

以 Fe(III) 改性胶原纤维为载体固定过氧化氢酶

陈爽¹, 宋娜², 廖学品¹, 石碧^{1,2}

1 四川大学生物质化学与工程系, 成都 610065

2 四川大学 制革清洁技术国家工程实验室, 成都 610065

摘要: 将胶原纤维用三价铁改性后作为载体, 通过戊二醛的交联作用将过氧化氢酶固定在该载体上。制备的固定化过氧化氢酶蛋白固载量为 16.7 mg/g, 酶活收率为 35%。研究了固定化酶与自由酶的最适 pH、最适温度、热稳定性、贮存稳定性及操作稳定性。结果表明: 过氧化氢酶经此法固定化后, 最适 pH 及最适温度与自由酶相同, 分别为 pH 7.0 和 25 °C; 但固定化酶的热稳定性显著提高, 在 75 °C 保存 5 h 后, 仍能保留 30% 的活力, 而自由酶则完全失活; 固定化酶在室温下保存 12 d 后, 酶活力仍保持在 88% 以上, 而自由酶在此条件下则完全失活; 此外, 固定化过氧化氢酶还表现出了良好的操作稳定性, 在室温下连续反应 26 次后, 相对活力为 57%。该研究表明胶原纤维可作为固定化过氧化氢酶的优良载体, 并有望用于其他酶的固定。

关键词: 胶原纤维, 载体, 过氧化氢酶, 固定化, 酶活力

Immobilization of catalase on Fe (III) modified collagen fiber

Shuang Chen¹, Na Song², Xuepin Liao¹, and Bi Shi^{1,2}

1 *Department of Biomass Chemistry and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China*

2 *National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu 610065, China*

Abstract: Fe (III) modified collagen fibers were used to immobilize catalase through the cross-linking of glutaraldehyde. The loading amount of catalase on the supporting matrix was 16.7 mg/g, and 35% enzymatic activity was remained. A series of experiments were conducted on free and immobilized catalase in order to investigate their optimal pH and temperature, and the thermal, storage and operation stability. Results suggest that the free and immobilized catalase prefer similar pH and temperature condition, which were pH 7.0 and 25 °C. It should be noted that the thermal stability of catalase was considerably improved after immobilization owing to the fact that the enzyme kept 30% of relative activity after incubation at 75 °C for 5 h. On the contrary, the free catalase was completely inactive. As for the storage stability, the immobilized catalase kept 88% of relative activity after stored at room temperature for 12 days while the free one was completely inactive under the same conditions. Moreover, the immobilized catalase preserved 57% of relative activity after being reused 26 times, exhibiting excellent operation stability. Consequently, this investigation suggests that collagen fiber can be used as excellent supporting matrix for the immobilization of catalase, and it is potential to be used for the immobilization of similar enzymes.

Received: September 16, 2010; **Accepted:** December 27, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20776090), Foundation for the Author of National Excellent Doctor Dissertation of China (No. 200762).

Corresponding author: Xuepin Liao. Tel: +86-28-85400382; E-mail: xpliao@scu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 20776090), 全国百篇优秀博士论文专项基金 (No. 200762) 资助。

Keywords: collagen fiber, support matrix, catalase, immobilization, enzyme activity

过氧化氢酶 (Catalase, 简称 CAT, EC 1.11.1.6) 是一种能高效催化过氧化氢转化为水和氧气的酶, 存在于所有需氧微生物以及动植物细胞内。过氧化氢酶由 4 个亚基组成, Fe(III)-原卟啉将这 4 个亚基连接成一条具有酶活性的多肽链^[1]。

过氧化氢酶在食品、纺织、造纸、农业、医学、废水处理等方面有着广泛的应用^[2-6]。但由于自由酶稳定性差, 易受各种环境因素影响而失活、难以重复使用, 反应后产物的分离、纯化以及酶的回收困难, 导致生产成本提高, 增加了产品污染的机会, 限制了过氧化氢酶的工业应用^[7-9]。

固定化酶是通过物理的或化学的方法, 将酶分子束缚在载体上, 使其既保持酶的天然活性, 又便于产物分离, 可以重复使用。固定化酶有可回收、产物易分离、稳定性高、利于实现连续反应等优点, 可以增加产物收率, 提高产物质量, 使酶的使用效率提高, 降低生产成本^[10]。

在固定化酶技术中, 载体材料对酶的性质影响极大, 合适的固定化载体材料是固定化酶是否成功的关键^[11]。一些价廉易得的天然高分子如壳聚糖、海藻酸、淀粉等都是固定化酶的常用载体^[12-13]。与其他固定化载体相比, 上述天然高分子具有无毒、生物相容性好、价廉易得等优点。研究表明, 壳聚糖^[14]和凝胶^[15]等均可用于过氧化氢酶的固定。但是, 这些天然高分子载体的水力学性质较差, 所以导致固定化酶难于实现大规模连续生产。

胶原纤维也是一种天然高分子, 为天然纤维结构, 不溶于水而又具有亲水性。主要来自于动物的皮。胶原纤维具有良好的生物相容性, 对酶的亲和性比其他载体材料所不能比拟的。它既有亲水基团又有疏水性基团, 这种两亲性质使胶原纤维可以通过空间构型的改变来适应反应体系中环境的变化, 从而使酶的活性能够充分发挥出来。此外, 胶原分子肽链上具有多种功能基团, 如-COOH 和-NH₂等,

不仅可以通过醛的交联作用将酶互接固定在胶原纤维上, 而且可以与金属离子结合后再进一步固定化酶。但是胶原纤维的热稳定性较差, 本实验利用制革化学原理, 用 Fe(III) 对胶原纤维改性, 目的是增加胶原纤维的热稳定性, 同时可进一步提高酶的载量。由于胶原纤维特殊的化学结构和空间结构, 以胶原纤维为载体固定化酶不仅能很好的保持酶的活性, 而且在固定床反应器中具有较好的水力学特性, 床层阻力较低。

首先用 Fe(III) 对胶原纤维改性, 主要是增加胶原纤维的热稳定性, 然后通过戊二醛的交联作用固定过氧化氢酶。研究了固定化酶的最适 pH、最适温度、热稳定性、操作稳定性及贮存稳定性并与未进行固定化的自由酶进行对比。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

胶原纤维 (按本课题组已建立的方法进行制备); 牛肝过氧化氢酶 (EC.1.11.1.6, 上海楷洋生物技术有限公司)。硫酸铁、戊二醛、硫酸-甲酸溶液、无水乙醇、丙酮, 碳酸氢钠、考马斯亮蓝、30%的过氧化氢等试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Fe(III) 改性胶原纤维的制备

较优的制备条件是: 2.000 g 胶原纤维置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 120 mL 去离子水浸泡 24 h, 用甲酸-硫酸溶液调节溶液 pH 至 1.8; 加入 0.204 g 硫酸铁, 30 °C 下水浴振荡反应 4 h。缓慢加入饱和碳酸氢钠溶液, 2~3 h 内将溶液 pH 升至 4.0~4.5。45 °C 继续反应 5 h, 反应结束后, 过滤并用去离子水充分洗涤后经乙醇、丙酮脱水, 室温下自然干燥, 即得 Fe(III) 改性胶原纤维 (Fe-CF)。

1.2.2 Fe-CF 固定化过氧化氢酶

较优的制备条件是: 将 0.100 g Fe-CF 置于

16 mL 浓度为 0.030 g/mL 的戊二醛溶液中, 25 °C 水浴振荡反应 1 h, 过滤并用去离子水洗涤后加入到 25 mL 浓度为 0.3 mg/mL 的过氧化氢酶溶液中, 25 °C 水浴振荡反应 2 h; 反应结束后, 过滤并用去离子水洗涤, 即得到胶原纤维固定化过氧化氢酶 (Fe-CF-Catalase)。

1.2.3 过氧化氢酶固载量的测定

考马斯亮蓝法^[16], 通过测定固定前后溶液中过氧化氢酶的浓度来计算固载量。

1.2.4 固定化过氧化氢酶的酶活力、比酶活及酶活收率测定

酶活力定义: 1 个酶活力单位 (1 U) 规定为在 25 °C 下, 每分钟分解 1 μmol 的过氧化氢所需的酶量。采用高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶的酶活力: 1 mL 浓度为 0.300 mg/mL 自由过氧化氢酶与 5 mL 浓度为 100 mmol/L 的过氧化氢溶液混合, 25 °C 下保温 3 min, 然后加入 2 mL 浓度为 0.200 mmol/L 的硫酸溶液终止反应, 反应后残留的过氧化氢用 100 mmol/L 的高锰酸钾溶液滴定。同时, 以沸水灭活后的过氧化氢酶作为对照组。

同样, 0.100 g 固定化酶与 10 mL 浓度为 100 mmol/L 的过氧化氢溶液混合, 25 °C 下保温 3 min, 然后取出固定化酶, 使反应液与固定化酶分离, 并测定反应液的高锰酸钾消耗量, 并以等量的过氧化氢溶液的高锰酸钾消耗量作为对照组。

过氧化氢酶的酶活计算公式为:

$$S = [(A - B) \times C_p] \times 1.7 \times 10^3 / 34 \times W \cdot t \quad (1)$$

式中, S 为过氧化氢酶的酶活力 ($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$); A 为对照组高锰酸钾溶液的消耗量 (mL); B 为反应组高锰酸钾溶液的消耗量 (mL); W 为固载的过氧化氢酶量 (mg); t 为反应时间 (min); C_p 为高锰酸钾溶液的浓度; 1.7 为高锰酸钾消耗量与过氧化氢量的计算系数; 34 为 H_2O_2 的分子量。

比酶活定义为每毫克酶蛋白所含的活力单位, 则过氧化氢酶的比酶活计算公式为:

$$N = S/M \quad (2)$$

式中, N 为过氧化氢酶的比酶活 (U/mg), S 为过氧化氢酶的酶活力 (U); M 为过氧化氢酶的质量 (mg)。

酶活收率定义为固定化酶的总酶活力与其固定化前的总酶活力之比, 则固定化过氧化氢酶的酶活收率计算公式为:

$$P = S_1/S_2 \times 100\% \quad (3)$$

式中, P 为固定化过氧化氢酶的酶活收率 (%), S_1 为固定化过氧化氢酶的总酶活力 (U), S_2 为过氧化氢酶固定化之前的总酶活力 (U)。

1.2.5 固定化过氧化氢酶与自由酶的最适温度、最适 pH、热稳定性、贮存稳定性及操作稳定性

将固定化酶与自由酶置于 15 °C~75 °C 下, pH 为 7.0 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中保温 15 min 后测定其酶活力, 以确定最适反应温度。将固定化酶与自由酶于室温下分别置于 pH 为 3~8 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中 15 min 后测定其酶活力, 以确定最适 pH 值。将自由酶与固定化酶分别于不同温度下 (15 °C~75 °C) 置于 pH 为 7.0 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中, 5 h 后测定其酶活力, 以测定热稳定性。分别考察固定化酶在 pH 为 7.0 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中室温贮存和在室温下干燥贮存的稳定性, 每隔 1 天测试 1 次贮存试样的酶活力, 并与自由酶在 pH 为 7.0 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中贮存稳定性对比。将 0.100 g 固定化过氧化氢酶与 10 mL 浓度为 100 mmol/L 的过氧化氢混合置于 25 °C 的水浴中反应 3 min, 然后取出固定化酶, 同样条件下重复试验, 测定每次重复试验的相对酶活力, 以测定固定化酶的操作稳定性。

2 结果与分析

2.1 固定化酶效果

通过考马斯亮蓝法测定, 胶原纤维固定化过氧化氢酶的酶蛋白载量为 16.7 mg/g, 比酶活为 1 050 U/mg。而自由过氧化氢酶的比酶活为 3 000 U/mg, 则固定化过氧化氢酶的酶活收率为 35%。与自由过氧化氢

酶相比, 固定化过氧化氢酶的比酶活力有所下降, 这可能是在固定化过程中, 酶与载体相互作用使酶的活性中心或变构中心的构象发生变化或酶与底物间的相互作用受到空间位阻从而导致酶活力下降。我们知道, 自由过氧化氢酶不能重复使用, 且对使用温度、pH 等环境因素较为敏感, 因此, 以胶原纤维为载体制备的固定化过氧化氢酶若能提高过氧化氢酶的热稳定性、贮存稳定性和操作稳定性, 则有利于过氧化氢酶的实际应用。在接下来的试验内容中, 我们着重研究了固定化酶的最适 pH、最适温度、热稳定性、贮存稳定性和操作稳定性。

2.2 固定化酶的最适 pH

由图 1 可见, 固定化酶和自由酶的酶活力均随着 pH 的改变而发生变化。自由酶与固定化酶的最适 pH 值均为 7.0。酶蛋白分子上带有大量酸性和碱性氨基酸残基, pH 值的变化直接影响这些残基侧链基团的解离状态, 进而影响底物的结合和进一步的催化反应, 使酶的活力发生变化^[17-20]。在相同的 pH 条件下, 固定化酶的相对活力均高于自由酶, 在 pH 为 3 时, 固定化酶的相对活力为 68%, 而自由酶为 45%; 并且固定化酶的相对活力随 pH 的变化的程度小于自由酶, 在整个 pH 范围内, 固定化酶的相对活力在 68% 以上, 表现出了更广的 pH 适应范围。说明胶原纤维对过氧化氢酶的固定较为稳定, 可以降低外界 pH 变化对过氧化氢酶活力的影响。

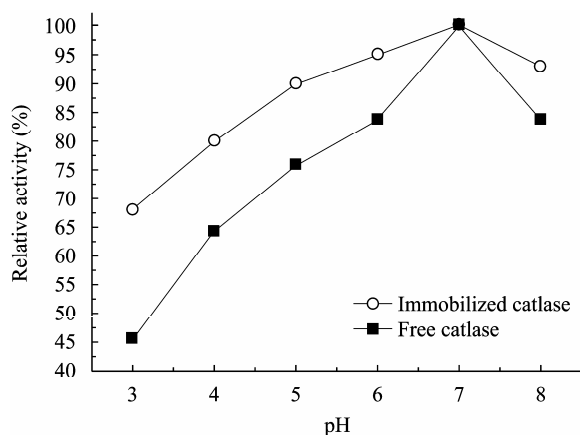


图 1 自由酶及固定化酶的最适 pH

Fig. 1 Optimal pH of free and immobilized catalase.

2.3 固定化酶最适温度的测定

图 2 表明, 固定化酶和自由酶的酶活力都随着温度的改变而发生变化, 自由酶及固定化酶的最适温度均为 25 °C。但是, 在相同的反应温度下固定化酶的相对活力均高于自由酶。在温度为 75 °C 时, 固定化酶的相对活力为 68.5%, 而自由酶为 46%。并且固定化酶的相对活力随温度的变化的程度也小于自由酶, 在整个温度范围内, 固定化酶的相对活力在 68.5% 以上, 温度适应范围更宽。这表明过氧化氢酶经固定化后对环境温度的适应性比自由酶更强。

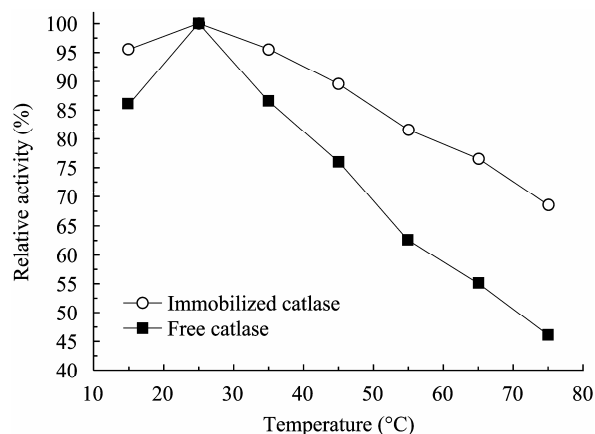


图 2 自由酶及固定化酶的最适温度

Fig. 2 Optimal temperature of free and immobilized catalase.

2.4 固定化酶的热稳定性

图 3 表明, 自由酶和固定化酶的相对活力均随着温度的升高而降低, 但在所考查的温度范围内, 固定化酶的相对活力均高于自由酶, 这表明过氧化氢酶经固定化后, 其热稳定性提高。固定化酶在 55 °C 下保温 5 h 后, 相对活力为 58%, 而自由酶相对活力仅为 38%; 而当在 75 °C 下保温 5 h 后, 固定化酶仍保留了 30% 的活力, 而自由酶则完全失活。Cetinus 等^[21]采用吸附法将过氧化氢酶固定在壳聚糖上, 在 55 °C 保温 5 h 后相对活力为 50%。可见, 胶原纤维作为载体固定过氧化氢酶具有较好的热稳定性。

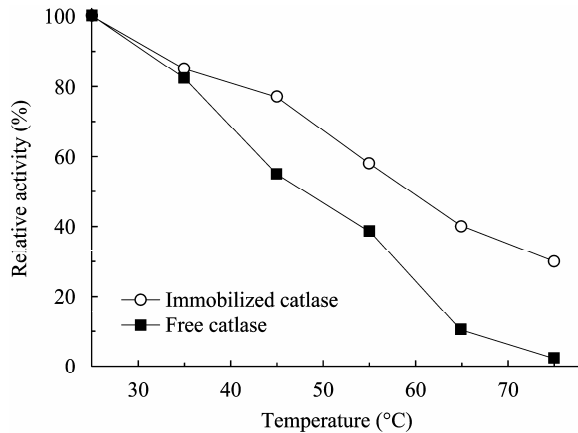


图3 自由酶及固定化酶的热稳定性
Fig. 3 Thermal stability of free and immobilized catalase.

2.5 固定化酶的贮存稳定性

如图4所示,固定化酶和自由酶的相对活力均随着贮存时间的延长而降低。在相同的贮存时间下,固定化酶的相对活力均高于自由酶,而干燥贮存的固定化酶相对活力最高。在第8天时,干燥贮存的固定化酶相对活力为91%,缓冲液中贮存的固定化酶相对活力为59%,而自由酶的相对活力仅为20%。这说明干燥状态下和缓冲液中的固定化酶的贮存稳定性均优于缓冲液中的自由酶。12 d后,缓冲液中贮存的自由酶已经失活,干燥状态下和缓冲液中贮存的固定化酶的相对活力仍分别为88%及51%。将

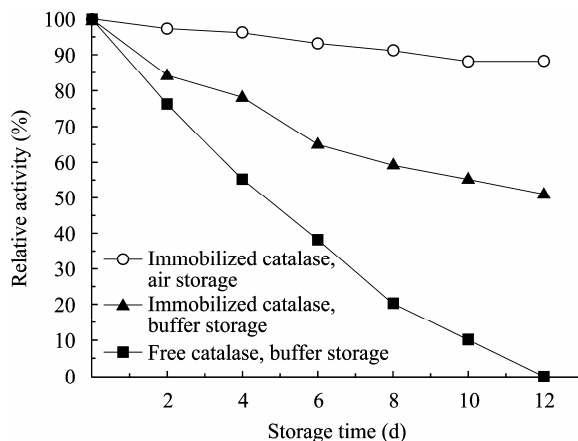


图4 自由酶与固定化酶的贮存稳定性
Fig. 4 Storage stability of free and immobilized catalase.

干燥状态下的固定化酶继续贮存至30 d时,固定化酶的相对活力为51%,显示了该固定化酶良好的贮存稳定性。

2.6 固定化酶的操作稳定性

酶在连续反应时的稳定性是决定固定化酶能否在工业上应用的重要因素。与自由酶不同,固定化酶可以多次重复使用。

图5表明,固定化酶重复使用6次后,酶活力没有明显下降,相对活力在95%以上。连续重复使用10次后,固定化酶的相对活力保持在87.3%,而连续重复使用26次后,固定化酶的相对活力仍保持在57.2%。谢雪凤等^[22]采用吸附法将过氧化氢酶固定在AB-8大孔树脂上,当重复使用10次后,相对活力为60%。这说明过氧化氢酶经胶原纤维固定化后具有良好的操作稳定性。

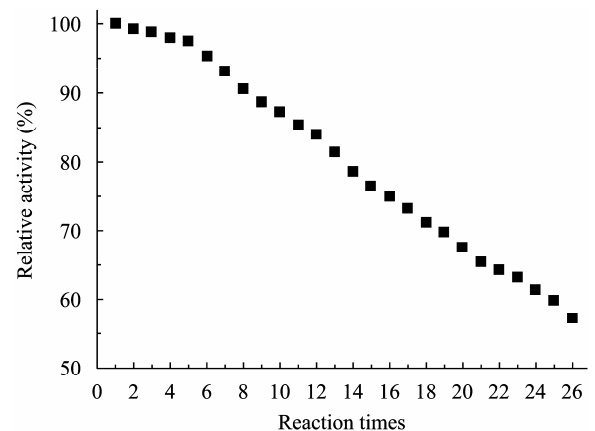


图5 固定化酶操作稳定性
Fig. 5 Operational stability of immobilized catalase.

3 结论

Fe(III)改性胶原纤维可作为固定化酶的载体,过氧化氢酶经固定化后具有较好的热稳定性、操作稳定性和贮存稳定性。固定化酶的使用pH和温度范围明显提高。与其他天然高分子载体相比,Fe(III)改性胶原纤维为载体固定过氧化氢酶具有更好的热稳定性及操作稳定性。鉴于胶原纤维的特殊物理化学性质,有望作为通用载体固定其他种类的酶。

REFERENCES

- [1] Liu LZ, Zhong GR, Xiong L, et al. Research and application progress of catalase. *Chem Bioeng*, 2009, 26(3): 15–18.
刘灵芝, 钟广蓉, 熊莲, 等. 过氧化氢酶的研究与应用新进展. *化学与生物工程*, 2009, 26(3): 15–18.
- [2] Chu HD, Leeder JG, Gilbert SG. Immobilized catalase reactor for use in peroxide sterilization of dairy products. *Food Sci*, 1975, 40(3): 641–643.
- [3] Zhang KS, Tian HL. Research and function of catalase in organism. *Food Sci Technol*, 2007, 32(1): 8–11.
张坤生, 田荟琳. 过氧化氢酶的功能及研究. *食品科技*, 2007, 32(1): 8–11.
- [4] Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45(2): 113–136.
- [5] Paar A, Costa S, Tzanov T, et al. Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents. *J Biotechnol*, 2001, 89(2/3): 147–153.
- [6] Singh S, Melo JS, Eapen S, et al. Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂. *J Biotechnol*, 2006, 123(1): 43–49.
- [7] Hu WJ, Tan TW, Wang F, et al. Immobilization of lipase by chemical modified of chitosan. *Chin J Biotech*, 2007, 23(4): 667–671.
胡文静, 谭天伟, 王芳, 等. 改性壳聚糖固定化脂肪酶的研究. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 667–671.
- [8] Li W, Sun JZ, Zhou QY. Advance in studies on polymer carriers for enzymes entrapment. *J Funct Polym*, 2001, 14(3): 365–369.
李伟, 孙建中, 周其云. 适于酶包埋的高分子载体材料研究进展. *功能高分子学报*, 2001, 14(3): 365–369.
- [9] Vandamme EJ. Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology. *Enzyme Microb Technol*, 1983, 5(6): 403–416.
- [10] Krajewska B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35(2/3): 126–139.
- [11] Tweddell RJ, Kermasha S, Combes D, et al. Immobilization of lipase from *Rhizopus niveus*: a way to enhance its synthetic activity in organic solvent. *Biocatal Biotrans*, 1999, 16(6): 411–426.
- [12] Li GY, Yang DL, Jiang YR, et al. Immobilization *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on cross-linked calcium alginate beads. *J Central South Univ: Sci Technol*, 2009, 40(6): 1510–1516.
李桂银, 杨栋梁, 蒋玉仁, 等. 交联海藻酸钙凝胶固定化酵母醇脱氢酶研究. *中南大学学报: 自然科学版*, 2009, 40(6): 1510–1516.
- [13] Chang MY, Juang RS. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36(1): 75–82.
- [14] Çetinus ŞA, Öztöp HN. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 32(7): 889–894.
- [15] Jürgen-Lohmann DL, Legge RL. Immobilization of bovine catalase in sol-gels. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(4): 626–633.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [17] Pan LH, Luo JP, Jiang ST. Study on isoflavone active aglycone preparation by immobilized β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Chin J Biotech*, 2007, 23(6): 1060–1064.
潘利华, 罗建平, 姜绍通. 固定化黑曲霉 β -葡萄糖苷酶制备染料木素活性苷元的研究. *生物工程学报*, 2007, 23(6): 1060–1064.
- [18] Cheng FL, Chen LL, Wang W, et al. Immobilization and stabilization of papain on SiO₂ particles containing amine groups. *Chin J Biotech*, 2004, 20(2): 287–290.
程凡亮, 陈伶利, 王卫, 等. 氨基化二氧化硅颗粒固定木瓜蛋白酶研究. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 287–290.
- [19] Peng Q, Hou B, Yao F, et al. Influence of pH, temperature and concentration of substrate on the activity of L1 metallo- β -lactamase. *Chin J Antibiot*. 2010, 35(1): 69–71.
彭青, 侯冰, 姚芬, 等. pH值、温度、底物浓度对L1型金属 β -内酰胺酶活性的影响. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(1): 69–71.
- [20] Liu Y, Gao H, Fan TT. Activity study on β -glucosidase immobilized on chitosan crosslinked with glutaraldehyde. *Food Sci*, 2008, 29(5): 315–318.
刘颖, 高晗, 范婷婷. 壳聚糖-戊二醛交联吸附法固定 β -葡萄糖苷酶的研究. *食品科学*, 2008, 29(5): 315–318.
- [21] Çetinus ŞA, Şahin E, Saraydin D. Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. *Food Chem*, 2009, 114(3): 962–969.
- [22] Xie XF, Zhang ZH, Chen PC. Study on the immobilization of catalase by AB-8 M acroporous absorbent resin. *Mater Rev*, 2009, 23(18): 50–53.
谢雪凤, 张朝晖, 陈培策. AB-8大孔吸附树脂固定化过氧化氢酶的研究. *材料导报*, 2009, 23(18): 50–53.