

纳米磁性微粒固定化脂肪 氧合酶的制备及其酶活研究

丁文武¹, 孙铭珍², 曹汝毅², 夏云空³

(1. 西华大学 生物工程学院, 四川 成都 610039;

2. 山东师范大学 历山学院, 山东 济南 250014; 3. 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610065)

摘要:采用纳米磁性四氧化三铁固定脂肪氧合酶,考察不同因素对游离酶和固定化脂肪氧合酶酶活的影响。结果表明:电镜观察微粒呈黑色短棒状粒子,固定在载体上酶的含量约为6.0%;游离酶与固定化脂肪氧合酶的最适温度均为30℃,游离酶最适pH为8.0,而固定化酶的最适pH为9.0,当双氧水的浓度分别达到14 g/L和8 g/L时,游离酶和固定化酶的活性分别达到最强;最适条件下,游离酶的酶活为 3.95×10^5 U/mL,固定化酶的酶活为 9.40×10^5 U/g。

关键词:纳米磁性微粒;固定化;脂肪氧合酶;酶活

中图分类号:TQ 925;Q 55 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)02-0079-04

Preparation of magnetic nanoparticles immobilized lipoxygenase and its activity

DING Wen-wu¹, SUN Ming-zhen², CAO Ru-yi², XIA Yun-kong³

(1. School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu Sichuan 610039;

2. Lishan College, Shandong Normal University, Jinan Shandong 250014;

3. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610065)

Abstract: Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles were prepared to immobilize lipoxygenase. The influence of factors on the enzyme activity of free enzyme and immobilized lipoxygenase was investigated. The results showed that the particulates were black short rod particles by TEM, and the mass of enzyme immobilized on the composite carrier was about 6.0%; the optional temperature for free enzyme and immobilized lipoxygenase was the same of 30℃; the optional pH value for free enzyme was 8.0, for immobilized lipoxygenase 9.0; The activity of the free and immobilized lipoxygenase showed a maximum activity when H_2O_2 concentration reached 14.0 g/L and 8.0 g/L, respectively. Under the optimum conditions, the activities of free and immobilized enzyme were 3.95×10^5 U/mL and 9.40×10^5 U/g, respectively.

Key words: magnetic nanoparticle; immobilization; lipoxygenase; enzyme activity

脂肪氧合酶为含铁的一种氧化还原酶,广泛存在于植物界中,从大豆中提取的脂肪氧合酶其活性高于其它植物来源的脂肪氧合酶,且提取脂肪氧合酶的效率较高^[1]。脂肪氧合酶是一种非耐热性酶,游离状态在室温下放置易失活,而固定化酶具有可

回收、易提纯、稳定性高、有利于实现连续反应等优点,可提高产物的质量,使酶的使用效率提高,降低成本^[2]。

1973年Robinson等第一次将磁性物质作为酶固定化的载体^[3],之后,磁性载体越来越多地应用于酶的固定化^[4-6]。纳米 Fe_3O_4 磁性载体,具有超顺磁性、高表面活性等特性,制备的固定化酶易于从反应体系中分离和回收,操作简便,并且利用外部磁

收稿日期:2014-08-19

基金项目:西华大学2014年校重点科研基金项目(zl420523)

作者简介:丁文武,1980年出生,男,山东人,讲师。

场可以控制磁性材料固定化酶的运动方式和方向,替代传统的机械搅拌方式,提高固定化酶的催化效率^[7];另一方面,与包埋方式的酶固定化等方法相比,纳米磁性载体具有比表面积大、分散性好的独特优点,这些特性使得酶与底物的接触机率大大增加,而且酶固定在载体表面,在与底物反应过程中,可以减少反应过程中的传质和传热阻力,从而可以进一步提高反应效率。

本实验通过水热法制备纳米磁性 Fe_3O_4 ,并用壳聚糖对粒子表面进行修饰,然后采用吸附法固定脂肪氧合酶,并研究了影响酶活的因素,以期获得一种较好的酶固定化方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中用到的七水合硫酸亚铁、无水硫酸钠、盐酸、双氧水均为分析纯,壳聚糖为生化试剂,购自国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钾(分析纯),淄博化学试剂厂;油酸,上海远航试剂厂;硝酸钾,上海市化学工业学校实验工厂;吐温 80(Tween-80,化学纯),天津市广成化学试剂有限公司;石油醚(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水热法制备纳米磁性载体

将 25 mL 浓度为 0.6 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 25 mL 浓度为 4.0 mol/L 的 NaOH 溶液加入到三口烧瓶中,然后将 50 mL 浓度为 4.0 mol/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液逐滴加入到烧瓶中,搅拌 1 h 后将反应体系转移到反应釜中,在 160 °C 下反应 16 h 后,磁铁分离取黑色沉淀,水洗后得纳米 Fe_3O_4 ;将 2% 的乙酸溶液、1.5 g 壳聚糖、300 mL 水、12 g 硫酸钠、0.15 mL Tween-80、5.5 g 纳米 Fe_3O_4 加入到 500 mL 三口烧瓶中,冰水浴超声 10 min 后,置于 40 °C 水浴中,并通入 N_2 保护 2 h,将 47 g 硫酸钠加入到 100 mL 40 °C 水中,快速滴加入三口烧瓶中沉降 4 h 后,磁铁分离壳聚糖包裹纳米 Fe_3O_4 。

1.2.2 吸附法固定脂肪氧合酶

大豆经粉碎、筛分去皮后,经石油醚多次浸提得到脱脂大豆粉,取一定质量的脱脂大豆,加水(固液比为 1:5, w/v)搅拌 1 h 后,在 4 000 r/min 条件下,

离心 20 min,取上清液即为粗酶液;将纳米 Fe_3O_4 与粗酶液按质量比为 1:15 的比例置于三口烧瓶中,常温搅拌 2 h 后于 4 °C 环境下静置 1 h。磁铁分离获得固定化脂肪氧合酶,然后密封冷藏保存备用。

1.2.3 酶活的测定

1.2.3.1 底物溶液的配制及酶活测定

酶活的底物溶液配制及酶活的测定方法,均遵循文献报道的基本步骤^[8-9],在此需要明确指明的是,加入反应体系的游离酶事先已被稀释了 100 倍,加入的固定化酶的量 0.05 g,其余步骤均与文献相同。

1.2.3.2 酶活影响因素的研究

pH 值对酶活的影响:将游离酶(或固定化酶)分别加入到不同 pH 值的反应体系中,恒温反应后,进行酶活测定。

温度对酶活的影响:将 pH 为 9 的游离酶(或固定化酶)分别置于不同温度的水浴环境中反应后,进行酶活测定。

双氧水浓度对酶活的影响:将游离酶(或固定化酶)分别加入到双氧水浓度为 0~18 g/L 的反应体系中,30 °C 恒温反应后进行酶活测定。

2 结果与分析

2.1 载体形貌分析

所制纳米 Fe_3O_4 样品均为亮黑色颗粒,在无水乙醇中超声分散一定时间后,经电镜扫描后观察纳米磁性载体的微观形状为黑色短棒状微粒,粒径约为 40 nm,平均长度约为 500 nm,颗粒成形较好,如图 1 所示。颗粒有一定的团聚,但并不严重,这主要是由于制备的粒径是在纳米范围,表面积很大,具有很高的表面自由能,从而导致其聚集^[10]。而颗粒之间团聚可以降低表面自由能,使体系趋于稳定。



图1 纳米 Fe_3O_4 粒子电镜形貌

2.2 Fe₃O₄ 及固定化酶 X 射线衍射(XRD)分析

Fe₃O₄ 及固定化酶的 X 射线衍射(x-ray diffraction, XRD)分析结果如图 2 所示。由图可以看出,固定化酶在 2θ 为 30°、36°、43°、53°、57°、62° 下出现了 6 个 Fe₃O₄ 的特征吸收峰,这表明对纳米磁性 Fe₃O₄ 粒子的表面修饰以及酶的固定化并未改变 Fe₃O₄ 的晶体结构,也表明在反应过程中,粒子仍然很好地保持了其磁性等特征,保证了在后续的生化反应过程中的进一步应用。

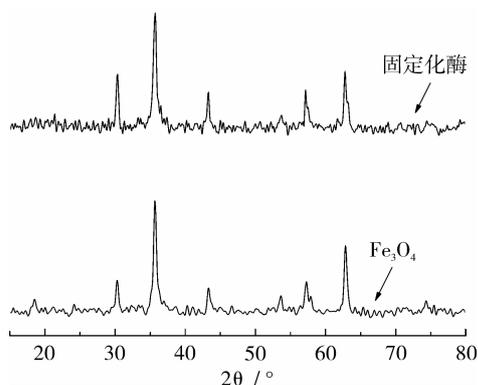


图 2 Fe₃O₄及固定化酶的 XRD 分析

2.3 固定在载体上的酶量分析

载体上固定的酶含量通过热失重进行分析得到,其结果如图 3 所示,在 200 °C 以下,固定化酶以及复合载体分别约有 7% 的失重,这是由载体中吸附的水分或其他可挥发物挥发造成的。由于四氧化三铁在高温(600 °C)含氮气氛中是稳定的,而脂肪氧合酶及包裹物几乎可以全部烧掉,剩下的成分则是 Fe₃O₄,如图所示,从 200 ~ 600 °C,固定化酶的失重约为 28.2%,而复合载体的损失约为 22.2%,由此计算可得到固定的酶量约占固定化酶总质量的 6.0%。

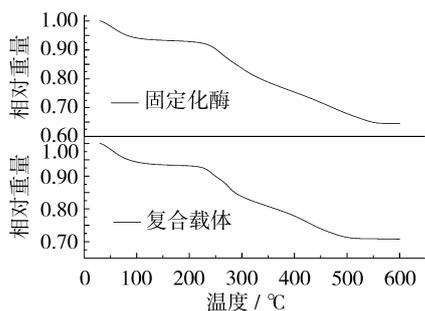


图 3 固定化脂肪氧合酶的热失重分析

2.4 pH 对酶活的影响

pH 对酶活的影响如图 4 所示。由图可知,游离酶的最适 pH 为 8,固定化脂肪氧合酶的最适 pH 为 9。pH 值对酶活性的影响是因为 pH 改变了酶的活性中心或与之有关的基团的解离状态,从而使酶的活性状态发生改变,在最适 pH 时,酶分子上活性基团的解离状态最适于与底物结合,pH 高于或低于最适 pH 时,活性基团的解离状态发生改变,酶和底物的结合力降低,因而酶反应速率降低^[11]。

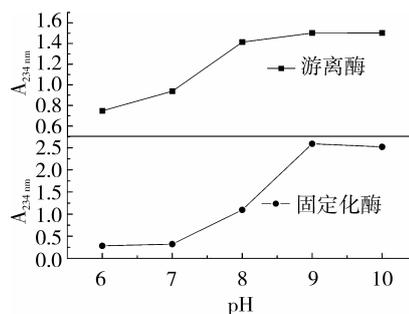


图 4 不同 pH 下游离酶和固定化脂肪氧合酶的活性

2.5 温度对酶活的影响

由图 5 不同温度下游离酶和固定酶的活性可知,游离酶与固定酶的最适温度均为 30 °C。在一定的温度范围内,温度升高,酶反应速度加快;但温度超过一定范围时,酶蛋白变性,从而使酶活性下降。同时,由于脂肪氧合酶的热稳定性差,在低温下活性较大^[12],因此 30 °C 为较佳反应温度。

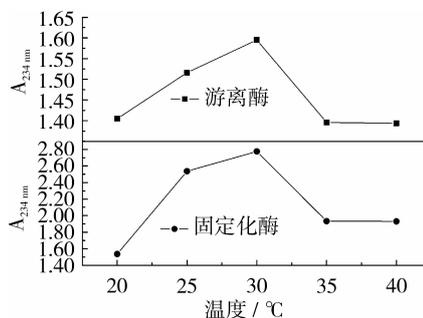


图 5 不同温度下游离酶和固定化脂肪氧合酶的活性

2.6 双氧水浓度对酶活的影响

反应体系在不同双氧水浓度下的反应活性见图 6。由图 6 可知,游离酶在双氧水浓度为 14 g/L 时,反应活性最强,实验过程中,双氧水的添加只是起到了活性诱发作用,但要是添加过多却会很大程度上抑制酶的活性,这是因为环境中过多的过氧化物会

改变酶结构,从而影响酶活性^[13],所以,从图中可以看出,脂肪氧合酶的酶活并没有随着双氧水浓度的增加而增加;对于固定化酶而言,当双氧水浓度为 8 g/L 时,反应活性几乎达到最强,其后随着双氧水浓度的增大,反应活性变化较小,不同于自由酶的酶活呈下降趋势,这也正好说明了酶的固定化有利于酶活的保持。

在最适条件下检测,固定前游离酶的酶活为 3.95×10^5 U/mL,固定化后酶活为 9.40×10^5 U/g。

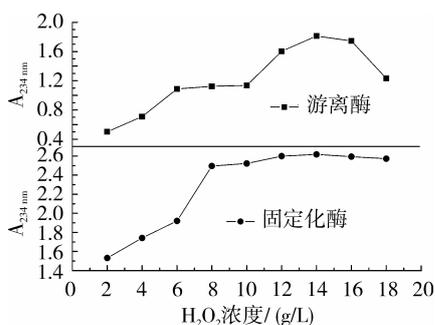


图 6 不同双氧水浓度下游离酶和固定化脂肪氧合酶的活性

3 结论

采用水热法制备出纳米磁性四氧化三铁,用壳聚糖对颗粒表面进行修饰得到复合载体,然后用吸附法将脂肪氧合酶固定在复合载体上,并考察不同因素对游离酶和固定化脂肪氧合酶酶活的影响。电镜观察显示纳米 Fe₃O₄ 粒子呈黑色短棒状粒子,固定的酶量约占固定化酶总质量的 6.0%,游离酶与固定化脂肪氧合酶的最适温度均为 30 ℃,最适 pH 分别为 8.0 和 9.0,当双氧水的浓度分别达到 8 g/L 和 14 g/L 时,固定化酶和游离酶的活性分别达到最高,在最适条件下,游离酶的酶活为 3.95×10^5 U/mL,固定化酶的酶活为 9.40×10^5 U/g。实验结果表明,以纳米磁性四氧化三铁颗粒制备得到的复合载体固定脂肪氧合酶是一种可行的固定

化方法。

参考文献:

[1] 龚宵,江均平,贺稚非. 泡盛曲霉 AS2437 菌株的酶系分析[J]. 食品工业科技,2009(1):144-145.

[2] 徐凤彩. 酶工程[M]. 北京:中国农业出版社,2001.

[3] Robinson P J, Dunnill P, Lilly M D. Properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1973, 15:603-607.

[4] Arica M Y, Yavuz H, Patir S, et al. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methyl methacrylate) microspheres; characterization and application to a continuous flow reactor [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*, 2000, 1:127-138.

[5] Liu C, Honda H, Ohshima A, et al. Development of chitosan-magnetite aggregates containing nitrosomonas europaea cells for nitrification enhancement [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89: 420-425.

[6] Yang Y, Yong X B, Li Y F, et al. Preparation of Fe₃O₄/P(GMA-co-EGDMA) magnetic composite microspheres with high specific surface area by deposition of porous template [J]. *Process*, 2008, 43(11):1179-1185.

[7] 刘会洲,何鸣鸿. 绿色化学与生态化工的研究内涵[J]. 化工冶金, 1999,20(4):405-409.

[8] 石彦国,任莉. 大豆制品工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.

[9] 钟芳,王璋,许时婴. 3种脂肪氧合酶活测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(1):77-81.

[10] 李黎,马力. Fe₃O₄ 磁性微粒的制备及表征[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(34):6385-6387.

[11] 蔡琨,方云,夏咏梅,等. 大豆脂肪氧合酶的提取及影响酶活因素的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2):52-56.

[12] 顾丹,杨铭,夏咏梅. 大豆脂肪氧合酶催化合成过氧化玉米胚芽油[J]. 中国洗涤用品工业, 2009, 4:66-67.

[13] 冯明. PDMS膜生物反应器生物转化制备香草醛研究[D]. 成都:四川大学,2007. 完