

文章编号: 1001-411X(2000)02-0054-03

几种葡萄糖氧化酶部分性质的比较

毛秋霞¹, 黄永芳², 陈甜女¹, 林 斌¹

(1 广东生物技术联合公司, 广东 广州 510405; 2 华南农业大学林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 从青霉菌(*Penicillium notatum*)中获得了一种葡萄糖氧化酶, 经 DEAE-Selectacel 柱层析, 洗脱液再经超滤浓缩, 加入保护剂冷冻干燥, 制得冻干粉, 并与进口葡萄糖氧化酶进行比较, 证明该葡萄糖氧化酶冻干粉的活力及稳定性等各项指标已达到进口产品的水平。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 活力; 稳定性
中图分类号: Q554.1 文献标识码: A

葡萄糖氧化酶(EC1.1.3.4 Glucoseoxidase GOD)是 1928 年由 Müller 等^[1]发现的, 此后 Nakamatsu、Konelia、Yoshio 等先后对此作了大量的研究并投入生产^[1~2], Fiedurek 等和 Rogalski 等对产酶单位的增加等方面做了大量的研究工作^[3~4]。目前该酶在临床检测及食品工业中有广泛用途^[4]。我国 70 年代开始便有葡萄糖氧化酶协作组^[5]、李友荣等^[1]对该酶进行过研究, 但一直未能进入规模生产, 其主要原因之一就是酶活力低、稳定性差, 所以一直以来我国葡萄糖氧化酶几乎全部依赖进口, 国家每年花费大笔外汇从日本、德国等地购进。为此, 研究及生产品质优良的葡萄糖氧化酶(GOD)制剂来代替进口产品, 具有重大意义。经过 2 年多的努力, 已成功地研制出质量达到进口产品水平的葡萄糖氧化酶冻干粉。

文章报道了广东生物技术联合公司生产的葡萄糖氧化酶与德国 Boehringer 及日本 TOYOBO 生产的葡萄糖氧化酶各项性能指标的比较结果。

1 材料与方法

1.1 试剂 奥特葡萄糖氧化酶(130 U/mg)、过氧化物酶(250 U/mg)为广东生物技术联合公司出品, 进口葡萄糖氧化酶为德国 Boehringer (150 U/mg)及日本 TOYOBO (130 U/mg)出品, 其它均为国产分析纯试剂。

1.2 葡萄糖氧化酶的活力测定

- (1) 参考 Worthington^[6]的方法进行。
- (2) 原理: 在有氧存在的情况下, 葡萄糖氧化酶催化葡萄糖的氧化反应生成葡萄糖酸和过氧化氢, 而加过氧化物酶后分解成过氧化氢, 分解出的氧又将邻-联二茴香胺氧化变成棕色物质, 这一反应使溶液吸光度增大(436 nm 处)与葡萄糖氧化酶活性成线性关系。
- (3) 定义: 1 个葡萄糖氧化酶单位“U”相当于 30 °C

条件下每 min 催化氧化 1 μg 分子的葡萄糖或葡萄糖酸的酶定义为 1 个葡萄糖酶的活力单位。

2 结果与分析

2.1 国产奥特 GOD 与进口 GOD 的活力比较

将酶冻干粉(含蛋白质 0.56 mg/mg)用去离子水配成酶 1 g/L 溶液后, 再稀释 1 000 倍, 然后测定, 结果如表 1, 可见, 奥特 GOD 每 mg 酶的活力单位高于进口产品, 比 Boehringer 高 8%, 比 TOYOBO 的产品高 18.84%。

表 1 奥特 GOD 与进口 GOD 的活力比较
Tab. 1 Comparison of several glucose oxidases activity

厂家 factory	TOYOBO	Boehringer	奥特
A_{436}/min	0.03	0.034	0.037
酶/(U·mg ⁻¹)	112.0	127.0	138.2

2.2 奥特 GOD 与进口 GOD pH 稳定性的比较

用各种 pH 缓冲液将酶粉配成 1 g/L 酶液(pH 8.0 以下用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH8.0 以上用巴比妥-盐酸缓冲液), 于 30 °C 条件下保存 24 h 后, 按酶活力测定方法测定, 结果如图 1。可见, 奥特 GOD 及 Boehringer GOD 在 pH4~8 范围内有较高稳定性, pH 小于 3.0 或大于 8.0, 酶活开始下降, TOYOBO GOD 则在 pH4~9 范围内较稳定, pH 小于 3.0 或大于 9.0, 活力开始下降。

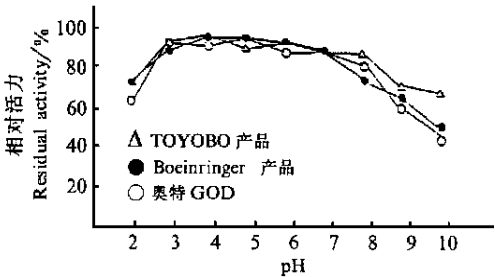


图 1 国产与进口 GOD pH 稳定性的比较

Fig. 1 Comparison of several GOD pH-stability

2.3 奥特 GOD 与进口 GOD 热稳定性的比较

将 1 g/L 的酶于不同温度条件下放置 1 h 后, 按酶活性测定方法测定酶活, 结果如图 2. 可见, 奥特 GOD 与进口 GOD 在 4~45℃ 条件下较稳定, 温度超过 45℃, 活力开始下降, 至 70℃, 活力几乎降至零, 3 种 GOD 的热稳定性基本一致.

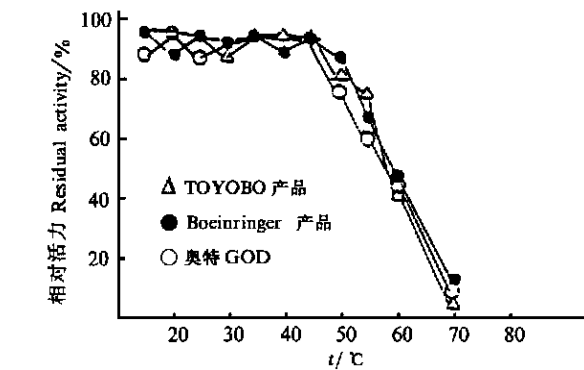


图 2 奥特 GOD 与进口 GOD 热稳定性的比较
Fig. 2 Comparison of several GOD temperature stability

2.4 最适 pH 的比较

等量酶在不同 pH 条件下 (pH 8 以下用磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液, pH 8 以上用巴比妥钠—盐酸缓冲液) 测定酶活性, 结果如图 3. 可见, TOYOBO 的 GOD 及奥特 GOD 的最适 pH 为 6.0 左右, 而 Boehringer GOD 的最适 pH 为 4.0 左右.

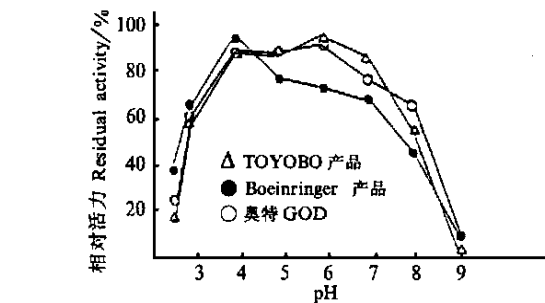


图 3 奥特 GOD 与进口最适 pH 的比较
Fig. 3 Comparison of several GOD pH-activity

2.5 底物专一性的比较

以不同单糖为底物, 测定各种酶对不同糖的专一性, 并以各种酶对 D-glucose 的活力为 100%, 求得不同酶对不同单糖的相对活力结果如表 2. 可知, 奥特 GOD 或进口 GOD 对底物专一性都非常强, 3 种产品对底物专一性的趋势是一致的, 即除了 D-glucose 外, 对其它底物的作用力都非常弱.

2.6 一些化学物质对酶活性影响的比较

用含各种化学物质的水溶液将酶配成 10 U/mL 的酶液, 在 25℃ 条件下放置 5 h 后, 再按酶活力测定

方法测定, 结果如表 3. 可知, Cu^{2+} 、 Ag^{+} 对奥特 GOD 及进口 GOD 的活力均有抑制, 而各种表面活性剂则可不同程度地提高各种酶的活性.

表 2 底物专一性的比较

Tab. 2 Comparison substrate specificity of several GOD			
$c_{\text{底物}} /$ $0.5 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	相对活力 residual activity/ %		
	TOYOBO GOD	Boehringer GOD	奥特 GOD
D-glucose	100	100	100
L-glucose	0	0	0
半乳糖	3.1	1	2.5
D-甘露糖	2.3	0.8	1.7
果糖	0.27	0.3	0.5
D-木糖	0.95	2.0	0.3

表 3 一些化学物质对酶活性的影响

Tab. 3 Comparison of the effects of various chemicals on several GOD				
化学药品 chemical drug		相对活力 residual activity/ %		
	c/ (mmol· L ⁻¹)	TOYOBO GOD	Boehringer GOD	奥特 GOD
对照		100 %	100 %	100 %
MgCl ₂	2.0	93	92	95
MnCl ₂	2.0	96	97	95
FeCl ₂	2.0	95	93	97
CuSO ₄	2.0	68	71	70
AgNO ₃	2.0	60	62	58
NaN ₃	2.0	96	93	97
EDTA	2.0	97	96	98
Brig35	ρ= 10.0 mg/ L	105	103	106
Tween	ρ= 10.0 mg/ L	108	109	105
吐温 20				
SDS	ρ= 10.0 mg/ L	113	110	110

3 讨论

酶制剂要商品化, 必须要适应市场的需求, 临床诊断上需要比活力高, 稳定性好的 GOD 酶制剂, 一般要求 GOD 每 mg 酶的活力单位达 100 U/mg 以上, 在 pH7.0 左右稳定性好, 且对底物专一性要强. 目前国内只有少量液体酶制剂生产, 液体酶制剂内含有醋酸缓冲液, 有强烈的刺激性气味, 且性能不稳定, 不利于贮存、运输及使用^[2]. 为此, 作者采用了超滤浓缩及 DEAE-Selectacel 柱层析法分离, 纯化了葡萄糖氧化酶, 并制成冻干粉, 将此酶与 Boehringer 及 TOYOBO 产品进行比较, 结果是奥特 GOD 的比活达 138 U/mg, 而 TOYOBO 及 Boehringer 的比活分别为 112 及 127 U/mg, 表明 3 种产品均达到了要求. 在 pH 稳定性方面, 奥特 GOD 及 Boehringer GOD 在 pH4~8 范围内稳定, 而 TOYOBO 的 GOD 在 pH4~9 范围

内稳定,说明奥特 GOD 在 pH 稳定性方面与其它两种酶基本上一致的,在热定性上,奥特 GOD 的热稳定性也完全与其它两种一致,在 4~45 °C 范围内较稳定,温度高于 45 °C,酶活开始下降,至 70 °C,酶活几乎全部消失. TOYOBO 的 GOD 及奥特 GOD 的最适 pH 为 6.0 左右,而 Boehringer GOD 的最适 pH 为 4.0 左右. 说明 TOYOBO 及奥特 GOD 比 Boehringer 的 GOD 更适合做临床诊断原料酶. 奥特 GOD 及进口 GOD 对底物的专一性都非常强,除了 D-glucose 外,对 L-glucose、半乳糖、D-甘露糖、果糖、D-木糖的活作用力都非常弱,不到 D-glucose 的 5%,是理想的诊断原料酶^[3]. 另外,为了测定某些化学物质对奥特 GOD 的干扰程度是否与进口 GOD 一致,作者选用了 10 种化学物质进行试验,结果证明 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 对奥特 GOD 及进口 GOD 的活力均有抑制作用,而表面活性剂可提高各种酶的活性,3 个产品的表现是一致的. 通过比较,证明了广东生物技术联合公司研制的 GOD 冻干粉在比活、热稳定性、pH 稳定性、最适 pH、底物专一性等质量及性能指标方面完全达到进口产品的水平, GOD 以上几项指标合格与否是决定该酶制剂能否作为临床原料酶的基本条件. 奥特 GOD 样品经有

关厂有试用,配制成试纸条及血糖试剂盒,亦证实了奥特 GOD 作为临床诊断的一个原料酶,完全可以替代进口产品.

参考文献:

- [1] 李友荣,张艳玲,纪西冰. 葡萄糖氧化酶的生物合成 1. 产生菌的筛选及产酶条件的研究[J]. 工业微生物, 1993, 23(3): 1~6.
- [2] 袁勤生. 应用酶学[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1994. 269~315.
- [3] FIEDUREK J, ROGALSKI J, IICZUK Z, et al. Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production[J]. Enzyme and Microbial Technol, 1986, 8(12): 734~736.
- [4] ROGALSKI J, FIEDUREK J, SZCZORDRAK J, et al. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant[J]. Enzyme and Microbial Technol, 1988, 10(8): 508~511.
- [5] 葡萄糖氧化酶协作组. 点青霉(*Penicillium notatum*) AS 3.3871 葡萄糖氧化酶的研究[J]. 微生物学通报, 1974, 1(1): 1~5.
- [6] DECKER L A. Worthington Enzyme Manual[M]. New Jersey: Freehold, 1977. 165~168.

Comparison of the Partial Qualities of Several Glucose Oxidases

MAO Qiu-xia¹, HUANG Yong-fang², CHEN Tian-nü¹, LIN Bin¹

(1 Guangdong Biotechnological Corporation, Guangzhou 510405, China;

2 College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The dehydrofreezing powder of glucose oxidase (GOD) from *Penicillium notatum* was obtained by DEAE-selectant Chromatography, ultrafiltration and putting in protectant. Compared with imported glucose oxidase, its activity, stability and other indexes has arrived at the level of the imported glucose oxidase's.

Key words: glucose oxidase; activity; stability

【责任编辑 张 砾】