

低温辐射引发聚合甲基丙烯酸 β -羟乙酯固定化葡萄糖氧化酶

曹 瑾 苏宗贤

(华东化工学院, 上海)

摘要 本文研究在 -78°C 下, ^{60}Co γ 辐射引发亲水性单体甲基丙烯酸 β -羟乙酯(HEMA)聚合固定化葡萄糖氧化酶(GOD), 实验结果证明, 控制辐射总剂量不超过 $1 \times 10^4 \text{Gy}$, 对葡萄糖氧化酶的活力损伤极微。载体 HEMA 浓度取为 50%, 包埋量是 1.0 ml GOD/10 ml 缓冲溶液(pH 为 5.6, 0.06 mol/L 磷酸缓冲液), 可以得到既有弹性, 又具有保存活力高的葡萄糖氧化酶固定化圆珠。辐照聚合 HEMA 温度越低, 保存活力愈高。反应底物 pH 试验判明, 固定化葡萄糖氧化酶的最适 pH 值与自然葡萄糖氧化酶的最适 pH 值一样, 不过固定化葡萄糖氧化酶比自然酶更广泛适应于 pH 值的变化。固定化葡萄糖氧化酶动力学实验结果: 米氏常数为 $k'_m = 1.42 \times 10^{-2} \text{mol}$ 比自然酶 $k_m = 1.0 \times 10^{-2} \text{mol}$ 略高, 说明了反应底物的扩散速度受到了一定的限制。活化能测定是 13.7 kJ/mol。

关键词 固定化酶; 包埋固定化; 葡萄糖氧化酶; 辐射引发聚合; 葡萄糖; 甲基丙烯酸 β -羟乙酯。

前 言

葡萄糖氧化酶的固定化方法研究有过较多的文献报导。P. E. Makey^[1]利用无机载体 X-1807 (SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3) $\cdot \text{Ni}$ 0302 (Al_2O_3 , Ni^+) 吸附葡萄糖氧化酶, 接着用戊二醛交联固定。P. G. Piffer^[2]利用阴离子交换树脂 (13 $\times$ Zeolite) 吸附固定化葡萄糖氧化酶。L. D. Angiuro^[3]进行了光引发接枝共聚将葡萄糖氧化酶固定在琼脂糖上的研究。I. Kaefsu^[4]利用亲水性单体和疏水性单体的低温辐射聚合分别对 α -淀粉酶, 葡萄糖异构酶, 纤维素酶进行了固定化实验, 结果表明, 低温辐射固定化能够提高酶的保留活性。

本文利用亲水性单体甲基丙烯酸 β -羟乙酯(β -Hydroxy ethyl Methacrylate HEMA)作载体, 在低温 -78°C 下, ^{60}Co γ 引发, 对葡萄糖氧化酶进行了粘住包埋固定化, 并对固定化葡萄糖氧化酶的性质进行了探讨。

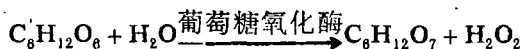
材料和实验方法

HEMA 单体: 上海珊瑚化工厂; 葡萄糖氧化酶: 中科院北京微生物研究所, 活力单位: 30 单位/ml。

取规定量的葡萄糖氧化酶溶液用 pH 5.6, 0.06 mol/L 的磷酸缓冲溶液稀释后, 加入一定量的 HEMA 单体, 配制成需要浓度的溶液。

盛有正己烷(或石油醚)的烧杯, 放在干冰-丙酮浴中(-78°C), 而后将上述配好的含有葡萄糖氧化酶、HEMA 规定浓度的缓冲液用滴管吸取一定量, 滴入到正己烷中, 随即凝结成珠状, 立即将烧杯, 及连同盛有干冰-丙酮的杜瓦瓶放置在 ^{60}Co γ 辐照场中进行照射; 辐照后, 倾去正己烷, 用乙醇洗涤, 再用蒸馏水洗, 最后用 pH 5.6 0.06 mol/L 磷酸缓冲液洗涤, 抽干, 得到圆珠状、富有弹性的固定化葡萄糖氧化酶。

固定化葡萄糖氧化酶的活力测定,是根据葡萄糖氧化酶与葡萄糖发生酶反应产生葡萄糖酸和 H_2O_2 的原理,用 3,5-二硝基水杨酸测定未反应的葡萄糖量,从而可以计算葡萄糖氧化酶的活力^[5]。



活力单位的定义是,在 pH 5.6 0.06 mol/L 磷酸缓冲溶液中,反应温度为 35℃,每分钟催化氧化 1 微摩尔葡萄糖所需要的酶量为一个活力单位。

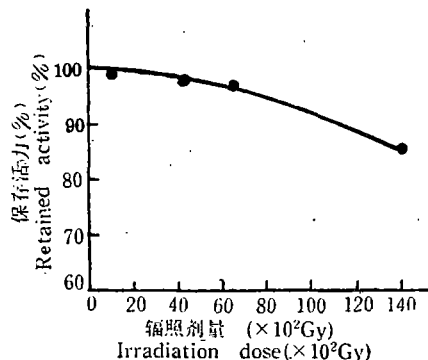


图 1 辐照剂量对葡萄糖氧化酶活力的影响

辐照温度: -78°C , 酶活力: 30 单位/ml

Fig. 1 The effect of irradiation dose on the activity of glucose oxidase

irradiation temperature: -78°C , activity of glucose oxidase: 30 u/ml

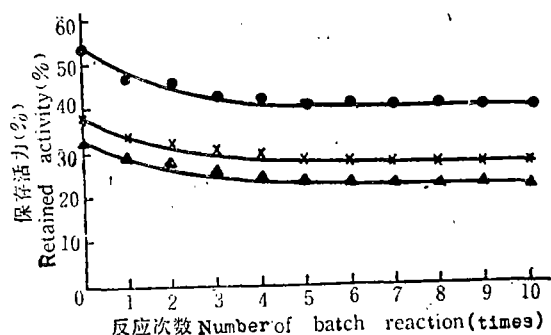


图 2 载体 HEMA 浓度对葡萄糖氧化酶活力的影响

辐照温度: -78°C , 包埋量: 1.0 ml GoD/10 ml 缓冲溶液;

辐照剂量: 6×10^3 Gy. ●: 50% HEMA, ×: 30% HEMA, ▲ 70% HEMA

Fig. 2 The effect of HEMA concentration on the activity of glucose ox dase

Irradiation temperature: -78°C ; Entrapped amount: 1.0 ml GoD/10ml solution; Irradiation dose: 6×10^3 Gy

图 2 表明, 30% HEMA 和 70% HEMA 含量的磷酸缓冲液包埋固定葡萄糖氧化酶, 分别经过与底物葡萄糖 10 次反应后, 保存活力基本一致, 唯有 50% HEMA 含量的磷酸缓冲液, 经与底物

结果和讨论

1. 辐照剂量对固定化葡萄糖氧化酶活力的影响

辐射粘住包埋固定化法所需要剂量的大小, 有二个因素所决定, 一是考虑到辐照对葡萄糖氧化酶的活力损伤, 辐照剂量愈小, 则辐照损伤就愈小, 但必须考虑第二个因素, 剂量不能太小, 否则 HEMA 单体聚合就不完全, 因此, 所需剂量的大小, 既要照顾到对酶的活力损伤, 又要考虑到 HEMA 单体的聚合程度。实验结果得到, 葡萄糖氧化酶的固定化, 总剂量在 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ Gy 范围内是适宜的。

2. 载体 HEMA 浓度不同, 对固定化葡萄糖氧化酶活力的影响

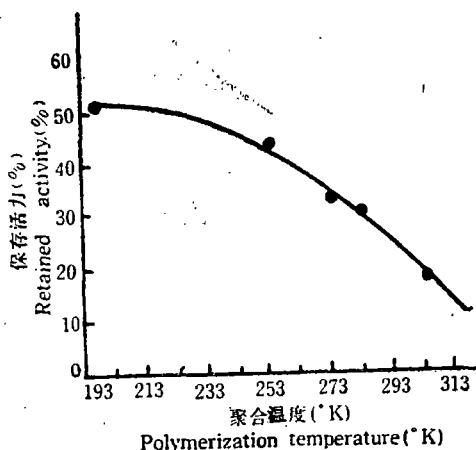


图 3 辐照聚合温度对葡萄糖氧化酶活力的影响
辐照剂量: 6×10^3 Gy; 包埋量: 1.0 ml GoD/10 ml 缓冲溶液; HEMA 浓度: 50%。

Fig. 3 The effect of polymerization temperature on the activity of glucose oxidase
Irradiation dose: 6×10^3 Gy; Entrapped amount: 1.0 ml GoD/10 ml solution; HEMA concentration: 50%.

10次反应后,保存活力仍高于30%。其原因是含30%HEMA的溶液,在低温下,由于水份多,经辐照后,在聚合物基块的内部结冰,造成多孔性增加,这样的结构,在进行酶反应时,酶的漏损机会就多。含有70%HEMA的溶液,辐照聚合时,由于HEMA量相对较多,聚合物基块内部的多孔性就减少,也即包埋葡萄糖氧化酶量也减少,保存活力也就下降。50%HEMA含量包埋葡萄糖氧化酶相比于30%HEMA包埋和70%HEMA包埋是适度的,既保持了聚合物基块内部的多孔性,不致于使酶漏损,又使酶能尽可能量的得到包埋,同时HEMA聚合物手感状态是具有一定的弹性,因此,保存活力也就较高。

3. 辐照聚合温度对固定化葡萄糖氧化酶活力的影响

由实验结果看出,随着辐照聚合温度的下降,葡萄糖氧化酶的酶的保存活力增加。

电镜分析判明,在温度20℃下,进行辐射聚合HEMA包埋葡萄糖氧化酶,HEMA聚合的结构是各基块间留下较大的空隙,酶游离在此空隙的水相中很容易漏失。在-78℃下进行实验,此

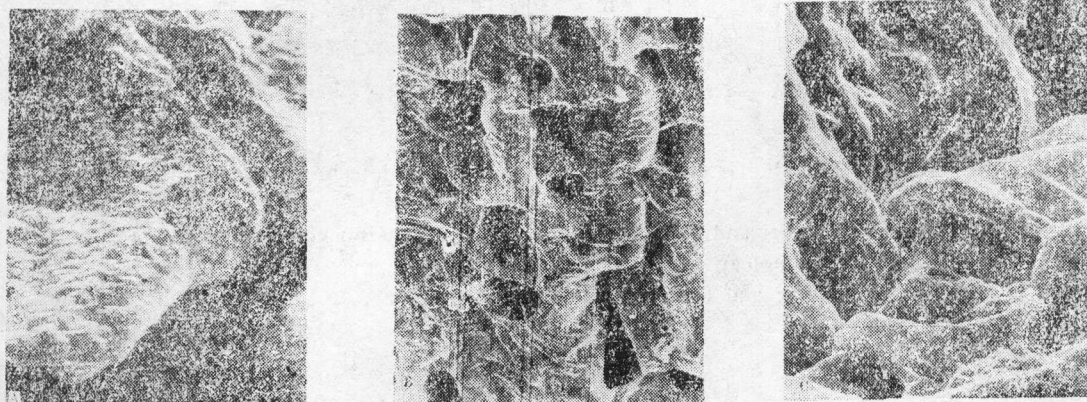


图4 电子显微镜照片

Fig. 4 The photograph of electron microscope

辐照温度: (A)20℃; B: -15℃; C: -78℃; 放大倍数: A: $\times 1000$ 倍; B: $\times 1000$ 倍; C: $\times 1000$ 倍。

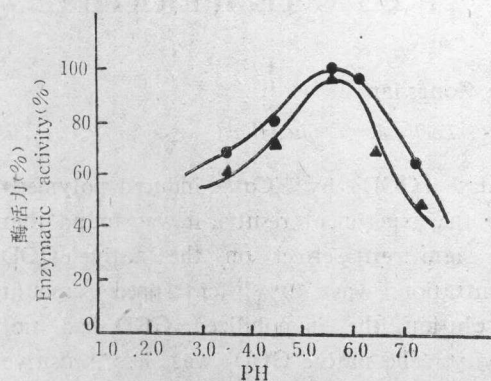


图5 固定化葡萄糖氧化酶活力与底物溶液pH值的关系

▲自然酶 ●固定化酶

Fig. 5 Relationship between the immobilization GOD activity and pH for substrate

▲ Natural GOD ● Immobilization GOD

pH 3.5~4.5 Acetic acid buffer solution

pH 5.6~7.0 phosphoric acid buffer solution

时, HEMA 处在过冷态, 成为玻璃化单体, 粘度增加, 经辐照后, 过冷态 HEMA 聚合后形成小基块, 这些小基块所包围的空隙就很小, 处在此空隙水相中的酶就不易漏失, 很容易吸附在这些小基块的内表面, 显示出了较高的保存活力。

4. 反应底物溶液 pH 值对葡萄糖氧化酶活力的影响

在本实验条件下, 影响反应最适 pH 值的因素有二个, 一是载体所带的电荷, 二是产物的酸性。带负电荷的载体往往容易吸附底物溶液中的 H^+ 离子, 使固定化酶周围局部环境的 pH 值低于溶液 pH 值, 为了消除这一影响, 必须增加溶液 OH^- 离子的浓度, 即要求固定化酶反应最适 pH 值升高。相反, 若载体带正电荷,

则固定化酶反应最适 pH 值下降。现在所用的载体 HEMA 是呈电中性的,这就排除了第一个因素所起的影响,至于说到第二个因素,虽然酶和底物葡萄糖溶液反应产生葡萄糖酸,但因为使用的是 pH = 5.6 的磷酸缓冲液,所以固定化葡萄糖氧化酶的酶反应最适 pH 值几乎与自然酶反应的最适 pH 值是一样的。只不过是固定化葡萄糖氧化酶比自然酶表现出更广泛适应于 pH 值的变化。

5. 固定化葡萄糖氧化酶的米氏常数和活化能

酶固定化后的表观米氏常数和自然酶相比略有不同,其理由是与固定化载体在溶液中所呈现的带电性质有关。带电载体和反应底物间的电荷作用,会引起底物分子在扩散层和整个溶液间的不均一分布。如果反应底物所带的电荷和载体电荷相反的话,固定化酶表观米氏常数将比自然酶低。对于电中性 HEMA 载体,以及经辐照聚合后呈疏水性的关系,由于扩散限制,其结果造成表观米氏常数比自然酶的米氏常数稍为偏高。

本实验表明,底物葡萄糖溶液浓度在 30~100 mol/L 范围内,固定化葡萄糖氧化酶的 $K'm = 1.42 \times 10^{-2} \text{mol}$,而自然葡萄糖氧化酶的 $K_m = 1.0 \times 10^{-2} \text{mol}$,两者相比,前者略高。

固定化葡萄糖氧化酶活化能经实验测定,并按 Arrhenius 方程计算得到 13.7 KJ/mol。

参 考 文 献

- [1] Peter E. Markey, Paul F. Greenfield and J. R. Kitterll, *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 288 (1975).
- [2] P. G. Pifferi, A. Vaccari and G. Ricci, *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2155 (1982).
- [3] L. D. Angiuro, *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 207 (1982).
- [4] I. Kaetsu, *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 863 (1979).
- [5] 张龙翔,张庭芳,李令媛主编,生化实验方法和技术, p. 9, 人民教育出版社, 1981.

(稿件收到日期: 1986 年 9 月 25 日)

IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE BY RADIATION INDUCED POLYMERIZATION OF HEMA AT LOW TEMPERATURE

Cao Jin Su Zongxian

(East China Institute of Chemical Technology, Shanghai)

ABSTRACT The immobilized glucose oxidase (GOD) by $^{60}\text{Co}-\gamma$ induced polymerization of HEMA at -78°C was studied. From the experiment results, it was found that the irradiation dose until $1 \times 10^4 \text{Gy}$ had not a significant effect on the native GOD activity. When the carrier (HEMA) concentration was 50%, entrapped amount 1.0 ml GOD/10 ml phosphoric acid buffer solution, the immobilized GOD had not only elastic, but also had high remaining activity. The native GOD was less sensitive to pH value than the immobilized GOD, but both the proper pH values didn't change.

The kinetic reaction results showed. Michaelis constant $k'm = 1.42 \times 10^{-2} \text{mol}$ (native GOD $k_m = 1.0 \times 10^{-2} \text{mol}$). This value indicated that diffuse velocity of substrate was restricted. The activation energies of the immobilized GOD were found to be 13.7 kJ/mol.

KEY WORDS Immobilized enzyme; Entrapped immobilized method; Glucose oxidase; Radiation-induced polymerization; Glucose; β -Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA).