

# 低温辐射聚合固定化葡萄糖 淀粉酶的研究\*

颜文礼 刘毅灵 陈国华 石尔雅

(应用化学系)

**摘要** 研究葡萄糖淀粉酶与  $\alpha$ -甲基丙烯酸- $\beta$ -羟基乙酯单体的低温辐射聚合固定化, 观察载体的微孔结构, 确定单体浓度(%) 在40—60、辐射剂量在  $5 \times 10^5$ — $1.2 \times 10^6$  rad、聚合温度在-60—-70℃ 酶在载体上的担载量在40—70mg/g 之间, 所制得的固定化酶的相对活力可达45%以上的最适宜条件, 并对工业应用进行了模拟实验。

**关键词** 辐射聚合, 固定化, 葡萄糖淀粉酶

## 0 前言

用低温辐射聚合方法, 将酶固定到聚合物载体上是发展酶制剂广泛应用在工业上的一种简便、易行且适用范围广的方法, 已愈来愈受到人们的重视<sup>[1,2]</sup>。本文选择葡萄糖淀粉酶(Ec3. 213, glucoamylase), 将它配成一定浓度的水溶液与  $\alpha$ -甲基丙烯酸- $\beta$ -羟基乙酯(HEMA) 共混, 低温辐射聚合将酶固定到聚  $\alpha$ -甲基丙烯酸- $\beta$ -羟基乙酯(PHEMA) 载体上, 探讨固定化的最适宜条件以及实现工业应用的可能性。前人有用低温辐射聚合固定葡萄糖淀粉酶到聚合物载体上, 探讨固定化的机理以及微观结构等<sup>[3-5]</sup>, 1976年 O. D. Lee 曾报道用固定化葡萄糖淀粉酶进行中试, 但至今未见推广。国内还沿用液态酶水解淀粉制葡萄糖, 这样酶只能一次性使用, 利用率太低。为了提高酶的利用效率, 探讨酶实现工业应用的最适宜固定化条件等仍具有现实意义。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与设备

本文1992-04-29收到。

福建省自然科学基金资助项目, 1992年8月全国高分子学术会议(长春)论文。

葡萄糖淀粉酶(液体,食品级,无锡酶制剂厂); $\alpha$ -甲基丙烯酸- $\beta$ -羟基乙酯(AR,上海珊瑚化工厂);可溶性淀粉(化学纯,浙江,湖州菱湖食品化工厂);葡萄糖(AR,上海化学试剂厂)。

721型分光光度计(上海分析仪器厂);501型超级恒温槽(上海市实验仪器厂);YQ02-30型旋片真空泵(上海长江医疗器械厂);JSM-U3型扫描电子显微镜(日本); $^{60}\text{Co}$  辐射源(福建省农科院稻麦研究所)。

## 1.2 固定化葡萄糖淀粉酶的制备

取一定量浓度的酶液,一定量0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液( $\text{pH}=4.5$ )和一定量 $\alpha$ -甲基丙烯酸- $\beta$ -羟基乙酯单体混合成总体积为20ml的混合液,置于50ml 安培瓶中,摇匀后放到广口保温瓶中冷却到零下某一温度恒温(用工业酒精及液氮调节温度),在该温度将安培瓶抽真空封口,并用 $^{60}\text{Co}$  进行一定剂量的辐照,使单体聚合即可得到乳白色多孔棒状的固定化酶,保留在冰箱中备用。

## 1.3 酶活性分析<sup>[7]</sup>

取10ml 浓度为5%的已熟化了的透明淀粉水溶液,加入5ml0.1mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液,然后加入游离酶或固定化酶(切成约2mm<sup>3</sup>小颗粒),在45℃恒温反应1小时;立即倒出反应液,加入0.5ml2mol/LNaOH 溶液终止反应,然后将溶液稀释到适当浓度,按文献[8]的方法测定溶液中葡萄糖的含量。

# 2 结果与讨论

## 2.1 固定化酶的活性表征

酶的活性常用酶活力单位来表征。国际活力单位是指在25℃以最适底物浓度,最适缓冲液的离子浓度,以及最适  $\text{pH}$  值等条件下,每分钟能催化消耗一微摩尔( $\mu\text{mol}$ )底物的酶量定为一个活力单位。本课题主要是探讨酶 固定化后其活性与固定化前(游离酶)有何差别、差别多大呢,而不在于酶本身的活性。可采用相对活力  $E_r$  来表征, $E_r = \frac{M_2}{M_1} \times 100\%$ ,其中  $M_1$  为游离酶水解淀粉生成葡萄糖的量, $M_2$  为与游离酶同等条件下固定化酶水解淀粉生成葡萄糖的量。若  $E_r$  值接近1说明酶固定化后其活性与固定化前的游离酶基本相同,失活甚少,反之失活就严重了。

## 2.2 辐射剂量 $R$ 和聚合温度 $T$ 对固定化酶活性的影响

以单体浓度  $M=50\%$ ,酶在载体上的担载量  $E=50\text{mg/g}$ , $\text{pH}=4.5$ ,聚合温度  $T=-70^\circ\text{C}$ ,分别以不同剂量进行辐射聚合反应。所得固定化酶的相对活力与辐射剂量的关系见图1。实验结果表明:辐射剂量在  $5 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^6 \text{rad}$  之间最适宜,剂量过低或过高均使固定化酶的  $E_r$  降低。这是因为剂量过低,单体聚合反应不完善,载体骨架不结实,酶易泄漏;剂量过高,能量过大,易损伤酶的活性。两者均使固定化酶的  $E_r$  降低。

以  $M=50\%$ 、 $E=50\text{mg/g}$ 、 $\text{pH}=4.5$  和  $R=6.5 \times 10^5 \text{rad}$ ,观察不同聚合温度与固定化酶的  $E_r$  关系见图2。从中看出,聚合温度与固定化时酶的活性少受损伤,但是温度太低又不利于单体的聚合反应,故聚合温度处在  $-60^\circ\text{C} \sim -70^\circ\text{C}$  之间为宜。

## 2.3 单体浓度与固定化酶活性的关系

单体经辐射聚合后,成为酶的载体。载体的结构对固定化酶的  $E_r$  影响极大。图3为固定化

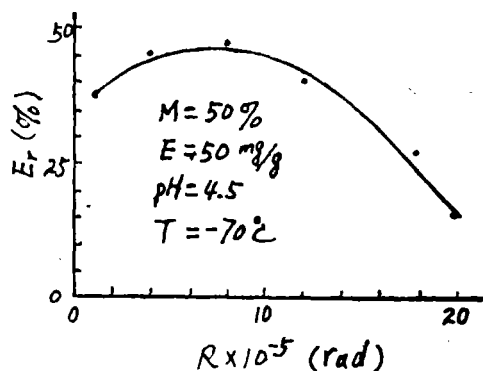


图1 辐射剂量与固定化酶相对活力的关系

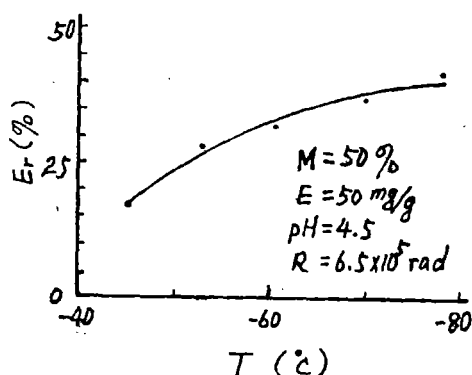


图2 聚合温度与固定化酶相对活力的关系

酶的  $E_r$  与单体浓度关系的实验结果. 从中可知, 单体浓度在40%—60%之间为宜. 过低, 经辐射聚合后载体骨架不牢, 孔洞过大, 酶易流失; 相反, 单体浓度过大, 经辐射聚合后载体的孔洞少且小. 淀粉分子要进入孔洞与孔洞内附着的酶接触进行水解反应有困难, 而反应产物葡萄糖分子要从孔洞内扩散出来亦不易, 导致固定化酶的  $E_r$  降低, 这点已与用扫描电镜测载体的微孔结构所证实, 见图4.

## 2.4 酶在载体上的担载量与固定化酶活性的关系

酶在载体上的担载量是指单位重量的载体上所担载的酶量  $E$ . 实验是在其他条件固定下 ( $M=50\%$ ,  $T=-65^\circ\text{C}$ ,  $pH=4.5$ ,  $R=7.5 \times 10^5 \text{ rad}$ ) 探讨酶的担载量与固定化酶活性的关系, 结果见图5. 当酶的担载量较小时, 固定化酶的  $E_r$  随  $E$  的增加而增大, 但是当  $E$  达到某一值后随着  $E$  继续增加  $E_r$  反而下降. 这是因为载体的比表面积是固定的, 含酶量增多, 单位比表面积上的含酶数增多, 酶分子之间相距愈来愈近, 最后因相距太近, 淀粉分子要挨近他们由于空间位阻彼此产生干扰而使水解反应不能顺利进行,  $E_r$  下降. 故实验结果表明  $E$  在40—70mg/g 之间为宜.

另外酶担载在载体上, 其稳定性如何? 我们对固定化酶进行重复使用的实验, 结果见图6. 发现在  $E=50 \text{ mg/g}$ ,  $T=-65^\circ\text{C}$ ,  $pH=4.5$ ,  $R=7.5 \times 10^5 \text{ rad}$  条件下, 固定化酶的稳定性与单体浓度有关, 当  $M=30\%$  时, 固定化酶重复使用数次后  $E_r$  下降很多. 正如前面所分析的,  $M$  低, 载体骨架不牢, 孔洞过大, 酶易流失. 而  $M$  在50%、60%和80%的固定化酶稳定性较好, 重复使用了6次  $E_r$  基本不变. 另外我们把这三种固定化酶在冰箱中或密封在室温下存放两个月再测其  $E_r$ , 发现冰箱存放的基本不变, 室温存放的约下降5%, 说明其稳定性极佳.

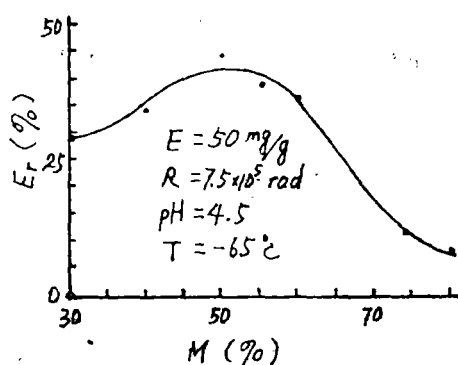
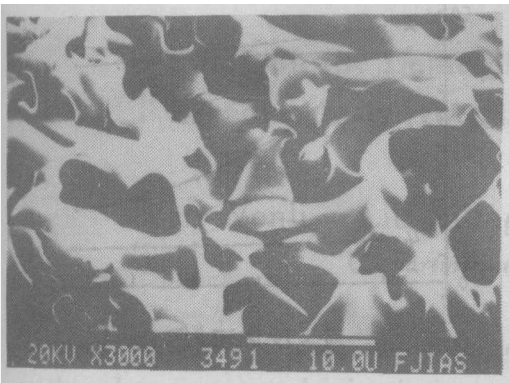
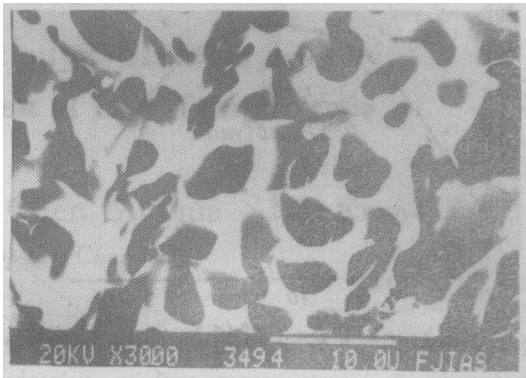


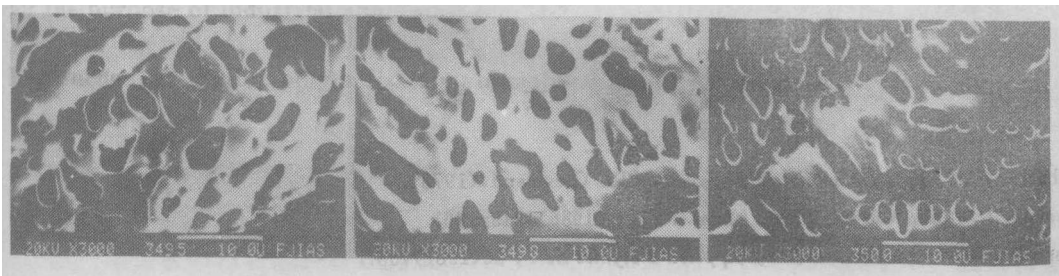
图3 单体浓度与固定化酶相对活力的关系



a(M=30%)



b(M=40%)



c(M=50%)

d(M=60%)

e(M=70%)

图4 不同单体浓度的固定化酶的扫描电镜照片

### 3 固定化酶模拟工业应用初探

为了模拟在工业上常用的间隙式搅拌罐反应器和连续式反应器,我们取1000ml 三颈瓶和55cm 直型冷凝管进行模拟实验.取500ml 浓度为10%( $pH=4.5$ )的淀粉溶液置于1000ml 三颈瓶中,在56℃恒温下加入20g 固定化酶小颗粒(含酶量为1000mg),慢速搅拌,反应到120min 后葡萄糖产率达到70%;将20g 固定化酶小颗粒填充在55cm 直型冷凝管中,夹套通56℃循环热水,将500ml 浓度为10%( $pH=4.5$ )的淀粉溶液,以20ml/min 的流速循环流经固定化酶柱,历时125min,葡萄糖产率为30%.因我们的操作条件不是两种工艺过程的最优条件,无法比较

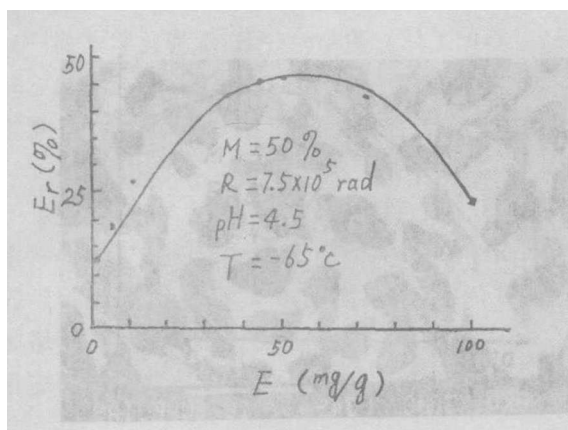


图5 酶的担载量与固定化酶相对活力的关系

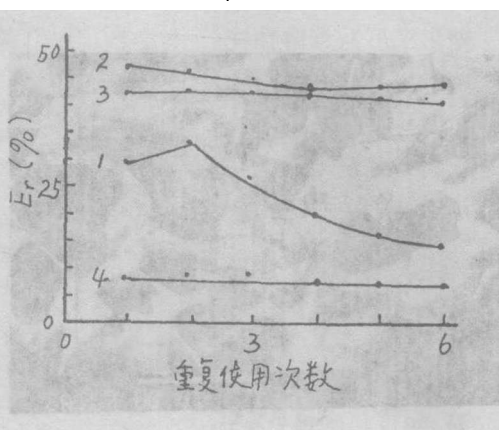


图6 固定化酶相对活力与使用次数的关系

$E=50\text{mg/g}$ ,  $R=7.5 \times 10^5 \text{rad}$

$\text{pH}=4.5$   $T=-65^\circ\text{C}$

$M$  为 1.30、2.50、3.60、4.80(%)

两种工艺过程的优劣,似乎间隙式搅拌罐反应器易于操作和实施.

## 参 考 文 献

- [1] Zabarrsky, O. R., *Immobilized Enzymes*, CRC Cleveland, (1973).
- [2] Kaetsu, I. et al, *Radiat. Phys. Chem.*, 27,4 (1986),245—263.
- [3] Yoshida, M., Kaetsu, I., *J. of Applied Polymet Sci.*, 26(1981),687.
- [4] Yoshida, M., Kumakura, M., *Kaetsu, I. Polymer*, 20(1979),3.
- [5] Yoshida, M., Kumakura, M., *Kaetsu, I. Polymer*, 20(1979),9.
- [6] Lee, O. D., *Biotechnol. Bioeng.*, 18(1976),253.
- [7] Yoshida, M. et al, *J. Macromil. Sci.—Chem.*, A14,4(1980),555.
- [8] 张惟杰主编,复合多糖生化研究技术,上海科学技术出版社,(1987),1.

## Study on the Immobilization of Glucoamylase by Irradiation Polymerization at Low Temperature

Yan Wenli   Liu Yiling   Chen Guohua   Shi Erya

(*Department of Applied Chemistry*)

**Abstract** A study is made on the immobilization of glucoamylase and  $\alpha$ -hydroxyethyl methacrylate monomer by irradiation polymerization at low temperature. A microhole structure of immobilized glucoamylase is observed by scanning electron microscopy. The optimal conditions are ascertained as follows, the concentration of monomer ranges from 40% to 60%; the radiation dose ranges from  $5 \times 10^5$  rad to  $1.2 \times 10^6$  rad; the temperature of polymerization ranges from  $-60^\circ\text{C}$  to  $-70^\circ\text{C}$ ; and the amount of glucoamylase immobilized on the PHEMA carrier is in the range of 40–70mg/g. With these conditions, the immobilized glucoamylase shows a relative activity over 45%. A simulation test is made for the purpose of industrial application.

**Key words** irradiation polymerization, immobilization, glucoamylase