

陶瓷-壳聚糖复合材料 固定真菌漆酶酶学性质研究

尚伟龙, 刘 伟, 王龙波

(北京化工大学化学工程学院, 北京 100029)

摘要:以陶瓷为第一载体、壳聚糖为二次载体、戊二醛为交联剂,采用共价结合和吸附联用法制备固定化漆酶,并研究了固定化漆酶的性质。固定化酶最适 pH 为 3.0,最适温度分别为 25℃ 和 50℃,均与游离酶相同。在 pH 3.0,温度 25℃ 时,固定化酶对 ABTS 的表现米氏常数为 66.64 $\mu\text{mol/L}$ 。与游离酶相比,固定化酶的热稳定性明显提高,并具有良好的贮存和操作稳定性。

关键词:陶瓷-壳聚糖复合载体;固定化;漆酶;酶活力

中图分类号:TQ426.97;Q814.2

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2009)03-0045-03

Characterization and study of agaricus bisporus laccase immobilized on a ceramic-chitosan composite support

SHANG Wei-long, LIU Wei, WANG Long-bo

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Laccase is immobilized on the ceramic-chitosan composite support by using glutaraldehyde as cross-linking reagent. The characteristics of the immobilized enzyme are investigated. The immobilized enzyme exhibits the maximal activity at pH 3.0. The optimal temperatures for immobilized enzyme are 25℃ and 50℃. The K_m value of immobilized laccase for ABTS can be 66.64 $\mu\text{mol/L}$ in pH 3.0 buffer at 25℃. Compared with free laccase, the thermal, operational, and storage stabilities of immobilized laccase are increased after the immobilization.

Key words: ceramic-chitosan composite support; immobilization; laccase; enzyme activity

漆酶是一类含铜的多酚氧化酶,能够催化氧化不同苯酚、替代多酚、芳族酚、苯硫醇等^[1],在废水处理、环境监测等方面具有重要价值^[2-4]。由于游离酶在使用过程中易随环境的变化变性失活,且不易从反应体系中分离而重复使用,限制了其工业应用。漆酶的固定化则可解决这些问题。采用陶瓷-壳聚糖复合材料为载体进行漆酶固定化,充分利用了块状陶瓷在填充床或流化床生物反应器中耐用性好^[5]、机械强度高^[6]和壳聚糖良好的成膜能力^[7]、对处理含油废水助催化作用^[8]、pH 的敏感性^[9]等优点。利用陶瓷-壳聚糖复合载体制备的固定化漆酶的比活力达到 55.78 U/g,单次固定化操作酶的固定化效率是 51.0% 以上,固定化后的残酶液具有可重复使用的优点。笔者主要研究了以陶瓷-壳聚糖为载体的固定化漆酶和游离漆酶的酶学性质。

1 实验部分

1.1 主要实验材料

真菌漆酶(>4 U/mg),美国 Sigma 公司;壳聚糖

(脱乙酰度 > 90%),国药集团化学试剂公司;陶瓷,高岭土烧制;2,2-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS,生化试剂),瑞士 Fluka 公司;KH-570 硅烷偶联剂;25% 戊二醛,分析纯;其余试剂均为分析纯。

1.2 陶瓷-壳聚糖复合材料的制备

以体积比 1:1 配置乙醇/水溶液,滴加醋酸溶液调节 pH 至 3.5~4.0。取上述溶液 30 mL,加入 KH-570 交联剂,配置成 KH-570 质量分数为 1% 的改性液。放入陶瓷约 0.3 g 于改性液中,密闭,置于 30℃ 水浴锅中,以 20 r/min 搅拌反应 5.0 h,依次用无水乙醇和蒸馏水清洗 2~3 次,放入干燥器中干燥,制得改性后的陶瓷。称取壳聚糖 0.4 g,加入到 20 mL 1% (体积分数)的醋酸溶液中,匀速搅拌 10 min,制得壳聚糖乙酸溶液,加入 0.5 g 的改性陶瓷,于 30℃ 下静置 1.5 h。取出陶瓷,将复合材料放入到干燥器中过夜干燥,反复涂敷 3 次,制得涂敷了壳聚糖的陶瓷作为固定化的载体。

收稿日期:2008-12-12

作者简介:尚伟龙(1982-),男,硕士生;刘伟(1962-),女,硕士,教授,硕士生导师,主要从事工业催化和工业水处理技术的研究,通讯联系人,010-64411283,liuw@mail.buct.edu.cn。

1.3 漆酶的固定化

称取载体 0.5 g, 加 6% 的戊二醛溶液 15 mL, 在 30℃ 下 30 r/min 搅拌活化 15 min, 载体用蒸馏水洗涤, 最后将复合材料放入到干燥器中干燥, 得到活化的载体。称取活化后的载体 1.0 g, 加入浓度为 1.25 mg/mL 的漆酶磷酸缓冲液 (pH 4.0) 5.0 mL, 在 4℃ 下固定化反应 24 h, 抽滤, 用磷酸缓冲液充分洗涤, 即得固定化漆酶, 于 4℃ 的冰箱中保存备用。

1.4 性能测定

游离漆酶和固定化漆酶的测定均以 ABTS (0.5 mmol/L) 为反应底物测定酶活力, 反应在 25℃ 下进行^[10]。在 25℃ (pH 3.0) 下每分钟氧化 1 μ mol 底物 ABTS 的酶量定义为一个活力单位。

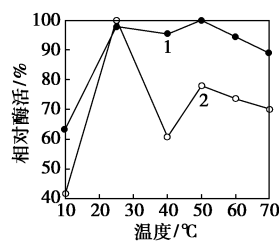
在温度 30℃、pH 4.0 的醋酸盐缓冲液 (0.1 mol/L) 中, 通过测定不同浓度的 ABTS 反应物和游离漆酶与固定化酶的反应速率与初始反应速率对比来测定最大的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

在温度 25℃、pH 3.0 ~ 6.0, 测定在磷酸盐缓冲液中的残留酶活来研究漆酶的 pH 稳定性。通过数次连续氧化底物 ABTS, 来测定固定化漆酶的活力, 评价其操作稳定性^[11]。游离酶和固定化酶贮存在 4℃ 下 1 个月来评价贮存稳定性, 并测定酶活。

2 结果与讨论

2.1 温度对酶活力的影响

由图 1 可见, 游离漆酶和固定化漆酶有 2 个最佳催化温度 (25℃ 和 50℃), 这可能是由于漆酶在低温条件下不稳定所致^[10]。游离漆酶在温度 15 ~ 70℃, 其相对酶活保持在 80% 以上; 而固定化漆酶相应的温度范围是 20 ~ 35℃, 说明固定化漆酶对环境温度依赖性增加。但 20 ~ 35℃ 的范围一般亦适用于工业废水处理。

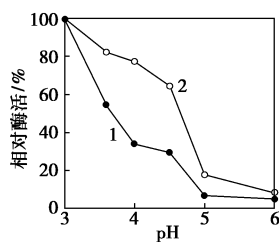


1—游离漆酶; 2—固定化漆酶

图 1 温度对固定化漆酶酶活的影响

2.2 pH 对酶活力的影响

由图 2 可见, 固定化漆酶和游离漆酶在 pH 为 3.0 ~ 6.0 内两者相对酶活随 pH 变化趋势相同。由于 pH 低于 3.0 时壳聚糖与陶瓷结合强度降低而影响酶的固定化, 同时游离酶的变性速度加快, 故两者最适 pH 均为 3.0。固定化漆酶对比游离漆酶有更好的 pH 适应性, 因为漆酶交联后复合载体表面壳聚糖的带电基团与漆酶结合, 载体的电荷变为中性^[12]。



1—游离漆酶; 2—固定化漆酶

图 2 pH 对固定化漆酶酶活的影响

2.3 操作和贮存的稳定性

图 3(a) 显示反应 10 次过程中固定化漆酶的活力基本保持不变, 最后其酶活仍能保持最初的 90.6% 以上。由图 3(b) 可见, 4℃ 下贮存 1 个月后固定化漆酶酶活没有明显下降, 酶活仍在 95% 以上, 游离漆酶保留了 90% 的活力。

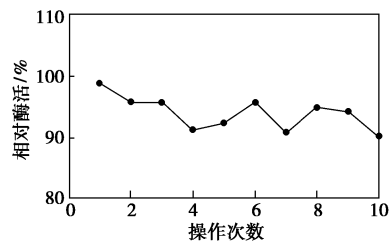
(上接第 44 页)

加入使得生物油气化过程中的可燃气 CO、H₂、CH₄ 部分燃烧, 而使得合成气中 CO₂ 的量明显提高, 不利于合成气品质的提高。

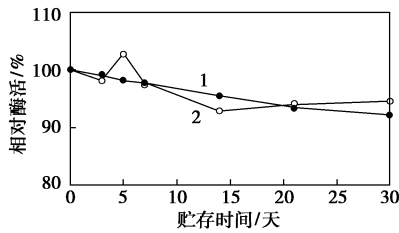
参考文献

- [1] Garcia L, French R, Czernik S, et al. Catalytic steam reforming of bio-oils for the production of hydrogen: Effects of catalyst composition[J]. Applied Catalysis A: General, 2000, 201(2): 225 - 239.
- [2] Czernik S, Bridgwater A V. Overview of applications of biomass fast pyrolysis oil[J]. Energy & Fuels, 2004, 18(2): 590 - 598.

- [3] 王贤华, 陈汉平, 张谋, 等. 生物油燃烧特性及动力学研究[J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2008, 69(4): 92 - 94.
- [4] 唐汝江, 陈汉平, 王贤华, 等. 生物质油应用技术[J]. 能源技术, 2005, 26(2): 66 - 69.
- [5] 朱锡锋, Venderbosch R H. 生物质热解油气化实验研究[J]. 燃料化学学报, 2004, 32(4): 510 - 512.
- [6] 王贤华, 陈汉平, 罗凯, 等. 提高生物油稳定性的方法[J]. 化工进展, 2006, 25(7): 765 - 769.
- [7] 郭晓亚, 颜涌捷. 生物质快速裂解油的催化裂解精制[J]. 化学工程与工艺, 2005, 21(3): 227 - 233.
- [8] 朱锡锋. 生物质液化制备合成气的研究[J]. 可再生能源, 2003 (1): 11 - 14. ■



(a) 固定化漆酶的操作稳定性



1—游离漆酶;2—固定化漆酶

(b) 贮存稳定性

图3 游离漆酶和固定化漆酶的稳定性

2.4 动力学性质

按 Hanes - Woolf 的方法作图,求得在 pH 3.0、25℃时,游离酶与固定化酶对 ABTS 的表观米氏常数分别为 34.41 $\mu\text{mol/L}$ 和 66.64 $\mu\text{mol/L}$,表观米氏常数变大说明固定化后,漆酶对底物的亲和力有所降低,这时可能由于底物内扩散限制,复合载体表面附近的底物浓度要比溶液中低,导致底物与酶的接触几率变小,使得固定化漆酶的亲和力降低^[13]。

3 结语

陶瓷-壳聚糖复合载体表面含有丰富的氨基与交联剂的醛基发生 Schiff 碱反应,同时经 KH-570 改性后的陶瓷具有较好的吸附能力,根据复合载体的这 2 个特性,将其用于酶的固定化。固定化酶的适宜温度为 25℃和 50℃,pH 为 3.0。与游离酶对比,固定化漆酶的耐热性和耐酸性有所提高,更适宜用于处理含油废水。固定化漆酶有着良好的贮存稳定性,与 ABTS 的亲和力有所降低,而连续进行 10 批次

操作后其酶活仍保持 90.6% 以上。

参考文献

- [1] Riva S. Laccases: Blue enzymes for green chemistry [J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(5): 219 - 226.
- [2] Hu Xiaoke, Zhao Xueheng, Hwang Huey-min. Comparative study of immobilized trametes versicolor laccase on nanoparticles and kaolinite [J]. Chemosphere, 2007, 66(8): 1618 - 1626.
- [3] Georgieva S, Godjevargova T, Portaccio M, et al. Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 55: 177 - 184.
- [4] 王国栋,陈晓亚.漆酶的性质、功能、催化机理和应用[J].植物学通报,2003,20(4):469 - 475.
- [5] Tischer W, Wedekind F. Immobilized enzymes: Methods and applications [J]. Topics in Current Chemistry, 1999, 200: 95.
- [6] Barbara Krajewska. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35: 126 - 139.
- [7] Wan Yunyang, Du Yumin, Shi Xiaowen, et al. Immobilization and characterization of laccase from Chinese *Rhus vernicifera* on modified chitosan [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1378 - 1382.
- [8] 陈新芳.油对水质稳定剂性能的影响及酶法处理含油污水的研究[D].北京:北京化工大学,2007.
- [9] Kovalenko G A, Komova O V, Simakov A V, et al. Macrostructured carbonized ceramics as adsorbents for immobilization of glucoamylase [J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2002, 182/183(5): 73 - 80.
- [10] 张鹏.以 ABTS 为底物测定漆酶活力的方法[J].印染助剂,2007,24(1):43 - 45.
- [11] Davis S, Burns R G. Covalent immobilization of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1992, 37(4): 474 - 479.
- [12] Kamori M, Hori T, Yamashita Y, et al. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 9(4/5/6): 269 - 274.
- [13] Jiang De-Sheng, Long Sheng-Ya, Jun Huang, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 25: 15 - 23. ■

《现代化工》“海外纵横”栏目征稿启事

《现代化工》“海外纵横”主要介绍国外某一国家或地区热点科研领域的开发应用状况、开发方向,或某一行业的发展现状、发展方向和问题探讨,以及有突出表现的国外公司的科研动态和研发经验等。

有意投稿的作者,请与“海外纵横”栏目编辑童志勇联系,以确定合适的主题和格式。联系电话:010-64444105-839, Email: tongzy@cheminfo.gov.cn。(本刊编辑部)