

酶稳定剂和还原剂对固定化葡萄糖氧化酶 稳定性的影响

李丽霞 俞耀庭 鲁格

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

本文研究了几种酶稳定剂和还原剂对固定化葡萄糖氧化酶稳定性的影响。血红蛋白能提高固定化葡萄糖氧化酶的活力, 在投入酶蛋白量和血红蛋白量之比为 1:10 时效果最明显。此外, 在底物反应液中, 加入还原性物质亦能提高固定化葡萄糖氧化酶的使用稳定性, 其中维生素C效果最显著。

关键词 葡萄糖氧化酶; 血红蛋白; 维生素C

酶在固定化时, 由于微环境的改变, 试剂的毒性等, 往往造成酶部分失活。因此在固定化酶时, 添加一些惰性蛋白质, 有利于提高酶活。文献[1—4]报道牛血清白蛋白可提供对酶更为有利的微环境, 从而提高酶的活性。本文作者试用了血红蛋白、牛血清白蛋白、肌红蛋白和细胞色素等几种蛋白。另外, 由于葡萄糖氧化酶催化葡萄糖转化为葡萄糖酸时, 另一产物 H_2O_2 能使葡萄糖氧化酶失活, 作者曾利用过氧化氢酶来分解 H_2O_2 , 取得了良好效果。目前, 试用还原性物质和 H_2O_2 构成氧化还原系统来分解 H_2O_2 , 亦取得了较好结果。

材料和方法

(一) 材料

葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase 简写 GOD), 生化试剂, 中国科学院微生物所中试厂产品, 酶活力为 30—45u/ml, (内含过氧化氢酶 100—150u/ml)。过氧化氢酶 (Catalase 简写 CAT), SIGMA 化学公司, Stock No C-40, 11000 SIGMAu/mg。

牛血清白蛋白 (简写 BSA), 生化试剂, 上海长阳生化制药厂。血红蛋白 (简写 Hb), 生化试剂, GMBH 公司, 德国产。肌红蛋白 (人), 生化试剂, 中国科学院生物物理所生化试剂厂。细胞色素 C, 注射用, 天津生物化学制药厂。

(二) 分析方法

液相葡萄糖氧化酶活力测定用滴定法^[5]。固定化葡萄糖氧化酶活力测定: 称取适量固定化酶, 采取同液相酶相同方法测定。

(三) 酶的固定化方法

1. ABSE-交联琼脂糖的制备^[6]。

2. 固定化酶的制备: 在 25ml 烧杯中, 将 2g ABSE-交联琼脂糖悬于 2ml 蒸馏水中, 冰浴中冷却, 搅拌下顺序加入 1ml 1N HCl 和 1ml 5% $NaNO_2$ 溶液, 于冰浴中搅拌反应 20min。抽滤, 用预冷的 0.05N HCl 溶液洗涤三次, 冷蒸馏水洗涤三次, 将滤干的重氮盐衍生物立即投入 2ml pH7.0

本文于 1986 年 3 月 10 日收到。

本工作得到中国科学院微生物研究所杨开宇同志的指导和帮助, 特此致谢。

的葡萄糖氧化酶和惰性蛋白的混合缓冲液中,在冰箱内放置过夜,用0.5M NaCl洗涤三次,蒸馏水充分洗涤,除去未偶联的酶,得固定化酶。

结果和讨论

(一) 空气对酶活力的影响

葡萄糖氧化酶在有氧情况下催化葡萄糖转化为葡萄糖酸。在测定酶活力时,氧气的充足与否,对酶活力的影响是很大的。在振荡器转速不同和不同反应器上酶促反应进行1h,测定的同一浓度的酶活力数据见表1。由表可见,在空气充足的情

表 1 空气对酶活力的影响

Table 1 Effect of air on the activity of glucose oxidase

转速 Rotation speed	反应器 (ml) Container	酶活力 Enzyme activity(u/ml)	相对活力 Relative activity
12	50	9.0	1.0
150	250	41.4	4.6
120	50	28.7	3.0
150	50	25.8	2.9

况下,酶活力是空气不充足时酶活力的4.6倍。因此,如能提高固定化酶表面氧的浓度,在催化底物反应时,固定化葡萄糖氧化酶亦能表现出较高的酶活力。

(二) 各种蛋白对酶固定化的影响

在制备固定化酶时,分别将酶和各种惰性蛋白混合,(酶蛋白与惰性蛋白量之比为3:1),然后固定化制成固定化酶,各种惰性蛋白对酶固定化影响情况见图1。实验结果表明,在固定化葡萄糖氧化酶时,加入血红蛋白能提高固定化酶的活力,这时,固定化酶的活力是不加蛋白的1.2倍。牛血清白蛋白和肌红蛋白没有看到有什么影响,细胞色素C很大程度地降低了固定化酶的活力。上述现象原因如下,实验中加入的蛋白(除细胞色素C

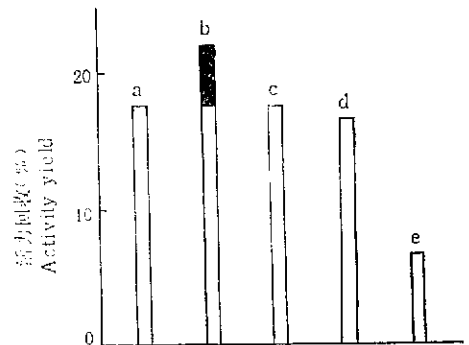


图 1 各种蛋白对酶固定化的影响

Fig.1 Different proteins tested versus the activity of immobilized glucose oxidase

- a. 固定化-GOD Immobilized GOD b. 固定化-GOD-HB Immobilized GOD/HB c. 固定化-GOD-BSA Immobilized GOD/BSA d. 固定化-GOD-肌红蛋白 Immobilized GOD/myoglobin e. 固定化-GOD-细胞色素C Immobilized GOD/cytochrome C

外),对酶有稳定作用,但由于固定化时,加入的惰性蛋白和酶之间产生了竞争偶联,造成载体偶联酶量减少,因此固定化酶活力下降。这可从图2看出。因为加入蛋白后,一方面对酶起稳定作用,结

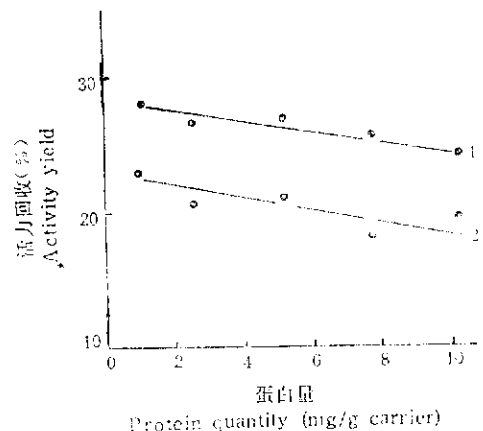


图 2 不同蛋白量对酶固定化的影响

Fig.2 Different amounts of protein added versus the activity of immobilized glucose oxidase

1. 固定化-GOD-HB Immobilized GOD/HB
2. 固定化-GOD-BSA Immobilized GOD/BSA

果是增加酶的活性;另一方面,由于加入的蛋白与酶发生竞争偶联,使偶联酶量下降,结果是使总酶活下降。上述两个因素

相互作用, 当提高酶活的因素占上风时, 则总的酶活就增加了。例如加入血红蛋白后, 由于血红蛋白是血液中输送氧气的蛋白质, 它有载氧作用, 所以增加了酶活, 这一作用比偶联酶量减少的作用要大得多, 所以, 总酶活还是增加了。肌红蛋白虽然也有载氧作用, 但由于肌红蛋白只有一个血红素辅基, 载氧能力远远低于血红蛋白。

(三) 加入血红蛋白量对酶固定化的影响

由于血红蛋白的载氧作用, 加入血红蛋白能够提高固定化葡萄糖氧化酶的活力, 但由于偶联时, 它与酶竞争接到载体上, 又可能降低固定化酶活力, 因此需寻找一个最佳血红蛋白的用量。由加入血红蛋白量对固定化葡萄糖氧化酶活力影响的曲线(图3)可见, 每克载体加入血红蛋白

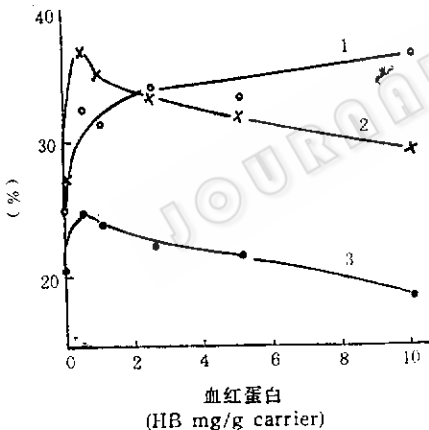


图3 加入血红蛋白量对酶固定化的影响
Fig.3 Amounts of hemoglobin added versus the activity of immobilized glucose oxidase

1. 残留活力 Residual activity (%) 2. 比活力 Specific activity (%) 3. 活力回收 Activity yield (%)

0.5mg 最佳, 这时每克载体加入的酶蛋白量与血红蛋白量之比约为12:1。随加入血红蛋白量再增加, 固定化酶活力又趋于下降。当每克载体加入的酶蛋白量与血红蛋白量之比为1:1时, 固定化酶活力和不加血红蛋白的固定化酶活力一样。当酶

蛋白量和血红蛋白量之比小于1时, 固定化酶活力开始低于不加血红蛋白的固定化酶了。因此, 为了得到较高活力的固定化酶, 最好在固定化葡萄糖氧化酶时, 加入少量的血红蛋白, 酶蛋白与血红蛋白量之比在10:1左右为宜。

(四) 还原类物质对固定化-GOD稳定性的影响

葡萄糖氧化酶催化反应的产物之一 H_2O_2 对酶有破坏作用, 利用过氧化氢酶

表2 还原类物质对固定化-GOD稳定性的影响
Table 2 Effect of reducing agents on the stability of immobilized glucose oxidase

还原类物质 Reducing agents	浓度 (M) Concentration	相对活力 (%) Relative activity
—		57.9
$NaBH_4$	0.01	59.3
$Na_2S_2O_3$	0.01	63.3
β -萘酚 (β -naphthol)	0.01	62.1
Vc	0.01	70.0

可分解 H_2O_2 达到提高酶稳定性的目的。利用其它还原剂也应该达到同样的目的。作者试用了以下几种还原剂。由表2可知, 加入的这几种还原剂都能使固定化-GOD稳定性有所提高, 其中, 以Vc的作用最大。若不加还原类物质, 再次使用时, 固定化酶活力降为原活力的57%, 加入Vc, 固定化酶活力可保持为原活力的70%。因此, 在底物反应液中, 加入还原剂Vc亦能提高固定化-GOD使用稳定性。

综上所述, 过氧化氢酶、血红蛋白、Vc都可以用来提高酶稳定性, 其程度见表3。由表可见, 用过氧化氢酶来提高固定化-GOD的使用稳定性效果最好。酶促反应时加入过氧化氢酶的固定化-GOD, 再次使用时仍保留原活力的103.6%; 而加血红蛋白和Vc的固定化-GOD, 再次使用时, 分别保持原活力的67%、和70.0%;

表 3 不同类稳定剂对固定化-GOD稳定性的影响
Table 3 Effect of different stabilizers on the stability of immobilized glucose oxidase

稳定剂 Stabilizers	浓度 Concentration	相对活力 (%) Relative activity
		57.9
过氧化氢酶 (CAT)	0.2mg/ml	103.6
血红蛋白 (Hb)	5.0mg/ml	67.0
V _c	0.01M	70.0

不加任何稳定剂的,只保持原活力的57.9%。在此,过氧化氢酶是生物催化剂,反应温和,速度快,且酶不被消耗。血红蛋白和V_c的作用相差不大。V_c是小分子化合物,若用它作稳定剂,可加在底物反应液中使用,血红蛋白是生物大分子,用它作稳定剂可以和酶一起偶联在载体上。

(五) 几种固定化酶连续使用稳定性

在填充柱反应器中,将几种固定化酶分别在25℃条件下,用0.2%的葡萄糖缓冲液连续通过36h,结果见图4。固定化-GOD-Hb、固定化-GOD-BSA、和固定化-GOD-CAT的使用稳定性均比固定化-GOD的使用稳定性明显提高了。其中固定化-GOD-CAT连续使用36h,活力几乎没有变化,固定化-GOD-Hb连续使用36h,活力仍保留95.6%。若失活速率按一级动力学处理^[6,7],则 $dE/dt = -k_d E$

$$\ln[E(t)/E(0)] = -k_d t$$

利用最小二乘法处理实验数据,可得几种固定化酶的 k_d 和 $t_{1/2}$ 数据,见表4。由此可见,利用惰性蛋白Hb或过氧化氢酶同时和葡萄糖氧化酶固定化,均可达到提高

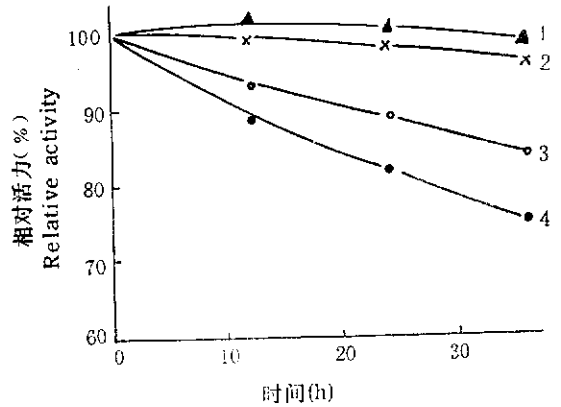


图 4 固定化酶的连续使用稳定性
Fig.4 Continual operational stability of immobilized enzymes

1. 固定化-GOD-CAT Immobilized GOD/CAT
2. 固定化-GOD-HB Immobilized GOD/HB
3. 固定化-GOD-BSA Immobilized GOD/BSA
4. 固定化-GOD Immobilized glucose oxidase

固定化葡萄糖氧化酶使用寿命的目的。利用该法制成的固定化-GOD-Hb和固定化-GOD-CAT的半衰期分别比用该法制成的固定化-GOD半衰期延长6.5倍和12倍,与文献[6]报道的结果相比,半衰期分别延长了7和12倍。这一结果为延长酶电极的使用寿命提供了新的途径。

表 4 几种固定化酶的 K_d 和 $t_{1/2}$

Table 4 Deactivation constant and half-life of immobilized enzymes

固定化酶 Immobilized enzymes	$-k_d \times 10^3 (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$
固定化-GOD Immobilized GOD	7.2	96.3
固定化-GOD-HB Immobilized GOD/HB	1.1	630.1
固定化-GOD-BSA Immobilized GOD/BSA	4.4	157.5
固定化-GOD-CAT Immobilized GOD/CAT	0.6	1155.2

参 考 文 献

- [1] Toshio Yao, *Anal. Chim. Acta.*, 148:27, 1983.
- [2] 袁中一, 钱雪明: 科学通报, 12:749, 1981.
- [3] Busby, M.G. et al., *United States Patent*, 4,317,879, 1982.
- [4] Ruphock, P.A.: *United States Patent*, 4,366,243, 1982.

- [5] 中山大学生物系生化微生物学教研室编：《生化技术导论》，人民教育出版社，1981。
[6] 杨开宇等：生物化学与生物物理学报，11:79, 1979。
[7] Ramachandran, K.B. and Perimutter, D.D., *Biotechnol. Bioeng.*, 18:669, 1976.
[8] Malikkides, C.O. and Weiland, R.H., *Biotechnol. Bioeng.*, 24:1911, 1982.

EFFECTS OF STABILIZERS AND REDUCING AGENTS ON THE STABILITY OF IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE

Li Lixia Yu Yaoting Lu Ge

(*Institute of Molecular Biology, Nankai University, TianJin*)

The effects of stabilizers and reducing agents on the stability of immobilized glucose oxidase were studied. It was found that hemoglobin had a good effect on the stability of immobilized glucose oxidase. The best ratio of enzyme to hemoglobin used was 1:10. In addition, the stability of immobilized glucose oxidase was also raised by the addition of reducing agents such as vitamin C to the substrate.

Key words

Glucose oxidase; hemoglobin; vitamin C