

壳聚糖固定化超氧化物歧化酶的研究

张春艳, 孟宪军, 宣景宏
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 目的: 研究壳聚糖固定化超氧化物歧化酶的酶学性质。方法: 分别以不同方法对超氧化物歧化酶进行固定并比较其活力, 对固定化方法进行相应的优化, 对固定化超氧化物歧化酶进行酶学性质测定。结果: 以壳聚糖为载体, 戊二醛交联法制备固定化超氧化物歧化酶, 优化条件下制备的固定化酶, 所得固定化酶活力为 330U/g, 酶活回收率为 58.33%, 热稳定性和酸稳定性较游离酶有很大的提高, 且具有良好的贮存稳定性, 固定化酶可实现反复使用, 提高了利用率。结论: 壳聚糖-戊二醛交联法可用于制备性能较优的固定化超氧化物歧化酶。

关键词: 超氧化物歧化酶; 壳聚糖; 固定化酶

Study on Superoxide Dismutase Immobilized with Chitosan

ZHANG Chun-yan, MENG Xian-jun, XUAN Jing-hong
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Objective: To study the enzyme properties of superoxide dismutase immobilized with chitosan. Methods: Immobilized superoxide dismutase were prepared by different processes. The methods were optimized by comparing their activities. Results: Superoxide dismutase on chitosan with glutaraldehyde as crosslinking agent showed the highest activities and recovery rates. The activity of superoxide dismutase powder immobilized under optimum conditions is 330 U/g, with the recovery rate above 58.33%. The temperature stability and the pH stability of the immobilized enzyme are much better than the free enzyme. And the immobilized enzyme also shows a good storage stability. The immobilized enzyme may be applied repeatedly. It can improve utilization rate. Conclusion: The immobilized superoxide dismutase can be prepared by crosslinking glutaraldehyde on chitosan, and it possesses good properties.

Key words superoxide dismutase; chitosan; immobilized enzyme

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0212-04

超氧化物歧化酶是广泛存在于生物体内的金属酶, 可专一清除细胞外液中存在的与一些疾病和发展密切相关的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$), 具有抗炎、抗肿瘤、抗

病毒、防辐射和延缓衰老等作用, 在化妆品、食品和医药等领域有着广泛的应用前景。将其固定化, 不但能保持原有酶活性, 而且稳定性也有所提高, 还兼有

收稿日期: 2006-01-17

作者简介: 张春艳(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事果蔬中生物活性物质的研究。

母细胞的破碎, 在起到同样破碎效果的情况下大大节省了提取酵母基因组的成本; 用酚-氯仿抽提的方法来代替蛋白酶K除去溶液中的蛋白, 同样达到好的除蛋白效果并节省提取酵母基因组的成本。

因此, 可以认为本文提供的方法是一种简单、经济、高效的提取酵母基因组的方法, 能够为酵母研究提供很大的方便。

参考文献:

- [1] HITZEMAN R A, HAGIE F E, LEVINE, et al. Expression of a human gene for interferon in yeast[J]. Nature, 1981, 293: 717-722.
- [2] VALENZUELA P, MEDINA A, RUTTER W J, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast[J]. Nature, 1982, 298: 347-350.
- [3] INNIS M A, HOLLAND M J, MACCABE P C, et al. Expression glycosylation and secretion of an *Aspergillus glucoamylase* by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Science, 1985, 228: 21-26.
- [4] 李晶, 赵晓祥, 沙场清, 等. 甲醇酵母基因表达系统的研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 17-20.

可回收和反复使用等优点,固定化酶可进一步组装为酶传感器。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^[1-3]。壳聚糖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^[4]。且目前植物中提取SOD的固定化研究较少。本研究以壳聚糖作为载体,固定化从树莓中提取的超氧化物歧化酶,进行有关其对贮存、热、pH的稳定性等酶学性质研究的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,以下简称SOD) 树莓中提取 壳聚糖 上海伯奥生物科技有限公司产品,脱乙酰度 $\geq 90.0\%$,粘度 $< 100\text{cps}$;其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 SOD 制备

取一定量树莓,加100ml 50mmol/L磷酸盐缓冲液,在冰浴条件下研磨,9500r/min离心20min,取上清液加50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4℃静置2h,12000r/min离心30min去除沉淀,留取上清液用90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析2h,12000r/min离心40min,弃去上清液,沉淀用适量50mmol/L磷酸盐缓冲液溶解,透析过夜,透析液经浓缩后12000r/min离心30min,得到SOD酶浓缩液,酶浓缩液过Sephadex G-100,收集酶活性部分。

1.2.2 SOD 活力测定

NBT光还原法^[5-6],以抑制NBT光还原的50%的酶液量作为一个酶活力单位(U)。

1.2.3 固定化SOD的制备

1.2.3.1 固定化超氧化物歧化酶A(以线型壳聚糖为载体)

取一定量的壳聚糖溶于2%的乙酸水溶液中,在快速搅拌下,滴加5%的氢氧化钠水溶液至溶液pH7.5,抽滤收集沉淀,可得壳聚糖的白色细小颗粒。将上述经过再沉淀处理后的壳聚糖加入一定量的超氧化物歧化酶搅拌均匀后,再滴加一定量的戊二醛水溶液,在10℃条件下振荡反应10h。抽滤,先用蒸馏水洗涤,再用磷酸盐缓冲液洗涤,直至洗涤液中检测不到戊二醛和游离酶,即得颗粒状固定化酶。

1.2.3.2 固定化超氧化物歧化酶B(以网状壳聚糖为载体)

取一定量的壳聚糖溶于1%的乙酸水溶液中,在磁力搅拌下,滴加2%的氢氧化钠水溶液至溶液pH5.5后,加入一定量的戊二醛水溶液反应1h,然后再在快速搅拌下滴加5%的氢氧化钠水溶液至溶液pH7.5,抽滤,收

集沉淀,可得预交联的网状壳聚糖的细小颗粒。超氧化物歧化酶固定化操作方法同上。以U/g载体表示固定化酶活力。

1.2.4 固定化SOD最佳制备条件的确定

1.2.4.1 网状壳聚糖载体制备中戊二醛浓度对固定化SOD活力的影响

固定化反应中,固定戊二醛终浓度0.5%。网状壳聚糖载体制备过程中,其他条件不变,分别加入不同量的戊二醛水溶液使其终浓度为0.2%、0.6%、1%、1.4%、1.8%,将其分别作为载体固定超氧化物歧化酶,测定酶活力及酶活回收率。

1.2.4.2 固定化反应中戊二醛浓度对固定化SOD活力的影响

分别以线型壳聚糖和网状壳聚糖作为载体,加入一定量的SOD溶液搅拌均匀后,再分别滴加一定量的戊二醛水溶液,使戊二醛浓度分别为0、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%,分别测定固定化酶活回收率。

1.2.4.3 固定化SOD载体的筛选

在最佳制备条件下分别制备线型壳聚糖载体和网状壳聚糖载体,将其用于SOD固定化,测定固定化酶活力及酶活回收率。

1.2.5 溶液酶和固定化酶的贮存稳定性测定

将等酶活力单位的溶液酶和固定化酶分别在4℃下保存,间隔取样测定相对酶活力。

1.2.6 固定化酶的连续使用稳定性测定

将固定化酶室温下保存一定时间后测定其酶活力,将该酶回收后测定其酶活力及酶活回收率。

1.2.7 固定化酶的热稳定性测定

将固定化酶及溶液酶置于梯度温度的水浴锅中,40min后测定固定化酶及溶液酶相对酶活力。

1.2.8 固定化酶的pH稳定性测定

固定化酶在不同pH值缓冲液条件下,30℃保温40min,测定固定化酶相对酶活力,溶液SOD作为对照。

2 结果与分析

2.1 固定化SOD最佳制备条件的确定

2.1.1 网状壳聚糖载体制备中戊二醛浓度对固定化SOD活力的影响

网状壳聚糖载体制备过程中,其他条件不变,分别加入不同量的戊二醛水溶液使其浓度为0.2%、0.6%、1%、1.4%、1.8%,将其分别作为载体固定超氧化物歧化酶,由图1可知,载体制备过程中,戊二醛浓度为1%时,所制备的固定化酶活力较高。

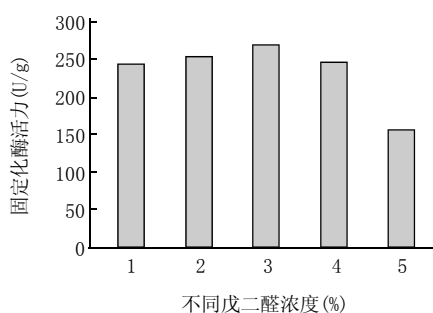


图1 不同戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

Fig.1 Effects of different glutaraldehyde concentration consistency on immobilized enzyme activity

2.1.2 固定化反应中戊二醛浓度对固定化SOD活力的影响

以网状壳聚糖作为载体, 加入一定量的SOD溶液搅拌均匀后, 再分别滴加一定量的戊二醛水溶液, 使戊二醛浓度分别为0、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%, 结果如图2所示, 固定化反应中戊二醛加量为0.1%时, 所得固定化酶酶活回收率较高。

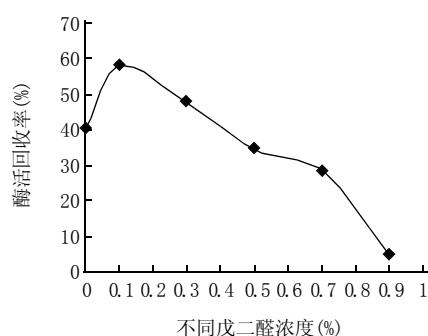


图2 不同戊二醛浓度对网状固定化酶活力的影响

Fig.2 Effects of different glutaraldehyde concentration consistency on immobilized enzyme activity

以线型壳聚糖作为载体, 加入一定量的SOD溶液搅拌均匀后, 再分别滴加一定量的戊二醛水溶液, 使戊二醛浓度分别为0、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、

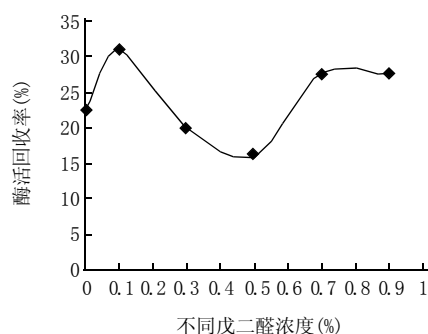


图3 不同戊二醛浓度对线型固定化酶活力的影响

Fig.3 Effects of different glutaraldehyde concentration consistency on immobilized enzyme activity

0.9%, 结果如图3所示, 固定化反应中戊二醛加量为0.1%时, 所得固定化酶酶活回收率较高。

2.1.3 固定化SOD载体的筛选

表1 不同种类固定化SOD活力比较
Table 1 Comparison of different superoxide dismutase activity

固定化SOD种类	酶活力(U/g)	酶活回收率(%)
固定化超氧化物歧化酶A	212.92	31.10
固定化超氧化物歧化酶B	325.00	58.32

由表1可知, 在固定化SOD活力测定结果中, 以线型壳聚糖作为载体制备的固定化SOD虽可得到酶活, 但酶活力及回收率相对较低, 以网状壳聚糖作为载体制备的固定化SOD, 酶活力和酶活回收率均较理想。选择以网状壳聚糖作为载体制备的固定化SOD进行后序酶学性质测定。

2.2 溶液酶和固定化酶的贮存稳定性

将等酶活力单位的溶液酶和固定化酶分别在4℃放置一定时间后, 相对酶活测定结果见图4, 图4表明溶液酶易于失活, 而SOD经壳聚糖固定化后, 可以较长时间保持很高的活力。

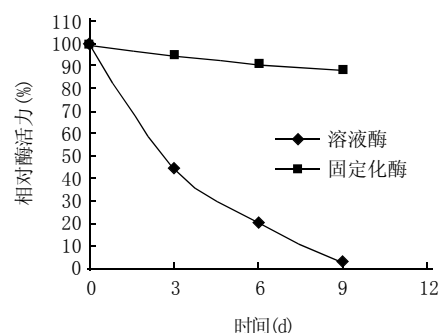


图4 固定化酶贮存稳定性

Fig.4 Conserve stability of immobilized enzyme

2.3 固定化酶的连续使用稳定性

固定化酶室温下保存一定时间后测定其酶活力, 将酶回收后测定其相对酶活力, 测定结果见表2, 表2表明, 二次回收固定化酶酶活回收率在50%以上, SOD经壳聚糖固定化后可反复使用, 提高酶的利用价值。

表2 固定化酶反复使用酶活回收率比较
Table 2 Utilization ratio of immobilized enzyme

	固定化酶	一次回收	二次回收	三次回收
酶活力(U/g)	330.00	226.40	191.6	133.32
酶活回收率(%)	100	68.62	58.08	40.41

2.4 固定化酶的热稳定性

将固定化酶及溶液酶置于梯度温度的水浴锅中, 40min后测定固定化酶及溶液酶相对酶活力。测定结果

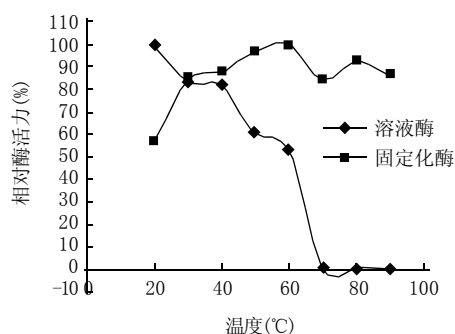


图5 固定化酶耐热稳定性

Fig.5 Heat stability of immobilized enzyme

如图5所示,溶液酶呈下降趋势,随温度升高,溶液酶迅速失活,相对溶液酶,固定化酶相对酶活力变化较缓,温度对固定化酶影响较小,由图可知固定化酶耐热稳定性较溶液酶有所提高。

2.5 固定化酶的pH稳定性

固定化酶在不同pH值缓冲液条件下,30℃保温40min,测定固定化酶相对酶活力,溶液SOD作对照。由图6可知极端酸性条件对溶液酶及固定化酶有一定激活作用,溶液酶在偏碱条件下酶活较高,碱性条件酶活损失,固定化酶在酸性条件下酶活较高,耐酸稳定性有所提高,碱性条件下酶活有一定损失。由图可知固定化酶在极端酸性条件下稳定性较溶液酶有较大提高。

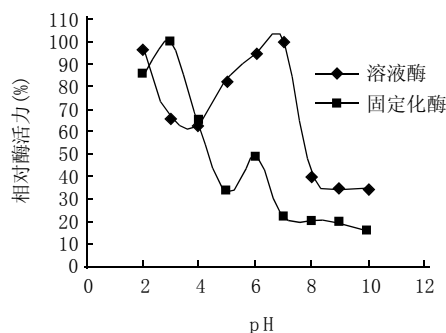


图6 固定化酶pH稳定性

Fig.6 pH stability of immobilized enzyme

3 讨论与结论

壳聚糖来源丰富,无毒,无抗原性,化学性质比较稳定,具有降血脂、抗肿瘤和提高机体免疫等功能,是性能良好的固定化酶载体,具备规模生产的条件。树莓中超氧化物歧化酶含量较高,且酶金属构象不同于其它酶。因此将树莓超氧化物歧化酶进行固定化研究具有现实意义。目前,壳聚糖作为固定化酶载体应用于固定化SOD的研究较少。筛选适合的壳聚糖及处理方法对

SOD进行固定化,制得壳聚糖固定化SOD的研究不但能保持原有酶活性,而且酶稳定性也有所提高,还兼有可回收和反复使用等优点,固定化酶可进一步组装为SOD酶传感器,用于清除超氧阴离子自由基药物的筛选。

本实验制备了两种以壳聚糖为载体固定树莓SOD的固定化酶,以线型壳聚糖作为载体制得的固定化酶没能得到酶活较高的固定化SOD,可能是由于固定化酶表面带上负电荷,会对 $O_2^{\cdot-}$ 产生静电排斥,阻碍 $O_2^{\cdot-}$ 与SOD活性中心的接触,进而测得SOD活性较低。以网状壳聚糖制得的固定化酶位于载体壳聚糖的表面,无空间位阻,另外预交联的网状壳聚糖结构紧密适于稳定酶构象,酶活回收率较高。

本研究比较了SOD固定化酶与溶液酶的酶学性质,结果表明SOD经壳聚糖固定化后稳定性提高。SOD固定化酶与溶液酶相比,可以较长时间保持很高的酶活力;SOD固定化酶可以反复使用,二次回收的固定化酶酶活回收率可达到50%以上;在梯度水浴保温,SOD固定化酶的相对酶活力稳定性高于溶液酶;在极端pH值溶液条件下,SOD固定化酶的稳定性均有所增强。这可能是由于SOD共价交联于壳聚糖表面后有效的保护了SOD的次级键,经壳聚糖固定化后,SOD分子共价交联在壳聚糖上,由于稳定酶分子构象的次级键被保护在内侧,固定化酶能够稳定其构象从而得到了保护,因此SOD固定化后酶的温度稳定性、pH稳定性均有所提高。壳聚糖固定化SOD的这些酶学性质特点,扩展了SOD的实用价值,有利于它在食品、日化及药物等方面的实际应用。

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] 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.
- [3] 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.
- [4] 纪平雄,侯瑶,徐凤彩.丝素-壳聚糖合金膜固定化超氧化物歧化酶的研究[J].华南农业大学学报:自然科学版,2003,24(2):51-53.
- [5] 吕淑霞.基础生化实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,2003:49-52,77-82.
- [6] GIANNOPOLLLTTISSC R S.Superoxide dismutase[J].Plant Phyyssiol,1977,59:309-314.
- [7] 乔小蓉,冉良骥,吕太平.固定化超氧化物歧化酶的制备[J].华西药杂志,2004,19(2):92-95.
- [8] 郑迎迎,李大力.壳聚糖载体的制备及脲酶的固定化研究[J].生物技术,2005,15(2):56-59.