

甲壳质及其衍生物为载体的固定化技术和应用

IMMOBILIZED TECHNIQUE ON CHTIN AND IT'S DERIVATION , AND APPLICATIONS

刘晨光 刘万顺 陈西广

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

。 近年来甲壳质及其衍生物作为载体固定化酶和细胞的研究引起了广泛的重视^[1]。甲壳质是甲壳动物外壳的主要成分,是自然界生成量仅次于纤维素的第二大天然聚合物。甲壳质的化学结构是由 N-乙酰葡萄糖胺通过 β 1,4 糖苷键连接而成的生物高聚物,其化学性质稳定,而且耐热性好。特别是分子中存在有氨基,既易于与酶共价结合,又可络合金属离子使酶免受金属离子的抑制,同时容易通过接枝改性,是一种很有应用价值的固定化载体。本文介绍了固定化载体的制备、固定化方法和应用。

1 固定化载体的制备方法

1.1 壳多糖的制备

以新鲜虾蟹壳为原料分别用 2 mol/L 的盐酸和 2 mol/L 的 NaOH 浸泡除去色素、蛋白质和钙质;然后用 40% ~ 45% 的浓碱处理加热 100℃ 保温 8~10 h,脱去乙酰基即成壳多糖,可溶于 2% 的乙酸溶液^[2]。

1.2 磁性壳多糖球的制备

壳多糖通常是片状或粉状无孔物质,分子间结构比较紧密,这一特点限制了其内部的吸收位点。相比

之下 Fe_3O_4 是一种多孔物质有较大表面积,而且具有磁性。二者不溶解的 pH 范围相同,将其结合制成磁性壳多糖球,既可提高吸附能力,又降低了其在酸性介质中的溶解性。其具体作法如下:将 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 盐的混合水溶性与壳多糖的乙酸溶液混合搅拌 1 h,然后将混合液滴入 5% ~ 25% 的 NH_4OH 中,搅拌条件下即可形成固化小球,磁性甲壳质和壳多糖球用磁铁收集后用蒸馏水洗净,在 60~90℃ 干燥后即可作为固定化载体。酶被固定在这种载体上后,会很容易地用磁性装置从反应的混合液中分离回收,从而方便了操作和降低成本^[5]。

1.3 水性凝胶的制备

多聚阴离子和多聚阳离子的反应可形成多聚复合物,这种复合物同组成它的单一物质相比在性质上有明显的区别。壳多糖是多聚阳离子,它可同多聚阴离子如 Xanthan、羧甲基纤维素、褐藻酸等反应形成水性凝胶。其具体作法如下:将 Xanthan 溶液(0.65%)用注射器逐滴滴加到壳多糖溶液中(0.5%~1.8%)并不断搅拌,室温搅拌 15 min 即可形成小球,然后用

。 收稿日期:1997-05-07

酸性缓冲液冲洗,湿的凝胶中水分占 95 % ~ 98 %。经乙醇脱水干燥,干品中 Xanthan 占 75 %,壳多糖占 25 %。扫描电子显微镜结果显示,没有酶存在时凝胶呈多孔纤维状结构,孔径在 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ m 之间。这种凝胶制成的微球表面具有均一的孔状结构,含有大量的水分子和电荷形成了一个良好的亲水环境,可允许底物自由通过,为酶的固着提供了更多的位点。当有酶存在时纤维网格中有球状体形成,这种球状体是 Xanthan、壳多糖和酶的三联复合物^[4]。

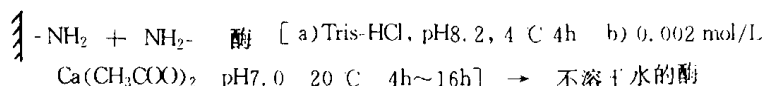


图 1 物理吸附法^[5]

此方法特点是不易破坏酶的活性中心和高级结构,但酶与载体之间相互吸附力弱,酶易脱落。然而若能找到适当的载体,也是较好的方法。经测定发现甲壳质及其衍生物对脂酶有很好的吸附能力,而且有一个最佳吸附浓度,例如当初始浓度是 78 mg(酶)/1g(载体)有 99 % 酶被吸附,当初始浓度是 158 mg(酶)/1g(载体)有 79 % 的酶吸附到载体上。作法是壳多糖经 0.15 mol/L CaCl_2 溶液处理过夜得溶液 I;将纯化的酶液同 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 混合液在室温下搅拌 2h 得溶液 II。然后将溶液 I、II 混合,室温下搅拌 2 h;蒸馏水冲洗后即得固定化酶^[5]。

2.2 网格型包埋法

包埋法的特征是不使酶本身发生结合反应,而是在凝胶微细格子中使酶粘结,酶不会流出网格之外,底物的生成物却容易从网格流出。但本法只适合作用于小分子底物和产物的酶,对于作用于大分子底物和产物的酶是不适合的。对于象壳多糖这样的天然高分子化合物,可先制备其溶胶,然后在酶或微生物存在的条件下使其凝胶化,从而达到固定化的目的。例如可先将壳多糖置于 1 % 的醋酸中搅拌溶解,将酶或菌

2 固定化的方法

2.1 物理吸附法

由于壳多糖不溶于水且含有大量的自由氨基,在 Tris-HCl (pH 8.2, 4°C , 4 h) 和 0.002 mol/L $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (pH 7.0, 20°C , 4~16 h) 的条件下通过物理性吸附。使酶蛋白固定化的方法反应如图 1。

与壳多糖溶液混合均匀,通过注射器滴入 2 % pH 9.2 的焦性磷酸钠溶液中,放置固化 1 h 即可。本室采用 1 % 的壳多糖胶液,加入葡萄糖异构酶胶体滴入 4 % 的草酸钾溶液中,形成的球体硬度高、机械性能好、使用时间长、重复使用率高。

也可用壳多糖同其他多糖类物质(如 Xanthan)交联的方法来包埋酶或微生物。例如将水溶性 Xanthan (0.65 %) 同酶溶液(0.5~1.8)混合,用注射器滴入壳多糖溶液中,并不断搅拌。在室温下不停搅拌 15 min 即可形成小球,用醋酸缓冲液冲洗,保存在醋酸缓冲液中(0.05 mol/L pH 5.3 5°C)^[4]。

2.3 吸附交联法

本法是用多功能试剂使酶与载体相结合的固定方法。交联法的优点是因酶通过交联剂与载体以共价键结合,酶不会脱落;酶因受到化学修饰,其不稳定性、易变性、易失活的性质大为改善。其缺点是制备方法较复杂,很容易引起酶的失活,需根据酶的种类与性质,选择适当的载体。由于壳多糖分子上有大量的氨基,因此可以使酶分子通过共价结合固定在壳多糖及其磁性衍生物上,反应如图 2。

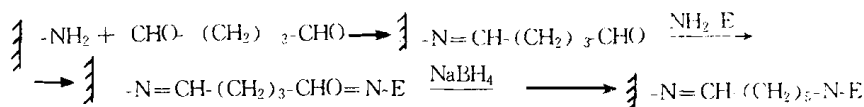


图 2 吸附交联法(摘自申炳华等,1988)

利用这一原理已实现了在壳多糖上胰酶、葡萄糖氧化酶、纤维素酶等酶的固定化。其制法是,加入戊二

醛使载体交联, 为避免酶分子间或载体间的过度交联, 戊二醛的加入量应是氨基的 25 倍。将制备好的交联载体在不同的 pH 下悬浮缓冲液中, 用磁力搅拌器不停搅拌, 然后加入胰酶, 使其吸附到壳多糖载体上。然后 蒸馏水冲洗至检测不到酶活性。

3 应用

3.1 在半合成青霉素方面的应用——酶法裂解青霉素制备 6-氨基青霉烷酸(6-APA)

目前 6-APA 的制备方法有化学法和酶法两种, 以酶法占优势。1990 年 K r a j e w s k a 等报道以壳多糖为载体固定化青霉素 G 酰化酶制备 6-APA, 同其他青霉素酰化酶的固定化载体如大孔树脂、葡聚糖、膨润土、三醋酸纤维、聚丙烯酰胺、环氧化合物等载体相比,

壳多糖具有价格便宜、亲水性好、良好的生物相容性、酶活半衰时间长等特点。固定化的青霉素酰化酶可裂解青霉素得到母核 6-APA, 而 6-APA 是半合成青霉素的母核。在 6-APA 的氨基上接上某些侧链, 可获得高效、广谱、服用方便的半合成青霉素, 例如氨苄青霉素, 甲氧苄青霉素, 羟氨苄青霉素, 羧苄青霉素等。

3.2 在食品工业方面的应用——果葡糖浆的生产

工业上已大规模地采用固定化葡萄糖异构酶生产果葡糖浆, 固定化载体广泛地使用了甲壳质。其制法是将酶或微生物通过一定加温处理, 加入甲壳质处理, 以戊二醛作为交联剂制成固定化酶或细胞。其工艺如图 3。

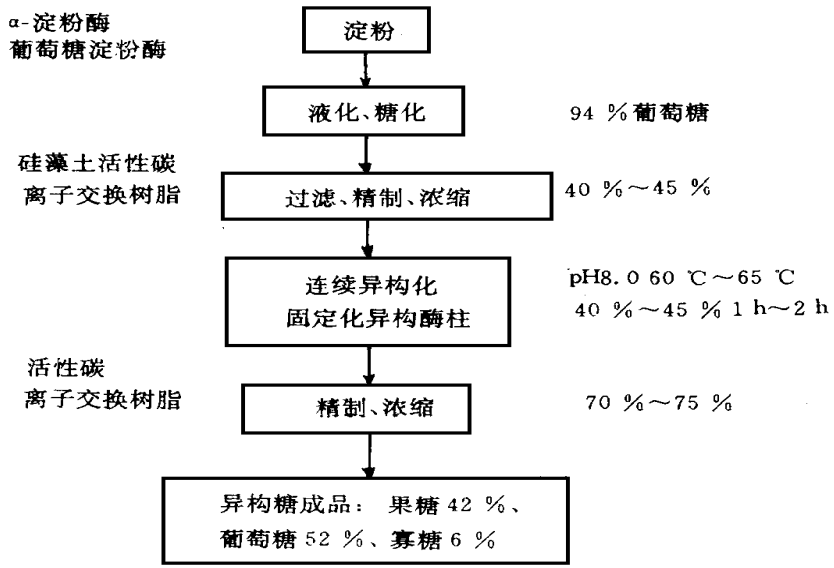


图 3 果葡糖浆的生产工艺(摘自熊振平等, 1989)

3.3 在生物学中的应用——体外循环装置中尿素的清除

Bow e r s, L. D. (1986) 报道用壳多糖固定化尿素酶在体外循环装置中清除尿素取得了较好效果。其原理是利用体外循环将患者的血液通过透析器除去部分代谢废物, 然后将通过透析器的含尿素的透析液用泵输入到一个柱内。柱的一端有固定化的尿素酶, 另一端有活性炭或离子交换剂, 当代谢物(尿素)通过时即受尿素酶作用转变为二氧化碳和氨, 氨和其他废物

被活性炭吸附。这样透析液重返体内, 二氧化碳由肺排出体外。

3.4 药物的固定化

目前已开始用壳多糖及其衍生物作为药物缓释系统的载体, 固定化的药物主要用于治疗高血压、癌症、肥胖症和普通的感冒等, 例如壳多糖掺入淀粉、乳糖或甘露糖, 可改善流动性可压性供 α -淀粉酶的直接压片, 使酶的活性稳定, 片硬度大且易崩解。壳多糖与消炎痛可制成胃漂浮片, 减少刺激和用药剂量, 延长

作用时间。壳多糖可提高难溶解药物溶解度,使药物晶体减小,可提高灰黄霉素溶解度 2~ 3 倍,苯妥英钠 7~ 8 倍,使氢化可的松的生物利用度提高 3 倍,对易溶作用时间短的药物加入适量壳多糖,可控释和延长药效时间。壳多糖在胃液呈粘稠凝胶可作为凝胶骨架,其与苹果酸或海藻酸制成非侵蚀型骨架可增强控释能力。壳多糖在这方面的应用有很大的潜力,它可以进一步制成受控于代谢物的药物缓释系统,从而模仿生物器官或腺体的自动调节功能^[4]。

3.5 其他方面

壳多糖及其衍生物可作为微藻的固定化载体,使浮游藻固着生长,作为鲍鱼等底栖生物的饵料;也可作为哺乳动物细胞固着生长的微球、微囊或包埋剂,用于动物细胞的大规模培养来生产生物工程下游产品,例如壳多糖与羧甲基纤维素形成复合膜包被“抗牛铁蛋白单抗的杂交瘤细胞”的培养,可使单抗的提取率大为提高;另外,壳多糖固定链霉菌蛋白酶还可用于化妆品制备等。

4 结语

甲壳质本身是多糖类物质,其生物亲和性好,来

源丰富。特别是作为酶的固定化载体,载酶活性高,单位体积载体负载的酶数量大,其机械强度明显优于琼脂糖、葡聚糖类等软凝胶,填充这种载体不易被压实,可以较高的流速通过流体,也可适用于粘度较高的流体。因此以甲壳质及其衍生物为载体的固定化技术具有相当的应用潜力,是一个值得发展的领域。

参考文献

- 1 储瑞嵩、钱悦、李士云等. 生物工程学报, 1997, **13**(1): 70 ~ 75
- 2 陈 盛、黄智跃、刘艳如. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(3): 250~ 254
- 3 熊振平等. 酶工程. 北京: 北京化学工业出版社, 1989, 294~ 296
- 4 S. Dumitriu and E. Chornet. *Chitin Enzymology*, 1996, 2: 543~ 564
- 5 V. Bendikene, B. Juodka, *Chitin Enzymology*, 1996, 2: 503~ 511