

研究报告

尖吻蝮蛇毒碱性磷脂酶 A₂ 的表达及其生化特征*刘小龙 钟晓燕 吴祥甫 周元聪¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 将尖吻蝮蛇毒碱性磷脂酶 A₂ (*A. aBPLA*₂) 基因克隆至温敏表达载体 pBLMV2, 在大肠杆菌 RR1 中成功诱导表达. 表达产物 *A. aBPLA*₂ 约占细菌蛋白质总量的 20%, 并以包涵体的形式存在. 纯化包涵体后, 将产物变性、复性, 然后用 FPLC SuperoseTM 12 纯化, 产物经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测只有单一条带. 对纯化后的表达 *A. aBPLA*₂ 进行了酶活性、抑制血小板聚集活性和溶血活性的测定. 结果显示, 表达 *A. aBPLA*₂ 的酶活性与变性后复性江浙蝮蛇酸性磷脂酶 A₂ 酶活性相近, 具有类似变性后复性江浙蝮蛇碱性磷脂酶 A₂ 的溶血活性, 没有抑制血小板聚集活性. 最后对磷脂酶 A₂ 的结构与这些活性的关系进行了讨论.

关键词 尖吻蝮蛇碱性磷脂酶 A₂, 表达, 活性测定, 结构, 功能

学科分类号 Q556, Q545

磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂, EC 3.1.1.4) 能酶促水解甘油磷脂的第二位酯酰键, 生成溶血磷脂和脂肪酸^[1]. 到目前为止发现, 几乎在所有的毒蛇毒液中都含有 PLA₂. 蛇毒 PLA₂ 除具有酶活性外, 还有很多的生理及药理学功能, 如作为神经毒素^[2]、肌肉毒素^[3]和心脏毒素^[4], 并有降血压、引起惊厥以及抑制血小板聚集、溶血、抗凝^[5]和诱导形成水肿^[6]等多方面的作用. 我们实验室从江浙蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 毒液中曾分离到三种 PLA₂^[7], 按其等电点不同分为酸性 (pI 4.5)、中性 (pI 6.9) 和碱性 (pI 9.3) 三种 PLA₂, 酸性 PLA₂ (APLA₂) 能抑制血小板聚集, 碱性 PLA₂ (BPLA₂) 具有溶血活性, 中性 PLA₂ (NPLA₂) 是突触前神经毒素. 最近我们又从尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon autus*) 毒腺的总 RNA 中克隆到四个 PLA₂ 基因^[8], 依据基因推导出的氨基酸序列, 运用 Protein Analysis 软件, 计算出它们的等电点, 依据等电点将它们命名为尖吻蝮蛇毒酸性磷脂酶 A₂ I (*A. aAPLA*₂ I)、尖吻蝮蛇毒酸性磷脂酶 A₂ II (*A. aAPLA*₂ II)、尖吻蝮蛇碱性磷脂酶 A₂ (*A. aBPLA*₂) 和尖吻蝮蛇 Lys⁴⁹-磷脂酶 A₂ (*A. aLys*⁴⁹-PLA₂). 其中 *A. aBPLA*₂ 基因推导的氨基酸序列与江浙蝮蛇的 BPLA₂ 的同源性较高. 本文对 *A. aBPLA*₂ 基因进行了表达和对表达产物进行了酶活性和药理活性的

测定, 并针对 PLA₂ 的结构与这些活性的关系进行了讨论.

1 材料和方法

1.1 材料

宿主菌 *E. coli* RR1 和载体 pBLMV2 为本室保存, 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, Taq 高保真酶为 GIBCO BRL 公司产品, Triton X-100, 卵磷脂为 Sigma 公司产品, 二硫苏糖醇 (DTT) 为 Serva 公司产品, FPLC 仪、SuperoseTM 12 柱为 Pharmacia 公司产品, ADP 为东风公司产品, 实验用人血为健康自愿者捐助, 其他均为国产试剂.

1.2 重组克隆和 DNA 酶解分析

细菌培养、质粒抽提制备、限制性内切酶解反应、PCR2、琼脂糖电泳、DNA 片段的回收、T4 DNA 连接酶反应、大肠杆菌转化等均按照文献 [9] 方法进行.

1.3 *A. aBPLA*₂ 基因表达、纯化和复性

依照文献 [10, 11] 的方法, 将重组表达质粒转化大肠杆菌 RR1, 成功对 *A. aBPLA*₂ 基因进行了表达. 表达产物以包涵体的形式存在, 包涵体的纯化依照 Michael 的方法^[12]略作修改进行. 表达

* 中国科学院重大项目资金资助.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (021) 64374430-273, E-mail: zhouyc@sunm.shenc.ac.cn

收稿日期: 1999-03-15, 修回日期: 1999-08-24

产物的变性和复性依照 Thomas 的方法^[13] 略作修改进行. 最后将复性后的表达产物经过 FPLC SuperoseTM 12 柱纯化, 得到单一条带的产物.

1.4 *A. aBPLA₂* 酶活性测定

底物的配制采用 Kawashiri 等的方法^[14] 并略加改进. 测活时取 6 ml 新鲜配制的底物, 搅拌, 加入 PLA₂ 同时计时, 用 0.02 mol/L KOH 中和水解产生的脂肪酸, 维持 pH 在 8.20, 根据每毫克 PLA₂ 消耗 KOH 的速度求出 PLA₂ 的活力.

1.5 抑制血小板聚集活性的测定

依照文献 [10] 的方法对 PLA₂ 的抑制血小板聚集活性进行测定.

1.6 溶血活性的测定

除去富血小板血浆后, 用生理盐水洗涤红细胞, 离心仅留红细胞. 称取 50 mg 卵磷脂悬浮在 50 ml 含 10 mmol/L Ca²⁺, 0.9% NaCl, pH 7.2 的 10 mmol/L Tris·HCl 缓冲液中, 超声处理 30 min 使其乳化, 加红细胞达 5% (体积百分比), 混匀. 测活时每次取 1 ml 溶液, 加不同浓度的酶, 37℃ 保温 15 min, 4 000 g 离心 5 min, 取上清液测 A₅₄₀ 以计算溶血情况.

2 结 果

2.1 *A. aBPLA₂* 的表达、纯化和复性

pBLMV2 载体是一个温敏表达载体, 成功地用来表达多种外源基因. 利用这一系统, 已成功地表达了江浙蝮蛇 APLA₂ 基因. 为了基因表达的方便, 在 *A. aBPLA₂* 成熟肽基因前面利用 PCR 方法加上一个翻译起始码 ATG, 然后利用 *EcoRI* 和 *Sam I* 位点将 *A. aBPLA₂* 克隆至表达质粒 pBLMV2 中得到 pPLA·*aBPLA₂* 质粒, 将此质粒转化至大肠杆菌 RR1, 在 32℃ 时不表达 *A. aBPLA₂* 基因, 经过 42℃ 温敏诱导, 得到 *A. aBPLA₂* 基因高效表达产物, 约占细菌蛋白质总量的 20%.

依照文献 [9] 方法, 检测出表达产物

A. aBPLA₂ 以包涵体形式存在. 为了纯化出包涵体, 表达菌用溶菌酶作用后, 在液氮和 37℃ 之间反复冻融 4 次裂解细菌, 用 DNase I 和 RNase A 消化细菌裂解释放出的 DNA 和 RNA, 然后离心得到沉淀, 沉淀经过二次洗涤, 大部分的杂蛋白被清洗掉, 最后沉淀中基本上是包涵体 (图 1). 用 8 mol/L 的盐酸胍 (Gu. HCl) 和 10 mmol/L 的 DTT 溶解包涵体过夜, 离心沉淀取上清, 然后透析掉 DTT. 在含有半胱氨酸和胱氨酸的氧化还原缓冲液中重折叠. 重折叠约 20 h 时, 酶活性最高, 最后用 FPLC SuperoseTM 12 柱子纯化复性产物, 收集活性峰的峰尖部分, 得到单一条带. 透析, 冻干.

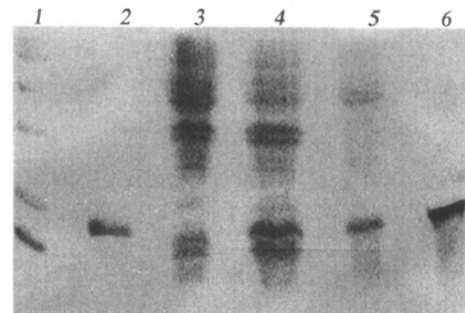


图 1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1: 分子质量标准 (97.4, 66.2, 43, 31, 20.1, 14.4 ku);
2: 天然 APLA₂; 3: 未诱导细菌总蛋白; 4: 温敏诱导表达细菌总蛋白; 5: 部分纯化包涵体; 6: 经纯化后的重组 *A. aBPLA₂*.

2.2 *A. aBPLA₂* 酶活性的测定

为了更好地比较表达的 *A. aBPLA₂* 酶活性和药理学活性, 取一些天然的江浙蝮蛇 APLA₂ 和 BPLA₂ 采用同表达产物包涵体的变复性相同的条件, 也经过变性后复性处理. 在同样条件下测定天然江浙蝮蛇酸性 PLA₂ 变复性产物、碱性 PLA₂ 变复性产物和表达 *A. aBPLA₂* 各自的酶活力, 结果见表 1. 表达的 *A. aBPLA₂* 的酶活力与变复性的江浙蝮蛇 BPLA₂ 差别较大, 与江浙蝮蛇 APLA₂ 反而较接近.

表 1 PLA₂ 的酶活力测定结果

	APLA ₂ 变-复性产物	BPLA ₂ 变-复性产物	表达的 <i>A. aBPLA₂</i>
酶活力/mmole·L ⁻¹ ·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	4.56 × 10 ⁻³	1.69 × 10 ⁻³	4.12 × 10 ⁻³

2.3 *A. aBPLA₂* 抑制血小板聚集活性的测定

江浙蝮蛇 APLA₂ 除了能够酶促水解底物卵磷

脂释放溶血磷脂和脂肪酸以外, 还能对多种致聚剂引起的血小板聚集具有抑制作用. 而江浙蝮蛇

BPLA₂ 却没有抑制血小板聚集的活性. 虽然 A . αBPLA₂ 和 APLA₂ 的酶活性接近, 但研究结果表明即使 A . αBPLA₂ 的浓度达 800 mg/L 也没有抑制血小板聚集的活性, 在此条件下变复性的 APLA₂ 可以 100% 抑制血小板的聚集.

2.4 A . αBPLA₂ 溶血活性的测定

从江浙蝮蛇毒液中分离到具有溶血活性的碱性 PLA₂ (BPLA₂) 和中性 PLA₂ (NPLA₂), BPLA₂ 的溶血活性最高, NPLA₂ 次之, APLA₂ 基本没有溶血活性. 为了测试比较 A . αBPLA₂ 的溶血活性, 在测定这一活性时, 选用江浙蝮蛇 BPLA₂ 全溶血时为 100% 溶血, 其他各种 PLA₂ 在不同浓度下测定的 A₅₄₀ 与全溶血时的 A₅₄₀ 比值为溶血百分比, 然后以 PLA₂ 的浓度为横坐标, 溶血百分比为纵坐标, 便得到溶血曲线 (图 2). 从中可以看出, A . αBPLA₂ 具有较强的溶血活性, 在低浓度时, A . αBPLA₂ 甚至比江浙蝮蛇 BPLA₂ 的溶血活力更强.

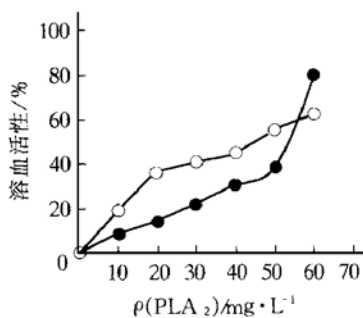


图 2 PLA₂ 的溶血活性

●—●: BPLA₂; ○—○: A . αBPLA₂.

1 10 20 30 40 50 60 70

1. SLLQFRKMIKKMTG-LEPVVSYAFYGCYCGSGGRGLPKDATDRCCFVHDCCYEKLT - - G - C - - - -DPKW

2. SLINFETLMKVVK-KSGMFWYSAYGCKCGWGGHGRPNATDRCCFVHDCCYQKLT - - V - C - - - -DSKK

3. SLIQFETLMKVAK-KSGMFWYSNYGCYCGWGGQGRPQDATDRCCFVHDCCYGVKVT - - G - C - - - -DPKM

4. ALWQFNGMIKCKIPSSPEPLLDNFNYGCYCGLGSGTTPVDDLDRCCQTHDNCYKQAKKLDSCVKLVDPNPYT

80 90 100 110 120 130

1. DDYTYSWKNGTIVCGG-DDPCKKEVCECDKAAAICFRDNLKTYKKRYMTYPNIL - CSSK - SEKC

2. DRYAYKWKNAIVCEK-NQPCMNEMCECDKAFAICLKKNLDTYNKSFYHCLKPS - CKKT - SEQC

3. DVYSFSEENGDIVCGG-DDPCKKEICECDRAAAICFRDNLNTYNDKKYWAFGAKNCPQEESEPC

4. NNYSYSCSNNEITCSSENNACEAFICNCDRNAAICFSKV - P - YNK - EHKNLDKKNC

图 3 PLA₂ 的氨基酸序列

1: BPLA₂; 2: A . αBPLA₂; 3: APLA₂; 4: 牛胰 PLA₂. 氨基酸残基序列按照通用的 Renetseder 等提出的规则排列.

目前认为 25 位以前的序列包含酶与底物结合的有关残基, 25~ 52 位氨基酸残基包括 Ca²⁺ 结合环和催化位点 His48, 而 52 位以后的氨基酸残基

3 讨 论

PLA₂ 的酶活性与质子传递系统、Ca²⁺ 结合环及疏水通道等有关. 其中质子传递系统由 His48、Asp99、Tyr52 和 Tyr73 等氨基酸组成; Ca²⁺ 结合环由 25~ 35 位氨基酸组成; 疏水通道由保守的疏水性残基 Leu2、Phe5、Met8、Ile9、Tyr22、Cys29、Cys45、Tyr52、Ala102、Ala103 和 Phe106 等组成. 从图 3 的氨基酸序列中可以看出, 江浙蝮蛇 APLA₂、BPLA₂ 和 A . αBPLA₂ 的上述三个因素基本相同 (只有个别氨基酸残基不一致), 但是当以卵磷脂为底物时, 酶活性还是差别较大, APLA₂ 和 A . αBPLA₂ 的酶活力接近, 都大于 BPLA₂. 对江浙蝮蛇 BPLA₂ 晶体结构以及 BAPLA₂ II 结构与功能的关系研究显示^[15], PLA₂ 的酶活性不但与上述三个因素有关, 还和 PLA₂ N 端 α 螺旋的带电荷性残基有关, 这些残基处于分子的表面, 暴露在溶剂中, 位于疏水通道的旁边; 当底物卵磷脂形成团粒时, 其带电荷的基团也是暴露在溶剂中, PLA₂ N 端 α 螺旋的带电荷性残基会影响其与底物的识别和接近速度, 从而影响 PLA₂ 酶活力的大小. APLA₂ 和 A . αBPLA₂ 的 N 端 1~ 13 带电荷位残基相同, 见图 3, 都有一个正电荷和一个负电荷 (Lys11 和 Glu6); BPLA₂ 有四个带正电荷的残基 (Arg6、Lys7、Lys10 和 Lys11), 这可能是造成酶活性差别较大的原因. A . αBPLA₂ 酶活性的测定结果说明了我们以前关于酶活性和 PLA₂ N 端 α 螺旋的带电荷性残基有关的观点.

与 PLA₂ 的多种药理活性有关. 一般来说, 具有溶血活性的 PLA₂ 大多是碱性蛋白质, 化学修饰江浙蝮蛇 BPLA₂^[16] 以及晶体结构^[17] 的研究表明,

PLA₂ 的碱性残基与溶血活性相关. 从江浙蝮蛇毒腺中分离得到的三种 PLA₂ 中只有 BPLA₂ 具有较强的溶血活性, APLA₂ 基本没有溶血活性. 表达得到的尖吻蝮蛇 A . aBPLA₂ 也有较强的溶血活性. 从一级结构序列中可以看出, BPLA₂、A . aBPLA₂ 及 APLA₂ 带正电荷的残基差别主要在 C 端, 这些都提示 C 端带正电荷的残基可能是造成溶血活性差异的原因.

另外, 在江浙蝮蛇 APLA₂ 晶体结构^[18] 和 BAPLA₂ II 结构与功能的研究中发现, 酸性残基 Glu6 和 Asp115 可能与抑制血小板聚集活性有关, 后来我们对 APLA₂ 进行定点突变, 结果表明只要突变 Glu6 和 Asp115 任何一个残基, 其抑制血小板聚集活性都基本消失 (结果待发表), 这些结果说明 Glu6 和 Asp115 在抑制血小板聚集活性中起到重要作用. 尽管从尖吻蝮蛇中表达得到的 A . aBPLA₂ 在酶活性上同江浙蝮蛇 APLA₂ 有相似性, 但是没有 Asp115, 抑制血小板聚集活性的测定结果也表明 A . aBPLA₂ 没有这一活性, 这说明 Asp115 在抑制血小板聚集活性中的重要作用.

参 考 文 献

- Dennis E A. Phospholipases. In: Boyer P ed. The Enzyme, **16**. New York: Academic Press, 1983. 307~ 353
- Bouchier C, Boulain J C, Bon C, et al. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic nonenzymatic subunit derives from a phospholipase A₂ like precursor. Biochim Biophys Acta, 1991, **1088** (3): 401~ 408
- Diz C, Cutierrez J M, Lomonte B, et al. The effect of myotoxins isolated from Bothrops snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant myotoxic activities. Biochim Biophys Acta, 1991, **1070** (2): 455~ 460
- Chiou S H, Raynor R L, Zheng B, et al. Cobra venom cardiotoxin (cytotoxin) isoforms and neurotoxin: comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and wodes of enzyme inhibition. Biochemistry, 1993, **32** (8): 2062~ 2067
- Babu A S, Gowda T V. Effects of chemical modification on enzymatic and toxicological properties of phospholipases A₂ from Naja najana and Vipera russaei snake venoms. Toxicon, 1991, **29** (10): 1251~ 1262
- Liu C S, Chen J M, Chen S W, et al. Light absorption, electron paramagnetic resonance and resonance Raman characteristics of nitrodochromium (v) protoporphyrin IX and its reconstituted hemoproteins. Biochim Biophys Acta, 1991, **1077** (3): 392~ 399
- Chen Y C, Maraganore J M, Reardon R L, et al. Characterization of the structure and function of three phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas. Toxicon, 1987, **25** (4): 401~ 406
- 刘小龙, 潘 华, 杨冠珍, 等. 尖吻蝮蛇毒磷脂酶 A₂ 基因的克隆与序列分析. 生物化学与生物物理学报, 1999, **31** (1): 41~ 45
- Liu X L, Pan H, Yang G Z, et al. Acta Biochim Biophys Sin, 1999, **31** (1): 41~ 45
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- 刘小龙, 潘 华, 杨冠珍, 等. 江浙蝮蛇毒酸性磷脂酶 A₂ 基因的表达. 生物化学与生物物理学报, 1998, **30** (4): 397~ 401
- Liu X L, Pan H, Yang G Z, et al. Acta Biochim Biophys Sin, 1998, **30** (4): 397~ 401
- 李伯良, 江智红. cIts857 基因的克隆、修饰及温敏诱导表达载体. 生物化学与生物物理学报, 1994, **26** (4): 389~ 395
- Li B L, Jiang Z H. Acta Biochim Biophys Sin, 1994, **26** (4): 389~ 395
- Michael J K, Robert M C, Edwaard A D, et al. Renaturation of cobra venom phospholipase A₂ expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1992, **1118** (1): 107~ 115
- Thomas D, Chen W Q, Wang S S, et al. High level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A₂. Biochim Biophys Acta, 1992, **1165** (2): 201~ 210
- Kawauchi S, Iwanaga S. Isolation and characterization of two phospholipase A's from the *Agkistrodon halys blomhoffii*. Biochim Biophys Acta, 1971, **236** (1): 142~ 160
- Liu X L, Pan H, Yang G Z, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of A basic acidic hybrid phospholipase A₂ II from *Agkistrodon halys* Pallas. Biochim Biophys Acta, 1999, **1431** (1): 157~ 165
- 冯 波, 张丽华, 徐来根, 等. 江浙蝮蛇毒碱性磷脂酶 A₂ 结构与功能的研究. 中国毒素研究, 1995, **3** (1): 24~ 26
- Feng B, Zhang L H, Xu L G, et al. Chinese Toxinology Research, 1995, **3** (1): 24~ 26
- Zhao K H, Song S Y, Lin Z J, et al. Structure of a basic phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys* Pallas at 2.13 Å resolution. Acta Cryst D, 1998, **54**: 510~ 521
- Wang X Q, Yang J, Lin Z J, et al. Crystal structure of an acidic phospholipase A₂ from the Venom of *Agkistrodon halys* Pallas at 2.0 Å resolution. J Mol Biol, 1996, **255** (5): 669~ 676

Expression and Biochemical Characterization of A Basic Phospholipase A₂ from *Agkistrodon acutus*.
LIU Xiao-Long, ZHONG Xiao-Yan, WU Xiang-Fu, ZHOU Yuan-Cong (Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract A cDNA encoding a basic phospholipase A₂ (A . aBPLA₂) from *Agkistrodon acutus* was inserted into a bacterial expression vector pBLMVL2 and effectively expressed in *E. coli* RR1. The protein was produced as insoluble inclusion bodies. After partial purification by washing the inclusion bodies with Triton X-100, denaturing and refolding, the renatured recombinant protein was purified by FPLC column superoseTM 12. The enzymatic activity of the

expressed *A. aBPLA₂* is close to those of denatured-refolded native acidic phospholipase *A₂* from *Agkistrodon halys* Pallas, *A. aBPLA₂* has the same hemolytic activity as denatured-refolded basic phospholipase *A₂* from *Agkistrodon halys* Pallas, but its inhibiting effect on platelet aggregation is negligible.

The roles of various amino acid residues in the enzymatic activity and pharmacological activities of phospholipase *A₂* are discussed.

Key words *A. aBPLA₂*, expression, activities assay, structure, function

壳聚糖固定化半纤维素酶的研究*

朱启忠

(菏泽师范专科学校生物系, 菏泽 274015)

摘要 从青霉菌 m8 提取出半纤维素酶, 将其固定在用戊二醛交联的壳聚糖载体上. 0.5 g 壳聚糖与 4% 的戊二醛结合固定 2.5 mg 蛋白质, 酶活回收率为 45.6%. 原酶的最适 pH 为 4.6, 固定化酶为 pH 3.6. 原酶的最适温度为 55 °C, 固定化酶在 60~75 °C 都具有较高活性. 固定化酶的耐热性优于原酶. 以半纤维素为底物, 固定化酶的表现 K_m 值略低于原酶, 前者为 5.0×10^{-2} g/L, 后者为 3.58×10^{-2} g/L.

关键词 壳聚糖, 半纤维素酶, 固定化酶

学科分类号 Q815

壳聚糖 (chitosan), 其学名为 2-氨基-1, 4-β 葡聚糖. 壳聚糖的来源十分丰富, 对它的开发利用已引起人们的普遍关注, 其在食品工业、日化工业和医药工业等方面都具有广泛的用途. 现有不少文献报道壳聚糖的用途, 作为生化载体就是其中之一. 壳聚糖是一种网状载体, 具有机械性能良好, 化学性质稳定, 耐热性好等优点, 特别是其分子中存在的氨基, 既易于与蛋白质和酶共价结合, 又可络合金属离子, 使酶免受金属离子的抑制, 同时它又易于通过接枝而改性. 因此, 它是一种良好的蛋白质和酶的载体, 近年来受到国内外不少学者的重视, 已成功地在壳聚糖上固定了碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、淀粉酶、天门冬氨酸酶及纤维素酶等十几种酶.

半纤维素是一种异质多糖, 约占陆生植物干重的 15%~30%, 微生物产生的半纤维素酶可降解半纤维素生成木糖及其他单糖. 研究半纤维素转化具有重要意义, 如在造纸工业的生物制浆和废水处理、转化半纤维素为单糖等. 在国外已有不少有关真菌和细菌降解半纤维素的研究^[1,2], 国内也已逐步开展, 但有关半纤维素酶的固定化尚未见报道. 本研究通过对产胞外半纤维素酶菌株进行培养, 提取半纤维素酶, 并将其通过戊二醛交联固定于壳聚

糖载体上, 制成固定化酶, 并对固定化酶的最适条件及稳定性等性质进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

虾壳, 自己收集. 戊二醛, 上海化学试剂站分装厂出品 (按 25% 计); 3, 5-二硝基水杨酸, 中国亚太医药工业研究所产品; 木聚糖, Sigma 公司产品; 壳聚糖, 自制; 半纤维素酶, 本实验室提取; 其他试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 菌株培养及酶液制备: 菌种为青霉菌 m8 (*Penicillium* sp. m8), 由本实验室采集、分离并初步命名. 菌株培养及酶液制备按孙迅等^[3]方法.

1.2.2 壳聚糖载体的制备: 参照陈盛等^[4]方法略加改动: 将河虾虾皮洗净, 去掉残余虾肉, 用 2~3 倍量体积的 3% 稀盐酸和 10% NaOH 反复处理 3~4 次, 每次 7~9 h, 用水洗至中性. 所得白色几丁质加入 45% NaOH, 于 80~100 °C 下保温处理 5~6 h 后, 水洗至中性, 晒干粉碎, 过 40 目筛即得产品.

* 山东省科委科研资金资助项目 (971164805).

Tel: (0530) 5525805, E-mail: wyw@public.hzptt.sd.cn

收稿日期: 1999-03-11, 修回日期: 1999-07-16