

科技简讯

固定化酶在我国的研究、应用及前景

固定化酶是国际上从 60 年代后期开始得到迅速发展的新技术,它是一类通过化学或物理的手段将原先溶解于水的酶固定起来,成为不溶于水的但仍具有生物活性的衍生物。这类衍生物过去曾用过固相酶、水不溶酶、不溶酶、固着酶等名称,在 1978 年我国召开的“固定化酶研究及应用学术交流会”上建议今后统一称为“固定化酶”。可以这样说,它是人们模拟体内酶的作用方式(体内酶大多数是结合在膜类物质上进行催化反应的),将酶进行一定的改造(固定化),使之更符合人类需要的酶制剂。在基础理论上可用它探讨酶在体内的作用方式;在实际应用上它可以使工艺自动化、连续化、提高酶的效率、降低成本和免除公害。因此,一进入 70 年代就已引起各国广泛的注意。目前世界上已有近十个固定化酶在不同程度上得到应用。

我国固定化酶的研究开始于 70 年代初期,经过几年的努力已取得了不少可喜的成绩。1978 年 5 月中国科学院一局在新会县召开的全国“固定化酶研究和应用学术交流会”上提出的三十多篇工作报告和四篇综述报告以及后来对三个固定化酶的生产应用的鉴定,反映了我国固定化酶的研究和应用已有了突破,进入了一个新阶段。

自 1970 年中国科学院上海生物化学研究所及微生物研究所开始固定化酶研究以来,相继应用了我国染料行业中的“591 脂化物”——对- β -硫酸酯乙砒基苯胺,作为酶与载体之间相连的双功能试剂。它和多糖类如葡聚糖凝胶淀粉、甘蔗渣纤维、木浆纤维、交联琼脂、交联琼脂糖等反应,得到各种带有苯胺基的载体,然后在十分温和的条件下与酶共价偶联。1972 年上海生物化学研究所就用这类载体 ABSE-葡聚糖凝胶共价结合红酵母的 3'-核糖核酸酶,生产 3'-核苷酸试剂。我国科研工作者还曾用这类载体共价结合了 5'-磷酸二酯酶、葡萄糖淀粉酶、多核苷酸磷酸化酶、青霉素酰胺酶、胰蛋白酶、磷酸单酯酶等,均得到十分满意的结果,做出了一批具有我国自己特点的工作。

如果说实验室的工作与生产之间存在一定的鸿沟的话,那么坚持研究和协同努力将使人们跨过这一鸿沟。我国第一批较大规模的固定化酶工业已经出现。中国科学院上海生物化学研究所固定化酶组在原来工作的基础上,进一步改变 SESA、纤维素载体的制备方法,使之更简单更廉价,并在提高发酵液活力单位的基础上,直接将发酵液连接到载体上去,使得大规模制备

固定化酶成为现实。他们与江门甘蔗化工厂、上海啤酒厂协作在 1977 年取得了固定化 5'-磷酸二酯酶生产 5'-核苷酸试验成功。用 78 公斤固定化酶、在 2,000 升罐中反复降解核糖核酸生产 5'-核苷酸。此固定化酶比原工艺的发酵液实际效率提高 30 倍,节省了原料和劳动力,降低了成本,便利了管理。此工艺在国内是首创,尚未见国外生产应用,已于 1978 年 5 月全国固定化酶会议上作了鉴定。它的成功将可能推动其他胞外酶的固定化及其工业生产规模的应用。

菌体固定化省去了提取酶的手续,这对胞内酶的固定化来说是十分吸引人的。近年来固定化菌体的应用发展迅速,我国也进行了不少这方面的工作。上海生物化学研究所、上海第三制药厂和上海医药工业研究院组成的固定化酶协作组,用明胶、戊二醛使具有青霉素酰胺酶活力的菌体固定化,装柱后连续生产 6-氨基青霉烷酸 7 个月,活力几乎不变,达到了世界先进水平。中国科学院微生物研究所与太原制药厂协作也成功地用琼脂、戊二醛包埋了大肠杆菌,用于大规模生产 6-氨基青霉烷酸。1978 年 12 月,化工部医药局通过了对这两项工艺的鉴定。

此外,中国科学院微生物所用 SESA、交联琼脂糖共价连接了多核苷酸磷酸化酶,并十分稳定地用于制备多聚核苷酸,简化了生产流程,提高了产品得率,已在 1978 年下半年进行了鉴定。上海生物化学研究所用吸附法将氨基酰化酶固定化,除拆分混旋氨基酸外,还拆分了 DL-对甲氧苯甘氨酸和 α -氨基丁酸(它们均非天然氨基酸),在生产羟氨苄青霉素和乙胺丁醇上得到中样试验的成功,分别于 1975 年和 1978 年通过鉴定。1977 年中国科学院微生物研究所将具有天门冬氨酸酶活力的菌体,十分简便地用琼脂包埋后,装柱连续高效率地生产天门冬氨酸。

还有些固定化酶已完成了实验室的工作,具备了生产应用的可能性,如广州市微生物所用聚丙烯酰胺包埋的大肠杆菌,可望不久用于 γ -酪氨酸的生产;上海生物化学研究所、上海汽水厂、上海工业微生物所组成的异构糖协作组以及沈阳食品发酵作用明胶、戊二醛包埋链霉菌,均已基本完成实验室工作,正进入中间试验阶段,生产高果糖浆。其他还有江西食品发酵所、郑州化学所、天津工业微生物所等十多个单位也在进行以高果糖浆生产为目的的固定化酶的研究,复旦大学进行了固定化 α -半乳糖苷酶的研究。

固定化酶除了工业应用外,在分析及亲和层析方面的应用也取得了一些进展。如华北制药厂用固定化青霉素酶对青霉素效价的测定。上海生物化学研究所用固定化 5'-磷酸二酯酶和固定化碱性磷酸单酯酶进行寡核苷酸序列分析。北京大学曾试用固定化酶提纯胰蛋白酶抑制剂。上海生物化学研究所用固定化抗体纯化甲胎蛋白、固定化组蛋白亲和层析蛋白激酶及固定化抑制剂亲和层析胆碱酯酶等。

在酶的固定化方法上,我国还研究了用电沉积的方法制酶膜,植物蛋白包埋,多孔氧化铝吸附等方法。在载体方面,用了多种多糖类载体、植物蛋白、多孔玻璃、多孔氧化铝等无机载体以及合成高分子载体,这些工作,为我国固定化酶的研究和应用打下了基础。

固定化酶这一领域,我国虽在几个工业应用上取得了一些成绩,但分析医学及基础理论研究方面还与世界先进水平相差甚远。为了适应四个现代化的需

要,我们应该探索新的载体和简便的方法,把一批在国民经济中有重大影响的固定化酶搞上去;我们应着眼于固定化多酶反应器改革发酵工业的可能性,着手探索需要辅助因子的多酶系统的固定化;固定化酶在国外已与自动分析系统配套,迅速、灵敏、廉价、准确地提供临床化验数据,我国应迅速填补这一空白;也要注意固定化酶在治疗疾病方面的探索。固定化酶的基础研究应该加强,这将对体内酶的作用方式的阐明提供有益的信息,对实际应用也将起指导作用。为了培养骨干,组织力量使固定化酶这一新技术得以迅速发展,上海化工学院和上海生物化学研究所筹办的固定化酶短训班即将进行。我们相信,经过我国有关的生物化学、微生物学等生命科学的科研人员以及工程技术人员的协同努力,固定化酶这一新技术一定会在我国更加茁壮成长,开出更加鲜艳的花朵,结出丰硕的果实。

(上海生物化学研究所吉鑫松、袁中一供稿)



(上接第 58 页)

二、操作方法

血液用枸橼酸钠作抗凝剂(在 3.8% 枸橼酸钠溶液中加入一小滴血),用 9% 蔗糖液洗三次后用 1/1,000 的甲基纤维素钠作成细胞悬液(于小试管中装 1—2 毫升 1/1,000 甲基纤维素钠液,加入少许洗过的细胞以略见混浊为度)。圆形玻璃毛细管(内径 0.76 厘米,镜下测为 750 微米,长约 6.0 厘米),装满待测的细胞悬液后管内不能有气泡,一端先插入凝固的琼脂(3% 琼脂,用蒸馏水配制)约 1 毫米,另一端再插入琼脂约 0.5 毫米(两端各进琼脂约 0.5 毫米)。将毛细管按在观察窗两端之凹内,再将琼脂桥池内灌满 3% 的琼脂(不宜过热或过凉),观察窗上盖上 24 × 32 毫米盖玻片,底及两侧边用固体石蜡封固,从输入管注入 22℃ 自来水(或 15% 蔗糖液),然后放在显微镜机械台上,用推进器固定,通电进行测量。电源为交流电,通过 D14—7 晶体管直流稳压电源(0—75 伏)进行控制,工作电压为 5 伏,目镜(10×)中装入方格测微计(0.5 厘米²,含 10 × 10 小方格),测量稳定层(细胞层次即以粘附管壁细胞为起点,焦距每移动 100 微米为一层,我们定第四层为稳定层)中细胞往返 10 个小方格各所需之时间(同一个细胞由上向下一次,再由下向上

一次),取其平均数。正式试验计算 10 个细胞的平均值。

三、结果与小结

用本装置进行过有关因素(略)及部分人、鼠红细胞试验,后者结果如表 1。

表 1 人、鼠红细胞电泳速度的比较

标本数	红细胞数	往返上下 10 小格所需平均时间 ± 标准差	波动范围	显著测验
人 5 份	50 个	17"60 ± 0.183	17"51—17"81	T = 2.738 P < 0.05
鼠 5 份	50 个	18"45 ± 0.670	17"67—19"13	

表中 5 份人红细胞(50 个红细胞)平均电泳速度为 17"60 ± 0.183, 5 份鼠红细胞平均电泳速度为 18"45 ± 0.67, 人、鼠各个体之间的差异不大,但两者之间差异显著(P < 0.05),说明本装置有一定敏感性和稳定性。此外立式细胞电泳较“卧式”为优越:(1)可进行长距离细胞电泳,无疑它是要敏感一些;(2)由于是立式,不会因细胞沉底而返工;(3)向观察窗(调温室)中灌一定温度的白糖水(用 1/10,000 洁尔灭配制,可常用)既可以解决圆形毛细吸管引起细胞畸变问题,又可控制温度;(4)琼脂桥搭桥方便;(5)本细胞电泳计用的是圆形毛细管,圆形毛细管制作较为方便。

[本文于 1979 年 2 月 5 日收到]