

用 κ -角叉菜胶和海藻酸钠为载体固定化葡萄糖异构酶的研究

李之浩 李锦子

(河南省科学院生物研究所, 郑州)

葡萄糖异构酶由于在果葡糖浆生产中的重要性, 国内外已研究了多种固定化方法。干畑一郎等利用角叉菜胶作载体, 在产氨基酸菌体^[1], 产酒酵母^[2]的固定化方面取得了较好的效果。我们采用日产角叉菜胶和国产海藻酸钠作载体制备了固定化细胞葡萄糖异构酶, 对两种载体的制备、特性和使用进行了研究。

材 料 和 方 法

1. 海藻酸钠(铵): 从温州助剂厂购得, 其分子式为 $(C_6H_7O_6Na)_n$, 分子量约为 15000。

2. κ -角叉菜胶和角叉菜胶: 分别从和光纯药工业株氏会社和王子テシヨテル株氏会社购得。分子式为 $(C_6H_7O_6S)_n$, 分子量约为 100,000—800,000。

3. 葡萄糖异构酶的制备: 见前报^[3]。

4. 固定化细胞的制备: 2g 湿菌丝体与 2g 2% 的海藻酸钠或 5% 的 κ -角叉菜胶混合, 搅匀, 分别滴入 4% $BaCl_2$ 溶液或 4% KCl 溶液中, 即成颗粒状或细丝状固定化细胞。颗粒直径为 4mm, 细丝直径为 1mm。

5. 酶活力测定方法: 半胱氨酸-吡唑法。

试 验 结 果

一、不同金属离子对形成海藻多糖凝胶物理强度的影响

将 2% 海藻酸钠和 2% 角叉菜胶浸入 4% 不同金属离子的溶液中成型, 切成 $1cm^3$ 的方块, 用加压破裂法测定其物理强度。海藻酸钠的组成单位是多糖醛酸, 角叉菜胶由多糖硫酸酯组成, 因此, 不同金属离子对所形成凝胶的强度也不相同(表 1)。海藻酸钠(铵)对 Na^+ 、 K^+ 、

NH₄⁺、Mg²⁺ 离子反应,不能形成凝胶,而 Ca²⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Cu²⁺ 则有较强形成凝胶的能力。K⁺离子对 κ-角叉菜胶形成凝胶的强度最好,而对角叉菜胶则无这种影响。

表 1 不同金属离子对形成海藻多糖凝胶强度的影响

结果 盐类	载体 海藻酸钠	海藻酸铵	κ-角叉菜胶	角叉菜胶
NaCl	—	—	—	—
KCl	—	—	+++	+
CaCl ₂	+++	+++	++	+
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	++	+
Al ₂ (SO ₄) ₃	++	++	++	+
CoCl ₂	+++	+++	+	+
MgSO ₄	—	—	+	+
MnSO ₄	+	+	+	+
FeSO ₄	+	+	+	+
BaCl ₂	+++	+++	+	++
ZnSO ₄	++	++	+	+
CuSO ₄	+++	+++	+	+

—: 不成凝胶, +: 0—500g 压力, ++: 500—1000g 压力, +++ 1000g 以上压力。

二、不同金属离子对固定化细胞的酶活力影响

κ-角叉菜胶为载体的固定化细胞的葡萄糖异构酶,以 K⁺离子为凝固剂时,酶活力最高;而海藻酸钠为载体则以 Ba²⁺、Co²⁺ 等为凝固剂时,固定化细胞酶活力较高。故分别使用 BaCl₂ 和 KCl 作为这两种载体的凝固剂(表 2)。

表 2 不同金属离子作凝固剂时对形成的固定化细胞的酶活力的影响

结果 盐类	载体 海藻酸钠 酶活单位	κ-角叉菜胶 酶活单位
KCl	—	309
CaCl ₂	13	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	72
Al ₂ (SO ₄) ₃	30	—
CoCl ₂	240	—
MgCl ₂	—	—
MnSO ₄	52	—
FeSO ₄	103	—
BaCl ₂	259	240
ZnSO ₄	20	—
CuSO ₄	26	—

加入的酶活力为 510 单位;“—”为不成型。

三、载体与菌量的配比

在 2g 2% 海藻酸钠(A 组)和 2g 5% κ-角叉菜胶(B 组)中分别加入 0.5、1、1.5、2、2.5、3g 湿菌丝体时,这两种海藻多糖的最佳包埋量是不同的,前者以 2g,后者以 0.5g 为宜(表 3)。

表 3 海藻多糖与湿菌丝体配比

加入湿菌丝体量 (g)		加入酶活力		测定酶活力		酶活力表现	
A	B	A	B	A	B	A	B
0.5	0.5	165	152.5	76	104	34	68
1	1	330	305	165	202	50	62
1.5	1.5	495	457.5	280	277	56	56
2	2	660	610	373	312	56	51
2.5	2.5	825	762.5	400	364	48	48
3	3	990	915	440	416	44	45

四、固定化细胞小型批式连续转化

将 20g 湿菌丝体分别加入 20 g 2% 海藻酸钠和 20 g 5% κ-角叉菜胶制成固定化细胞,进行批式连续转化。每 24 小时更换一批 35% 左右口服葡萄糖 200ml,保持 60℃ 恒温。加入 0.01% CoCl₂, 0.05% MgSO₄。κ-角叉菜胶制备的固定化细胞转化液中加入 1% KCl,并以 KOH 调 pH7,而海藻酸钠固定化细胞则用三羟甲基甲胺调 pH7。转化头几天由于表面包埋不牢固的菌体逐渐脱落,使转化率下降,在

表 4 固定化细胞转化结果

结果 转化测定项目	固定化细胞及材料 海藻酸钠	κ-角叉菜胶
转化糖总体积(ml)	6960	6950
转化产生果糖总量(g)	4043	4073
平均转化率(%)	40.1	41.8

10—14 天左右转化率趋于稳定。转化 30 天平均转化率前者为 41.8%,后者为 40.1% (表 4)。

讨 论

κ-角叉菜胶国内尚无货源,故目前使用海藻酸钠较 κ-角叉菜胶作各种酶的载体更为适

宜。但 κ -角叉菜胶用 K^+ 作为凝固剂要比海藻酸钠适用于更为广泛的酶种。

κ -角叉菜胶和海藻酸钠以海藻为原料，资源丰富，价格低于现有各种载体，因此具有十分广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Tosa, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**: 1697, 1979.
- [2] 千畑一郎, 土佑哲也: *触媒*, **21**: 426, 1979.
- [3] 李之浩等: *生物化学与生物物理进展*, **4**: 79, 1980.