壳聚糖-精氨酸树脂固定化胰凝乳蛋白酶及其性质

肖 燕 王 娟 周小华*
(重庆大学化学化工学院 重庆 400044)

摘 要 以具柔性亲水手臂的壳聚糖-精氨酸树脂为载体,用戊二醛交联胰凝乳蛋白酶,获得壳聚糖-精氨酸树脂固定化胰凝乳蛋白酶。最佳固定化条件为:m(酶):m(载体)=20:1 000、戊二醛体积分数为1.0%、pH=5.20、30 ℃交联60 min。固定化酶活力达850 U/g,K_m为1.83 mmol/L,比游离酶增大33.6%,比交联壳聚糖固定化酶低24.0%。壳聚糖-精氨酸树脂固定化胰凝乳蛋白酶水解时间进程曲线与游离酶基本一致,均在反应30 min达到最大速率,最适温度为70 ℃,比游离酶升高10 ℃;在75 ℃时的半衰期可达6.0 h,比游离酶提高约4.3倍;最适pH值为5.92,比游离酶向酸性偏移2pH单位。4 ℃贮存半衰期为49 d。

关键词 壳聚糖,*L*-精氨酸,胰凝乳蛋白酶,交联,固定化
中图分类号:O636.1; O629.7 文献标识码:A 文章编号:1000-0518(2009)07-0780-06

与游离酶相比较,固定化酶具有稳定性、机械强度好,可反复使用,易分离等优点[1]。性能优良的载体是固定化酶成功的关键因素[2,3]。壳聚糖是常用于固定化酶的天然高分子载体,虽亲水性强、生物相容性好,以其为载体固定化酶的活力回收高[4],但是,由它固定的酶往往呈凝胶,易降解,机械强度低、扩散阻力大,活力低且半衰期短,不适宜大规模工业化生产[5]。目前,壳聚糖的改性方法主要有交联成多孔微球[6]及接枝改性[7,8]。前者增加表面积及机械强度,但未增加活性位点及改善固定化酶的微环境;后者则改善了与酶蛋白的亲和性或增加固定化酶作用的自由度。接枝于高分子骨架上的侧链基团具有一定自由度,称为'柔性手臂'[9],常用的接枝物有二乙烯基砜、丙烯酸及其酯、缩水甘油甲基丙烯酸盐、聚丙烯腈、双醛淀粉[10]等。Reku等[11]指出,在载体表面接枝较大分子侧链,可获得活力回收及稳定性均高的固定化酶,接枝小分子侧链,则效果不佳。Chaijitrsakoola等[12]认为,载体孔径及孔容积均影响酶蛋白定位及传质阻力,获得最佳固定化效果的孔径应为酶直径的2~6倍。交联壳聚糖微球的孔径一般为微米级,而酶分子的动力学平均直径约为10 nm[13],对其接枝亲水柔性手臂,有利于提高固定化酶的活力回收及稳定性[14,15],目前,尚未见用蛋白质基本组成单位——氨基酸接枝修饰交联壳聚糖微球,并固定化酶的报道。本文在交联壳聚糖微球上接枝*L*-精氨酸,引入约8个碳-碳键长(约12 nm)、对蛋白质亲和的柔性手臂,以戊二醛为交联剂,制备固定化胰凝乳蛋白酶,研究了主要工艺条件以及酶学性质,以获得活力回收较高、稳定性好、可反复使用的生物催化剂。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

壳聚糖,脱乙酰度90.32%;*L*-精氨酸、*N*,*N*-二环已基碳化二亚胺(DCC),BR;考马斯亮蓝G-250,BR;胰凝乳蛋白酶(>1 000 U/g),牛血清白蛋白(BSA)(FW:约67 000);50%戊二醛、碳酸钙、石油醚、丙酮、95%乙醇、土温-80、液体石蜡,以上均为分析纯试剂。

CS501-SP型超级数显恒温器;SHA-C型水浴恒温振荡器;752N型紫外可见分光光度计;pHS22C型精密酸度计;BA200型生物显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 制备壳聚糖-精氨酸树脂 8.0 g壳聚糖充分溶解于400 mL体积分数为1%的HCl中,先用同体积、体积分数为0.5%吐温-80的液体石蜡分散10 min,再加入40 mL体积分数为2.5%的戊二醛及

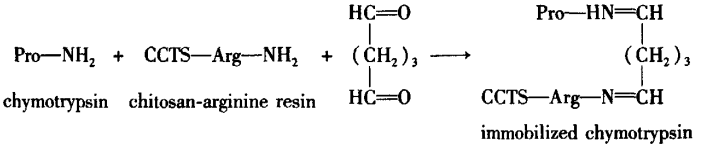
2008-07-18收稿,2008-11-20修回

通讯联系人:周小华,男,教授; E-mail:zhou65306590@tom.com; 研究方向:生物化工,药物化学

万方数据

8.0 g致孔剂 $CaCO_3$,40 ℃搅拌 1 h 后用稀 NaOH 调节 pH = 9.0。升温至 60 ℃,搅拌 3 h 后静置分层。弃上层油相,沉淀物依次用石油醚和 95% 乙醇各洗涤 3 次,再分散于 400 mL 体积分数为 2% 的 HCl 中过夜,溶解其中的 $CaCO_3$。次日抽滤,用蒸馏水反复洗涤滤渣,直至洗涤液呈中性,即获得交联壳聚糖。将此交联壳聚糖分成 2 份,1 份分散于 200 mL 质量浓度为 2 g/L 的 *L*-精氨酸溶液中,搅拌 30 min,再于 10 min内滴加与精氨酸等摩尔的 DCC(95% 乙醇溶解),继续搅拌 30 min 后真空抽滤,并用 95% 乙醇充分洗涤,除去 DCC 衍生物。将滤渣装入截留分子量为 5KD 的透析袋中,对流水透析过夜。次日抽滤,滤渣即为壳聚糖-精氨酸树脂,4 ℃保存或 105 ℃干燥至恒重备用。壳聚糖精氨酸树脂干粉总氮为 9.32%,直径约 2 mm,表面分布大量小孔道,比表面积 527.36 m^2/g,干堆积密度 0.215 g/cm^3,吸水量 855%。另 1 份直接固定化酶,4 ℃保存或 105 ℃干燥至恒重备用。交联壳聚糖干粉总氮为 7.45%,直径约 2 mm,表面分布有小孔道,比表面积 613.25 m^2/g,干堆积密度 0.189 g/cm^3,吸水量 953%,不溶于体积分数为 1% 的稀 HCl 及质量浓度为 10 g/L 的稀 NaOH 溶液。

1.2.2　*壳聚糖-精氨酸树脂固定胰凝乳蛋白酶制备*　将 1.5 g 壳聚糖-精氨酸湿树脂或等量湿交联壳聚糖分别悬浮于 20 mL 胰凝乳蛋白酶的磷酸盐缓冲溶液(pH = 5.20,胰凝乳蛋白酶活力 100 U/mL)中,(30 ± 0.1) ℃保持 30 min,分别控制戊二醛用量、载体酶摩尔比及交联时间,制备固定化胰凝乳蛋白酶。固定化反应完成后抽滤,滤渣用 pH = 5.20 的磷酸缓冲液反复洗涤,直至洗涤液 OD_{280} 为 0,即获得壳聚糖-精氨酸树脂及交联壳聚糖固定化胰凝乳蛋白酶,4 ℃冷藏备用。



Scheme 1　Reaction of chymotrypsin immobilized on chitosan-Arg resin

1.2.3　*测定胰凝乳蛋白酶活力*　采用考马斯亮蓝法[16]。称取定量固定化胰凝乳蛋白酶,加入定量、40 ℃预热的 0.5 g/L 牛血清白蛋白(BSA)溶液,振荡水解 10 min,加入 2 mL 体积分数为 10% 的 HCl 终止反应。水解液 3 000 r/min 离心 10 min,取上层清液,加入定量考马斯亮蓝溶液,以 0.5 g/L 牛血清白蛋白(BSA)溶液为参比,测定其 OD_{280}。以每分钟水解 1 μg BSA 的酶量为 1 活力单位(U)计算酶活力。

2　结果与讨论

2.1　影响壳聚糖-精氨酸树脂固定胰凝乳蛋白酶的主要因素

2.1.1　*酶/载体比例*　从 Scheme 1 可以看出,用交联法制备固定化酶,载体活性基团、酶蛋白及交联剂之间的理论摩尔比为 1:1:1,假定每分子胰凝乳蛋白酶至少有 1 个游离氨基通过戊二醛与壳聚糖-精氨酸树脂交联,因此戊二醛及胰凝乳蛋白酶/载体的比例对固定化酶活力均有显著影响,其结果分别见图 1和图 2。从图 1 可以看出,当戊二醛的体积分数为 1% 时,壳聚糖-精氨酸树脂固定化胰凝乳蛋白酶的活力最大,达到 850 U/g;当戊二醛的体积分数为 0.75% 时,交联壳聚糖固定化胰凝乳蛋白酶的活力最大,达到 313 U/g。前者的活力为后者的 2.72 倍。这个差异是由其活性基团数量及固定化酶蛋白自交联量所导致。壳聚糖-精氨酸树脂的游离氨基为精氨酸残基的 α-氨基和胍基氨基,其数量为交联壳聚糖的 2 倍,理论上可结合与之相当的酶蛋白,在戊二醛浓度恒定时,壳聚糖-精氨酸树脂固定的胰凝乳蛋白酶多,活力高。戊二醛通过与酶蛋白及载体游离氨基形成席夫键影响固定化酶活力[4],理论上 1 个分子戊二醛仅需分别与 1 个分子胰凝乳蛋白酶和载体氨基各形成 1 个席夫键即可形成固定化酶。因此,在戊二醛摩尔数小于酶蛋白摩尔数区间,增加的戊二醛主要用于与游离酶蛋白和载体交联,增加交联剂浓度可增加固定化酶蛋白数量及活力;在戊二醛摩尔数大于酶蛋白摩尔数区间,增加的戊二醛主要用于固定化酶蛋白之间交联,随着戊二醛浓度的增加,与酶蛋白分子形成的席夫键增加。酶蛋白的刚性增加[11],活力下降。

从图 1 还可以看出,交联壳聚糖-精氨酸树脂固定化酶所需的戊二醛质量浓度比交联壳聚糖固定化

万方数据

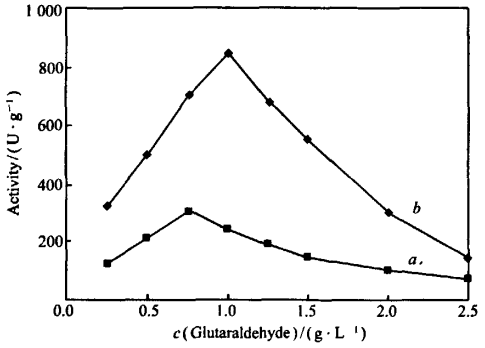


图1 戊二醛浓度对固定化胰凝乳蛋白酶活力的影响

Fig. 1 Effects of glutaraldehyde concentration on immobilized chymotrypsin activity

a. enzyme immobilized by the resin;

b. encyme immobilized by crossing chitosan

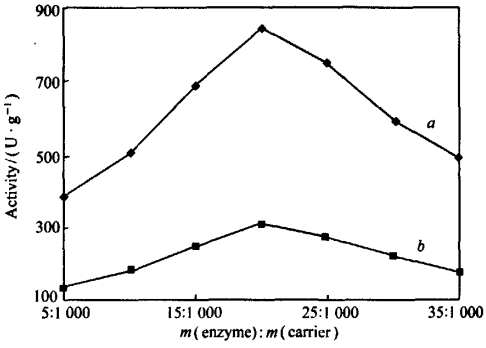


图2 酶/载体比例对固定化胰蛋白酶活力的影响

Fig. 2 Effects of ratio of enzyme to carrier on immobilized chymotrypsin activity

a. enzyme immobilized by the resin;

b. enzyme immobilized crossing chitosan

酶所需的质量浓度高33%。这是由于与后者相比,前者可供固定化酶的游离氨基数量更多,即可固定更多的酶蛋白,因此,需要更多戊二醛。

从图2可知,固定化酶的活力随m(酶):m(载体)的增加而增加,当该比值达到20:1 000时,出现最大值。这种关系既反映了单位载体固定的酶蛋白量,也反映了酶蛋白参与固定化反应的游离氨基数。当该比值较低时,参与固定化的酶蛋白数量少于载体游离氨基数,每个酶分子均能均匀扩散到载体的游离氨基附近,在戊二醛的作用下,发生载体-戊二醛-游离酶的交联反应,固定化酶的活力与酶/载体比例成正相关。当该比值为20:1 000时,扩散到载体游离氨基附近并发生固定化反应的酶量达到饱和,固定化酶的活力达到最高,活力回收率达69.0%。此后继续增加酶/载体比,只能增加酶之间的自交联并降低活力[4]。

2.1.2 交联时间 戊二醛固定化酶的过程可描述如下:戊二醛扩散至游离酶或载体氨基附近,与游离酶或游离载体中的氨基反应,形成单交联游离酶或载体,其中的游离醛基分别与载体氨基或游离酶反应,形成固定化酶。其中单交联游离酶或载体分别扩散至载体或游离酶氨基附近的过程为限制性步骤[18]。图3为交联时间对固定化酶活力的影响。从图中可以看出,在60 min时固定化酶的活力达到最大值。此时,单交联酶与载体氨基或游离酶与单交联载体的反应已经完成,因此,固定化酶活力最高。超过60 min后,残余的单交联酶和游离酶只能发生自交联,或与固定化酶交联,导致其活力下降。从图3还可以看出,交联壳聚糖-精氨酸树脂固定化酶活力较交联壳聚糖固定化酶高,且达到活力最大的时间较少,这可能是当单交联胰凝乳蛋白酶扩散至树脂附近或游离酶扩散至单交联载体附近时,由于柔性精氨酸臂可在一定空间内自由摆动,缩短了交联反应所需时间。

2.2 固定化胰凝乳蛋白酶的主要酶学性质

2.2.1 水解时间进程曲线 胰凝乳蛋白酶及固定化胰凝乳蛋白酶水解牛白蛋白的时间进程曲线如图4所示。从图中可以看到,该反应在20 min内呈线关系,并在30 min时达到最大值。在前30 min,交联壳聚糖精氨酸树脂固定化胰凝乳蛋白酶的水解时间进程曲线与游离酶几乎一致,但在达到最大活力后,游离酶活性即逐渐下降,而固定化酶内仍保持最大活力。根据中间产物学说[17],酶-底物复合物形成及产物扩散离开酶活性中心的速度直接影响反应速度。精氨酸亲水柔性手臂以及戊二醛的碳骨架,使固定化的酶蛋白与吡喃糖环间的距离达到约13个碳-碳键长(约20 nm),具有较大的"自由度",因此固定的酶蛋白可以消除吡喃环上羟基等的位阻效应,并使平均直径约为10 nm的蛋白分子[13]可从多角度扩散至酶的活性部位,即增加了底物扩散至酶及产物离开酶活性中心的传递速度,因此,其水解速度与游离酶相当。此外,亲水柔性手臂的束缚使稳定性提高,可以在较长时间内保持高水解活力。而交联壳聚糖固定化酶在50 min时才达到最大值(图5曲线*c*)。显然这是由于酶蛋白与载体之间仅有5个碳-碳

万方数据

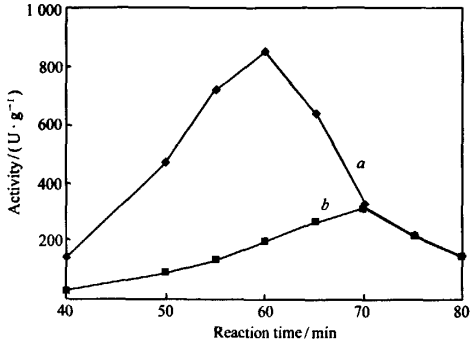


图 3　交联时间对固定化胰凝蛋白酶活力的影响

Fig. 3　Effects of crossing time on activity of chymotrypsin immobilized

a. enzyme immobilized by the resin;

b. enzyme immobilized by crossing chitosan

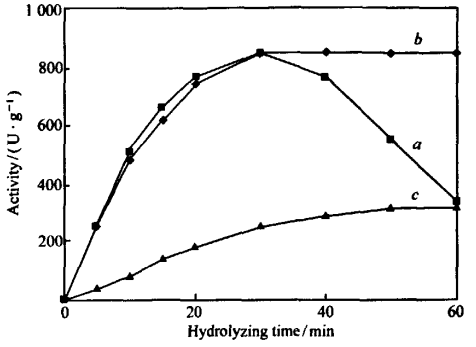


图 4　固定化胰凝乳蛋白酶水解牛白蛋白的活力曲线

Fig. 4　Hydrolyzing curves of chymotrypsin immobilized (cattle albumin as substrate)

a. free enzyme; *b*. enzyme immobilized by the resin;

c. enzyme immobilized by crossing enzyme

键距离,自由度较小,底物及产物传质阻力较大所致。

2.2.2　最适温度　图 5 为胰凝乳蛋白酶的温度活力曲线。图中可见,游离酶、树脂及交联壳聚糖固定化酶的温度活力曲线均呈钟罩形,树脂及交联壳聚糖固定化酶的最适温度均为 70 ℃,比游离酶的60 ℃高 10 ℃。低于最适温度时,升高温度将增加酶与底物的碰撞几率及产物的传递速度,使反应速度增加;高于最适温度时,升高温度导致酶变性,降低了反应速度。酶的温度系数一般为 1 ~2,即每升高 10 ℃,其催化速度可增加 1 ~2 倍[18],表明固定化胰凝乳蛋白酶可在较高温度下高效率催化蛋白质水解。

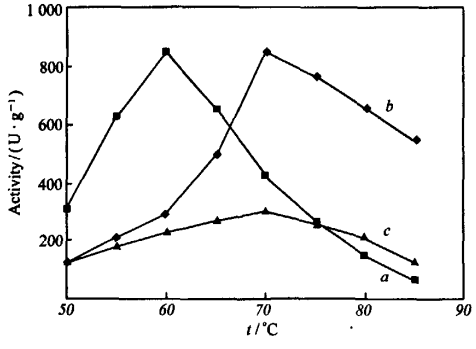


图 5　固定化胰乳蛋白酶的最适温度

Fig. 5　Optimal temperatures of immobilizing chymotrypsin

a. free enzyme; *b*. enzyme immobilized by the resin;

c. enzyme immobilized by crossing chitosan

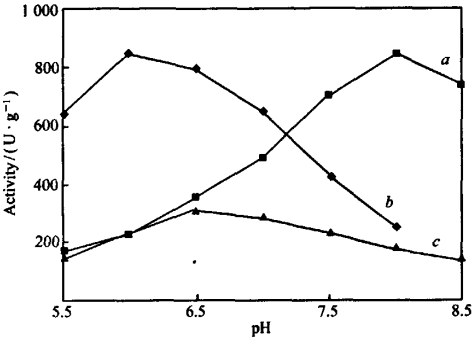


图 6　固定化胰凝乳蛋白酶的最适 pH

Fig. 6　Optimal pH values of immobilizing chymotrypsin

a. free enzyme; *b*. enzyme immobilized by the resin;

c. enzyme immobilized by crossing chitosan

2.2.3　最适 pH 值　pH 值控制酶与底物可解离基团的解离度,从而控制中间产物形成及催化反应速度[19]。游离、固定化胰凝乳蛋白酶的 pH-活力曲线如图 6。游离酶最适 pH = 8.0,树脂固定化酶和交联壳聚糖固定化酶的最适 pH 值分别向酸性偏移至 5.92 和 6.50。胰凝乳蛋白酶活性部位的 Ser_{195}-COO^-、His_{57}咪唑基、Ser_{195}-OH 形成质子接力系统,His 在生理 pH 下既是路易斯酸又是路易斯酸碱[18]。因此,pH 值可能控制了 His_{57}咪唑 N 接受或给出质子能力。因此,固定化胰凝乳蛋白酶可在较低的 pH 值、特别是在生理 pH 值下使用。

2.2.4　米氏常数 K_m　图 7 为游离、固定化胰凝乳蛋白酶的双倒数曲线。从图中可以看到,游离酶、交联壳聚糖固定化酶和树脂固定化酶的 K_m 值分别为 1.37、2.27 和 1.83 mmol/L。显然,这是固定化作用

万方数据

增加了酶的刚性所致[11]。固定化树脂的 K_m 比游离酶的增大33.6%，但是比交联壳聚糖固定化酶的低24%，这是因为树脂固定化酶有较合适的亲水柔性，使固定的胰凝乳蛋白酶"自由度"较大，部分抵消了因固定化导致的刚性增加。

2.2.5 稳定性 图8为游离、固定化胰凝乳蛋白酶的热稳定曲线。从图中可以看到，游离酶在75 ℃处理1.4 h，活力即衰减50%，而树脂及交联壳聚糖固定化酶在此温度下的半衰期均为6h。这说明固定化使胰凝乳蛋白酶更加稳定，能在较高温度下较长时间使用。

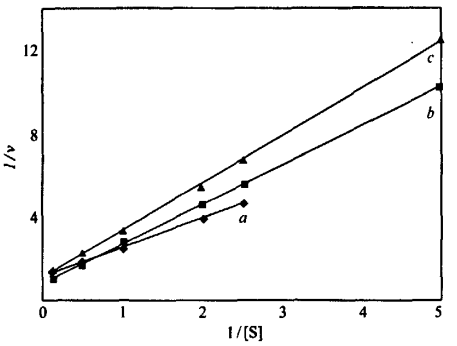


图7 固定化胰乳蛋白酶 K_m 值

Fig. 7 K_m values of chymotrypsin immobilized

a. free enzyme; *b*. enzyme immobilized by the resin; *c*. enzyme immobilized by crossing chitosan

图9为固定化胰凝乳蛋白酶的贮存稳定性(4 ℃)，经线性方程拟合得树脂固定化酶和交联壳聚糖固定化酶的贮存半衰期分别为49和43 d。在低温条件下，亲水分子可降低溶液的冰点，从而保护了生物大分子[18]。树脂固定化酶中增加的赖氨酸柔性手臂为亲水物，手臂上游离氨基或希夫键亚氨基氮均可与水分子形成氢键或与水中微量重金属等结合，降低了水中微量溶质对酶蛋白的破坏，从而起到部分保护作用，故其半衰期较长。

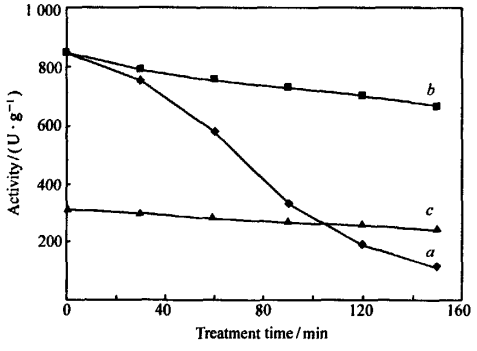


图8 固定化胰凝蛋白酶的热稳定曲线

Fig. 8 Heat steady curves of chymotryspin immobilized(75 ℃)

a. free enzyme; *b*. enzyme immobilized by the resin; *c*. enzyme immobilized by crossing chitosan

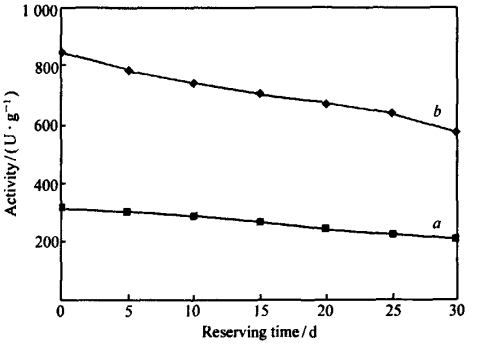


图9 固定化胰乳蛋白酶贮存稳定性

Fig. 9 Reserving stabilities of chymotrypsin immobilized(4 ℃)

a. enzyme immobilized by the resin; *b*. enzyme immobilized by crossing resin

参 考 文 献

1 Harish Prashanth K V, Tharanathan R N. *Trends Food Sci Technol*[J], 2007, **18**: 117

2 LIN Si-Chong(林思聪). *Chinese Polym Bull*(高分子通报)[J], 1998, (1): 1

3 YUAN Chun-Tao(袁春桃), JIANG Xian-Ming(蒋先明). *Chinese J Appl Chem*(应用化学)[J], 2002, **19**(9): 862

4 Anny Manrich, Célia M A, Galvao, Charles D F Jesus, Roberto C Giordano, Raquel L C Giordano. *Int J Bio Macromol*[J], 2008, **43**: 54

5 Jayakumari V G, Rajasekharan Pillai V N. *J Appl Polym Sci*[J], 1991, **42**: 583

6 Hejazi R, Amiji M. *Int J Pharm*[J], 2004, **272**: 99

7 Gabrovskaa K, Nedelchevaa T, Godjevargovaa T, Stoilovab O, Rashkov I. *J Mol Catal B: Enzymatic*[J], 2008, **55**: 169

8 Xiao Y, Zhou X H. *Reactive Func Polym*[J], 2008, **68**: 1 281

9 Frydlová F, Kučerová Z, TichKá M. *J Chromatog B*[J], 2008, **863**: 135

10 Al-Shannag M, Al-Qodah Z, Herrero J, Humphrey J A C, Giralt F. *Biochem Eng J*[J], 2008, **39**: 554

万方数据

11 Reku A, Kruczkiewicz P, Jastrzembska B, Liesiene J, Peczy'nska-Czoch W, Bryjak J. *Int J Bio Macromol*[J], 2008, **42**: 208

12 Chaijitrsakoola T, Tonanona N, Tanthapanichakoona W, Tamonb H, Prichanonta S. *J Mol Catal B: Enzymatic*[J], 2008, **55**: 137

13 GAO Bo(高波), ZHU Guang-Shan(朱广山), FU Xue-Qi(付学奇), XIN Ming-Hong(辛明红), CHEN Jing(陈静), WANG Chun-Lei(王春雷), QIU Shi-Lun(裘式纶). *Chem J Chinese Univ*(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(10): 1 852

14 Gabrovska K, Marinov I, Godjevargova T, Portaccio M, Lepore M, Grano V, Diano N. *Int J Macromol*[J], 2008, **43**: 339

15 Godjevargova T, Gabrovska K. *Enzyme Microbial Technol*[J], 2006, **38**: 338

16 NING Zheng-Xiang(宁正祥). Handbook of Food Component Analysis(食品成分分析手册)[M]. Beijing(北京): Chinese Light Industry Press(中国轻工业出版社), 1998: 748, 348

17 Prakit Sukyai, Tonci Rezi, Cindy Lorenz, Kitti Mueangtoom, Werner Lorenz, Dietmar Haltrich, Roland Ludwig. *J Biotechnol*[J], 2008, **135**: 281

18 YUAN Qin-Sheng(袁勤生), ZHAO Jian(赵健). Enzymes and Enzyme Engineering(酶与酶工程)[M]. Shanghai(上海): East China University of Science and Technology Press(华东理工大学出版社), 2005: 172

19 QI Yi-Zheng(戚以政), XIA Jie(夏杰). Biological Reaction Engineering(生物反应工程)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2004: 25

Preparation of Immobilized Chymotrypsin by Chitosan-arginine Resin and Its Properties

XIAO Yan, WANG Juan, ZHOU Xiao-Hua*

(*College of Chemistry & Engineering, Chongqing University, Chongqing* 400044)

Abstract With glutaraldehyde as the crosslinker, chymotrypsin was immobilized onto chitosan-arginine resin which was porous and grafted with a flexible and hydrophilic amino acid. The optimal conditions of immobilization are that the ratio of enzyme loading/wet resin(mg/g) is 20:1, concentration of glutaraldehyde solution is 1.0%, the dose is 10 mL, pH is 5.20, the activity is 850 U/g, and the immobilizing time is 60 min. The enzymatic properties of immobilized chymotrypsin are that the maximum rate is obtained within 30 min, and the catalysis time curve is similar to that of free enzyme; its K_m value is 1.83 mmol/L, 33.6% higher than that of free enzyme, and 24.0% lower than that of enzyme immobilized by crossing chitosan; its optimal temperature is 70 ℃, 10 ℃ higher than that of free enzyme; its optimal pH is 5.92, which deviates 2 units to acid side compared with the free enzyme. Moreover, the immobilized chymotrypsin has a high thermal stability and storage stability, with a half-life of 6 h at 75 ℃ or 49 days at 4 ℃.

Keywords chitosan, *L*-arginine, chymotrypsin, cross-linking, immobilization

万方数据