磁性生物活性玻璃共固定葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶的研究

李丕武[1]，李瑞瑞[1]，刘佃磊[1]，闵丹丹[2]，杨晴[1]，郝琼[1]
（1. 齐鲁工业大学食品与生物工程学院，山东济南 250353）
（2. 齐鲁工业大学材料科学与工程学院，山东济南 250353）

摘要：生物活性玻璃具有良好的生物相容性和生物活性，利用其进行酶的固定化是一种新的实验理念。本文对生物活性玻璃进行改性，加入一定量乙二醇利用溶胶-凝胶的方法制备了表面具一定磁性的磁性生物活性玻璃微球，并利用该微球对葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶进行固定。实验表明，同时固定两种酶比单独固定效果更为显著。之后将GOD-CAT以一定的比例分别在传统水相和有机相二恶烷中进行共固定化，比较水相共固定化酶和有机相共固定化酶的酶比活力和酶学性质，找到了最佳的固定介质。实验表明，戊二醛浓度为0.4%，加酶活力比GOD:CAT为1:2，二恶烷含水量1.5%时，GOD的表观酶活回收率达到90.25%；而传统水相中，GOD的表观酶活回收率最大仅为72.18%。连续使用10次后，有机相固定化酶活为初始值的67.30%，而传统水相中酶活仅为初始值的44.33%。

关键词：葡萄糖氧化酶；过氧化氢酶；共固定；相对酶活
文章篇号：1673-9078(2013)9-2180-2185

Co-immobilization of Glucose Oxidase and Catalase on Magnetic Mesoporous Bioactive Glasses

LI Pi-wu[1], LI Rui-rui[1], LIU Dian-lei[1], MIN Dan-dan[2], YANG Qing[1], HAO Qiong[1]
(1.School of Food and Bioengineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353,China) (2.Shandong Provincial Key Laboratory of Processing and Testing Technology of Glass and Functional Ceramics, Jinan 250353, China)

Abstract: Due to the biocompatibility and bioactivity, bioactive glasses is consider as a new type of carrier for enzymes immobilization. In this paper, the bioactive glasses was modified to be magnetic using the sol-gel approach and polyethylene glycol (PEG) and was used to immobilize glucose oxidase and catalase. Co-immobilization was much more better than individual immobilization of the two enzymes. The special activities and enzyme characterization were determined and the best medium was selected. Under the conditions of 0.4% glutaraldehyde, 1.5% moisture, and glucose oxidase:catalase of 1:2, the enzyme recovery of glucose oxidase reached 92.25%. In aqueous phase, the maximum enzyme recovery was only 72.18%. After 10 repeated use, the residue activities of the immobilized enzyme in organic solvent and aqueous phase were 67.30% and 44.33%, respectively.

Key words: glucose oxidase; catalase; co-immobilization; relative enzyme

葡萄糖氧化酶(GOD)是一种氧化还原酶，在O_2充足条件下，它能够快速专一地催化β-D-葡萄糖为β-D-葡萄糖酸和H_2O_2[1]；过氧化氢酶（CAT）以H_2O_2为专一底物通过催化一对电子的转移而最终将其降解为H_2O和O_2，用于去除过量H_2O_2[2~3]。在GOD的催化体系中引入CAT，即将两种酶固定于同一体系，GOD催化反应生成的H_2O_2扩散至CAT微环境的距离就会缩短，两种酶的使用效率都得以提高。

国内外众多学者尝试不同的共固定化的方法来提高两种酶的利用率。徐小艳等以GOD及CAT协同作用提纯商品异麦芽低聚糖，有效除去其中的葡萄糖，提高异麦芽低聚糖浓度[4]；管文军等[5]采用新型共固定化技术将GOD和CAT共固定在同一载体-尼龙66膜上，并制备出可检测血糖浓度的试纸用于临床检验；Sisak等[6]利用阴离子交换树脂Amberlite UP 900对GOD及CAT进行共固定，并设计了反应器用于去除鸡蛋清中的葡萄糖；崔凤霞等[7]以弱碱性阴离子交换树脂D301T为载体，对GOD和CAT两种酶进行分次固定。以上研究均表明固定化酶相对于游离酶有更好的操作稳定性和重复利用性。

但现有的制备共固定化GOD-CAT的工艺存在许

收稿日期：2013-05-03
基金项目：国家高技术研究发展计划（863计划）（SQ2010AA0222655001）
作者简介：李丕武（1970-），男，博士，教授，研究方向：微生物酶技术

多不足：如将GOD-CAT共固定在尼龙66膜上，尼龙材料的强疏水性会导致固定化酶的大量损失，另外将酶直接固定在膜表面，与膜表面距离太近，形成大量细小的缝隙会阻碍血液大分子传递，甚至堵塞；GOD和CAT分次固定进而实现共固定，每次只固定一种酶，然而在相同条件下同一种酶带相同电荷，会互相排斥，固定化材料上的功能性官能团（如-NH_2，-COOH等）很难实现充分利用等。

本实验针对当前共固定化GOD-CAT工艺的不足，制备了磁性生物活性玻璃微球并用其实现GOD-CAT的共固定。磁性生物活性玻璃具良好的生物相容性及生物活性；原料成本较低且制作过程简单，清洁安全；固定化酶半衰期长，可重复利用10次以上。与其他固定化材料相比，本实验制备的磁性生物活性玻璃微球的最显著特性是具一定的磁响应性，易于从反应体系中分离。

本实验采用水相和有机相固定化酶这一设计，通过比较找到了固定化效率最高的介质为含水量1.5%的二恶烷。在此介质下，酶活回收率最高可达90%以上，并且连续使用10次剩余酶活仍高于60%，固定化效果较国内外其他固定化材料十分显著。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

葡萄糖氧化酶（Sigma:G-7141）；辣根过氧化物酶（Sigma:C9322）；葡萄糖，潍坊盛泰药业有限公司；25%戊二醛，国药集团化学试剂有限公司；二恶烷，天津市富宇精细化工有限公司；SBA 生物传感分析仪，山东省科学院生物研究所；Eppendorf 5084R 冷冻离心机，Eppendorf 公司；磁力搅拌器，江苏省荣华仪器制造有限公司。

1.2 生物活性玻璃微球的制备及活化

（1）将一定量柠檬酸溶解于无水乙醇的水溶液中，磁力搅拌 10 min。

（2）将前驱体原料正硅酸乙酯（TEOS）、磷酸三乙酯（TEP）、四水硝酸钙、六水硝酸镁按顺序加至上述溶液中，形成溶胶 A；将一定量聚乙二醇-2000溶于无水乙醇的水溶液中，形成溶液 B。

（3）将溶胶 A 缓慢加入溶液 B 中并搅拌 4 h；将充分水解的溶胶装入密封的 50 mL 离心管于 60 ℃水热老化 24 h；之后湿凝胶取出于 60 ℃干燥 24 h。

（4）将烘干的干凝胶研磨后置入高温炉中以600 ℃热处理2 h，研磨无需过筛即可得到分散良好的生物活性玻璃微球颗粒。

按戊二醛溶液/生物活性玻璃10 mL/g的比例混合加入一定浓度的戊二醛水溶液，活化2 h后洗至中性，充分干燥备用。

1.3 固定化GOD-CAT的制备

水相组：将GOD:CAT按活力比1:1-6溶解于0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液（pH 4.5），制成 1 mg/mL的酶液。取1 mL加入到0.1 g的固定化材料中，室温交联反应15~20 h，之后离心弃上清，洗去表面未交联的酶，得固形物即固定化酶，干燥备用。

有机相组：将GOD:CAT按活力比1:1~6溶解于2 mL蒸馏水，取0.1 mL加入0.1 g固定化材料和0.9 mL含水量0.5~2.5%的二恶烷。其它操作同上。

1.4 分析方法

1.4.1 相对酶活定义及测定方法

具有相同酶蛋白量的固定化酶与游离酶活力的比值成为相对酶活。相对酶活是表征固定化效率的重要参数。

按照质量百分比10%的比例配制葡萄糖溶液，在装有挡板的三角瓶中加入葡萄糖溶液50 mL，同时加入1.3所得的固定化材料0.1 g，进行氧化的同时用生物传感分析仪测定残糖量，氧化温度25~85 ℃，氧化时间0~16 h，pH 4.0~8.0，残糖低于0.3%时氧化结束，氧化结束后回收固定化酶，测定重复利用次数。以葡萄糖转化率表观酶活性，葡萄糖转化完全时转化率为100%。

1.4.2 GOD-CAT固定化条件的优化

（1）MgO和聚乙二醇添加量

在生物活性玻璃配方（50% SiO_2、46% CaO、4% P_2O_5）基础上，用MgO替代CaO，MgO的加入量分别为0、5%、10%、15%；PEG-2000加入量分别为0、10%、20%，分别制得1-12号改性生物活性玻璃。产品标号对应的配方见表1：

表 1 12 种材料配方

Table 1 12 kinds of materials

PEG	MgO/%			
/%	0	5	10	15
0	1	2	3	4
10	5	6	7	8
20	9	10	11	12

（2）戊二醛浓度

将制备好的固定化酶置于戊二醛浓度0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%及1.2%的HAc-NaAc缓冲液中，于25 ℃恒温水浴锅中交联15 min，用上述缓冲液淋洗至

滤液中无戊二醛，得固定化酶，测GOD酶活并4 ℃保存备用。

（3）GOD-CAT加酶比例

上述优化的最佳戊二醛浓度，尝试GOD-CAT加酶比例1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6进行水相和有机相（含水量1.5%）固定化，测GOD酶活。

（4）有机相-二恶烷含水量

上述优化的GOD-CAT加酶比例，有机相组分别使用含水量0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%的二恶烷进行GOD-CAT的有机相固定，测GOD酶活。

以各系列实验中酶活最高者为100%，用相对酶活和酶比活表示各实验结果。

1.4.3 固定化GOD-CAT的酶学性质分析方法

以下实验均按1.4.2的最佳优化条件进行有机相与水相固定化，酶活性测定按照1.4.1方法。

（1）最佳温度

分别在25 ℃、35 ℃、45 ℃、55 ℃、65 ℃、75 ℃和85 ℃测定固定化酶酶活；

（2）最佳pH

上述最佳反应温度下，分别在pH 4.0、5.0、6.0、7.0和8.0测定固定化酶酶活；

以葡萄糖转化完全时转化率为100%，用葡萄糖转化率来表示不同温度及pH下固定化GOD-CAT活性变化情况。

（3）热稳定性和pH稳定性

水相和有机相固定的GOD-CAT置于三角瓶中，65 ℃水浴孵化2 h和pH 6.0的缓冲液中4 ℃处理3 h，每30 min取样测定残留酶活。

以未处理前的固定化酶活力最高者为100%，以酶比活力和相对酶活来表示固定化酶随热处理时间不同的酶活变化情况。

（4）重复利用次数

在最佳温度和pH条件下，固定化酶活每测定一次，离心弃上清，并用0.2 mol/L（pH 7.0）的磷酸盐缓冲液洗涤沉淀2~3次，之后重新置入50 mL 10%的葡萄糖溶液继续反应，记录固定化酶活力随利用次数增加的变化。

本文所有实验设计和数据结果统计由Origin 7.5软件辅助完成。

2 结果与讨论

2.1 固定GOD-CAT条件优化

2.1.1 MgO和聚乙二醇对固定GOD的影响

由图1可知，12号材料上清GOD活力最小，则固定于12号材料上的GOD最多。因此后续试验选取12号材料为实验对象。图2为透射电子显微镜拍摄的固定化酶的TEM图片。图3为原子力显微镜拍摄的载酶前后材料外貌的AFM图片。

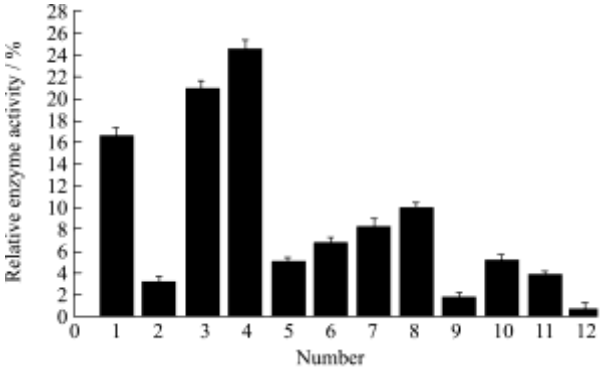

图 1 上清 GOD 活力

Fig.1 Enzyme activity in supernatant

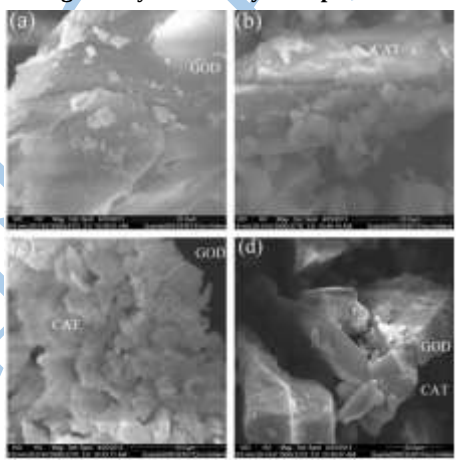

图 2 固定化酶的 TEM 图片

Fig.2 TEM images of immobilized enzyme

注:a. 固定 GOD 后的生物活性玻璃的 TEM 图片(×3000); b. 固定 CAT 后的生物活性玻璃的 TEM 图片（×3000）; c. 共固定 GOD-CAT 后的生物活性玻璃的 TEM 图片（×3000）; d. 共固定 GOD-CAT 后的生物活性玻璃的 TEM 图片（×1500）

CAT 相对分子质量为 244000~250000，而 GOD 相对分子质量大约有 158000。

由图 2 可以看出，单独固定 GOD（图 2a）和 CAT（图 2b）时，颗粒状的小分子 GOD 和鳞片状的大分子 CAT 均匀地吸附在载酶材料表面，但固定量较少，材料的结合位点未被完全利用；相同条件下同时固定 GOD-CAT（图 2c，2 d），更多的 GOD 分子和 CAT 分子固定于材料表面，呈现蜂窝状。原因可能是同种酶带相同电荷，单独固定时酶分子之间相互排斥，降低固定效率；同时固定两种酶会减少同种酶分子相互接触进而排斥的机会，提高固定效率。证实本实验制备的磁性生物活性玻璃对 GOD 和 CAT 两种酶分别有固定效果；而同时对两种酶进行共固定可大幅度提高

固定效率。

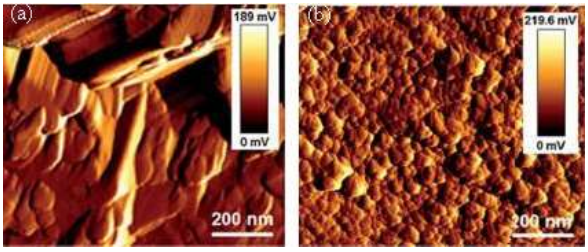

图 3 载酶前、后磁性生物活性玻璃的 AFM 图片

Fig.3 Amplitude mode AFM images of samples before and after GOD-CAT immobilization treatme

注：a：载酶前磁性生物活性玻璃外貌；b：载酶后磁性生物活性玻璃外貌。

通过比较图 3a 和图 3b，载酶前后磁性生物活性玻璃的外观形态存在显著差异。载酶前材料表面为层状堆积的纳米结构（图 3a）；而载酶之后其表面几乎完全被交联聚集的 GOD-CAT 酶分子覆盖，这是因为磁性生物活性玻璃表面携带电荷，可以减少同种酶分子之间的静电排斥，从而有利于酶分子在材料表面聚合。如图 3b，酶分子均匀地覆盖在材料表面。这也进一步证实，两种酶可均匀地固定于材料表面，本实验制备的磁性生物活性玻璃是一种优良的固定化酶材料。

2.1.2 戊二醛浓度对固定化 GOD 酶活的影响

借助双功能试剂使酶分子之间发生交联反应制成网状结构的固定化酶法称为交联法。常用的交联试剂有戊二醛、己二胺、顺丁烯等，其中应用最广泛的是戊二醛。戊二醛有两个醛基，这两个醛基都可与酶或蛋白质的游离氨基反应，形成席夫（Schiff）碱，而使酶或菌体蛋白交联，制成固定化酶或固定化菌体。

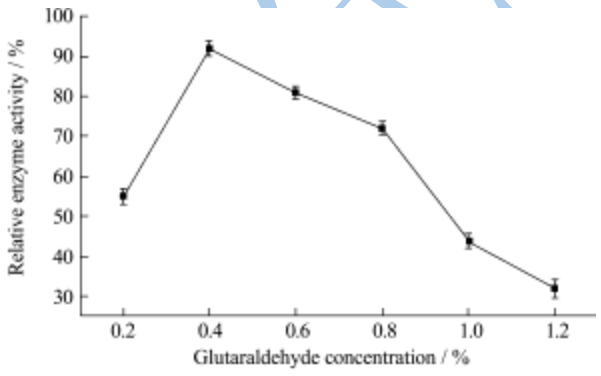

图 4 戊二醛浓度对固定化 GOD 活力的影响

Fig.4 Effect of glutaradehyde concentration on the covalently immobilized GOD

如图 4 所示，戊二醛浓度 0.4%时固定化效果最好，继续增加戊二醛浓度固定化酶酶活下降。

2.1.3 GOD-CAT 加酶比例对固定化 GOD 酶活的影响

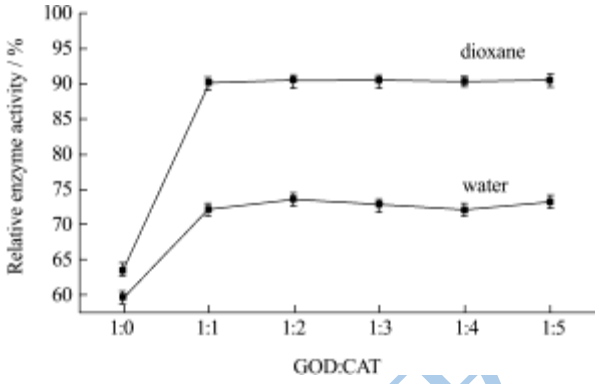

图 5 CAT-GOD 活力比对固定化 GOD 酶活的影响

Fig.5 Effect of activity ratio of GOD and CAT on the covalently immobilized GOD

如图5所示，固定化GOD在有机相和水相中的活力都是随着CAT:GOD增加而增加，在CAT:GOD为2:1时，表观酶活回收率达到最大，继续增大比例酶活不再增大。但是有机相固定的GOD比水相固定的GOD表现出更高的比活力。此时，有机相中固定化酶活回收率为90.25%；水相中则为71.77%。

2.1.4 有机相-二恶烷含水量对固定化 GOD 酶活的影响

大量研究都证实，在有机溶剂中酶的催化活性与反应系统中的含水量有着密切关系。酶在完全非水环境中没有催化活性，加入水能够使酶反应加速，说明一定量的水对维持酶催化所需的正确构象是必需的。在酶的催化反应中所需含水量因酶的不同而有所差异。

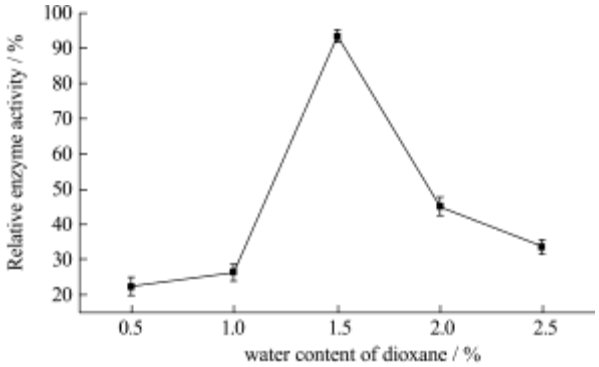

图 6 二恶烷含水量对固定化 GOD 酶活的影响

Fig.6 Effect of water content with organic solvents on the covalently immobilized GOD activity

如图 6 所示，当二恶烷含水量为 1.5%时，GOD 表观酶活回收率达到最大。

2.2 固定化 GOD-CAT 的酶学性质分析

2.2.1 温度对生产葡萄糖酸的影响

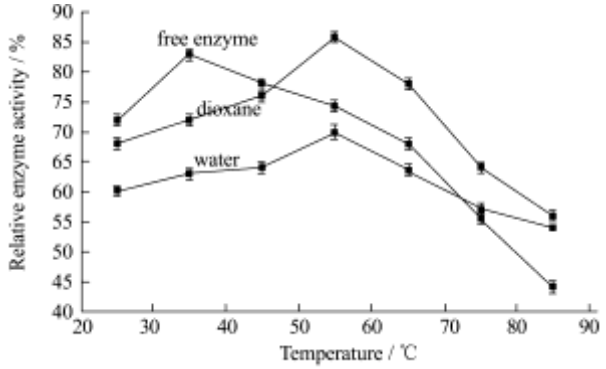

图 7 温度对固定化 GOD 酶活的影响

Fig.7 Effect of temperature on the covalently immobilized GOD

如图 7 所示，纯酶的最适反应温度是 35 ℃，而固定化酶的最适反应温度是 55 ℃。固定化酶最适反应温度升高，原因可能是酶在固定化过程中增强了自身酶活构象的牢固程度，固定后载体与酶分子多点连接可避免酶分子的伸展变性。另外，酶分子与载体材料结合后，载体与酶分子之间的氢键作用阻挡了高温受热对酶结构变化的影响，从而提高了固定化酶的最适反应温度。

在 55~85 ℃范围内，水相固定化酶和有机相固定化酶酶活性都随着温度的升高而降低。但是有机相固定化酶具有较高的相对活性，酶活下降慢，说明有机相固定化酶有更好的热变性抵抗力。

2.2.2 pH 对生产葡萄糖酸的影响

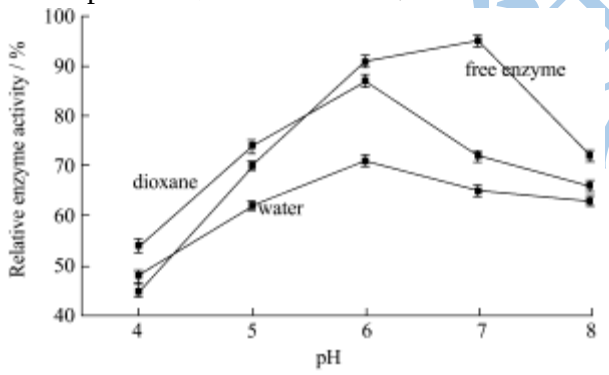

图 8 pH 对固定化 GOD 酶活的影响

Fig.8 Effect of reaction pH on the covalently immobilized GOD

如图 8 所示，纯酶和固定化酶的活性随着 pH 的增大而增大，达到最大值后随 pH 的增加而减小。纯酶的最适 pH 为 7.0，而固定化酶的最适 pH 为 6.0。固定化酶的最适 pH 发生偏移的原因可能是，载体电荷的影响导致固定化酶分子内外扩散层的氢离子浓度产生差异，外部环境的 pH 需向酸性方向移动来抵消环境变化，以获得最佳催化活性；载体与酶分子间形成的氢键作用力可避免酶的活性位点直接暴露于媒介环境中，限制了固定化酶对低 pH 的敏感性；载体材料结构的屏蔽作用增强了固定化酶对 pH 的适应性。

2.2.3 固定化酶的热稳定性和 pH 稳定性

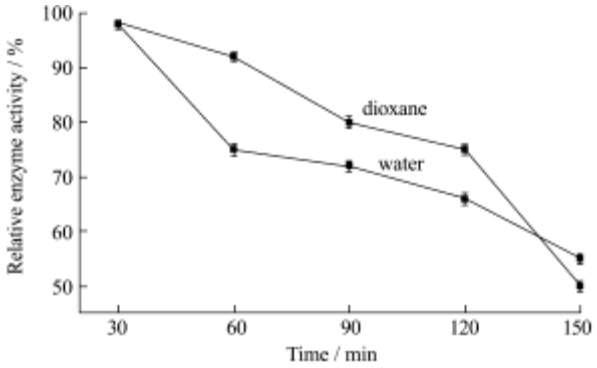

图 9 固定化酶的热稳定性

Fig.9 Thermal stability of covalently immobilized GOD

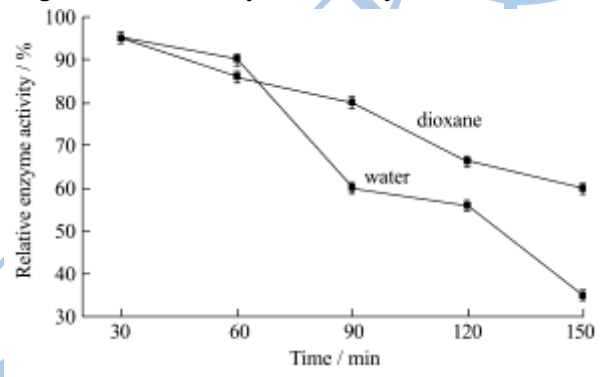

图 10 固定化酶的 pH 稳定性

Fig.10 pH stability of covalently immobilized GOD

如图 9 和图 10 所示，固定化酶和纯酶活性随着处理时间的增长而不断降低。但整体上固定化酶活性下降速率远大于纯酶。65 ℃处理时间 2 h 后，固定化酶活下降到原来的 72.72%，而纯酶下降到原来的 64.80%；pH 4.0 处理时间 2 h 后，固定化酶活下降到原来的 66.84%，而纯酶下降到原来的 54.36%。这说明固定化过程增强了酶的热稳定性和 pH 稳定性，原因可能是酶分子与载体间形成的氢键作用力在高温和极性 pH 条件下保护酶活性位点，防止其构象变化引起的酶活损失[8]。

2.2.4 共固定化酶的分离和重复使用次数比较

当外界磁场存在时，固定化酶极易被磁化。图 11 为固定化酶的磁化曲线，光滑而没有磁滞回线的出现，这说明存在外磁场时，固定化酶被吸附，如图 12b；而当除去外界磁场，固定化酶几乎没有剩磁，可在水溶液中形成棕红色悬液，如图 12a。

如图 13 所示，随着重复利用次数的增加，两种固定化酶的表观相对酶活也随之降低，但是有机相固定的酶活性下降的速率慢。原因可能是水相固定化过程中酶与载体共价结合反应剧烈，酶在固定化过程中活性中心或者变构中心的构象发生不可逆的变化，导致酶与底物的结合能力下降，酶分子容易从载体上脱落，

同时经过回收过程中的离心、洗涤等操作后发生泄露损失，致使固定化酶的催化活性连续下降。

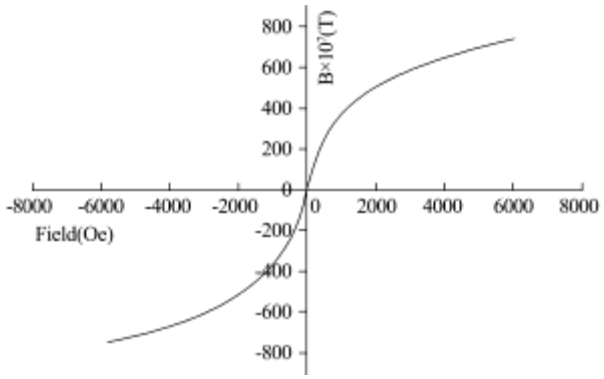

图 11 固定化酶的磁化曲线

Fig.11 Magnetization curve of soft ferromagnetic materials for immobilized GOD-CAT

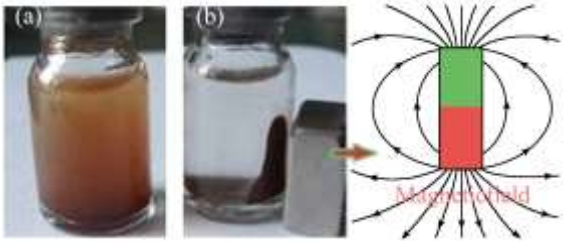

图12 磁场对固定化酶的影响

Fig.12 Effect of magnetic field for immobilized GOD-CAT

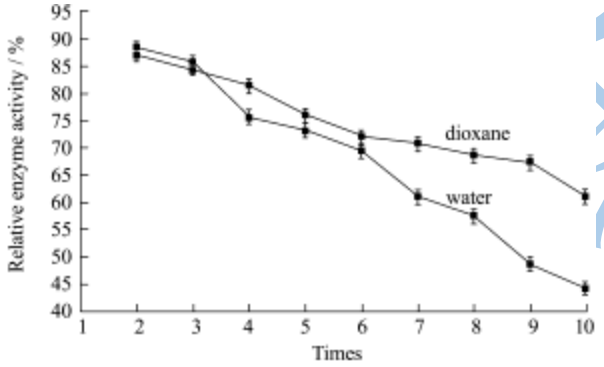

图 13 重复使用次数测定

Fig.13 Operational stability of covalently immobilized GOD

3 结论

3.1 本文介绍了一种制备磁性生物活性玻璃的方法，相对于普通的不具磁性的固定化材料相比，优点总结如下：利于固定化酶从反应体系中分离和回收，操作简便；工业化生产中若将其放入磁场稳定的流动床反应器中，可减少持续反应体系的操作，适合大规模连续化操作；利用外部磁场可控制固定化酶的运动方式和方向，替代传统的机械搅拌，提高酶的催化效率。

3.2 通过在水相和有机相二恶烷中的共固定化比较，有机相固定化在温度和 pH 耐受性、重复利用性等方面均表现一定优势。有机相固定化酶在连续使用 10 次后酶活性仍保持在原来的 67.30%。GOD-CAT 在有机相二恶烷中的共固定可促进载体与酶的共价连接，提高了固定化效率，延长了酶的使用寿命，而且增强了其重复利用性；利用 GOD-CAT 在有机相二恶烷中共固定化生产葡萄糖酸设备简便，反应条件温和，绿色环保，是有利于可持续发展的一种有效手段[9]。

参考文献

[1] Dalgaard P, Mejiholm O, Huss H H. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish [J]. Inter-national Journal of Food Microbiology, 1997, 38: 169-179

[2] Rando D, Kohring G W, Giffhorn F. Production, puriflcation and characterization of glucose 1245 oxidase from a newly isolated strain of Penicillium pinophilum [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48(1): 34-40

[3] Fan J, Yin J J, Ning B, et al. Direct evidence for catalase and peroxidase activities of ferritin-platinum nanoparticles [J]. Biomaterials, 2011, 32(6): 1611-1618

[4] 徐小艳,彭聪,田兴国.葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶复合体系提纯异麦芽低聚糖的研究[J].华南农业大学学报,2005,26(4): 102-105
XU Xiao-yan, PENG Cong, TIAN Xing-guo, et al. Studies on purifying isomalto-oligosaccharide by combined enzyme of glucose oxidase and catalase [J]. Journal of South China Agricultural University, 2005, 26(4):102-105

[5] 管文军,龚兴国,李荣宇.葡萄糖氧化酶-过氧化物酶膜共固定化的研究[J].浙江大学学报,2002,36(2):209-211
GUAN Wen-jun, GONG Xing-guo, LI Rong-yu. Studies of Glucose-Oxidase/Peroxidase Co-immobilization on nylon film. [J]. Journal of Zhejiang University, 2002, 36(2): 209-211

[6] Sisak C, Csanádi Z, Rónay E, et al. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(5): 1002-1007

[7] 崔凤霞,谭天伟.葡萄糖氧化酶-过氧化氢酶共固定研究[J].北京化工大学学报,2012,39(2):63-67
CUI Feng-xia, TAN Tian-wei. Studies of Co-immobilization of Glucose-Oxidase/Peroxidase [J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology, 2012, 39(2): 63-67

[8] 武翠翠.囊泡状二氧化硅的制备及对脂肪酶的固定化研究[D].山东济南:山东轻工业学院,2012
WU Cuicui. Study on Preparation of Vesiclular Silica and its Immobilization of Lipase [D]. Jinan, Shandong: Shandong Institute of Light Industy, 2012

[9] 谭天伟,陈文,葛春玲,等.共固定化葡萄糖氧化酶/过氧化氢

酶微球及其在生产葡萄糖酸或其盐中的应用:中国, CN201210488451[P] 2013.02.27.中国专利信息网

TAN Tian-wei, CHEN Wen, GE Chun-ling, et al. Microballoon for Co-immobilization of Glucose-Oxidase/ Peroxidase and its Application to Produce Gluconic Acid and Gluconate: China, CN201210488451 [P]. 2013, 02(27): China Patent Infonet

现代食品科技