

嘉南藥理學院專題研究計畫成果報告

計畫名稱：應用殼糖胺多點式結合進行酪胺酸酶之固定化

計畫編號：CNFH-88-11

執行期間：87年9月1日至88年6月30日

計畫類別：個別型

主持人：朱惠鈴

協同研究：吳鴻程

摘要

洋菇之酪胺酸酶以多點式之共價鍵結於臺灣盛產之不溶性擔體,即幾丁質之衍生物殼糖胺 Chitosan-carbodiimide-glutaraldehyde(CN-DEC-GA)系統,每克擔體結合相當 78.8mg 之可溶性酪胺酸酶活性。固定化酪胺酸酶對可溶性酵素之相對比活性,以 L-酪氨酸為基質時為 57%,以 L-DOPA 為基質時為 67%。固定化酪胺酸酶之最適 pH 值為 7.5,比可溶性之酪胺酸酶高出一個 pH 單位,且其活性對 pH 變化較不敏感,固定化酪胺酸酶之 pH 穩定性亦較可溶性酵素為高,固定化之酪胺酸酶其最適之反應溫度為 70°C,比可溶性酵素高出 20°C,經過固定化之酪胺酸酶其熱穩定性大為提高,在 80°C 時其半衰期為 1 小時,而可溶性之酪胺酸酶其於 65°C 時其半衰期為 8 分鐘。可溶性酵素及固定化酵素於 60°C 時其熱變性速率常數 k, 由圖中之數據得之分別為 0.01729 及 0.0053 h⁻¹,可知固定化酵素於 60°C 其熱穩定性為可溶性酵素 3.26 倍,可知多點式共價鍵結法提供高溫時酵素穩定性。

關鍵字：洋菇酪胺酸酶,殼糖胺,多點式結合,固定化。

前言

酪胺酸酶(tyrosinase,E.C.1.14.18.1.)廣布於植物界,於植物中具重要生理功能如傷口癒合,防禦及老化作用。酪胺酸酶於酵素工技頗富潛力,如可應用於處理工業廢水中酚類,環類胺;合成 L-DOPA 治療 Parkinson's disease;並可合成聚合物而應用於醫療,照片顯影劑,化粧品,防晒油及太陽眼鏡製造;亦可合成 phenolic resin 可製造合板,黏著劑,防火劑.等用途。

酵素固定化在工業上進行生物轉換,醫業上進行酵素治療(enzyme therapy)或分析上均比溶性酵素優越,具有許多優點。而選擇具經濟性及可利用性之擔體是非常重要的。臺灣蟹肉加工每年產出大量蟹殼廢棄物,可製成足量之幾丁質。將幾丁質去乙醯基即得殼糖胺(chitosan)。

本研究以一種多點結合法將酪胺酸酶共價結合於殼糖胺(chitosan)後可大大提高酵素之穩定性,而可把固定化之酪胺酸酶應用在去除廢水中酚類,合成 L-DOPA 之應用上,可進一步提高酪胺酸酶在醫療,工業及食品上之應用。

本文

一、材料與方法

洋菇購自於傳統市場,運至實驗室立即製成丙酮粉,取丙酮粉溶於 3 倍體積 50mM pH7.0 之磷酸緩衝溶液以 10000x g 離心 30 分鐘,取上層液,再以真空凍結乾燥機乾燥,即得到"酪胺酸酶之粉末"。

戊二醛,磷酸二氫鈉,磷酸氫二鈉,L-DOPA,L-酪胺酸購自於德國 Merck 公司,殼糖胺(30~100mesh),碳二醯胺購自美國 Sigma 公司,殼糖胺使用前再自行研磨到可通過 30mesh 之篩子,其他試藥皆為試藥級。

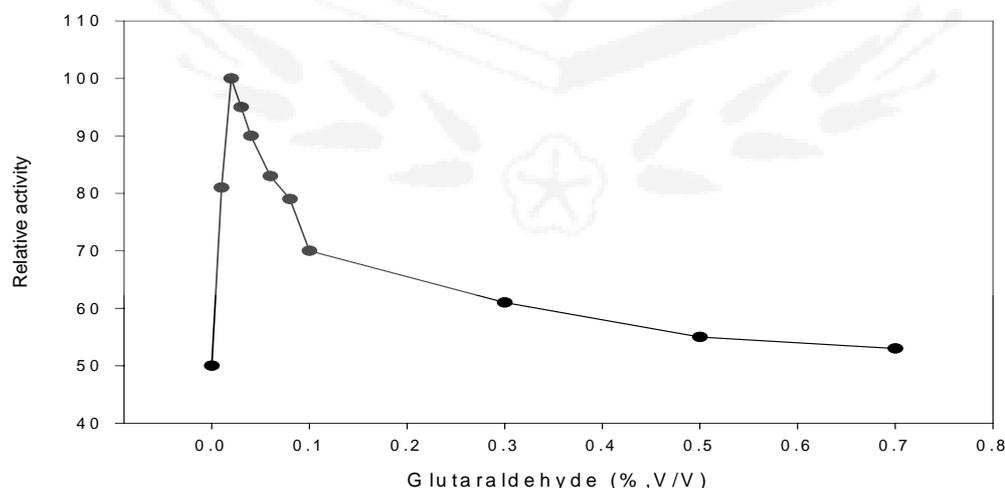
溶性酵素活性測定[9]:取 0.079 克 L-DOPA 溶於 100 毫升 25mM pH6.8 磷酸緩衝液為基質,於每次實驗前製備新鮮溶液,取 0.9 毫升基質加入 0.1 毫升酵素液,混合均勻於 475nm 測吸光值,酵素活性以 A475nm/min 表示之。

固定化酵素活性測定:以 L-酪胺酸、L-DOPA 為基質,於每次實驗前製備新鮮溶液,取定量固定化酵素置於體積 10 毫升之玻璃容器中,取 3 毫升經充氧達飽和之基質加入,置於恆溫振盪培養箱作用,反應初測 OD280、OD475 吸光值,至作用時間到達後,經真空過濾取濾液測吸光值,扣除反應初之吸光值,即為固定化酵素活性。

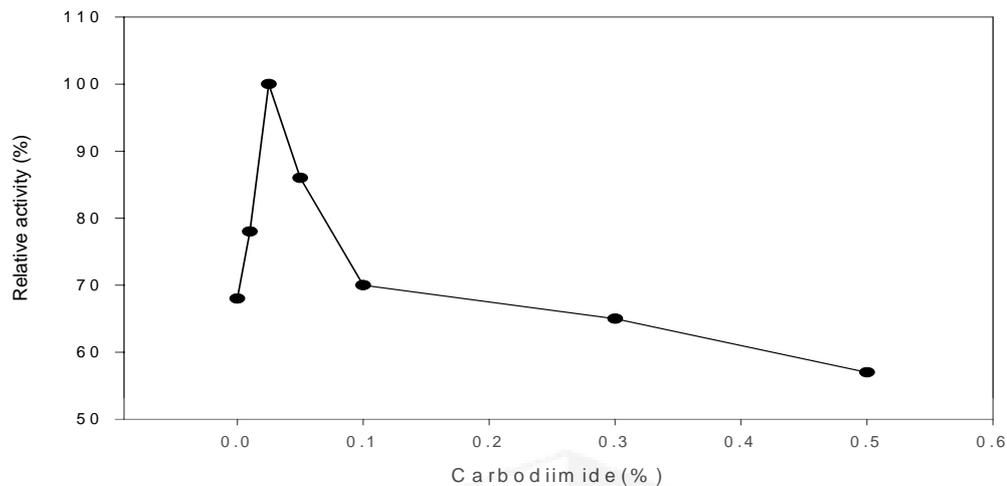
酪胺酸酶之固定化:將殼糖胺溶於 0.1N 鹽酸溶液,將溶液之 pH 值調至 6.0,以 6000 g 離心 10 分鐘後,取上層液,稱為 "A 液"。取 0.6g 之酪胺酸酶粉末溶於 25 毫升 10mM 硫酸銅溶液中,加入 "A 液"於 4 °C 中攪拌 2 小時後加入 0.08g 碳二醯胺(carbodiimide)於 4 °C 中攪拌 2 小時後,緩緩加入 0.2 毫升 25%之戊二醛於 4 °C 攪拌 0.5 小時,加入 25 毫升 1M pH8.0 之磷酸緩衝液,經過濾後收集沉澱物,乾燥即得固定化之酪胺酸酶酵素。

二、結果與討論

以殼糖胺多點式共價鍵結系統 CN-EDC-GA 進行酵素固定化,而固定化酵素之活性受所使用化學試劑戊二醛及碳二醯胺之濃度影響如圖(一)及圖(二)所示,戊二醛及碳二醯胺進行酪胺酸酶多點式結合固定化作用之最適濃度分別為 0.02% 及 0.025%,故下列實驗均以此二種最適濃度進行固定化,以 CN-EDC-GA 系統進行酵素固定化結果每克殼糖胺結合相當於 78.8 毫克之可溶性酪胺酸酶,而固定化酪胺酸酶對可溶性酵素之相對比活性,以 L-酪胺酸為基質時為 57%,以 L-DOPA 為基質時為 64%。



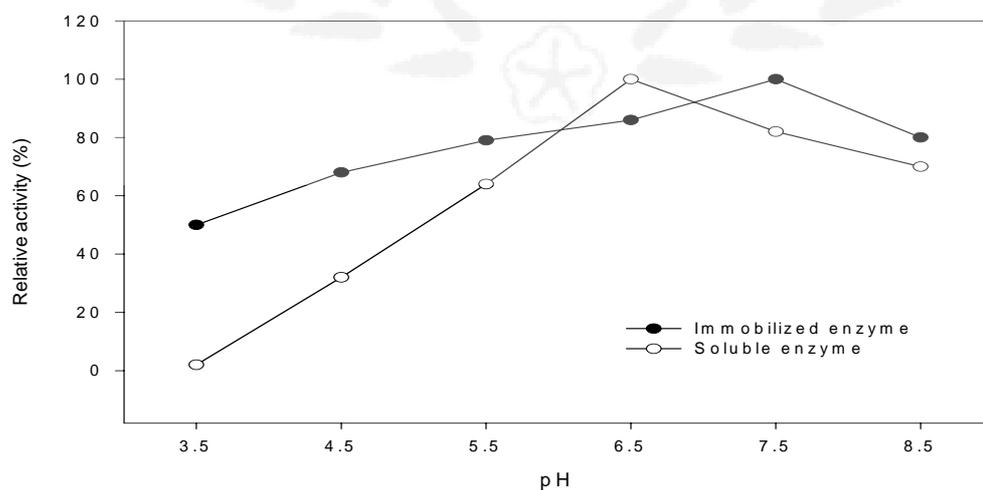
圖一、戊二醛濃度對固定化酪胺酸酶之酵素活性之影響
Fig.1 Effect of amount of glutaraldehyde added on relative loading enzyme activity on CN-EDC-GA tyrosinase



圖二、碳二醯胺的濃度對固定化酪胺酸酶活性之影響
 Fig.2 Effect of amount of carbodiimide added on relative loading enzyme activity of CN-EDC-GA tyrosinase

最適 pH

可溶性酵素及固定化酵素以 L-DOPA 為基質，於各種 pH 值下測定最適 pH 值，結果如圖(三)，因 L-DOPA 於 PH9.0 以上會自動氧化，故本實驗只能測試至 pH9.0。結果可溶性酵素最適 pH 值為 6.5，固定化酵素最適 pH 值為 7.5。固定化酵素比可溶性酵素高出 1.0 個單位 pH，這種現象於青蛙表皮抽出的酪胺酸酶，以聚丙烯醯胺及 CPE-acrylamide 為擔體離進行固定人作用，亦有最適 pH 往鹼性移動的現象，這可能是因為固定化酵素中擔體所產生立體障礙妨礙質子擴散作用所致。

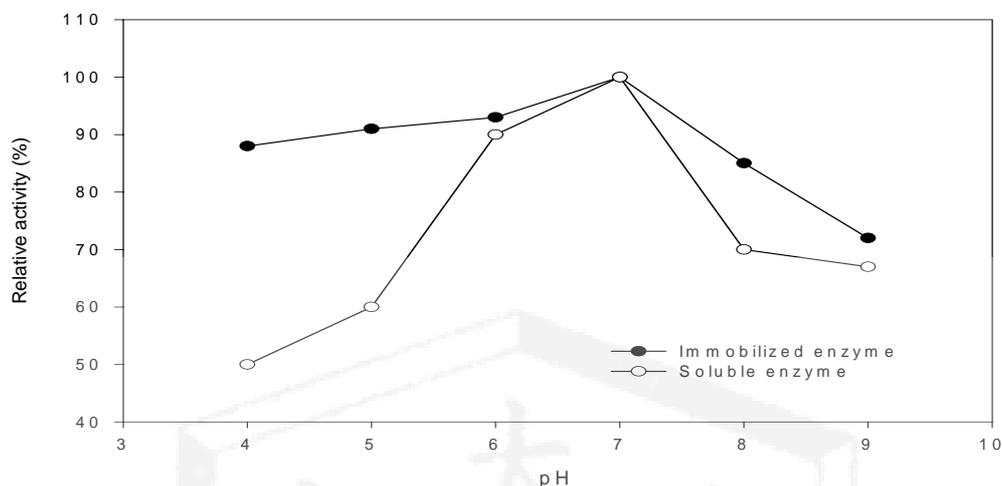


圖三、pH 值對固定化酪胺酸酶活性之影響
 Fig. 3 Effect of pH on the activity of immobilized tyrosinase

PH 值對酵素安定性之影響

將可溶性酵素及固定化酵素分別置於不同 pH 值緩衝劑(Bicin, CAPS, sodium acetate ,Bis-Tris propane),配製成 20 Mm,pH3.0~9.0 數個 pH 值緩衝液,取酵素加入該 pH 緩衝液中,混合後置於 37°C 反應 30 分鐘,可溶性酵

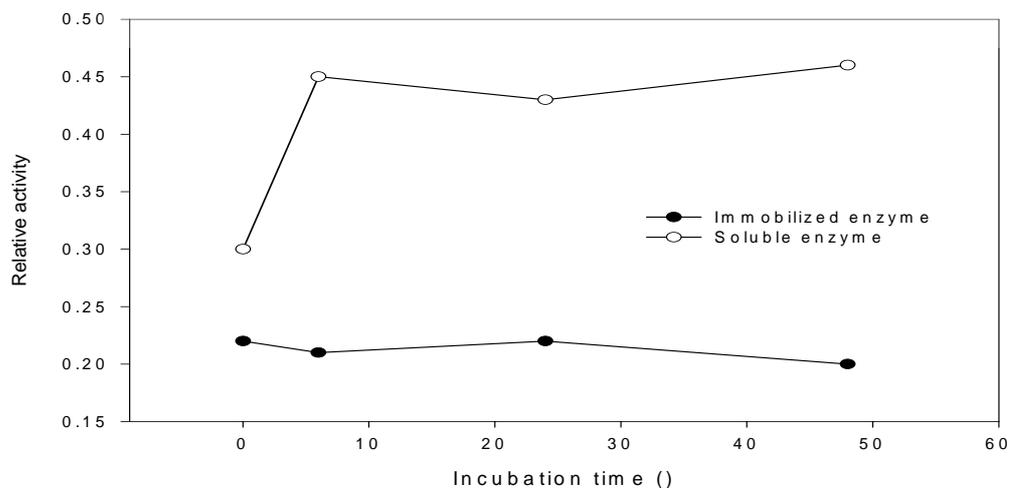
素自混合液中取出 0.1 毫升,加入 0.9 毫升 3.8mM L-DOPA(溶於 0.1M,pH7.0 磷酸緩衝液),混合均勻測活性,而固定化酵素經過濾後從不同 pH 值緩衝液中濾出,以 pH 7.0 之緩衝液沖洗再與基質 L-DOPA 作用,實驗結果如(圖四)所示,得知固定化酵素對 pH 值的安定性較可溶酵素為佳,尤其於酸性 pH 範圍下其 pH 之安定性更佳。



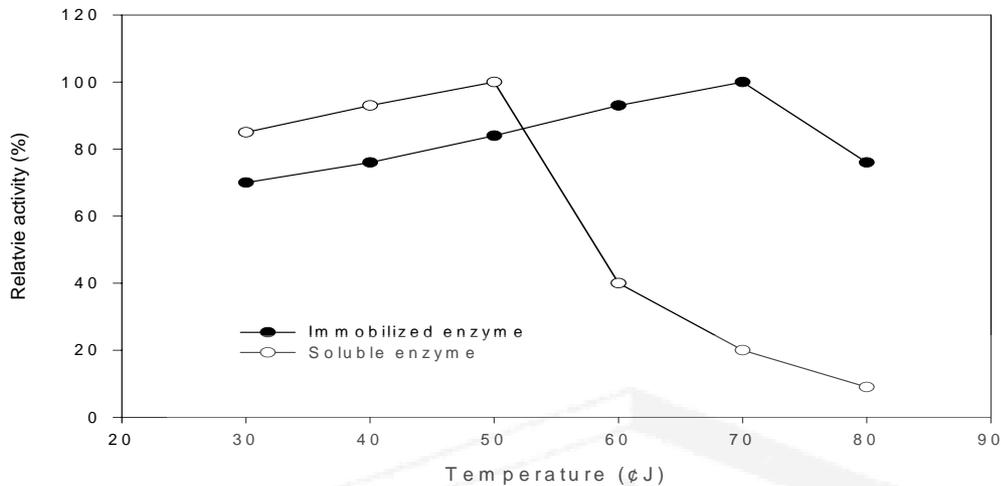
圖四、固定化酪胺酸酶之 pH 穩定性
Fig.4 PH stability of immobilized tyrosinase

尿素對酵素安定性之影響

固定化酵素與可溶性酵素分別置於 6M 尿素及 0.1M pH6.5 磷酸緩衝液經過 0, 24, 48 小時後取出酵素測其殘餘活性,結果如(圖五)。得之固定化酵素浸泡於尿素 24, 48 小時後,其活性與對照組比對,並沒有失活現象。但在可溶性酵素中卻發現浸泡於尿素 24, 48 小時後,其活性沒有損失反而還增加一倍,一般尿素為酵素變性劑,但於此實驗卻反而活化酵素推測可能是尿素改變可溶性酪胺酸酶氫鍵鍵結,使其構形更適合於結合 L-DOPA,於日後實驗中將會進一步探究其因。



圖五、尿素之濃度對固定酪胺酸酶之影響
Fig.5 Effect of urea on immobilized tyrosinase



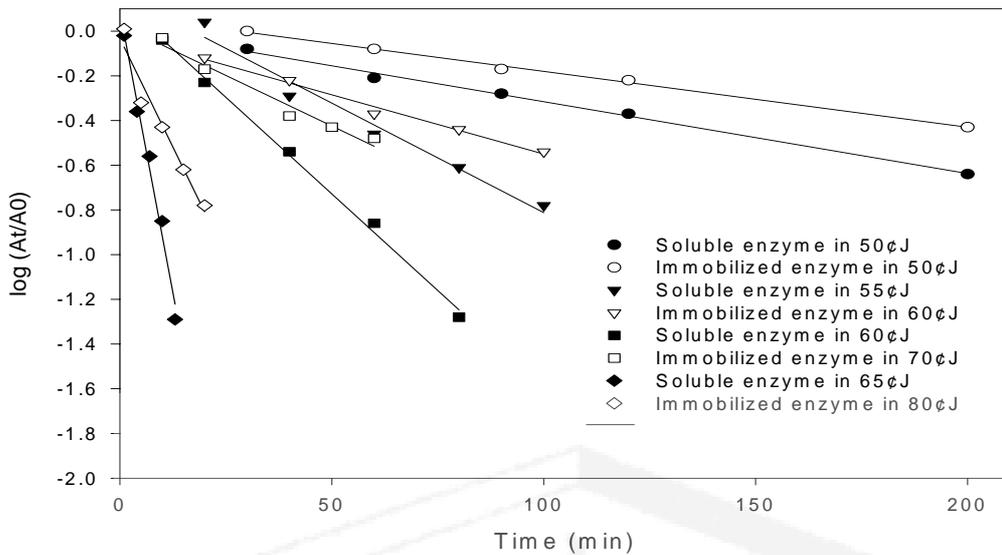
圖六、溫度與固定化酪胺酸-酵素活性之關係
Fig. 6 Effect of temperature on the activity of immobilized tyrosinase

最適反應溫度

固定化酵素與可溶性酵素於各種不同溫度下測活性，結果如圖(六)可溶性酵素最適反應溫度於 50°C，而酵素固定化之後其最適溫度提高到 70°C，而來自於青蛙表皮之固定化酪胺酸酶之最適作用溫度為 20°C [21]，有很大的差異，故以殼糖胺多點式共價結合的固定化作用適於高溫作用，而固定化酵素對溫度較不敏感即使溫度提高到 80°C，仍保有原活性之 75%，而可溶性酵素當溫度提高至 70°C 時，其活性僅剩原來的 20%。為了證明酵素經過固定化之效用，進行下列熱穩定性實驗。

熱穩定性

將固定化酵素置於 0.1M pH 7.0 之磷酸緩衝劑中，以恆溫振盪培養箱將溫度分別控制於 50, 60, 70, 及 80°C。可溶性酵素於 50, 55, 60, 65°C 中加熱，當加熱時間到達後取出酵素液立刻移至冰浴中冷卻，於 37°C 測殘餘活性，結果如(圖七)所示，經過固定化之酪胺酸酶其熱穩定性大為提高，在 80°C 時其半衰期為 1 小時，而可溶性之酪胺酸酶其於 65°C 時其半衰期為 8 分鐘。由圖可知可溶性酵素及固定化酵素之熱變性反應屬於一級反應，根據方程式 $\log A_t/A_0 = -kt$ ，於方程式中 A_0 及 A_t 分別代表最初酵素活性及酵素經 t 時間加熱後之殘餘活性，而 k 代表熱變性速率常數，經由 $\log A_t/A_0$ 對 t 作圖，圖形中直線斜率即為 k 值，由圖可知酵素經過固定化後其熱變性速率常數下降，可溶性酵素及固定化酵素於 60°C 時其熱變性速率常數 k ，由圖中之數據得之分別為 0.01729 及 0.0053 h⁻¹，可知固定化酵素於 60°C 其熱穩定性為可溶性酵素 3.26 倍，可知多點式共價鍵結法提供高溫時酵素穩定性。



圖七、固定化酪胺酸於各種不同濃度下之殘餘活性
 Fig. 7 The plot of log (residual activity, %) VS operation time of various immobilized tyrosinase at different temperature and pH 7.0 with L-DOPA as substrate

1. 酵素固定化在工業上進行生物轉換, 醫藥上進行酵素治療(enzyme therapy)或分析上均比溶性酵素優越, 具有下列優點: (1) 可重複使用 (2) 可自動化控制及連續性操作 (3) 酵素與基質及產物分離容易 (4) 酵素穩定性增加 (5) 可藉擔體與固定方法改變酵素性質, 如最適反應 pH 與特異性。由上述結果得知酵素經過固定化作用後, 酵素之最適 pH、最適溫度及熱穩定性等性質均會改變, 以殼糖胺進行多點式之共價鍵結會增加酵素之熱穩定, 而幾丁質本身不但耐高溫且具經濟價值, 可由蝦蟹加工的廢棄殼中製得。台灣蟹肉加工每年約有 500 噸蟹殼廢棄物, 可製成約 10-100 噸之幾丁質, 將幾丁質去乙酰基即得殼糖胺, 我們將酵素藉著與戊二醛鍵結, 再與殼糖胺結合, 而因為此種固定化作用屬於多點式結合, 酵素的構形已被穩定住, 雖以高溫加熱仍具耐熱性, 因其酵素構形不易改變, 亦不易形成聚合形式或解離的形式, 而可把固定化之酪胺酸酶應用於工農廢水處理以去除酚類物質, L-DOPA 的合成, 故多點共價鍵結之酵素固定法於食品醫療及工業上的應用頗見潛力。