

“构象记忆”的辣根过氧化物酶的微水相共价固定化

蔡奕璇, 陈俊华, 姚冬生, 刘大岭

暨南大学生命科学技术学院 微生物技术研究所, 广州 510632

摘要: 本研究利用酶在微水溶剂中的“构象记忆”特性, 以壳聚糖微球为载体, 以辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)为研究对象, 将 HRP 于活性构象下冻干“固定”后, 在二氧六环:水=99:1(V/V)微水介质中与载体进行共价交联, 同时与传统水介质中共价交联固定化的 HRP 进行比较。结果发现, 两种介质中固定化 HRP 的最适温度都提高到 60°C, 最适 pH 均为 6.5, 而微水相中固定的酶活力损失较低, 酶活比传统水相中固定的酶高 6 倍以上; 70°C 保温 30 min 后, 微水相中固定的酶保留 75.42% 的活力, 而水相中固定的 HRP 仅存 15.4% 的活力; 微水相中固定的 HRP 具有更好的操作稳定性和热稳定性, 60°C 下连续操作 5 次之后, 微水相固定的 HRP 保留 77.69% 的酶活, 而水相固定的 HRP 仅存 16.67% 的酶活; 微水相中固定的 HRP 在苯酚的去除中表现得更具优势; 微水相中共价交联制备的 CS-HRP-SWCNTs/Au 酶修饰电极对 H₂O₂ 的响应信号比水相中共价固定的酶电极强 2.5 倍, 灵敏度更高。本研究表明利用酶的“构象记忆”在微水介质中进行共价交联是固定化酶的一种可行方法, 所制备的固定化酶具有更优良的性质。

关键词: 构象记忆, 微水介质, 共价固定, 辣根过氧化物酶

Investigation of micro-aqueous covalent immobilization of horseradish peroxidase by “conformation memory”

Yixuan Cai, Junhua Chen, Dongsheng Yao, and Daling Liu

Institute of Microbial Biotechnology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: We have studied the feasibility of preventing protein from denature during covalent immobilization by “conformation memory”, which was achieved by freeze-drying under enzyme active conformation and cross-linked with carrier under micro-aqueous media (MAM). Horseradish peroxidase (HRP) and chitosan beads have been used as the model enzyme and carrier. The MAM consisted of 99% dioxane and 1% water. We compared the immobilized HRP under MAM with that under traditional aqueous solvent, found that the optimum temperature of both was raised to 60°C, and the optimum pH was 6.5. However, the MAM-immobilized HRP had shown less activity loss during usage and six times higher activity than that immobilized under aqueous solvent. After 30 min incubation at 70°C, the MAM-immobilized HRP remained 75.42% activity while the aqueous-media-immobilized enzyme only 15.4%. The MAM-immobilized HRP has shown a better operation stability with 77.69% residue activity after 5 times of repeat operation while the aqueous-media-immobilized enzyme only 16.67%. In addition, the MAM-immobilized HRP had also shown more advantages when used in phenol removal. We constructed enzyme electrodes (CS-HRP-SWCNTs/Au) to further display the different properties of the two immobilized HRP. MAM-immobilized HRP-electrode has shown two times stronger response signal to H₂O₂ than that immobilized under aqueous media, which indicated a better enzyme activity of MAM-immobilized HRP. Our research demonstrated that the conformation memory, to some extent, did contribute to preventing protein from denaturing when use HRP as a model, and it is feasible to immobilize enzyme by covalent cross-linking

Received: October 6, 2009; **Accepted:** November 6, 2009

Corresponding author: Daling Liu. Tel: +86-20-85228422; Fax: +86-20-85226223; E-mail: tldl@jnu.edu.cn

method under micro-aqueous media.

Keywords: conformation memory, micro-aqueous media (MAM), covalent immobilization, horseradish peroxidase (HRP)

自 20 世纪 50 年代至今,酶的共价交联固定化是酶固定化技术的重要手段之一,该方法固定的酶与载体连接牢固,不易发生脱落,有良好的稳定性及可操作性,且使用寿命长,尤其在生物反应器的制备中发挥着重要的作用。但该法反应剧烈,易引起酶构象发生不可逆的变化,严重影响了固定化酶的活力。

20 世纪七八十年代,美国科学家 Klibanov 等^[1-2]发现多种酶在有机溶剂中仍然具有催化活性,且比水介质下的酶具有更高的稳定性,他们认为^[3]酶悬浮在含微量水(小于 1%)的有机溶剂时,蛋白质分子内氢键起主导作用,使蛋白质结构变得“刚硬”(Rigidity),活动的自由度变小,这种疏水环境中的动力学刚性限制了蛋白质构象向热力学稳定状态转化,能维持着和水溶液中同样的构象,不但不变性还能表现出催化活性。1990 年 Valiverty 等^[4]研究发现在有机溶剂中的酶活性与干燥前所在的缓冲液的 pH 和离子强度密切相关,其最适 pH 与水相中酶的最适 pH 一致,酶在最适缓冲液中经冻干后,能保持酶的最佳构象,转入微水有机溶剂中,它能“记忆”(Remember)原缓冲液中的 pH,记忆酶的最佳构象,也就是说,酶在微水有机溶剂中具有“构象记忆”的特性。利用酶的这种“构象记忆”,在微水介质中(即蛋白质形成“刚硬”结构)进行共价交联,是否能更好地保持酶的活性,这是一个十分有趣的问题,也是一个有理论和应用意义的问题,迄今未有文献报道过,值得探讨。

本研究利用酶在微水有机溶剂中这种“构象记忆”的特性,让酶保持在“正确”的构象状态下进行共价交联,以防止或减少酶在与载体进行共价交联时因构象变化而导致的活力下降。研究以壳聚糖微球为载体,以辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)为研究对象,使酶在活性构象下冻干,“固定”其构象之后,在微水有机介质中,让这种“构象记忆”的酶与载体进行共价结合,通过对固定化酶的性质评价,探讨在微水有机介质中利用“构象记忆”进行共价交联酶固定化方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

辣根过氧化物酶(>300 U/mg, 上海生工); 85%~90%脱乙酰度的壳聚糖(浙江澳兴生物科技有限公司); 1,4-二氧六环、戊二醛、过氧化氢、4-氨基安替比林、苯酚等为国产化学纯; TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 电化学操作在 CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上进行。

1.2 微水相和水相固定化辣根过氧化物酶的制备

1.2.1 酶的处理

将辣根过氧化物酶溶解于 pH 7.0、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液中,制成 0.1 mg/mL 的酶液,冻干后备用。

1.2.2 壳聚糖微球的活化

称取 2.5 g 壳聚糖粉末加入到 99 mL 蒸馏水中,磁力搅拌 10 min,然后再加入 1 mL 冰乙酸,室温下搅拌混合 3 h,纱布过滤,收集滤液,制成浓度为 2.5%的壳聚糖溶液,注入到含有 10% 的 NaOH(W/V)和 16.67%的 95%乙醇(V/V)的凝结液中,形成 2 mm 左右的壳聚糖微球,过滤收集壳聚糖珠,用蒸馏水洗涤至中性,制成壳聚糖微球,用一定浓度的戊二醛溶液交联活化 2 h,洗至中性,充分干燥,备用。

1.2.3 固定化 HRP 的制备

微水相固定化 HRP: 取含 0.5 mg 酶的冻干酶粉,置于 10 mL 的二氧六环微水溶液(二氧六环: H₂O=99:1, V/V)中,再加入 1 g 已活化的干燥壳聚糖微球,冰上振荡吸附 1 h,然后于 4°C 下吸附过夜。过滤,用吹风筒冷风将残留的二氧六环除去,得到在微水相中制备的具有“构象记忆”的固定化辣根过氧化物酶。

水相固定化 HRP: 取含 0.5 mg 酶的冻干酶粉,置于 10 mL pH 7.0、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液中,再加入 1 g 已活化的干燥壳聚糖微球,冰上振荡吸附 1 h,然后 4°C 下吸附过夜。过滤,用 pH 7.0、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液淋洗除去未吸附上的游离酶,干燥,得到在水相中制备的固定化辣根过氧化物酶。

1.3 酶活力测定

参考文献沃辛通(Worthington)法^[5]测定辣根过氧化物酶活性。定义：一个过氧化物酶单位相当于在规定条件下，于25°C、pH 7.0，每分钟分解1 μmol过氧化氢所需的酶量。固定化酶酶活(U/g)为1 g固定酶(干重)所具有的酶活力。

固定化酶酶活固定率(%) = 固定化后固定酶的总活力/加入溶液酶的活力×100%

1.4 固定化酶的蛋白结合率的测定

使用 Bradford 法测定吸附上的蛋白的含量，由加入的总蛋白量与残液中的蛋白总量的差值来决定。

蛋白结合率=(加入蛋白总量-残液中蛋白总量)×100%/加入蛋白总量

1.5 固定化 HRP 去除苯酚的作用

参照文献的方法^[6]，反应总体积为10 mL，在三角瓶中先加入终浓度为2 mmol/L的苯酚溶液和pH 7.0、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液置于三角瓶中振摇，溶液温度达到30°C时，加入终浓度为2 mmol/L的H₂O₂溶液，使[苯酚/H₂O₂]的摩尔比为1，再加入1 g的固定化酶，每隔5 min取样0.4 mL，滤去凝聚物，稀释至2.4 mL，于比色杯中加入0.3 mL 83.4 mmol/L铁氰化钾和0.3 mL 20.8 mmol/L 4-氨基安替比林，505 nm下测定吸光度，空白对照用2.4 mL的水代替样品。

苯酚去除率的计算： $[苯酚]\% = (A - A_0) \times 100 / A$;

A: 每次取样的样品吸光值;

A₀: 没有加酶之前的样品吸光值。

1.6 HRP 修饰电极的制备

将金电极(Au)依次用0.3 mmol/L和0.05 mmol/L的Al₂O₃粉抛光后，分别用无水乙醇和双蒸水超声3 min后于红外灯下烘干，备用。将2 mg单壁碳纳米管(SWCNTs)分散在5 mL的0.5%壳聚糖(CS)溶液中，超声分散得到均匀的CS-SWCNTs混悬液，取5 μL CS-SWCNTs混悬液滴于Au上自然晾干后得到CS-SWCNTs/Au修饰电极，滴加0.3%的戊二醛交联后室温晾干，然后按溶剂：酶=10 μL:0.05 mg(V/W)比例分别于缓冲液条件下和二氧六环：水=99:1(V/V)微水相中进一步共价交联HRP，其中用于微水相(MAM)共价固定的HRP为预先于最适

pH值下冷冻干燥的HRP。上述溶液各取10 μL滴于CS-SWCNTs载体中，4°C固定过夜，分别制作得CS-WHRP(水相中固定的)-SWCNTs/Au酶修饰电极和CS-MAMHRP(微水有机相中固定的)-SWCNTs/Au酶修饰电极。

2 结果与讨论

2.1 酶固定化的戊二醛浓度的选择

戊二醛活化壳聚糖微球表面的氨基，将酶分子共价交联到载体上。交联过程中要求一个适当的交联度剂浓度，交联度过大，酶与载体结合过于紧密，产生的空间障碍影响酶活性的发挥。本实验尝试了0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%等6个戊二醛浓度。结果如图1所示。当戊二醛浓度为0.3%时，固定化酶的活性最高，此后随着浓度的增加或减小而酶活减少。说明0.3%的戊二醛已经足以使壳聚糖微球上的氨基充分发生交联反应并让酶保持一定的自由度，故选用0.3%的戊二醛作为本研究固定化酶所用戊二醛浓度。

2.2 二氧六环浓度对固定化酶活力的影响

文献报道^[7]，在含一定量二氧六环的溶液中HRP具有考察活性，而且在有机溶剂中酶的催化活性与其含水量密切相关^[8]。本研究以二氧六环作为共价固定酶的介质，考察在不同含水量的二氧六环溶剂中共价固定HRP对固定化酶活力的影响。结果如图2所示，在含水量为1.0%的二氧六环溶剂中，固定化酶活性最高。含水量低于1.0%时，酶分子过

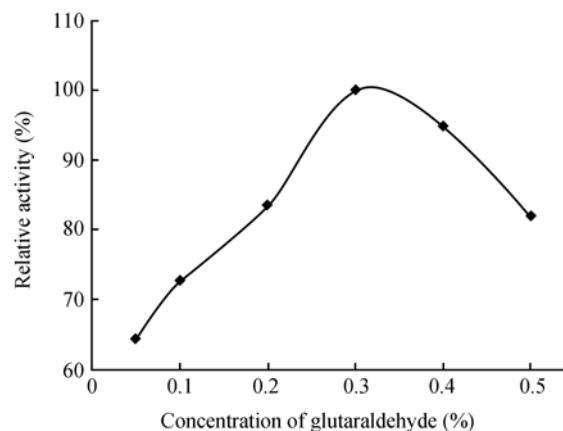


图1 戊二醛浓度对固定化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of glutaraldehyde on activity of immobilized enzyme.

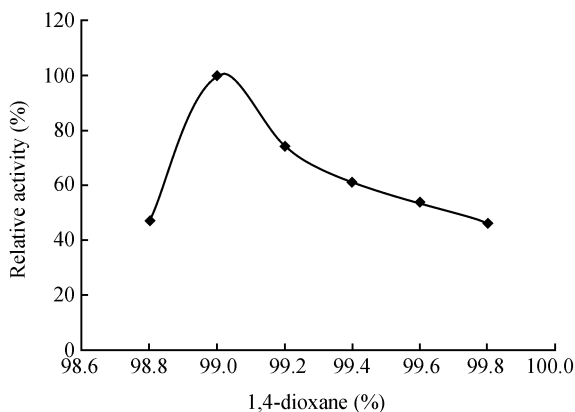


图2 二氧六环浓度对固定化酶活力的影响
Fig. 2 Effect of 1,4-dioxane on activity of immobilized enzyme.

于“刚性”而影响了其催化过程中必需的“柔性”，而含水高于 1.0%时，酶分子过于“柔性”在共价交联过程中易发生构象变化而丢失活力。

2.3 微水相固定化 HRP 与水相固定化 HRP 的酶学性质比较

2.3.1 最适温度和温度稳定性

结果如图 3 所示，微水相和水相中共价固定的 HRP，酶促反应最适温度均在 60°C，比游离酶(25°C)提高了 35°C。将两种固定化酶分别分成若干份置于 70°C 中孵育，每隔 30 min 取出于最适条件下测活，结果如图 4 所示：孵育 30 min 后，水相固定化 HRP 仅保留 15.4%的酶活，比活力 4.36 U/g，而微水相固定化 HRP 可以保留 75.42%的酶活，比活力为 152.84 U/g；孵育 60 min 后，微水相固定的 HRP 残留酶活为 71.48%，而水相固定化 HRP 酶活力几乎完全丧失。这表明微水相共价固定化 HRP 具有更高的热稳定性。

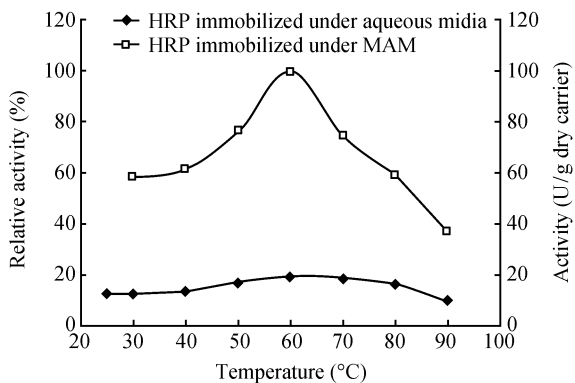


图3 固定化酶的最适温度
Fig. 3 Optimum temperature of immobilized enzyme.

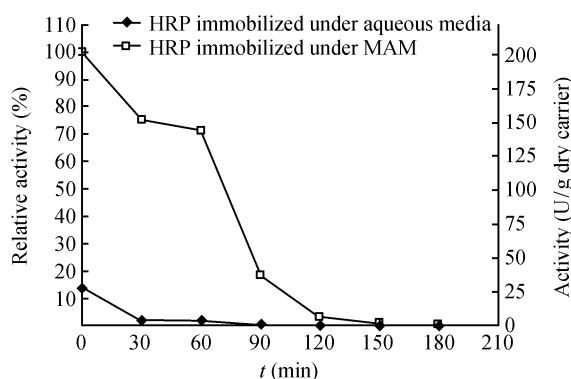


图4 固定化酶的热稳定性
Fig. 4 Thermal stability of immobilized enzyme.

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

如图 5 所示，两种介质中固定的 HRP 在 pH 6.5 处表现最大酶活力，均比游离酶(pH 7.0)低，但是微水相固定的 HRP 酶活远远高于水相固定的 HRP。在考察固定化酶的 pH 稳定性时发现(图 6)：室温下在各种 pH 值的缓冲液中放置 24 h 后，微水相固定的 HRP 在 pH 7.0 时酶活损失最少，在 pH 5.5~7.0 之间稳定，有较好的耐酸性，而水相固定化 HRP 在 pH 7.0~8.0 之间显示一定的耐碱性，但残留酶活明显不如微水相固定化 HRP。

2.3.3 操作稳定性

把两种介质中共价固定的酶在 60°C 下连续测定其活力来考察固定化酶的操作稳定性，每次测定之后用去离子水洗涤固定化酶，吸干水分之后再进行一次操作，发现(图 7)：操作一次后，微水相固定的酶损失了 8.22%的酶活，比活力为 194.39 U/g，而水相中固定的 HRP 活力损失 34.26%，活力仅为

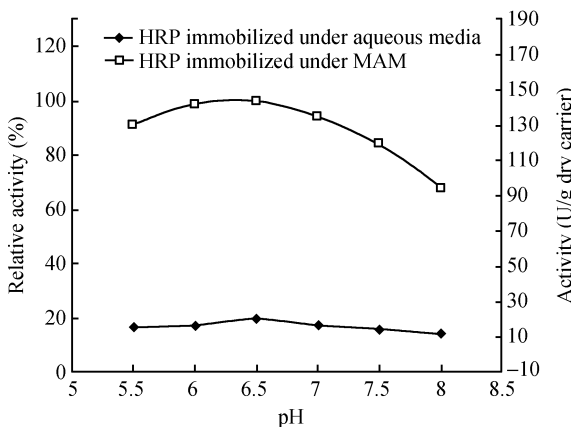


图5 固定化酶的最适 pH
Fig. 5 Optimum pH of immobilized enzyme.

17.98 U/g; 而操作到第 5 次时, 微水相中固定的 HRP 残留酶活为 77.69%, 酶活力仍有 164.5 U/g, 而水相中固定的 HRP 残留活力仅存 16.67%, 比活仅有 4.56 U/g。该结果表明在二氧六环微水相中对酶进行共价交联固定化比传统的水相中进行的共价固定显示了更好的操作稳定性。

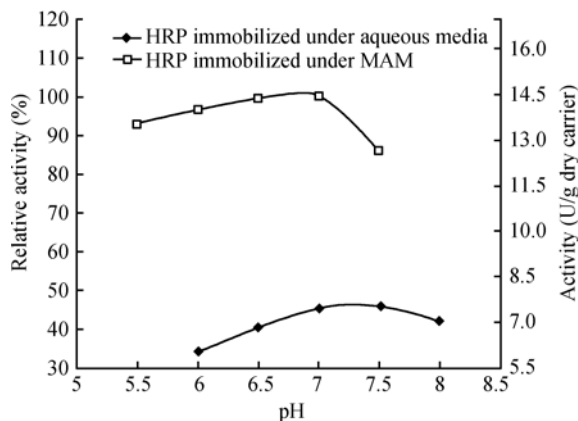


图 6 固定化酶的 pH 稳定性
Fig. 6 pH stability of immobilized enzyme.

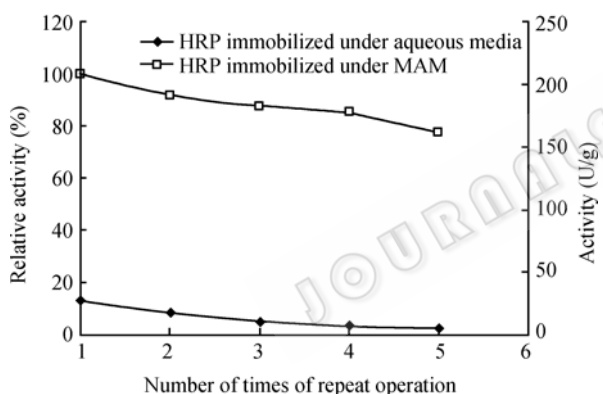


图 7 固定化酶的操作稳定性
Fig. 7 Operative stability of immobilized enzyme.

2.3.4 不同介质下 HRP 固定化效果的比较

参考沃辛通测活方法^[5], 在 96 孔板中, 每个孔等量加入测活时的底物和显色剂, 同时分别加入一定量的游离酶, 和结合上与游离酶等量蛋白的水相固定化酶和微水相固定化酶, 壳聚糖载体(对照)及二氧六环(对照), 反应 5 min 后, 观察各组显色情况, 颜色越深, 说明酶活越高。结果如图 8 所示: 游离酶和固定化酶 3 个组显色, 2 个对照组均未显色, 可以排除固定化酶中的载体和可能残存的二氧六环对测活的干扰。同时发现微水相固定化酶组明显比水相

固定化酶组颜色要深, 这直观地表明了利用酶的“构象记忆”在微水有机介质中共价固定的酶较传统的水相固定能更好地保留酶的活力。

两种介质中共价固定的 HRP 在外观上亦有所不同(图 9), 微水相固定的 HRP 壳聚糖微球呈红色, 机械强度较好, 水相固定的 HRP 壳聚糖微球呈绿色, 球体较软, 机械强度较差。

表 1 总结了在两种不同介质中共价固定化 HRP 的效果, 结果显示微水相固定化 HRP 活力回收率较高, 酶活是水相固定化 HRP 的 6 倍以上。由此认为, 在缓冲液中进行固定化时, 酶的周围存在大量的水, 酶分子的柔性加强, 有足够空间允许酶分子自由伸展, 在共价交联时构象易改变而引起酶活力下降; 而处于“构象记忆”状态中的酶在微水介质中, 周围的有机介质限制了酶分子的伸展, 进行共价交联时更好地保持了酶原有的“正确”构象, 而适量的水又保证了酶行使催化作用所必需的水, 因而显示了更好的固定化酶活回收率。

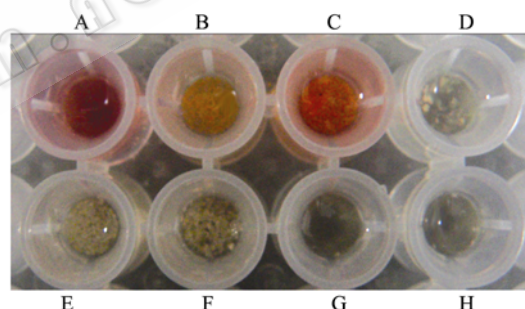


图 8 各对照组在 HRP 测活显色系统中的显色情况
Fig. 8 Coloration of control groups in activity measurement of HRP. A: free enzyme; B: HRP immobilized under aqueous media; C: HRP immobilized under micro-aqueous organic media; D: chitosan; E: chitosan and buffer; F: chitosan and 1,4-dioxane; G: buffer; H: 1,4-dioxane.

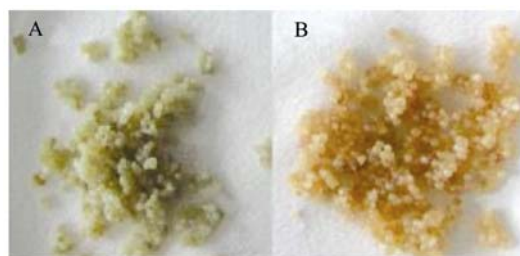


图 9 固定化辣根过氧化物酶
Fig. 9 Immobilization of horseradish peroxidases. (A) HRP immobilized under aqueous media. (B) HRP immobilized under micro-aqueous organic media.

表 1 不同介质下壳聚糖微球共价固定化辣根过氧化物酶

Table 1 Covalent immobilization of horseradish peroxidases using chitosan beads and different immobilization medium

Immobilization medium	Activity (U/g Carrier)	Protein bounding (%)	Activity offered for immobilization (U)	Immobilization activity (%)	Immobilization yield (%)
Buffer	28.36	56	455.93	5.23	7.05
Dioxane: water=99: 1(V/V)	202.66	56.8	455.93	28.89	40.35

2.4 两种固定化 HRP 对苯酚的去除试验

文献报道^[9-10]辣根过氧化物酶可有效去除废水中的酚类化合物, 本研究将 1 g 微水相固定的 HRP 和水相固定的 HRP 分别用于去除含量为 2 mmol/L 的苯酚, 以比较两种固定化酶的应用效果。结果如图 10 所示: 在相同条件下反应 5 min 后, 微水相固定化 HRP 对苯酚的去除率可达到 63.86%, 而水相固定的 HRP 对苯酚的去除效率仅为 34.16%; 反应 15 min 以后, 微水相固定化 HRP 对苯酚的去除效率已经达到最高, 为 84.9%, 而水相固定的 HRP 在反应 20 min 后才达到最大值, 去除率仅为 72.51%。这表明了微水相共价固定化 HRP 在苯酚的去除中也更具优势。

2.5 两种介质固定的 HRP 修饰电极对 H₂O₂ 响应信号的电化学表征

为了更好地了解利用“构象记忆”进行酶在微水介质中共价交联固定对酶催化特征的影响, 本研究还采用了电化学的方法对两种介质中共价固定的 HRP 进行了电化学表征。分别将缓冲液中的 HRP 和微水相中处于“构象记忆”状态的 HRP 共价交联固定到电极上, 得到 CS-WHRP-SWCNTs/Au 和 CS-MAMHRP-SWCNTs/Au 两种酶修饰电极。利用循环伏安(CV)法检测 H₂O₂ 发现(图 11): 扣除背景电流(曲线 a, b)后(空白对照不加 H₂O₂), CS-MAMHRP-SWCNTs/A 电极对 H₂O₂ 的还原峰电流(曲线 d)响应信号比 CS-WHRP-SWCNTs/Au 电极(曲线 c)提高了 2.5 倍, 表明在“构象记忆”状态下对酶进行共价交联更有利于酶保持其活力。

3 结论

在提高固定化酶的酶活回收率、稳定性和使用性方面有大量的研究^[11], 合适载体的选择、固定化条件的优化以及各种抑制剂的添加, 都对固定化酶

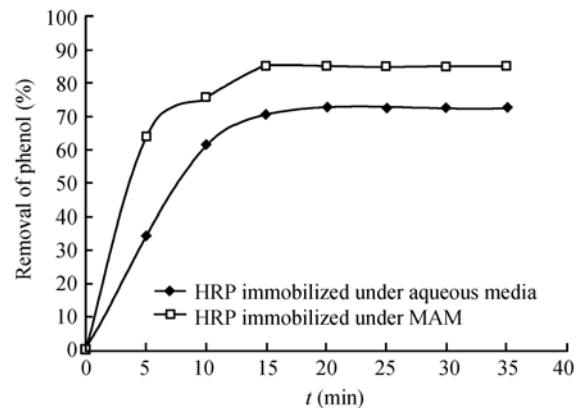
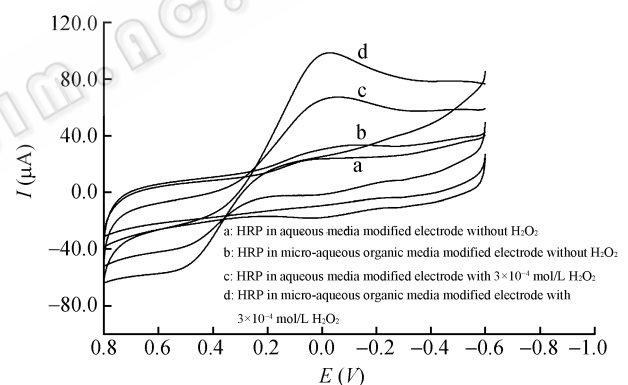


图 10 固定化 HRP 对苯酚的去除

Fig. 10 Immobilized HRP for phenol removal.

图 11 不同介质下固定化 HRP 修饰电极循环伏安(CV)法检测 H₂O₂Fig. 11 H₂O₂ detected by CV using immobilized HRP in different medium.

的效果起到了重要作用。从本研究结果可以看出, 利用蛋白质的“构象记忆”在微水介质中进行的辣根过氧化物酶的共价交联固定, 与传统的水介质固定化方法相比, 能够更好地保留酶的活力, 显著地提高了酶的回收率。此外在热稳定性、操作稳定性以及对苯酚的去除上, 微水相固定都显示了明显的优势。本研究的结果表明利用蛋白质的“构象记忆”在二氧六环微水相中对辣根过氧化物酶进行共价交联固定确实比传统的水相中进行的共价固定能更

好地保持酶的活性。利用“构象记忆”进行酶共价固定的方法,有可能为设计耐用、高活力、高稳定性和使用性的固定化酶开辟一条新的途径。

REFERENCES

- [1] Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, 1984, **224**(4654): 1249–1251.
- [2] Zaks A, Klibanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(10): 3192–3196.
- [3] Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents. *J Biol Chem*, 1988, **263**(7): 3194–3201.
- [4] Valivety RH, Rakels JLL, Blanco RM, *et al.* Measurement of pH changes in an inaccessible aqueous phase during biocatalysis in organic media. *Biotechnol Lett*, 1990, **12**(7): 475–480.
- [5] Stellmach B[German], translated by Qian JY. *Bestimmungsmethoden Enzyme*. Beijing: China Light Industry Press, 1992: 276–278.
施特尔马赫 B[德], 著. 钱嘉渊, 译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 276–278.
- [6] Gómez JL, Bódalo A, Gómez E, *et al.* Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39**(5): 1016–1022.
- [7] Akkara JA, Senecal KJ, Kaplan DL. Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 1991, **29**(11): 1561–1574.
- [8] Zaks A, Klibanov AM. The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem*, 1988, **263**(17): 8017–8021.
- [9] Lai YC, Lin SC. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochem*, 2005, **40**(3/4): 1167–1174.
- [10] Cho SH, Shim J, Yun SH, *et al.* Enzyme-catalyzed conversion of phenol by using immobilized horseradish peroxidase (HRP) in a membraneless electrochemical reactor. *Appl Catal A: General*, 2008, **337**(2): 66–72.
- [11] Mateo C, Palomo JM, Lorente GF, *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **40**(6): 1451–1463.

JOURNALS.IM.AC.CN