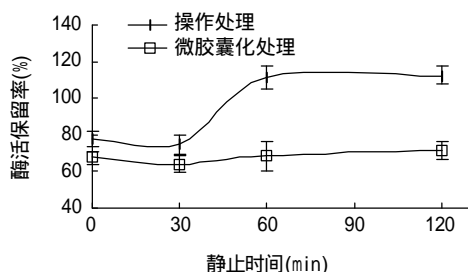


图5 静置时间的影响

Fig.5 Influences at different placement time

采用1.2.2所述方法进行微胶囊化,在氯化钙溶液中混合均匀后,继续在其中分别静置0、30、60、120min,采用0.2% SA和0.1mol/L氯化钙溶液,得到如图5所示曲线。静置时间对微胶囊化后酶活保留率的影响不大,说明海藻酸钙的形成反应在较短时间已完成。在操作冲刷过程后酶活保留率出现上升,出现在30min和60min之间,说明在此时间段内达到了完全的固化。因为静置过程是胶囊固化的过程,时间长则强度大,能够抵抗操作时缓冲液的冲刷作用。

2.2.4 搅拌时间的影响

采用1.2.2所述方法进行微胶囊化,在氯化钙溶液

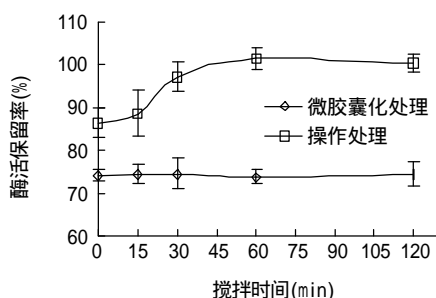


图6 搅拌时间的影响

Fig.6 Influences at different mix time

中混合均匀后,使用磁力搅拌器继续在其中分别搅拌0、15、30、60、120min,采用0.2% SA和0.1mol/L氯化钙溶液,得到如图6图关系。可以看到,这与静止时间和酶活保留率的关系相似。搅拌时间对于固化过程没有显示更大的作用,没有明显的缩短时间。说明静止即可达到固化要求。

2.3 微胶囊化对固定化酶操作稳定性的加强作用

海藻酸钠的浓度影响微胶囊生成凝胶网格的大小,氯化钙溶液浓度影响到胶囊的固化程度,二者浓度的增加均会导致微胶囊化后的酶活损失加大。综合不同作用与影响,采用0.2%海藻酸钠和0.1mol/L氯化钙溶液,静置30min时,对有无微胶囊化的固定化酶进行了比较。结果见表2和图7。从流出曲线,尤其是30min内区域,可明显看到流出液的酶活力小,即流失的酶活力少。说明微胶囊化对提高固定化酶的操作稳定性有明显作用。

2.4 钙离子对操作稳定性的加强作用

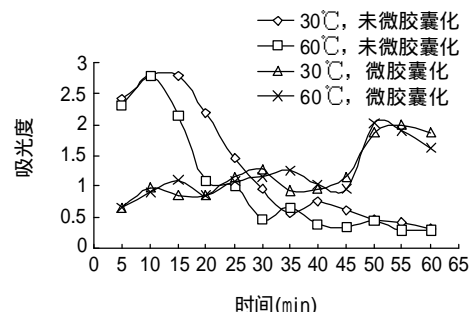


图7 有无微胶囊化条件下的流出曲线

Fig.7 Outflow curves with and without encapsulating

由图7可知,微胶囊化后流出液的酶活出现了跳跃性增长。根据2.2.1中酶活保留率随SA浓度的升高而增大的机理推测,这是由于形成的海藻酸钙凝胶被缓冲液冲刷损坏,而使固定化酶裸露。此时,酶进行扩散和传质的阻碍消失。微胶囊化的结果是对固定化酶进行包埋,但海藻酸钙凝胶会被缓冲液冲刷损坏。根据传质和离子的平衡理论,在缓冲液中加入钙离子期望减缓对海藻酸钙凝胶的破坏,以获得更好的操作稳定性。因钙离子与柠檬酸缓冲液会生成不溶产物,采用在Tris缓冲液加入0.025mol/L的钙离子来进行测试,结果见图8。可以看到,流出曲线变的相对较平缓,没有出现大的跳跃性的变化。即,海藻酸钙凝胶的破坏

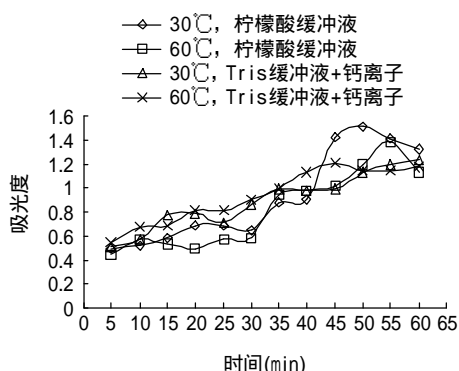


图8 有无钙离子条件下的流出曲线
Fig.8 Outflow curves with and without Ca^{2+}

被抑制, 固定化酶的操作稳定性得到了进一步提高。为了获得应用实践的操作条件, 应对其作进一步的研究。

3 结 论

离子交换法固定化酶结合力较弱, 导致操作的不稳定, 这影响到了基于固定化酶的生物传感器的性能。

本文利用海藻酸钙对固定化鸡肝酶进行包埋, 对不同操作条件下的微胶囊化固定化酶进行了研究。结果表明, 使用 0.2% 海藻酸钠和 0.1mol/L 氯化钙溶液, 静置 30min 时, 固定化酶活力损失较小, 并能明显加强固定化酶的操作稳定性。为进一步提高固定化酶的稳定性, 在缓冲液中加入 0.025mol/L 钙离子, 以防止胶囊的破坏, 得到了相对较满意的结果。

固定化鸡肝酶的微胶囊化处理方法简单, 成本低廉, 实际操作性强。进一步对操作条件进行优化, 并应用到快速检测有机磷农药量热式生物传感器中, 将促进其实用化的进程。

参考文献:

- [1] 林玉锁, 龚瑞忠, 朱忠林. 农药与生态环境保护[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] 华小梅, 江希流. 我国农药环境污染与危害的特点及控制对策[J]. 环境科学研究, 2000, 13(3): 40-43.

- [3] 陈陶声, 等. 固定化酶理论与应用[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987.
- [4] Tischer W, Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers[J]. Trends in Biotechnology, 1999, 17: 326-335.
- [5] Marty JL, Garcia D, Rouillon R. Biosensors: Potential in pesticide detection [J]. Trends in Analytical Chemistry, 1995, 14(7): 329-333.
- [6] Ashok M, Priti M, Wilfred C. Enzyme biosensor for determination of organophosphates [J]. Field Analytical Chemistry and Technology, 1998, 2(6): 363-369.
- [7] 宋健, 陈磊, 李效军. 微胶囊化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [8] Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsrod O. Alginate as immobilization material: 1. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1989, 33: 79-89.
- [9] Appleton A, Gibson TD, Woodward JR. High temperature stabilization of immobilized glucose oxidase: potential applications in biosensors [J]. Sensor and Actuators B, 1997, 43: 65-69.
- [10] Gouda MD, Kumar MA, Thakur MS, et al. Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17: 503-507.
- [11] 杨基础, 等. 海藻糖对固定化酶的保护作用[J]. 化工学报, 2000, 51(2): 193-197.
- [12] Efremenko EN, et al. Addition of polybrene improves stability of organophosphate hydrolase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel carrier [J]. Biochem Biophys Methods, 2002, (51): 195-201.
- [13] Asperen VK, et al. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. J Ins Physiol, 1962, (8): 401-416.
- [14] 华泽钊, 肖建军, 徐斐. 探测农药残留用的量热式生物传感器[P]. 实用新型专利(专利号: 01253887.6), 中华人民共和国国家知识产权局.
- [15] 赵晓磊, 郑艺华, 王芳芳, 等. 酶法测定农药残留的量热系统的初步实验研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 127-130.

信息

日本推出骨太 MBP 系列饮料

日本雪印乳业公司向市场推出配有骨太 MBP 的系列饮料。MBP 是含在牛乳及母乳中的微量成分, 是一种碱性蛋白, 具有增加骨芽细胞数量及提高骨芽细胞胶原的作用, 进而促进骨的形成, 使骨质紧密、结实。MBP 还有调节骨细胞过剩的作用, 从而能抑制钙从骨上流失、抑制骨重量下降。