

环氧聚胺——一种细胞固定化的新型交联剂

胡 军* 周兆康

(上海师范学院分院生物系)

近年来随着人们对酶和微生物细胞固定化研究的逐渐深入,对固定化的各种载体材料^[1]和固定化方法^[2,3]也进行广泛研究。

本文报道一种固定化酶的新型交联剂——环氧聚胺(Epoxy-polyamine 简称 E. P. A.)用于游动放线菌葡萄糖异构酶和大肠杆菌青霉素酰化酶交联固定化的研究结果。

一、材料和方法

1. 菌体及试剂

(1) 菌体 含青霉素酰化酶之大肠杆菌,由华北制药厂提供。含葡萄糖异构酶之游动放线菌,由上海新型发酵厂提供。

(2) 环氧聚胺 上海市化学试剂商店。

2. 酶活力测定

(1) 青霉素酰化酶活力 用比色法^[5]。

(2) 葡萄糖异构酶活力 用旋光法^[4]。

(3) 固定化细胞酶活回收率的表示方法:

$$\text{回收率} = \frac{\text{固定化细胞中酶活力}}{\text{原细胞中酶活力}} \times 100\%$$

3. 固定化细胞的制备方法

(1) 葡萄糖异构酶 将10克湿菌泥悬浮于100毫升无离子水中(pH 7.0),加入0.1—0.25毫升E.P.A.溶液,均匀搅拌,反应60分钟后离心,60℃干燥成型。其颗粒为圆柱形,长径比为 $1.5 \times (1-2)$ mm左右。

(2) 青霉素酰化酶 将10克湿菌泥悬浮于100毫升无离子水中,加入0.1—0.3毫升E. P. A. 溶液,均匀搅拌,反应30分钟后离心,40℃干燥成型。其颗粒为无定形,直径在1—1.5 mm 之间。

二、结果与讨论

1. E. P. A 用量对固定化酶的影响

由表1和表2可见,E. P. A. 用量对青霉素酰化酶交联固定后的酶活力回收影响较大,但对葡萄糖异构酶的影响相对较小,这可能同二者细胞壁结构的差别有关。

表1 E. P. A. 量对葡萄糖异构酶活力及固定化机械强度的影响

原细胞湿重(克)	E.P.A.(毫升)	回收率(%)	机械强度*(g/cm ²)
10	0.1	86	+++
10	0.15	81	++++
10	0.2	80	++++
10	0.3	74	++++

表2 E. P. A. 量对青霉素酰化酶活力及机械强度之影响

原细胞湿重(克)	E.P.A.(毫升)	回收率(%)	机械强度*(g/cm ²)
10	0.1	65	+
10	0.2	23	++
10	0.3	12	+++

2. 固定化葡萄糖异构酶之连续上柱试验

根据表1的结果,以添加E.P.A. 0.2毫升/10克(湿细胞)酶活回收率为80%的一组实验为基础,制得10克干固定化酶,装柱连续转化葡萄糖,生产果葡聚糖。结果表明该固定化酶柱半寿期可达26天,共运转35天,累计每克固定化酶可转化2600克葡萄糖(干物)成果糖,转化率为42%(图1)。

* 现在上海工业微生物研究所工作。

表3 不同固定化方法之机械强度比较

固定化细胞	固定化方法	回收率(%)	机械强度(g/cm ²)*
葡萄糖异构酶	E. P. A. 交联法	80	++++
	戊二醛交联法	83	++++
	明胶包埋法	60	+++
	角叉菜聚糖包埋法	65	++
青霉素酰化酶	E. P. A. 交联法	23	++
	戊二醛交联法	25	++
	明胶包埋法	21	+

* 即固定化细胞颗粒所能承受的载荷力^[6]

注: “+”能承受的力为 200—500 g/cm², “++”为 500—1000 g/cm², “+++”为 1000—1500 g/cm², “++++”为 1500—2000 g/cm²

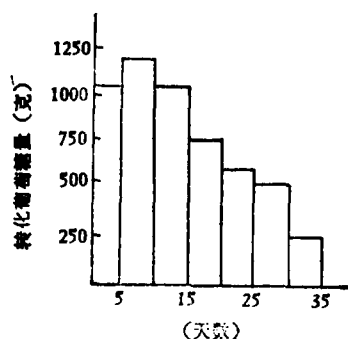
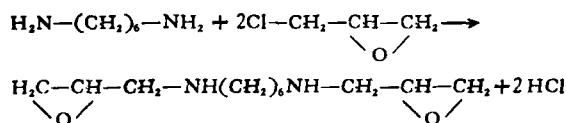


图1 果糖产率和固定化酶半寿期

3. E. P. A. 分子聚合反应及交联固定化的可能机理

E. P. A. 是由一分子己二胺和二分子环氧氯丙烷缩合而成,其反应如下:



环氧氯丙烷和己二胺二者本身都是交联剂,经缩合形成的 E.P. A. 分子,既有较活泼的

二个环氧基团,又有二个亚胺基团,因此是一种多功能团的交联剂。

当其同细胞接触进行交联时,分子中的二个环氧基如受到质子的攻击,就会断开一个 C—O 键,形成具有较强电负性的羰基,这样就很有可能同蛋白质中的游离氨基形成牢固的类似肽链的共价键,或者形成肽链间氢键。同时分子中的亚胺基则可在蛋白质肽链之间形成氢键。由于每一分子 E. P. A. 都有若干个反应活性基团,因此固定化酶的强度就大大增加。另外分子中六碳脂肪链的存在又能在交联细胞之间留有较大的空间距,而便于底物和产物的通透。作者通过对固定化葡萄糖异构酶的上柱考验,证明其机械强度及底物和产物的通透与扩散性能均良好。

E. P. A. 用于固定化细胞,如使用得当,有较高酶活收率,并能经受长期连续反应之考验。在反应温度高、生产周期长的条件下,以该交联剂制成的固定化细胞,同目前常用的交联剂戊二醛相比,除了交联强度毫不逊色外,还有使用方便,价格便宜,勿需进口等优点,适宜于实验室和工业上采用。关于 E.P. A. 在细胞交联中的确切机制,尚有待研究。

参 考 文 献

- [1] Kolot, F. B.: *Process Biochemistry*, 16, (5), 2, 1981.
- [2] Chibata, I. et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10, 197—210, 1981.
- [3] Tosa, T. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 2, 153, 1976.
- [4] 胡学智等:《微生物学通报》1, 1982。
- [5] 王庆诚等《医药工业》7, 22, 1978。
- [6] Chibata, I. et al.: *J. Solid-Phase Biochemistry*, 2, (3), 225, 1978.

[本文于 1983 年 3 月 28 日收到]