葡萄糖氧化酶在管状空心 SiO_2 载体上的固定化

蒋利伟[1]　袁其朋[1*]　肖清贵[2]
(北京化工大学 1. 生命科学与技术学院; 2. 教育部超重力工程研究中心, 北京　100029)

摘　要: 以针状 $CaCO_3$ 为无机模板,制作成新型固定化材料管状空心 SiO_2 载体,用来固定葡萄糖氧化酶(GOD)。研究了 pH 值,温度和载体与 GOD 的配比等对固定化酶活的影响。所得的最佳工艺条件为:最佳载体和游离酶配比为 0.6 g/mL;固定化酶的最适 pH 值为 5.2;最佳反应温度为 32 ℃。和游离酶相比无论操作性还是稳定性都有提高。

关键词: 固定化酶; 葡萄糖氧化酶; 管状空心 SiO_2; 针状碳酸钙
中图分类号: Q814.2

引　言

葡萄糖氧化酶(GOD)和其他酶一样是由蛋白质组成,其高级结构对所处的环境十分敏感。一般情况下,对热、强酸、强碱,有机溶剂等均不够稳定,在反应中容易失活。因此,固定化葡萄糖氧化酶显得尤为重要。多种材料可应用于固定化葡萄糖氧化酶[1-3],如氨基化硅胶[4],凝胶复合物[5]等。本文以超重力反应沉淀法制备的针状碳酸钙为无机模板制备管状空心 SiO_2,并将其用于葡萄糖氧化酶的固定化。

无机载体空心管状 SiO_2 具有良好的热稳定性、机械稳定性、低毒性、高固定化率,便于底物和产物的传递并能耐微生物和有机溶剂的影响。由于管状空心 SiO_2 的独特结构和合成方法,其应用范围研究仍处于初级阶段,无机载体空心管状 SiO_2 仅在青霉素酰化霉等有限的酶上进行过固定化研究[6]。本文首次将其应用在固定 GOD 的研究上,研究了该新型载体对葡萄糖氧化酶的固定化的工艺和稳定性。

1　实验部分

1.1　实验材料

1.1.1　实验原料　葡萄糖氧化酶(保定长城临床试剂有限公司,50 u/mL);氢氧化钠,磷酸二氢钾,磷酸氢二钾,盐酸等均为分析纯。

1.1.2　实验仪器　PB-10 型 pH 计(德国赛多利斯公司),HJ-3 数显恒温磁力搅拌器(国华电器有限公司),透射电镜 H-800(日本日立公司),J2-21 型离心机(美国 Beckman 公司)。

1.2　载体制备

1.2.1　针状碳酸钙无机模板的制备　本实验采用碳化法在旋转填充床反应器中进行制备针状 $CaCO_3$,核心反应为碳化反应,即让 CO_2 气体与 $Ca(OH)_2$ 浆液在超重力反应器(旋转填充床)中接触并反应生成 $CaCO_3$。碳酸钙工艺流程如图 1 所示。

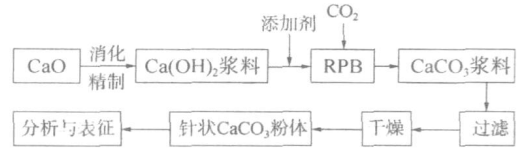

图 1　超重力碳化法制备针状 $CaCO_3$ 的工艺

Fig. 1　Flow diagram for preparation of $CaCO_3$ templates by a high gravity reactive precipitation

1.2.2　管状空心 SiO_2 载体的制备　量取超重力床生产的针状碳酸钙浆液 150 mL,分别加入去离子水 50 g 和 2.5 g 十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)搅拌均匀后,加入一定量分析纯氨水和乙醇,搅拌 15 min 后,按 SiO_2 和碳酸钙之间质量比为 0.15 到 0.2 的比例在溶液中加入正硅酸已酯(TEOS),搅拌 2 h,过滤,滤饼用适量乙醇冲洗,在烘箱中干燥,温度 90 ℃;而后放置在马弗炉中焙烧,温度 650 ℃(采用程序升温 1 ℃/min),时间为 5 h。取出后用稀盐酸溶

收稿日期: 2007-02-05
基金项目: 国家自然科学基金 (20376007)
第一作者: 男,1980 年生,硕士生
*通讯联系人
E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

解其中的碳酸钙模板,并维持溶液中的 pH 小于 1,过滤出,干燥即得管状 SiO_2 载体[6-8]。

1.3　固定化酶的制备

采用包埋法,称取一定量已制备的载体于 100 mL 烧杯中,加入 50 mL 双重水,用移液管取 1 mL 游离酶于烧杯中,在一定时间及温度控制范围内让酶固定到载体内,将载体离心取出,并用过量去离子水冲洗滤饼,以去除未被包埋的酶分子以免影响测试结果,待完全干燥后,将载体从离心管中回收,即可得到所需要的固定化酶载体样品。

1.4　固定化 GOD 酶活测定

采用滴定法进行酶活测定[9]。游离酶活力取相对活力;固定化酶活力以实际值为准。

2　结果与讨论

2.1　针状碳酸钙及管状空心 SiO_2 的形态描述

适宜的添加剂浓度,较高的反应温度,较小的气体流量,适宜的旋转床转速有利于文石型针状 $CaCO_3$ 的形成。在适宜的反应条件下,在旋转填充床中可以成功制备出直径为 0.2～0.5 μm、长度为 3.0～5.0 μm、分散性良好的针状 $CaCO_3$ 粒子,文石相比例为 88.75 %。电镜图如图 2 所示。

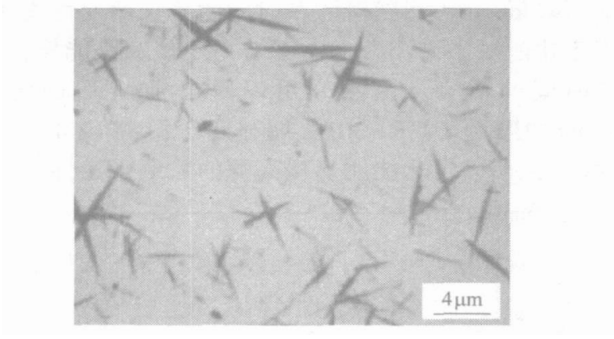

图 2　针状 $CaCO_3$ 粒子的 TEM 照片

Fig. 2　TEM images of needle-like $CaCO_3$

以针状碳酸钙为模版所制备的管状 SiO_2 载体电镜照片如图 3 所示。从图 3 中可以观察到制备的载体粒径大,基本上为管状,单分散性好,没有团聚现象。制备出来的管状空心 SiO_2 具有良好的管状结构,适宜游离酶快速扩散,而且能够固定大量的游离酶,具有很好的固定化酶和蛋白性能。

2.2　各因素对固定化酶酶活的影响

2.2.1　载体和游离酶配比对固定化酶酶活的影响

管状空心 SiO_2 具有很好的载体性能,同其他载体相比较,其特殊管道结构有利于固定化酶迅速达到

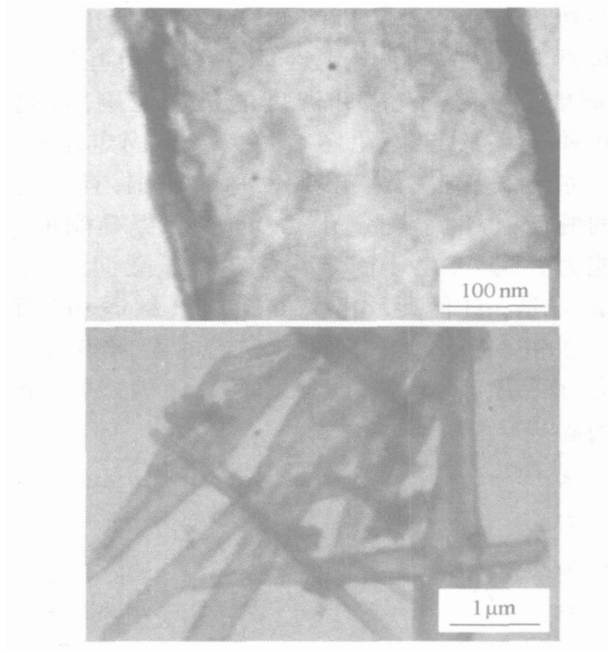

图 3　管状空心 SiO_2 载体 TEM 照片

Fig. 3　TEM images of porous hollow silica nanotubes

平衡吸附,而且能够比介孔材料容纳更多的酶。由图 4 可以看出,随着载体和游离酶配比的增加,固定化 GOD 的活力也不断增加,当其质量配比达到 0.6 g/mL 后酶活增长趋于平缓,增加配比对酶活影响不大。这是因为固定化时载体的加入量对酶的固定化有很大影响,一方面,载体的加入量越多,给酶的固定化提供了更大的空间,固定上去的酶更多,对固定化有利。另一方面,所提供的游离酶毕竟有限,即便载体再多由于游离酶数量的限制,到达一定程度后,酶的固定化达到饱和。载体量多了反而造成浪费,降低了载体的利用效率。综合考虑固定化的经济实用性,配比为 0.6 g/mL 时为最佳。

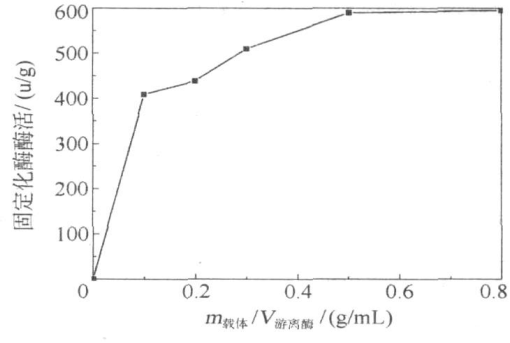

图 4　载体和游离酶不同配比对酶活回收率的影响

Fig. 4　The effect of the ratio of carrier to enzyme on the PGA loading process

2.2.2　固定化 GOD 的最适 pH 值　管状空心 SiO_2

具有的热稳定性和抗有机溶剂腐蚀的特性也比高分子材料具有更好的固定化性能。其应用在固定化 GOD 时能提高酶对 pH 和温度的适应范围,提高酶的操作和储藏稳定性,由图 5 可以看出固定化 GOD 比游离 GOD 具有更广泛的 pH 适应范围,且保持了较高的酶活,说明了固定化 GOD 能够提高酶的 pH 耐受能力。另外,由于固定化材料略显酸性,固定化 GOD 的最适 pH 值要比游离 GOD 低(最适 pH 值分别为 5.2 和 5.6)。当 pH 在 5 左右时游离酶达到最大活力,而固定化酶并未达到最适 pH 值,活力低于游离的固定化酶。

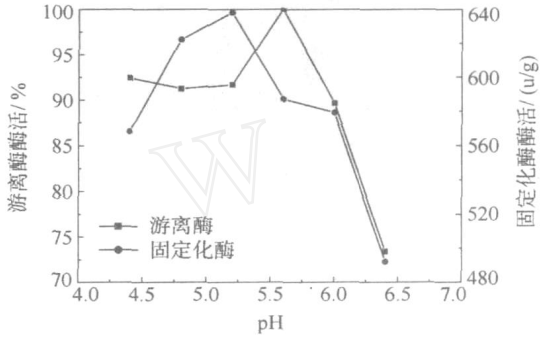

图 5 固定化 GOD 和游离 GOD 的最适反应 pH 值

Fig. 5 The effect of pH on the activity of immobilized GOD and free enzyme

2.2.3 固定化反应最适温度 随着温度的提高酶的反应速率加快,但同时 GOD 也在逐渐变性而失去活力引起酶反应速率的下降,当酶活的增长速率和酶的失活速率相等时,产生酶的最适反应温度。由图 6 可以看出,固定化 GOD 和游离 GOD 的最适温度分别为 32 ℃和 28 ℃,实验结果表明,固定化 GOD 明显比游离 GOD 有更宽的温度适应范围,提高了游离酶的耐热性,使其有了更广泛的温度应用范围。

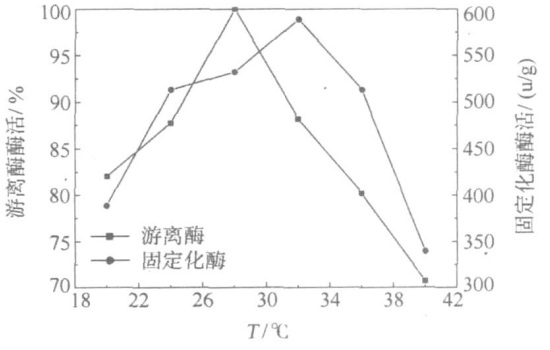

图 6 固定化 GOD 和游离 GOD 的最适反应温度

Fig. 6 The effect of temperature on the activity of immobilized GOD and free enzyme

2.2.4 固定化酶的热稳定性 将固定化 GOD 和游离 GOD 分别置于 60 ℃温水中,考察其热稳定性。结果如图 7 所示,固定化 GOD 和游离 GOD 的活性都随着时间的增加而降低,因为在高温下,酶随着时间的延长而逐渐变性,导致酶活的下降。固定化 GOD 活性的降低速率明显比游离 GOD 缓慢,这说明固定化能明显提高 GOD 的热稳定性。

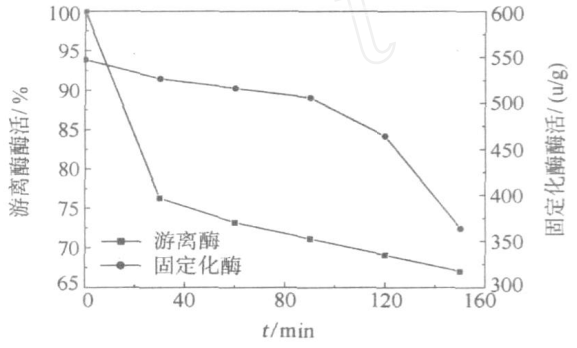

图 7 固定化酶的热稳定性

Fig. 7 The effect of storage time on the activity of immobilized GOD and free enzyme

2.2.5 固定化 GOD 的贮藏稳定性 由图 8 可以看出,固定化 GOD 和游离 GOD 的活性随着时间的增加而降低,因为酶随着贮藏时间的延长而变性失活。固定化酶对于游离酶的一个实用优势就是能保存更长时间的活力。由图 8 可以看出 10 d 后固定化 GOD 的酶活仍高于 50 %,明显高于游离 GOD 的活性,这说明固定化能明显提高酶的贮藏稳定性。

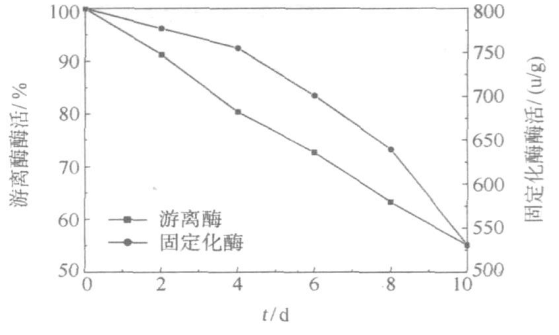

图 8 固定化 GOD 的贮藏稳定性

Fig. 8 The stability of stored immobilized GOD

3 结论

以针状 $CaCO_3$ 为无机模板,制作成新型固定化材料管状空心 SiO_2 载体,用来固定葡萄糖氧化酶(GOD)。所得的最佳工艺条件为:最佳载体和游离

酶配比为 0.6 g/mL;固定化酶的最适 pH 值为 5.2;最佳反应温度为 32 ℃。和游离酶相比无论操作性还是稳定性都有提高。

参考文献:

[1] GODJEVARGOVA T, NENKOVA R, KONSULOV V. Immobilization of Glucose Oxidase by Acrylonitrile Copolymer Coated Silica Supports[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 38: 59 - 64.

[2] OH C, LEE J H, LEE Y G, et al. New Approach to The Immobilization of Glucose Oxidase on Non-porous Silica Microspheres Functionalized by (3-aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS)[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006, 53: 225 - 232.

[3] YANG Y M, WANG J W, TAN R X. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO_2 gel[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34: 126 - 131.

[4] 钱军民, 李旭祥, 锁爱莉. 氨基化硅胶固定化葡萄糖氧化酶的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(3): 394 - 397.

[5] 钱军民, 李旭祥. HEC/SiO_2 凝胶复合物包埋固定化葡萄糖氧化酶的研究[J]. 应用化学, 2002, 19(2): 153 - 157.

[6] XIAO Qinggui, TAO Xia, ZHANG Jieping, et al. Hollow silica nanotubes for immobilization of penicillin G acylase enzyme[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 42: 14 - 19.

[7] CHEN Jianfeng, WANG Jiexin, LIU Runjing, et al. Synthesis of porous silica structures with hollow interiors by templating nanosized calcium carbonate[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2004, 7: 447 - 449.

[8] DING Haomin, SHAO Lei, LIU Runjing, et al. Silica nanotubes for lysozyme immobilization[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 290: 102 - 106.

[9] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1978.

Hollow silica nanotubes for immobilization of glucose oxidase enzyme

JIANG LiWei[1]　YUAN QiPeng[1]　XIAO QingGui[2]

(1. College of Life Science and Technology; 2. Research Center of the Ministry of Education for High Gravity Engineering and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Porous hollow silica nanotubes (PHSNTs) have been synthesized via a sol-gel route using nano-sized needle-like $CaCO_3$ as the inorganic template and employed as a support for immobilization of Glucose Oxidase enzyme (GOD) biocatalyst. The effect of varying factors such as phosphate buffer pH, immobilization temperature and ratio of carrier to free GOD (g/mL) on the activity of immobilized GOD are discussed. The optimum conditions were found to be as follows: ratio of carrier to free GOD (g/mL) 0.6 g/mL, phosphate buffer pH 5.2, immobilization temperature 28 ℃. The results show that under optimized conditions the efficacy and stability of GOD are improved relative to the free enzyme.

Key words: enzyme immobilization; glucose oxidase enzyme (GOD); hollow silica nanotubes; needle-like $CaCO_3$