

图 11 的吸滤装置。加树脂振荡 3—5 分钟后，用吸滤装置能迅速地吸去全部上清液，测量留在原塑料瓶中的树脂，可得到  $T_4$  的游离率。从图 6 的  $T_4$  标准曲线可见，曲线的斜率良好。用同一正常血样分别 8 次重复试验，其平均值为  $8.26 \pm 1.10$  微克/分升，重复性良好。

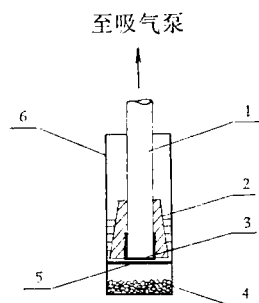


图 11 吸滤装置

1. 玻璃管, 2. 橡皮塞, 3. 尼龙布,  
4. 树脂, 5. 滤纸, 6. 塑料管

## 小 结

本文介绍两种测定血清甲状腺素的方法。方法灵敏、准确性和重复性良好。与国内同类

方法相比较，所测得的人血清甲状腺素值有明显的相关性，与国外文献报道的正常值范围也相符合。试验操作简单，不需大型设备，便于推广和普及。

两种方法测定过兔抗  $T_4$  血清的效价，因此又可用于  $T_4$  放射免疫测定。

本工作得到中国科学院原子能研究所、解放军总医院、首都医院、北京东四产院、工农兵医院、朝阳医院的协助，特此表示感谢。

## 参 考 文 献

- [1] Ekins, R. P.: *Clin. Chim. Acta.*, 5, 453, 1960.
- [2] Murphy, B. E. P. et al.: *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 24, 187, 1964.
- [3] Wong, W. H.: *Clin. Chemistry*, 21, 216, 1975.
- [4] Mitchell, M. L.: *J. Nuclear Med.*, 14, 336, 1973.
- [5] 中国科学院原子能研究所、解放军总医院：竞争性蛋白结合分析法测定血清甲状腺素。
- [6] Kue Hung Chau, et al.: *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 42, 189, 1976.
- [7] Alexander, N. M.: *Clin. Chemistry*, 20, 553, 1974.

[本文于 1978 年 9 月 1 日收到]

# 固定化链霉菌生产异构糖试验

中国科学院上海生物化学研究所固相酶组

上海市工业微生物研究所异构酶组

上海汽水厂异构糖试验组

异构糖是一种新型甜味剂，它是由葡萄糖部分地异构化成果糖而制得的。当果糖的含量为 42%、葡萄糖的含量为 58% 时，异构糖的甜度与同样浓度的蔗糖相仿。六十年代末以来，它受到人们广泛的注意。在世界糖价急剧上涨的七十年代初期，异构糖生产的应用研究更获得了显著进展。

葡萄糖的异构化有碱催化法及生物法两种。碱催化法是将葡萄糖溶液加碱到 pH12 以上，使葡萄糖发生异构反应而成果糖。这种方

法，由于异构化过程中副反应多，转化率低，而且影响产品颜色和口味，造成产品精制困难，因而工业上很少采用。生物法则是靠葡萄糖异构酶来催化葡萄糖向果糖转化的，在这过程中，没有副反应发生，因此工业上已采用此工艺，产量逐年增加。葡萄糖异构酶存在于多种微生物中，为细胞内酶。自 1966 年以来工业上生产异构糖都是用发酵液或菌体来进行的，但是产品的后处理上还存在很大困难。

六十年代后期固定化酶(即固相酶)迅速发

展。它具有能反复使用、适于自动化、管道化生产、不会给产品带进杂质等优点。异构糖研究者因此特别重视葡萄糖异构酶的固定化,并努力使之用于生产<sup>[1-2]</sup>。研究初期,人们先将葡萄糖异构酶从菌体分离出来,然后再进行固定化。这种方法的缺点是,必需破碎细胞及分离酶,设备及技术要求都较高,用于生产存在一定问题。为了弥补上述不足,简化固定化手续,近年来发展了菌体直接固定化方法<sup>[3-5]</sup>。我们在这方面也进行了研究,试用明胶、戊二醛固定化方法固定链霉菌,得到了性能较好的固定化菌体,在葡萄糖连续异构化的扩大试验中取得了颇为满意的结果。

我们使用的产生葡萄糖异构酶的菌种是玫瑰暗黄链霉菌(*Streptomyces roseofulvus*) K<sub>c</sub>13-5750。制备固定化链霉菌所用的明胶为粘度15度以上的照相明胶。戊二醛是用E. Merk公司或Kock-Light公司的25%浓度的溶液。

葡萄糖异构酶活力用以下方法测定:称取一定量的菌体或固定化菌体,悬浮于18毫升0.2M pH7.8的磷酸缓冲液中,加3毫升0.1M MgSO<sub>4</sub>溶液,70℃保温5分钟,加9毫升70℃预热过的70%(w/v)葡萄糖溶液,搅拌反应1小时,反应液中形成的果糖含量用咔唑法及间苯二酚法<sup>[6]</sup>测定。能在上述条件下生成1毫克果糖的酶量定义为1个活力单位。

## 一、固定化链霉菌的制备

我们研究的固定化链霉菌的制备方法有两种:

**1. 戊二醛直接凝结法** 将菌体与明胶溶液混匀后,加入戊二醛凝结而成固定化菌体,步骤如下:将10克湿菌体加入10毫升10%明胶溶液,搅匀,然后边搅边加1毫升25%戊二醛,加完后,混合物凝结成块状,切成10目大小的颗粒,再用缓冲液及水洗即成。

**2. 明胶包埋后用戊二醛固定法** 先把菌包埋在明胶里,然后用戊二醛固定。具体做法如下:先将10克菌体用7毫升蒸馏水搅拌均匀;另外将1克明胶用8毫升蒸馏水溶解,待完全溶解后倾入上述菌体中,搅拌均匀,然后铺成

2—3毫米厚的膜;0—5℃的冰箱内放置1小时。随后用75毫升0.25%戊二醛浸泡24—48小时,切成10目大小,水洗待用。

用以上两种方法制得的固定化菌体,其活力回收约为原菌体活力的40%左右。但大规模制备时,包埋后再固定法较直接凝结法方便。扩大试验时,我们采用包埋后再固定的方法。

## 二、固定化菌体的连续反应试验

完成小试验后,1977年10月进行了扩大连续反应试验。固定化链霉菌装柱,以每天60公斤的规模连续转化葡萄糖。

扩大试验中用的葡萄糖是由玉米淀粉经 $\alpha$ -淀粉酶、黑曲糖化酶水解得到的未经结晶浓度为45%的葡萄糖溶液。

9公斤湿的链霉菌菌体,按照“固定化链霉菌的制备”一节中的方法2,即用明胶包埋、铺膜、戊二醛固定,制得固定化菌体27公斤,装于分层的有恒温水夹套保温的柱中。柱的形式如图1。

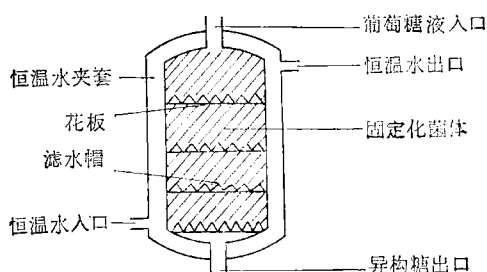


图1 异构化柱示意图

45%(w/w)浓度的葡萄糖液(pH7.8,加适量NaH SO<sub>3</sub>以维持pH),从柱的上部流入,下行通过固定化菌体床进行酶反应,流速控制在每小时5.5升,此时,已达到转化率所需要的最大流速。反应温度在65℃左右,由恒温水通过夹套反复循环进行控制,每天定时取样测定转化率。图2为异构化柱20天内,每天连续处理60公斤葡萄糖液的转化率变化情况。

从图2可看出:固定化菌体连续使用效果较好。20天内转化率下降很慢,前15天几乎无下降,15天后虽略有下降,但仍保持在40%以上。

异构化柱制得的异构糖液只需稍经离子交

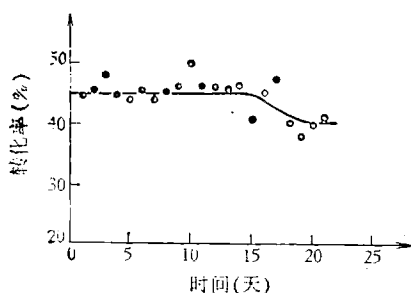


图2 装柱反应中转化率变化情况

换及脱色处理即可浓缩为成品,后工艺远较使用菌体及发酵液的工艺简单,成品的颜色极淡,质量亦好。

### 三、小结

明胶、戊二醛的方法制备固定化菌体用以生产异构糖的试验,其结果是令人满意的。如果考虑应用于工业化生产时,以下几方面的优点更为突出:固定化所用的原料——明胶、来源充足,价格低廉,便于推广和降低固定化的成本(如自行合成戊二醛成本可进一步降低)。所用的试剂基本上无毒性,因此用于异构糖的生产,它有较聚丙烯酰胺凝胶固定化方法无法比拟的好处。由于活力回收较高、又能反复使用,固定化链霉菌在扩大试验过程中比原菌体实际效率提高5倍以上,也有利于降低生产成本(仅就菌体的固定化与发酵比较,固定化链霉菌使用后处理方便所降低的成本尚未计算在内)。固定化方法简便,设备简单,易于实施;生产采用柱反应器的形式,管道化连续进行,便于操作,管

理。因此,这种方法可供工业规模生产异构糖时,考虑采用。当然,方法本身还存在一些有待改进之处。其一,由于需将菌体固定化,生产时要添置收集菌体的设备;其二、固定化链霉菌的重量和体积比用原菌体增加两倍左右,因此,反应器的体积需要加大。虽然如此,它仍不失为一种较好的方法,生产上有着广泛应用的前景。

还应指出,这两种明胶、戊二醛固定化方法,除可用于链霉菌外,用于其他菌体也是一种较为满意的方法。同样方法用于固定化具有青霉素酰化酶的大肠杆菌时也是成功的。

本试验所用的链霉菌菌种是由江苏化工设计研究所提供的,黑曲糖化酶由上海工业微生物所糖化酶组及上海啤酒厂、上海酒精厂提供,异构柱的设计得到由上海生化所、上海第三制药厂、上海医药工业研究院等单位组成的固定化青霉素酰化酶协作组的协助。在此,一并表示感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Strandberg, G. W. and Smiley, K. L.: *Applied Microbiology*, 21, 588, 1971.
- [2] Strandberg, G. W. and Smiley, K. L.: *Biotech. Bioeng.*, 14, 509, 1972.
- [3] 千畑一郎: 发酵と工业, 35, 13-14, 1977
- [4] Moskowitz, Gerard, J.: U. S. Patent. 3843442, 1974.
- [5] 千畑一郎: 公开特许公报, 48, 74132290, 1974.
- [6] Dawson, R. M. C. et al.: *Data for Biochemical Research*. p. 620, 1969.

[本文于1978年11月8日收到]

## (科技消息)

### 蛋白质水解酶对受体糖脂的效应

细胞表面有各种受体。一般认为当用蛋白质水解酶处理后受体失去效应即表明该受体是蛋白质,迄今为止还未有一个明确的例外报告。然而最近发现巨噬细胞表面的与抑制运动因子[MIF]结合的受体,经胰蛋白酶处理后尽管失活了,然而却不是蛋白质。

MIF是受免疫刺激的淋巴球产生的一种可溶性蛋白质,它作用于巨噬细胞,抑制其自由移动,同时提高了吞食力。Poste等人[→Cell, Immunol, 44, 71(1979)]发现中脑的神经节甙脂结合有MIF,因而推测巨噬细胞表面膜上的神经节甙脂分子可能是MIF的受体,他们制备了含各种神经节甙脂的核糖体,让其作用于巨噬细胞。结果含GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GM<sub>3</sub>, Gl<sub>3a</sub>的核糖体无效。含牛脑的神经节甙脂及淋巴球的神经节

甙脂的核糖体,使细胞对MIF的敏感性增大。由此断定MIF的受体是某些种神经节甙脂,再者根据各种合成糖和MIF的相互作用及外源凝集素处理后细胞的MIF敏感性的变化,表明MIF受体是具有和H型糖脂类似结构的岩藻糖脂。

尽管他们认为糖脂是MIF受体,但是用胰蛋白酶处理巨噬细胞,发现其MIF敏感性也下降。这点似乎支持以前认为MIF受体是糖蛋白质的见解。看来,最可能的解释是:MIF受体是糖脂,但和膜蛋白紧紧结合着。用一般抽提法无法分离。当用蛋白酶作用后,受体本身虽未分解,但其存在状态发生变化,因而失去了受体活性。

以前在受体的研究中,若是用蛋白水解酶处理失活,便认为该受体是蛋白质。这个例子告诉我们,不能那么简单地下结论。

据:《蛋白质核酸酵素》24(10)1979.

(中国科学院动物研究所 原晋林)