

磁性聚乙二醇载体固定化葡萄糖淀粉酶的研究^{*}

邱广亮¹⁾ 德力格尔 栗淑媛 高艳春

(内蒙古师范大学生物系, 呼和浩特 010022)

摘要 以磁性聚乙二醇为载体, 通过吸附-交联法固定化糖化酶. 研究了戊二醛浓度、pH 值及加酶量对酶固定化的影响. 并对固定化酶的最适温度、最适 pH、米氏常数、热稳定性及操作稳定性等进行了探讨.

关键词 葡萄糖淀粉酶, 磁性聚乙二醇粒子, 戊二醛, 磁性固定化酶

学科分类号 Q55

葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 广泛应用于葡萄糖制造、发酵、酿酒工艺^[1]. 糖化酶的需要量越来越大. 因而世界各国科学家对糖化酶^[2,3] 的固定化进行了大量研究, 显示了工业应用前景. 我们用磁性聚乙二醇胶体粒子作载体, 采用吸附-交联法, 制备出具有磁响应性的固定化糖化酶, 简称磁性固定化酶 (magnetic immobilized enzyme, MIE). MIE 既可稳定地分散于水相或有机相中, 又可借助外部磁场简单地回收, 因而为该酶工业化应用提供了一种新的途径.

1 材料和方法

1.1 材料

糖化酶为无锡酶制剂厂产品, 工业酶活为 $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ U/g; 可溶性淀粉为北京试剂厂产品, 分析纯; 戊二醛为北京化学试剂厂产品; 其他试剂均为分析纯或化学纯.

1.2 方法

1.2.1 聚乙二醇磁性胶体粒子的制备, 见文献 [4].

1.2.2 糖化酶活力测定按文献 [5]: 用 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法测定生成葡萄糖含量. 糖化酶活力单位定义为每小时产生 1 mg 葡萄糖的酶量. MIE 活性采用相同方法测定.

1.2.3 糖化酶的固定化: 称取 0.1 g 经过纯化及预处理的磁性胶体粒子, 加入适量糖化酶, 6℃振荡 20 h, 滴加 1% 戊二醛至所需浓度, 6℃下振荡 10 h. 混和液在磁场中被分离, 然后分别用重蒸水和醋酸缓冲液充分洗涤, 直至无酶蛋白被洗出, 冷冻真空干燥得 MIE.

1.2.4 固定化蛋白载量的测定: 采用 Lowry 法^[6] 测定, 以牛血清白蛋白作标准.

2 结果和讨论

2.1 pH 对固定化酶的影响

表 1 是不同 pH 下 MIE 的活力、蛋白载量、比活和活性回收率.

表 1 pH 对 MIE 的影响

pH	总活力/ U·g ⁻¹	蛋白载量/ mg·g ⁻¹	比活/ U·mg ⁻¹	活性回收 率/%
3.6	11 323	73.5	154.1	41.5
4.0	16 500	98.7	167.2	59.3
4.5	10 096	72.7	138.9	37.0
5.0	8 185	51.5	158.9	30.0
5.8	7 904	50.0	158.1	39.0

2.2 给酶量对固定化酶的影响

恒定其他条件, 取相同量的载体各 0.1 g, 依次用 2、4、6、8、10、12 ml 酶, 分别制备 MIE, 测定酶活性, 依次为 2 232、6 637、7 984、8 886、10 699、10 650 U/g. 说明每克干胶的最大载酶量为 10 699 U, 当酶与载体结合位点趋向饱和时, 再增加酶量, MIE 活性也不再升高.

2.3 戊二醛浓度对固定化酶的影响

采用戊二醛终浓度在 0.01% ~ 0.25%, 分别制备 MIE, 见表 2.

2.4 最适温度

图 1 是 30~ 70℃, 每隔 10℃测其活力, 以其相对活力对温度作图, 由图 1 可知: MIE 的最适温度是 60℃, 比游离糖化酶的最适温度 (55℃) 高 5℃.

^{*} 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (自然科学 A94062).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-09-15, 修回日期: 1998-03-11

表 2 戊二醛浓度对 MIE 的影响

戊二醛浓度/%	总活力/ U·g ⁻¹	蛋白载量/ mg·g ⁻¹	比活/ U·mg ⁻¹	活性回收率/%
0.01	12 201	74.5	163.8	44.7
0.05	12 287	75.9	162.1	47.1
0.10	14 547	94.9	153.5	53.3
0.15	17 095	100.8	169.6	63.0
0.20	7 651	108.0	70.8	28.0

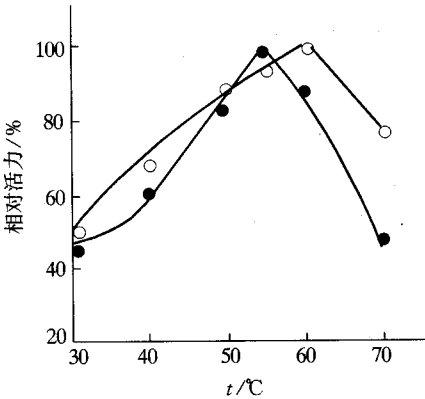


图 1 自由酶和磁性酶的最适温度
○—○: 磁性酶; ●—●: 自由酶.

2.5 最适 pH

取一定量的磁性酶或游离糖化酶, 以 2% 可溶性淀粉为底物, 在不同 pH (2.2 ~ 5.8) 的 0.2 mol/L 醋酸缓冲液中, 55℃ 振荡保温 10 min 测定酶活性, 得到的结果 (图 2) 表明: MIE 的最适 pH 是 4.5, 比游离酶的最适 pH4.0, 高 0.5 个 pH 单位. 这是因为制备磁性载体过程中加入过氧化氢, 过氧化氢氧化聚乙二醇端羟基为羧基^[4], 因而磁性载体带负电.

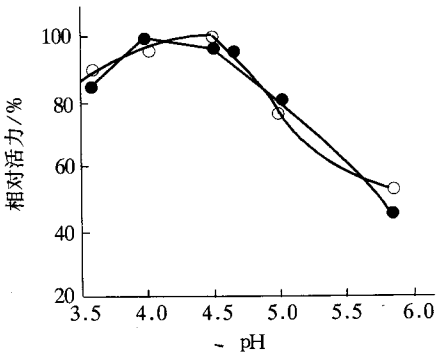


图 2 自由酶和磁性酶的最适 pH
○—○: 磁性酶; ●—●: 自由酶.

2.6 米氏常数

图 3 是 Lineweaver-Burk 双倒数图, 游离糖化酶的 K_m 值为 0.16%, MIE 的 K_m 值为 0.22%.

说明 MIE 对底物的亲和力较自然酶小, 为自由酶的 66.7%.

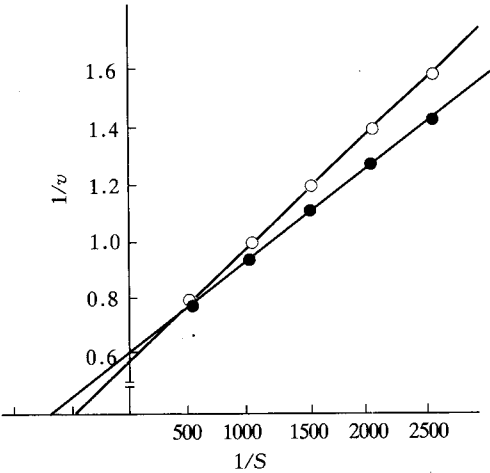


图 3 自由酶和磁性酶的米氏常数
○—○: 磁性酶; ●—●: 自由酶.

2.7 温度对酶稳定性的影响

在无底物存在条件下, 将磁性酶与自由酶于不同温度下保温 2 h, 冷却后, 在 55℃ 下测其残余活力, 结果表明 MIE 的热稳定性较自由酶强 (图 4).

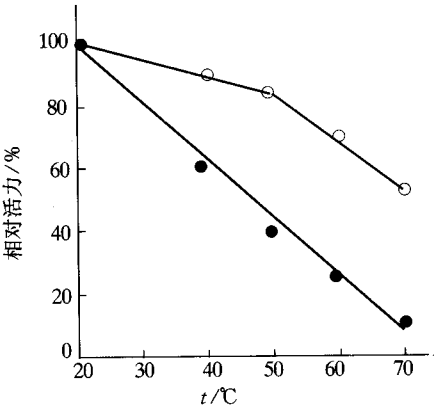


图 4 自由酶和磁性酶的热稳定性曲线
○—○: 磁性酶; ●—●: 自由酶.

2.8 贮存稳定性和操作稳定性

MIE 和自由酶在无底物存在下, 在 4℃ 保持 30 d, 其剩余活力分别为 90% 和 20%, 显然, 糖化酶经固定化后, 其稳定性比溶液酶有明显优势. 表 3 为 MIE 多次重复使用后活性保持情况. 每次使用后, 磁分离在 0.05 wb/m² 磁场下进行. 由于磁性胶体粒子粒径不很均匀, 一部分粒径很小的磁性胶体粒子在磁分离时被损失掉, 若提高磁场强度, 可扣除这部分损失, 则磁性酶在多次使用后将具有很高的活性保持率.

表 3 MIE 的操作稳定性

MIE 使用次数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MIE 活力/ $U \cdot g^{-1}$	8 640	8 424	8 244	7 830	7 812	7 470	7 272	6 642	6 228	6 210
相对活力/%	100	97.5	95.4	90.6	90.4	86.5	84.2	76.9	72.1	71.9

参 考 文 献

- 1 张树政. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社 (Zhang S Z. Enzyme industry. Beijing: Science Press), 1984. 2~10
- 2 Chen Z, Kong W, Zhou H, *et al.* The study of immobilized glucoamylase to grafted starch carrier. Chinese Biochemical Journal, 1995, **11** (2): 150~154
- 3 郭 桥, 罗贵民, 孙启安, 等 (Guo Q, Luo G M, Sun Q A, *et al.*). α -淀粉酶与糖化酶的共固定化研究. 生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal), 1994, **10** (3): 260~263
- 4 邱广明 (Qiu G M). 水溶性磁流体的制备. 化学试剂 (Chemical Reagents), 1993, **15** (4): 234~237
- 5 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社 (Zhang L X. Biochemically experimental method and technology. Beijing: Advanced Education Press), 1981. 165~169
- 6 朱 俭. 生物化学试验. 上海: 上海科学技术出版社 (Zhu J, Biochemical experiment. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press), 1981. 64~66

Immobilization of a Glucoamylase onto a Magnetic Collidal Article by Adsorbing-crosslinking. QIU

Guang-Liang, Deligeer, LI Shu-Yuan, GAO Yan-Chun (Department of Biology, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China).

Abstract A magnetic immobilized glucoamylase has been prepared by adsorbing glucoamylase onto a magnetic collidal particle and cross-linking it with glutaraldehyde. The effects of different concentration of glutaraldehyde, pH of buffer, and the amount of glucoamylase on immobilization. The results showed that the activity of MIE was 17 095 U/g dry gel. The activity recovery was 63%. And some properties of magnetic immobilized and native glucoamylase such as optimum temperature, optimum pH and michaelis constant, stabilities to heat and operational stability were studied and compared.

Key words glucoamylase, magnetic polyethylene particle, glutaraldehyde, magnetic immobilized enzyme

发育阶段 M-CAT 结合因子的组织分布 及表达动力学*

倪菊华 刘云浩 贾弘禔¹⁾

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 采用胶阻滞和 DNA-蛋白质印迹技术分析了鸡胚和雏鸡发育不同阶段骨骼肌、心肌、胗、肝和脑组织核抽提物中 M-CAT 结合因子 (MCBF) 与含 CATTCCT、CATTGCT 核心序列的寡核苷酸的相互作用。胶阻滞实验结果表明, 被检的五种组织均有 MCBF 结合活性存在, 但结合模样不完全相同; 两寡核苷酸探针与同一骨骼肌核抽提物结合模样也不相同。采用两寡核苷酸为探针对五种组织核抽提物进行 DNA-蛋白质印迹分析均检出一分子质量约 30 ku 核因子, 提示 30 ku 核因子是存在于五种组织中的普遍因子, 该因子可直接或以同二/多聚体结合 CATTCCT、CATTGCT 序列, 属 MCBF 结合活性的基本组成成分。除普遍因子外, 胶阻滞分析结果不排除各组织存在的特异因子通过蛋白质-蛋白质相互作用、与 30 ku 因子形成杂聚体结合 DNA 的可能性。骨骼肌组织 30 ku 因子在胚胎发育 18 天前表达, 出生后消失。

关键词 M-CAT 盒, M-CAT 结合因子, DNA-蛋白质相互作用

学科分类号 Q7

* 国家自然科学基金资助项目 (39480017、39970422), 中国医学科学院医学分子生物学国家重点实验室外部课题。 ¹⁾ 通讯联系人。
收稿日期: 1997-09-23, 修回日期: 1998-03-11