

多孔菌漆酶在 AOT/异辛烷反胶团中的特性表征

张俊¹, 潘易², 林宝达¹, 周春何¹, 董海洁¹

(1. 丽水市环境监测中心站, 浙江丽水 323000; 2. 丽水市固体废物管理中心, 浙江丽水 323000)

摘要 [目的]对多孔菌漆酶包埋于 AOT/异辛烷反胶团中的特性进行研究。[方法]在漆酶反胶团中加入醋酸盐缓冲液和邻联甲苯胺, 放入 25 °C 恒温箱中培养 25 min 后离心, 取下清液, 测光密度值。[结果]在漆酶反胶团体系中加入适量吐温-80 后, 漆酶反胶团酶活力有所提高。经反胶团包埋后, 酶的热稳定性和酸碱稳定性较水相酶有较大提高, 在 40 °C 下保温 30 d 酶活力保留 81.3%, 在 pH 4.5 下保存 30 d 酶活力保留 89.6%。[结论]在该反胶团体系中, 酶的稳定性有较大的提高。

关键词 多孔菌漆酶; AOT; 异辛烷; 反胶团; 特性表征

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)18-005-03

Characterization of Polyporous Laccase in AOT/Isocetane Reversed Micelles

ZHANG Jun¹, PAN Yi², LIN Bao-da¹ et al (1. Lishui Environmental Monitoring Center, Lishui, Zhejiang 323000; 2. Lishui Solid Waste Management Center, Lishui, Zhejiang 323000)

Abstract [Objective] The characteristics of polyporous laccase entrapped in AOT/isocetane reversed micelles were studied. [Method] Acetate buffer and o-tolidine into AOT/isocetane reversed micelles was added, then was put in an incubator chamber at 25 degrees for 25 minutes. Bottom clear liquid was collected to measure optical density value after centrifugating. [Result] Its activity was enhanced after joining optimal quantity of Tween-80 and its stability to variation of temperature and pH was improved to a great extent. 81.3% of its activity still remained after storage at 40 °C for 30 days, and 89.6% of its activity remained after storage at pH 4.5 for 30 days. [Conclusion] The stability of polyporous laccase was enhanced greatly in the reversed micelles.

Key words Polyporous laccase; AOT; Isocetane; Reversed micelles; Characterization

多孔菌漆酶对降解含氯有机物的作用是非常明显的, 但因其在水相中稳定性不高, 因而限制了它的广泛使用。为了增强酶的稳定性, 克服在溶解状态易受抑制的缺点, 通常采用吸附法^[1-3]、交联法^[4-6]、共价键结合法^[7-9]和包埋法固定化酶^[10-12]。与传统固定化方法相比, 反胶团包埋酶技术有其独特的优点。反胶团的结构特征使酶在有机溶剂中溶入很小的水环境中, 由于表面活性剂的存在而使酶不与有机溶剂直接接触, 可更好地保护酶的催化活性部位, 因而活性和稳定性得到保留。笔者研究了多孔菌漆酶在二-(2-乙基己基)琥珀酸双酯磺酸钠(AOT)/异辛烷反胶团中的稳定性, 并与相应的游离漆酶进行比较。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 多孔菌菌种, 中科院化学研究所提供; 邻联甲苯胺, 分析纯, 上海化学试剂总厂; AOT 气溶胶, 浙江嘉善巨枫化工厂; 756 MC 型紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 试验方 法

1.2.1 游离漆酶活性的测定。取 0.1 mol/L、pH 4.6 的醋酸缓冲液 3.4 ml, 加入 3.36 mmol/L 邻联甲苯胺 0.5 ml, 再加入游离漆酶液 0.1 ml, 25 °C 保温 30 min。在 756 MC 型紫外可见分光光度计下测定 600 nm 处的光密度(OD 值), 以空白不含酶溶液为对照。酶活力以酶与底物反应 30 min 后光密度的改变值表示。以每分钟光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位。

1.2.2 反胶团的制备。在含 0.1 mol/L AOT 的异辛烷溶液

中加入一定量的 0.02 mol/L、pH 4.6 的漆酶醋酸盐缓冲液(其中加入游离漆酶液), 立即振荡溶液至澄清, 使之形成均一、透明、稳定的反胶团体系, 即得所需含水值为 R 的含酶反胶团。欲改变 R 值, 只需调节注入的缓冲液量即可。 R 值的定义为有机相中水的摩尔浓度与 AOT 摩尔浓度之比, 即 $R = [H_2O]/[AOT]$ 。

1.2.3 反胶团酶活力的测定。取 5 ml 漆酶反胶团(其中含游离漆酶 0.1 ml), 加入 0.1 mol/L、pH 4.6 的醋酸盐缓冲液 3.4 ml, 再加入 3.36 mmol/L 邻联甲苯胺 0.5 ml, 放入 25 °C 恒温箱中培养 25 min 后, 在 25 °C 下 4 000 r/min 的离心机上离心 5 min。取下清液, 放在 756 MC 型紫外可见分光光度计测 600 nm 处的光密度(OD 值), 以与空白不含酶的为对照。酶活力以漆酶反胶团与底物反应 30 min 后光密度的改变值表示。以每分钟光密度增加 0.01 为 1 个酶活力单位。

1.3 数据分析方法 试验数据用 SAS 8.01 版统计软件进行处理和分析。采用 DMRT 法进行多重比较, P 值均为 0.05。

2 结果与分析

2.1 反胶团中不同含水值及 Tween-80 浓度对漆酶反胶团活力的影响 反胶团的含水值是反胶团结构的重要参数之一。它会影响到漆酶反胶团活力。Tween-80 作为一种助表面活性剂, 在反胶团中的浓度也会影响到漆酶反胶团活力。表 1 表明, 反胶团中不同含水值和 Tween-80 浓度对漆酶反胶团活力都有显著影响。当反胶团中 Tween-80 浓度为 0.012 5 mol/L 时, 漆酶反胶团活力提高最显著, 当含水值为 30 时漆酶反胶团活力达到 51.97, 是未加 Tween-80 时活力的 1.43 倍, 是游离漆酶活力的 1.40 倍。这一结果与前人研究报道的关于漆酶在反胶团体系下体现出“超活力”的结论^[13]一致。

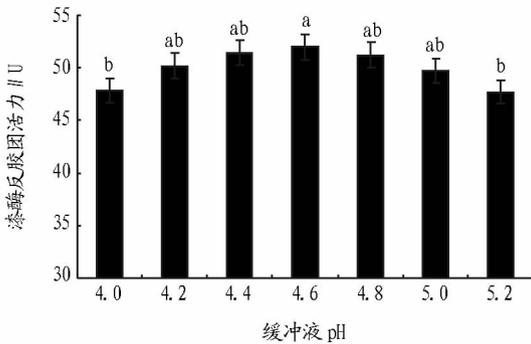
表1 不同含水值和 Tween-80 浓度对漆酶反胶团活力的影响

U

Tween-80 浓度 mmol/L	Tween-80 浓度//mmol/L			
	0	6.25	0.0125	0.025
15	33.81 ± 0.79b(c)	40.94 ± 0.95a(b)	49.01 ± 1.14a(a)	42.65 ± 0.99a(b)
20	31.48 ± 0.75b(c)	37.23 ± 0.89b(b)	45.00 ± 1.08b(a)	38.79 ± 0.93b(b)
25	23.54 ± 0.63d(c)	27.42 ± 0.73d(b)	33.14 ± 0.88d(a)	28.57 ± 0.76d(b)
30	36.36 ± 0.84a(c)	43.00 ± 0.99a(b)	51.97 ± 1.21a(a)	44.80 ± 1.04a(b)
35	33.71 ± 0.81b(c)	41.38 ± 0.99a(b)	48.98 ± 1.18a(a)	43.11 ± 1.03a(b)
40	26.33 ± 0.74c(c)	30.63 ± 0.86c(b)	37.16 ± 1.04c(a)	32.03 ± 0.89c(b)

注:采用 DMRT 法进行多重比较,同列数据中含有相同字母者表示差异不显著;括号里的字母是同行多重比较结果,含有相同字母者表示差异不显著。

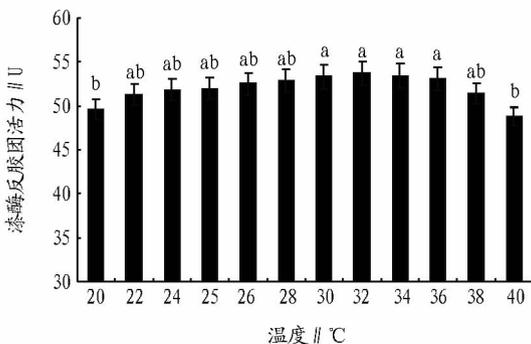
2.2 制备反胶团时加入不同 pH 缓冲液对漆酶反胶团活力的影响 由图 1 可知,加入的缓冲液 pH 在 4.2~5.0 之间对漆酶反胶团活力影响不显著,且活力都维持在较高水平。加入缓冲液的最适 pH 为 4.6,此时漆酶反胶团活力为 51.97,加入缓冲液的最适 pH 与“1.2.2”漆酶反胶团的制备方法中加入的缓冲液 pH 相同。



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图1 不同 pH 缓冲液对漆酶反胶团活力的影响

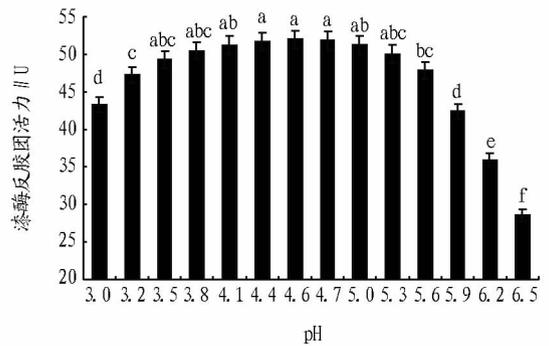
2.3 温度对漆酶反胶团活力的影响 由图 2 可知,漆酶反胶团在 22~38 °C 之间时活力受温度影响不显著,且活力都维持在较高水平。当漆酶反胶团最适作用温度为 30~36 °C 时,活力达到 53.70 U。与游离漆酶相比,漆酶反胶团在 20~40 °C 的活力变化更小,最适作用温度有所提高。这反映漆酶反胶团的热稳定性较游离漆酶得到提高。郭从容等^[14]对青霉素酰胺酶经反胶团包埋后最适作用温度提高 5 °C 的报道与该试验结果接近。



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图2 温度对漆酶反胶团活力的影响

2.4 pH 对漆酶反胶团活力的影响 由图 3 可知,漆酶反胶团在 pH 3.5~5.3 之间时活力变化不显著,且都维持在较高水平。在此 pH 范围之外,活力都会有所下降,在漆酶反胶团最适作用 pH 4.4~4.7 时,活力达到 51.97 U。



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 pH 对漆酶反胶团活力的影响

2.5 漆酶反胶团的热稳定性 由图 4 可知,漆酶反胶团在 30、40、50 °C 保存 4 d 后活力变化显著;30、40、50 °C 保存 30 d 活力分别保留 84.4%、81.3%、62.0%。而游离漆酶在 30、40、50 °C 保存 30 d 活力,分别只保留 69.4%、10.5%、6.2%。与游离漆酶液相比,漆酶反胶团热稳定性得到显著提高。

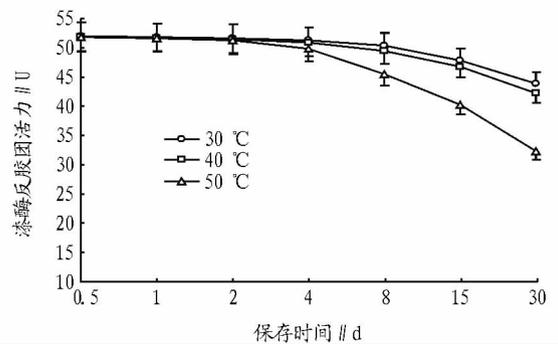


图4 不同温度下保存一定时间后的漆酶反胶团活力动力学变化

2.6 漆酶反胶团的酸碱稳定性 由图 5 可知,漆酶反胶团在 pH 4.0~5.0 下保存较稳定,pH 4.5 时保存最稳定,保存 30 d 活力仅损失 10.4%;pH 5.0 时保存 30 d,活力保留 66.3%;但,在 pH 小于 3.0 或大于 5.5 时保存不稳定,在 pH 3.0 保存 30 d,活力仅保留 42.5%;pH 6.0 时保存 30 d,活力仅保留 21.0%。与游离漆酶相比,pH 4.5 时保存 30 d,活力仅保留 45.0%;pH 5.0 时保存 30 d,活力保留 20.4%;pH 5.5

时保存 30 d,活力仅保留 13.1%,漆酶反胶团的酸碱稳定性也得到显著提高。

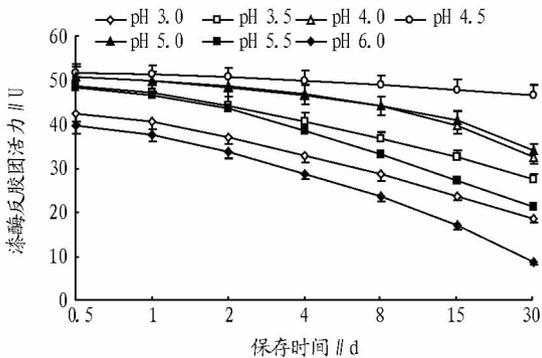


图5 不同 pH 下保存一定时间后漆酶反胶团活力动力学变化

3 结论与讨论

(1) 经反胶团包埋后,漆酶的稳定性较游离漆酶有较大提高,热失活和酸碱失活显著减少。这可能是因为酶在反胶团内的微环境比在水溶液中更接近其天然的胞内环境,有利于维持具有催化功能的酶的空间构象,减少其他构象的存在^[15],从而保持较高的酶活性。另一方面,酶的稳定性一般与水化程度有关,不完全水化的酶的稳定性往往较高^[16],因此反胶团体系中有有机溶剂的存在也有利于改善酶的稳定性。

(2) 反胶团体系不同含水值、Tween-80 浓度以及制备反胶团时加入不同 pH 的缓冲液对漆酶反胶团活力都有一定影响。当反胶团体系中含水值为 30、Tween-80 浓度为 0.012 5 mol/L、制备反胶团的缓冲液 pH 为 4.6 时,制得的反胶团酶活力最高。该酶在 AOT/异辛烷反胶团体系中的最适作用温度为 30 ~ 36 °C,最适作用 pH 为 4.4 ~ 4.7。该条件下反胶团体系较稳定。

(上接第 4 页)

- [6] TAI Y C, SPEED T P. A multivariate empirical Bayes statistic for replicated microarray time course data [J]. *The Annals of Statistics*, 2006, 34: 2387 - 2412.
- [7] ZHANG H, LI G, SONG X, et al. Changes in soil microbial functional diversity under different vegetation restoration patterns for Hulunbeier Sandy Land [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33: 38 - 44.
- [8] JANSEN J J, HOEFSLOOT H C, VAN DER GREEF J, et al. ASCA: Analysis of multivariate data obtained from an experimental design [J]. *Journal of Chemometrics*, 2005, 19: 469 - 481.
- [9] KOOP G, KOROBILIS D. Bayesian multivariate time series methods for empirical macroeconomics [M]. Now Publishers Inc, 2010.
- [10] SMILDE A K, JANSEN J J, HOEFSLOOT H C, et al. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21: 3043 - 3048.
- [11] ZWANENBURG G, HOEFSLOOT H C, WESTERHUIS J A, et al. ANOVA-principal component analysis and ANOVA-simultaneous component analysis: A comparison [J]. *Journal of Chemometrics*, 2011, 25: 561 - 567.
- [12] SZYMANSKA E, SACCENTI E, SMILDE A K, et al. Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies [J]. *Metabolomics*, 2012, 8: 3 - 16.
- [13] XIA J, MANDAL R, SINELNIKOV I V, et al. Metabo analyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis [J]. *Nucleic Acids Re-*

参考文献

- [1] 朱祥瑞,徐俊良. 家蚕丝素固定化 α -淀粉酶的制备及其理化特性[J]. *浙江大学学报:农业生命科学版*, 2002, 28(1): 64 - 69.
- [2] 杨昌英,潘家荣,钟珩,等. 醋酸纤维素固定化脂肪酶催化猪油合成单甘酯[J]. *湖北化工*, 2002(6): 20 - 21.
- [3] 高贵,韩四平,王智,等. 硅藻土固定化脂肪酶[J]. *吉林大学学报:理学版*, 2002, 40(3): 324 - 326.
- [4] 钱军民,李旭祥,锁爱莉. 氨基化硅胶固定化葡萄糖氧化酶的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(30): 394 - 397.
- [5] 曾嘉,郑连英,余世清. 壳聚糖微球固定化葡萄糖氧化酶的研究[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(1): 29 - 31.
- [6] QUINN Z, ZHOU K, CHEN X D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde[J]. *J Food Eng*, 2001, 48(1): 69 - 74.
- [7] 乌云高娃,卢冠忠,郭杨龙,等. 聚甲基丙烯酸缩水甘油酯固定化青霉素酰化酶性质的研究[J]. *华东理工大学学报*, 2002, 28(6): 633 - 636.
- [8] DESSOUKI A M, ISSA G I, ATIA K S. Pullulanase immobilization on natural and synthetic polymers[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2001, 76(7): 700 - 706.
- [9] WANG S L, CHIO S H. Reversible immobilization of chitinase via coupling to reversibly soluble polymer [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22(7): 634 - 640.
- [10] ARVIND M. A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation[J]. *Biochemical Education*, 1999, 27: 114 - 117.
- [11] 钱军民,李旭祥. HES/SiO₂ 凝胶复合物包埋固定化葡萄糖氧化酶的研究[J]. *应用化学*, 2002, 19(2): 153 - 157.
- [12] 颜慧,冯妍,李军红. 扑草净降解酶的固定化及其对受污染土壤的生物强化研究[J]. *南开大学学报:自然科学版*, 2003, 36(2): 109 - 115.
- [13] PSHEZHESKY A V, KLYACHKO N L, PEPANIYAN G S, et al. Modeling of membrane environment of enzymes: Superactivity of laccase entrapped into surfactant reversed micelles in organic solvents [J]. *Boikimiya*, 1988, 53(2): 1013 - 1016.
- [14] 郭从容,何志敏,邹超. 青霉素酰化酶在 AOT/异辛烷反胶团中的稳定性研究[J]. *中国医药工业杂志*, 1999, 30(12): 531 - 533.
- [15] BROWN E D, YADA R Y, MARAGONIA A G. The dependence of the lipolytic activity of rhizopus arrhizus lipase on surfactant concentration in AOT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzymes structure [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1161(1): 66.
- [16] YAMADA Y, KUBOI R, KOMASAWA I. Increased activity of *Chromobacterium viscosum* lipase in aerosol OT reverse micelles in the presence of nonionic surfactants [J]. *Biotechnol Prog*, 1993, 9: 468 - 472.
- [17] XIA J, PSYCHOGIOS N, YOUNG N, et al. Metabo analyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 652 - 660.
- [18] 戴建军,宋朋慧,闫春春,等. 不同种植方式对苗期大豆、玉米根际土壤酶活性及微生物量碳、氮的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2013(2): 17 - 22.
- [19] 何国艳,汤利,郑毅. 玉米马铃薯间作对根际微生物数量的影响[C]//涂仕华,周健民,邓良基. 面向未来的土壤科学(中册)——中国土壤学会第十二次全国会员代表大会暨第九届海峡两岸土壤肥科学术交流研讨会论文集. 成都:电子科技大学出版社, 2012.
- [20] 宋亚娜. 不同间作体系中作物根际微生物群落结构多样性特征[D]. 北京:中国农业大学, 2006.
- [21] ZHANG N N, SUN Y M, LI L, et al. Effects of intercropping and rhizobium inoculation on yield and rhizosphere bacterial community of faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46: 625 - 639.
- [22] 宋亚娜, MARSCHNER P, 张福锁, 等. 小麦/蚕豆, 玉米/蚕豆和小麦/玉米间作对根际细菌群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(7): 2268 - 2274.
- [23] NAKATSU C H, TORSVIK V, ØVREÅS L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64: 1382 - 1388.