

固相酶制备与应用的一些研究

上海生物化学所固相酶组

在天然情况下,有的酶分泌在细胞外;有的则存在于细胞内。细胞内的酶,有的以溶于水的形式存在于细胞浆内;也有一些酶存在于细胞的细微结构上,在正常情况下不溶于水。不溶于水的酶经过一定处理,也能成为水可溶的酶;水可溶酶经过处理也可变为水不可溶的酶。经过这种处理的酶称为固相酶。

近年来,固相酶的研究有了迅速的发展。固相酶的研究除对酶的基本理论研究(如模拟天然生物膜,化学改变及固化后酶的结构与功能的变化等研究)有很大意义以外,对于生化、医药研究也有很大意义,例如:亲和层析技术、酶电极、利用固相酶治疗疾病等。在工业生产中,应用固相酶的前景很好。因为固相酶一般具有较高的稳定性,又易与反应物分离,能简化产品的后处理,改进工艺流程;由于固相酶可以反复使用,所以对于某些来源不易的酶,则更有意义。固相酶在工业上的应用,是生化工艺与工程中一项重大的进展。

固相酶制备的方法可分为吸附法、载体偶联法、交联法、包埋法等。国外有关综述性的报导^[1-5]都提到这些方法。它们各有其优缺点,可按具体情况选用。一般来讲,吸附法操作简单方便,但酶容易脱落。载体偶联法是指酶通过蛋白质的游离氨基、羧基、巯基、咪唑基或酚基等基团,而与水不溶载体共价结合。此法较麻烦,但结合上的酶不易脱落。交联法是应用双功能试剂,使酶蛋白分子之间交联起来。此法有时和吸附法并用,即先把酶蛋白吸附于载体的表面上,然后再交联。包埋法是把酶包裹或埋藏在惰性的半透膜的小球内或凝胶格子内,这种形式的固相酶,对大分子的底物不适用。

据报导,用三醋酸纤维素包埋的酶^[6]活力

回收高,稳定性好,如包埋的 β -半乳糖苷酶在25℃下作用60天后,剩余活力仍达90%。载体偶联法也广为应用,以多孔玻璃为载体,借助硅烷制备固化胰蛋白酶也很稳定^[7],在23℃下水解小分子底物连续作用158小时不失活。用溴化氰活化的琼脂糖为载体效果也较好,特别在亲和层析技术上应用此法的最多。在Melrose^[8]的综述文章里列举了二十七种固相酶的四十种用途。

在国内,广州市固相酶协作组以甘蔗渣纤维-ABSE为载体偶联糖化酶,以及应用甘蔗渣纤维通过三氯化钛为吸附剂制备固相糖化酶,取得了较好的结果^[9]。中国科学院微生物研究所对固相酶也做了很多的工作,如用离子交换吸附法,把葡萄糖淀粉酶吸附于DEAE-葡聚糖凝胶上^[10],以及使用纤维素-ABSE为载体共价偶联葡萄糖淀粉酶^[11],这些工作为固相酶在葡萄糖工业生产上的应用,创立了良好的基础。

我们于1970年开始应用载体偶联法制备固相酶,用一种易得的双功能试剂,即对 β -硫酸酯乙砒基苯胺(简称SESA)为“桥”使红酵母(*Rhodotorula gracilis*) 3'-RNase连接于葡聚糖凝胶G-200上,所得到的固化3'-RNase的比活(同样蛋白量的固相酶与天然酶活力之比),一般在50%以上^[12];同时也对影响偶联的一些因素,如载体用量与活力回收和比活的关系,偶联时硫酸铵的存在对比活的影响,以及对该固相酶的某些性质,如热稳定性、保存性能、酶解产物的分析等,进行了较为详细的探讨,并于1971年在上海试剂二分厂用于生产3'-核苷酸。据粗略计算,酶使用的实际效率提高10倍以上。在这个基础上,利用同样的方法固化桔青霉(*Penicillium citrium*)的磷酸二酯酶,1972

年在上海啤酒厂中型试验中用于生产 5'-核苷酸^[13]。

鉴于目前在国内葡聚糖凝胶的产量较少,价格较贵,且利用它所制的固相酶装柱后,液体流速太慢,因此,我们先后于 1971 年至 1972 年初探索以琼脂^[14]、淀粉^[15]及纤维素^[16]代替葡聚糖凝胶,利用 SESA 使红酵母 3'-RNase 固相化,取得了较好的结果。虽然以琼脂、食用粉丝(淀粉)为载体所得的 3'-RNase 固相酶,其单位重量(湿重)固相酶活力低于葡聚糖凝胶为载体的,但比活均较高,特别是以琼脂为载体的比活可达到 100%。这个结果似可说明,通过这个方法偶联的 3'-RNase 化学改变不影响其活力,而载体的空间位阻可忽略不计。以碱纤维(纤维素,上海化纤二厂生产粘胶纤维的中间物)代替葡聚糖凝胶制备固化红酵母 3'-RNase 的工作,表明这个方法也是好的:第一,滤过性能好,宜于装柱;第二,载体的化学及物理性质较稳定;第三,价格低廉,为工业应用提供有利条件;第四,单位重量或容积的固相酶活力、比活均较以葡聚糖凝胶为载体的略佳。目前以这个方法制备的固相胰蛋白酶,以蛋白质作底物,比活可达 50% 左右。

此外,我们也利用吸附法制备固相酶,从黄曲抽提的酶溶液,用 DEAE-葡聚糖凝胶 A25 为

吸附剂得到固相的氨基酰化酶^[17]。该固相酶已在我们研究所附属的东风试剂厂中样试验,用于拆分乙酰-DL-色氨酸,酶的使用效率比原来工艺提高数倍。

目前固相酶的研究仍在迅速发展,摸索新的固化方法以制备更好的固相酶,将使它的应用前景更为广泛。

考 参 文 献

- [1] 干畑一郎,土佐哲也:化学と生物,7,147,1969.
- [2] "Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports" 1-78, New York, 1971.
- [3] "The Chemistry of Biosurfaces", 2, 563, 1972.
- [4] Falb, R. D.: Biotechnol. Bioeng. Symp., 3, 177, 1972.
- [5] Orth, H. D. and Bruemmer, W.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 11, 249, 1972.
- [6] Dinell, D.: Process Biochem., 7, 9, 1972.
- [7] Weetall, H. H.: Science, 166, 615, 1969.
- [8] Melrose, G. J. H.: Rev. Pure & Appl. Chem., 21, 83, 1971.
- [9] 广州人民食品厂等:广州轻工科技通讯,14 页,1973 年 3 月份。
- [10] 中国科学院微生物研究所水不溶酶组:微生物学报,13, 25, 1973.
- [11] 黎青翔等:微生物学报,13, 31, 1973.
- [12] 上海生物化学研究所酶室(未发表资料,1971 年 4 月)。
- [13] 上海啤酒厂、上海生物化学研究所(未发表资料,1972 年 2 月)。
- [14] 上海生物化学研究所酶室(未发表资料,1972 年 3 月)。
- [15] 上海生物化学研究所酶室(未发表资料,1972 年 5 月)。
- [16] 上海生物化学研究所酶室(未发表资料,1972 年 9 月)。
- [17] 上海生物化学研究所酶室(未发表资料,1972 年 9 月)。

名詞解釋

酶 酶是由生物体所产生的催化剂,所有已知的酶都是蛋白质。作为催化剂,酶的特点是不仅选择性很强,有些是高度专一的;而且催化效率高,比一般催化剂通常要高一千万倍至十万亿倍。许多生命活动的基本特征如化学能量的利用;按照特定

的方向和途径进行化学合成;或者把化学能转化为机械能、电能、热能等等无一不依较高度专一的酶来进行。活细胞的代谢过程,无论是分解(释放能量)还是合成(耗能过程)也都需要酶的参与,而且酶的催化都是在常温常压下进行的。机体内有水解酶、合成酶、氧化还原酶、裂解酶、转移酶、消旋酶六大类。