

表 1 不同百分浓度 NaCl 溶液的渗透浓度值

NaCl%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
渗透浓度* (mosm/kg)	33±1.2	65±1.0	97±1.5	128±1.5	160±1.1	190±1.3	222±0.9	254±0.9	286±1.5	316±1.4

* 为 FM-1 型冰点渗透压计测定数值 ($\bar{X} \pm S. D, n = 5$)

表 2 几种生物体液样品的渗透浓度值

样 品	FM-1 型冰点渗透压计测定数值 (mosm/kg)	国 外 文 献 报 道	
		作 者, 年 份	mosm/kg
血 清 或 血 浆	267—287	Rose, B. D., 1977	275—290
尿液 (8 小时禁水后)	600—1100	Baker, F. J., 1976	700—1500
人 奶	286 (平均值)	Tomarelli R. M., 1976	300 (平均值)
牛 奶	283 (平均值)	(同 上)	288 (平均值)

显示读数,操作程序控制,样品量为 0.2—1 毫升,测量速度 2—3 分/次,重复误差平均小于 1%,测量范围 0—2000 毫渗量/公斤水,读数可至 1 毫渗量/公斤水,在 0—400 毫渗量/公斤水量程内,测量精度为 ± 1.5 毫渗量/公斤水,电源 ~ 220 伏,耗电 80 伏安。上述性能指标均已达到国外同类产品的最新水平。本仪器操作方便易于掌握。

五、样 品 测 试

FM-1 型冰点渗透压计在我院附属华山医院临床

试用了半年多,性能良好,结果稳定,共测定了上千个不同体液样品,现仅将所测部分实验数据介绍在表 1。

从表 1 结果看,NaCl 溶液从 0.1%—1.0%,每差 0.1%其渗透浓度最大为 33mosm/kg,最小为 30mosm/kg,故测量误差约为 ± 1.5 mosm/kg。

表 2 中所列渗透浓度值,均在正常的生理变化范围内,且与国外文献报道数据接近。

【本文于 1978 年 12 月 24 日收到】

电解沉积法制备固定化明胶酶膜

李之浩 王子光 李锦子 谷清晨 贾景元 李慧林

(河南生物研究所)

应用各种载体进行固定化的方法和技术虽然在近十余年中有了巨大的进展^[1,2],然而固定化酶的进一步应用仍然受到制作费用高或固定化酶稳定性差的限制,实际应用的仍然不多。由于需要从细胞中提取纯化,再在惰性载体上制成固定化酶,工艺复杂和成本提高往往成为实际应用时主要障碍。最近出现的采用整个细胞固定化的技术是很值得重视的^[3]。

骨胶或明胶是一种纤维型胶原蛋白,有很好的亲水性。酶包入胶膜后,它的质量传递性能也比较理想^[4]。骨胶已作为十几种酶的固定化载体^[5]。使用胶制作固定化酶的方法很多,有的先作成胶膜,酶通过渗

透进入膜内;也有将酶和胶溶液搅匀、冷却、凝固制成酶胶膜;还有更简便的方法是利用蛋白质的带电性,在外电场的作用下,使它沉积在电极板上制成固定化酶。本文对这种电解沉积法进行了初步的探讨,并对未加处理的带有微生物菌体细胞的发酵液,用电解沉积法一步制成葡萄糖异构酶的固定化酶膜作了介绍。

材 料 和 方 法

菌种 玫瑰红链霉菌 (*Streptomyce* sp.) 336 取自沈阳市食品发酵所。

培养基(%) 麸皮 5,豆饼粉 1.4,玉米面 1.2,

K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.1, $CoCl_2$ 0.01, pH 7.2.

发酵液 摇瓶发酵 60 小时,去麸皮,经 70℃ 热处理 10 分钟,得酶活 120 单位/毫升。

酶粉 用 1.5% 碳酸镁, 1:1.5 酒精沉淀上述发酵液,酶活为 1,200 单位/克。

菌丝体 发酵液经 3,000 转/分,离心 30 分钟,水冲洗两次,湿菌丝体酶活为 440 单位/克。

明胶 含水量 17%, 北京化工厂出品,二级。

戊二醛 含量 25%, 进口分装。

口服葡萄糖 郑州嵩山制药厂出品。

整个试验在 3 厘米×3 厘米×11 厘米的玻璃缸内进行(见图 1)。在含 1% 明胶(重量/体积)和 1% 甲醇(体积/体积)的酶液中调 pH 至 7.5, 拌匀,放入冰箱约 1 小时,注入玻璃缸,插入两块平行的铂金片(2.5 厘米×4 厘米×0.4 毫米),两极间距离为 2.5 厘米,电

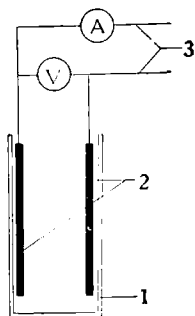


图 1 电解沉积法制明胶固定化酶实验室装置示意

1. 电解槽, 2. 铂金电极, 3. 直流电源
A. 安培计, V. 伏特计

场强度为 40 伏/厘米。在 15℃ 通直流电一、二分钟后,便在正极开始形成乳白色胶膜,通电约 6—8 分钟后取下,放在塑料布上自然干燥。大量制作酶膜时用 $3 \times 5.5 \times 10$ 厘米的玻璃缸,正极换用 7 厘米×5 厘米×0.4 毫米的不锈钢片。

酶活测定: 采用咪唑法。在含 0.1M 硫酸镁的 0.2M 磷酸缓冲液中, 70℃, 1 小时生成 1 毫克果糖的酶量定为一个葡萄糖异构酶单位。

转化率: 该酶催化转化葡萄糖为果糖的百分率。

结果和讨论

1. 曾有人报道电解沉积法制备固定化骨胶膜只能用精制酶粉或粗制酶粉,一般须去除离子后方能在电极板上形成膜。我们用含粗酶粉、离心分离的菌丝体和除热处理外不再加其它处理的发酵液,均能在正极板上形成明胶固定化酶膜。其最高酶活分别为 640 单位/克, 151 单位/克和 616 单位/克(表 1)。

湿菌丝体的包埋的酶活力比发酵液和粗酶粉包埋的酶活力要低。这可能反映了菌丝体包入胶膜后,由于菌丝体含有的主要酶是胞内酶,它的扩散受到阻碍,而其它两个制剂都含相当量的胞外酶,这些酶包埋入胶膜后,受到阻碍较小,表现活力自然较高。

2. 电解沉积液的 pH 对膜的形成有很大的影响。如果 pH 稍偏离 7.5,成膜量就会急剧下降(表 2)。这一点与 Karabe 与 Vieth 等报道的可以在广泛的 pH 范围内成膜的结果不同^[6]。这可能是由于我们所用的明胶的等电点在 pH 7.5 附近,如果偏离等电点,就会使胶分子水份增加,以及电解溶液的电流强度增加

表 1 加入酶量与酶活表现

酶 活	材 料			粗 酶 粉			湿菌丝体			发 酵 液		
	加入酶量(单位)			1820	910	445	1232	616	308	1750	875	437
明胶固定化酶膜酶活表现(单位/克)				640	375	123	不成膜	151	48	616	419	243

表 2 pH 对电解沉积制成的膜重量的影响

pH	电 解 沉 积 次 数						
	6.7	6.9	7.1	7.3	7.5	7.7	8.0
1	0	44	70	133	73	69	0
2		13	83	80	72	56	
3			52	55	61	25	
4			24	68	62		
5				60	52		
6				58	47		
7					34		
合计(毫克)	0	57	230	454	473	230	0

割了水的电解,在正极上产生大量气泡,致使酶胶复合体虽然能在正极附近集聚,但不能在正极上形成完整的胶膜。

3. 电解沉积胶膜形成的极限温度在 20℃ 以下, 0℃ 时胶溶液本身凝固也不能在电极上沉积。因此实验最好在 10℃ 进行(表 3)。

表 3 温度对电解沉积制成的膜重量的影响

温度(℃)	0°	5°	10°	15°	20°	25°
电解沉积次数						
1	0	78	106	76	75	0
2		72	85	77	43	
3		78	55	48	47	
4		52	83	51	60	
5		38	60	64	35	
6		47	58	49	25	
7		53	44	67	48	
8		38	43	39	25	
合计(毫克)	0	456	535	471	310	0

4. 电解沉积固定化酶膜的重复性和稳定性, 我们采用分批式转化(糖液的体积约 100 毫升, 内含 30 克葡萄糖, 固定化酶膜 5 克。转化温度保持 65℃ ± 1, pH7) 每批反应均在三角烧瓶内进行, 不加搅拌, 连续反应 24 小时, 每 24 小时换一批葡萄糖溶液。未加处理的发酵液制备的明胶葡萄糖异构酶膜作用 20 天的结果见图 2。经戊二醛浸泡的明胶固定化酶随浸泡的时间延长而增加了稳定性。这反映了戊二醛能起酶和载体的交联作用^[1], 也能使胶增加其坚韧性^[4]。戊二醛浸泡 3 小时的明胶固相酶转化 6 天后, 酶已全部失活。经戊二醛浸泡 48 小时的固定化酶, 可以保持相当的稳定性。本实验所用之放线菌葡萄糖异构酶和过去报道的一般放线菌葡萄糖异构酶相似, 都需要 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 。当转化时补加入适量的上述两种离子时, 酶的活性可以提高。

由于本法无需处理发酵液而一步制成固定化酶膜, 且电解沉积过程对酶还有一定的提纯作用, 对纯度要求不高的酶制品较为适用。

K. Venkatasubrama 等曾用不锈钢的长 50 厘米、直径 1.5 厘米圆滚筒作为电极, 通电的同时转动滚筒

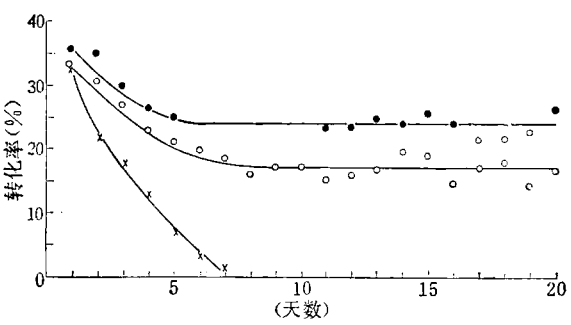


图 2 分批式转化的重复性与稳定性

- ×-× 1% 戊二醛浸泡 3 小时。
- 0.5% 戊二醛浸泡 48 小时。
- 0.5% 戊二醛浸泡 48 小时, 转化时补加 0.05% $MgSO_4$, 0.01 $CoCl_2$ 。

使酶在滚筒上成膜。Wang 和 Vieth^[9] 还建议将上述圆滚筒和槽放大, 并用一块板插在滚筒上, 使滚筒上的胶酶膜不断推出, 以进行连续生产。这些工艺上的改进结合本文报道的直接使用发酵液电解沉积法制备酶膜片, 可简化工序, 也许能为工业应用的固定化酶的生产, 提供新的手段。此外, 这种简便的制作固定化酶膜的方法也可以在制作酶电极或医药等方面, 发现其用途。

主要参考文献

[1] Colowik, S. P. and Kaplan, N. O.: *Methods in Enzymology*, 44, 1976.

[2] 袁中一等: 《固相酶与亲和层析》, 科学出版社, 1975.

[3] Jack, T. R. and Zajic, J. E.: *Advances in Biochemical Engineering*, 5, 125, 1975.

[4] Saini, R. and Vieth W. R.: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 25, 115, 1975.

[5] Bernath, F. R. and Vieth, W. R.: *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*, Plenum Press, 157, 1974.

[6] Constantinides, A. Vieth, W. R. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, 1, 127, 1973.

[7] Richards, F. M. and Knowles, J. R.: *J. Mol. Biol.*, 37, 231, 1968.

[8] Vieth, W. R. et al.: *Biotech. and Bioeng.*, 15, 565, 1973.

[9] Wang, S. S. and Vieth, W. R.: *ibid.*, 15, 93, 1973.

[本文于 1979 年 2 月 15 日收到]

学术动态

美国冷泉港实验室学术空气活跃

这个实验室除每年暑期召开一年一度大型定量生物学会会议外(内容侧重分子遗传学), 还开办许多 20 人左右训练班和若干小型专题学术会议。1979 年 5 月至 9 月初召开了八个专题会议。这些专题是: C. Elegans(一种圆虫, 是研究发育

过程中基因表达的好材料; 细胞骨架、膜和运动; 膜的生物发生; 病毒致癌; 酵母分子生物学; 细菌噬菌体; 疱疹病毒; 自然存在于肿瘤里的病毒。参加这些会议的从 200—500 人不等。