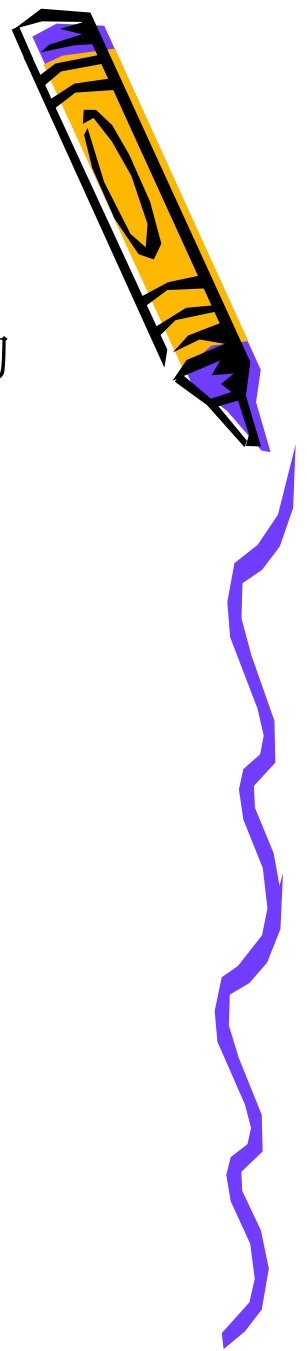


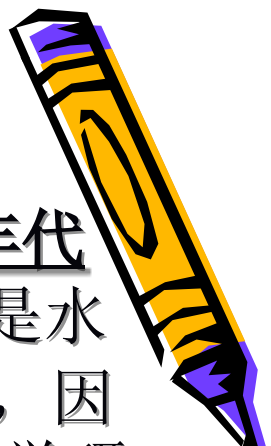


关于固定化酶和固定化细胞

知识点:

- 1.酶和活细胞的固定方法(包括游离酶、微生物、动物细胞和植物细胞)。
- 2.辅酶和辅基的固定。
- 3.固定化酶的性质
- 4.固定化对酶反应系统的影响
- 5.固定化酶和固定化细胞的应用





固定化酶(Immobilized Enzyme)是20世纪60年代发展起来的一项新技术。以往使用的酶绝大多数是水溶性的酶。这些水溶性酶催化结束后，极难回收，因而阻碍了酶工业的进一步发展。60年代后，在酶学研究领域内涌现出固定化酶。**它是通过物理的或化学的手段，将酶束缚于水不溶的载体上，或将酶束缚在一定的空间内，限制酶分子的自由流动，但能使酶充分发挥催化作用；过去曾称其为水不溶酶或固相酶。**1971年第一届国际酶工程会上正式建议采用固定化酶的名称。

从60年代起，固定化酶的研究发展很快，起初人们把注意力集中在酶的固定化方法研究上，近年来，不但固定化方法和载体开发有了长足发展，并且已转向它在工业、医药、化学分析、亲和层析、环境保护、能源开发以及理论研究等方面的应用研究。





1 酶和活细胞的固定方法

1.1 固定化酶与固定化细胞的优缺点

1.1.1固定化酶：固定化酶的研究已取得大量重要成果，发挥着巨大作用，受到人们极大的关注。其重要原因是它和水溶性酶比较具有以下优点：

(1)极易将固定化酶与底物、产物分开；产物溶液中没有酶的残留，简化了提纯工艺。

(2)可以在较长时间内反复使用，有利于工艺的连续化、管道化。

(3)酶反应过程可以严格控制，有利于工艺自动化和微电脑化。

(4)在绝大多数情况下提高了酶的稳定性。

(5)较能适应于多酶反应。

(6)酶的使用效率提高，产物得率提高，产品质量有保障，成本。





固定化酶也存在一些缺点：

- (1)酶固定化时酶的活力有所损失。同时也增加了固定化的成本，使工厂开始投资大。
- (2)比较适应水溶性底物和小分子底物。
- (3)与完整细胞比较，不适于多酶反应，特别是需要辅因子的反应，同时对胞内酶需经分离后，才能固定化。

1.1.2固定化细胞 固定化细胞是在固定化酶的基础上发展起来的。它的优点如下：

- (1)省去了酶的分离手续，为多酶系统，无须辅因子再生。
- (2)细胞生长快、而且多、反应快。
- (3)可以连续发酵，节约了成本，而且在蒸馏和提取前不用分离去细胞，能一边排出发酵液，一边进行培养，排除了产物抑制和消耗。
- (4)保持酶在细胞内的原始状况，增加了酶的稳定、特别是对污染因子的抵抗力增加。



固定化细胞同时也存在一些缺点：

(1) 必须保持菌体的完整，防止菌体自溶，否则，将影响产品纯度。

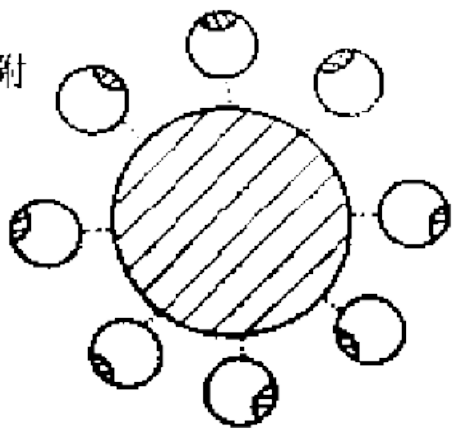
(2) 必须防止细胞内蛋白酶对所需酶的分解，同时，需抑制胞内其他酶的活性止副产物的形成。

(3) 细胞膜、壁会阻碍底物渗透和扩散。

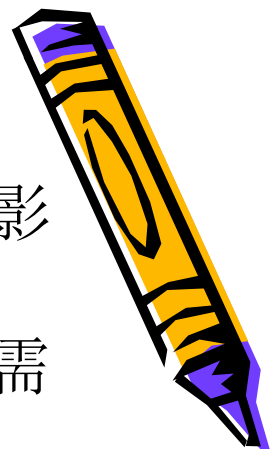
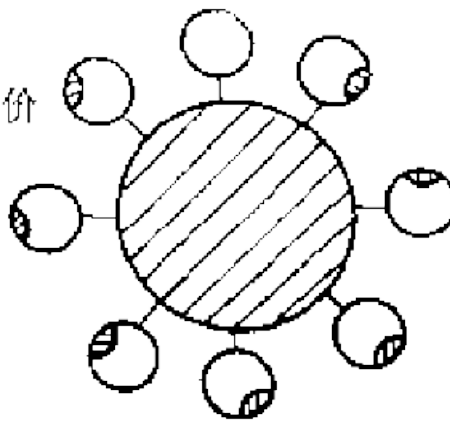
1.2 酶的固定化方法

酶的固定化方法有：吸附法；共价键结合法；交联法；包埋法。
如下图：

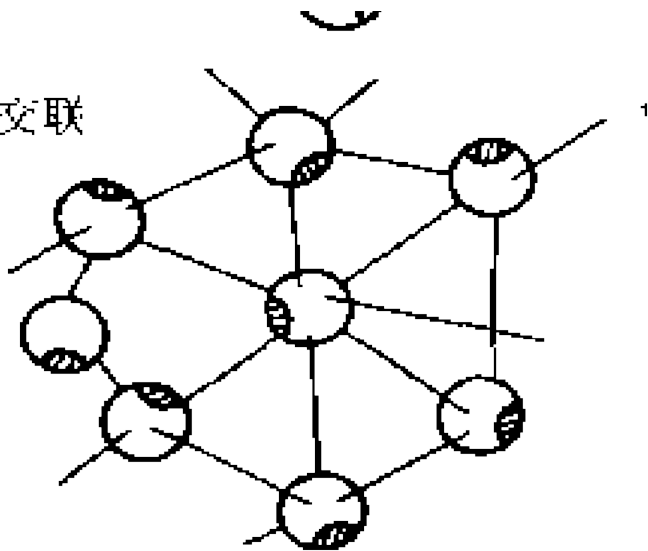
1. 吸附



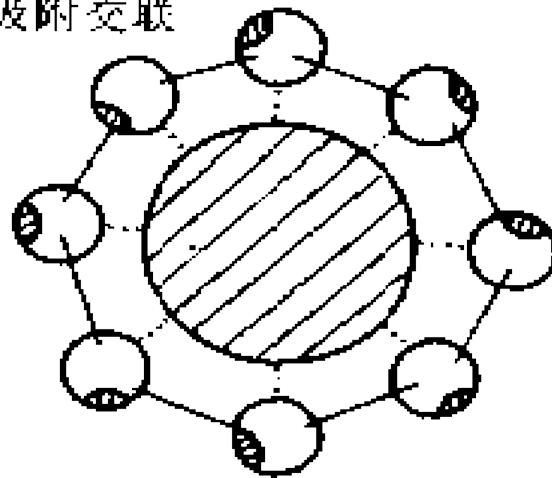
2. 共价



3. 交联

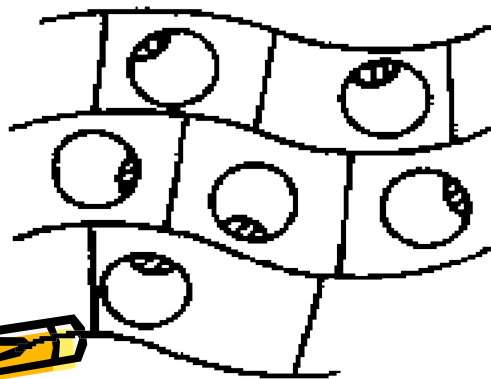


吸附交联

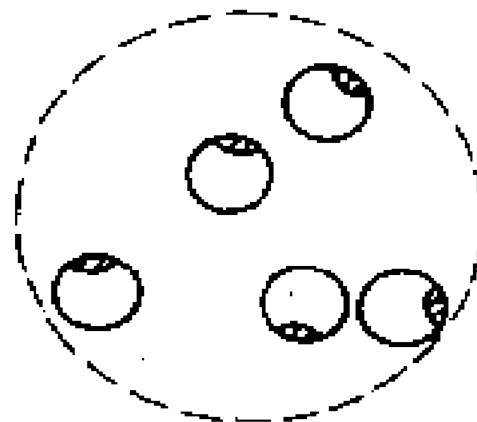


4. 包埋

(1) 基质包埋



(2) 微胶囊包埋



1.2.1 吸附法

吸附法分为物理吸附法和离子交换吸附法。


(1) 物理吸附法：通过氢键、疏水作用和 π 电子亲和力等物理作用，将酶固定于水不溶载体上。从而制成固定化酶。常用的载体有：

①有机载体。纤维素、骨胶原、火棉胶及面筋、淀粉等。比如用纤维素作为吸附剂，用膨润的玻璃纸或胶棉膜吸附木瓜蛋白酶、碱性磷酸脂酶、6—磷酸葡萄糖脱氢酶。吸附后在载体表面形成单分子层，吸附蛋白能力约 $70\text{mg}/\text{cm}^2$

②无机载体。氧化铅、皂土、白土、高岭土、多孔玻璃、二氧化钛等。比如用多孔硅为载体吸附米曲酶和枯草杆菌的 α 淀粉酶以及黑曲霉的糖化酶，在 45°C 进行固定化，用高浓度的底物进行连续反应。半衰期分别为14、35、60d。无机载体的吸附容量较低、而且酶容易脱落。

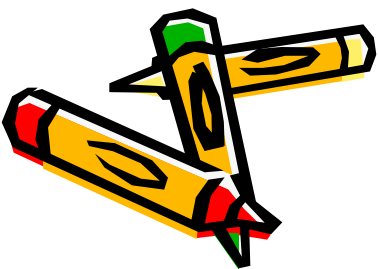
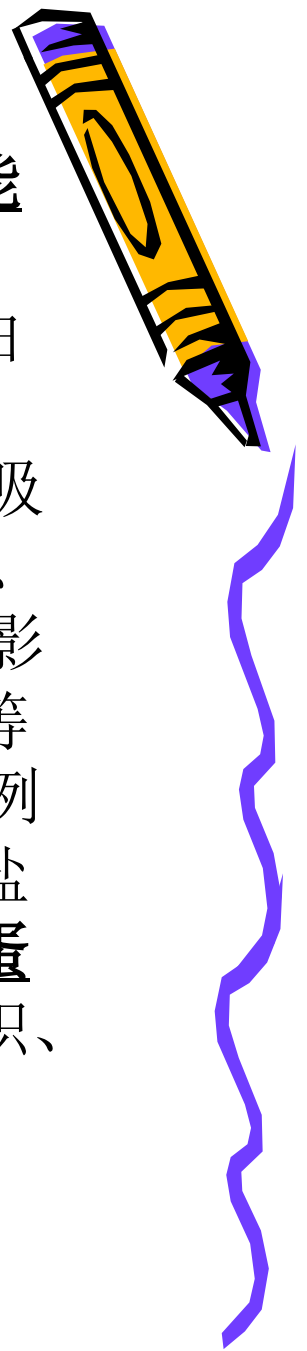


(2)离子交换吸附法：这是将酶与含有离子交换基的水不溶载体相结合而达到固定化的一种方法。酶吸附较牢，在工业上颇具广泛的用途。常用的载体有阴离子交换剂，如二乙氨基乙基(DEAE)-纤维素、混合胺类(ECTEDLA)—纤维素、四乙氨基乙基(TEAE)—纤维素、DEAE—葡聚糖凝胶、Amberlite IRA—93、410、900等。阳离子交换剂基，如羧甲基(CM)—纤维素、纤维素柠檬酸盐、Amberlite CG50、IRC—50、IR—200、Dowex—50等。



DEAE-Sephadex固定化氨基酰化酶：将DEAE-SephadexA25充分溶胀。用0.5mol/LNaOH和水洗涤后，加入pH7.0—7.5的米曲霉3042粗酶液(水解乙酰—DL-Ala活力为25 $\mu\text{mol}/\text{m}^1\cdot\text{h}$)充分混合(1g湿重载体加60ml酶液)后，于低温下搅拌过夜后，吸去上清液，再用蒸馏水和0.15mol/L醋酸钠水溶液洗涤固定化酶，置4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。固定化酶活力回收50-60%，水解乙酰—DL—A1a活力为600-800 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{h}$ 湿固定化酶。氨基酰化酶也可固定于DEAE—纤维素。此外，DEAE—纤维素吸附的 α —淀粉酶、蔗糖酶已作为商品固定化酶。

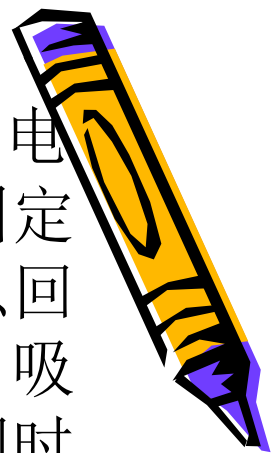
通过酶蛋白化学修饰来增加蛋白质分子上电荷。能有效的克服吸附法制备的固定化酶在使用过程的解吸。用水溶性乙烯—顺丁烯二酸酐共聚物共价修饰的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶、可以用DEAE—纤维素和DEAE—Scphadex载体有效的固定。这种固定几乎是不可逆的吸附。此外，酶的吸附与解吸还与介质中离子强度、pH、温度、蛋白质浓度及酶和载体的特性相关。pH的变化影响到载体和酶的电荷，从而影响载体对酶的吸附。在等电点两侧($\pm 1-2\text{pH}$ 单位)吸附将明显减少，但也有个别例外。盐对吸附的影响较为复杂。在一些特殊事例中、盐可以促进蛋白质的吸附。这就是所谓的盐析吸附。对蛋白质吸附来说，随温度的升高吸附下降。载体的表面积、多孔性及其顶处理都影响对酶的吸附。



吸附法制备固定化酶操作简单，可充分选择不同电荷、不同形状的载体，吸附过程可以同时纯化酶，固定化酶在使用过程失活后可重新活化，同时，载体可以回收再利用。但由于有些机理不十分明了，在给酶量、吸附程度与固定化酶活力回收的关系不可预见性大，同时由于吸附法制备的固定化酶易脱落，影响产物纯度和酶的操作稳定性。

1.2.2 包埋法

包埋法是将聚合物的单体与酶溶液混合，再借助于聚合助进剂(包括交联剂)的作用进行聚合，酶被包埋在聚合物中以达到固定化。包埋法操作简单，由于酶分子只被包埋，未受到化学反应，可以制得较高活力的固定化酶。对大多数酶、粗酶制剂甚至完整的微生物细胞都是适用的。但是，只有小分子底物和产物可以通过凝胶网络，而对大分子底物不适宜。同时，凝胶网络对物质扩散的阻力导致固定化酶动力学行为的变化、活力降低。包埋法常用凝胶包埋法和微囊化法。

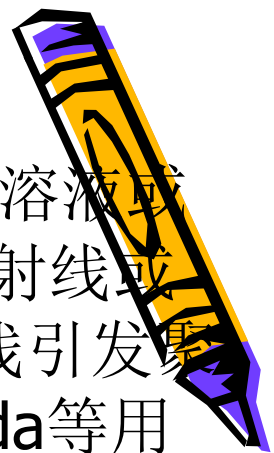


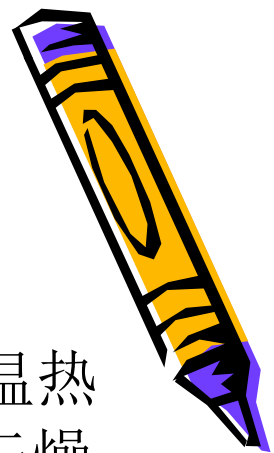
(1)凝胶包埋法 凝胶包埋法是将酶分子包埋在凝胶格子中。

①聚丙烯酰胺凝胶包埋法。一般的制备过程如下：将1ml溶于适当缓冲液的酶溶液加入含有750mg丙烯酰胺(单体)和40mgN, N'-甲叉双丙烯酰胺(交联剂)的3ml溶液中，再加0.5ml 15%的二甲氨基丙腈(加速剂)，同时，加入1%过硫酸钾(引发剂)，混合，于25T：保温10min，便得含酶凝胶。将凝胶粉碎，制得不规则的颗粒。于低温储存或冷冻干燥。为制得珠状固定化酶，可以在聚合反应开始时，立即转入到疏水相(一种乳化剂，与水相有相同密度)的有机溶液中，使分散成含酶的珠状凝胶。

聚丙烯酰胺包埋法的缺点是酶容易漏失，以低分子量蛋白质为甚，如果调整交联剂浓度与交联程度可以得到克

②辐射包埋法。酶溶于纯单体水溶液、单体加合物水溶液或纯聚合物溶液中。在常温或低温下，用X—射线、Y—射线或电子束辐照。可得到包埋酶的亲水凝胶。如用X—射线引发聚丙烯酰胺聚合，可以固定胰蛋白酶。1973年H. Maeda等用聚乙烯水溶液辐照包埋了多种酶。运用弱水性或稍微疏水性的玻璃化载体，用低温过冷态的辐照聚和，可用于一般生物物质的固定化。这些生物物质主要分布在载体表面层区域，固定化产物表面具有生物活性，曾称这种方法为粘附法。这种方法可粘附酶、叶绿素、病毒等，长期使用后仍有较高的活性。可以使用玻璃化单体，玻璃化单体和非玻璃化单体混合物、单体和天然聚合物的混合物为载体。



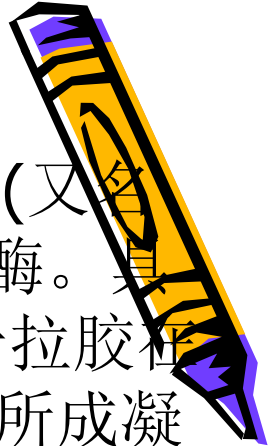


③其他凝胶包埋法。

a.淀粉凝胶包埋法。将氨基甲酸乙酯的泡沫垫浸入温热的淀粉溶液和乙酰胆碱脂酶的混合物中，再经冷却、干燥，便制得固定化乙酰胆碱脂酶。，为增强机械强度和重新水合可加入一定量的甘油。

b.胶原包埋法即大分子络合法。胶原有纤维性，易成膜，能在生理pH下自发的聚焦成束，胶束末端可以通过多种次级键与酶分子相互作用，通过酶和胶原分子形成网架而将酶固定化。其制备方法极为简单：将酶加到胶原悬浮液中、铺膜、干燥即得固定化酶。或者经过透析的酶和胶原混合，插入电极，酶—胶原复合物便在电极上沉淀。




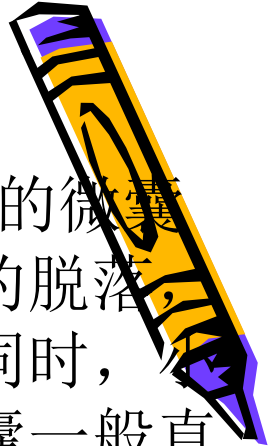


c. 卡拉胶包埋法: 卡拉胶(K—Carrageenin)是由角叉菜(又名鹿角菜:Cawageen)中提取的一种多糖,可以用来包埋酶。具体方法:将100gx酶在37—50℃溶于水中,又将1.7g卡拉胶在40—60溶于34ml生理盐水中,二者混合后冷全10℃,所成凝胶浸在0.3mol/L KCl 溶液中硬化,作成适当大小的颗粒,即为固定化酶。

d. 天然血纤维包埋法: 血纤维不会引起抗体形成,且无毒。在柠檬酸缓冲液中使酶和血纤蛋白原及凝血酶混合、便制得血纤蛋白包埋的固定化酶。酶分子的氨基和血纤蛋白的谷氨酰胺残基之间发生交联而将酶固定化。

e. 大豆蛋白包埋法。 含葡萄糖异构酶的链霉菌菌株与大豆蛋白溶液混合,在60℃用碳酸镁处理使其凝结,过滤. 制球,干燥后用戊二醛和六甲叉二胺处理,硬化. 从而制得固定化葡萄糖异构酶。





(2)微囊化法 此法是将酶包埋于具有半透性聚合物膜的微囊内。它使酶存在于类似细胞内的环境中，可以防止酶的脱落，防止微囊外环境直接接触。从而增加了酶的稳定性。同时，小分子底物能通过膜与酶作用，产物经扩散而输出。微囊一般直径约1~100 μm ，膜厚约100nm，膜上孔径约3.6nm，表面积与体积之比极大，物质能很快达到平衡，能有效的包埋许多种酶。同时、可用不同类型、不同浓度的酶、细胞提取物或细胞，不同组成和含量的膜包裹组建成人工细胞。因此，此法在医疗上极为有用。例如固定化天门冬酰胺酶(治疗白血病)就是用这种方法制成的微胶囊。微胶囊的制备方法有4种。



①界面沉淀法。是利用某些高聚物在水相和有机相的界面上溶解度极低而形成膜，

从而将酶包埋的方法。如，含有高浓度血红蛋白的酶溶液在与水不互溶、沸点比水低的有机相中乳化，加入油溶性表面活性剂，形成油包水的微滴，再将溶于有机溶剂的高聚物在搅拌下加入乳化液中，然后加入一种不溶解高聚物的有机溶剂，使高聚物在油—水界面上沉淀形成膜，最后移于水相，从而制成固定化酶。作为高聚物有硝酸纤维素、聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等。如“人造细胞”制备：**25ml 10% 血红蛋白水溶液(内含适当酶、**

②界面聚合法。界面聚合法是将疏水性和亲水性单体在界面进行聚合，形成半透膜，使酶包埋于半透膜微囊中。此法曾用来制备Asn酶、脲酶等。制备方法一般是：将酶水溶液与亲水单体(如葡萄糖)用一种水不溶混的有机溶剂制成乳化液，再将溶于同一有机溶剂疏水单体(如多异氰酸)溶液在搅拌下加入到上述乳化液，在乳化液中的水相和有机溶剂之间的界面发生聚合化

这样水相中酶便包埋在聚合体(聚脲)膜内。例如用含酶的10%血红蛋白水溶液与己甲叉二胺的水溶液混合,立即在1%Span85的氯仿-环己烷中分散乳化,加入癸二酰氯(有机相)后,便在油-水界面发生聚合反应,弃除上清液,加入Tween-20去乳化,洗除有机溶剂,除去未聚合单体后,转入水相,制得固定化酶。

③**液体干燥法**。此法曾用乙基纤维素和聚苯乙烯包埋过氧化氢酶、脂肪酶等。它是将一种聚合物溶于一种沸点比水低,且与水不混溶的溶剂中。加入酶液后,加入油溶性表面活性剂为乳化剂使之乳化。再把它分散于含有保护性胶质如明胶、聚丙烯醇和表面活性剂的水溶液中,第二次乳化.在不断搅拌下,低温真空除去有机溶剂,便得含酶微囊。常用聚合体有乙基纤维素、聚苯乙烯、氯橡皮等,有机溶剂有苯、环己烷和氯仿。



④红血球包埋法。在高渗溶液中红细胞膨胀伸展后，细胞内血红蛋白漏出，同时胞外蛋白也能扩散进红血球。再放进等渗溶液中，红血球膜又回复至正常状态和透性，进入的酶不会漏出来。

⑤脂质体包埋法。上述微囊法是一种半透性膜将酶包埋，近年来采用双层脂质体形成极细球粒包埋酶。例如，将卵磷脂、胆甾醇和二鲸蜡磷酸酯按7: 2: 1溶于氯仿中。再加入酶液，混合物在旋转蒸发器中，在氮气下32℃转动乳化，然后在室温下保持2h，再在氮气气流中，4℃用音波处理10s，在室温下保持2h，过Sepharose 6B柱，收集脂质体，离心分离脂质体，所得球粒悬浮于缓冲液中，继续音波处理，并过Sepharose 6B柱，可得含酶的微囊。这种微囊液膜当底物产物穿过时、与膜的径无关。但与产物或底物对膜成分的溶解



1.2.3 共价键结合法

共价键结合法是酶蛋白的侧链基团和载体表面上的功能基团之间形成共价键而固定的方法。其优点是：酶与载体结合牢固，酶不易脱落，但反应条件较激烈，酶易失活，同时，制作手续亦较繁琐。

(1) 酶分子和载体连接的功能基团 从理论上讲，酶蛋白上可供载体结合的功能基团有以下几种：

①酶蛋白N—端的M—氨基或赖氨酸残基的-氨基。②酶蛋白C-端的羧基以及Asp残基的 α -羧基和Glu残基 γ -羧基。③Cys残基的巯基。④Ser、Tyr、Thr残基的羟基。⑤Phe和Tyr残基的苯环。⑥His残基的咪唑基。⑦Trp残基的吲哚基。

在实际中偶联最普遍的基团是：氨基、羧基以及苯环。
偶联的基团还应是酶活性的非必需基团，否则将导致酶失去活性。





(2)载体的选择

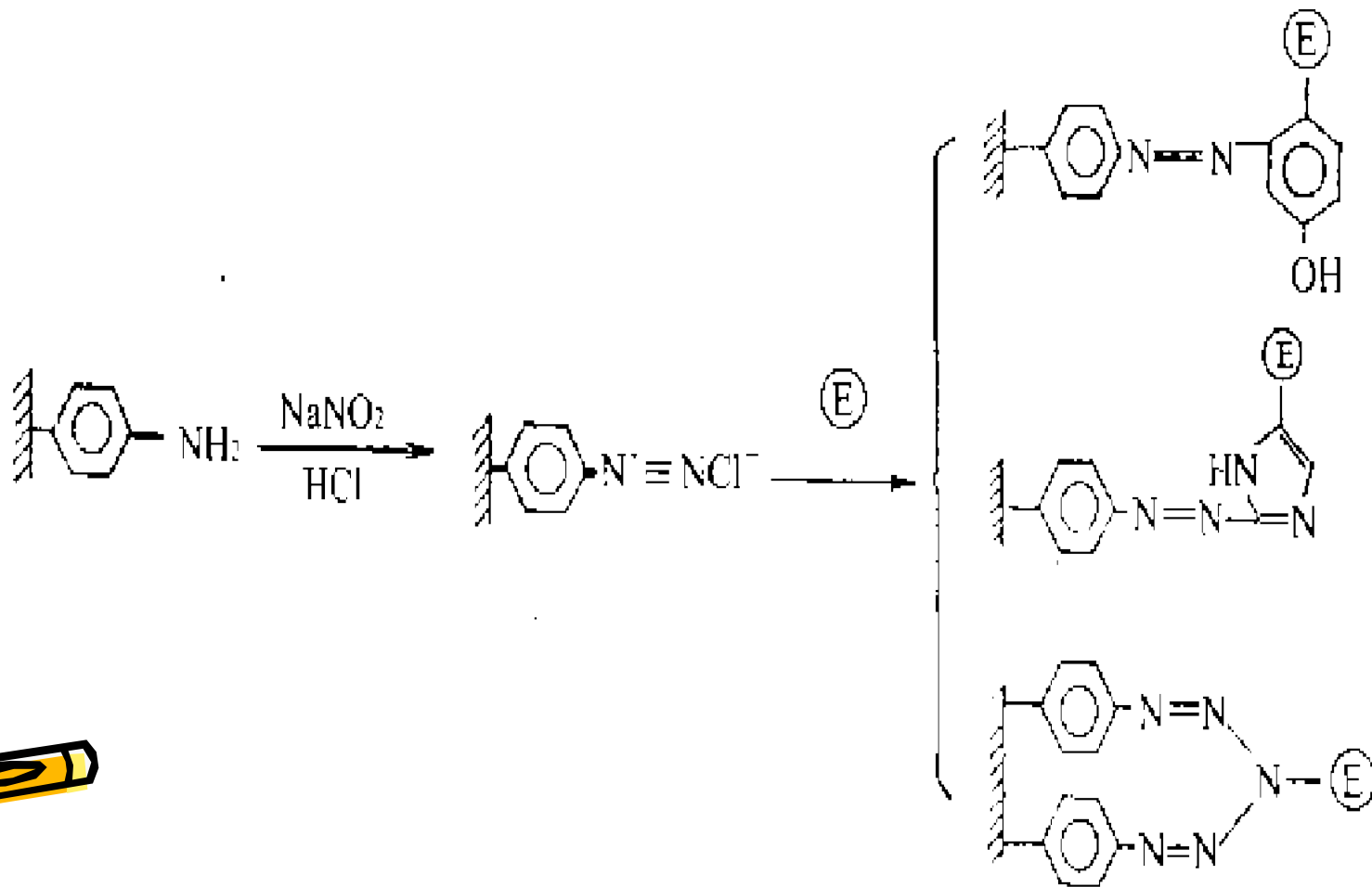
载体直接关系到固定化酶的性质和形成。对载体的一般要求是：

- ①一般亲水载体在蛋白质结合量和固定化酶活力及其稳定性上都优于疏水载体。
- ②载体结构疏松，表面积大，有一定的机械强度。
- ③载体必须有在温和条件与酶共价结合的功能基团。
- ④载体没有或很少有非专一性吸附。
- ⑤载体来源容易，便便，并能反复使用。

(3)偶联反应 酶和载体的连接反应取决于载体上的功能基团和酶分子上的非必需侧链基团，而且是在十分温和的pH、中等离子强度和较低温的缓冲液中进行。现已有许多种偶联反应都能制备固定化酶。这些方法在实际运用中经济意义起着决定性作用，必须考虑到酶的偶联效率，固定化酶总活力，操作的简便性以及载体与试剂的成本等因素。现介绍如下：

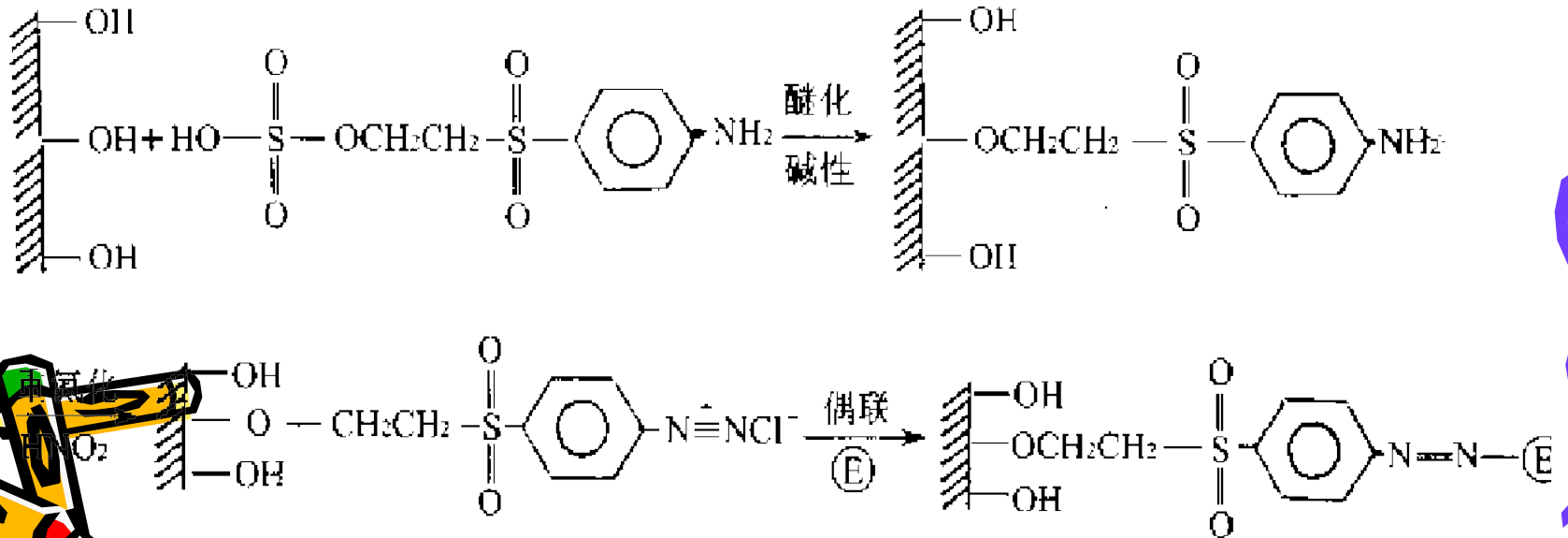


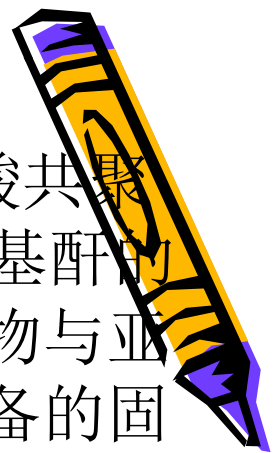
①重氮法 是将带芳香族氨基的载体，先用 NaNO_2 和稀盐酸处理成重氮盐衍生物，再在中性偏碱(pH8—9)条件下与酶蛋白发生偶联反应，得到固定化酶。



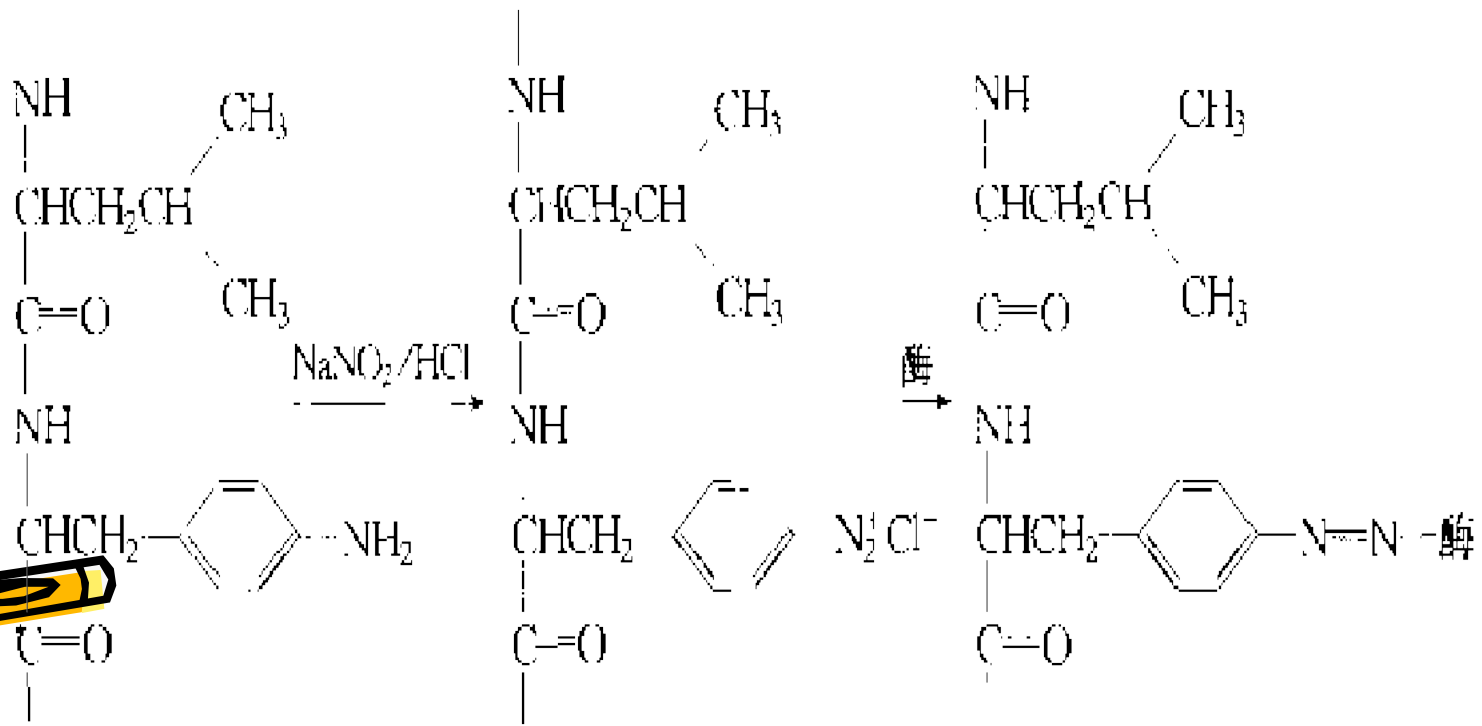
可能与酶蛋白中Tyr的酚基，His的咪唑基生成重氮衍生物，在过量重氮盐存在下还可与酶蛋白的N—端氨基或Lys的ε—氨基形成双偶氮化合物。常用载体及其反应如下：

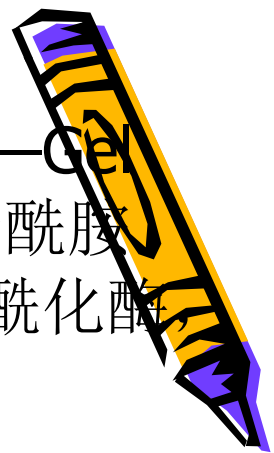
a. 多糖类的芳香族氨基衍生物。我国独创的使用对-β-硫酸脂乙砒基胺(ABSE—)多糖(纤维素，葡聚糖，文联琼脂糖，交联琼脂及淀粉)属于此类载体。在碱性条件下用对—β—硫酸脂乙砒基胺活化多糖，制得的醚键连接的乙砒基苯胺衍生物，经重氮化后偶联酶：



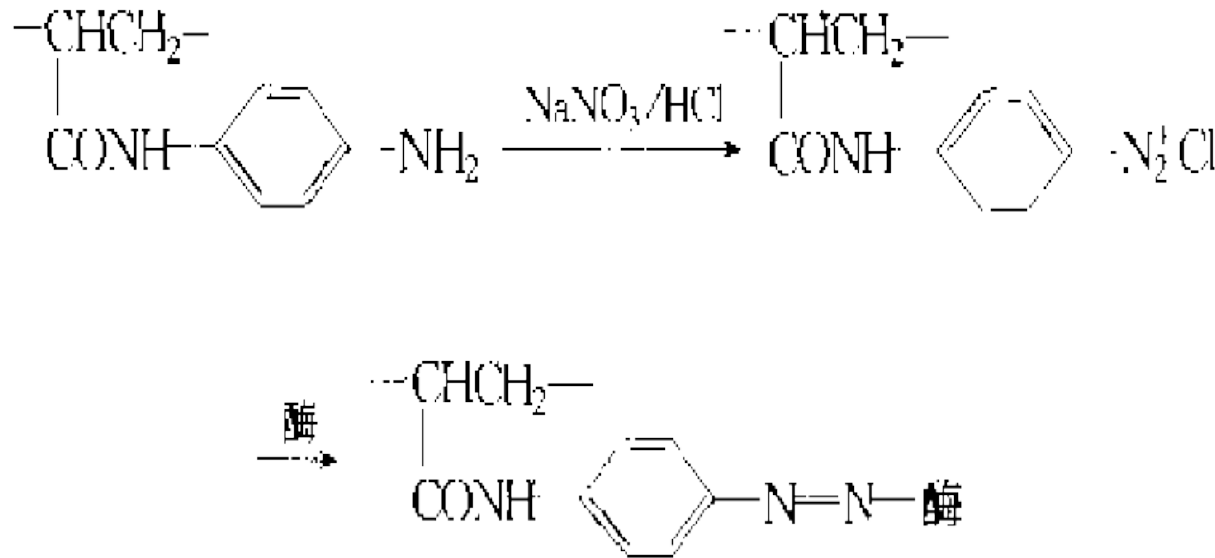


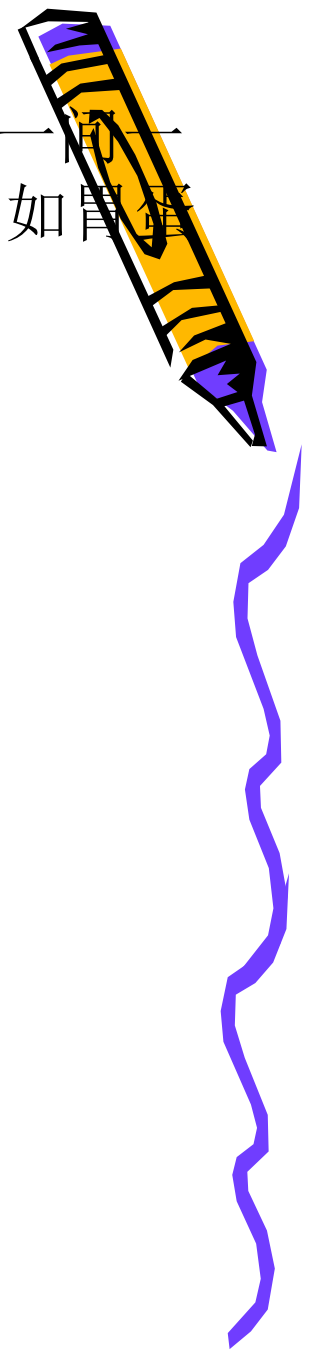
b.氨基酸共聚体。如L—Leu和对氨基—DL—苯丙氨酸共聚物：待1mol/L的L—Leu和对氨基—DL—Phe的N—羧基酐的苯溶液在少量水存在及室温下进行反应制成。共聚物与亚硝酸作用转变为重氮盐，可供酶固定用。用此法制备的固定化酶有蛋白酶、脲酶、核糖核酸酶等。



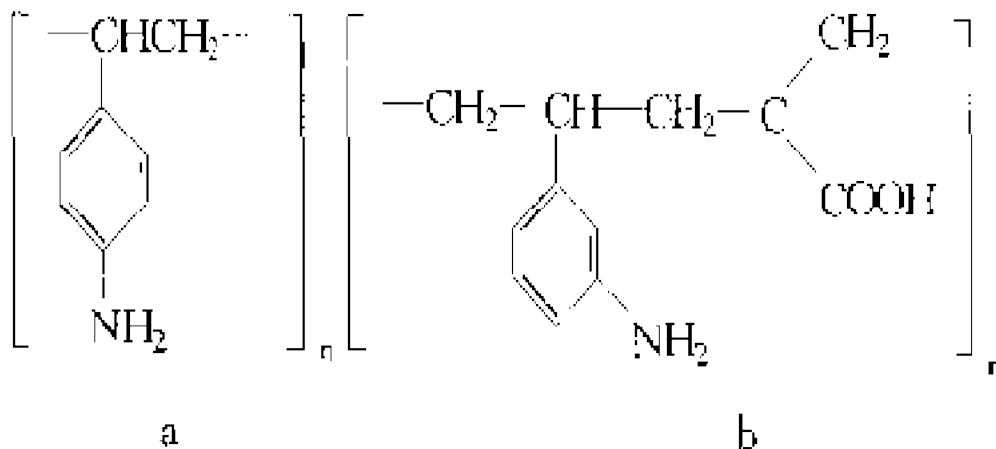


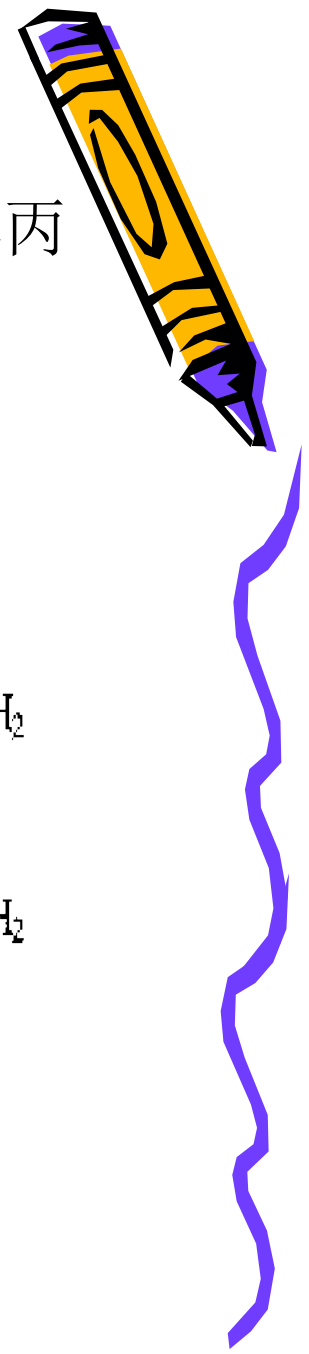
c. 聚丙烯酰胺衍生物。该类衍生物的商品名称为bio-Gel或Enzacry。如EnzacryIAA是含有芳香氨基的聚丙烯酰胺衍生物，经重氮化可固定酶。用此法制备的有氨基酰化酶、淀粉酶等固定化酶。





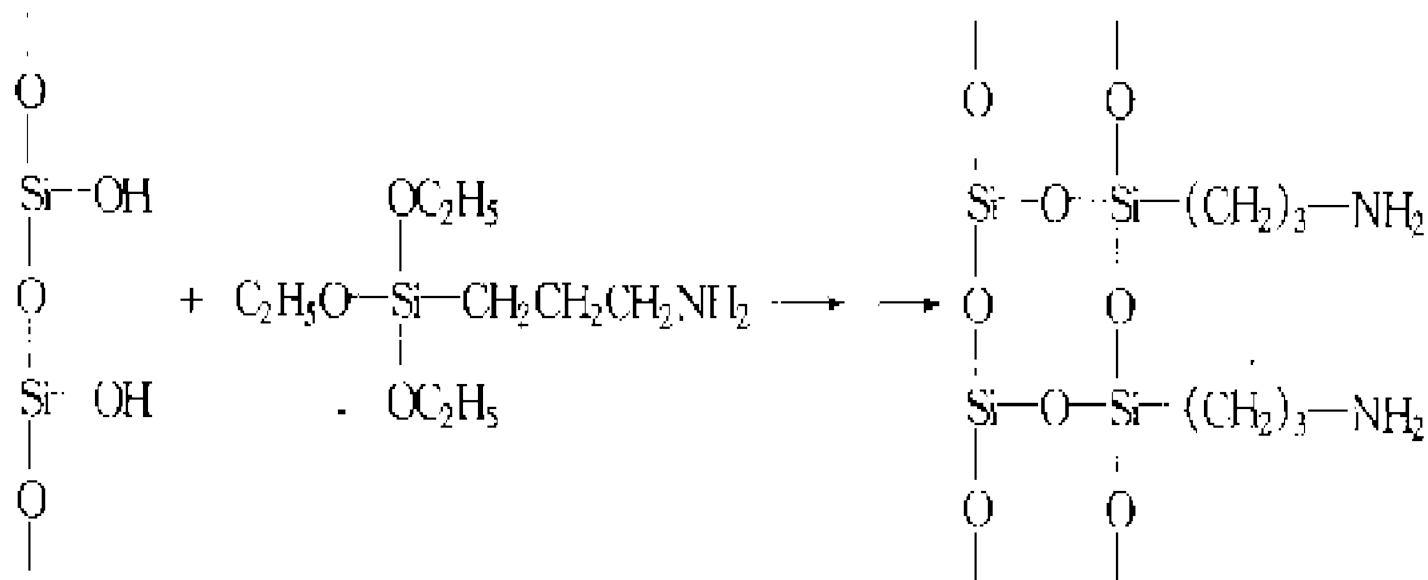
d. 苯乙酰树脂。这是聚氨基苯乙烯(a)和一种异丁烯-间-氨基苯乙烯(b)的共聚物，通过重氮化后可固定酶。如胃蛋白酶、核糖核酸酶等。



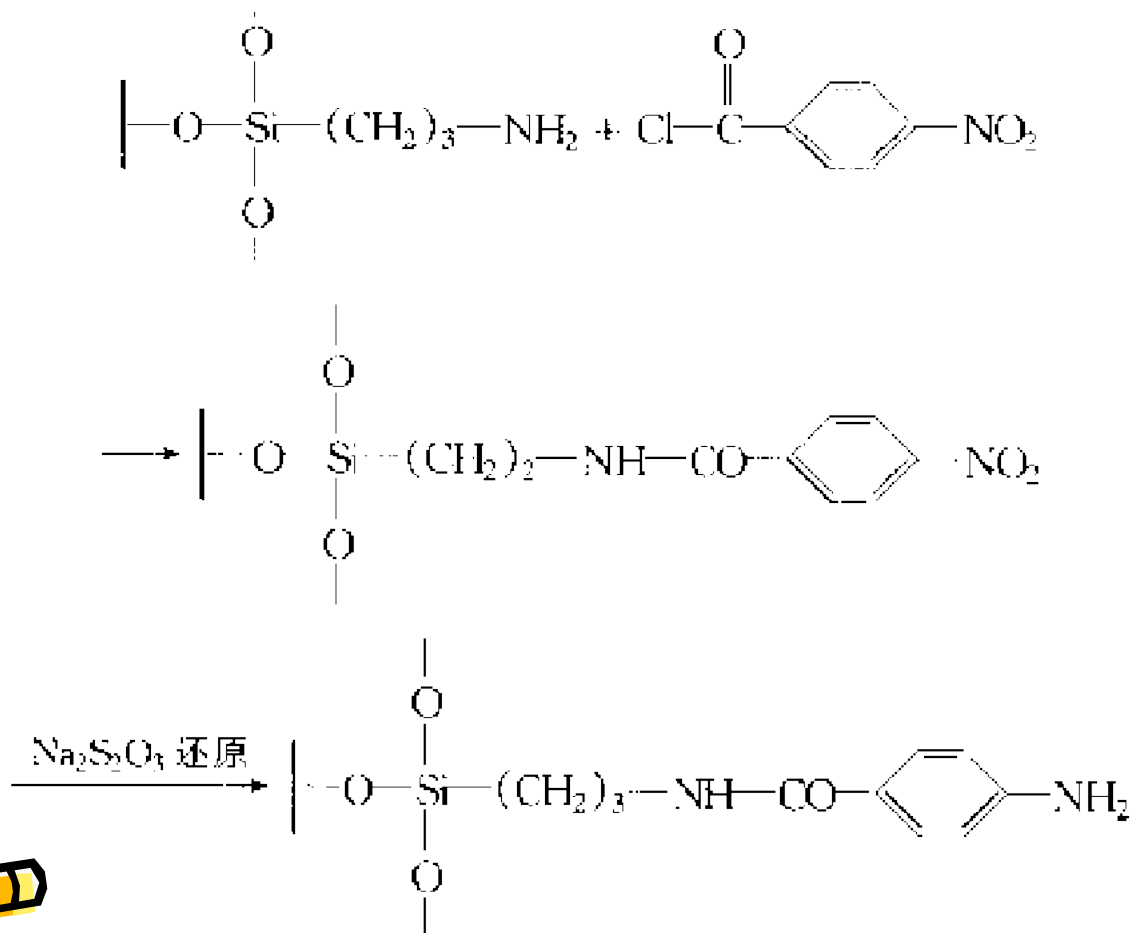


e. 多孔玻璃的氨基硅烷衍生物。

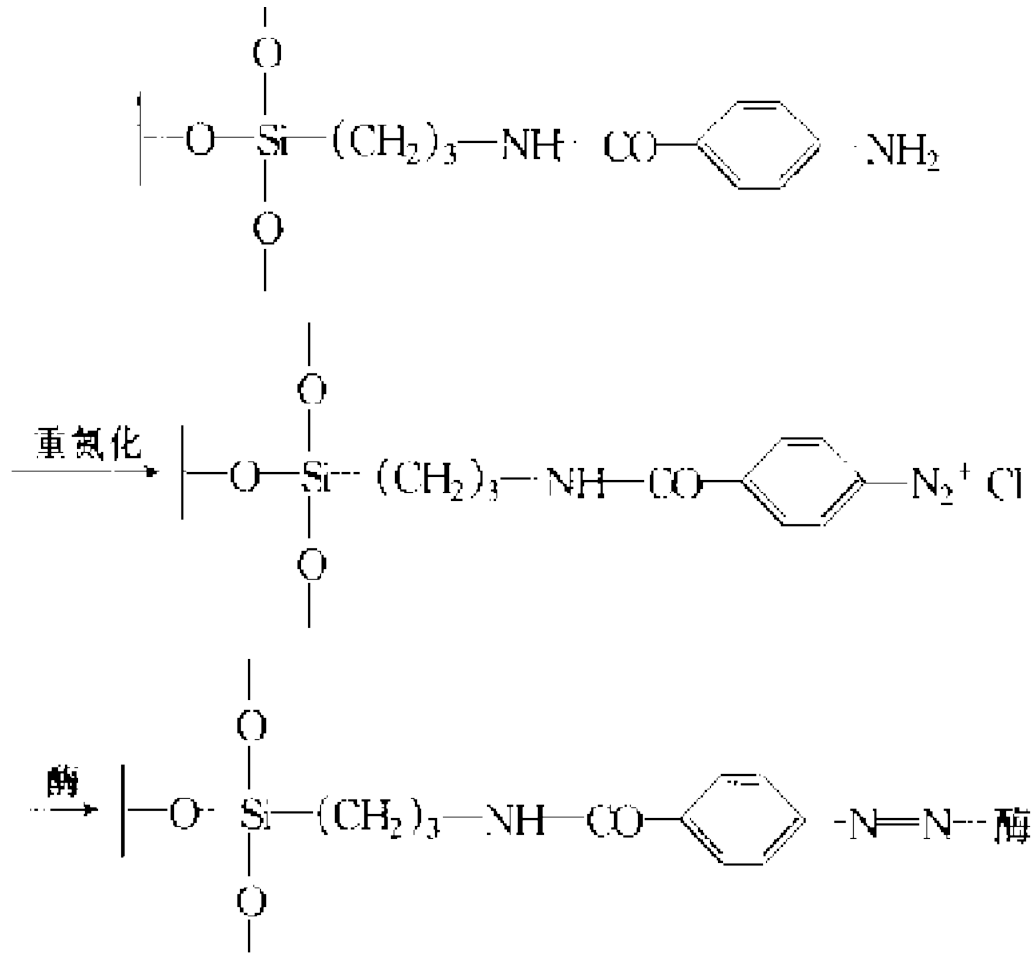
玻璃的化学改造物多孔玻璃在丙酮中与γ-氨基丙基三氧乙烷硅回流加热，生成烷基胺玻璃：

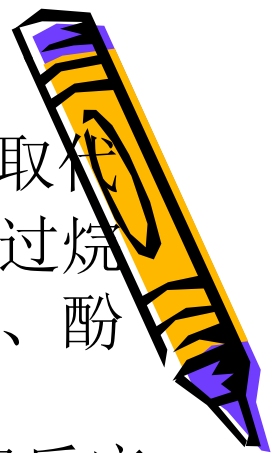


烷基氨玻璃用对硝基苯酚氯处理后，再还原，转变为芳香基衍生物：



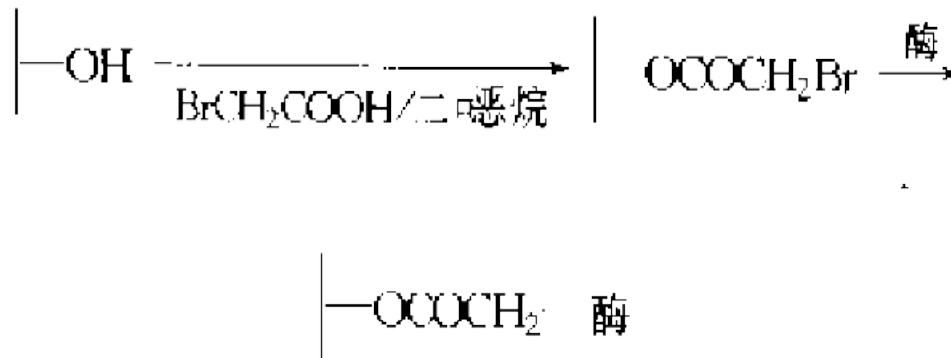
此芳香基衍生物经重氮化后与酶结合，产生固定化酶。





②芳香烃化反应 具有卤素取代的芳香环或含有卤素取代的杂环的高聚物以及含有卤乙酰基的高聚物，可以通过烷基化、芳香基化，在碱性条件下，与酶分子上的氨基、酚基、巯基等反应，如：

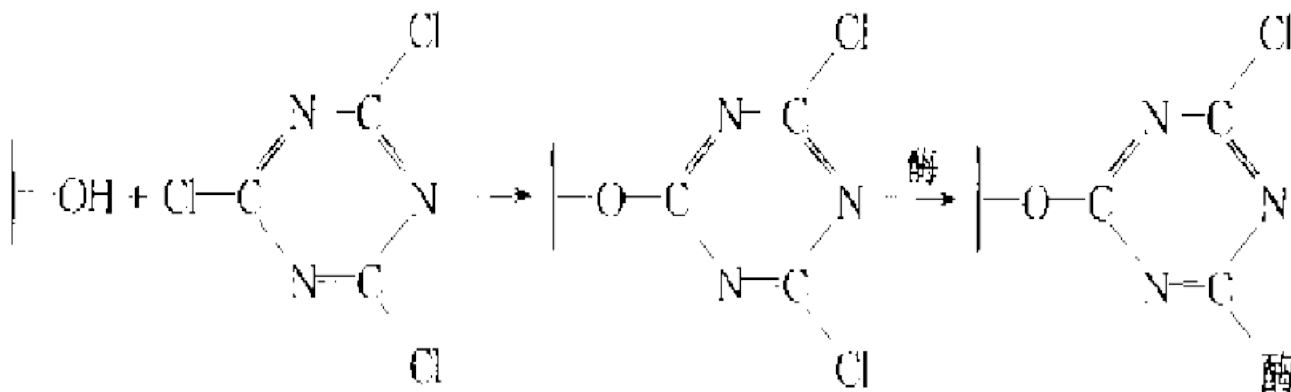
a.将纤维素在二恶烷(Dioxane)-溴乙酸中与溴乙酰溴反应，形成溴乙酰纤维素，可供胰蛋白酶、糜蛋白酶和核糖核酸酶之固定化：



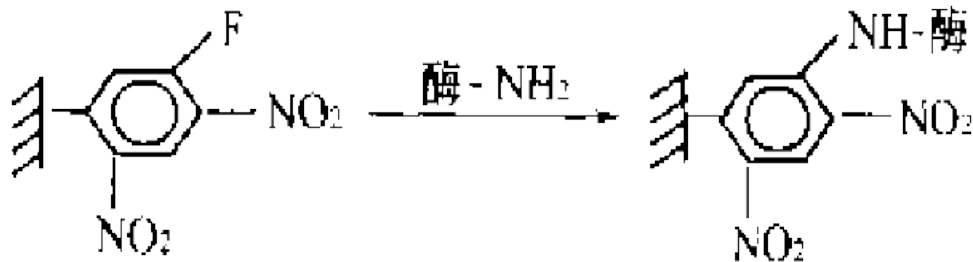
常用材料有卤乙酰、卤异丁烯衍生物，如氯乙酰纤维素、溴乙酰纤维素、碘乙酰纤维素等。

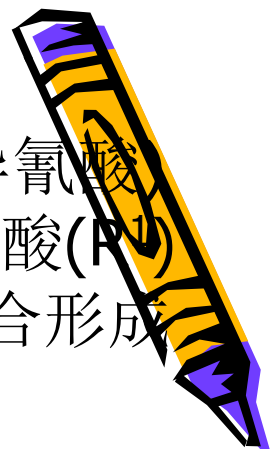


b. 纤维素等载体在碱性条件下和均三氯三嗪等反应，引入活泼的卤素基后，能与酶的氨基、酚羟基、巯基反应，产生固定化酶。

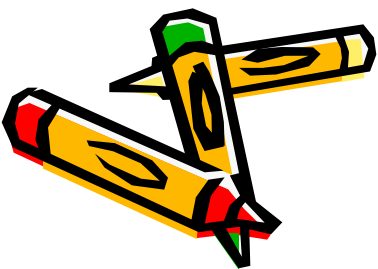
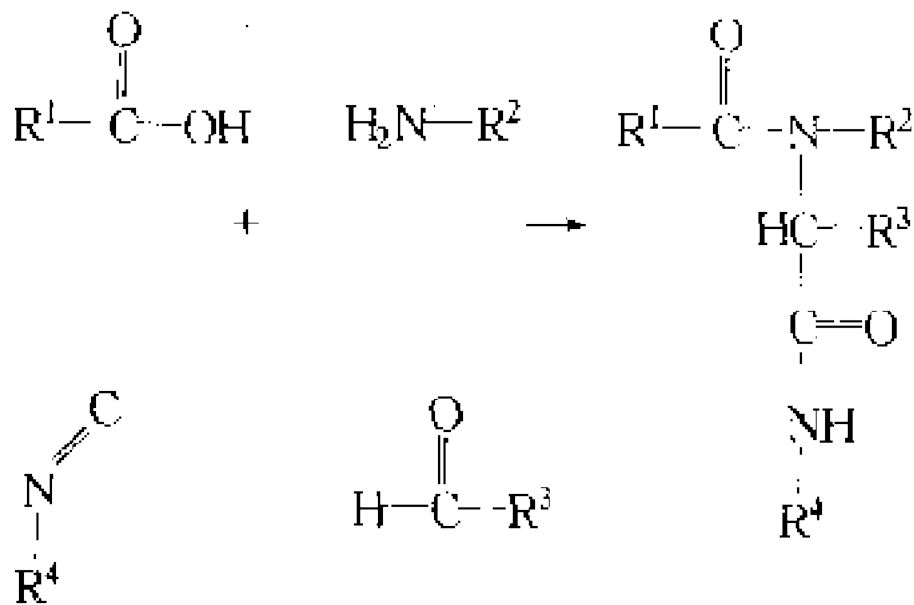


与纤维素共价结合的另一类芳香烃化功能基是3-F-4, 6-二硝基苯。控制pH < 7，使它与酶分子的氨基反应，产生固定化酶。



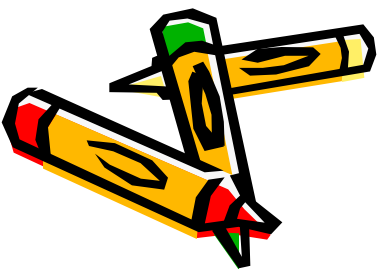


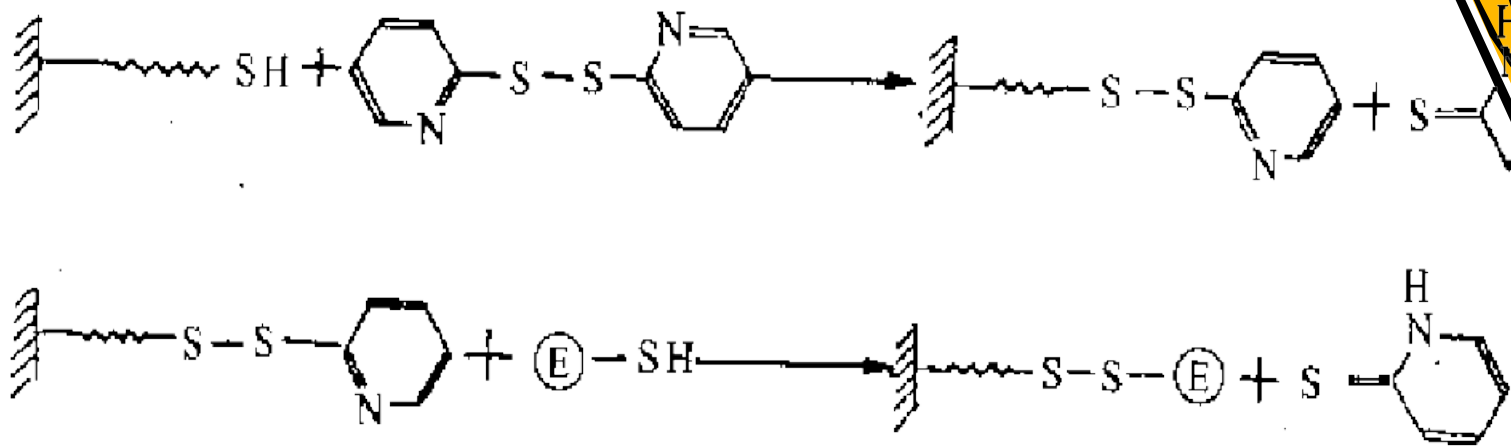
c. 四元缩合反应 利用四元化合物(羧酸、胺、醛和异氰酸)发生缩合反应, 形成N-取代的酰胺。在反应中, 羧酸(R^1)和胺化合物(R^2)形成酰胺键, 醛(R^3)和异氰酸(R^4)结合形成酰胺氮的侧链:



当选择适当条件，适当的载体及控制反应液中的添加物，可以使连接键或通过酶的氨基或通过羧基，将酶固定并免除有害反应。例如：在乙醛和小分子的3—(二甲氨基)—丙基异氰酸存在下，用0.5mol/L HCl维持pH6.5，搅拌反应6h，用带氨基的聚合物，可以与酶分子的羧基偶联。而带—COOH的高聚物在醛和异氰酸存在下，可与酶分子的—NH₂偶联。

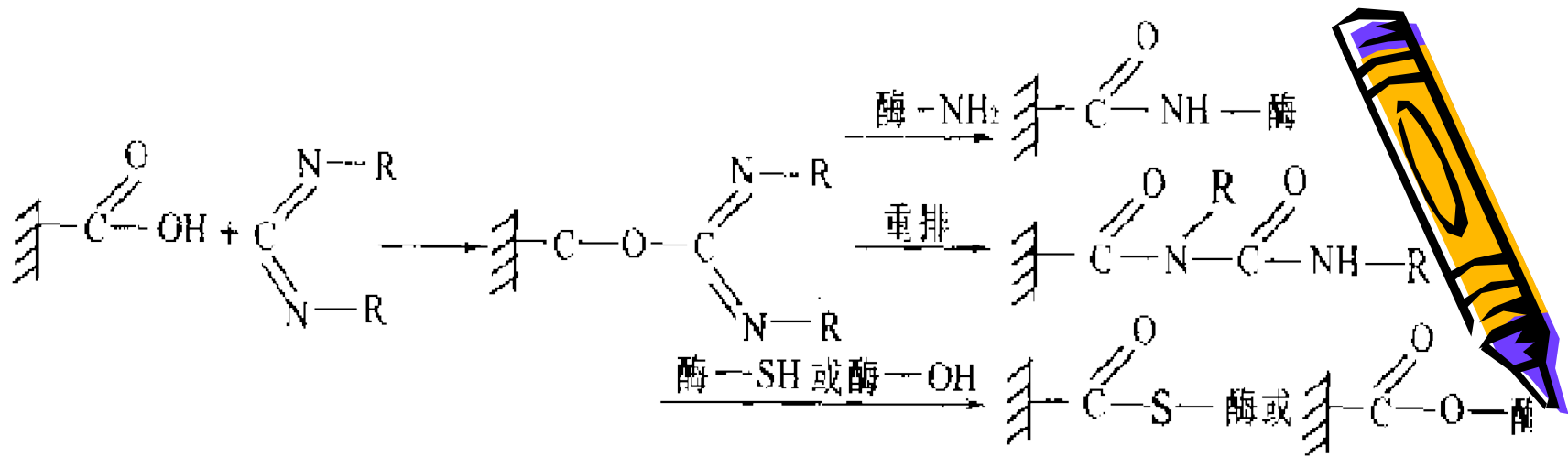
d. 巯基—二巯基交换反应 带有一—SH或二巯基的载体，通过巯基—二巯基的交换反应，和酶分子上非必需巯基偶联。若载体的功能基团为一—SH时，可先用2, 2'—二吡啶二硫化物处理，生成的二巯基中间产物在酸性条件下能与酶分子的巯基发生交换反应，从而产生固定化酶。





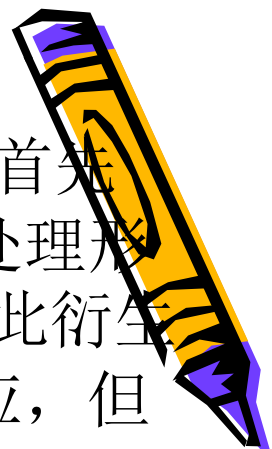
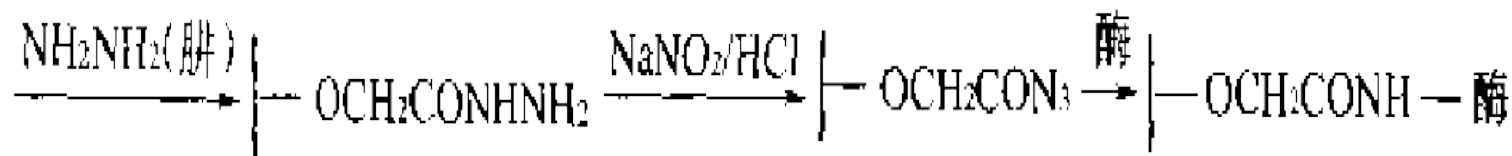
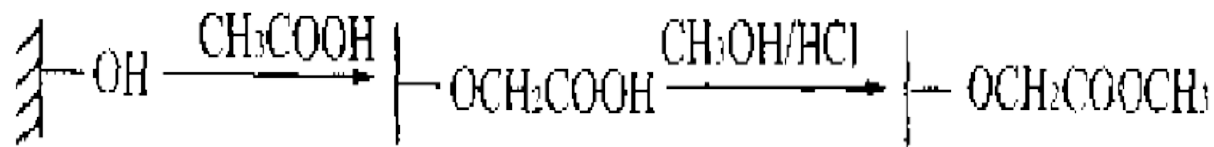
此法通过小分子巯基化合物的运转，使载体可以再生：





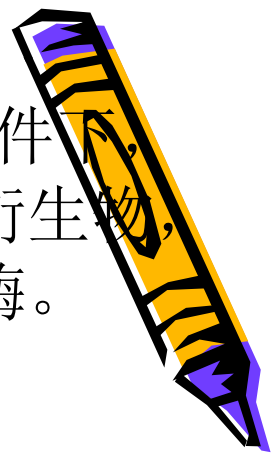
例如以丙烯酰胺和丙烯酸共聚物为载体用缩合法制备固定化胰蛋白酶。0.95g丙烯酸用3mol/L NaOH调pH6.5，加入1.95g丙烯酰胺和0.1g N, N'—甲叉双丙烯酰胺，再加入0.1mol/L pH6.5磷酸缓冲液，使体积为10ml，加入25mg过硫酸铵和22ulN, N, N', N'—四甲基乙二胺，抽真空除气泡，4聚合30min，压挤成粒，搅拌下水洗。丙酮干燥备用。70g干胶在20ml0.5mol/L HCl中搅拌30min，用水和0.1mol/L pH 6.5磷酸缓冲液洗涤后转至小烧杯，加入3.5ml 0.1mol/L pH6.5磷酸缓冲液的8.75mg胶原蛋白酶后，搅拌5min，接着加1—环己基—3—(2—吗啉乙基)—羰二亚胺甲基对甲苯磺酸，连续搅拌18h，洗涤后即为止固定化酶。

g. 叠氮反应 带有羧基或羟基、羧甲基等的载体，首先在酸性条件下用甲醇处理使之酯化，再用水合肼处理形成酰肼，最后在HNO₃作用下转变成叠氮衍生物。此衍生物在低温下可与酶蛋白的羟基、酚基或巯基等反应，但产物可用中性羟胺水解掉，使之仅与一NH₂反应。

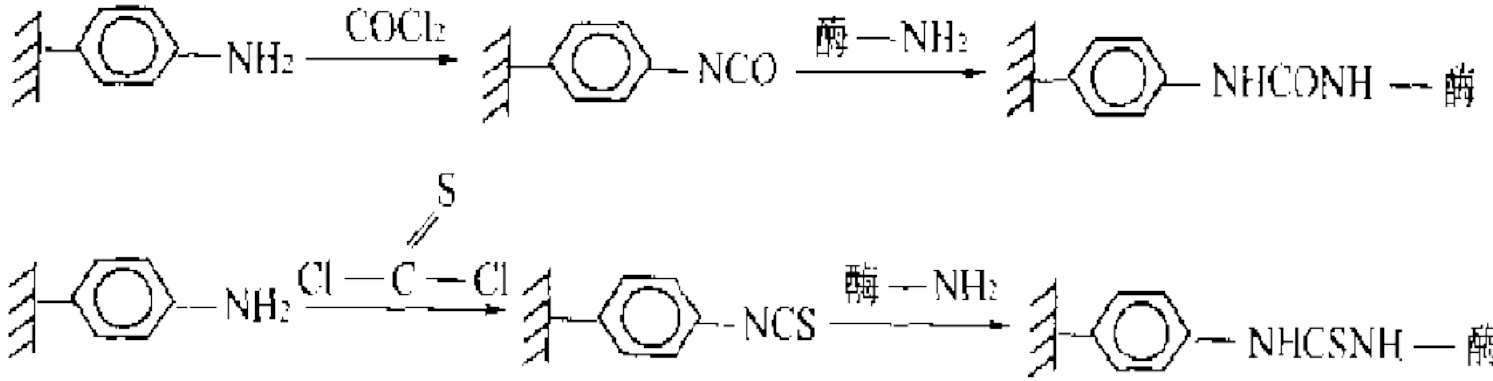


此法常用载体有羧甲基纤维素、CM—Sephadex、聚天冬氨酸、BioGel.CM—100、乙烯—顺丁烯二酸酐共聚物、Amberlite IRC50等。叠氮法用途较广，举例如下：

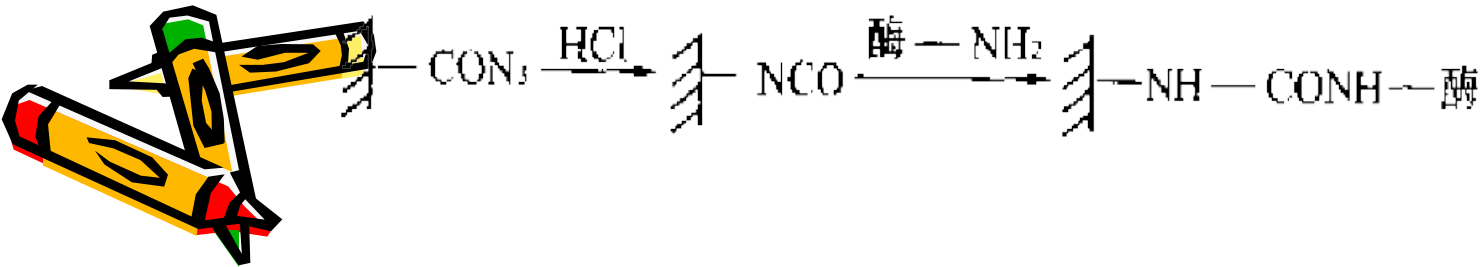
以CM—纤维素(CMC)叠氮衍生物为载体固定化胰蛋白酶。首先，载体的酯化与胍解：**CMC**依次用水、乙醇和乙醚洗涤，干燥后，悬于无水甲醇，在冰浴冷却下通入**HCl**气体，使之饱和。室温下过夜，并重复此过程(甲酯化)。然后用甲醇、乙醚充分洗涤，并空气干燥。将产物悬于甲醇中，加入**80%**水合胍，回流**1h**。放置过夜，过滤，再用甲醇洗涤，干燥。其次为偶联：**1g CMC**酰胍和**150ml 2% HCl**在冰浴中混合，搅拌下滴加**9ml 3% NaNa₂**，冰水浴中搅拌**20min**。离心弃去上清液。沉淀用**150ml**二氧氯环洗涤。再用**150ml**冷的蒸馏水洗涤二次，并且悬于预冷的**10ml 0.05mol/L pH8.7**磷酸缓冲液的胰蛋白酶溶液，搅拌反应**2—3h**，用**HCl**调**pH4**，冷**0.001mol/L HCl**洗三次，冷水洗一次，冻干，即为固定化酶。



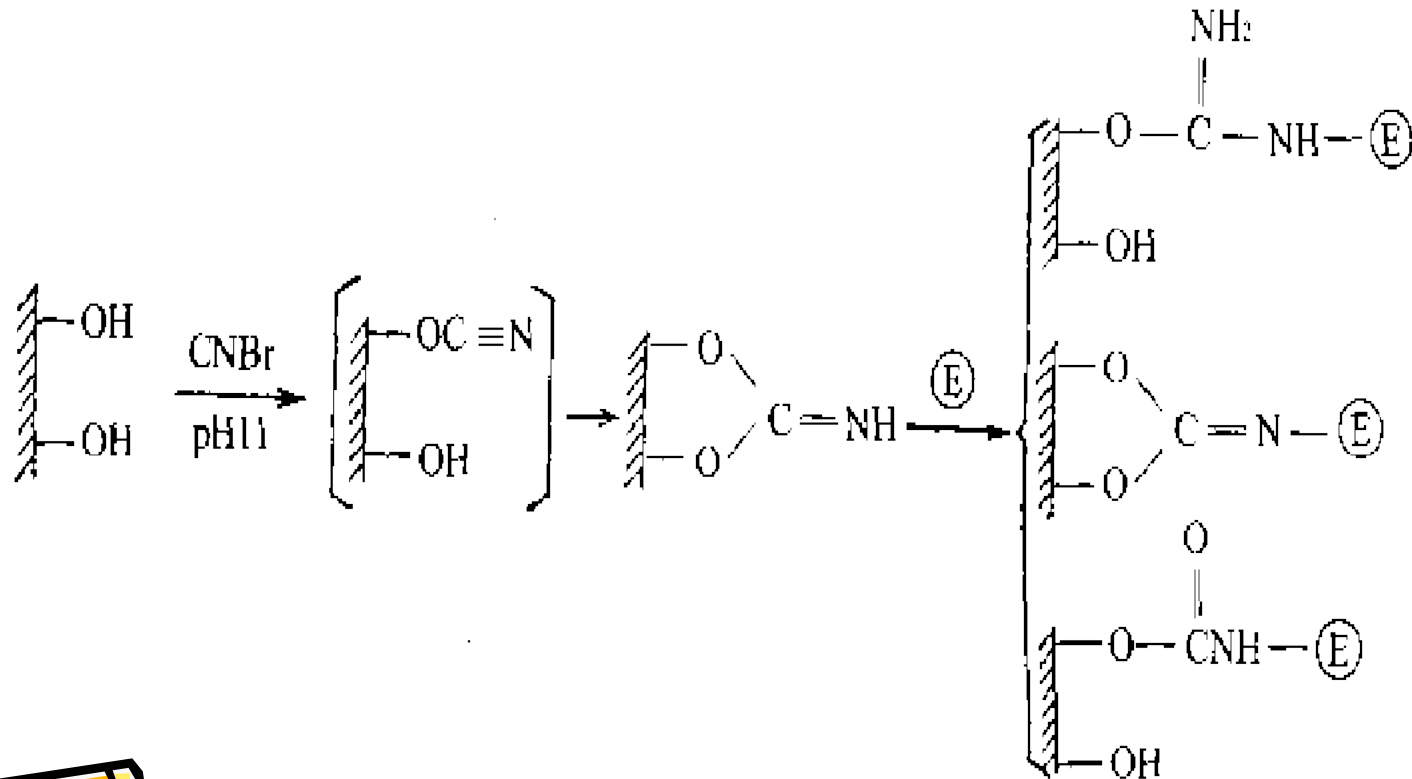
j. 异硫氰酸反应 含有芳香氨基的载体，在碱性PH条件下，与光气或硫芥子气反应，生成异硫氰酸或异硫氰酸衍生物，可在温和条件下与酶分子的氨基连接，产生固定化酶。



用含有酰基叠氮的载体在加热下与HCl反应，亦得到异硫氰酸衍生物，亦可用于固定化酶。

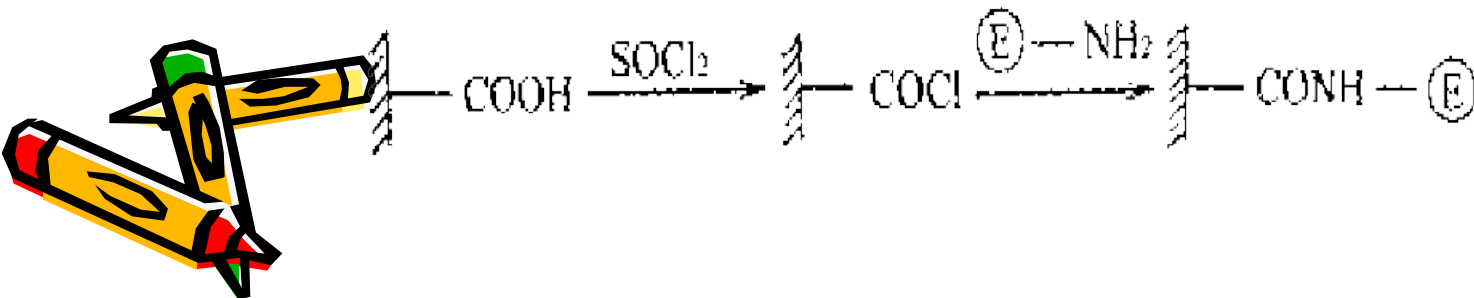


k. 溴化氰—亚胺碳酸基反应 含有羟基的载体(如纤维素、葡聚糖、琼脂等)在碱性条件下, 载体的羟基与CNBr反应, 生成活泼的亚胺碳酸基, 在弱碱条件下, 可与酶分子的氨基偶联, 产生固定化酶。

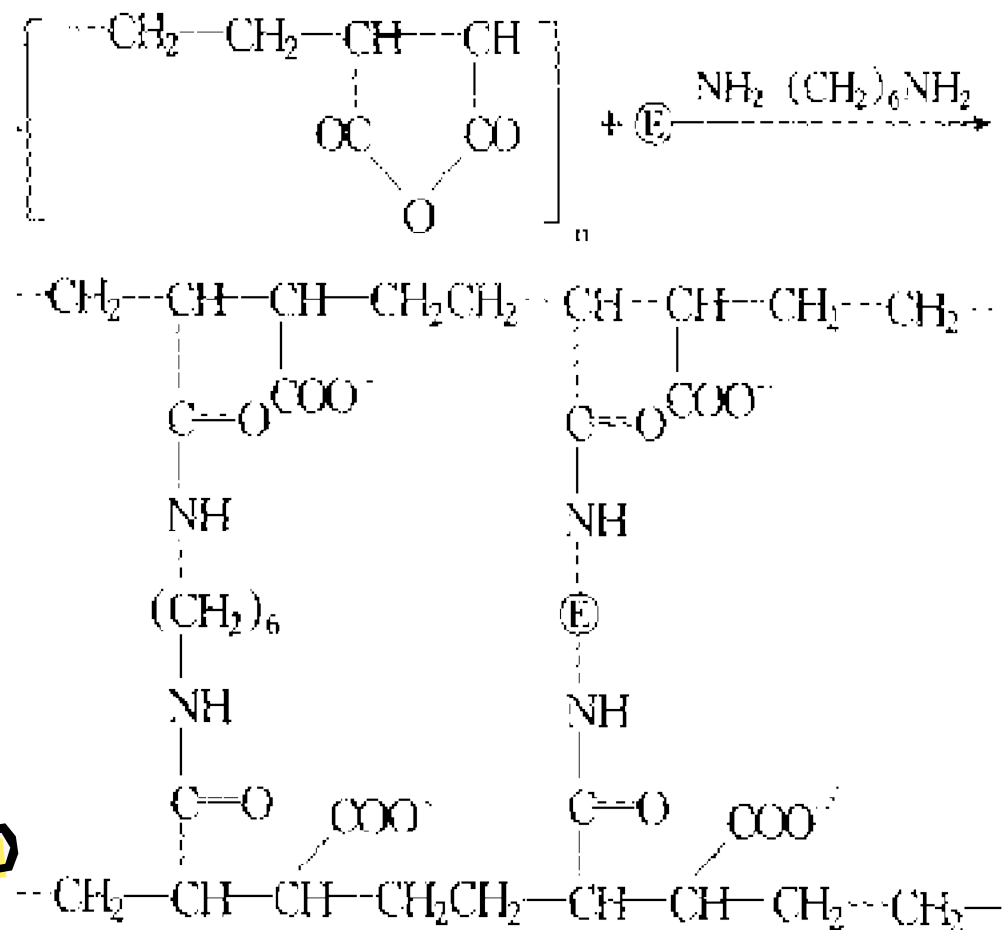


例如：用CNBr活化的琼脂糖固定化胰蛋白酶。将Sephacrose 4B用蒸馏水洗净，含0.1g干物质的湿胶加5ml水和4ml现配溴化氰水溶液(25mg/ml)，搅拌下用2mol/L NaOH调pH11.0，23—25℃反应6min，抽干立即用300ml 0.1mol/L NaHCO₃洗净，(5—8min内完成)。活化的载体用0.025mol/L pH10.2 (含0.02mol/L CaCl₂) 硼酸缓冲液快速淋洗后，用5ml缓冲液转入烧杯内加16mg结晶胰蛋白酶，搅拌4h，用0.1mol/L pH8.5硼酸缓冲液(内含1mol/L NaCl)洗涤后，复用pH4.1的醋酸缓冲液洗涤，便制成了固定化胰蛋白酶。

⑩酰氯化反应 含羧基载体如羧基树脂(Amberlite IRC—50等)，可用氯化亚砷处理，生成酰氯衍生物，与酶分子的氨基偶联，产生固定化酶。



m. 酸酐反应 乙烯或苯乙烯、甲代乙烯基与顺丁烯二酸酐的共聚物，在己二胺作用下，酸酐与酶蛋白的氨基起偶联反应，产生固定化酶。



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/448133112021006064>