

大孔树脂固定化葡萄糖异构酶及其动力学研究^{*}

刘建忠 陈石明 杨惠英 计亮年

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要 研究了用大孔径聚丙烯腈树脂固定化葡萄糖异构酶的方法及固定化酶的性质. 固定化酶活力达到 $4.629 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 左右. 同时研究了固定化酶的反应动力学, 测得其米氏常数 $K_m = 6.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最大反应速度 $V_{\max} = 1.40 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

关键词 葡萄糖异构酶, 固定化, 聚丙烯腈树脂, 酶反应动力学

分类号 Q 558

葡萄糖异构酶 (GI) 主要是胞内酶, 它能转化葡萄糖为果糖, 从而制备高果糖浆. 由于微生物酶的固定化技术的发展, 至今已发展了多种葡萄糖异构酶固定化方法, 但还没有一种十分完善的方法.

由于聚丙烯腈树脂 (PAN) 的孔径是葡萄糖异构酶分子大小的 2 倍, 且具有高比表面积, 因此非常有利于 GI 分子的吸附固定化. 用 PAN 固定化酶在国外曾有报导, 如固定化 α -淀粉酶^[1], 但在国内还未见有报导. 为此本文以 PAN 为载体, 进行固定化葡萄糖异构酶, 同时对该固定化酶的动力学进行了研究, 希望能找到一种具有工业应用价值的方法.

1 材料与方法

(1) 葡萄糖异构酶的制备: 玫瑰红暗黄链霉菌 A₉ (本室保藏) 在 30℃, 250 r/min 转速下摇床培养 3 d 后, 延长发酵 12 h, 使 GI 释放出来, 然后过滤除渣, 滤液在 65~75℃ 下处理 10 min, 即可冰箱保存备用.

(2) 酶活力的测定: 按文献 [2, 3] 方法进行测定.

(3) 聚丙烯腈树脂 (PAN): 由华南师范大学化学系提供.

(4) PAN 预处理: PAN 在使用前用苯浸泡处理 2~3 次, 每次浸泡 4 h (苯/PAN = 20 mL/g); 用 95% 乙醇洗涤除去残留的苯后, 再分别用 2 mol/L HCl 溶液、2 mol/L NaOH 溶液及蒸馏水洗涤去除其它杂质, 即可.

2 结果与讨论

2.1 GI 的固定化

(1) 酶液量对 GI 固定化的影响: 称取 1 g PAN, 加入不同体积酶液及磷酸缓冲液 (pH 7.6), 于 45℃ 下振荡吸附 14 h, 测定固定化酶活力 (单位为 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 下同). 结果见表 1. 可见酶液量与 PAN 比例为 75: 1 (mL/g) 为最佳. 酶液量过大, 固定化酶活

^{*} 国家教委博士点基金 (8855803) 和广东省高校重点学科基金资助项目

收稿日期: 1997-01-17 刘建忠, 男, 30 岁, 讲师

力反而下降,这与酶液中其它杂质(蛋白质、多糖等)的增加,从而产生竞争性吸附有关.

(2) 固定化时间的影响: 其它条件不变,改变振荡吸附时间进行固定化,其结果见表 2 由此可见,吸附 14 h 固定化酶活力随时间而提高; 14 h 后基本不变.

(3) pH对固定化的影响: 其它条件不变,添加不同 pH值的磷酸缓冲液进行固定化,其结果见表 3. 可看出 pH 7. 0~ 7. 6 范围,能提供 GI合适的离子强度环境以固定. pH过高或过低都不适合.

(4) 温度对固定化的影响: 其它条件不变在不同温度下进行振荡吸附固定化,其结果见表 4. 由此可看出,升高温度有利于酶的吸附,但温度过高,酶易失活.

表 1 不同酶液量对固定化的影响
Tab. 1 Effect of volume of enzyme on immobilization

(酶 /PAN) (mL/g) 固定化酶活力		(酶 /PAN) (mL/g) 固定化酶活力	
25	1. 893 4	100	2. 296 8
50	2. 165 0	125	2. 013 3
75	2. 436 6		

表 2 吸附时间对固定化的影响
Tab. 2 Effect of time on immobilization

时间 h	固定化酶活力	时间 h	固定化酶活力
2	1. 156 3	14	3. 205 5
6	1. 955 2	18	3. 063 7
10	2. 630 4	22	3. 091 7

表 3 pH对固定化的影响
Tab. 3 Effect of pH on immobilization

pH	固定化酶活力	pH	固定化酶活力
6. 0	1. 311 3	7. 2	3. 321 1
6. 4	1. 929 5	7. 6	3. 326 4
6. 8	2. 708 6	8. 0	2. 165 7

表 4 温度对固定化的影响
Tab. 4 Effect of temperature on immobilization

温度 ℃	固定化酶活力	温度 ℃	固定化酶活力
30	1. 751 5	45	2. 512 5
35	1. 831 5	50	2. 238 9
40	2. 268 8		

2. 2 固定化酶的性质

(1) 固定化酶的热敏性: 由于固定化酶与游离酶一样都是一种蛋白质,葡萄糖的转化及酶的保藏都与温度有很大的关系. 为此我们研究了 PAN固定化 GI及游离酶的最佳转化温度及热稳定性,结果见图 1. 从中可看出,固定化 GI的最适转化温度(70℃)比游离酶(85℃)低,这更有利于降低葡萄糖转化为果糖的成本. 固定化 GI在温度高于 70℃保存 12 h 后其活力明显下降,而游离酶则要高于 80℃后其活力才下降,这要求固定化酶尽量在低温保存.

(2) pH对固定化酶活性的影响: 同样我们就固定化 GI及游离酶的最适 pH与 pH稳定性进行了比较,结果见图 2. 发现固定化 GI的最适转化 pH比游离酶稍高,但考虑到高 pH易使酶脱落,并且产生颜色,影响产品色泽,故实际操作中采用 pH 7. 6为宜; 固定化酶与游离酶的 pH稳定性随 pH升高而提高,当 pH大于 7. 6时,其稳定性趋于稳定. 所以固定化 GI一般应湿法在微碱性条件下保存较好.

(3) 金属离子对固定化酶活性的影响: 由于 GI是一种金属酶,其活性中心是含钴的配合物,因此金属离子对其转化葡萄糖有很大的影响,为此我们进行了不同浓度 Mg^{2+} 、 Fe^{3+}

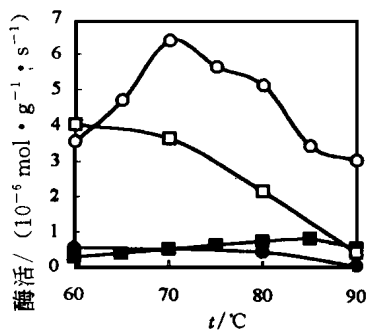


图 1 温度对葡萄糖异构酶的影响

Fig. 1 Effect of temperature on GI

(○) 固定化酶转化温度; (■) 游离酶的转化温度; (×) 固定化酶转化 pH; (□) 游离酶的转化 pH
(□) 固定化酶温度稳定性; (●) 游离酶的温度稳定性 (○) 固定化酶 pH 稳定性; (+) 游离酶的 pH 稳定性

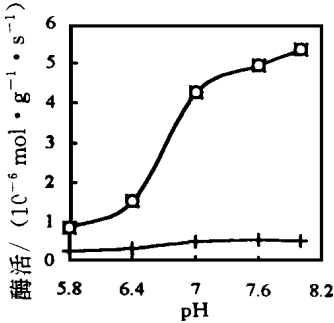


图 2 pH对葡萄糖异构酶的影响

Fig. 2 Effect of pH on GI

Co^{2+} , Ca^{2+} 对固定化 GI 转化反应的影响, 结果见图 3. 由此可看出, Mg^{2+} , Co^{2+} 对固定化 GI 有一定的激活作用, 但其浓度超过一定范围时都有抑制作用, 这主要与离子强度增大对酶产生抑制作用有关; 而且 Co^{2+} 的激活作用比 Mg^{2+} 弱. Fe^{3+} , Ca^{2+} 对固定化 GI 都有抑制作用, 而且还随离子浓度增大, 其抑制就愈剧烈; 因此实际生产中要求酶柱不能用金属材料制备, 而且要注意生产用水的硬度.

2.3 固定化 GI 反应动力学

根据酶促反应动力学——米氏方程, 在葡萄糖浓度 (c_G) 为 0.19~ 3.11 mol/L 的范围内, 在 70°C、pH 7.6 时测定固定化 GI 的活力, 即相对反应初速度 (V), 以 $1/V$ 对 $1/c_G$ 作图, 结果见图 4. 求得米氏常数 $K_m = 6.00 \text{ mol/L}$, 最大反应初速度 $V_{\max} = 1.40 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

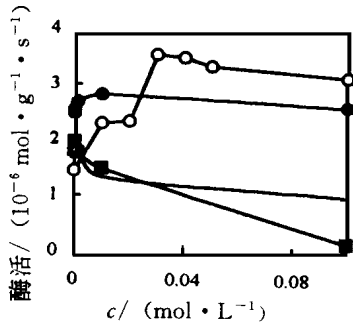


图 3 金属离子对固定化葡萄糖异构酶的影响

Fig. 3 Effect of metal iron on immobilization GI

(○) Mg^{2+} ; (●) Co^{2+} ; (□) Ca^{2+} ; (■) Fe^{3+}

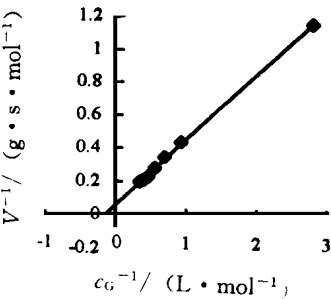


图 4 双倒数作图

Fig. 4 Lineweaver-Burk plot

参 考 文 献

- 1 Han M J, Lee K H, Kim K Y. Study on the immobilization of enzyme to polyacrylonitrile. Pol-
limo, 1985, 9 (3): 193~ 199
- 2 胡学智, 梁天锡, 仇昌明, 等. 链霉菌葡萄糖异构酶的研究. 工业微生物, 1981 (2): 1~ 11
- 3 吴麟德, 徐国强, 高殿义, 等. 固定化葡萄糖异构酶的研制报告. 天津微生物, 1980 (1): 1~ 15

Immobilization of Glucose Isomerase by Macropore Size Polyacrylonitrile Resin

Liu Jianzhong^{} Chen Shiming Yang Huiying Ji Liangnian*

Abstract The macropore size polyacrylonitrile (PAN) resin was used as a carrier for im-
mobilization of glucose isomerase. Immobilized glucose isomerase with high activity ($3.0 \times 10^{-6} \sim 6.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) was achieved. In the meantime, different conditions of
immobilization, properties of immobilized glucose isomerase and Michaelis reaction kinetics
were studied. The results showed that the highest activity of immobilized glucose iso-
merase was achieved at 70°C and $\text{pH } 7.6 \sim 8.0$. Mg^{2+} , Co^{2+} can activate and Fe^{3+} , Ca^{2+} can
inhibit the immobilized glucose isomerase. K_m for the immobilized glucose isomerase is 6.00
 mol/L , $V_{\max}$ is $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Keywords glucose isomerase, immobilization, polyacrylonitrile resin, kinetics

$c / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ $\alpha^{-1} / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 酶活 / ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 酶活 / ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
酶活 / ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) $V^{-1} / (\text{g} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1})$

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275