

葡萄糖氧化酶在蟹壳几丁质上的固定化作用

申炳华 李 华 李大海

(北京师范大学生物系, 北京)

黎高翔

(中国科学院微生物研究所, 北京)

由蟹壳提取的几丁质是一种含有大量羟基和氨基的多糖类的天然聚合物。是固定化酶优良载体。本文报道用几丁质制备水不溶性葡萄糖氧化酶的初步研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 载体: 蟹壳来源于天津塘沽水产加工厂, 提纯方法按申炳华等人的方法^[1]。

2. 酶源: 点青霉 (*Penicillium notatum*) 葡萄糖氧化酶由中国科学院微生物所提供。

(二) 方法

1. 浓缩酶液的制备: 粗酶液经过过滤并透析过夜后, 按75%饱和度硫酸铵盐析, 静置1h后离心(10000rpm, 0°C) 10min, 沉淀用0.006mol/L pH5.5的磷酸缓冲液溶解, 然后过Sephadex柱脱盐, 即得含蛋白质量为10mg/ml的无盐酶液。

2. 蛋白质浓度的测定: 采用Lowry法^[2]。

3. 酶活力的测定: 按文献[3]进行。

4. 固定化酶的制备与活力测定: 取1g湿载体(含水量50%)加入8ml 2.5%的戊二醛, 充分搅拌, 抽气后在室温下放置过夜, 彻底水洗后抽干, 再加入1.5ml

的酶液, 充分搅拌后在冰箱中放置过夜, 彻底水洗至无蛋白即得。

测定固定化酶的方法基本与自然酶一致, 调整加入反应体系中固定化酶量, 使表现活力在6.5—7u, 对照以活化载体代替固定化酶, 计算活力时折成u/g(干载体)。

结 果 和 讨 论

(一) 固定化条件的摸索

1. 不同pH对戊二醛活化载体及酶偶联的影响: 结果如图1。均以pH5时固定化酶活力最高。

2. 不同离子强度对载体偶联酶的影响: 结果如图2。低离子浓度有利于酶偶联。

3. 共固定化其他蛋白的比较: 称取三份1g(湿重)的活化载体, 分别与20mg酶蛋白, 20mg酶蛋白+4mg牛血清清蛋白及20mg酶蛋白+4mg血红蛋白进行偶联反应, 比较固定化酶的活力, 发现在血红蛋白存在下固定化酶的表现活力较高。

4. 在底物存在下进行酶偶联反应, 结果表明固定化酶活力较高。

本文于1987年6月14日收到,

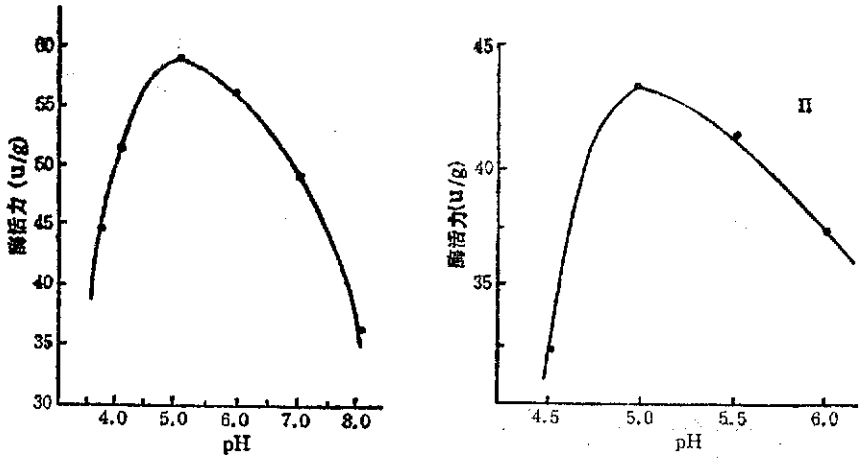


图1 pH对戊二醛活化及酶偶联的影响
 I. 不同pH戊二醛活化的固定化酶活力 I. 不同pH偶联酶的固定化酶活力

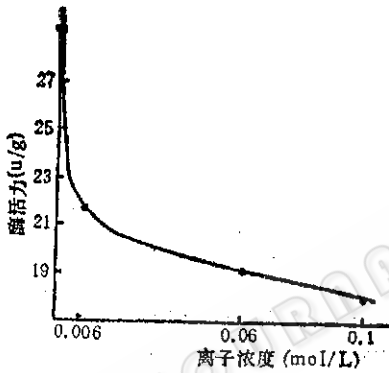


图2 不同离子浓度偶联酶对固定化酶活力的影响

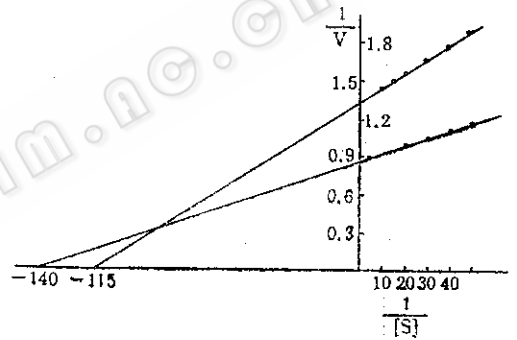


图4 双倒数法测米氏常数

5. 不同酶浓度偶联反应对固定化酶活力的影响, 结果如图3。

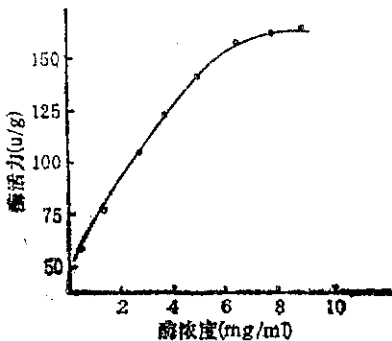


图3 不同酶浓度偶联反应对固定化酶活力的影响

10^{-3} mol/L, 二者 K_m 值差别不大。

2. pH 对酶活力的影响: 结果如图5。固定化酶的最适pH比自然酶提高了一个单位。

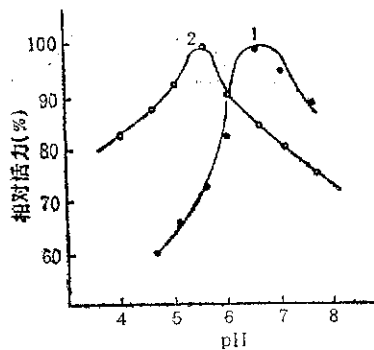


图5 pH对酶活力的影响
 1. 固定化酶 2. 自然酶

(二) 固定化酶与自然酶性质的比较

1. 米氏常数: 如图4固定化酶 $K_m = 7.1 \times 10^{-3}$ mol/L, 自然酶 $K_m = 8.7 \times$

3. 温度对酶活力的影响: 结果如图

6. 固定化酶最适温度比自然酶高 5 °C。

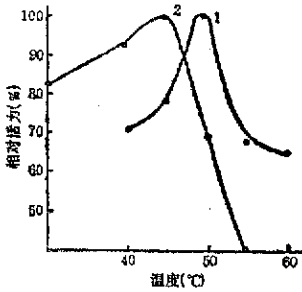


图 6 温度对酶活力的影响
1. 固定化酶 2. 自然酶

4. pH 对酶贮存稳定性的影响: 结果如图 7。

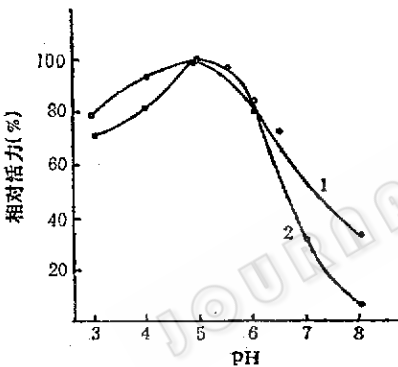


图 7 pH对酶稳定性的影响
1. 固定化酶 2. 自然酶

5. 酶的热稳定性: 结果如图 8, 表明在 60°C 下保温 5 h 后固定化酶仍保留 77% 活力。而自然酶只有 20% 的活力。固定化酶热稳定性有明显提高。

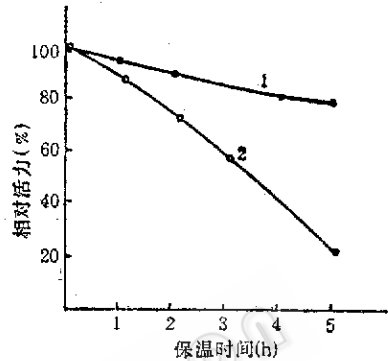


图 8 酶的热稳定性

1. 固定化酶 2. 自然酶

6. 重复使用稳定性: 取 100mg 固定化酶, 与 25ml 2% 的葡萄糖-磷酸缓冲液反应, 30°C 1h 后立即抽滤, 滤液加入 0.1mol/L NaOH, 并用 0.1mol/L HCl 滴定检测产物量, 每隔一定时间测酶活力, 重复测定 20 天, 前 3 次活力下降较明显, 以后活力基本不变。

参 考 文 献

- [1] 申炳华等: 北京师范大学学报, (1): 67—71, 1986.
 [2] Lowry, O.H. et al., JBC, 193:265, 1951.
 [3] 张树政等: 酶制剂工业, 科学出版社, 北京, pp. 679—680, 1984.

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ON CRAB CHITIN

Shen Binghua Li Hua Li Dahei

(Department of Biology, Beijing normal university, Beijing)

Li Gaoxiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The carrier chitin was prepared by treating crab shell with acid and alkali. Glucose oxidase (EC 1.1.3.4.) was covalently bound on chitin using glutaraldehyde as a crosslinking agent. The conditions of enzyme immobilization have been investigated.

Some properties of the immobilized enzyme and the native enzyme have been comparatively investigated. The optimal temperature of the immobilized GOD and native enzyme was 50°C and 45°C, respectively. The optimum pH of bound GOD shifted 1.0 pH unit toward the alkaline side compared to the native one. The apparent K_m values for glucose with the immobilized GOD and the native enzyme were 7.1×10^{-3} mol/L and 8.7×10^{-3} mol/L, respectively. After enzyme immobilization, the stability of the enzyme has been increased distinctly.

Key words

Immobilization; glucose oxidase; chitin