

戊二醛交联法制备壳聚糖固定化酶的改进研究

陈昆明 张墨玲 郝树清 王俊生 侯秉璋

(天津医科大学内分泌研究所 天津 300070)

壳聚糖是由是虾、蟹壳蛋白中提取的一种氨基多糖(2-氨基-1,4- β 葡聚糖),呈网状结构,由于其来源丰富,制备简单,化学性质稳定,耐热和具有良好的机械性能,是固定化酶的良好载体,在医药及工业上有着广阔的应用前景^[1]。为此探索酶固定化方法,提高酶利用率,活性回收率,提高稳定性和使用周期是固定化酶研究的重要课题。戊二醛交联法是制备固定化酶常用的方法,为防止戊二醛直接和载体分子中氨基间可能会发生的交联反应,本文采用醛基保护改进戊二醛交联法制备了壳聚糖固定化酶,并对其酶利用率,活性回收率进行了观察和比较。

1 材料和方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶(Sigma),戊二醛、乙醇胺(上海化学试剂站分装厂);虾、蟹壳自行收集,其余试剂均为国产生化分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖的制备:参考陈盛介绍的方法^[2]加以改进。虾、蟹壳经稀酸,稀碱脱钙,脱蛋白反复处理制备甲壳质。再用30% NaOH煮沸2h,用水洗至中性,抽滤脱水即得到部分脱乙酰化的壳聚糖。

1.2.2 载体活化:将8%戊二醛与乙醇胺按一定比例混溶,持续搅拌30min,离心去沉淀,然后和制备的壳聚糖于室温下反应18h。而后用生理盐水反复洗涤至中性。离心去上清,并用不同浓度的盐酸在室温下持续搅拌30min去除保护剂,再用生理盐水洗至中性,4℃储存备用。

1.2.3 偶联反应:将已活化的载体壳聚糖调整浓度为0.1mg/ml/管;离心去上清,然后各反应管加入辣根过氧化物酶1ml(0.1mg/ml),4℃搅拌下反应18h,离心去上清,并用0.1mol/L PB pH7.6(磷酸盐缓冲液)洗涤数次,4℃贮存待测。

1.2.4 酶活性测定:固定的辣根过氧化物酶活性测定参照文献^[3]介绍的常规方法,将实验样品在同等条件下用0.1mol/L PB作适当稀释,用酶标仪测定其光密度值(A_{490nm})。

2 结果和讨论

2.1 戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

在载体(壳聚糖)及偶联酶(辣根过氧化物酶)浓度相同的条件下改变交联剂戊二醛浓度制备的固定化酶活性如图1。结果表明:固定化酶的活性随戊二醛浓度增加而增加,8%达峰值。说明8%的戊二醛足以和实验的壳聚糖分子上的氨基发生交联反

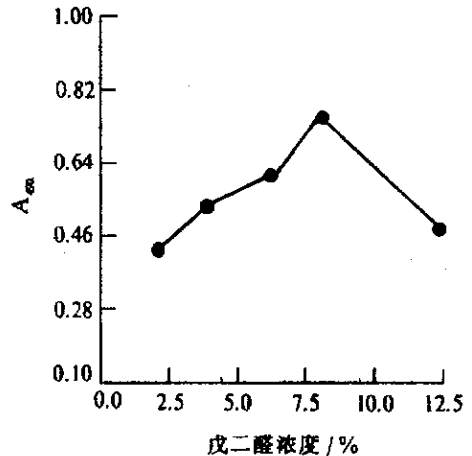


图1 戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

本文于1995年5月11日收到。

应,壳聚糖是由甲壳质脱乙酰基而成,其分子中氨基含量因其制备方法,甲壳质脱乙酰基程度不同而异。其氨基含量直接影响戊二醛用量及固定化酶的活性回收^[4]。

2.2 醛基保护

在载体及偶联酶浓度相同的条件下选用不同摩尔比的戊二醛/乙醇胺活化载体并进行酶联反应;制备的固定化酶活性和不同摩尔比的戊二醛/乙醇胺的关系如图 2 所示;戊二醛和乙醇胺摩尔比为 1.76

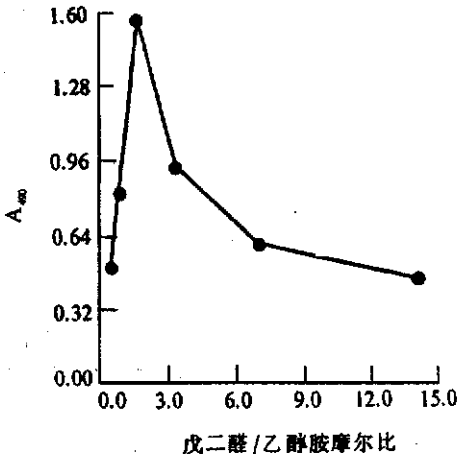


图 2 不同摩尔比的戊二醛/乙醇胺和固定化酶活性的关系

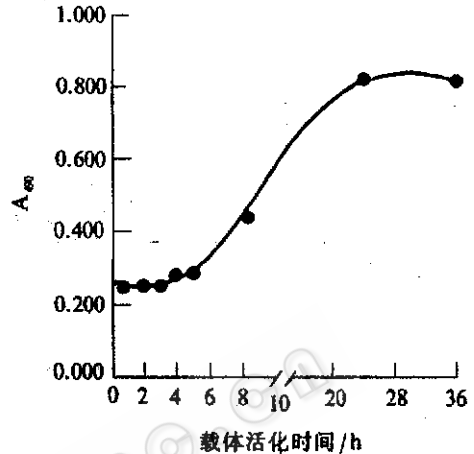


图 3 载体活化时间对固定化酶活性的影响

时(戊二醛浓度为 8%)酶活性回收最高(A₄₉₀1.56),较未醛基保护条件下酶活性(A₄₉₀0.40)提高了 3 倍。为探讨醛基保护对偶联率的影响,用¹²⁵I-甲状腺球蛋白作示踪剂,替代酶分别和经醛基保护/未醛基保护的活化载体进行结合反应,以载体结合示踪剂量(B)/加入总示踪剂量(T)之比代表偶联率,二者分别为 193912cpm/203645cpm = 95.22%; 131212cpm/203645cpm = 64%。结果表明醛基保护可提高偶联率,减少自身交联有利于提高酶的结合容量及酶的活性。

2.3 载体活化时间

在相同的醛基保护条件下,改变不同的活化时间,随着活化时间的延长固定化酶的活性亦相应提高,如图 3 所示过夜温育酶活性最强。

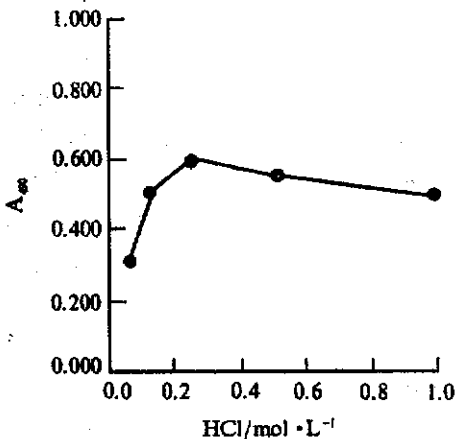


图 4 不同浓度的盐酸处理对固定化酶活性的影响

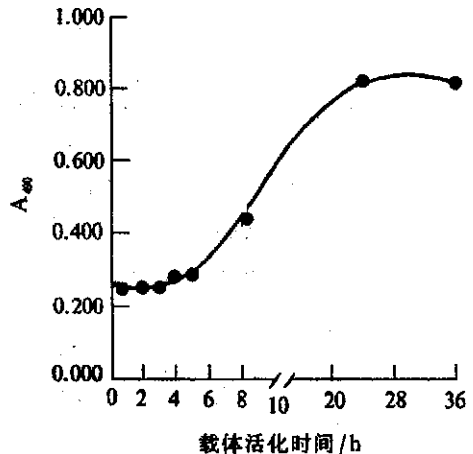


图 5 固定化酶的最适 pH

2.4 保护基的水解

选用不同浓度的盐酸处理经醛基保护处理的活化载体 30min, 观察保护基水解的盐酸适宜浓度; 实验结果(图 4)表明使用 0.1~0.2mol/L 的盐酸水解 30min 即可。

2.5 固定化酶的最适 pH

取定量的固定在壳聚糖上的辣根过氧化酶悬浮在 0.1mol/L PB(调整 pH 为 2~11)中, 测定酶活性。结果如图 5。固定化酶最适 pH 为 3.8(游离酶 pH5.4)向低 pH 移动。

2.6 固定化酶稳定性

经醛基保护制备的固定化酶和未经醛基保护制备的固定化酶在同等条件下贮存 65d(4℃), 活性分别保持 84% 和 81%(表 1)。此结果表明壳聚糖经醛基保护制备的固定化酶和其它方法^[5]制备的固定化酶一样有着良好的稳定性。

表 1 壳聚糖固定化酶贮存稳定性

| 贮存时间/d | 0 | 14 | 42 | 56 | 65 |
|--------|-----|----|----|----|----|
| 未醛基保护 | 100 | 94 | 87 | 80 | 81 |
| 醛基保护 | 100 | 95 | 89 | 84 | 84 |

参 考 文 献

- [1] 严俊等. 化学通报, 1984, 1: 24.
 [2] 陈盛等. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(5): 383~386.
 [3] 张龙翔等. 生化实验方法与技术. 北京: 高等教育出版社, 1987, 179~183.
 [4] Valentin M *et al.* Journal of Applied Biochemistry, 1983, 5: 420~428.
 [5] 隋德新等. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17:(4), 311~313.

An Improvement Glutaraldehyde Crosslinking Method For Enzyme Immobilization on Chitosan

Chen Kunming Zhang Moling Xi Shuqing Wan Junsheng Hou Bingzhang
 (Tianjin Medical University endocrinology institute, Tianjin 300070)

Abstract Glutaraldehyde crosslinking is one of the most common methods in immobilization of enzymes. The present paper described the improvement of this method: Ethanolamine was used to protect the aldehyde groups from the crosslinking reaction on the carrier. The improved method was used in the immobilization of Peroxidase on Chitosan. Our results showed that the enzymatic activity was increased by 3 fold, the efficiency of immobilization raised by 2 fold.

Key words Glutaraldehyde, immobilization of enzymes