

# 氧化铝为载体的固定化葡萄糖异构酶某些性质的研究

印明善 马秀贞 叶乃芝 李小平

(中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州)

本文报道了以廉价的大孔氧化铝作为葡萄糖异构酶的固定化载体。该固定化酶的热稳定性是60—70℃, 如高于70℃就开始失活。最适pH和温度分别为7.2—8.0和70℃。Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和Ba<sup>2+</sup>等金属离子对它的酶活有抑制作用, Co<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>金属离子却有明显的激活作用。该固定化酶酶活是6000—7000u/g。通过柱运转, 它的半衰期为40天以上, 转化率是葡萄糖异构为果糖理论值的80—85%。

**关键词** 固定化; 葡萄糖异构酶; 氧化铝

工业应用的固定化酶载体不但要求价廉和制备方便, 而且要能回收和反复使用。氧化铝正符合这个要求。Messing等人<sup>[1,2]</sup>曾于1976年、1977年先后在美国取得了以不同方法制备的受控氧化铝为载体的固定化葡萄糖异构酶的专利。本文报道了以偏铝酸钠硝酸法制备的一种大孔氧化铝为载体的固定化葡萄糖异构酶的某些性质。

## 材料和方法

### (一) 酶源

菌种是沈阳发酵研究所提供的玫瑰红链霉菌 (*Streptomyces sp.*) 336号<sup>[3]</sup>。该菌经发酵培养后, 按Strandberg等人<sup>[4]</sup>的方法, 将酶液从发酵液中提取出来。

### (二) 载体

氧化铝的物理性质是: 表面积150—160m<sup>2</sup>/g, 孔体积0.8cm<sup>3</sup>/g, 平均孔径180—200Å左右和颗粒度20—60目。

### (三) 固定化方法

氧化铝和酶液以1:2—3的体积比混合, 混合液置于60℃水浴中, 间歇搅拌2h后, 即可制得固定化酶。载体对酶的吸附率是70%左右。

### (四) 酶活力测定

按高渗法<sup>[5]</sup>, 以被测酶液在特定的反应系统下, 于70℃反应1h, 生成1mg果糖的酶量称为1个酶活力单位。

## 结果与讨论

### (一) 温度对酶活力的影响

将酶液和固定化酶分别在60、65、70、80、90和95℃下反应1h, 测其在这些反应温度下的酶活力。结果见图1。

由图1可以看出固定化酶和游离酶作用的最适温度均为70℃。在70℃以下, 两者的活力都随着温度的增加而上升, 如在70℃以上, 则随着温度的增加而下降。这表明温度高于70℃时, 酶开始失活。

### (二) 酶的热稳定性

本文于1985年3月29日收到。

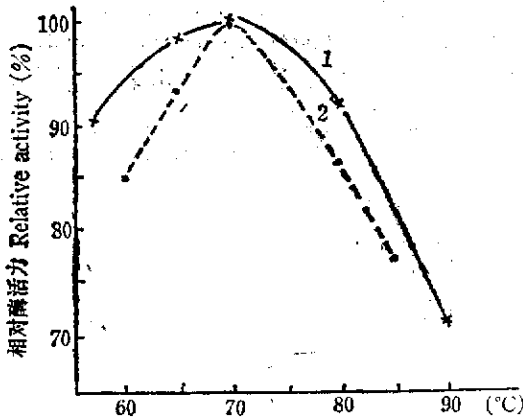


图1 温度对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature on enzyme activity

1. 固定化酶 Immobilized enzyme
2. 游离酶 Free enzyme

将酶液和固定化酶分别与磷酸缓冲液混合，在60、65、70、75、80、85和90°C的温度下保温1h后，测其酶活力。以不经保温的酶作为对照，结果见图2。

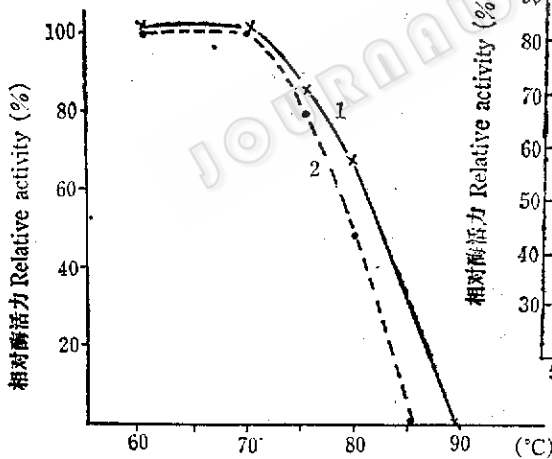


图2 酶的热稳定性

Fig. 2 Thermal stability

1. 固定化酶 Immobilized enzyme
2. 游离酶 Free enzyme

由此图可以表明固定化酶虽然在70°C以上开始失活，但仍比游离酶的热稳定性好，显示出了固定化酶的优越性。

### (三) pH对酶活力的影响

分别称取固定化酶100mg(湿重)和

吸取酶液1ml，各加入70% (w/v)的葡萄糖溶液1.5ml，0.1M硫酸镁0.5ml和不同pH值的磷酸缓冲液3ml，在70°C下反应1h后，测其活力，结果见图3。

由图3可知，固定化酶和游离酶的最适pH均为7.2—8.0，这说明了葡萄糖异构酶是一种在碱性环境下作用较好的酶。氧化铝作为此酶的无机载体是较为适合的。

### (四) 金属离子对酶活力的影响

1. 吸取70%的葡萄糖溶液1.5ml和0.1M硫酸镁0.5ml，分别加入 $1 \times 10^{-3}M$ 的多种金属离子0.5ml，然后再加入0.1g固定化酶或1.0ml的酶液及pH为7.8的磷酸缓冲液，使反应总体积达到5.0ml，置于70°C下反应1h后，测其活力。结果列

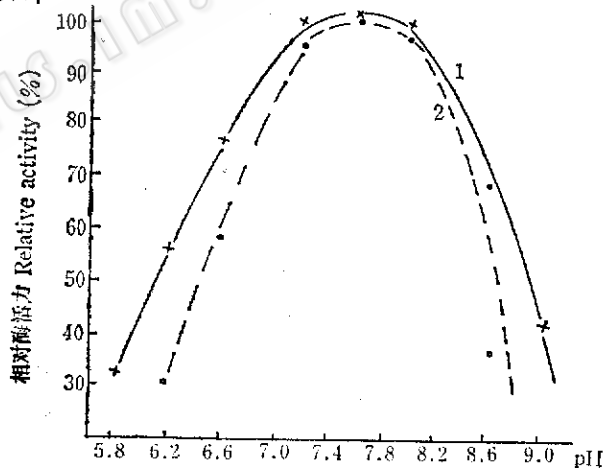


图3 pH对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzyme activity

1. 固定化酶 Immobilized enzyme
2. 游离酶 Free enzyme

于表1。

结果说明在所试各种金属离子中 $Cu^{2+}$ 对酶活力有强烈的抑制作用， $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 和 $Ba^{2+}$ 稍有抑制作用，其他金属离子无明显的抑制作用。

2. 由于在不加入 $Co^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 金属

离子的空白对照中葡萄糖异构酶的活力仅有10%表现出来, 所以就将这二种金属离子配制成不同的浓度, 测其活力, 结果见图4和5。

图4和5表明  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对酶活力有明显的激活作用。其最适浓度分别为  $1 \times 10^{-3} - 10^{-4} \text{M}$  和  $1 \times 10^{-2} - 10^{-3} \text{M}$ 。

### (五) 运转试验

将酶活力为 6000—7000u/g 的固定化酶(干重) 500g, 分别以 160g 和 170g 的量装入三根玻璃柱, 进行串联的下行运转试验。各柱串联的间隔时间是15天。原料液的组分是 50% (W/V) 的葡萄糖液, 内含  $5.0 \times 10^{-3} \text{M}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $5.0 \times 10^{-4} - 2.5 \times 10^{-4} \text{M}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和  $7.0 \times 10^{-3} - 5.0 \times 10^{-3} \text{M}$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , pH为7.2—

表 1 金属离子对酶活力的影响

Table 1 Effect of metal ions on enzyme activity

金属离子 Metal ion	相对活力 (%) Relative activity	
	游离酶 Free enzyme	固定化酶 Immobilized enzyme
对照Control	100	100
$\text{Ca}^{2+}$	95.9	94.7
$\text{Fe}^{2+}$	96.3	86.0
$\text{Cu}^{2+}$	39.6	48.6
$\text{Zn}^{2+}$	89.0	88.0
$\text{Mn}^{2+}$	81.6	88.4
$\text{Ba}^{2+}$	82.4	96.7
$\text{Mo}^{2+}$	97.8	100
$\text{K}^+$	100	100
$\text{Na}^+$	100	100

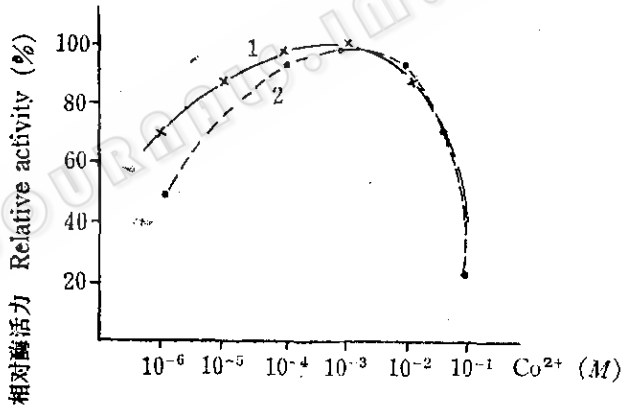


图 4 钴离子对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of cobalt ion on enzyme activity

1. 固定化酶 Immobilized enzyme  
2. 游离酶 Free enzyme

7.5。前后共运转了85天, 最后取出时, 剩余活力为初始活力的28.4%。共生产了含42.06%果糖的绝干转化糖 1.107kg, 由此 1 kg 固定化酶则可生产2.2吨绝干转化糖即相当于3.1吨高果糖浆。它们的第

半衰期是平均32天, 第二半衰期是50天, 见图6。液体体积空速变化是2.0—3.0。这说明了它的异构化速度较快。反应体积小, 但却能异构较大量的原料液。

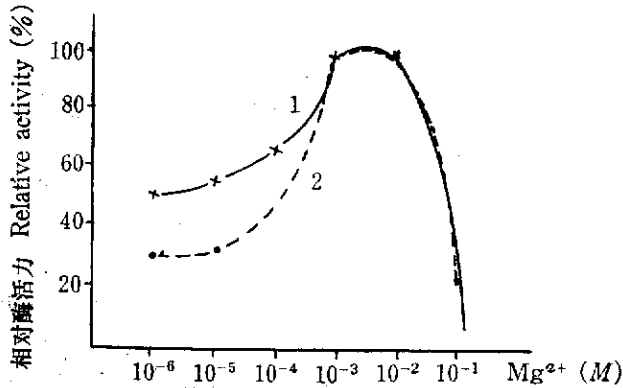


图 5 镁离子对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of manganese ion on enzyme activity

1. 固定化酶 Immobilized enzyme
2. 游离酶 Free enzyme

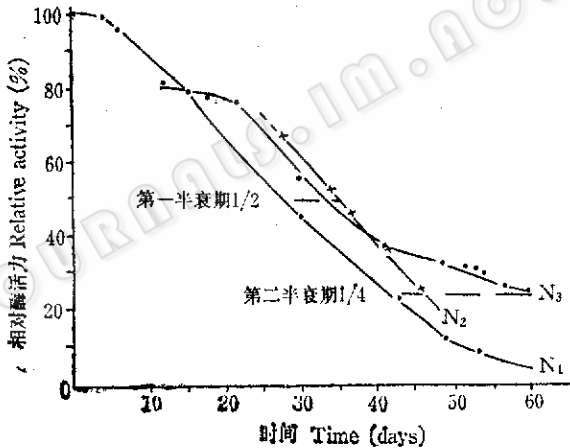


图 6 500g固定化酶分装三柱串联运转实验

Fig. 6 Operation of three continous column reactor in seris with 500g immobilized enzyme  
N<sub>1</sub> 160g N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> 170g

## 参 考 文 献

- (1) Eaton, D.L. and Messing, R.A.:US patent, 3,992,329, 1976.
- (2) Gregory, J.L. and Pitcher, W.H.:US patent, 4,002,576, 1977.
- (3) 沈阳市食品发酵研究所:轻工微生物, 1:1—7, 1977.
- (4) Strandberg, G.W. et al.:*Appl. Microb.*, 21(4):588, 1976.
- (5) 江苏省化工设计研究所:江苏发酵, 2:1—11, 1976.

# PROPERTIES OF THE GLUCOSE ISOMERASE IMMOBILIZED WITH ALUMINA AS A CARRIER

Yin Mingshan Ma Xiuzhen Ye Naizhi Li Xiaoping  
(Lanzhou Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Lanzhou)

The glucose isomerase immobilized with large-pore alumina as a carrier has been investigated. The optimum pH and temperature for immobilized glucose isomerase were 7.2—8.0 and 70°C, respectively. Its thermal stability was 60—70°C. Enzyme activity was inhibited by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  metal ions, while  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  trend to stimulate activity. Column half-lives in excess of 40 days were observed for reactor operating at 80 to 85% theoretical conversion of glucose to fructose.

## Key words

Immobilize; glucose isomerase; alumina