

辐射聚合丙烯酸酰胺固定面包酵母

苏宗贤 曹瑾 王富军* 隋澎*

(华东化工学院)

摘要 本文研究用 ^{60}Co 辐射聚合丙烯酸酰胺,包埋具有转化酶活力的酵母细胞的方法。丙烯酸酰胺作为载体,NN'-甲撑双丙烯酸酰胺作为交联剂。探讨了固定化的一些条件,如辐照剂量、聚合温度、酵母和交联剂的用量对酶活力的影响。试验发现,辐照剂量高达 $2 \times 10^6 \text{rad}$,对酶活力没有影响。由最适条件所制得的固定化细胞既有弹性又有硬度,并且显示较高的活力回收,重复10次反应后酶活力保持不变。

关键词 辐射聚合; 丙烯酸酰胺; 转化酶; 蔗糖。

引言

采用直接固定完整细胞的方法,以利用细胞内的一种酶或多种酶,应用于医药、食品工业生产的研究日益增多。在固定细胞的诸方法中,包埋法也是常用的方法之一。因为,它既不会引起细胞内酶结构的改变,也不需要酶的结构中有特殊的功能基因。简单地说,它可以在比较温和条件下,使细胞高浓度地固定。

在包埋法中,通常所用的载体是聚丙烯酰胺。1963年Bernferd等^[1]最早用该法固定胰凝乳蛋白酶,番瓜蛋白酶。1966年Moshach和Mosbach^[2]利用此方法固定了地衣Umbilicaris Pustulata的枝芽。聚丙烯酰胺包埋细胞的第一次应用是一种甾族化合物(Reichstein化合物S)立体特异的11- β 羟化作用,用分批法生成皮质醇^[3]聚丙烯酰胺包埋技术应用于工业开始于1973年,已成功地利用聚丙烯酰胺凝胶包埋细胞连续生产尿酸, L-瓜氨酸和 L-天门冬氨酸等^[3]。

一般认为酶对热是很不稳定的。化学聚合过程中的放热以及引发剂的加入都可能使酶失活。为了提高固定化酶的活力回收,尝试用辐射聚合的方法,因为辐射聚合可以在低温下进行,从而减少了聚合热的影响。Dobo^[4]在1970年用X线照射0℃以下的丙烯酸酰胺-双丙烯酸酰胺固定胰凝乳蛋白酶。Kawashima和Umeda^[5]研究了 γ 射线辐射聚丙烯酰胺,固定葡萄糖氧化酶、转化酶、淀粉酶和氨基酰化酶等。

本文采用辐射聚合聚丙烯酰胺包埋面包酵母细胞的方法,对辐射包埋的条件以及固定化细胞的性质进行了研究。

材料和方法

1. 材料

面包酵母:上海酵母厂出品;丙烯酸酰胺(Acr):临海化学厂出品,CP级;NN'-甲撑双丙烯酸酰胺(Bis):广州化学试剂厂出品,CP级。

2. 固定化方法

5g湿酵母(含干酵母1.5g)投放在15ml载体液中,载体液的配比是:加0.1g双丙烯酸酰胺,

* 王富军、隋澎为本院84年生化系毕业生

3.75 g 丙烯酰胺, 15 ml 生理盐水, 将所制得的悬浊液倒入玻璃反应器里, 反应器经氮气饱和, 搅匀悬浊液, 立即将反应器放在杜瓦并中 (-4°C 冰盐或者 -78°C 干冰) 并置于 ^{60}Co γ 射线辐射场中进行辐照。辐照后的固定化细胞切成薄片, 在 10 目/吋筛网中挤压成小颗粒 ($\phi 2\text{ mm}$) 用蒸馏水充分洗涤以除去未包埋的酵母细胞。

3. 转化酶活力的测定

5 g 湿酵母所制备的固定化细胞, 加到 50 ml ($\text{pH } 4.6, 1.5\text{ mol/L}$) 蔗糖溶液中, 温度 28°C , 搅拌反应 1 小时, 然后用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖的量, 并据根水解生成还原糖的毫克数表示酶活力。同时, 称取 5 g 湿酵母, 按上述同样的方法测定还原糖量作为基准与固定化酵母相比较。

结果与讨论

1. 辐照对酵母转化酶活力的影响

已有报导, 葡萄糖淀粉酶、转化酶和 β -半乳糖酶, 对大剂量 γ 射线照射具有很高的稳定性^[6]。然而, 微生物细胞在大剂量辐照下会产生损伤, 多酶系统中的一些娇弱的酶失活。若采用相对低的辐照温度, 如低于 -24°C 和相对低的辐照剂量, 如低于 $5 \times 10^5\text{ rad}$, 则可以避免因辐照而使酶失活^[7]。对面包酵母自然细胞用不同剂量照射, 可以观察到, 用高达 $2 \times 10^6\text{ rad}$ 辐照剂量, 对细胞内转化酶的活力无明显影响(见图 1)

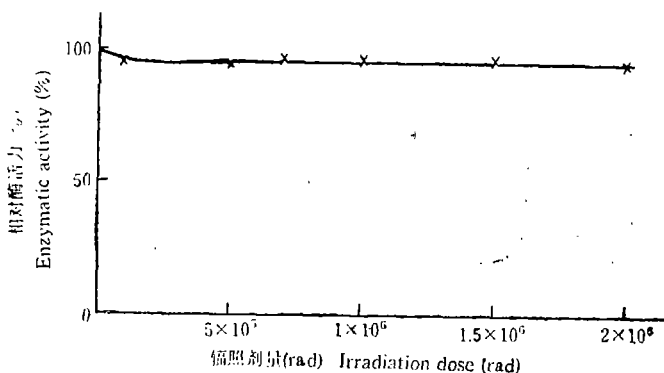


图 1 辐照剂量对酵母细胞转化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of irradiation dose on the enzymatic activity of yeast cell invertase

2. 双丙烯酸酰胺用量对固定化细胞强度和酶活力的影响

双丙烯酸酰胺是一种交联剂, 它有助于丙烯酸酰胺在较低辐照剂量下, 完成聚合交联反应生成凝胶。有人做过试验^[5], 单纯用丙烯酸酰胺辐射聚合需要高剂量(对 12% 溶液, 辐照剂量要超过 400 krad), 然而有双丙烯酸酰胺存在时, 辐照剂量明显地降低, 而且聚合物的硬度也有所改善。

双丙烯酸酰胺(Bis)与丙烯酸酰胺(Acr)的比例, 对固定化细胞的强度和相对活力有很大影响。实验发现, 当 $\text{Bis/Acr} > 10\%$ 时, 制得的固定化细胞硬而脆。 $\text{Bis/Acr} < 1\%$ 时的固定化细胞软而粘, Bis/Acr 在 3% 左右时, 固定化细胞强度较佳, 既富有弹性, 又有一定硬度, 这与一些资料所提供的数据相吻合^[8-9]。同时还发现, 在该比例范围时, 固定化细胞相对酶活力为最高(见图 2)。其原因在此比例条件下, 形成的网格结构, 既能包住细胞不易泄漏, 又能使底物和产物的扩散容易进行, 因而呈现出最高的相对活力。

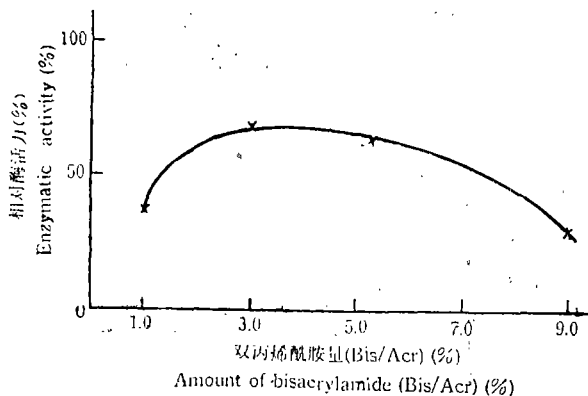


图2 双丙烯酸胺用量对酶活力的影响

包埋量: 5 g 湿细胞/15 ml 载体液, 载体液总摩尔浓度恒定, 辐照: -4°C , $6.2 \times 10^4 \text{rad}$; 粒度: $\phi 2 \text{ mm}$

Fig. 2 Effect of amount of bisacrylamide on the enzymatic activity

Entrapped amount 5 g wet cell/15 ml carrier solution, The total mol concentration of carrier solution is constant;

Irradiation: -4°C , $6.2 \times 10^4 \text{rad}$; particle size: $\phi 2 \text{ mm}$

固定化酶活力就越高。但用丙烯酸胺作载体时温度不能太低, 否则会影响聚合程度, 最终使固定化酶的强度降低。嘉悦勋^[10]认为, 当温度低于 -20°C , 丙烯酸胺本身呈结晶态, 辐射时基本不聚合。

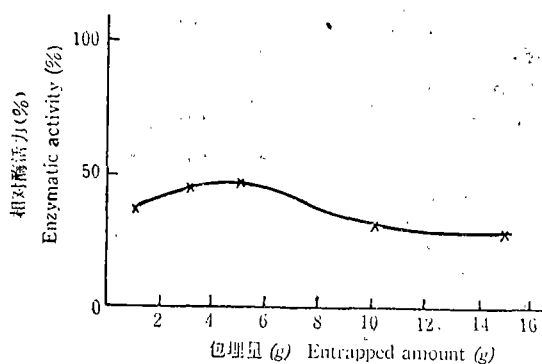


图3 包埋量对酶活力的影响

载体液: 15 ml, 辐照: -4°C , $6.2 \times 10^4 \text{rad}$
粒度: $\phi 2 \text{ mm}$

Fig. 3 Effect of entrapped amount on the enzymatic activity

Carrier solution: 15ml; Irradiation: -4°C
 $6.2 \times 10^4 \text{rad}$;

Particle size: $\phi 2 \text{ mm}$

稳定性为最好。

6. 反应时间对底物转化率的影响

在反应的最初阶段, 转化率随时间的延长而增加。在反应进行一段时间后, 底物转化率逐渐

3. 包埋不同酶量对固定化细胞活力的影响

为达到单位重量固定化细胞有最高的活力, 尽可能在相同载体量的条件下, 包埋最多的细胞量, 但是, 实际上载体的包埋量是有一个限度的。图3可以看出, 一旦超过这个限度, 单位重量的酶活力不但不会增加反而下降。这是因为大量湿细胞的加入, 使得载体溶液的浓度相对降低, 固定化细胞强度变差, 细胞的漏损趋于严重, 结果使单位重量的酶活力降低。

在包埋面包酵母时, 以每 15 ml 载体液加入 5 g 湿酵母, 固定化细胞显示的酶活力为最高。

4. 聚合温度对酶活力的影响

酶一般对热是很敏感的, 聚合反应常常是放热的。因此, 聚合时的温度对固定化酶活力有很大的影响。通常聚合温度越低, 所得的固定化酶活力就越高。但用丙烯酸胺作载体时温度不能太低, 否则会影响聚合程度, 最终使固定化酶的强度降低。嘉悦勋^[10]认为, 当温度低于 -20°C , 丙烯酸胺本身呈结晶态, 辐射时基本不聚合。但辐照后随反应体系温度升高, 则辐照时积蓄的活性中心引起后聚合效应而使之聚合。虽然所得到的固定化细胞的活力较高, 但强度却很差, 不同温度下包埋面包酵母, 对转化酶活力的影响也呈现同样的结果(见图4)。

5. 固定化细胞酶活力的稳定性

图5(A、B、C)画出了不同条件下, 所制得的固定化酵母细胞的酶活力与多次反应的变化关系。观察到固定化细胞经10次反应后, 酶活力基本保持不变。另外, B包埋的固定化细胞, 因聚合不完全, 在前面三次反应中细胞漏损严重, 活力下降很快。以后, 由于剩下的细胞是完全包埋住的, 故活力下降趋于平稳。C在多次反应中活力保持不变。A的活力在最初阶段虽略有下降, 但比C的要高。所以, 从反应次数试验中, 也可以看出在 Bis/Acr 等于 3% 时

稳定在70%左右,反应36小时后,转化率略有下降(见图6)。原因可能是由于细胞菌体内,还有产生CO₂气体的有氧呼吸途径的存在,产物——葡萄糖、果糖被菌体氧化利用了,所以从外观看,底物转化率下降了。

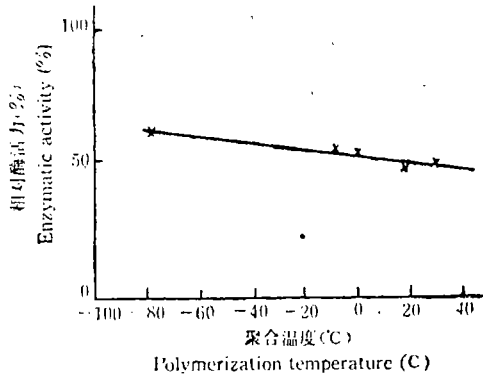


图4 聚合温度对酶活力的影响

包埋量: 5 g 湿细胞/15 ml 载体液;
辐照: 6.2×10^4 rad; 粒度: ϕ 2 mm

Fig. 4 Effect of polymerization temperature on the enzymatic activity

Entrapped amount: 5 g wet cell/15 ml carrier solution; Irradiation: 6.2×10^4 rad; particle size: ϕ 2 mm

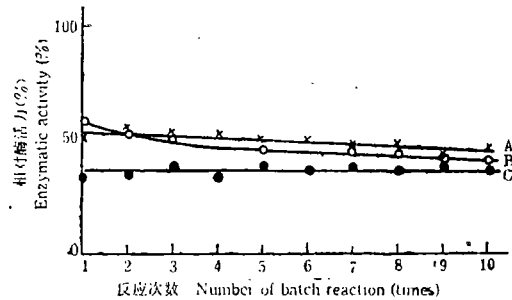


图5 反应次数与酶活力的关系

A 载体液: Bis/Acr = 3%, 0.25 Acr/1 ml 载体液;

包埋量: 5 g 湿细胞/15 ml 载体液; 辐照: -4°C , 6.2×10^4 rad;

粒度: ϕ 2 mm.

B 辐照: -78°C , 其它同A; C Bis/Acr = 5.3%; 其它同A。

Fig. 5 Relationship between the enzymatic activity and the number of batch reaction

A Carrier solution Bis/Acr = 3%, 0.25 g Acr/1 ml carrier solution; Entrapped amount: 5 g wet cell/15 ml carrier solution; Irradiation: -4°C 6.2×10^4 rad;

particle size: ϕ 2 mm;

B Irradiation: -78°C The other same as A;

C Bis/Acr = 5.3%, The other same as A.

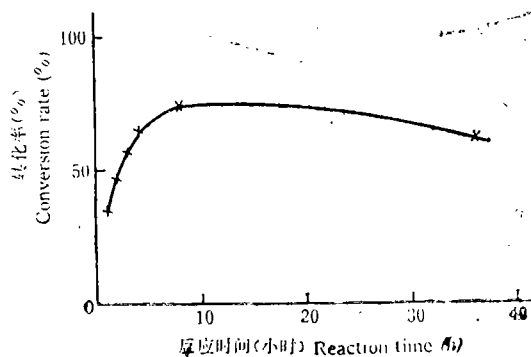


图6 反应时间与底物转化率的关系

包埋量: 5 g 湿细胞/15 ml 载体液; 辐照: -4°C , 6.2×10^4 rad.
粒度: ϕ 2 mm.

Fig. 6 Relationship between the reaction time and the conversion rate of substrate

Entrapped amount: 5 g wet cell/15 ml carrier solution;

Irradiation: -4°C 6.2×10^4 rad;

Particle size: ϕ 2 mm.

参 考 文 献

- [1] P. Bernferd, *Science*; 142, 678 (1963).
- [2] K. Mosbach and R. Moshach, *Acta. chem. Scand*; 20, 2807 (1966).
- [3] T. R. Jack and J. E. Zajic, *Adv. Biochem. Eng.*, 5, 125~145(1977).
- [4] 嘉悦勋, *高分子*, 26(3), 198~202 (1977).
- [5] K. Kawashima and K. Umeda, *Biotech Bioeng*; 16, 609~621 (1974).
- [6] H. Maeda and H. Suzuki, *Proc Biochem*; 12(6), 9~12 (1977).
- [7] M. Kumakura, M. Yoshida and I. Kaetsu. *Biotech Bioeng.*, 21, 679~688 (1979).
- [8] 北京师范大学生物系生物化学教研室, 基础生物化学实验, pp 52~55, (1982). 人民教育出版社.
- [9] 莽克强, 徐万正, 方荣洋, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 8~110(1975), 科学出版社.
- [10] 嘉悦勋, 董良昶, 汪森燧, 祁关泉译, 低温过冷态聚合反应及其应用的研究, 上海科技大学译(1980). (交流资料)

(1985年6月26日收到)

IMMOBILIZATION OF BAKER'S YEAST BY RADIATION-INDUCED POLYMERIZATION OF ACRYLAMIDE

Su Zongxian Cao Jin Wang Fujun Sui Peng

(*East China Institute of Chemical Technology*)

ABSTRACT The method for entrapment of Baker's yeast cell with invertase activity by ^{60}Co radiation-induced polymerization of acrylamide has been studied.

Acrylamide was used as a carrier and N, N'-methylene bisacrylamide as a cross-linking reagent. The influence of immobilized conditions (such as irradiation dose, polymerization temperature, amount of yeast and cross-linking reagent) on the enzymatic activity has been investigated. From the experiments it was found that the irradiation dose until 2×10^6 rad has not a significant effect on the enzymatic activity. The immobilized cell which was prepared according to the optimum conditions was not only elastic but also hard and exhibited higher activity recovery. After the repeated use 10 times of batch reaction the enzymatic activity didn't change.

KEY WORDS Radiation-induced polymerization; Acrylamide; Invertase; Sucrose.