

辐射聚合在酶的固定化中应用概述

冯真泰 颜文礼

(应用化学系)

摘要 本文报道了低温辐射聚合固定化酶的技术及其进展,主要综述了固定化酶的活性、固定化酶的重复使用稳定性、母体结构对固定化酶活性的影响。

关键词 辐射聚合,固定化,酶

0 前言

人们为了得到固定化酶而又不破坏酶原来活性,在低温下利用辐射聚合来固定生物酶是一个新的尝试,通过辐射聚合来固定生物酶,可以对酶和微生物细胞进行有效的表面固定化。这种方法似乎可以改善以前的固定化酶方法的缺点。辐射诱导聚合固定化法是用“玻璃态”(glass-forming)单体^[1]和酶等混合在一起,于低温下通过辐射而使单体聚合,使生物酶固定。这种固定化酶的特点是:聚合后所得的组份具有多孔结构,酶可以大量地被诱捕于孔的表面区域中。在相对温和的条件下,能对多种酶进行固定,显示了此法的远大发展前途。70年代末至今,许多学者已在这方面做了不少的研究工作^[2-3],他们用来固定化酶的种类有:纤维素酶^[1-6]、葡萄糖糖化酶^[5,7-10]、 α -淀粉酶和 α -糖甙酶^[5]、葡萄糖氧化酶^[5,11]、腺酶^[11,12]、葡萄糖过氧化酶^[11]、嗜热菌蛋白酶^[13,14]、葡萄糖异构化酶^[12,15]、胰蛋白酶^[16]等。本文把前人的一些工作作一简要介绍。

1 实验方法

把“玻璃态”单体和缓冲溶液以及需固定化的酶放到玻璃安培管中,减压至0.13Pa左右,摇匀后迅速置入冷却体系中,冷却到所需的温度(0—-78℃),并在该温度下用⁶⁰Co的 γ 射线辐照,辐照量为 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ R,辐照之后,得到棒状或者微球粒状的固定化酶组份。不同的单体及不同的浓度所得到的母体有不同的形状。把所得的固定化酶在一定条件下与基物结合进行活性分析,同时对固定化酶母体结构也进行分析。

2 固定化酶的活性及其稳定性

本文1989-12-27收到。

2.1 辐照固定化酶的活性率及其重复使用的稳定性

酶活性是指在一定温度和时间下单位重量的酶使底物转化的克数, 固定化酶的活性率(%)为 $Ia/Na \times 100$ 。其中 Ia 为用于每次反应的固定化酶的活性; Na 为与用于固定化酶相同量的原酶的活性, Ia 和 Na 是在同样的条件下测得的。辐照固定化酶因反应条件的不同, 活性率在10—70%之间。如图1所示^[12, 15], (a)和(d)为同一种葡萄糖糖化酶600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (EGA)和不同的单体, 在不同的单体浓度 $[M]$ 下进行固定化后测得的酶活性率。从中可看出采用二甘醇二甲基丙烯酸酯单体(DGDA), $[M]$ 为30%时酶活性率最大, 而

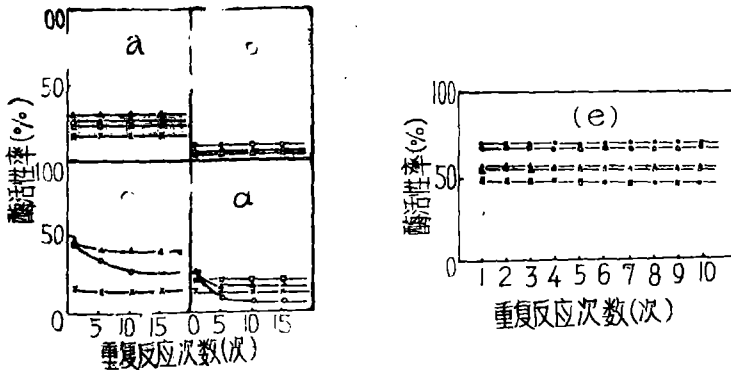


图1 用疏水单体固定化酶其重复反应次数对酶活性的影响

(a) 酶: EGA, 单体: DGDA; (b) 酶: EGI, 单体: GMA; (c) 酶: 葡萄糖氧化酶100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 单体: 聚(四乙二醇)二丙烯酸酯; (d) 酶: EGA, 单体: HA; (e) 酶: EGJ 单体: P-2G $[M]$:
 • \bigcirc —15%; \blacktriangle —30%; \blacksquare —50%; \times —70%; \bigcirc , \triangle , \square , 一未干燥处理; \bullet , \blacktriangle , \blacksquare —干燥处理, 固定化温度: -78°C , 辐射量: $1 \times 10^6 \text{ R}$, 真空状态

采用聚(六乙二醇)丙烯酸酯单体(HA)时, $[M]$ 为50%酶活性率最大; 从(b)和(e)中除了 $[M]$ 的影响外还可看出葡萄糖异构化酶50mg/ml(EGI)采用丙二醇二甲基丙烯酸酯单体(P-2G)的酶活性率比用甲基丙烯酸缩水甘油酯单体(GMA)要大得多。以上说明不同的单体和单体浓度均对固定化酶的活性率有影响。

用于固定化的单体分两种: 一种是与水相溶性较好的, 称亲水性单体(IM), 一种是与水相溶性较差的, 称疏水性单体(OM)。图1表明, 用OM单体所得的固定化酶经多次重复使用都很稳定。至于使用IM的情况, 对不同的酶都存在一个极限的单体浓度, 大于极限单体浓度, 酶经反复多次使用很稳定, 而小于极限单体浓度, 酶的初始活性较大, 而后逐渐变小。EGA酶用(2-羟乙基)甲基丙烯酸酯单体(HEMA)时, 其极限浓度为40%。对IM单体所得母体切片的厚薄与活性有关, 对EGA酶, 单体HEMA的浓度为30%时, 固定化酶的使用稳定性不好, 当单体浓度为50%时, 活性率在25%左右而很稳定, 厚薄对其几乎没有影响。

为了弥补亲水性单体或疏水性单体的各自缺点, 可以把这两种单体按不同比例混和, 以达到固定化酶活性率大, 重复使用性稳定的目的。如50%HEMA和50%(2-羟乙基)丙烯酸酯单体(HEA)共聚固定化酶, 比纯单体HEMA或HEA固定化酶的活性率都高, 重复使用稳定性也好^[8], 这可能由于HEA和HEMA结构相似之故。在不同的共聚单体中, 存在一定的

组份比,使得固定化酶的活性率较高。又如HEMA单体加入己二醇单甲基丙烯酸酯(HDMM)进行共聚,酶活性率有显著提高;而加入甲基丙烯酸甲酯(MMA)进行共聚则正好相反。总之,共聚对固定化酶活性率的影响,除与所用单体有关外,还与组份配比有关。

2.2 温度对固定化酶稳定性的影响

将酶与固定化酶分别置于相同的温度,在一定时间(一般为1 h)后测定其剩余酶的活性,从而比较固定化酶对温度的稳定性。

将固定化酶进行干燥,可以提高其热稳定性^[13,15]。酶经固定化后,在较高温度区域,其稳定性有很大提高。不同的酶经固定化后都可提高其对热稳定性,且随固定化单体浓度的提高,得到的固定化酶对热稳定性更好^[14,16]。

2.3 pH值对固定化酶稳定性的影响

把酶及固定化酶置于不同pH值的缓冲液中,测定其活性,与最佳pH值溶液时的活性相比较,得相对活性。酶经固定化后,pH值使用范围拓宽,对固定化酶进行干燥处理后,pH值使用范围更宽^[5,15]。

3 固定化酶母体结构及其影响因素

固定化酶母体结构包括母体中孔的平均直径 D 、每单位面积聚合物中的孔数 n 和孔积率 A 等参数,可通过光学显微镜图片的微观相测出。

$$D = \left[\frac{\text{平均孔面积}}{\pi} \right]^{1/2}$$

$$A(\%) = S_p/S \times 100,$$

其中 S_p 为总的孔面积, S 为微观显微镜下的总面积。

3.1 高聚物母体的结构对酶活性的影响

固定化酶母体结构参数对酶的活性有影响,若知道它们之间的相互关系,人们就可以通过控制母体结构来控制酶的活性,达到最佳酶活性的目的。

对于亲水性单体,在一定的平均孔径下,存在最大活性^[6]。这是由于酶被捕捉到聚合物表面,孔洞变小有助于增加聚合物的表面积,但也增大了底物与酶结合的阻力,因而存在一个最佳的孔直径。对于纤维素酶,平均孔径为 $0.5\mu\text{m}$ 时,活性率可达65%。对于亲水性母体,颗粒粒径增大,酶活性下降。对于疏水性母体,颗粒粒径增大($<300\mu\text{m}$),酶活性增大^[12]。这是由于对疏水性单体,若其浓度增大而颗粒数不变时,颗粒粒径变大,因而颗粒表面积也增大,使得酶活性变大。

关于高聚物母体的结构参数对酶活性的影响的实验数据还较少,两者之间的相互关系有待进一步的探讨。

3.2 聚合温度对平均粒径和平均孔径的影响

对疏水性单体体系,当聚合温度在 $-20\sim-25^\circ\text{C}$ 时,粒径陡然提高(见图2)^[12],固定化酶活性率变小。亲水性单体体系与疏水性体系不同,随聚合温度升高,平均孔径增大,到 -30°C 左右时突然显著下降(见图3)^[6]。在 -30°C 左右正好是体系从结冰到非结冰的临界点,

因而孔径的陡然变化与这个临界点有很大关系。对照图 3、4^[5]，固定化酶活性率随孔径增大而增大，这种关系可能与酶在结冰与非结冰体系中的分布有关，当在结冰体系时，酶处于

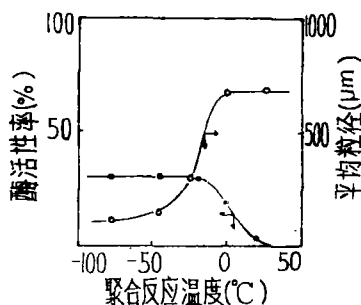


图2 聚合温度与固定化酶活性率及平均粒径的关系 (酶: EGI, 单体: 三羟甲基丙烷三丙烯酸酯, 辐射量: $1 \times 10^6 R$.)

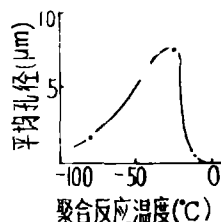


图3 多孔聚合物母体的孔径与聚合温度的关系 (单体: 十四亚乙基二丙烯酸酯, $[M] = 50\%$)

冰块与单体之间, 易被捕捉。在非结冰体系, 酶分布在水溶液内, 聚合时酶不易被捕捉到聚合物表面。由以上可知, 我们可以控制母体孔径大小来获得较理想的活性率。

3.3 单体浓度对母体结构的影响

单体浓度增大, 粒径变大, 但孔径变小^[12, 16]。另外聚合物母体孔洞的平均孔径随辐射量和单体种类的不同而不同。

3.4 单体组份对母体结构的影响

HEMA 单体与亲水性更好的单体共聚时, 孔积率一般随亲水性单体含量的增加而减少^[8], 即随亲水性和水含量增加而减少。与 HEA 共聚, 结构变化很小。这可能是由于 HEMA 与 HEA 相似结构的缘故。当 HEMA 与亲水性更差的单体共聚时, 得到的聚合物从孔状海绵形转变成微球粒子形^[8]。随非亲水性单体的增多, 平均孔径逐渐减小。在共聚结构中, 孔数的变化是由于单体和聚合体系的相变所引起的。即由于亲水性较差的单体组份含量的增加使体系从均相变成非均相所致。

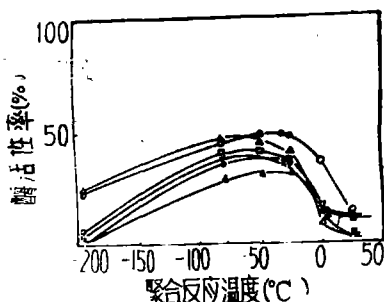


图4 聚合温度与固定化酶活性率的关系
○-α-淀粉酶 600mg/ml, 50% HEMA;
▲-葡萄糖淀粉酶, 600ug/ml, 50% HEMA;
●-葡萄糖淀粉酶 600ug/ml 30% HEMA;
×-葡萄糖氧化酶 100ug/ml, 50% HEMA;
△-α-葡萄糖苷酶 30mg/ml, 50% HEMA;
□-纤维素酶 500ug/ml, 50% HEMA; 真空辐射量: $1 \times 10^6 R$

4 结束语

通过低温辐射聚合来固定生物酶, 可以抑制由于热及辐射所引起的失活, 固定化酶的活性率可达 50% 以上, 对 pH 值及热稳定性均有所拓宽, 重复使用的稳定性好。具有生物功能的化合物主要被捕捉在载体表面区域内, 底物就很容易与酶接触从而完成催化作用。还可以广泛地选择聚合物作为母体, 通过超冷状态聚合而形成各种合适的形状。因此, 这种固定化方法, 显得很有理论意义和实际应用价值。

参 考 文 献

- [1] Kaetsu, I., Okubo, H., Ito, A. and Hayshi, K., *J. Polym. Sci. (A-1)* 10, (1972), 2203.
- [2] Higa, O.Z., Del Mastro, N.L. and Castagnet, A.C., *Radiat. Phys. Chem.*, 27 (4), (1986), 311.
- [3] Kevser, P.A., NATOASI Ser., Ser.C., 226, (1988), 17.
- [4] Yoshida, M., Kumakura, M. and Kaetsu, I., *Polym. J.*, 11, 12 (1979) 915.
- [5] Kaetsu, I., Kumakura, M. and Yoshida, M., *Biotechnol. Bioeng.*, XX1, (1979), 847.
- [6] Kumakura, M., Kaetsu, I., *Makromol. Chem.*, 184, (1983), 1831.
- [7] Yoshida, M., Kumakura, M. and Kaetsu, I., *J. Macromol. Sci. Chem.*, A14 (4), (1980), 541.
- [8] Yoshida, M., Kumakura, M. and Kaetsu, I., *J. Macromol. Sci. Chem.*, A14 (4), (1980), 555.
- [9] Yosnida, M., Kaetsu, I., *J. Appl. Polym. Sci.*, 26, (1981), 687.
- [10] Yoshida, M., Kumakura, M. and Kaetsu, I., *Polym.*, 20, (1979), 9.
- [11] Kaetsu, I., Kumakura, M. and Asano, M., *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, (1980), 139.
- [12] Kaetsu, I., Kumakura, M. and Yoshida, M., *Biotechnol. Bioeng.*, XX1, (1979), 863.
- [13] Kumakura, M., Kaetsu, I., *Helvetica Chimica Acta*, 66 (7), (1983), 2044.
- [14] Kumakura, M., Kaetsu, I., *Enzyme Microb. Technol.*, 6, (1984), 23.
- [15] Kumakura, M., Kaetsu, I., *Process Biochemistry*, May/June, (1983), 28
- [16] Kumakura, M., Kaetsu, I., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 35B, (1985), 78.

Application of Radiopolymerization to the Immobilization of Enzymes

Feng Zhentao Yan Wenli

(Department of Applied Chemistry)

Abstract The authors make a review on the immobilization technique of various enzymes by means of radiation-initiated polymerization at low temperature as well as on its recent progress. The main topics involve the activity of immobilized enzymes, the stability of their repeated use, and the effect of polymer matrix structure on the activity of immobilized enzymes.

Key words radiopolymerization, immobilization, enzymes