

多孔醋酸纤维素球形载体固定化糖化酶的研究

曲红波 丛 威 韦新桂 陈剑飞 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 报道了一种多孔醋酸纤维素球形固定化酶载体的制备技术, 以 NaIO_4 氧化法活化, 固定糖化酶, 测定了固定化糖化酶的催化反应特性, 并与游离酶作了比较. 固定化酶在 55°C 下水解 10 批淀粉溶液, 总反应时间超过 24 h, 活力无显著变化.

关键词 多孔醋酸纤维素球, 糖化酶, 固定化

学科分类号 Q55

固定化酶技术自 60 年代兴起, 已在工农业和医学中取得巨大效益, 受到科学界和产业界的重视^[1~3]. 在实际应用中, 需根据应用目的和酶的特性, 选择合适的固定化载体和方法. 世界上一些公司已有生物固定化载体 (包括已经活化的载体) 出售.

我国固定化酶技术的研究成就显著, 发展了一些独特的固定化技术, 如对- β -硫酸酯乙砒基苯胺 (SESA) 便是我国研究者首先使用的一种高效双功能试剂^[4,5]. 但是, 固定化载体方面的研究相对较少, 尚没有商品化的固定化专用载体^[6~8]. 在固定化酶技术的研究和生产中, 多采用经过简单加工的天然材料和一些工业副产物作为载体, 也常使用 Sepharose 等进口载体^[9~11]. 这种情况不利于我国固定化酶技术的发展和运用.

在固定化酶技术的研究和应用中, 最为关键的问题是提高固定化酶的活力和稳定性, 选择载体时亦应以此为出发点, 从两方面考虑, 一是其物理、机械性能和化学生物稳定性; 二是其表面基团的反应活性和与酶结合的化学键型. 在固定化酶的研究中, 需要研究开发高效的固定化载体和相应的固定化技术.

本文报道了一种多孔醋酸纤维素球作为固定化酶载体的性能. 以糖化酶为固定化研究对象. 糖化酶是一种较易于失活的酶, 同时又是工业上以游离形式使用量最大的酶之一, 其固

定化技术的研究比较活跃^[12,13]. 因此以之为对象具有一定的代表性.

1 材料和方法

1.1 试剂

醋酸纤维素 (上海醋酸纤维素厂); 糖化酶 (amylglucosidase, EC 3.2.1.3, Sigma 产品, 以 pH 4.6, 0.02 mol/L 醋酸缓冲液稀释 200 倍后, 4°C 保存备用); 3, 5-二硝基水杨酸 (化学纯, 军事医学科学院药材供应站); 可溶性淀粉 (分析纯, 四川省彭州市军乐化工厂).

其他试剂均为市售分析纯; 所有溶液如无特殊说明均用蒸馏水配制.

1.2 醋酸纤维素多孔球的制备

称取一定量的醋酸纤维素, 溶于 DMSO 和乙醇 1:2 的混合溶剂. 通过 6 号注射针头滴入蒸馏水中成球. 抽滤, 洗涤后, 密封保存, 防止干燥.

1.3 载体活化

醋酸纤维素球, 与两倍体积的 0.05 mol/L NaIO_4 溶液混合, 4°C 摇动过夜, 以蒸馏水充分洗涤. 抽干, 4°C 密封保存.

1.4 酶的固定

将已活化的载体, 与等体积的酶液混合,

4℃ 摇动过夜. 抽滤、洗涤后, 加入 200 ml 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液, 摇动 2 h, 抽干. 再以蒸馏水充分洗涤, 抽干. 进行以下实验. 不用时, 4℃ 保存.

1.5 酶活力测定

以 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定水解 2% 可溶性淀粉产生的葡萄糖. 反应条件为 55℃, pH 4.6. 酶活力单位定义为, 每分钟产生 1 μmol/L 葡萄糖的酶量.

1.6 稳定性测定

以一定量的固定化酶在 55℃, pH 4.6 条件下水解 50 ml 2% 可溶性淀粉溶液, 反应中测定酶活力. 待完全水解 (一般 2~3 h) 后, 固定化酶以蒸馏水充分洗涤, 抽干后重复进行水解试验.

2 结果与讨论

2.1 醋酸纤维素球的制备及大批量生产技术

以文献报道的方法为基础, 考虑到实际操作中的安全性, 以乙醇代替一般采用的丙酮, 取得了相同的效果. 醋酸纤维素母液的浓度影响醋酸纤维素球的形状和孔隙结构. 母液浓度太低时, 形成的球结构过于疏松, 强度不够, 且偏扁平; 浓度太高时, 形成蝌蚪形、带拖尾的球. 实验表明, 醋酸纤维素溶液的浓度在 8%~10% 范围内比较合适.

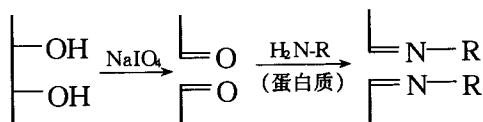
这种使溶液以液滴形式喷出凝固成型的技术, 可以采用工业造粒塔进行大批量生产^[14].

2.2 载体特性

实验中制备的醋酸纤维素多孔球, 直径在 2 mm 左右, 表面和内部呈多孔结构. 含水量为 88.7%.

2.3 固定化反应

NaIO₄ 氧化法活化多糖类基质固定蛋白质分子的反应式如下:



酶直接键合于载体表面, 二者中间没有连

接臂. 这对固定化酶的催化作用会产生两方面的影响: 一是对底物与酶的连接造成空间位阻, 二是影响酶分子的构象.

2.4 固定化酶的活性及稳定性

以相同条件制备六批固定化酶, 平均活性 376 U/g (干重), 酶活收率约为 10%.

固定化酶经 10 次水解实验, 在 55℃ 总反应时间超过 24 h, 活力无显著下降的趋势 (图 1). 此结果比物理吸附法固定的糖化酶稳定性高^[13]. 以此结果计算, 经 230 次反应之后, 保留酶活 50%.

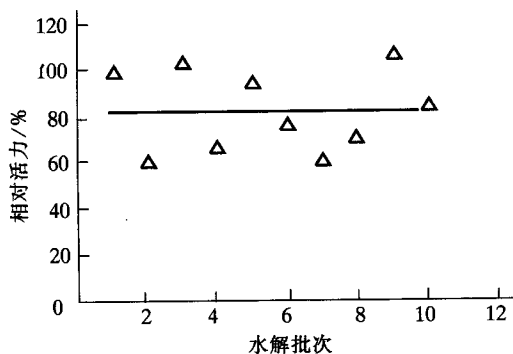


图 1 固定化糖化酶的操作稳定性

2.5 固定化酶的 pH 效应

测定在不同的 pH 下固定化酶和游离酶的反应初速度, 反应时间为 15 min, 图 2 中显示了结果. 固定化酶的最适 pH 值与游离酶相比, 向碱性方向偏离了约 0.2 个 pH 单位. 这说明固定化载体对微环境造成了影响.

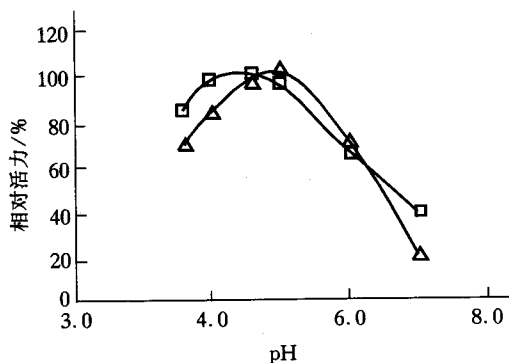


图 2 固定化酶和游离酶的 pH 效应

△—△: 固定化酶; □—□: 游离酶.

2.6 固定化酶的温度效应

测定在不同的温度下固定化酶和游离酶的反应初速度，反应时间为15 min，图3中显示了结果。固定化酶和游离酶的最适温度相近，但是，固定化酶的活性随温度的变化幅度不如游离酶大，即固定化酶对温度的变化不如游离酶敏感。

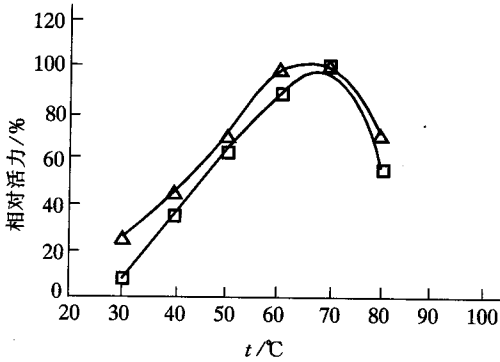


图3 固定化糖化酶和游离糖化酶的温度效应

△—△: 固定化酶; □—□: 游离酶.

2.7 固定化酶的动力学

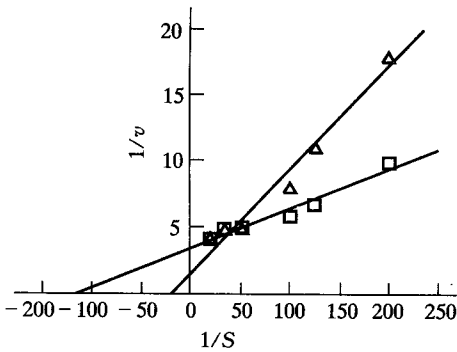


图4 固定化和游离糖化酶的米氏动力学

△—△: 固定化酶; □—□: 游离酶.

图4是固定化酶和游离酶的Lineweaver-Burk双倒数图。图4中的 v 是将不同底物浓度下的反应速度与 $S=2\%$ 时的反应速度（即酶的活力单位）相比较得出的相对值。与游离酶相比，固定化酶的米氏常数增大， $K'_m/K_m=5.8$ 。说明固定化后酶与底物的亲和力降低。造成这种变化的原因，一是固定化改变了酶的构象，影响了酶与底物的结合；二是底物在载

体内的扩散阻滞。

2.8 水解产物分析

图5是2% (w/v)可溶性淀粉溶液经固定化酶水解后产物的HPLC图谱，产物主要为葡萄糖。

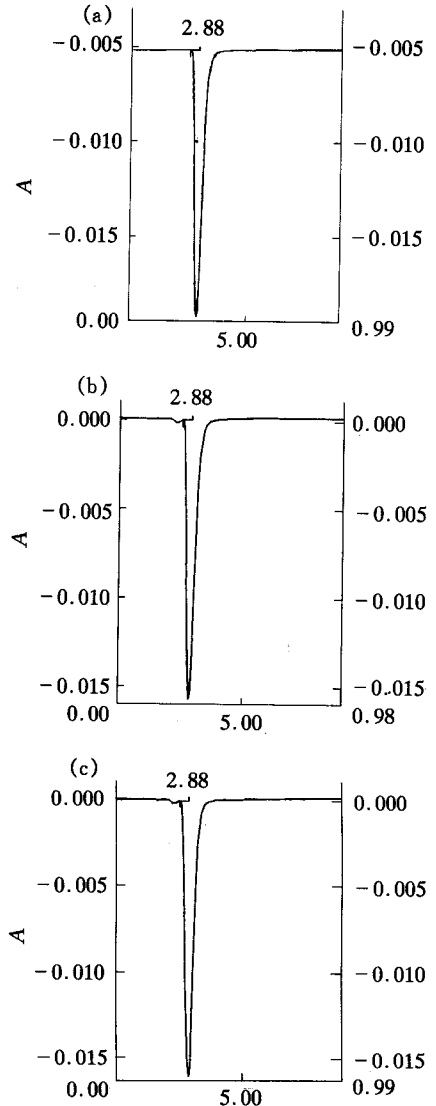


图5 固定化酶水解淀粉产物的HPLC图谱

(a) 葡萄糖标准溶液 (10 g/L); (b), (c) 2% 可溶性淀粉的固定化酶水解液。条件: ODS-C18柱 46 mm×200 mm; 流速 1.0 ml/h; 示差折光检测器。

本实验中制备的多孔醋酸纤维素载体，成本低，易于活化，是一种值得深入研究的固定

化载体。NaIO₄ 氧化固定法, 操作简便、安全, 步骤少, 制成的固定化酶稳定性较好, 但是固定化使酶与底物的亲和力降低。在载体制备工艺和固定化方法方面有待进一步的研究。另外, 固定化对酶催化作用的影响及此技术对其他酶的效果, 也需进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 Katchalski Katzir E. Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol*, 1993, **11** (11): 471~ 478
- 2 Clark D S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity. *Trends Biotechnol*, 1994, **12** (11): 439~ 443
- 3 Lee J M. *Biochemical Engineering*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc, 1992. 54~ 68
- 4 张树政主编. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984. 355~ 356
- 5 陈陶声, 居乃斌, 陈石根等编著. 固定化酶理论与应用. 北京: 轻工业出版社, 1987. 118~ 120
- 6 徐冠珠, 王祯祥, 朱丽钊等. 固定化青霉素酰化酶的研究. *微生物学报*, 1992, **32** (3), 212~ 217
- 7 袁中一, 刘树煌, 汪静英等. 固定化核酸酶 P1 应用于 5'-核苷酸生产. *科学通报*, 1980, (14): 654~ 657
- 8 黎高翔, 张绍恺, 孙万儒等. 水不溶酶的研究 II 对氨基苯磺酸乙基纤维素-葡萄糖淀粉酶的制备. *微生物学报*, 1973, **13** (1): 31~ 37
- 9 郭胜清, 赵华月. 两种 CNBr 活化 Sepharose 固定化胆碱酯酶方法的研究. *生物化学杂志*, 1995, **11** (2): 239~ 242
- 10 徐 俊, 郭 俊, 袁中一. 共价法固定化胰蛋白酶的研. *生物工程学报*, 1993, **9** (1): 69~ 73
- 11 蔡 瑾, 杨歧光, 王顺光等. 虫荧光素酶的固定化及其应用. 见: 何鸣鸿, 刘大陆, 刘德华编. 第五届全国生物化

工学术会议论文集. 北京: 化学工业出版社, 1993. 192 ~ 195

- 12 Hartmeier W. *Immobilized Biocatalysis*. Berlin: Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, 1988. 150~ 153
- 13 陈 尊, 孔 维, 周 慧等. 接枝淀粉载体固定化糖化酶的研究. *生物化学杂志*, 1995, **11** (2): 150~ 153
- 14 王时珍著. 造粒塔与造粒喷头. 北京: 化学工业出版社, 1987. 1~ 5

Study on Porous Cellulose Acetate Beads for Amyloglucosidase Immobilization .

QU Hong-bo, CONG Wei, WEI Xin-gui, CHEN Jian-fei, OUYANG Fan (*State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Porous cellulose acetate beads are formed for enzyme immobilization. The carrier is activated by being oxidized with NaIO₄, after which amyloglucosidase is attached to it. The optimal reaction conditions and the kinetics of the immobilized amyloglucosidase are determined and compared with those of the free enzyme. The activity of the immobilized amyloglucosidase shows no decay after 10 batches of starch hydrolyses, the total reaction time of which is more than 24 h at 55 °C.

Key words porous cellulose acetate beads, amyloglucosidase, immobilization

(上接第 105 页, Continued from page 105)

- 4 Han V K, Matsell D G, Delhanty P J *et al.* IGF-binding protein mRNAs in the human fetus: tissue and cellular distribution of developmental expression. *Horm Res*, 1996, **45** (1): 160~ 166

Progress on the Studies of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins. DU Qing-you, WANG Hu-xin (*Institute of Beijing Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) are a family of soluble proteins that bind the insulin-like growth factors (IGFs) with high affinity. These proteins not merely carry the IGFs and prolong the half-life

of IGFs, but have influences on both the bioactivity and distribution of IGFs in the extracellular environment. Under the different experiment conditions, IGFBPs can either inhibit or augment IGFs actions. In addition, IGFBPs appear to have intrinsic biological activity independent on IGFs. Research on molecular structure, gene expression, post-translational modifications, and bioactivity of IGFBPs were summarized.

Key words IGFBPs, molecular structure, gene expression, post-translational modifications, bioactivity