

氨基化硅胶固定化葡萄糖氧化酶的研究*

钱军民¹⁾** 李旭祥¹⁾ 锁爱莉²⁾

(¹⁾西安交通大学环境与化学工程学院, 西安 710049; ²⁾西安交通大学第一医院, 西安 710061)

摘要 利用溶胶-凝胶技术, 以四甲氧基硅 (TMOS) 和 γ -氨丙基甲基二甲氧基硅烷 (APMDMOS) 为前驱体制成了一种功能化的材料——氨基化硅胶. 并以戊二醛为交联剂, 利用该氨基化硅胶为载体对葡萄糖氧化酶 (GOD) 进行交联固定化, 研究了 TMOS 用量、戊二醛浓度、给酶量、温度和 pH 值等因素对固定化 GOD 活力的影响, 并考察了固定化 GOD 的热稳定性和贮存稳定性. 红外光谱验证了氨基化硅胶交联固定化 GOD 的可行性. 确定出了优化的固定化条件: TMOS 用量为 10%, 戊二醛的浓度 2.0%, 给酶量 1 600 U, 最适 pH 和最适温度分别为 5.2 和 32 °C. 固定化 GOD 具有良好的热稳定性和贮存稳定性.

关键词 固定化酶, 葡萄糖氧化酶, 载体, 功能化硅胶, 溶胶-凝胶技术

学科分类号 Q814.2

随着生物技术的飞速发展, 分离出的酶种类越来越多. 酶由于具有催化专一性、高活力和催化高效性等优点, 在发酵工业、制药、生物传感器等领域发挥着越来越大的作用^[1]. 但游离态的酶在应用上受到很大限制. 对酶进行固定化就成为酶工程的核心内容之一. 目前, 固定化方法主要有包埋法、吸附法和交联法等^[2~4]. 其中, 运用包埋法和吸附法固定化生物活性单元时, 虽然对其生物活力伤害较小, 但生物活性单元易脱落, 稳定性差, 而共价交联法固定化生物活性单元则可克服上述不足.

固定化生物活性单元的活力除受固定化技术的影响外, 载体材料的物理和化学性质在很大程度上决定着固定化生物活性单元的活力. 在某种意义上来说, 固定化技术的发展就是对载体材料的不断开发与研究. 而使用更简单、更实用的固定化方法和性能更优异的载体材料以促进固定化生物活性单元获得更多的实际应用则是研究的焦点. 溶胶-凝胶材料是近年来才发展起来的一种新材料、新技术. 由于其具有优良的光学、热、化学惰性、生物相容性以及制备条件温和等优点, 得到了广泛的研究和应用^[5]. 本文利用溶胶-凝胶技术, 以四甲氧基硅和 γ -氨丙基甲基二甲氧基硅烷为前驱体制成了一种功能化的载体——氨基化硅胶, 并以其为载体对葡萄糖氧化酶进行固定, 取得了理想的结果.

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

葡萄糖氧化酶 (GOD, 源于黑曲酶, 酶活力

为 109 U/mg): 高纯, 上海生工生物工程技术有限公司; 葡萄糖: 分析纯, 西安化学试剂厂; 戊二醛: 生化试剂, 天津市化学试剂三厂; 四甲氧基硅 ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$, TMOS) 和 γ -氨丙基甲基二甲氧基硅烷 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_2\text{CH}_3$, APMDMOS) 均为武汉大学化工厂, 蒸馏后使用; 实验用水为二次蒸馏水. 其余试剂和药品均为国产分析纯.

磁力加热搅拌器: 78-1 型, 杭州仪表电机厂; 超级恒温器: 501 型, 上海市上海县实验仪器厂; 电光分析天平: TG328B 型, 上海天平仪器厂; pH 计: pH5-25 型, 上海雷磁仪器厂; 红外光谱仪: AVATAR 360 FT-1R 型, 美国 Nicolet 公司; 恒温冷冻摇床: HQL-300 型, 中国科学院武汉科学仪器厂.

1.2 载体的制备与 GOD 的固定化

TMOS 和 APMDMOS 按配比加入到试管中, 水为溶剂, 甲醇为共溶剂, 置于恒温水浴中, 在酸性条件下进行水解-缩聚反应, 并搅拌至形成均匀透明的体系, 开始形成溶胶, 然后进行陈化, 最后形成凝胶, 再经高温处理后即为载体——氨基化硅胶.

载体经体积浓度为 0.5% ~ 2.5% 的戊二醛溶液处理后, 将载体室温风干. 再在 4 °C 的冰箱中对

* 西安交通大学科学研究基金资助项目 (XJJ200020).

** 通讯联系人.

Tel: 029-2668385, E-mail: huasilou@263.net

收稿日期: 2001-08-17, 接受日期: 2001-10-18

葡萄糖氧化酶进行交联固定 30 h, 即得到固定化 GOD, 以固态形式储存于 4℃ 冰箱中备用. 固定化 GOD 的参数如下: TMOS 与 APMDMOS 的体积比为 1: 9, 戊二醛浓度为 2.0%, 给酶量 1 600 U (200 U/ml 酶溶液), pH 和温度分别为 5.2 和 32℃. 其他参数作为影响因素讨论.

1.3 GOD 活力的测定

游离态 GOD 和固定化 GOD 的活力测定方法参见文献 [6]. 介质为 0.1 mol/L, pH 值为 5.2 的磷酸盐缓冲溶液. 其中, 游离态 GOD 活力取相对活力, 它以给定的 GOD 活力为基准 (109 U/mg); 固定化 GOD 的活力以实际测定的活力数值为准 (载体质量以干态氨基化硅胶为基准).

2 结果与讨论

2.1 载体固定化 GOD 过程的红外表征

载体氨基化硅胶固定化 GOD 过程的红外光谱表征如图 1 所示.

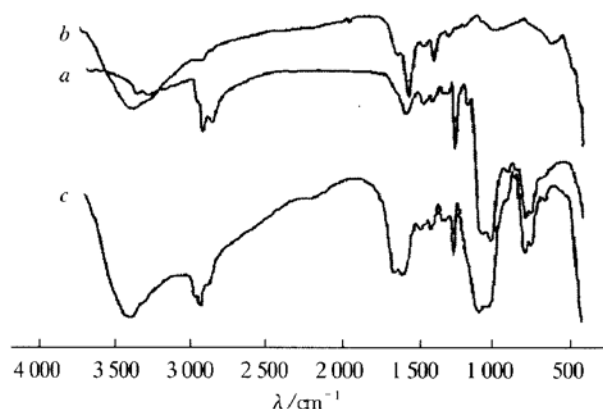


Fig. 1 IR spectra of immobilization of GOD on aminated silica gel

a: carrier aminated silica gel; b: glutaraldehyde covalently linked to carrier; c: GOD immobilized on carrier.

由上述红外吸收光谱图分析可知, 硅胶与戊二醛反应后, $1\,579.3\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\delta_{(\text{NH})}$ 吸收峰消失, 在 $3\,398.3\text{ cm}^{-1}$ 处出现了羟基的吸收峰, 且在接近 $1\,700\text{ cm}^{-1}$ 处出现了醛基的特征吸收, 这说明凝胶材料已连接上了戊二醛. 酶固定化后, 醛基的特征吸收峰消失, 并且亚胺的吸收峰变得更明显, 说明 GOD 已被固定到载体上.

2.2 TMOS 用量对固定化 GOD 活力的影响

载体的结构对固定化 GOD 活力有很大的影响. 而影响载体结构最重要的因素是制备载体过程中交联剂 TMOS 的用量, 交联剂 TMOS 用量的影

响见图 2.

由图 2 可知, 随 TMOS 用量的增大, 固定化 GOD 的活力明显下降, 这是因为交联剂 TMOS 的用量增大, 载体交联度增大, 网格变小, 空隙率减小, 造成固定化 GOD 的活动空间受到限制, 也使底物和反应产物等小分子物质的扩散变得困难起来, 妨碍了酶促反应的进行, 致使固定化 GOD 活力显著下降. 考虑到 TMOS 对载体制备过程中凝胶时间的影响, 确定本研究中 TMOS 的用量取 10%.

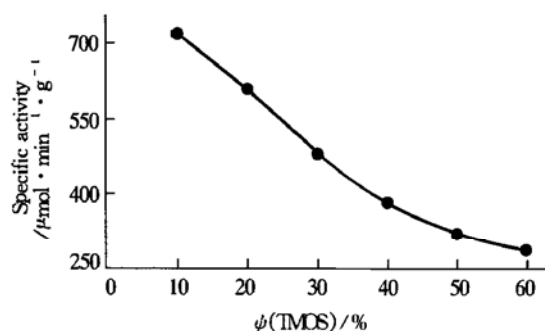


Fig. 2 Relation between TMOS content and specific activity of immobilized GOD

2.3 戊二醛浓度对固定化 GOD 活力的影响

运用交联法固定化酶时, 交联剂戊二醛浓度的大小对固定化酶的活力有重要影响 (图 3).

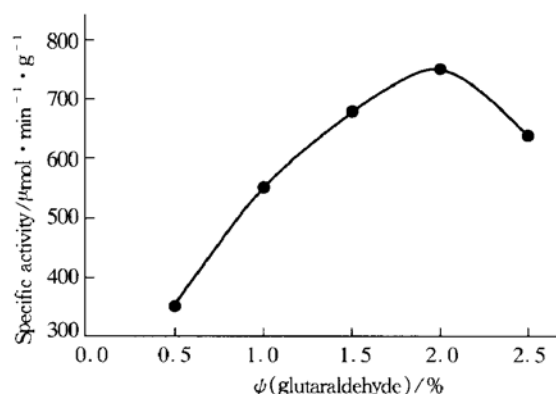


Fig. 3 Relation between glutaraldehyde concentration and specific activity of immobilized GOD

由图 3 可以看出, 随戊二醛浓度的增大, 固定化 GOD 的活力呈现先增大后降低的变化趋势, 在戊二醛浓度为 2.0% 时, 出现一个极大值. 这是因为戊二醛浓度较小时, 使酶在载体上的固载量相应较小, 故固定化酶活力不高; 当戊二醛浓度升高时, 酶在载体上的固载量随之提高, 固定化酶的活力增大; 而当戊二醛浓度再增大时, 固定在载体上

的酶量更高, 致使单个固定化酶分子的活动空间减小, 空间位阻作用明显, 酶活力下降, 同时, 戊二醛也是酶的变性剂, 其用量增大势必会造成酶有较大的变性, 使酶活力下降, 可见交联剂戊二醛浓度也不能太大. 故戊二醛浓度取为 2.0%.

2.4 温度对固定化 GOD 活力的影响

温度的升高, 一方面可以加快酶促反应的进行, 提高酶活力; 另一方面, 温度的提高也可使酶变性, 降低酶活力, 酶活力是上述两种作用共同作用的结果. 温度对酶活力的影响如图 4 所示.

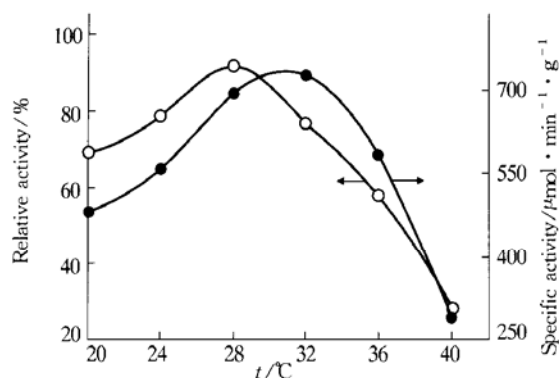


Fig. 4 Relation between temperature and specific activity of immobilized GOD

○—○: free GOD; ●—●: immobilized GOD.

由图 4 可见, 与游离酶相比, 固定化 GOD 的最适反应温度提高了 4°C, 且高活力范围加宽了. 可见, 酶被固定化后, 其耐热性得到了较程度的提高. 为使固定化 GOD 的活力最大, 最适固定化温度为 32°C.

2.5 pH 对固定化 GOD 活力的影响

缓冲液的 pH 值对固定化 GOD 活力的影响如图 5 所示.

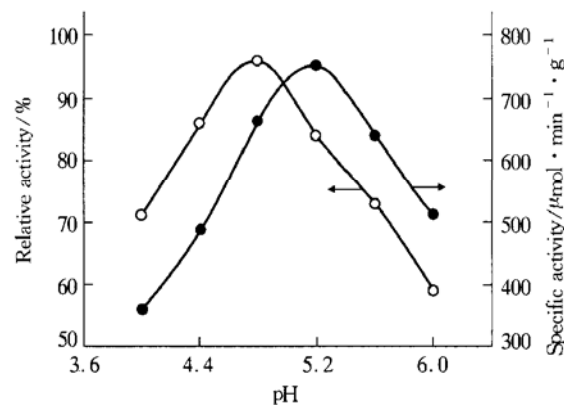


Fig. 5 Relation between pH and specific activity of immobilized GOD

○—○: free GOD; ●—●: immobilized GOD.

从图 5 可以看出, 固定化酶的最适 pH 值比游离酶提高了约 0.5 个单位, 且酶的最大活力变化不大. 最适 pH 值提高, 是因为交联剂戊二醛在交联固定化 GOD 时, 消耗了 GOD 上的一些氨基, 改变了其微观环境, 造成局部羧基含量增大, 酸性增强, 故这部分损失就需酶所处的环境来补偿. 因此, 固定化酶的最适 pH 值比游离酶有所提高, pH 为 5.2.

2.6 给酶量对固定化 GOD 活力的影响

给酶量 (200 U/ml) 对固定化 GOD 活力的影响 (图 6).

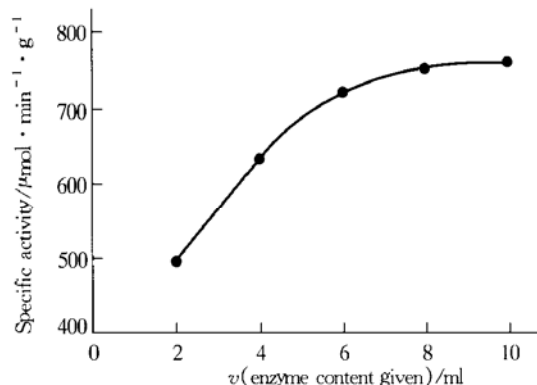


Fig. 6 Relation between enzyme content given and specific activity of immobilized GOD

由图 6 可见, 随给酶量的增加, 固定化 GOD 活力逐渐增大, 且当给酶量达到一定程度时, 固定化酶活力的增加变得很缓慢. 当交联剂用量一定时, 随给酶量的增加, 固定到载体上的酶量增加, 固定化 GOD 活力增大, 当给酶量增大到一定程度时, 载体上固定的酶量已趋于饱和, 故再增大给酶量, 对提高固定化 GOD 活力就不明显了, 所以实验中给酶量取为 1 600 U.

2.7 固定化 GOD 的热稳定性

将固定化 GOD 放置于温度分别为 30°C、

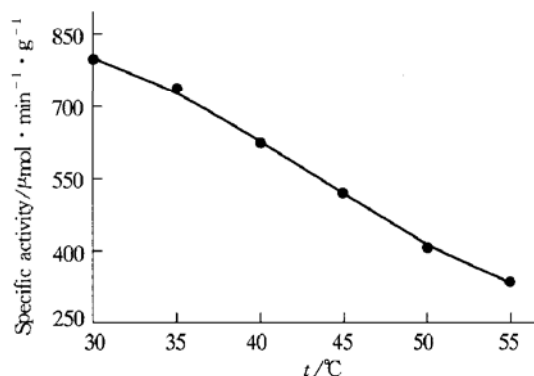


Fig. 7 Heat stability of immobilized GOD

35℃、40℃、45℃、50℃和55℃的烘箱中保温1 h, 取出后自然冷却至室温, 在32℃测定其残存活力, 结果见图7.

由图7可以看出, 随温度升高, 固定化GOD的残存活力下降; 在50℃时的残存活力约为50%. 可见, 固定化GOD具有良好的热稳定性.

2.8 固定化GOD的贮存稳定性

图8是固定化GOD活性随放置时间的延长而变化的曲线.

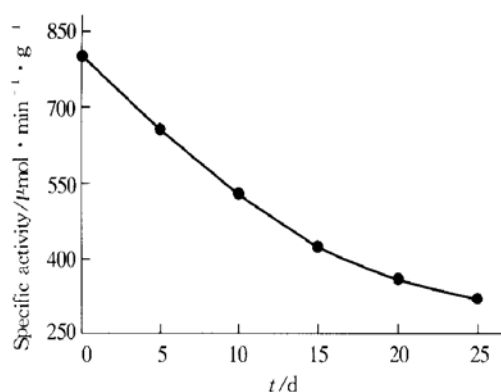


Fig. 8 Relation between storage time and specific activity of immobilized GOD

由图8可见, 随放置时间的延长, 固定化GOD活力逐渐下降, 放置15 d时, 固定化GOD活力仍在50%以上. 可见, 固定化GOD具有较好的贮存稳定性.

参 考 文 献

- 1 Júnior L R, Neto G de O, Fernandes J R, *et al.* Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix. *Talanta*, 2000, **51**: 547~557
- 2 Erlenkötter A, Kottbus M, Chemnitz G C. Flexible amperometric transducers for biosensors based on a screen printed three electrode system. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2000, **481**: 82~94
- 3 Currell N, Oliva S, Rescigno A, *et al.* Novel diazonium-functionalized support for immobilization experiments. *Journal of Applied Polymer Science*, 1997, **66**: 1433~1438
- 4 Larsson T, Lindgren A, Ruzgas T, *et al.* Bioelectrochemical characterisation of cellobiose dehydrogenase modified graphite electrodes: ionic strength and pH dependences. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2000, **482**: 1~10
- 5 Wang B Q, Li B, Wang Z X, *et al.* Sol-gel thin film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium. *Analytical Chemistry*, 1999, **71**: 1935~1939
- 6 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978. 60
Department of Biochemistry & Microbe, Zhongshan University. Introduce to Biochemistry Technology. Beijing: People Education Press, 1978. 60

Study on Immobilization of Glucose Oxidase on Aminated Silica Gel*

QIAN Jun-Min^{1)**}, LI Xu-Xiang¹⁾, SUO Ai-Li²⁾

¹⁾ School of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

²⁾ The First Teaching Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract A new type of functional material: aminated silica gel was prepared through the hydrolysis and polycondensation of precursors tetramethoxy-silane (TMOS) and γ -aminopropylmethyldimethoxysilane by sol-gel process. Glucose oxidase (GOD) was cross-linkly immobilized on the carrier aminated silica gel by cross-linking agent glutaraldehyde. The effects of immobilization conditions such as TMOS content, glutaraldehyde concentration, enzyme content given, temperature and pH on the activity of immobilized GOD were discussed in detail. The heat performance and storage stability of immobilized GOD were also investigated. The feasibility of GOD immobilized on the carrier was confirmed by the correlative infrared spectra. The optimum conditions were acquired as follows: TMOS content 10%, glutaraldehyde concentration 2.0%, enzyme content given 1 600 U, temperature 32℃ and pH 5.2. The immobilized GOD had high bioactivity.

Key words immobilized enzyme, glucose oxidase, carrier, functional silica gel, sol-gel process

* This work was supported by a grant from the Natural Science Research Foundation of Xi'an Jiaotong University (XJJJ200020).

** Corresponding author. Tel: 86-29-2668385, E-mail: huasilou@263.net

Received: August 17, 2001 Accepted: October 18, 2001