

用吸附-交联法在磁性胶体粒子上固载中性蛋白酶*

邱广明

(内蒙古轻工科学研究所, 呼和浩特 010050)

孙宗华**

(中国科学院成都有机化学研究所, 成都 610015)

提 要

利用吸附-交联法, 在磁性胶体粒子表面固载 AS1.398 中性蛋白酶, 可以制备出活性达 2 500U/g 的磁性固定化中性蛋白酶. 该固定化酶具有较好的耐热性和操作稳定性, 最适作用 pH6.0—6.5, 最适作用温度 60℃. 考察了交联剂量、温度、pH 及酶与载体比例对 AS1.398 中性蛋白酶固定化的影响.

关键词 磁性酶, 固定化酶, 磁性胶体粒子, AS1.398 中性蛋白酶, 固定化

中性蛋白酶是最早用于工业生产的蛋白酶, 可以广泛应用于皮革鞣制、食品加工、酒类澄清及医药工业等^[1-3]. AS1.398 中性蛋白酶是一种来源于枯草杆菌的蛋白水解酶, 稳定性差, 易受激活剂和抑制剂的干扰, 使用很不方便. 用适当的载体固定该酶有利于增加酶的稳定性, 扩大使用范围, 提高酶的利用率, 降低生产成本^[4], 带来广阔的工业应用前景. 磁性聚乙二醇胶体粒子不仅具有强的磁响应性, 而且表面具有两亲性, 所以利用该粒子固载中性蛋白酶, 不仅可以使酶均匀地分散于有机或水介质中充分发挥催化作用, 还可以借助外部磁场方便地回收酶, 有利于重复使用.

1 材料与方法

1.1 材料

FeCl₂·4H₂O, 分析纯; 聚乙二醇(分子量 4 000), 上海合成洗涤剂二厂; 过氧化氢, 分析纯; AS1.398 中性蛋白酶 (30 000U/g), 泸州酶制剂厂; 戊二醛 (25%), E. Merck 公司进口, 上海试剂厂分装; 其他试剂均为生化试剂或分析试剂.

1.2 磁性胶体粒子的制备和纯化

以聚乙二醇为分散剂和稳定剂, 水为分散介质, 在碱性条件下, 用过氧化氢氧化亚铁盐可以得到磁性胶体粒子的悬浮液, 即磁流体^[5]. 在外部磁场中, 磁性胶体粒子被分离出来, 用

重蒸水洗涤数次, 然后用 0.1mol/L, pH8.5 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 平衡过夜, 磁分离后真空冻干.

1.3 AS1.398 中性蛋白酶的纯化

用阴离子交换树脂除去粗 AS1.398 中性蛋白酶中蛋白杂质, 然后浓缩、冻干. 活性可达 300 000U/g.

1.4 中性蛋白酶的固定化

称取 0.25g 经过纯化及预处理的磁性胶体粒子, 加入适量中性蛋白酶溶液 (12mg/ml, 用 0.1mol/L, pH8.5 的 PBS 配制), 室温搅拌 20h, 滴加 2.5% 戊二醛溶液至所需浓度, 室温搅拌 10h. 混合液在磁场 (0.05Wb/m²) 中被分离, 然后分别用重蒸水和 PBS (0.1mol/L, pH8.5) 充分洗涤直至无酶蛋白被洗出, 真空冻干得到磁性固定化酶, 即磁性酶.

1.5 酶活性测定

可溶性中性蛋白酶活性测定按文献 [6] 进行, 底物为 2% 酪蛋白, PBS (0.1mol/L, pH8.5), 40℃ 恒温振荡 (100r/min) 10min, 721 型分光光度计在 680nm 测定 A 值. 以磁性酶代替可溶性酶, 采用同样的测定方法测定磁性酶的活性.

* 本研究属于国家自然科学基金资助项目.

** 通讯联系人.

收稿日期: 1992-06-13 修回日期: 1992-11-03

每毫升可溶性中性蛋白酶(自由酶)溶液,每分钟水解酪蛋白产生的酪氨酸微克数,用于表示自由酶活性,单位是 $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$,即 U/ml.

每克磁性酶,每分钟水解酪蛋白产生的酪氨酸微克数,用于表示磁性酶活性,单位是 $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,即 U/g.

酶的固定化率

$$= \frac{\text{加入酶总活力} - \text{上清酶总活力}}{\text{加入酶总活力}} \times 100\%$$

1.6 分析测试

用日本 JEM-100X 透射电镜拍摄磁性胶体粒子形态,并计算其平均粒径.

2 结果与讨论

2.1 磁性胶体粒子

在本研究中,用作固定化酶载体的磁性胶体粒子按照文献[5]制备.该粒子内部为磁性氧化铁,外围缠绕聚乙二醇,表面具有两亲性,所以不仅可分散于水溶液中,也可分散于有机溶剂中.电镜照片表明,磁性胶体粒子粒径小(约 250nm),表面为多孔结构(见图 1).

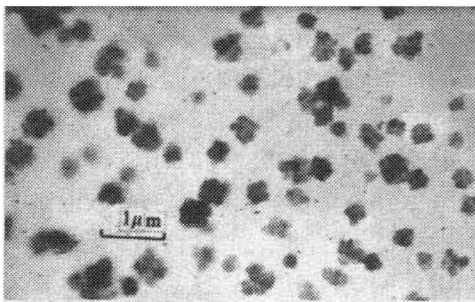


图 1 磁性胶体粒子的透射电镜照片

该粒子比表面积大,对蛋白等吸附容量大,有利于提高磁性固定化酶的活性.磁性胶体粒子磁响应性强,在磁场中易于分离,这对于固定化酶的回收和重复使用极为重要.

2.2 中性蛋白酶的固定化

将磁性胶体粒子分散于中性蛋白酶的磷酸盐缓冲液中,长时间搅拌,使粒子表面较大程度地吸附中性蛋白酶,再加入适量戊二醛交联中性蛋白酶,以避免吸附于粒子表面的中性蛋

白酶脱落,这有利于磁性酶的重复使用.采用该法可以制备出活性很高的磁性固定化中性蛋白酶(2500U/g).实验表明,固定化条件对磁性固定化酶活性有很大影响.

2.2.1 戊二醛浓度的影响

戊二醛既是交联剂,也是酶的强烈变性剂,戊二醛用量增大,酶的固定化率增大,但酶的变性作用也增强.表 1 说明,戊二醛浓度为 0.1% 时,磁性固定化中性蛋白酶活性最高.

表 1 戊二醛浓度对酶固定化的影响

戊二醛浓度/%	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30
酶固定化率/%	43.4	61.5	86.7	97	98.2
磁性酶活性/(U/g)	162	225	769	146	63

2.2.2 pH 的影响

随着固定化过程缓冲液 pH 值的增大,中性蛋白酶(等电点 pH8.95)在磁性胶体粒子上吸附容量增大,固定化酶活性增大;但是 pH 增大,戊二醛对酶的变性作用增强.上述两种相反影响作用的结果将使制备固定化酶时缓冲液 pH 值存在一个最佳范围,实验结果见表 2.

表 2 缓冲液 pH 对固定化过程的影响

pH	5.0	6.5	7.5	8.5
酶固定化率/%	88.5	95.2	96.4	97.0
磁性酶活性/(U/g)	2223	2500	1924	760

2.2.3 温度的影响

与小分子吸附行为相反,温度升高,酶蛋白分子在磁性胶体粒子表面的吸附将增加(图 2).

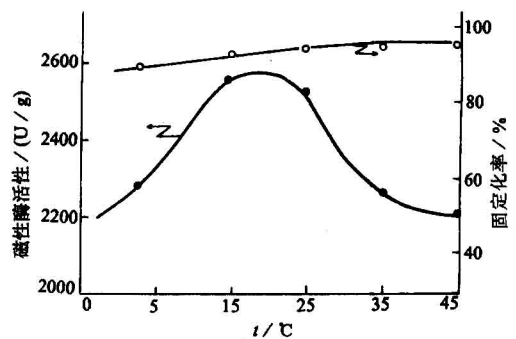


图 2 温度对固定化的影响

○—○: 固定化率, ·-·: 磁性酶活性

此外,温度升高,戊二醛的交联作用增强,

因而磁性酶活性增大. 但是温度过高, 戊二醛对酶的变性作用加剧, 结果磁性酶活性反而下降. 从图 2 中可见, 在其他条件不变时, 15—25℃ 范围内制备的磁性固定化中性蛋白酶活性最高.

2.2.4 酶与载体比例的影响

恒定其他条件, 量取 10ml 酶液 (6748.8 U/ml), 改变磁性胶体粒子用量 (0.25—2.5g), 制备磁性固定化酶, 测定磁性酶活性和中性蛋白酶的固定化率.

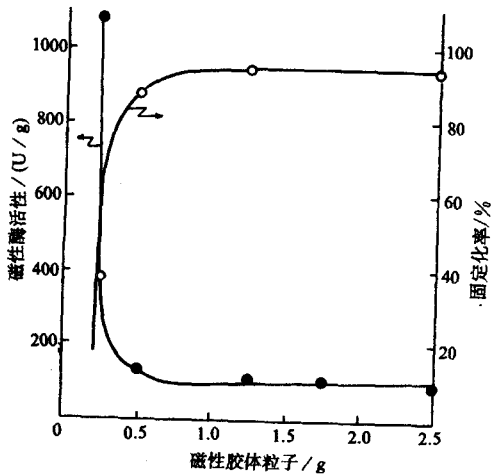


图 3 酶与载体比例对固定化的影响

○—○: 固定化率, ●—●: 磁性酶活性

图 3 表明, 载体用量增加, 酶的吸附增加, 固定化率增加, 但单位重量的固定化酶活性减少. 当载体用量超过 0.5g 后, 酶的固定化率的增加和固定化酶活性的减少均趋于平缓.

2.3 磁性固定化中性蛋白酶的催化性质

游离的可溶性中性蛋白酶被磁性载体粒子固定化, 可能导致酶的构象及酶附近的微环境发生变化, 也可能产生扩散效应等, 因而磁性固定化酶的动力学性质将有别于游离酶.

2.3.1 磁性化中性蛋白酶的最适作用温度

控制其他条件不变, 在 30—70℃ 范围内, 每隔 10℃ 恒温振荡 10min, 分别测定磁性酶和游离酶的活性, 并对温度作图.

图 4 表明, 磁性酶最适作用温度 60℃, 比

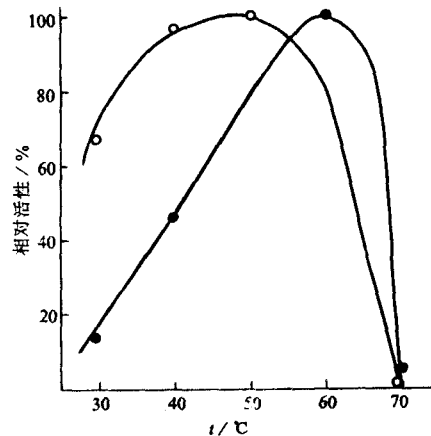


图 4 最适作用温度曲线

○—○: 自由酶, ●—●: 磁性酶

游离酶的最适作用温度 (50℃) 高 10℃. 这可能是由于载体与酶之间的氢键、范氏作用力以及戊二醛的交联稳定了酶分子的构象, 因而临界变性温度升高. 从图 4 可以发现, 磁性酶的活性-温度曲线比固定化前窄, 这可能意味着磁性酶的活化能和失活能均比固定化前大.

2.3.2 磁性化中性蛋白酶的最适作用 pH

称取一定量磁性酶 (10mg), 改变 PBS 的 pH (5.0—8.5) 以 2% 酪蛋白为底物, 40℃ 恒温振荡 10min, 测定磁性酶活性. 可溶性自由酶活性采用同样条件测定.

图 5 表明, 磁性酶最适作用 pH 6.0—6.5, 比固定化前 (pH 7.5) 低 1.0—1.5 个单位. 此

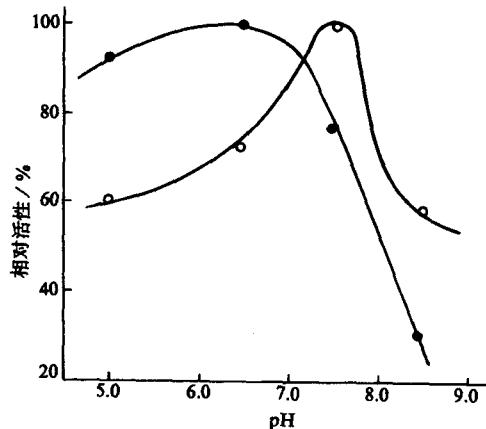


图 5 最适作用 pH 曲线

○—○: 自由酶, ●—●: 磁性酶

外,磁性酶的活性-pH曲线比固定化前宽,即磁性酶起作用的pH范围变宽.固定化过程有可能改变酶蛋白的构象及电子状态,载体的性质(如表面电荷)也对磁性酶的微环境有一定影响,这些因素将会改变磁性固定化酶起作用的pH范围.

2.3.3 磁性化中性蛋白酶的活化能

图6是磁性酶和可溶性自由酶的 $\lg v - 1/T$ 曲线图(即Arrhenius图形).其中曲线1的AB,BC段和曲线2的AB段分别反映可溶性自由酶和磁性固定化酶的高温失活过程,可以发现自由酶失活的临界温度比磁性酶低,在高温情况下,对温度变化比磁性酶敏感.图6中

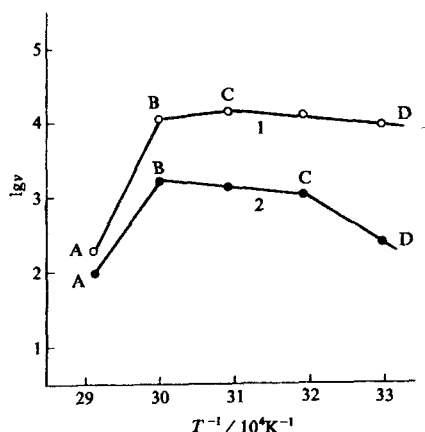


图6 磁性酶和自由酶的Arrhenius图形
 ○—○: 自由酶, ●—●: 磁性酶

曲线1的CD段和曲线2的BC,CD段分别反映自由酶和磁性酶的催化过程.比较自由酶和磁性酶催化过程的Arrhenius图形,可以肯定磁性酶的催化过程存在内扩散控制(BC段)和动力学控制(CD段)两种情况.在本研究中,作为载体的磁性胶体粒子表面为多孔结构,所以磁性酶催化过程的内扩散影响将无法避免.实验表明,磁性酶的素质活化能(116.25 kJ/mol)比自由酶的素质活化能(23.40 kJ/mol)大得多,因而可以认为,在本研究中,固定化过程及载体性质对磁性酶的动力学性质有很大影响.

2.3.4 磁性化中性蛋白酶的操作稳定性

表3 磁性酶的使用次数对其稳定性的影响

磁性酶使用次数	磁性酶活性/(U/g)	活性保持/%
0	2527.64	100
1	2328.09	92.11
2	2062.02	81.58
3	2012.13	79.61
4	1862.47	73.68

表3反映了磁性酶多次重复使用后的活性保持情况.磁分离在0.05 Wb/m²磁场下进行.由于磁性胶体粒子不很均匀,一部分粒径很小的磁性胶体粒子在磁分离时将被损失掉,如果扣除这部分损失,磁性酶重复使用后的酶活保持率将会很高.

结 语

磁性胶体粒子磁响应性强,比表面积大,表面具有两亲性,是固载酶的理想载体.采用吸附-交联法可以制备出活性很高(2500 U/g)的磁性固定化中性蛋白酶.该磁性固定化酶的耐热性和操作稳定性均有明显改善,易于分散于各类介质中充分发挥酶效,在磁场中也易分离,可以重复使用.戊二醛、温度、pH对酶的固定化有很大影响.磁性酶最适作用温度60℃,最适作用pH6.0—6.5.

中科院成都生物研究所的蒙义文、莫卫平、陈素文等不仅慷慨地提供了AS1.398中性蛋白酶,而且对酶活测定工作给予了热情帮助.作者对此表示感谢.

参 考 文 献

- 1 Fogart W M, Griffin P J, Joyce A M. Enzymes of bacillus species. *Process Biochem.* 1974;9(7):27
- 2 Laishely E J, Bernlohr R W. Regulation of arginine and proline catabolism in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 1968;96(2):322
- 3 Keay L, In: Gyozo T ed, *Ferment technology today*, Japan: Society of Fermentation Technology, 1972:289
- 4 Sstanley W L, Watters G G, Chan B J *et al.* Lactase and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975;17(3):315
- 5 邱广明,孙宗华.磁性聚苯乙烯微球的合成和特性.化学试剂,1993,印刷中
- 6 朱俭,曹凯鸣,周润琦等.生物化学实验.上海:上海科学技术出版社,1981:186—190