

关于褐藻胶作为固定化载体的研究*

顾柯楠

(中国科学院海洋研究所)

包埋法是固定化技术中比较成功而且多为工业应用的方法。褐藻胶 (Algin) 的钙盐能够形成天然的凝胶, 因此, 褐藻酸钙 (Calcium-Alginate) 是包埋法固定化技术中人们普遍采用的载体之一。

褐藻胶应用于固定化技术, 1973年始于美国。其后, 1975年联邦德国的科学家 Hackel V. 和 J. Klein 发表了研究论文。1977年英国 Tate and Lyle 公司的研究人员 Kierstan M. 和 C. Bucke^[1] 报道了他们用褐藻酸钙做载体成功地固定了面包酵母 (*Saccharomyces cerevisias*) 细胞、马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 细胞、叶绿体和线粒体等细胞器, 以及菊粉酶和葡萄糖氧化酶等具有高分子量的单酶。证明褐藻酸钙是一种能在极为温和条件下迅速成胶的优良载体。此后, 这一载体为各国所采纳。十几年来, 用褐藻酸钙固定各种生物物质的研究, 特别是用于工业化生产的研究日益增多。同时, 人们还采用各种方法改进这种凝胶的性能, 以使它的应用范围更广泛, 更符合人们的要求。1982年日本采用褐藻酸钙凝胶珠包埋固定啤酒酵母细胞技术, 进行乙醇连续发酵生产获得成功。不仅使酵母使用寿命延长, 而且乙醇的转化率和产率大大增加。并且应用这项技术, 建立了一个总容量为4000 L的实验性工厂^[2]。

褐藻胶做为固定化载体, 具有许多优点^[1]。即, 胶体本身为生化惰性物质, 成胶条件温和而迅速, 安全无毒, 对生物活性的影响小, 操作简单, 胶的机械强度好, 固定生物量大, 费用低廉等。

褐藻酸钙凝胶的孔径比较大。Tanaka, H. (1984) 证明分子量在 3×10^5 左右的分子能够在凝胶中自由出入。Klein, J. (1983) 以胶珠 (直径10—120 μ m) 做静止相, 进行糊精的柱分离, 推算出胶孔径的大小约为6.8—16.6 $\times 10^{-9}$ m, 比预想的要大。对于底物分子来说, 良好的通透性正是我们所期望的。但是, 这种性质也限制了我们只能用它来包埋固定那些体积较大、分子量较高的物质。在前述的 Kierstan, M. 的实验中, 即使是对细胞或高分子量的酶的包埋, 也存在着一定的外漏现象。为了克服这一缺点, 使一般的酶也能用褐藻酸钙凝胶固定, 人们做了多种努力。Kumaraswamy, M. D. K. 等人 (1981) 将酶共价连接在褐藻酸多聚物上。James M. L. (1983) 将 β -D-葡萄糖苷酶先固定到伴刀豆蛋白 A 和 Sepharose 的复合物上, 然后再与细菌 (*Z. Mobilis*) 细胞一起包埋在褐藻酸钙中, 完全防止了酶的外漏, 还使得酶的活力提高了两倍。Kierstan, M. (1982) 将 β -葡萄糖苷酶先固定在 Sepharose 4B 上, 然后再与酵母细胞用褐藻酸钙共包埋也取得了效果。Husain, Q. et al. (1985) 将葡萄糖氧化酶 (Glucose Oxidase)、转化酶 (Invertase) 和淀粉葡萄糖苷酶 (Amyloglucosidase) 等结构上含糖的酶分别与伴刀豆蛋白 A (ConA) 作用, 形成 Con-A 酶复合物。经浓度很低的戊二醛的交联作用后, 再用褐藻酸

* 本文承中国科学院海洋研究所张燕霞副研究员和吉林大学罗贵民讲师审阅, 特此致谢。

钙凝胶进行包埋。除能够有效地防止酶的外漏外,还有许多积极的效果。例如包埋后的酶仍有相当高的有效因数 (effectiveness factor), 表明固定化的Con-A酶保持了酶的大部分活性; 底物的通透性良好, 底物很容易接触到酶的活性部位; 固定化使酶的稳定性大大提高, 包埋后的Con-A酶的最适pH和最适温度不发生变化, 然而酶起作用的pH范围和温度范围都变宽了; 包埋后酶的使用寿命被大大延长了。如包埋的Con-A-转化酶能够连续作用于蔗糖(1.0 mol/L) 4个月以上。Husain, Q. 还指出本实验中高纯度的Con-A可用Jack Been的粗提取代替; 对于结构上不含有碳水化合物成份的酶, 可采取先制备抗体-酶复合物的办法, 再用褐藻酸钙固定化。Sato, P. (1983) 就曾制备出了L-古洛糖酸内酯氧化酶 (L-Gulonolactone Oxidase) 与抗体生成的免疫沉淀物。

褐藻酸钙凝胶的另一特点是胶中的 Ca^{2+} 能与磷酸盐形成稳定的复合物, 从而使凝胶逐渐溶解。利用这一特性我们可以将已固定化了的生物物质取出进行更新, 而褐藻胶载体能够反复使用。但是在有磷酸存在的系统中, 褐藻酸钙包埋的固定化受到限制。为克服这种局限, Veliky, I. A. (1981) 用含有碱性基团的高分子溶液处理凝胶, 使高分子吸附在胶上。从而得到有较强抗磷酸能力 (0.1 mol/L Na_2HPO_4 , pH8) 的凝胶。Tanaka, H. (1984) 使用聚乙烯亚胺 (Poly (ethyleneimine), PEI) 覆盖在包埋葡萄糖淀粉酶 (分子量 9.7×10^4) 的褐藻酸钙上, 发现这种方法不仅由于减小了胶的孔径而避免了酶的外漏, 而且具有抗磷酸溶解的能力。

褐藻胶为天然胶, 其结构因不同的褐藻种类, 生长地区和生长时期, 以及生产工艺的不同而有所差别。褐藻胶的主要成份是 β -D-甘露糖醛酸(简称M)和 α -L-古洛糖醛酸(简称G)以及少量的葡萄糖醛酸。不同来源的褐藻胶是由不同比例的M、G嵌段组成的共聚物。古洛糖醛酸一般为总糖量的20—40%。X

射线图谱的分析表明, 古洛糖醛酸是褐藻胶中能与金属离子结合的活性部分。二价钙离子与不同链上的古洛糖醛酸螯合, 使其发生交联, 形成不溶性的凝胶。因此, 古洛糖醛酸含量高的褐藻胶对钙离子的结合能力强, 加入钙离子后立即形成凝胶, 凝胶的机械强度大, 孔径小。甘露糖醛酸含量高的褐藻胶加入钙离子后, 凝胶是逐渐形成的。胶的强度差、孔径大。因而, 应用褐藻酸钙作为固定化载体时, 有必要搞清它的组份, 测定古洛糖醛酸与甘露糖醛酸的比值, 以减少应用的盲目性。为适用不同的固定化条件, 也可人为地改变褐藻胶中古洛糖醛酸与甘露糖醛酸的比例, 有关的化学方法或酶学方法已有过报道。

苏美两国科学家 (Burns, M. A et al., 1985) 提出一种新的固定化载体材料。这是一种用褐藻酸钙包裹着磁粒的干燥小胶球。这种小球的强度比聚丙烯酰胺或右旋糖酐的强度更大, 可应用于高流速和高压力的分离柱上。小球经受得住120℃的高温和范围广泛的pH变化。用试剂 (Tyzor, TE) 处理过的小球, 在磷酸缓冲体系中不溶解。小球的微观表面极为粗糙不平, 有利于酶的连结和着附。两种有代表性的酶: *Actinomyces fradiae* 的蛋白酶类 (Proteases) 和 *Aspergillus niger* 的淀粉酶 (α -Amylase) 被固定在小球的表面, 具有高活性和高度稳定性。

总之, 褐藻胶作为固定化载体和以褐藻胶为基础的固定化新材料, 将在固定化技术中发挥重要作用。

主 要 参 考 文 献

- (1) Kierstan, M. et al., 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotech. Bioeng.* 19:387—397.
- (2) Nagashima, M. et al., 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotech. Bioeng.* 26:992—997.