

# 用高梯度磁场分离磁性固定化酶技术研究

张兆庆 安治法\* 关成信 冯志新 王京梅 安玉玲

(河南省科学院应用物理所, 郑州) (河南省科学院生物所, 郑州)\*

细胞和微球体的磁标记技术的新发展<sup>[1]</sup>使得高梯度磁分离(HGMS)的应用范围扩展到生物工程中的许多重要领域。我们用自己设计, 制造的HGMS和超顺磁性磁粉, 对 $\alpha$ -淀粉酶, 糖化酶, 葡萄糖异构酶和蛋白酶进行了磁性固定化和分离, 分离率至少在95%以上。磁性固定化酶活性好, 可反复使用多次, 对今后的工业应用提出了初步设想。

## 材料与 方法

### (一)高梯度磁分离的原理

世界上的物质按磁性来分可归于铁磁性、顺磁性和抗磁性三种。前两种可被高梯度磁场所吸引, 后一种不能被吸引, 但通过加磁种使之和磁种结合在一起, 便能和磁种一起被分离出来。对生物上绝大多数物质来说都属于第三种。高梯度磁分离器实际上是一个置于磁场中的容器, 里边装有导磁不锈钢毛, 因钢毛导磁率很高, 可把磁场集于钢毛内, 在钢毛表面磁场衰减很快, 因此可产生一个很高的梯度场和很强的吸力, 在待分离物质通过容器时, 便能将它们很容易地分离出来。

### (二)分离系统的设计和磁种制备

高梯度磁分离器如图1所示<sup>[2]</sup>, 上下磁极间填充占总体积4%的不锈钢毛, 加磁场后便可产生很强的吸力。其工作过程如图2所示。

工作时, 待过滤溶液通过阀门1从下部向上通过分离器, 滤液从阀门2流出, 磁粉和酶被截流在钢毛上, 过滤完毕后, 关掉磁场和阀门1、2, 打开阀门3、4, 用反冲洗液把磁粉冲出。

硅烷化超顺磁性磁粉制备: 我们采用化学共沉淀法, 即将0.5mol/L的 $FeCl_2$ 和0.25mol/L的 $FeCl_3$ 各200ml与200ml的NaOH溶液在600℃混合, 倒入含100ml蒸馏水的烧杯中, 搅拌2

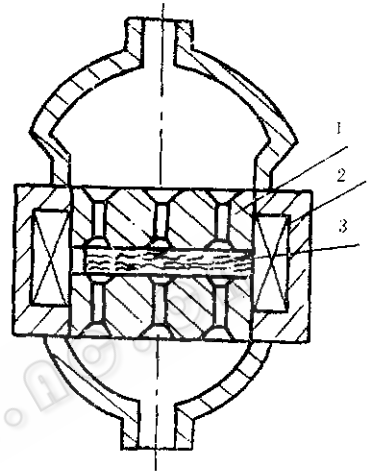


图1 高梯度磁分离器  
1.磁极 2.磁毡 3.钢毛

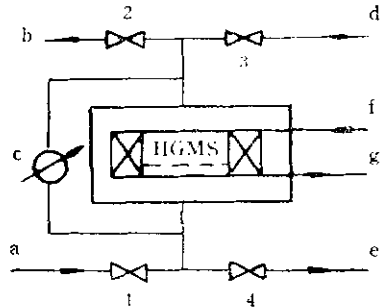


图2 高梯度磁分离器运转示意图  
a.酶液 b.滤液 c.压力计 d.反冲洗液进口  
e.反冲洗液出口 f.冷却进水 g.冷却出水  
h.1-4为阀门

min, 便得到黑色沉淀物, 用水冲洗至中性, 便制成粒度0.025 $\mu$ m左右的 $Fe_3O_4$ 微粉。因它是亲水性的, 而一些有机物, 酶等是亲油性的, 故需经硅烷化处理, 用 $\gamma$ -氨基丙基三乙氧基硅烷作偶联剂, 它的X基团首先水解成硅醇, 然后硅醇

本文于1990年12月3日收到。

脱水与 $Fe_3O_4$ 中的Fe原子耦合,使 $Fe_3O_4$ 表面包一层单分子层的硅烷偶连剂,再用戊二醛活化,表面的醛基便能靠共价键和酶的氨基结合在一起。我们分别用电子显微镜、比表面测量仪和铁磁仪测得超顺磁性磁粉参数是:粒度 $0.025\mu m$ ,比表面:60—80 $m^2/g$ ,比磁化强度:70A· $m^2$ (T)。

### (三)分离方法和测量

我们用高梯度磁分离方法分离了 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶和蛋白酶。这些酶取自河南省科学院生物所酶制剂组。分离步骤一般是大同小异的,现以 $\alpha$ -淀粉酶为例加以说明:

1. 磁粉活化:取3g已硅烷化的磁粉,在磁场下用蒸馏水洗三次,加60ml含2%戊二醛的蒸馏水溶液,搅拌2h,磁场下倒去上清液,用冷的、pH=6的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液洗至无醛味为止。

表1 对四种酶的分离结果

酶种类		A		B		C		D	
磁粉		230*强搅	130*	120*	230*	180*	180*弱搅	130*	180*
酶活 (u/ml)	分离前	1200	1200	36000	36000	75	143.6	26000	26000
	分离后	88	0	460	360	0.99	0.17	1300	1280
分离率(%)		93.0	100	98.7	99.0	99.0	99.9	95.0	95.1

A.  $\alpha$ -淀粉酶 B. 糖化酶 C. 葡萄糖异构酶 D. 蛋白酶

### (二)磁性固定化酶活性

我们用同样方法测量了固定化酶磁粉活性,其结果分别是: $\alpha$ -淀粉酶:9600u/g,糖化酶:280000u/g,葡萄糖异构酶:960u/g,蛋白酶:200000u/g。(以上磁粉均为湿粉)。

### (三)磁性固定化 $\alpha$ -淀粉酶和葡萄糖异构酶反复使用次数试验

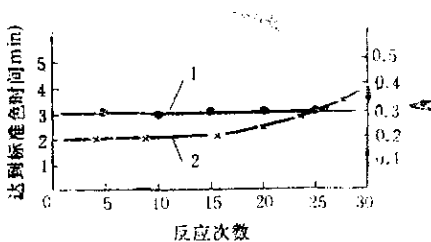


图3 反应次数实验  
1. 葡萄糖异构酶; 2.  $\alpha$ -淀粉酶

2. 固定化酶:将磁粉加入稀释150倍的酶液中,在200rpm速度下搅拌4h。

3. 过滤:让悬浮液在0.3T的磁场强度下通过过滤器,分别收集磁粉和滤液待分析。

4. 酶活测定:对固定化酶磁粉和滤液分别用轻工部颁标准测定了 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶(次亚碘酸法)<sup>[3]</sup>的活性。分别用哇唑法<sup>[4]</sup>和福林法<sup>[5]</sup>测定了葡萄糖异构酶和蛋白酶的活性。

## 结果与讨论

### (一)分离结果

我们用HGMS对四种酶进行分离,测量磁粉上固定化酶和滤液的酶活,其结果如表1所示。可以看出,对不同的磁粉,由于制造工艺不同,固定酶的能力是不同的,过强的搅拌也是不利的,容易引起酶的脱落。

用标准方法测定了反复催化次数,如图3所示:

### (四)工业应用的初步设想

设想装置如图4,有两个反应器,把挂酶磁粉先放入反应器2中,反应完后打开开关1、3让产物从3排出,磁粉被吸在过滤器中,反应

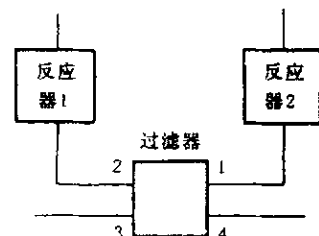


图4 设想的反应装置  
1—4为开关

器2的产物排完后，关掉磁场和开关1、3，打开开关2、4，原料从开关4通过开关2进入反应器1中，过滤器中磁粉被冲向反应器1进行催化反应，如此反复可使挂酶磁粉使用多次。

### 参 考 文 献

- [1] Setchell, C. H., *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 35B, 175—182, 1985.  
 [2] 张兆庆：第六届全国磁学会议论文摘要集，武汉，616，1987。  
 [3] 中华人民共和国轻工部部颁标准：QB746-747-80，1981。  
 [4] 安治法，*河南科学*，(3—4)，136，1986。  
 [5] 上海市粮油工业公司技校，上海市酿造科学研究所：发酵调味品生产技术，轻工出版社，上册，p.218—228，1978。

## Technology Investigation of Separating Magnetic Immobilized Enzyme by High Gradient Magnetic Field

Zhang Zhaoqing An Zhifa\* Guan Chengxin  
 Feng Zhixing Wang Jingmei An Yuling

(*Institute of Applied Physics Henan Academy of Sciences, Zhengzhou*)

(*Institute of Biology Henan Academy of Sciences, Zhengzhou*)\*

New developments in magnetic labelling techniques for cells and microspheres have extended the useful range of high gradient magnetic separations (HGMS) into many important areas of biotechnology. We use the superparamagnetic powder to put magnetic labels on the  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, glucoseisomerase and proteinase, then separate them by HGMS. At least the separate efficiency can be more than 95%, the activity of the magnetic immobilized enzyme are better, for the industrial application in the future we offer an initial imagination.

### Key words

High gradient magnetic separation; magnetic labell; superparamagnetic powder