

# 磁性壳聚糖微球固定化黄嘌呤氧化酶及其酶学性质的研究

任娇艳, 康小燕, 陈云, 郭陈锋

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文利用化学共沉淀法制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性颗粒, 并以此为磁核通过乳化交联法制备磁性壳聚糖微球, 以环氧氯丙烷对微球表面进行活化, 用于黄嘌呤氧化酶的固定化研究。以微球表面的环氧基密度为活化指标, 确定了活化过程的最适工艺条件: 环氧氯丙烷体积分数为 40%,  $\text{NaBH}_4$  浓度为 0.60 g/L,  $\text{NaOH}$  浓度为 1.20 mol/L。对微球进行结构表征, 结果表明: 壳聚糖成功包裹了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性粒子, 且已活化微球的表面具有环氧基活性基团;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性粒子、未活化和已活化磁性壳聚糖微球的中径分别为 2.16、20.30 和 24.69  $\mu\text{m}$ 。活化结束后, 将黄嘌呤氧化酶固定在磁性微球上。以酶活为指标, 确定最适固定化工艺为: 时间 1 h, 温度 30  $^\circ\text{C}$ , pH 8.0。对固定化黄嘌呤氧化酶的酶学性质研究, 结果表明: 酶的最适作用温度为 48  $^\circ\text{C}$ , 最适作用 pH 为 8.5, 酶具有良好的热稳定性、pH 稳定性及操作稳定性。

**关键词:** 磁性壳聚糖微球; 环氧基密度; 固定化黄嘌呤氧化酶; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2016)12-66-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.011

## Immobilization of Xanthine Oxidase on Magnetic Chitosan Microspheres and its Effect on Enzymatic Properties

REN Jiao-yan, KANG Xiao-yan, CHEN Yun, GUO Chen-feng

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Iron oxide magnetic particles were prepared by chemical co-precipitation and the particles were cross-linked to magnetic chitosan microspheres. Afterwards, the magnetic chitosan microspheres were activated by surface modification with epoxy groups for subsequent xanthine oxidase immobilization. Using the epoxy density of the microsphere surface as an activation marker, optimal processing conditions were 40% (V/V) epichlorohydrin, 0.60 g/L sodium borohydrite, and 1.20 mol/L sodium hydroxide. Microsphere structural characterization showed that the iron oxide magnetic particles were successfully wrapped in chitosan and the surfaces of activated microspheres were surrounded by epoxy reactive groups. The diameter of iron oxide magnetic particles, the unactivated magnetic chitosan microspheres, and the activated magnetic chitosan microspheres were 2.16, 20.30, and 24.69  $\mu\text{m}$ , respectively. After activation, xanthine oxidase was immobilized on the magnetic microspheres. Using enzyme activity as an indicator, the optimal immobilization process was conducted at 30  $^\circ\text{C}$  and pH 8.0 for 1 h. The optimum temperature and pH of the enzyme were 48  $^\circ\text{C}$  and 8.5, respectively. Moreover, the enzyme possessed good thermal, pH, and operating stability.

**Key words:** magnetic chitosan microspheres; epoxy density; immobilized xanthine oxidase; enzymatic properties

磁性微球由于具有磁敏、热敏和 pH 敏感等特殊性能, 且具有较好的生物相容性、化学稳定性、生物降解性和靶向性, 从而在生物医学领域广受关注<sup>[1]</sup>。表面带有功能基团的磁性微球, 可通过共价键来结合

收稿日期: 2015-09-03

基金项目: 广东省自然科学基金杰出青年基金项目(S2013050013954); 教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-13-0213); “广东特支计划”科技青年拔尖人才项目(2014TQ01N645)

作者简介: 任娇艳(1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学、食品营养与健康

细胞、酶和抗体等生物活性物质, 同时可借助外磁场的作用方便地从反应介质中对磁性微球进行回收<sup>[2]</sup>。这些性质使磁性微球具有标记、固定、引导和磁分离的功能, 而在酶工程、细胞生物学、分离工程与分子生物学等领域有着良好的发展前景。磁性壳聚糖微球作为高分子材料与磁性材料的复合物, 一方面有着优良的超顺磁性, 使其很容易在外加磁场下实现对靶向物质的富集、分离和回收利用。另一方面, 又可通过活化修饰引入如醛基、羧基与环氧基等的功能性基团而使其具有更多的功能特性。近年来, 关于磁性壳聚

糖微球制备及其应用的研究越来越广泛,尤其是在固定化酶方面。例如研究发现利用磁性壳聚糖磁性微球,用于固定化血红素孔菌漆酶<sup>[3]</sup>、脂肪酶<sup>[4]</sup>及纤维素酶<sup>[5]</sup>,可使酶的热稳定性、pH 稳定性、操作稳定性、储存稳定性以及酶的工作效率等得到很大程度的改善。

黄嘌呤氧化酶是一种含钼和非血红素铁的黄素酶,能够氧化次黄嘌呤和黄嘌呤生成尿酸,直接调控着体内尿酸水平的高低,是体内嘌呤代谢的关键酶<sup>[6]</sup>。黄嘌呤氧化酶作为一种重要的代谢调控酶,在医学诊断及工业应用中具有远大前景,但游离酶较差的稳定性直接影响其应用。国内外关于黄嘌呤氧化酶稳定性的研究主要集中于改变溶液环境提高其稳定性<sup>[7,8]</sup>,对固定化方法的研究较少<sup>[9]</sup>。本课题选用磁性壳聚糖微球对黄嘌呤氧化酶进行固定化研究,并进一步对固定化酶的酶学性质进行了研究。本文提供的方法使黄嘌呤氧化酶的稳定性得到很大提高,有利于酶的进一步应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料

黄嘌呤氧化酶和辣根过氧化物酶,购自 sigma 公司;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  和液体石蜡,购自天津市大茂化学试剂厂;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH、冰醋酸和盐酸,购自天津市福晨化学试剂厂;油酸,购自上海展云化工有限公司;壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90.0\%$ )和三羟甲基氨基甲烷,购自上海伯奥生物科技有限公司;50%戊二醛、环氧氯丙烷、 $\text{NaBH}_4$  和硫代硫酸钠,购自天津市科密欧化学试剂有限公司;Span-80 和吐温-80,购自广东省化学试剂工程技术研究开发中心;苯酚,购自广州市金华大化学试剂有限公司;黄嘌呤、无水乙醇和 4-氨基安替比林,购自国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析级。

#### 1.1.2 仪器

漩涡混合器 XW-80A,上海精科实业有限公司; pH 计 H-3C,上海仪电科学仪器股份有限公司;水浴恒温振荡器 SHA-C,常州澳华仪器有限公司;电子分析天平 FA2104N,上海民桥精密科学仪器有限公司;电热恒温水浴锅 HH-4,常州澳华仪器有限公司;紫外可见分光光度计 UV754N,上海仪电分析仪器有限公司;傅里叶变换红外光谱仪 VERTEX 33,德国 Bruker 公司;激光散射粒度分布分析仪 LA-960S,日本 Horiba 公司;同步热分析仪 STA449 F3,德国 Netzsch 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性壳聚糖微球的制备

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性壳聚糖微球的制备参考文献<sup>[3]</sup>的方法,但稍作修改。取 0.5 mol/L 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  40 mL 和 0.5 mol/L 的  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  30 mL 于烧杯中,搅拌混匀,在氮气保护下,滴加 3 mol/L NaOH,至溶液变为黑亮色,边滴加边搅拌,30 °C 下搅拌 30 min。结束后加入 0.5 mL 油酸,80 °C 水浴振荡下熟化 30 min,超声 10 min。冷却后磁铁吸附,用无水乙醇和去离子水洗涤,干燥。

将 0.2 g 壳聚糖加入到 20 mL 3% 的醋酸溶液中,制得 10 mg/mL 的壳聚糖醋酸溶液;在溶液中加入 0.4 g 磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  微粒,超声分散 30 min;分散结束后,加入 80 mL 液体石蜡、2 mL 吐温-80、1.5 g Span-80,在 40 °C 水浴条件下搅拌 30 min;逐滴加入 2 mL 25% 戊二醛溶液,升温至 60 °C,搅拌 1 h,逐滴滴加 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 9.0 左右,70 °C 恒温振荡 1 h,超声 10 min。冷却后磁铁吸附分离,用无水乙醇和去离子水洗涤,干燥。

#### 1.2.2 磁性壳聚糖微球的活化<sup>[10]</sup>

称取适量微球于离心管内,加入一定浓度的 NaOH 溶液 2.0 mL,一定体积分数的环氧氯丙烷溶液 2.0 mL,搅拌混匀,加入一定量的  $\text{NaBH}_4$ ,于 40 °C 恒温水浴振荡反应 4 h。以环氧基密度为活化指标,研究环氧氯丙烷体积分数、 $\text{NaBH}_4$  浓度以及 NaOH 浓度对活化工艺的影响。活化结束后,用无水乙醇不断洗涤微球。量取 3 mL 清洗液加 1~2 滴酚酞,振荡不变红则无羟基,再滴加 1.3 M 硫代硫酸钠 3 mL,振荡不变红则无环氧基。洗涤完全后,采用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{SO}_3$  滴定法<sup>[11]</sup>测定微球的环氧基密度。

环氧基密度计算公式为:

$$S = \frac{cV}{m}$$

式中: S 为环氧基密度, mmol/g; V 为消耗标准盐酸体积, L; c 为标准盐酸浓度, mmol/L; m 为活化的磁性壳聚糖微球的质量, g。

#### 1.2.3 磁性壳聚糖微球的结构表征

##### 1.2.3.1 傅里叶红外光谱分析

采用傅立叶变换红外光谱仪对  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性粒子、壳聚糖和未活化的磁性壳聚糖微球和活化的磁性壳聚糖微球进行官能团结构表征。样品以 KBr 压片,扫描波数范围为 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ 。

##### 1.2.3.2 粒径分析

将干燥过的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性粒子、未活化的磁性壳聚糖微球和活化的磁性壳聚糖微球分别溶于无水乙醇

中, 超声分散 10~15 min, 用激光散射粒度分布分析仪测其粒径分布。

### 1.2.3.3 热重分析

采用热重分析仪对磁性壳聚糖微球进行热失重分析(TGA), 通过热失重曲线计算磁性复合微球中磁性纳米粒子的含量, 实验全过程采用高纯氮气氛围, 升温范围为 25~600 °C, 升温速率为 10 °C/min。

### 1.2.4 磁性壳聚糖微球固定化黄嘌呤氧化酶的制备

采用周敬豪<sup>[10]</sup>的方法固定化黄嘌呤氧化酶, 并稍作修改。称取一定量的磁性壳聚糖微球于离心管中, 加入一定量的黄嘌呤氧化酶酶液, 3 mL Tris-HCl 缓冲液, 在一定温度下水浴震荡一定时间, 以固定化黄嘌呤氧化酶的酶活为考查指标, 研究固定化温度、pH 及时间对固定化工艺的影响。

### 1.2.5 固定化黄嘌呤氧化酶酶活的测定

酶活测定参照文献<sup>[12]</sup>的方法并有所改进。称取一定量的磁性微球固定化酶于离心管中, 加入 400 μL 一定浓度的黄嘌呤标准液, 3 mL 显色液, 水浴保温 20 min 后磁铁分离, 取清液在 508 nm 下测定吸光值。以显色液作为参比溶液。

固定化黄嘌呤氧化酶活力单位 (U/g) 定义: 在 30 °C 下每克固定化酶微球每分钟催化 1 μmol 黄嘌呤, H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub> 生成 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和尿酸为 1 个活力单位。

$$\text{样品中酶活力 (U/g)} = \frac{cV}{mt}$$

式中: c 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度, mmol/L; V 为溶液总体积, L; t 为反应时间, min; m 为微球质量, g。

### 1.2.6 固定化黄嘌呤氧化酶的酶学性质研究

#### 1.2.6.1 固定化酶的最适反应温度

取一定量 1.2.4 制备的固定化酶至离心管中, 加入 3 mL 显色液, 400 μL 一定浓度的黄嘌呤标准液于 25~60 °C 水浴条件下进行酶活力测定, 以活力最高者为 100%, 计算不同温度下的相对酶活力。

#### 1.2.6.2 固定化酶的最适反应 pH

取一定量 1.2.4 制备的固定化酶至离心管中, 加入 3 mL 不同 pH 的显色液, 400 μL 一定浓度的黄嘌呤标准液于 48 °C 水浴条件下进行酶活力测定, 以活力最高者为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活力。

#### 1.2.6.3 固定化酶的热稳定性

取一定量 1.2.4 制备的固定化酶至离心管中, 加入 3 mL pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 48 °C 水浴保温 10、30、50、70、120 和 240 min, 倾去上清液, 加入 3 mL 显色液, 400 μL 一定浓度的黄嘌呤标准液于 48 °C 水浴条件下进行酶活力测定, 以活力最高者为 100%,

计算不同保温时间下的相对酶活力。

#### 1.2.6.4 固定化酶的 pH 稳定性

取一定量 1.2.4 制备的固定化酶至离心管中, 分别加入 3 mL pH 6.0~10.0 的缓冲液, 4 °C 冰箱储存 24 h, 倾去上清液, 加入 3 mL 显色液, 400 μL 一定浓度的黄嘌呤标准液于 48 °C 水浴条件下进行酶活力测定, 以活力最高者为 100%, 计算不同保温时间下的相对酶活力。

#### 1.2.6.5 固定化酶的操作稳定性

取一定量 1.2.4 制备的固定化酶至离心管中, 加入 3 mL 显色液, 400 μL 一定浓度的黄嘌呤标准液于 48 °C 水浴条件下进行酶活力测定, 重复测定 8 次, 以活力最高者为 100%, 计算不同操作次数下的相对酶活力。

## 1.3 数据分析

每组实验重复测定 3 次, 结果表示为平均值±标准偏差 SD。采用 SPSS 19.0 及 Origin 8.5 软件对实验数据进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磁性壳聚糖微球的活化

#### 2.1.1 环氧氯丙烷体积分数对磁性壳聚糖微球表面环氧基密度的影响

由图 1A 可知, 在环氧氯丙烷体积分数达到 40% 之前, 微球表面的环氧基密度随环氧氯丙烷体积分数增大呈显著增大的趋势 ( $p < 0.05$ ), 在体积分数为 40% 处达到最大值。这可能是在 40% 之前, 微球表面可以不断地接环氧基, 而在 40% 之后, 环氧基密度达到饱和, 而环氧氯丙烷的溶解度有限, 体积分数过高时其强疏水性不利于 NaOH 扩散, 故在 50% 处环氧基密度反而有所下降。因此选择环氧氯丙烷体积分数为 40% 作为活化磁性壳聚糖微球的最优条件。

#### 2.1.2 NaBH<sub>4</sub> 浓度对磁性壳聚糖微球表面环氧基密度的影响

由图 1B 可知, 随着 NaBH<sub>4</sub> 浓度的不断增大, 微球表面的环氧基密度首先有一个小幅上升, 之后呈现明显的下降趋势 ( $p < 0.05$ )。NaBH<sub>4</sub> 作为一种封闭剂, 可以在活化过程后掩蔽磁性壳聚糖微球表面剩余的活性基团, 这样可以防止微球接连上环氧基后, 剩余的活性基团通过基团的共价结合而引起不可逆的吸附。但是, 当 NaBH<sub>4</sub> 含量过大时, 可能会引起环氧基开环, 反而会导致环氧基密度的降低。因此选择 NaBH<sub>4</sub> 浓度为 0.6 g/L 作为活化磁性壳聚糖微球的最优条件。

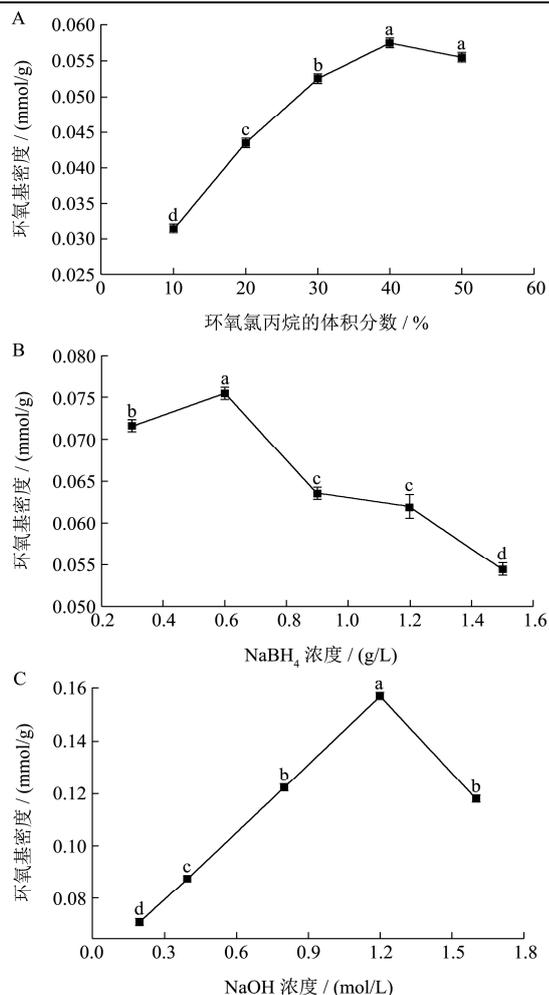


图1 环氧氯丙烷体积分数(A)、NaBH<sub>4</sub>浓度(B)和NaOH浓度(C)对磁性壳聚糖微球表面环氧基密度的影响

Fig.1 Effect of epichlorohydrin volume fraction (A) and concentration of NaBH<sub>4</sub> (B) and NaOH (C) on epoxy surface density of magnetic chitosan microspheres

注: a~d 图中小写字母不同表示不同活化因素间的显著差异( $p < 0.05$ )。

### 2.1.3 NaOH 浓度对磁性壳聚糖微球表面环氧基密度的影响

由图 1C 可知,在 NaOH 浓度达到 1.2 mol/L 之前,微球表面的环氧基密度是随 NaOH 浓度增大而增加,在 1.2 mol/L 处达到最大值,之后反而下降( $p < 0.05$ )。这是由于包被着微球的壳聚糖含有大量羟基,加入 NaOH 后羟基会被激活,为环氧氯丙烷亲核取代提供游离负离子,同时碱液在适当浓度下可以使碳负离子在反应体系中保持稳定,有利于活化反应的顺利进行。但是环氧基易水解,氢氧根又会催化环氧基开环水解,当 NaOH 浓度过大时,会增大环氧基开环水解速率,反而使环氧基密度降低。因此选择 NaOH 浓度为 1.2 mol/L 作为活化磁性壳聚糖微球的最优条件。综上,确定最优活化条件为:环氧氯丙烷体积分数为 40%,

NaBH<sub>4</sub> 浓度为 0.60 g/L, NaOH 浓度为 1.20 mol/L, 此时制备的磁性壳聚糖微球表面的环氧基密度可达到 0.17 mmol/g。

## 2.2 磁性壳聚糖微球的结构表征

### 2.2.1 傅里叶红外光谱分析

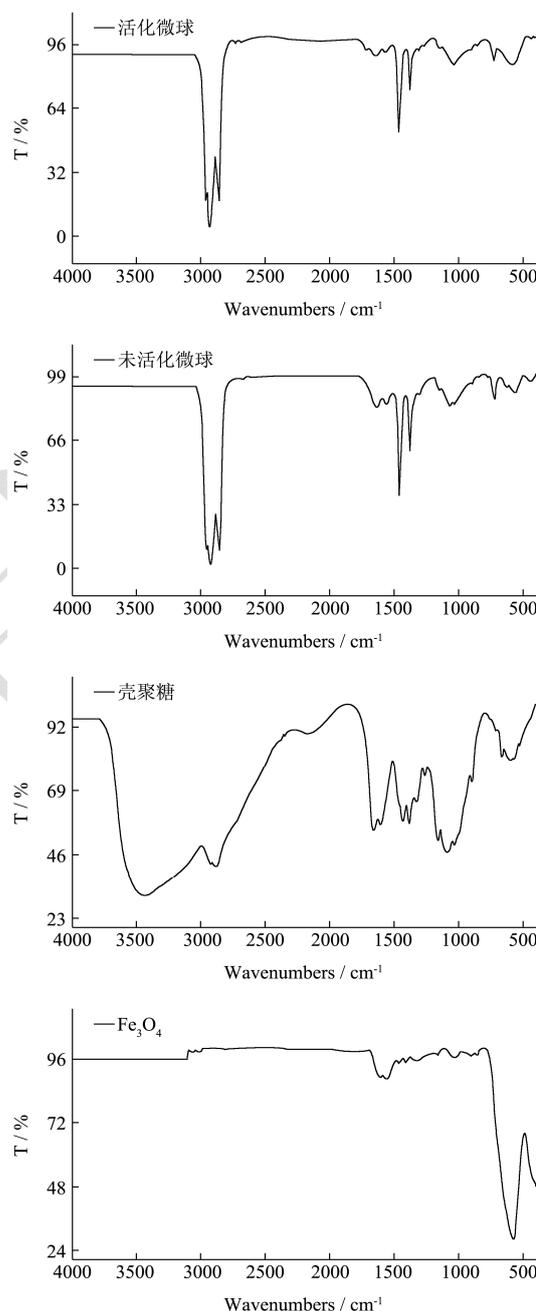


图2 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、壳聚糖、未活化磁性壳聚糖微球和已活化磁性微球的红外光谱

Fig.2 FT-IR spectra of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, chitosan, unactivated magnetic microspheres, and activated microspheres

图 2 为 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、壳聚糖、未活化磁性壳聚糖微球和已活化磁性微球的红外光谱图。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的特征峰为 571.88 cm<sup>-1</sup>。壳聚糖的红外光谱图中, 3438.97 cm<sup>-1</sup> 左

右是形成氢键缔合的-OH 伸缩振动吸收峰和-NH<sub>2</sub> 的伸缩振动吸收峰重叠而增宽的多重吸收峰, 2922.06 cm<sup>-1</sup> 和 2877.70 cm<sup>-1</sup> 处是 C-H 的两个伸缩振动峰, 1657.76 cm<sup>-1</sup> 和 1603.77 cm<sup>-1</sup> 处是酰胺的面内弯曲振动吸收峰, 1425.35 cm<sup>-1</sup> 处是-CH<sub>2</sub> 弯曲和-CH<sub>3</sub> 变形吸收峰, 1380.99 cm<sup>-1</sup> 处是 C-H 弯曲和-CH<sub>3</sub> 对称变形吸收峰, 1091.67 cm<sup>-1</sup> 处是 C-O 的伸缩振动吸收峰。未活化磁性壳聚糖微球红外光谱图中, 同时呈现了 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和壳聚糖的特征振动吸收峰, 说明制备的壳聚糖微球成功包裹了 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性粒子。其中, 571.88 cm<sup>-1</sup> 处是 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的特征峰; 3438.97 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰强度明显降低, 这主要是由于壳聚糖上-NH<sub>2</sub> 与戊二醛上的醛基反

应, 使得缔合的峰强度降低, 而 2925~2850 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰强度显著增大, 归因于戊二醛交联到壳聚糖上, 增加了甲基与亚甲基的含量, 使得强度增加; 1634.62 cm<sup>-1</sup> 处有新的吸收峰生成, 主要是戊二醛与壳聚糖上氨基反应, 生成亚胺 C=N 即希夫碱的吸收峰, 表明戊二醛与氨基发生反应; 1461.99 cm<sup>-1</sup> 和 1377.13 cm<sup>-1</sup> 是 C-H 弯曲和-CH<sub>3</sub> 对称变形吸收峰, 峰强度变大与甲基和亚甲基的含量增多相关; 1066.60 cm<sup>-1</sup> 是 C-O 的伸缩振动峰。与未活化磁性微球相比, 活化后的磁性微球在 900.73 cm<sup>-1</sup> 处有一个新的小峰, 是环氧基环的不对称伸缩振动峰, 表明微球表面结合了环氧基基团。

### 2.2.2 粒径分析

表 1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、未活化磁性壳聚糖微球和已活化磁性微球的粒径分布表

Table 1 Particle distribution of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic particles, unactivated magnetic chitosan microspheres, and activated microspheres

样品	D10/μm	D50/μm	D90/μm	平均粒径/μm
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0.90	2.16	6.20	2.97
未活化磁性壳聚糖微球	4.45	20.30	59.91	27.65
活化磁性壳聚糖微球	5.01	24.69	107.75	44.53

表 1 为 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、未活化磁性壳聚糖微球和已活化磁性微球的粒径分布表, 图 3 为其粒径分布曲线。由图 3 和表 1 可知, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、未活化磁性壳聚糖微球和已活化磁性微球的 D50 分别为 2.15、20.30 和 24.69 μm, 说明壳聚糖包埋了 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, 且活化的微球表面结合有活性基团环氧基, 使其中径大于未活化微球的中径。图 3 中, 活化和未活化的磁性壳聚糖微球有 2 个峰, 可能是聚合体未完全分散。

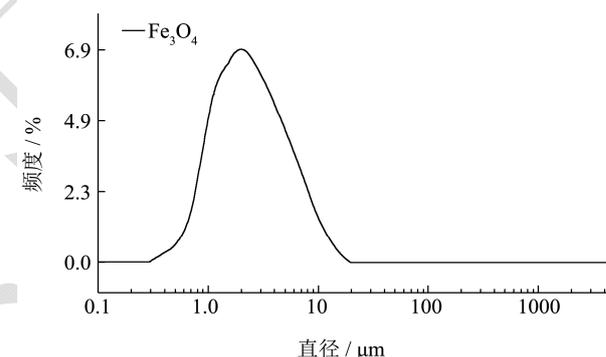
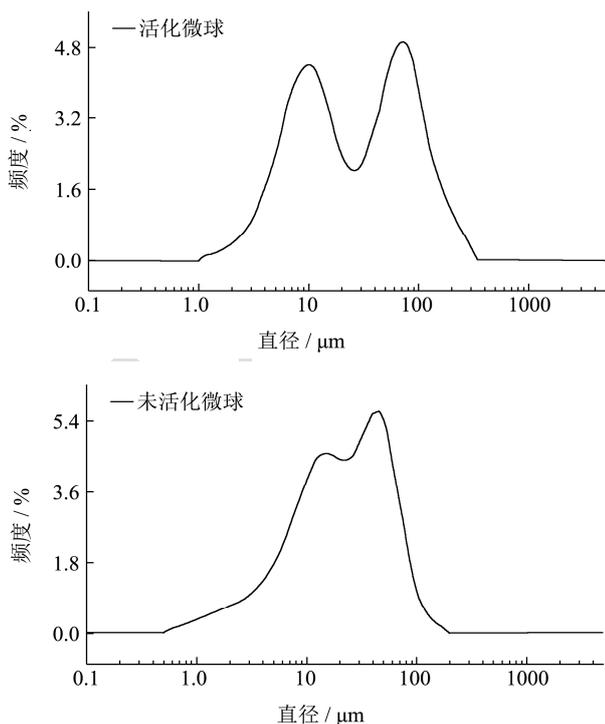


图 3 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、未活化磁性壳聚糖微球和已活化磁性微球的粒径分布

Fig.3 Particle distribution of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic particles, unactivated magnetic chitosan microspheres, and activated microspheres



### 2.2.3 热重分析

表 2 为磁性壳聚糖微球的热重参数分析表, 图 4 为其热重分析及差示扫描量热分析曲线。在曲线中, 第一段失重出现在 160 °C 之前, 失重比例约为 16.31%, 失重成分为样品中吸附的水分和空间水。160~390 °C 处出现第二阶段失重, 范围较大, 失重比例约为 23.16%, 对应的过程是交联后的磁性壳聚糖微球脱掉乙酰基和失去交联剂。第三阶段失重出现在 390~520 °C, 失重比例约为 25.42%, 这一阶段的失重速率最快, 原因是壳聚糖在脱掉乙酰基之后热分解。由于 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 高温稳定不会分解, 因此 520 °C 之后不变的成分含量即为 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁核占磁性壳聚糖微球的比

例, 约为 35.12%, 而壳聚糖的含量为 48.58%。丁明<sup>[13]</sup>等发现 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 与壳聚糖的质量比 9.05% 时, 微球已适用于磁性分离, 谢晓灵<sup>[5]</sup>制备的磁性微球 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 与壳聚糖的质量比为 29.2%, 具有良好的磁分离效果, 而本实验中 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 与壳聚糖的质量比为 72.3%, 远大于上述实验要求, 故具有优良的磁响应性。

表 2 磁性壳聚糖微球的热重参数分析表

Table 2 Thermogravimetric parameters of magnetic chitosan microspheres

磁性壳聚糖微球	
热重参数	磁性壳聚糖微球
第一阶段, 温度区间/℃	(25.98~160.98)
失重/%	16.31
第二阶段, 温度区间/℃	(160.98~390.98)
失重/%	23.16
第三阶段, 温度区间/℃	(390.98~598.48)
失重/%	25.42
残余 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , 598.48 °C/%	35.12

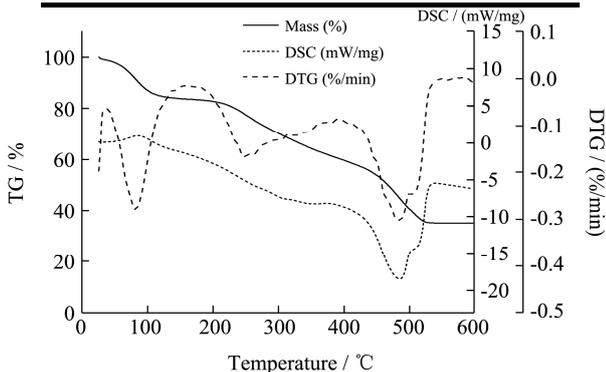


图 4 磁性壳聚糖微球热重分析和差示扫描热分析图

Fig.4 Thermogravimetric analysis (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) analysis of magnetic chitosan microspheres

### 2.3 固定化黄嘌呤氧化酶的制备

#### 2.3.1 最适固定化反应时间

由图 5A 可知, 固定化时间对固定化黄嘌呤氧化酶活性影响较大。随着反应时间的延长, 固定化酶的酶活呈现先增大后减小的趋势( $p < 0.05$ )。反应 60 min 后, 其酶活力达到最大值。可能是经过 60 min 吸附, 磁性微球表面的环氧基对酶分子的吸附接近饱和, 在表面形成黄嘌呤氧化酶单分子层, 有利于酶与底物的作用, 相对酶活力最高达 100%。当反应超过 60 min 后, 固定化酶活性开始下降, 可能是此时微球负载酶量已达到饱和, 延长反应时间只会增大酶空间位阻而致使酶活性变小, 因此选取磁性壳聚糖微球固定化黄嘌呤氧化酶最佳反应时间为 1 h 进行下一步实验。

#### 2.3.2 最适固定化反应温度

由图 5B 可知, 反应温度对固定化酶活性的影响比较明显。固定化酶活性随着温度的升高而先增大后减小( $p < 0.05$ ), 在温度为 30 °C 时有最高酶活性, 30~48 °C 时, 酶活性下降不明显。当温度到 60 °C 时, 酶活性显著下降( $p < 0.05$ ), 可能是因为酶活性位点遭到破坏。因此选取磁性壳聚糖微球固定化黄嘌呤氧化酶最佳温度为 30 °C 进行下一步实验。

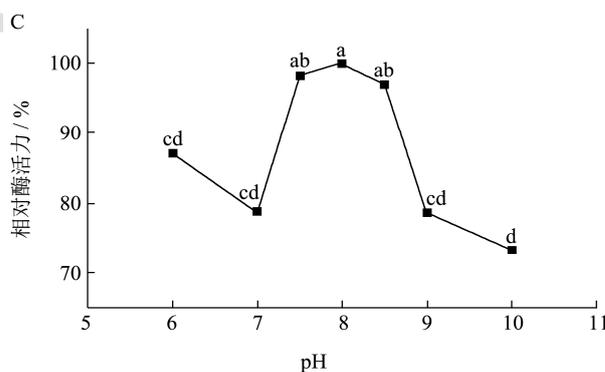
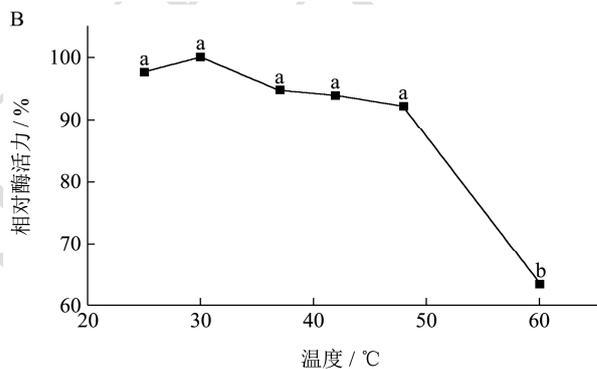
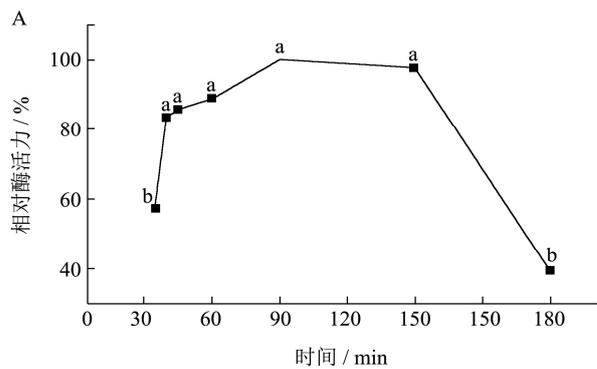


图 5 反应时间(A)、反应温度(B)和反应 pH(C)对固定化黄嘌呤氧化酶酶活的影响

Fig.5 Effects of reaction time (A), temperature (B) and pH (C) on immobilized xanthine oxidase enzyme activity

注: a~d 图中小写字母不同表示不同活化因素间的显著差异( $p < 0.05$ )。

#### 2.3.3 最适固定化反应 pH

由图 5C 可知, 固定化酶活性随 pH 升高先下降后上升而后下降( $p < 0.05$ )。当 pH 为 8.0 时, 固定化酶有最高酶活性。这是因为磁性微球表面的环氧基在酸性条件下开环, 与酶结合; 中性条件下环氧基不易发生

亲核取代, 与酶结合速率慢, 酶活下降; 在偏碱性条件酶活力会逐渐增加, 因此随着 pH 的升高, 固定到微球表面的黄嘌呤氧化酶酶活也会逐渐升高, 另外缓冲液为弱碱性时更利于微球表面环氧基的开环反应, 利于酶的固定化, 从而提高固定化酶活性。因此, 选取磁性壳聚糖微球固定化黄嘌呤氧化酶最佳 pH 为 8.0。综上, 确定固定化酶的最适条件为: 时间 1 h, 温度 30 °C, pH 8.0。

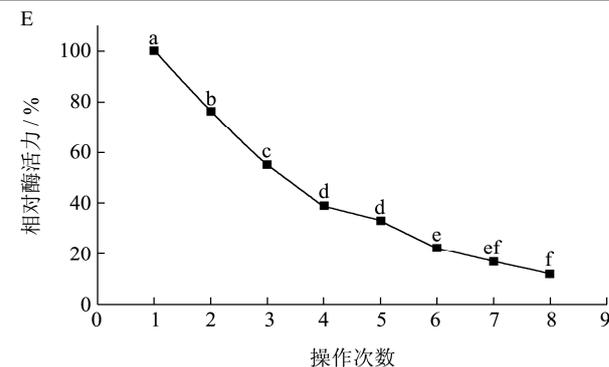
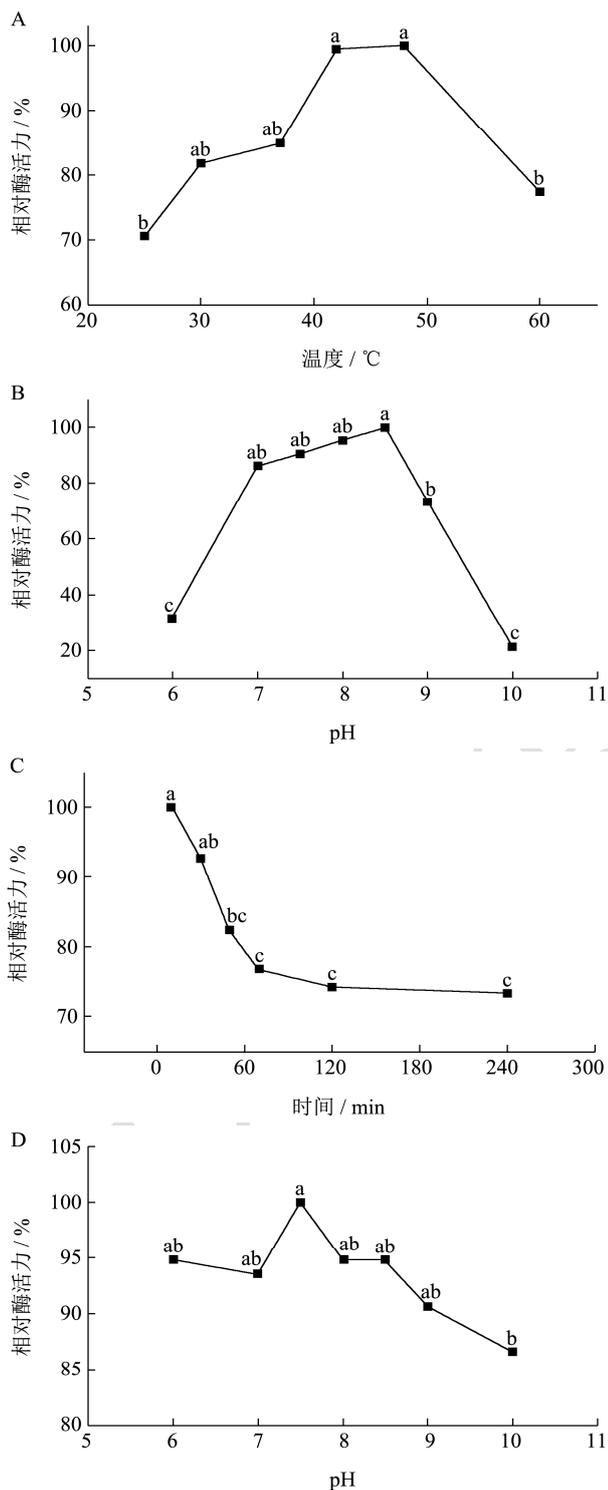


图6 反应温度(A)和pH(B)对固定化黄嘌呤氧化酶酶活的影响及固定化酶的热稳定性(C)、pH稳定性(D)和操作稳定性(E)  
Fig.6 Effects of reaction temperature (A) and pH (B) on immobilized xanthine oxidase enzyme activity and thermal stability (C), pH stability (D), and operational stability (E)

注: a~f 图中小写字母不同表示不同活化因素间的显著差异( $p < 0.05$ )。

## 2.4 固定化黄嘌呤氧化酶的酶学性质

### 2.4.1 固定化酶的最适反应温度

由图 6A 可知, 温度对固定化酶的酶活影响比较显著( $p < 0.05$ )。固定化酶的酶活力随温度的升高先上升后下降, 在 48 °C 时具有最大酶活力, 即酶作用的最适温度是 48 °C。

### 2.4.2 固定化酶的最适反应 pH

由图 6B 可知, 固定化酶的酶活力随 pH 的增大呈现先上升后下降的显著趋势( $p < 0.05$ )。在 pH 7.0~8.5 间, 固定化酶的相对酶活力保持在 80% 以上, pH 8.5 的环境下, 有最大相对酶活力, 即固定化酶的最适用 pH 为 8.5。

### 2.4.3 固定化酶的热稳定性

图 6C 是在 48 °C 下保温不同时间测定的固定化酶相对酶活力的变化曲线。结果显示, 固定化酶的相对酶活随着保温时间延长而显著降低( $p < 0.05$ )。保温 70~240 min, 固定化酶活性较稳定, 相对酶活力在 73% 以上, 表明该固定化黄嘌呤氧化酶具有良好的热稳定性。

### 2.4.4 固定化酶的 pH 稳定性

图 6D 是在不同 pH 缓冲液中静置 24 h 测定的固定化酶相对酶活力的变化曲线。结果显示, 固定化酶的相对酶活随 pH 的增大呈现先上升后下降的趋势( $p < 0.05$ ), 在 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中具有最大相对酶活力。在不同 pH 的缓冲液中储存, 其相对酶活力在 86% 以上, 表明该固定化黄嘌呤氧化酶具有良好的 pH 稳定性。

### 2.4.5 固定化酶的操作稳定性

图 6E 是固定化酶重复使用 8 次测定的相对酶活力的变化曲线。结果显示, 该固定化酶的相对酶活力随操作次数的增加而减小( $p < 0.05$ ), 可能是在反复洗涤及反应过程中, 酶被洗脱下来, 重复使用 6 次后还具有 22% 的相对酶活力, 之后趋于平缓, 表明该固定化酶具有良好的操作稳定性。

## 3 结论

本实验通过化学共沉淀法和乳化交联法制备得到了一批磁响应性优良的磁性壳聚糖微球。以环氧氯丙烷对微球表面进行活化, 考察了 NaOH 浓度、NaBH<sub>4</sub> 浓度和环氧氯丙烷体积分数对活化过程的影响, 以环氧基密度为指标, 确定了最优活化条件: 环氧氯丙烷体积分数为 40%, NaBH<sub>4</sub> 浓度为 0.60 g/L, NaOH 浓度为 1.20 mol/L。磁性壳聚糖微球的结构表征结果表明, 壳聚糖成功包裹了 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性粒子, 且已活化微球表面具有环氧基活性基团; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性粒子、未活化和已活化磁性壳聚糖微球中径分别为 2.16、20.30 和 24.69 μm。将活化后的磁性壳聚糖微球用于黄嘌呤氧化酶的固定化, 以固定化酶的酶活为指标, 确定最适固定化工艺为: 时间 1 h, 温度 30 °C, pH 8.0。对固定化酶的酶学性质研究表明该固定化黄嘌呤氧化酶具有良好的热稳定性、pH 稳定性和操作稳定性。

## 参考文献

- [1] Gui R, Wang Y, Sun J. Encapsulating magnetic and fluorescent mesoporous silica into thermosensitive chitosan microspheres for cell imaging and controlled drug release *in vitro* [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 113: 1-9
- [2] Guo J, Yang W, Wang C, et al. Poly (N-isopropylacrylamide)-coated luminescent/magnetic silica microspheres: preparation, characterization, and biomedical applications [J]. Chemistry of Materials, 2006, 18(23): 5554-62
- [3] Jiang D S, Long S Y, Huang J, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 25(1): 15-23
- [4] Xie W, Wang J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil [J]. Biomass and Bioenergy, 2012, 36: 373-80
- [5] 谢晓灵. 磁性固定化纤维素酶的制备及其性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012  
XIE Xiao-ling. Preparation and properties of magnetic immobilized cellulase [D]. Guangzhou: South China university of Technology, 2012
- [6] So A, Thorens B. Uric acid transport and disease [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(6): 1791
- [7] Amini K, Sorouraddin M H, Rashidi M R. Activity and stability of rat liver xanthine oxidase in the presence of pyridine [J]. Canadian Journal of Chemistry, 2011, 89(1): 1-7
- [8] 李忠琴, 许小平, 王武. 奶油黄嘌呤氧化酶的酶学性质研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(9): 420-422  
LI Zhong-qin, XU Xiao-ping, WANG Wu. Study on characteristics of xanthine oxidase from milk cream [J]. Food Science, 2008, 29(9): 420-422
- [9] 张玉然, 辛瑜, 王武, 等. 黄嘌呤氧化酶酶学性质及共价交联固定化 [J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(1): 16-21  
ZHANG Yu-ran, XIN Yu, WANG Wu, et al. Enzymatic properties of xanthine oxidase and its covalent immobilization on different supports [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(1): 16-21
- [10] 周敬豪. 磁性壳聚糖微球的制备及其分离降血压肽的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2013  
ZHOU Jing-hao. Research on preparation of magnetic chitosan microspheres and isolation of antihypertensive peptides [D]. Nanning: Guangxi University, 2013
- [11] Scoble J A, Scopes R K. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions [J]. Journal of Chromatography A. 1996, 752(1): 67-76
- [12] Li Z Q, Wang W. Spectrophotometric assay of xanthine oxidase activity in cell extracts applying horseradish peroxidase [J]. Chemistry and Bioengineering, 2008, 25(11): 75-8
- [13] 丁明, 孙虹. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/壳聚糖核壳磁性微球的制备及特性 [J]. 磁性材料及器件, 2001, 32: 1-3  
DING Ming, SUN Hong. Preparation and properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and chitosan core-shell magnetic microspheres [J]. Magnetic Materials and Devices, 2001, 32: 1-3