

白腐菌(*T. pubescens* MB89)漆酶的固定化及其酶学性质研究

张 莉,贾志宽

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究白腐菌 *T. pubescens* MB89 漆酶固定化处理的最佳条件及其酶学性质。【方法】采用壳聚糖、壳聚糖铜、海藻酸钠/壳聚糖和 TEOS/PEG 4 种载体对漆酶进行固定,测定固定化漆酶活性在不同温度、pH 值和固定化条件处理下的变化。【结果】白腐菌漆酶的固定化方法和最佳固定条件为:① 壳聚糖固定化漆酶(IE1)。戊二醛最佳浓度为 0.4 mol/L,最适交联时间 8 h,最佳给酶量 1.5 mg/g;② 壳聚糖铜固定化漆酶(IE2)。CuSO₄ · 5H₂O 最佳添加量为 0.6 mg/g,最适络合时间 10 h,最佳给酶量 0.25 mg/g;③ 海藻酸钠/壳聚糖固定化漆酶(IE3)。0.2 mol/L 海藻酸钠,0.2 mol/L CaCl₂,0.1 mol/L 戊二醛,0.15 mol/L 壳聚糖,最佳给酶量 1.5 mg/g;④ TEOS/PEG 固定化漆酶(IE4)。最适 PEG 分子质量为 600~800,最适添加量 1.5 g/g,最佳给酶量 1.5 mg/g。4 种固定化漆酶的酶学性质:IE1 和 IE4 的最适温度均为 60 ℃,IE2 和 IE3 为 30 ℃;IE1、IE3 和 IE4 的最适 pH 值为 4.5,IE2 为 4.0;与游离漆酶(Lac)的最适 pH 值相比,固定化漆酶的最适 pH 值均向碱性方向偏移,且固定化漆酶的酸碱稳定性、热稳定性和贮存稳定性均优于游离漆酶。【结论】固定化酶的最适合温度、pH 均受固定化载体和方法的影响,固定化漆酶的稳定性均优于游离漆酶。

【关键词】 白腐菌漆酶;酶固定化;酶学性质;酶稳定性

【中图分类号】 Q814.2;S182

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)10-0151-010

Immobilization and properties of laccase from a white rot fungus (*T. pubescens* MB89)

ZHANG Li, JIA Zhi-kuan

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The methods and characteristics of immobilized laccase from *T. pubescens* MB89 were studied. 【Method】 Using chitosan, chitosan-copper, alginate/chitosan and TEOS/PEG as immobilized carrier, enzyme activity was detected for characteristic study. 【Result】 The best methods and fixed conditions for immobilization were: (1) Chitosan immobilized laccase (IE1): the best concentration of glutaraldehyde 0.4 mol/L, the optimum crosslinking time 8 h, the best to the enzyme 1.5 mg/g; (2) Chitosan immobilized copper (IE2), the best content of CuSO₄ · 5H₂O was 0.6 mg/g, the optimal time of 10 h, the best to the enzyme 0.25 mg/g; (3) Alginate/immobilized chitosan (IE3): 0.2 mol/L sodium alginate, 0.2 mol/L CaCl₂, 0.1 mol/L glutaraldehyde, 0.15 mol/L chitosan. The volume of the best enzyme was 1.5 mg/g; (4) TEOS/PEG immobilized (IE4): The optimum PEG molecular weight of 600—800, the best concentration 1.5 g/g, the best to the enzyme 1.5 mg/g. The optimum temperature of IE1 and IE4 was 60 ℃, IE2 and IE3 30 ℃. The optimum pH value for IE1, IE3 and IE4 was 4.5, IE2 4.0. IE pH stability, thermal stability

* [收稿日期] 2009-04-28

[基金项目] 奥地利政府项目(2004)

[作者简介] 张 莉(1974—),女,江苏涟水人,讲师,在职博士,主要从事农业资源开发与利用研究。E-mail: happy74@126.com

[通信作者] 贾志宽(1962—),男,山西朔州人,教授,博士生导师,主要从事旱区农业资源开发与利用研究。

and storage stability were superior to those of laccase. 【Conclusion】 The optimum pH and temperature of IE vary with different immobilized carriers. The stability of IE is better than free laccase.

Key words: laccase; enzyme immobilization; enzymatic property; enzyme stability

漆酶对变性剂、逆境因素和毒理作用具有高度的敏感性,这一特点限制了漆酶的有效和重复利用^[1-7]。酶固定化技术是实现酶重复连续利用和稳定性改善的有效手段^[8]。固定化漆酶是将水溶性漆酶以物理或化学的方法固定在有机或无机载体上,形成不溶于水的具有酶活性的酶衍生物^[9]。固定化处理既保持了酶的催化活性,又增加了酶的稳定性,并且与反应产物溶液分离,利于连续使用。酶的固定化拓宽了漆酶在废水处理、生物传感器构建等领域的应用。

载体和固定方法的选择,对固定化酶的酶学性质具有非常重要的影响。近年来,国内外在真菌漆酶的固定化中使用的载体,主要有多孔玻璃、壳聚糖、硅藻盐和纤维素聚胺复合物等^[10-18]。由于壳聚糖具有亲水性、生物相容性以及抗微生物分解等特性,而且来源非常丰富,因此常被用作酶的固定化载体。在一些酶的固定化研究中,会对壳聚糖进行改性处理,如用聚乙二醇、磁流体、硫酸铜溶液等^[16]。由于改性后的壳聚糖载体具有较高的比表面积,故可固定大量的酶,同时在磁场作用下,其可从反应体系中迅速分离,有利于回收和反复使用,所以以其复合材料作为固定化漆酶的新型载体,已受到越来越多的关注。

白腐菌是一类丝状真菌,是迄今为止最有效、最主要的木质素降解微生物,在自然界的碳素循环中具有重要作用^[19-23]。漆酶是白腐菌木质素降解酶系中重要而特殊的一员,白腐菌中栓菌属(*Trametes*)是最有效的漆酶生产者^[19]。*Trametes pubescens* MB89 是近年来工业生产漆酶常用的菌种之一,但目前对 *T. pubescens* MB89 漆酶的研究,多集中在酶发酵生产的条件优化、酶的分离纯化、基本酶动力学性质等方面^[19,24],尚未见有关 *T. pubescens* MB89 漆酶固定化的研究报道。

本研究以白腐菌 *T. pubescens* MB89 漆酶为研究酶,以壳聚糖、壳聚糖铜、海藻酸钙、凝胶等材料为载体,利用包埋、交联、吸附和化学键配位等方法制备固定化漆酶,研究交联剂浓度、固定化时间、缓冲液 pH 值、初始酶液浓度等因素对固定化漆酶活力的影响,确定载体固定化漆酶的最佳操作条件,同时比较固定化酶和游离酶的最适 pH 值和最适温度等

酶学性质,以期对白腐菌漆酶的生产应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

漆酶,以白腐菌 *T. pubescens* MB89 为生产菌,经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀分级、离子交换等纯化步骤于实验室制备。

1.2 漆酶的活性测定

1.2.1 游离漆酶活性的测定 在 1 mL HAc-NaAc 缓冲液(pH 3.5)中加入 1 mL 0.08 g/L 漆酶水溶液和 1 mL 1 mmol/L 邻甲联苯胺水溶液,在比色皿中混合均匀,于 600 nm 处测定吸光度的变化,将每 min 使 1 μmol 底物吸光度升高 0.001 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。游离酶比活力($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)用每 mg 游离酶的活力表示。

1.2.2 固定漆酶活性的测定^[12] 准确称取 0.01 g (湿质量)固定化漆酶于烧杯中,加入 2 mL 浓度为 1 mmol/L 的邻甲联苯胺水溶液和 2 mL HAc-NaAc 缓冲液(pH 3.5),在室温下搅拌反应 10 min,离心取上清液,于波长 600 nm 处测定吸光度的变化。按下式计算固定化酶的活性保持率和固定化酶的比活力:

固定化酶活性保持率/% = 固定化后固定酶活力/加入溶液酶活力 $\times 100\%$ 。

固定化酶比活力/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) = 固定化后固定酶总活力/固定化酶干质量。

1.3 漆酶的固定化

1.3.1 壳聚糖固定化漆酶(简称为 IE1) (1)载体的制备。将一定量的壳聚糖粉(脱乙酰度(%)为 70%~80%,80 目)溶于一定量 0.1 mol/L 的冰醋酸中,搅拌均匀,静置 1 h,充分溶解,形成胶状溶液,用针形注射器滴加到凝结剂(2 mol/L NaOH)中,形成球形颗粒,注射器针头距离凝结剂液面 5 cm,速度 50~60 滴/min。水洗至中性,抽滤脱水制成球状壳聚糖载体。(2)酶的固定化。将制备的球状壳聚糖载体与戊二醛溶液混合,在室温下慢速振荡 5 min,静置过夜,进行一定时间的交联,洗去多余戊二醛,抽滤,加入 50 mmol/L 琥珀酸缓冲液(pH 4.5)和一定量漆酶母液,置于混匀器上,搅拌一定时

间,静置、抽滤,得固定化酶。

1.3.2 壳聚糖铜固定化漆酶(简称为 IE2) (1)载体制备。将壳聚糖用体积分数 0.2 mol/L 的醋酸水溶液配成溶液。称取适量硫酸铜,用一定量蒸馏水溶解后,将两种溶液混合置于摇床上络合 12 h,静置 30 min,加入体积分数 95% 的乙醇沉淀,然后于 4 000 r/min 离心,用蒸馏水反复洗涤沉淀直至用 Na_2S 溶液检测上清液中无铜离子,制得浅绿色的壳聚糖铜,将所得载体置于冰箱中冷藏保存备用。(2)固定化。称取 2 g 壳聚糖铜,加入 7 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液,浸泡 30 min,加入 0.253 mg/mL 的粗酶液 1.2 mL,在 20 ℃ 恒温水浴振荡器中固定 2 h,静置 30 min,然后于 3 600 r/min 离心,用蒸馏水反复洗涤沉淀,直至用邻联甲苯胺检测上清液中无游离酶存在,制得黄绿色的固定化酶。

1.3.3 海藻酸钠/壳聚糖固定化漆酶(简称为 IE3)

(1)海藻酸钙包埋。称取一定量的海藻酸钠,加水 50 mL 加热溶解,加入 5 mL 粗酶液搅拌均匀,用 5 号注射器加入到含有一定浓度壳聚糖的一定浓度 CaCl_2 溶液中,并拉成管状,凝固 2 min,用蒸馏水洗涤,滤干备用。(2)壳聚糖交联。将固定化酶加入到一定浓度的戊二醛溶液中进行交联,隔夜(10 h)后用水洗涤数次,将残余戊二醛洗去置于 4 ℃ 冰箱中冷藏备用。

1.3.4 正硅酸乙酯(TEOS)/聚乙二醇(PEG)法固定漆酶(简称为 IE4) (1)载体制备。称取 3 g 正硅酸乙酯,与一定量蒸馏水、一定量聚乙二醇、0.05 mL 0.4 mol/L 醋酸溶液混合搅拌均匀后,边混合边加入 0.08 mL 0.25 mol/L 的 NaOH 溶液,得透明均匀的溶胶溶液 A。称取一定量的漆酶,溶于 10 mL 一定 pH 值的醋酸缓冲液中,配成一定浓度的酶液,4 ℃ 保存,作为 B 溶胶溶液。(2)酶的固定化。将溶液 A、B 按 3 : 1 的质量比混溶于试管中,搅拌至形成均匀凝胶,于 4 ℃ 冰箱中陈化。7~10 d 后,刮取干裂的含酶凝胶,切成颗粒状,用醋酸缓冲液清洗,然后保存在冰箱内备用。

1.4 漆酶固定化处理条件的确定

1.4.1 IE1 (1)戊二醛浓度。分别制备 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mol/L 的戊二醛溶液用于固定化漆酶处理,测定所得固定化酶的酶活性,计算固定化酶的比活力,确定戊二醛的最佳浓度。每个处理重复 3 次,结果取平均值。(2)交联时间。分别将交联时间设为 2,4,6,8,10,12 和 14 h,测定固定化酶的酶活性,计算固定化酶的比活力,比较不同

交联时间对固定化酶比活力的影响。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.4.2 IE2 (1) Cu^{2+} 质量浓度。分别称取 0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 和 0.9 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,加 5 mL 水后再与 1.3.2 方法制得的壳聚糖醋酸溶液络合 10 h,按照前述固定化方法制备固定化酶。测定固定化酶酶活性,计算固定化酶的比活力,比较 Cu^{2+} 质量浓度对固定化漆酶比活力的影响,确定 Cu^{2+} 的加入量。每个处理重复 3 次,结果取平均值。(2)络合时间。将适量 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 与壳聚糖,按照前述固定化酶制备方法分别络合 4,6,8,10,12 和 14 h 后,制成固定化酶。测定固定化酶酶活性,计算固定化酶的比活力,比较络合时间对固定化漆酶比活力的影响,确定最佳的络合时间。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.4.3 IE3 分别配置质量分数为 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 和 0.3 mol/L 的戊二醛、 CaCl_2 、壳聚糖和海藻酸钠溶液,按照上述固定化方法进行漆酶的固定,测定所得固定化酶的酶活性,计算固定化酶的比活力,分析戊二醛、 CaCl_2 、壳聚糖和海藻酸钠质量浓度对固定化漆酶比活力的影响,确定其适宜的质量浓度。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.4.4 IE4 (1)聚乙二醇(PEG)的分子质量。分别添加 1.0 g 分子质量分别为 200,400,600,800,1 000,1 200 和 1 400 的 PEG,进行漆酶固定并测定固定化酶的活性,计算固定化酶的比活力,筛选 PEG 的最佳分子质量。每个处理重复 3 次,结果取平均值。(2)聚乙二醇的添加量。分别取 0.5,1.0,1.5,2.0 和 2.5 g PEG 固定相同量的漆酶,测定固定化漆酶的酶活性,计算固定化酶的比活力,确定 PEG 的适宜添加量。每个处理 3 次重复,结果取平均值。

1.5 给酶量对漆酶固定化酶酶活性的影响

在 0.2,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 mg/g 给酶量条件下,进行漆酶的固定化处理,分别测定 4 种固定化漆酶和游离漆酶的酶活性,计算酶的比活力,分析不同给酶量对固定化漆酶酶活性的影响。每个处理 3 次重复,结果取平均值。

1.6 固定化酶的性质

1.6.1 温度对固定化酶性质的影响 在温度 10~100 ℃,每隔 10 ℃ 分别测定游离漆酶和 4 种固定化漆酶的酶活性,计算酶的比活力,确定固定化漆酶的最适作用温度。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.6.2 pH 值对固定化漆酶性质的影响 在 pH 为

3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0 和 6.5 时,分别测定游离漆酶和 4 种固定化漆酶的酶活性,计算酶的比活力,确定固定化漆酶的最适作用 pH 值。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.7 固定化酶的稳定性

1.7.1 热稳定性 取适量的游离酶和固定化酶于 10~100 ℃ 水浴,放置 60 min 后取出测定酶活性,以最大酶活性为 100% 相对酶活力,计算不同温度条件下的相对酶活力,分析固定化漆酶酶活性与温度变化的关系,比较不同固定化方法对漆酶热稳定性的影响。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.7.2 酸碱稳定性 取适量的游离漆酶和固定化漆酶,置于不同 pH 的缓冲液中于室温下放置 60 min 后,取出测定酶活性,以最大酶活性为 100% 相对酶活力,计算不同 pH 值条件下的相对酶活力,分析固定化漆酶酶活性与 pH 变化的关系,比较不同固定化方法对漆酶酸碱稳定性的影响。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

1.7.3 贮藏稳定性 取适量的游离酶和固定化酶于 4℃ 条件下存放 0~6 周,定期测定酶活性,以最大酶活性为 100% 相对酶活力,计算不同贮藏时间的相对酶活力,分析固定化漆酶酶活性与贮藏时间的关系,比较不同固定化方法对漆酶贮藏稳定性的影响,确定固定化酶的最佳贮藏时间。每个处理重复 3 次,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 载体对漆酶固定化酶酶活性的影响

2.1.1 IE1 的固定化效果 壳聚糖是自然界中仅次于纤维素的第二大可再生资源,其是从虾、蟹等甲壳动物的壳中提取出来的甲壳素脱乙酰化后的产

物,属于一种氨基多糖。由于其分子链上含有大量的羟基和氨基,易于进行化学改性。因此,目前国内外很多研究者在进行固定化酶的有关研究时,都以壳聚糖为载体^[12]。

(1)戊二醛浓度对 IE1 固定化效果的影响。在以壳聚糖为载体、采用吸附交联法固定漆酶的过程中,戊二醛作为交联剂对固定化效果具有一定的影响^[8]。

从图 1 可以看出,戊二醛的浓度为 0.1~0.4 mol/L 时,IE1 的比活力随着戊二醛浓度的增加而增大,戊二醛浓度为 0.4~0.5 mol/L 时,IE1 的比活力一直保持在较高水平。此后继续增加戊二醛浓度,IE1 的比活力又呈下降趋势。可见,戊二醛浓度对 IE1 的固定化效果具有很大影响。尽管戊二醛是交联固定过程中一个经常使用的优良交联剂,但其同时又具有酶的变性剂作用,因此在使用戊二醛进行酶的交联固定化时,既要一定浓度的戊二醛来保证壳聚糖分子的氨基反应能形成最大的活性基团,又要避免高浓度戊二醛与壳聚糖发生分子内和分子间的交联,降低载体与酶的结合能力。

(2)交联时间对 IE1 固定化效果的影响。由图 2 可见,交联时间小于 8 h,随着戊二醛活化时间的增加,IE1 比活力逐渐增大,于交联 8 h 时达到最大,为 196 U/mg。若继续延长交联时间,IE1 比活力又呈缓慢下降趋势。戊二醛作为固定化酶的优良交联剂,具有双功能基团,其一侧醛基与壳聚糖载体上的氨基偶联后,就在载体表面出现游离醛基,该醛基含量直接关系到酶的固定量。随着戊二醛活化时间的增加,载体表面醛基的含量明显增加,但醛基含量达到一定程度后则趋于平衡,酶的固定量也相应达到饱和而不再增加。

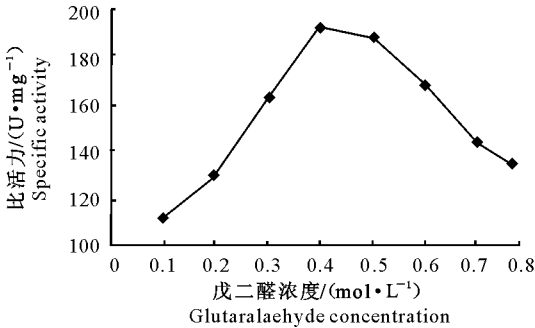


图 1 戊二醛浓度对 IE1 比活力的影响

Fig. 1 Effect of concentration of glutaraldehyde on the specific activity of IE1

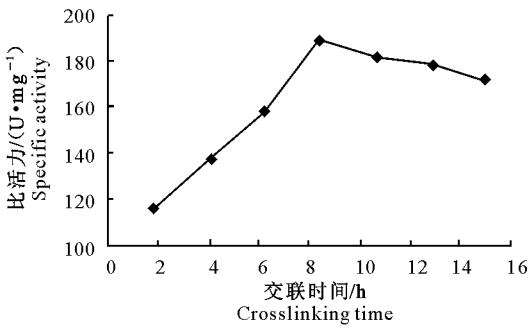


图 2 交联时间对 IE1 比活力的影响

Fig. 2 Effect of crosslinking time on the specific activity of IE1

2.1.2 IE2 的固定化效果 由于壳聚糖的分子链

上含有大量的羟基和氨基,有利于化学修饰和改性。

Cu^{2+} 可以与壳聚糖的 $-\text{NH}_2$ 发生络合反应,形成高分子络合物,由于高分子键的刚性作用,若络合物中 Cu^{2+} 的配位未达到饱和,则其可进一步与酶中的游离氨基酸配位,使酶以配位键的形式固定在壳聚糖上^[23]。

(1) Cu^{2+} 添加量对 IE2 固定化效果的影响。图 3 是以 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 作为 Cu^{2+} 来源,在 1 g 壳聚糖载体上,分别添加不同量的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 时 IE2 比活力的测定结果。从图 3 可以看出, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的添加量为 0.2~0.6 mg/g 时,随着 Cu^{2+} 添加量的增加,IE2 的比活力迅速增大,并于 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的添加量为 0.6 mg/g 时,IE2 的比活力达到最大值,为 351 U/mg。当 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的添加量超过 0.6 mg/g 时,随着 Cu^{2+} 添加量的增加,IE2 比活力呈缓慢下降趋势。张莉^[24] 在 *T. pubescens*

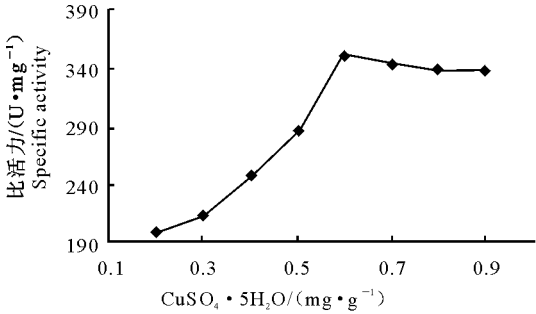


图 3 Cu^{2+} 添加量对 IE2 比活力的影响

Fig. 3 Effect of Cu^{2+} concentration on the specific activity of IE2

由图 4 可以看出,在络合作用开始的 2~6 h, IE2 的比活力基本维持在 350 U/mg 左右,总体来看呈增大趋势,但变化幅度并不明显。在络合作用 6~10 h,IE2 的比活力随着络合时间的延长而快速增加,由络合 6 h 时的 351 U/mg 增大到络合 10 h 的 398 U/mg。当络合时间超过 10 h 时,IE2 的比活力开始出现缓慢下降;当络合时间达到 14 h 时,IE2 的比活力下降到 389 U/mg。出现这种结果的原因,可能是由于载体上的配位键相互作用,而使载体网络结构过于拥挤,空间阻碍导致了络合过程的减缓或停滞。

2.1.3 IE3 的固定化效果 海藻酸钠-壳聚糖固定是包埋和交联共同作用的一种固定方法。海藻酸钠是由 β -(1,4)-D 甘露糖醛酸(M)和 α -(1,4)-L 古洛糖醛酸(G)组成的线性高聚物。海藻酸盐分子链的 G 块很容易与 Ca^{2+} 作用,两条分子链 G 块间形成一个洞,结合 Ca^{2+} 后成“蛋盒”模型,形成热不可逆凝胶,从而可以在包埋法固定酶的过程中通过凝胶网

络使酶得到固定。在适当的 pH 下,壳聚糖的氨基容易形成阳离子聚电解质,海藻酸钠的羧基在水中易离子化形成阴离子聚电解质。壳聚糖和海藻酸钠可以相互吸引形成稳定的聚电解质化合物。同时,壳聚糖和戊二醛还可以形成 Schiff 碱,在固定化酶的过程中起到交联的效果。

(2)络合时间对 IE2 固定化效果的影响。将壳聚糖与 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 0.2 mol/L 的醋酸缓冲液中分别络合 2~14 h,IE2 比活力的测定结果如图 4 所示。

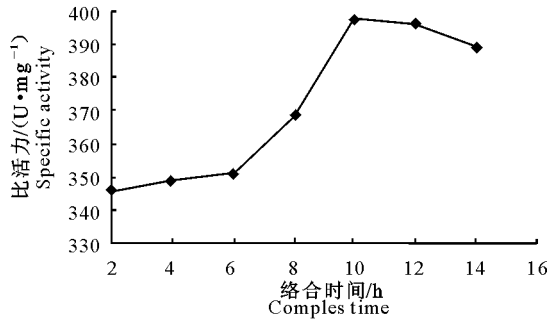


图 4 络合时间对 IE2 比活力的影响

Fig. 4 Effect of complex time on the specific activity of IE2

络使酶得到固定。在适当的 pH 下,壳聚糖的氨基容易形成阳离子聚电解质,海藻酸钠的羧基在水中易离子化形成阴离子聚电解质。壳聚糖和海藻酸钠可以相互吸引形成稳定的聚电解质化合物。同时,壳聚糖和戊二醛还可以形成 Schiff 碱,在固定化酶的过程中起到交联的效果。

(1)海藻酸钠浓度对 IE3 固定化效果的影响。从图 5 可以看出,当海藻酸钠浓度为 0.05~0.2 mol/L 时,IE3 的比活力随着海藻酸钠含量的增加接近于直线增长趋势。当海藻酸钠的浓度超过 0.20 mol/L 时,IE3 的比活力有较小幅度的下降。海藻酸钠浓度的增加,可以增加漆酶被包埋的机会,但若海藻酸浓度过高,会导致载体强度增加,使其表面致密程度加强,限制了底物的快速扩散,减少了底物与酶结合的机会,从而使 IE3 的比活力在海藻酸钠大量存在时出现下降。

(2) Ca^{2+} 浓度对 IE3 固定化效果的影响。 Ca^{2+} 在海藻酸钠凝胶网络形成的过程中,具有稳定凝胶

网络的作用。Ca²⁺ 浓度对 IE3 比活力的影响结果如

图 6 所示。

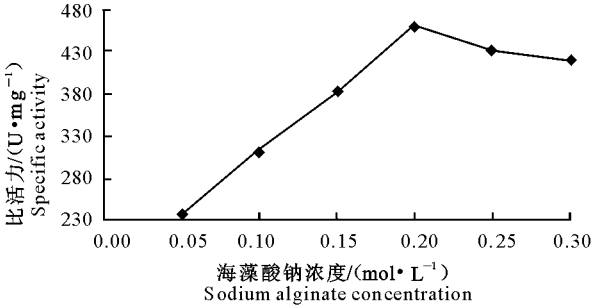


图 5 海藻酸钠浓度对 IE3 比活力的影响
Fig. 5 Effect of sodium alginate concentration on the specific activity of IE3

由图 6 可见,当 Ca²⁺ 浓度为 0.05~0.20 mol/L 时,随着 Ca²⁺ 浓度的提高,IE3 的比活力呈上升趋势;当 Ca²⁺ 浓度为 0.20 mol/L 时,IE₃ 的比活力达到最大,其后又随 Ca²⁺ 浓度的升高而降低。这是因为 Ca²⁺ 对载体凝胶的形成起稳定作用,同时 Ca²⁺ 对漆酶催化活性有抑制作用^[16],所以 CaCl₂ 对 IE3 比活力的影响表现出先升高后降低的变化趋势。

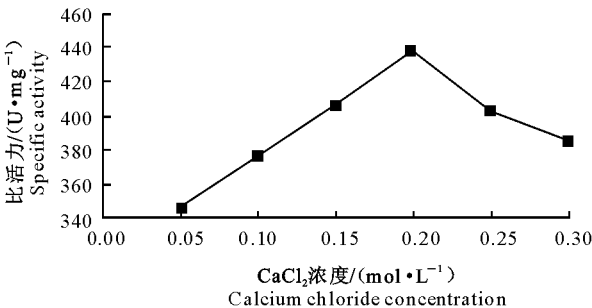


图 6 CaCl₂ 浓度对 IE3 比活力的影响
Fig. 6 Effect of calcium chloride concentration on the specific activity of IE3

(3)戊二醛浓度对 IE3 固定化效果的影响。戊二醛与壳聚糖会发生 Schiff 碱反应,从而在凝胶表面形成一层致密的保护膜,增加了载体凝胶的强度^[13]。戊二醛浓度对 IE3 比活力的影响结果如图 7 所示。从图 7 可以看出,IE3 的比活力随着戊二醛浓度的增加,表现出先迅速上升后缓慢下降的变化趋势。当戊二醛浓度为 0.10 mol/L 时,IE3 的比活

力达到最大;继续增加戊二醛浓度,IE3 的比活力一直呈下降趋势;当戊二醛的浓度为 0.3 mol/L 时,IE3 的比活力仅为 64%。这是由于戊二醛在酶与载体交联固定的过程中,形成致密的聚电解质膜,抑制了底物与酶的结合,从而对酶的活性产生了影响。

(4)壳聚糖浓度对 IE3 固定化效果的影响。由图 8 可以看出,随着壳聚糖浓度的增加,IE3 的比活力呈现出先增大后减小的变化趋势。当壳聚糖浓度为 0.15 mol/L 时,IE3 的比活力达到最大;继续增加壳聚糖含量,IE3 的比活力反而下降。出现这种结果的原因是因为高浓度的壳聚糖,增强了载体表面聚电解质膜的致密性,导致底物和酶接触困难,从而引起 IE3 的比活力下降。

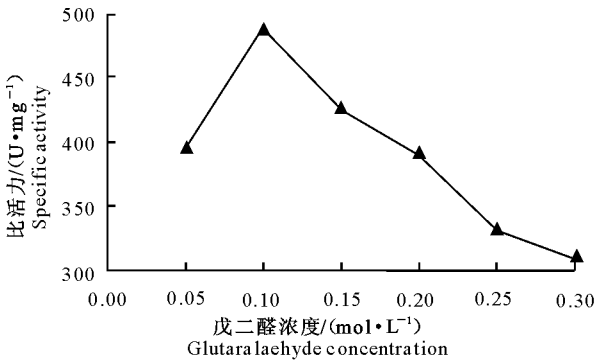


图 7 戊二醛浓度对 IE3 比活力的影响
Fig. 7 Effect of glutaraldehyde concentration on the specific activity of IE3

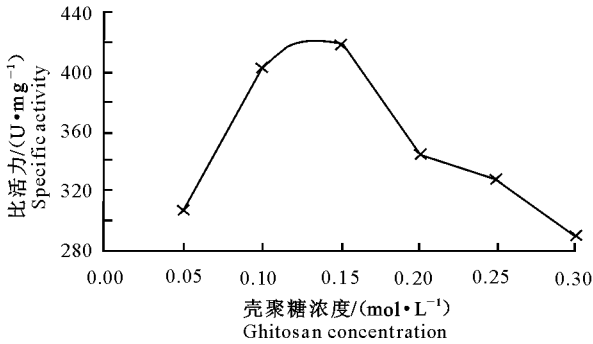


图 8 壳聚糖浓度对 IE3 比活力的影响
Fig. 8 Effect of chitosan concentration on the specific activity of IE3

2.1.4 IE4 的固定化效果 TEOS/PEG 属于溶胶-凝胶技术,是一种物理包埋固定酶的过程。在保持生物酶活性和反应稳定性等方面表现出较大的优势,是一种较好的生物酶固定化技术^[16]。聚乙二醇(PEG)具有优良的粘接性和热稳定性,故常用作粘

结剂和热稳定剂,不同分子质量的 PEG 理化性质也存在着较大的差异。

(1)不同分子质量 PEG 对 IE4 固定化效果的影响。分别添加不同分子质量的 PEG,测定 IE4 的比活力,考察 PEG 分子质量对 IE4 比活力的影响,其

结果如图 9 所示。从图 9 可以看出,随着 PEG 分子质量的提高,IE4 的比活力表现出先迅速增大后缓慢下降的变化趋势。当 PEG 的分子质量为 600 时,IE4 的比活力最大,为 302 U/mg;当 PEG 分子质量为 800 时,IE4 的比活力为 298 U/mg,也维持在较高的活力水平。该试验结果表明,PEG 的分子质量为 600~800 时,IE4 可以取得较好的固定化效果。

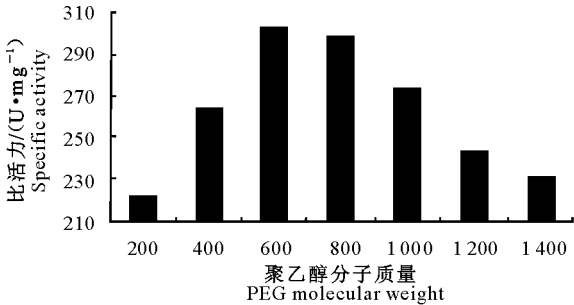


图 9 PEG 分子质量对 IE4 比活力的影响
Fig. 9 Effect of PEG molecular weight on the specific activity of IE4

2.2 给酶量对漆酶固定化效果的影响

2.2.1 IE1 从图 11 可以看出,当给酶量为 0.2~1.5 mg 时,IE1 的比活力呈直线上升,IE1 的比活力于加酶量为 1.5 mg 时达到最大,此后继续增加酶量,IE1 的比活力趋于平衡而基本保持不变。在给酶量为 0.2~1.5 mg 时,IE1 酶的活性保持率下降

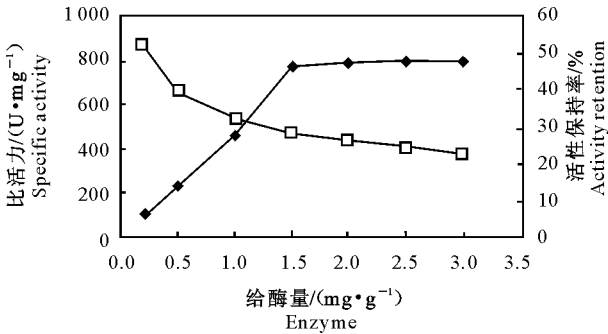


图 11 给酶量对 IE1 比活力及活性保持率的影响
Fig. 11 Effect of enzyme loading amount on the specific activity and activity retention of IE1

2.2.2 IE2 从图 12 可以看出,当给酶量为 0.1~0.4 mg 时,IE2 的比活力随着给酶量的增加呈“平缓增加—迅速增大—保持稳定”的变化趋势。当给酶量为 0.25 mg 时,IE2 的比活力达到最高,其后继续增加酶量,IE2 比活力趋于平衡。在给酶量为 0.1~0.2 mg 时,IE2 的活性保持率下降较快,继续增加给酶量,IE2 的酶活性保持率一直呈缓慢下降趋势。从 IE2 比活力和活力保持率两方面综合分析,在以壳聚糖铜为载体固定化漆酶时,最适给酶量

(2)PEG 添加量对 IE4 固定化效果的影响。分别添加 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 g/g 分子质量为 600 的 PEG,测定 IE4 比活力的变化,其结果如图 10 所示。由图 10 可知,随着 PEG 添加量的增加,IE4 比活力呈先迅速增大后缓慢下降的趋势,当 PEG 添加量为 1.5 g/g 时,IE4 的比活力达到最大,表明 1.5 g/g 为 PEG600 的最适添加量。

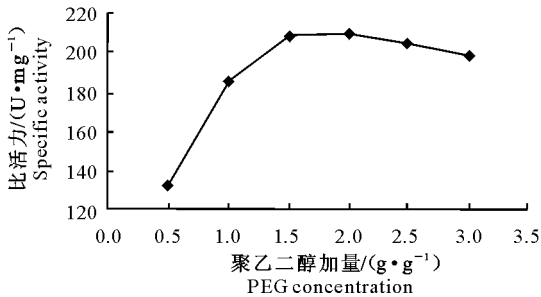


图 10 PEG 添加量对 IE4 比活力的影响
Fig. 10 Effect of PEG concentration on the specific activity of IE4

较快,继续提高给酶量,IE1 的活性保持率维持在 20%~30%,变化幅度较小。因此,从 IE1 的比活力和酶活性保持率两方面考虑,在以壳聚糖为载体固定化漆酶时,最适给酶量为 1.5 mg,此时酶的活性保持率为 28.9%。

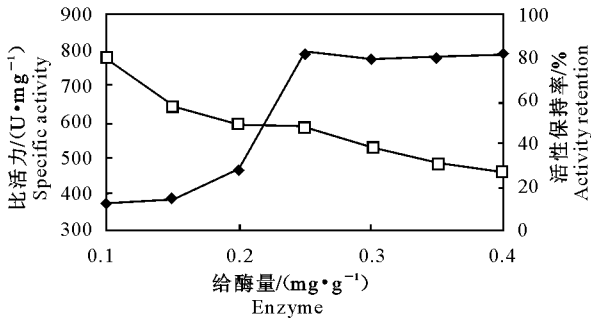


图 12 给酶量对 IE2 比活力及活性保持率的影响
Fig. 12 Effect of enzyme loading amount on the specific activity and activity retention of IE2

为 0.25 mg,此时酶的活性保持率为 47.9%。
2.2.3 IE3 分别将 1 g 海藻酸钠-壳聚糖载体与不同量的漆酶混合固定,测定所得固定酶 IE3 的比活力和酶活性保持率,其结果如图 13 所示。由图 13 可以看出,当漆酶给酶量为 0.5~1.5 mg 时,IE3 的比活力与给酶量呈正比例上升关系,继续增加给酶量,IE3 的比活力逐渐趋于平衡,并基本保持不变。当漆酶给酶量为 0.5~1.5 mg 时,IE3 的活性保持率随给酶量的增加接近于直线下降趋势,若继

续增加给酶量,酶活性保持率的变化幅度有所减小。综合分析认为,以海藻酸钠-壳聚糖为载体时,最适给酶量为 1.5 mg,此时酶活性保持率为 31.2%。

2.2.4 IE4 由图 14 可见,当给酶量为 0.5~1.5 mg 时,IE4 的比活力接近于直线上升。继续增加给酶量,IE4 的比活力趋于平衡而基本保持不变。在

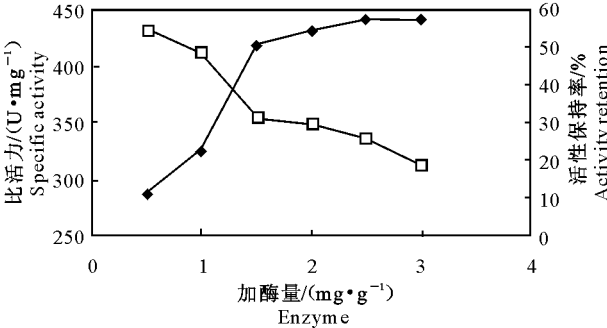


图 13 给酶量对 IE3 比活力及活性保持率的影响

Fig. 13 Effect of enzyme loading amount on the specific activity and activity retention of IE3

2.3 固定化漆酶的酶学性质

2.3.1 最适温度 通常固定化酶的最适作用温度与游离酶差不多,活化能也变化不大。但是有些固定化酶的最适温度与游离酶会有较为明显的差异^[11-13]。同一种酶,在采用不同的方法或不同的载

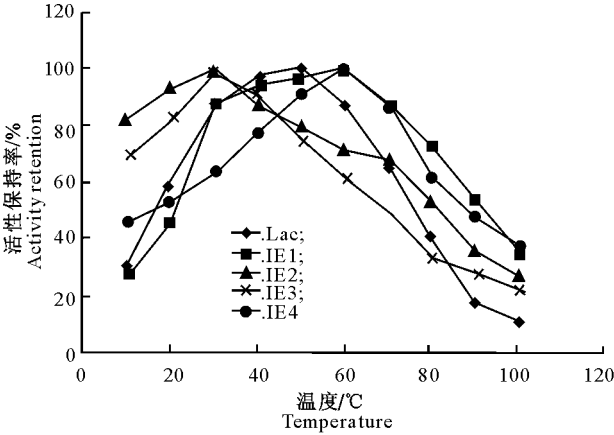


图 15 温度对游离漆酶及固定化漆酶活性保持率的影响

Fig. 15 Effect of temperature on the activity retention of immobilized laccase

从图 15 可以看出,温度对游离漆酶及利用不同载体和方法所得的固定化漆酶活性保持率的影响各不相同。在 50 °C 时,Lac 的活性保持率达到最大;IE1 和 IE4 的最适温度均为 60 °C,较 Lac 的最适温度提高了 10 °C,说明以壳聚糖和 TEOS/PEG 为载体固定漆酶时,可以使酶的热稳定性有所提高;IE2 和 IE3 的酶活性均在 30 °C 时达到最大,低于 Lac 的

试验给酶量范围内,IE4 的活性保持率随着给酶量的增加而下降。因此从 IE4 的比活力及酶活性保持率两方面考虑,在以 TEOS/PEG 为载体固定漆酶时,最适给酶量为 1.5 mg,此时酶活性保持率为 47.3%。

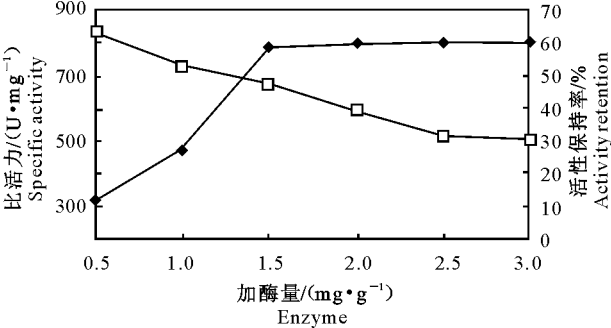


图 14 给酶量对 IE4 比活力及活性保持率的影响

Fig. 14 Effect of enzyme loading amount on the activity and activity retention of IE4

体进行固定化处理后,其最适温度也可能不同^[14]。本研究在 10~100 °C 水浴 60 min 后,测定并比较了游离漆酶(Lac)和 4 种固定化漆酶(IE1,IE2,IE3 和 IE4)酶活力的变化,其结果如图 15 所示。

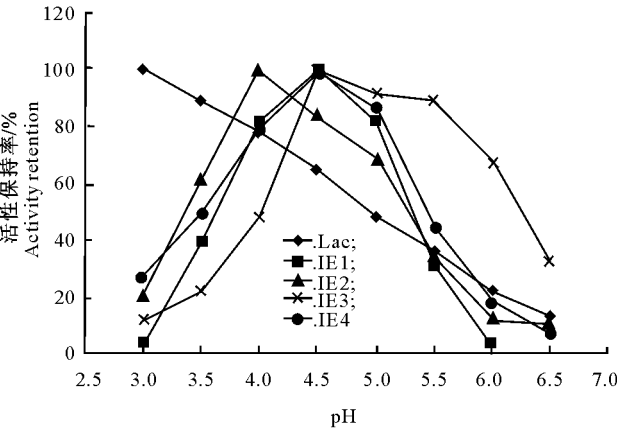


图 16 pH 值对游离漆酶及固定化漆酶活性保持率的影响

Fig. 16 Effect of pH on the activity retention of immobilized laccase

最适温度,说明这两种固定化酶对温度比较敏感。

2.3.2 最适 pH 值 酶经过固定化处理后,其作用的最适 pH 值往往会发生变化。影响固定化酶最适 pH 值的因素主要是载体的带电性质和酶催化反应产物的性质。由于 *T. pubescens* MB89 漆酶为酸性适宜酶,所以选取 pH=3.0~6.5,测定 pH 对固定化酶活性的影响,确定固定化漆酶的最适 pH。

从图 16 可以看出,IE1、IE3 和 IE4 的最适 pH 值均为 4.5,IE2 为 4.0。与 Lac 的最适 pH 值相比,4 种固定化漆酶的最适 pH 值均向碱性方向偏移。从 4 种酶的固定化过程来看,最适 pH 的变化通常是由载体的静电荷决定的,使用阳离子型载体时,会使固定化酶的微环境 pH 值较外部溶液偏碱性,因此要求固定化酶的宏观环境必须具有偏酸性的最适 pH 值,才可能获得固定化酶的最适作用 pH 值。而图 16 所示的试验结果与这一理论并不符合,导致这种变化的机理尚有待于进一步研究。

2.3.3 稳定性 固定化酶的稳定性一般强于游离酶。主要表现为其热稳定性提高、保存稳定性和对

环境体系的适应性增强。

(1)酸碱稳定性。图 17 是 4 种固定化漆酶和游离酶在不同 pH 条件下处理 60 min 后的酶活性保持率的变化情况。从图 17 可以看出,在不同酸碱环境下处理 60 min 后,IE1、IE2、IE3 和 IE4 获得最大酶活性保持率的 pH 值分别是 4.5,4.0,4.5 和 4.5;最小酶活性保持率的 pH 值分别是 6.0,6.5,3.0 和 3.5。综合前面研究可知,4 种固定化酶酸碱稳定性最好的 pH 值分别与其最适 pH 相一致。

(2)热稳定性。图 18 是 4 种固定化漆酶和游离漆酶在不同温度处理 60 min 后酶活性保持率的变化情况。

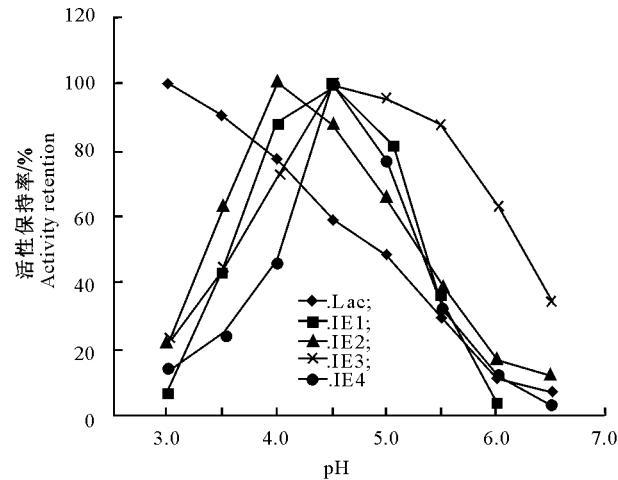


图 17 游离漆酶及 4 种固定化漆酶酸碱稳定性的比较
Fig. 17 pH stability of immobilized laccase

从图 18 可以看出,4 种固定化酶获得最大酶活性的温度也分别与其最适合温度相一致。固定化漆酶的热稳定性高于游离漆酶。

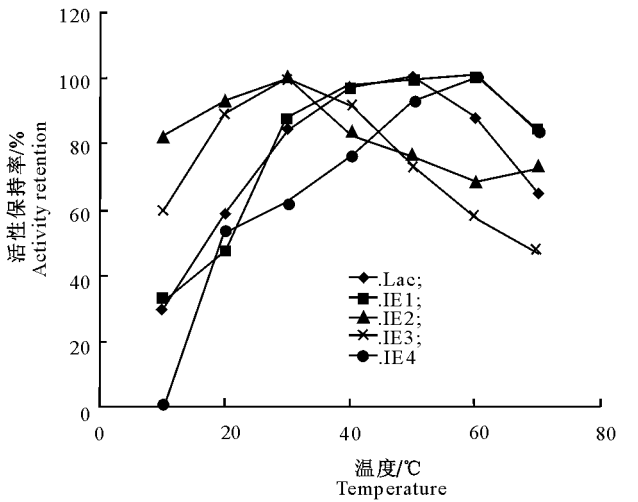


图 18 游离漆酶及 4 种固定化漆酶热稳定性的比较
Fig. 18 Thermal stability of immobilized laccase

(3)贮存稳定性。将 4 种固定化漆酶和 Lac 在 4℃ 保存,分别在保存的 0,1,2,3,4,5 和 6 周测定其相对酶活性,结果如表 1 所示。

表 1 游离漆酶及 4 种固定化漆酶贮存稳定性的比较
Table 1 Storage stability of immobilizedlaccase

贮存时间/周 Time	相对酶活性/% Relative activity				
	Lac	IE1	IE2	IE3	IE4
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	52.30	87.65	89.36	93.64	87.46
2	38.24	76.88	78.64	85.36	79.32
3	21.32	73.45	67.38	79.43	69.38
4	16.50	69.68	58.76	68.45	61.47
5	7.85	53.45	49.57	59.68	57.69
6	3.21	49.86	41.36	54.76	49.86

由表 1 可以看出,在贮存 1 周后,Lac 的酶活性大幅度下降,其保存的活性仅为原活性的 52.3%,而 4 种固定化漆酶的活性均得到了很高程度的保存。比较固定化酶的酶活性变化可以看出,IE3 的贮藏稳定性优于其他 3 种固定化酶,即使贮存 6 周时其

酶活性依然可以保持在 50% 以上。

3 结 论

3.1 漆酶固定化处理条件的确定

(1)IE1:戊二醛的最佳浓度为 0.4 mol/L,最适

交联时间为 8 h,最佳给酶量为 1.5 mg/g。

(2) IE2: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的最佳添加量为 0.6 mg,最适络合时间为 10 h,最佳给酶量为 0.25 mg/g。

(3) IE3: 0.2 mol/L 海藻酸钠, 0.2 mol/L CaCl_2 , 0.1 mol/L 戊二醛, 0.15 mol/L 壳聚糖, 最佳给酶量 1.5 mg/g。

(4) IE4: 最适 PEG 的分子质量为 600~800, 最适添加量为 1.5 g, 最佳给酶量为 1.5 mg/g。

3.2 固定化漆酶的酶学性质

(1) 最适温度。Lac 的最适温度为 50 ℃, IE1 和 IE4 均为 60 ℃, IE2 和 IE3 为 30 ℃。

(2) 最适 pH 值。IE1、IE3 和 IE4 的最适 pH 值均为 4.5, IE2 为 4.0。与 Lac 的最适 pH 值相比, 4 种固定化酶的最适 pH 值均向碱性方向偏移。

3.3 固定化酶的稳定性

(1) 酸碱稳定性。IE1、IE2、IE3 和 IE4 获得最大酶活性的 pH 值分别是 4.5, 4.0, 4.5 和 4.5。4 种固定化酶酸碱稳定性最好的 pH 值分别与其最适 pH 相一致。

(2) 热稳定性。4 种固定化酶获得最大酶活性的温度也分别与其最适温度相一致。固定化酶的热稳定性高于游离酶。

(3) 贮存稳定性。固定化酶的贮存稳定性均优于游离酶。4 种固定化漆酶中, IE3 的贮藏稳定性最好, 贮存 6 周时其酶活性依然可以保持在 50% 以上。

[参考文献]

- [1] Galhaup C, Goller S, Peterbauer C K. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions [J]. Microbiology, 2002, 148: 2159-2169.
- [2] Yoshida H. Chemistry of Lacquer (Urusht) part1 [J]. J Chem Soc, 1883, 43: 472-486.
- [3] Albino A D. Environmental applications of fungal and plant systems: Decolourisation of textile wastewater and related dyestuffs [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [4] 赵敏, 魏兴东, 汪春蕾, 等. 细菌漆酶的研究进展 [J]. 中国造纸学报, 2008, 23(3): 107-114
Zhao M, Wei X D, Wang C L, et al. Research progress of Bacterial Laccase [J]. Transactions of China Pulp and Paper, 2008, 23(3): 107-114. (in Chinese)
- [5] 甘景镐. 酶工程学上进展与漆酶作用研究的途径再议 [J]. 中国生漆, 1991(1): 17.
Gan J G. Development of enzyme engineering and laccase industrial application [J]. Journal of chinese Lacquer, 1991(1):

17. (in Chinese)
- [6] 曹治云, 郑腾, 谢必峰, 等. 漆酶工业应用的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2004(4): 100-102.
Cao Z Y, Zheng T, Xie B F, et al. Advances of industrial application of laccase [J]. Letters in Biotechnology, 2004(4): 100-102. (in Chinese)
- [7] 魏华丽, 史安石, 石淑兰. 漆酶及其应用 [J]. 黑龙江造纸, 2004(4): 40-41.
Wei H L, Shi A S, Shi S L. Laccase and its applications [J]. Letters in Biotechnology, 2004(4): 40-41. (in Chinese)
- [8] 袁勤生. 现代酶学 [M]. 2 版. 上海: 华东理工大学出版社, 2001
Yuan Q S. Enzyme [M]. 2nd Ed. Shanghai: East China University Publishing House, 2001. (in Chinese)
- [9] D'Annibale A, Stazi S R, Vinciguerra V, et al. Oxirane immobilized laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 77: 265.
- [10] Jolival C, Brenon S, Caminade E, et al. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in water [J]. J Membrane Sci, 2000, 180: 103.
- [11] 孟庆强, 陈凌云, 赵镜浩. 用自由漆酶和固定漆酶处理 2,4-二氯苯酚土壤污染的研究 [J]. 水土保持科技情报, 2003(4): 33.
Meng Q Q, Chen Ling-yun, Zhao J H. Treatment of 2,4-dichlorophend polluted soil with free and immobilized laccase [J]. Scientific and Technical Information of Soil and Water Conservation, 2003(4): 33. (in Chinese)
- [12] 刁颖辉, 付时雨, 余惠生, 等. 利用酰胺活化聚乙烯醇作为载体固定漆酶的研究 [J]. 纤维素科学与技术, 2002, 10(3): 11.
Diao Y H, Fu S Y, Yu H S, et al. Study of immobilization of panus conchatus laccase on the Amide-Activated Polyvinyl Alcohol [J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2002, 10(3): 11. (in Chinese)
- [13] 肖亚中, 张书祥, 胡乔彦, 等. 壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理酚类污染物的研究 [J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 245.
Xiao Y Z, Zhang S X, Hu Q Y, et al. Immobilization of fungal laccase on chitosan and its use in phenolic effluents treatment [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(2): 245. (in Chinese)
- [14] Hublik G, Schinner F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 330.
- [15] 邱凌峰, 黄志心. Sol-gel 法固定化漆酶处理氯酚类污染物 [J]. 福州大学学报, 2008, 36(6): 910-914.
Qiu L F, Huang Z X. Chlorophenols treatment with immobilization of laccase by Sol-gel [J]. Journal of Fuzhou University, 2008, 36(6): 910-914. (in Chinese)

(下转第 166 页)