

磁性高分子微球固定化中性蛋白酶的研究

李孝红* 章贤明 丁小斌 孙宗华

(中国科学院成都有机化学研究所 成都 610041)

摘 要 以表面带羟基的磁性高分子微球为载体,对位苯醌活化后,通过共价结合修饰中性蛋白酶,得到比活性为1000U/g的磁性固定化酶。偶联蛋白量20~30mg/g载体,固定化酶活性保持达40%。自由酶和固定化酶相比,最适温度从50℃变到50~60℃,最适pH从7.5变到6.5, K_m 从0.054%变到0.088%酪蛋白溶液,pH稳定性、热稳定性、贮存稳定性都有较大提高。

关键词 磁性高分子微球,中性蛋白酶,固定化

磁性高分子微球表面带有功能基团,可通过共价键来结合酶、细胞、抗体等生物活性物质,同时在外磁场作用下可方便地从反应介质中回收这些物质,因此磁性高分子微球广泛应用于固定化酶、免疫测定、亲和层析及临床诊断等领域^[1]。中性蛋白酶是最早应用于工业生产的蛋白酶,可用于皮革鞣制、食品加工、酒类澄清及医药工业^[2],但其稳定性较差,极易失活自溶,文献曾有通过酰化修饰改善其活性的报道^[3]。本文以带羟基的磁性高分子微球为载体,苯醌活化后,共价偶联中性蛋白酶,并对其固定化条件和磁性固定化酶的特性进行了研究。

1 实验部分

1.1 材 料

磁性高分子微球,粒径40~60 μ m,制备过程如下^[4]:0.1g Fe_3O_4 粉末同聚乙二醇溶液超声分散1小时。转入四口瓶中,加分散介质水-乙醇,然后加入苯乙烯(St)、甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)、二乙烯基苯(DVB)和引发剂过硫酸钾(KPS),聚合10小时,磁性分离,洗涤微球即可。中性蛋白酶(泸州酶制剂厂),用阴离子交换树脂除去蛋白质,浓缩,冻干,活性达300,000U/g(中国科学院成都生物所测定)。其余试剂为生化试剂或分析试剂。

1.2 磁性高分子微球的功能基化

将1.0g微球,10.0mL 0.1mol/L对位苯醌缓冲溶液(磷酸缓冲液PBS,pH 7.5,含20%乙醇)置于三角瓶中室温振荡2~3小时,抽滤,依次用20%乙醇、1mol/L NaCl溶液、蒸馏水洗至流出液无色为止,抽干。

1.3 中性蛋白酶固定化

将1.0g已功能基化的微球加入10.0mL酶缓冲液(pH 6.5,酶活性3871.7U/mL),在0~10℃磁搅拌40小时。混合液在磁场(4200高斯)中分离,蒸馏水洗微球至流出液无蛋白为止,得固定化酶。

1.4 酶活性和蛋白质含量的测定

自由酶的活性按文献^[5]测定,以2%酪蛋白为底物,40℃恒温10分钟,721型分光光度计680nm处测OD值。磁性固定化酶的活性测定类此。固定化酶量30mg,以1.0mL pH 6.5磷酸缓冲液(PBS)代替自由酶。

1993-12-06 收稿,1994-03-23 修回

国家自然科学基金资助项目

$$\text{固定化酶活性保持, \%} = \frac{\text{固定化酶活性}}{\text{加入酶总活性} - \text{上清液未偶联酶活性}} \times 100\%$$

自由酶和固定化酶的蛋白质按文献[5]测定,以蛋白含量为 $75\mu\text{g/mL}$ 牛血清蛋白为标准.

$$\text{偶联效率} = \frac{\text{加入总蛋白} - \text{上清液蛋白}}{\text{加入总蛋白}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 固定化过程

在本研究中,用作固定化酶载体的磁性高分子微球,内部是 Fe_3O_4 磁粉微晶,外包苯乙烯-甲基丙烯酸羟乙酯共聚高分子壳层^[4],微球表面带有 $-\text{OH}$,既可改善其亲水性,又可作为功能基团同酶等共价结合得到磁性固定化酶.微球表面的 $-\text{OH}$ 经对位苯醌活化后,与酶蛋白的 $-\text{NH}_2$ 共价结合.机理见文献[6].

2.2 固定化条件的确定

2.2.1 酶与载体的比例 在相同条件下,量取 10.0mL 酶液,改变微球重量,固定化结果如表 1 所示.随着载体/酶的比例减小,偶联蛋白量增加,活性保持在 30%~40% 范围内变化.载体用量小于 1.0g 后,偶联蛋白及酶活性的变化渐缓,同时载体/酶比例减小,固定化过程用酶量多,故确定载体用量 1.0g 为固定化条件.

表 1 载体与酶的比例对固定化的影响

载体, g	酶液		固定化酶性质		
	蛋白浓度, mg/mL	体积, mL	酶活性, U/g	偶联蛋白量, mg/g	活性保持, %
0.25	5.45	10.0	839.4	24.4	42.7
0.5	5.45	10.0	839.9	22.0	42.3
1.0	5.45	10.0	823.7	21.1	40.9
1.5	5.45	10.0	642.5	17.3	33.2
2.5	5.45	10.0	642.5	15.4	31.6

固定化时间: 40h; 酶: pH 6.5.

2.2.2 pH 对固定化的影响 在相同条件下加入不同 pH 值的 PBS, 结果见表 2. 可以看出 pH 6.5 时固定化酶活性最高, 且 pH 值对偶联蛋白量影响不大.

表 2 pH 对固定化的影响

PBS		自由酶活性, U/mL	固定化酶性质		
mol/L	pH		偶联蛋白量, mg/g	活性, U/g	相对活性, %
0.02	5.0	2903.8	24.6	545.0	67.3
0.02	6.0	3291.0	24.0	547.0	67.6
0.02	6.5	3600.7	25.9	809.7	100.0
0.02	7.0	3678.2	24.1	353.8	43.7
0.02	7.5	3871.7	25.9	96.4	11.9
0.02	8.0	2710.2	24.6	70.4	8.7

固定化时间: 40h; 载体: 1.0g; 酶 (5.45mg/mL): 10.0mL.

2.2.3 固定化时间的影响 0.5g 功能化微球, 5.0mL 粗酶溶液 (pH 6.5, 蛋白 5.45mg/mL), 分别固定化 5、10、15、20、25、30、40 小时, 洗涤后测定其活性和偶联效率, 结果如图 1 所示.

2.3 固定化酶的性质

2.3.1 最适温度 分别将固定化酶和自由酶同 2% 酪蛋白缓冲液 (pH 6.5) 在 30~70℃ 范围

内反应 10 分钟,测定其活性,对温度作图,如图 2 所示. 自由酶最适温度是 50℃,固定化酶为 50~60℃,比自由酶宽.

2.3.2 最适 pH 改变 2%酪蛋白缓冲液的 pH 值,40℃反应 10 分钟,分别测定固定化酶和自由酶的活性,对 pH 作图,结果如图 3 所示. 自由酶最适 pH 是 7.5,固定化酶为 6.5.

2.3.3 稳定性 将固定化酶在 pH 6.5~8.5 PBS 中,50℃下保温 1 小时,测定其酶活性,结果如图 4 所示. pH 6.5 时最稳定. 根据固定化条件的 pH 值,固定化酶的最适 pH 及 pH 稳定性说明,pH 6.5 是磁性高分子微球固定化中性蛋白酶的最好环境. 分别将固定化酶和自由酶

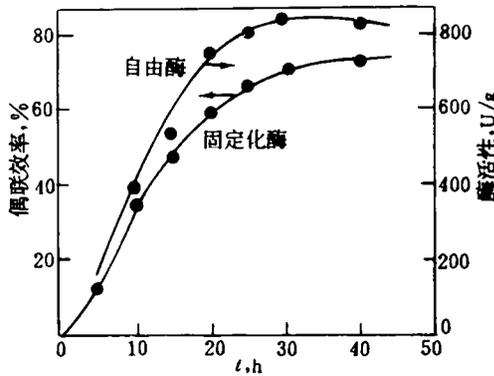


图 1 固定化时间的影响

分别将固定化酶和自由酶

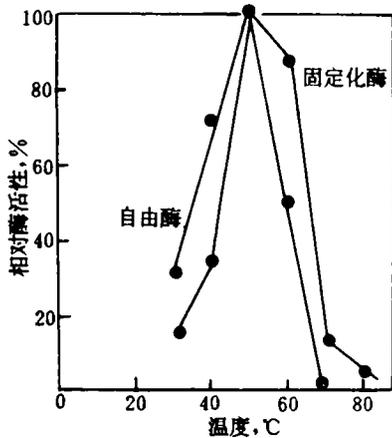


图 2 温度对自由酶和固定化酶活性的影响

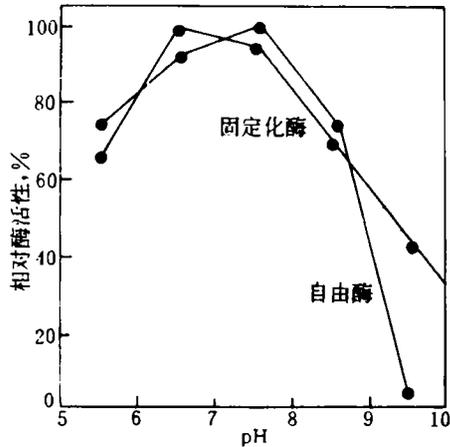


图 3 pH 对自由酶和固定化酶活性的影响

在 30~70℃范围内的恒温水浴内保温 1 小时,测定其活性,结果如图 5 所示. 固定化酶在 30~50℃比较稳定,而自由酶在 50℃迅速失活. 固定化酶和自由酶分别在 0,20℃放置 30 天. 活性为 96.4%、83.0%和 62.6%、0.2%. 固定化酶的贮存稳定性显著提高.

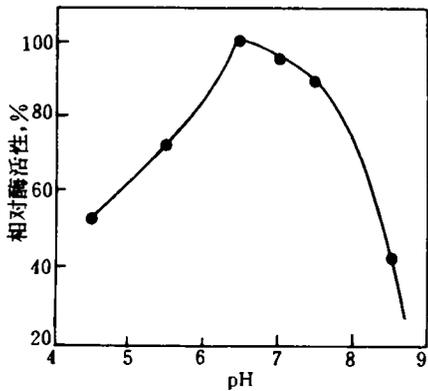


图 4 固定化酶的 pH 稳定性

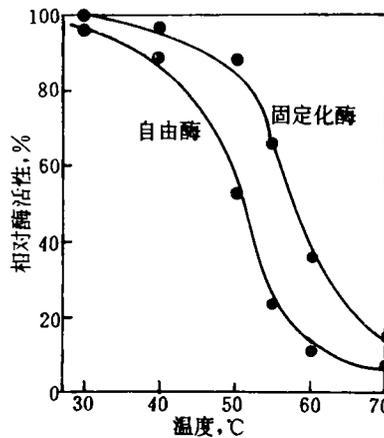


图 5 固定化酶和自由酶的热稳定性

由上面的结果可以看出,酶和分子载体结合固定化后,结构变得牢固,构象被固定,即使受热酶蛋白肽链也难以伸展,酶蛋白的高级结构得以维持,所以固定化酶的稳定性显著提高.

2.3.4 动力学常数 K_m 值 分别以 1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05% (W/V) 酪蛋白的磷酸缓冲液为底物,测定固定化酶和自由酶的活性,按 Lineweaver-Burk 法作图(图 6),求得固定化酶的 K_m 为 0.088% 酪蛋白溶液,自由酶的 K_m 为 0.054% 酪蛋白溶液. 可知,固定化酶的亲合力约为自由酶的 61.4%. 酶固定化后,其活性中心受到高分子载体的影响,具有一定的空间位阻. 在酶水解底物过程中,外部底物

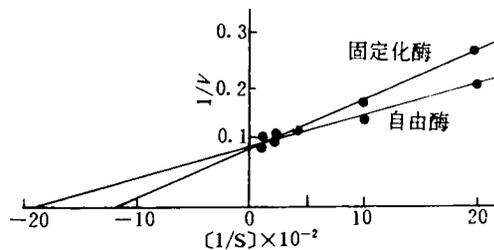


图 6 固定化酶和自由酶的 Lineweaver-Burk 曲线

溶液首先扩散到活性中心部位,这一扩散控制过程造成活性中心部位的底物浓度比外部低. 动力学常数 K_m 可理解为酶活性中心被占据一半时所需底物浓度,固定化酶活性中心的空间位阻大,所以其 K_m 值变大.

参 考 文 献

- 1 Paul Kronick, Richard W G. *J Biochem Biophys Methods*, 1986; **12**:73
- 2 Fogart W M. *Process Biochem*, 1974; **9**(7):27
- 3 Halphen M G. *Industrial Enzymes from Microbial Sources*, New Jersey: Noyes Data Corporation, 1981: 58
- 4 李孝红, 丁小斌, 孙宗华. *功能高分子学报*, 1994: 待发表
- 5 朱俭, 曹凯鸣, 周润琦等著. *生物化学实验*. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 64, 186
- 6 Johnny Bramdt, Lars-Olov Anderson, Jerker Porath. *Biochim Biophys Acta*, 1975; **386**:196

Immobilization of Neutral Protease onto Magnetic Polymer Microspheres

Li Xiaohong*, Zhang Xianming, Ding Xiaobing and Sun Zonghua

(Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract A neutral protease from *Balillus Subtilis* has been immobilized onto the magnetic polymer microspheres, which were obtained from styrene, hydroxyethyl methacrylate, divinyl benzene and Fe_3O_4 and had hydroxyl groups in the surface by covalent coupling. The magnetic immobilized neutral protease had a enzyme activity of 1000U/g, enzyme yield of 20~30mg/g carrier, and activity retention of about 40%. For both free enzyme and immobilized enzyme the optimum work temperatures were 50°C and 50~60°C, the optimum pH values were 7.5 and 6.5, and the kinetic constants were 0.054% and 0.088%, respectively. The thermal stability, pH stability, and the storage stability of the immobilized enzyme are improved obviously.

Keywords magnetic polymer microsphere, neutral protease, immobilization