

多糖类亲和分离材料的研究进展

江咏, 李晓玺, 李琳, 陈玲

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要:亲和分离技术的核心是设计亲和分离材料, 基于分子识别与亲和机制, 针对多糖类高分子化合物的结构特点, 探讨了其材料的设计原则, 并综述了国内外多糖类亲和分离材料的制备技术及其应用研究进展。在此基础上提出了进一步改进多糖类高分子化合物制备技术的措施, 并展望了此类材料的应用前景。

关键词:多糖; 亲和分离材料; 配基

中图分类号: O647.33

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)08-0019-04

Advances in polysaccharide-based affinity separation polymers

JIANG Yong, LI Xiao-xi, LI Lin, CHEN Ling

(School of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The core of affinity separation technology is designing the materials. The designing principle of polysaccharide-based polymers for their structural characteristics based on the molecular recognition and affinity mechanism is discussed, the preparation technology and research progress in polysaccharide-based affinity separation polymers are reviewed. Furthermore, the measures to improve those polymers' preparation technology are put forward, and their application foreground is prospected.

Key words: polysaccharide; affinity separation polymer; ligand

发展高效生物分离技术是生物工程技术领域的一个重要的研究课题。进入 20 世纪 90 年代, 生物科学、生物技术基础研究与化工分离学科、材料学科等相关学科的进步极大地推动了新型高效生物分离技术的发展。根据生物分子亲和性进行分离的亲和分离技术, 由于其在分离过程中具有高度特异性、高收率、高纯度及能保持生物大分子天然状态等优点而备受关注。

亲和分离技术的核心是设计和制备适用范围广泛的亲和分离材料。亲和分离材料是亲和分离体系设计、建立的基础, 通过改变高分子材料的化学、物理和生物学特性, 就可以调整亲和分离系统对不同目标产物的分离纯化行为, 获得理想的分离效果^[1]。多糖类天然大分子物质在亲和分离材料中占有主导地位, 常用的多糖类亲和分离材料有琼脂糖、葡聚糖、甲壳素/壳聚糖和纤维素等。本文就多糖类亲和分离材料的设计以及在亲和分离中的应用进行综述。

1 分子识别与亲和分离机制

分子识别与亲和引导分子间专一性地相互作用, 是受体与配体之间选择性结合并具有专一性的

过程。互补性及预组织是决定分子识别过程的 2 个关键原则: 前者决定识别过程的选择性, 后者决定识别过程的键合能力^[2]。

亲和分离技术的核心材料应满足下列要求: ①具有亲水性多孔结构, 无非特异性吸附, 比表面积大; ②物理和化学稳定性高, 有较高的机械强度, 使用寿命长; ③含有可活化的反应基团, 用于亲和配基的固定化; ④生物相容性好; ⑤可形成粒径均一的球形粒子。多糖不但能够和具有特定官能团的试剂发生醚化、酯化、交联、接枝共聚等反应, 在分子中引入新的基团及改变链结构, 而且可以对其进行大分子修饰, 为模拟特定的大分子构象奠定了基础。因此, 基于分子识别与亲和原理, 对多糖分子结构进行修饰和设计, 在其分子链上引入特异性亲和配基, 从而提高多糖分子与目标分子间的分子识别和特异亲和性。当其与含有目的分子的混合原料作用并去除未结合的杂质之后, 再在一定条件下洗脱目的分子而使其得以纯化。

1.1 分子之间的相互作用

分子识别的重要决定因素是预组织原则, 它主要决定识别过程中的键合能力。预组织原则是指受

收稿日期: 2006-05-12; 修回日期: 2006-06-13

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(05200617)和国家自然科学基金重点项目(20436020)

作者简介: 江咏(1984-), 男, 硕士生, 701jiangyong@163.com; 李琳(1962-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为糖类物质及其药物制备与生物利用, 020-87110249, felinli@scut.edu.cn。

体与底物分子在识别之前将受体中容纳底物的环境组织得愈好,其溶剂化能力愈低,则它们的识别效果愈佳,形成的络合物愈稳定。

通常,分子间相互作用力分为 2 类,即强相互作用(主要指共价键)和弱相互作用(又称分子间力,包括范德华力、氢键等)。前者是使分子中或分子间的原子之间结合的主要相互作用,它维持分子的基本结构,决定生物大分子的一级结构。弱相互作用虽然比强相互作用小得多,但它在维持生物大分子的二级、三级、四级结构以及在维持其功能特性中起主要作用,也是生物分离过程中的重要识别方式。

1.2 分子识别与亲和的互补性

互补性是分子识别的另一个决定因素,它不仅包括底物与受体间空间电学特性的互补(表现为各种分子间力的形式),而且包括空间结构的互补^[3]。底物受体的互补程度越高,则特异结合越高,识别越好。

空间结构互补性最早由 Fisher 的“钥匙关系”所描述。1958 年 Koshland 提出了诱导配合(induced fit)的概念,弥补了 Fisher 概念的不足,指出在底物与受体相互结合时,受体将采取一个能同底物达到最佳结合的构象,这个过程也被称为识别过程的构象重组。空间电学特性互补包括满足氢键的形成、静电相互作用(如盐桥的形成)、 π 堆积相互作用、疏水相互作用等,这就要求受体及底物的键合位点及电荷分布能很好地匹配。

2 多糖亲和分离材料及应用

2.1 琼脂糖

琼脂糖凝胶具有高度亲水性,非特异性吸附十分低,为目前应用最广泛的亲和分离载体材料,其中以琼脂糖质量分数为 4% 或 6% 的凝胶应用最为广泛。但琼脂糖凝胶易压缩,使得琼脂糖层析柱的放大受到限制。

为了改善琼脂糖凝胶的机械性能,陈嫚等^[4]以交联琼脂糖为载体、三聚氰氨为活化剂、刺桐胰蛋白酶抑制剂为配基,制备了亲和填料。该填料对重组人组织型纤溶酶原激活剂突变体(reteplase)的吸附量为 8.76 mg/g,且解吸附完全,不影响活性。交联琼脂糖的刚性、对 pH 和温度的稳定性比琼脂糖大大提高。通过各种反应在琼脂糖分子中导入不同配基,可以制备不同性质的修饰琼脂糖,以满足不同的分离需要。杨青等^[5]设计合成了一种含有碱性磷酸酶抑制剂——对氨基苄基磷酸的化学配基,并将其

偶联到琼脂糖凝胶上,用于分离纯化从小牛肠中提取的碱性磷酸酶。当配基浓度为 6 $\mu\text{mol/g}$ 时,对氨基苄基磷酸琼脂糖酯衍生物具有最高的酶选择性,将 NaCl 洗脱与 NaH_2PO_4 洗脱结合起来碱性磷酸酶纯化倍数达到 300 倍,活力回收率达 90% 以上。胡翠华^[6]用溴化氢活化的琼脂糖珠 4B 与肌红蛋白(Mb)交联合成了亲和层析材料,用于纯化 Mb 抗体。张静等^[7]采用琼脂糖凝胶共价偶联牛胰蛋白酶,制成抑肽酶亲和吸附剂,将其用于从牛肺提取液中亲和层析分离纯化高比活的抑肽酶。通过实验研究,得到抑肽酶比活力为 79 000,酶活性回收率为 76.63%。邓湘蕾等^[8]从小麦胚芽中提取出的麦胚凝集素(WGA)为配体,活化偶联 Sepharose 4B 获得固定化 WGA,得到纯化倍数为 158.5 倍的 WGA 单体,相对分子质量为 16 000,表观相对分子质量为 32 000,血凝活力为 8.3 mg/L。朱家骅等^[9]采用含碱性添加物的琼脂水溶液喷雾,在惰性颗粒流化床中制得了薄壳型琼脂凝胶复合颗粒载体,与生物活性染料三嗪染料(Cibacron Blue F3GA)配体偶联后,兼具有较好的流态化操作性能与蛋白质吸附特性。Fraguas 等^[10]将 ConA 偶联在琼脂糖上,用 CDAP 代替了以往的 CNBr 活化。该材料在 4℃ 下储存 1 年不会失效,当湿胶中配基质量浓度为 22.2 mg/mL、 α -D-甲基甘露糖苷中洗脱液湿胶浓度为 0.1 mol/L 时,从山葵根中提取的过氧化物酶相对表观分子质量为 42 000,与之前报道的数据吻合。

2.2 葡聚糖

低交联葡聚糖能很好地用于亲和层析中,但因其开孔率低,使用受到限制,主要用于外源凝集素的分离。Lakhari^[11]在葡聚糖分子上交联一定量的二乙氨基,然后将其涂在硅颗粒表面,使亲和填料具有多糖和硅基质的优点,机械性能好,有效地降低了硅表面与蛋白质的非特异性作用。他们还在填料上偶联乙酰氨基葡萄糖,并将其用于胰岛素的分离纯化,实验显示胰岛素的活性回收率达到 75%。Shibusawa^[12]将聚乙烯乙二醇和葡聚糖反应,并将其偶联染料配基 procion red,并以此作为亲和逆流色谱的固定相从牛肝粗提物中得到高活性的乙醇脱氢酶。袁毅等^[13]根据低密度脂蛋白(LDL)的分离特点,在葡聚糖分子中同时引入具有亲水性的磺酸基和疏水性的胆固醇 2 类配基,合成了新型 LDL 亲和吸附材料。通过对 LDL 纯溶液中吸附等温线的测试,探讨了双亲型 LDL 分离材料与单一亲水型磺酸基、单一疏水型胆固醇基葡聚糖分离载体材料吸附

量和亲和吸附系数的关系。

Mateo 等^[14]将葡聚糖涂在琼脂糖基质上,然后螯合 Zn^{2+} ,制成固定化金属离子亲和层析柱。实验发现,由于葡聚糖涂层的作用,非特异性多点吸附作用明显减弱,使用浓度为 60 mmol/L 的咪唑洗脱液可将目标产物聚组氨酸洗脱。董聿生^[15]采用反相悬浮包埋技术将磁性粒子引入到葡聚糖微球中,以不同的间隔臂偶联上 *L*-精氨酸甲酯、对氨基苯甲脒和胍基己酸配体,制备了 5 种磁性葡聚糖亲和吸附分离材料,并将其用于尿激酶粗品的纯化,通过测定,尿激酶的活性回收率为 40.0%~60.7%、纯化倍数为 14.9~32.8 倍,吸附容量为 89~121 mg/L。

3 甲壳素/壳聚糖

甲壳素分子链中由于具有 *N*-乙酰基-*D*-氨基葡萄糖,而一些蛋白和糖蛋白(如植物凝集素)对 *N*-乙酰基葡萄糖胺具有特异亲和作用,因此可以利用甲壳素糖链分子本身的特异性亲和作用来对糖蛋白进行分离纯化^[16]。Kopacek 等^[17]用磁性-甲壳素亲和分离法及 2 步 Mono S 柱阳离子交换层析法纯化昆虫溶菌酶。Yang 等^[18]利用甲壳素亲和层析法及 Superose 12 快速层析法从乙烯诱导 Guilder Rose 叶中鉴定并均一性纯化了甲壳素结合蛋白,该蛋白对真菌病原体具有抗菌作用,可用作植物抗菌剂。Liu 等^[19]用甲壳素亲和层析及凝胶过滤法从巨曲霉 (*Aspergillus giganteus* MDH 18894) 培养液中纯化 α -帚曲菌素 (α -sarcin) 和抗真菌蛋白,方法简单特效。为了扩大甲壳素分离材料的应用范围,Zhou 等^[20]将甲壳素和纤维素混合制成微球状材料,并考察了其对 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 等重金属离子的吸附能力,由此制备了含有金属离子的甲壳素亲和分离材料,提高了其对含有供电子氨基酸残基蛋白质的分离效果。

Roy 等^[21]将藻酸盐及壳聚糖制成微珠,用于流化床亲和色谱法纯化麦芽 α -淀粉酶和纤维素酶,纯化倍数分别为 50 倍和 30 倍,活性回收率分别为 90% 和 80%。李艳利等^[22]以直径为 0.5~1.5 mm 的壳聚糖多孔珠为载体、胰蛋白酶为配基,亲和分离胰蛋白酶抑制剂。该吸附剂对胰蛋白酶抑制剂的吸附容量为 6 410 U/g(干基),纯化品比活性为 1 350 U/mg,活性回收率为 40.2%。宋扬等^[23-25]用壳聚糖及交联壳聚糖共价偶联牛胰蛋白酶,制成抑肽酶亲和吸附剂,并将其用于从牛肺提取液中亲和层析分离纯化高比活抑肽酶,结果表明其非特异性吸附能力较低。申屠静灵等^[26-27]将反相悬浮交联法制

备的壳聚糖微球与三嗪染料活性蓝 F3GA (Cibacron Blue) 反应,制得了染料亲和分离材料,并采用扫描电镜、红外光谱、染料泄漏率测定等对此材料进行鉴定与表征。结果表明,该材料具有良好的过氧化氢酶亲和分离性能。张静等^[28]对壳聚糖微球羟丙基氯化及氨基化后用其偶联色素配体 F3GA,考察了该染料亲和分离材料对牛血清白蛋白(BSA)的吸附性能,发现其对 BSA 有较高的吸附量(95.2 mg/g),负载牛血清白蛋白的微球容易洗脱,洗脱率高达 99%。王雪峰等^[29]以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂、亚氨基二乙酸(IDA)为螯合配基制备了分别固载有 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 3 种金属离子的螯合亲和分离材料。实验表明,其稳定性与机械强度均较好,当交联度达到一定程度时上述 3 种分离材料对牛血清白蛋白均具有最大吸附量。

4 纤维素

孔德领等^[30]以球形纤维素为载体,经环氧氯丙烷活化后共价键联小牛胸腺 DNA,制备 DNA 免疫吸附剂,通过血液灌流能够治疗系统性红斑狼疮。对病人血清的吸附实验结果表明,1 mL 吸附剂与 3 mL 病人血清混合,于 37℃ 下保温 1 h,可吸附除去 40%~70% 致病抗体。邹长军^[31]以环氧氯丙烷、球形纤维素和 NaOH 为原料,在 40℃ 活化温度下首先制得含有活化基团的中间体,然后再固定 Anti-HBsAg 单克隆抗体,得到偶联率为 16.8% 的 Anti-HBsAg 单克隆抗体免疫吸附剂。经患者血清体外吸附评价实验结果表明,该吸附剂可吸附除去 6.2%~46.3% 致病抗体,血清由阳性转为阴性。Jolita 等^[32]用 2 种凝集素伴刀豆蛋白和麦胚凝集素为配体活化偶联大孔纤维素,得到的层析填料对糖蛋白有很高的亲和吸附性,吸附容量达 7.4 mg/mL,再生率为 93%。李欣等^[33]采用反相悬浮包埋技术制备了粒径小于 300 μ m、粒径分布窄和湿态孔度高(85%~90%)的高顺磁性珠状纤维素。经高碘酸钠活化后,与具有生物活性的绒毛膜促性腺激素偶联得到磁性亲和分离材料。

笔者所在课题组以葡聚糖为载体,分别合成了对氨基苯甲脒亲和超滤载体和卵粘蛋白亲和超滤载体,并在膜分离设备上实现了一些酶的分离纯化。

5 结语

天然多糖生物相容性较好,易于衍生化,可制成具有不同性能的各种亲和分离材料,用于核酸、蛋白

质、糖蛋白和多糖等生物活性物质的分离纯化,具有很好的应用前景。随着“生态环境生产”和“可再生”意识的萌发和兴起,天然高分子作为分离载体材料越来越受到关注和青睐。特别是部分多糖糖链结构本身对蛋白和某些生理活性物质分子具有特异识别性,是极具开发前景的亲分离载体材料。商品化的亲和分离材料种类有限且价格昂贵,远不能满足分离工程以及科研工作的需要,在实际应用中往往需要对载体进行修饰改性或自制新的载体,使其更有利于亲和分离,以满足大规模工业生产的需要。因此,研制价格低廉、机械强度高、活化效率高的新型载体材料是亲和分离研究中的一大热点。由于多糖在生物领域中的重要性,寻找新的性能优异的多糖分离载体材料备显重要。当然,多糖类亲和分离材料的刚性普遍不如无机基质材料的刚性好,孔结构较复杂,在洗脱体系的变化过程中会产生膨胀或收缩现象,所有这些影响分离性能的因素仍有待于通过载体制备技术进一步研究解决。相信随着研究的进一步深入,必将产生性能更加优良的具有广阔应用前景的新型多糖亲和分离材料。

参考文献

- [1] Haginaka J. Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2005, 24(5): 407 - 415.
- [2] Buckingham A D, Legon A C, Roberts S M. Principles of molecular recognition[M]. London: Blackie Academic & Professional, 1995: 1 - 15.
- [3] Mayes A G, Whitcombe M J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57(12): 1742 - 1778.
- [4] 陈漫, 任启生, 宋新荣, 等. 刺桐胰蛋白酶抑制剂亲和层析填料的制备及应用[J]. 北京理工大学学报, 2005, 25(2): 172 - 175.
- [5] 杨青, 姚伟, 彭明利, 等. 定向合成化学配基亲和层析纯化碱性磷酸酶[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(3): 241 - 245.
- [6] 胡翠华. 亲和层析微柱在抗肌红蛋白抗体纯化中的应用[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15(2): 114 - 115.
- [7] 张静, 范继业. 琼脂糖凝胶提取纯化抑肽酶的研究[J]. 河北化工, 2005(5): 41 - 42.
- [8] 邓湘蕾, 李新荣, 高景燕. 麦胚凝集素的分离纯化及其在亲和层析中的应用[J]. 东南大学学报: 医学版, 2003, 22(3): 157 - 160.
- [9] 朱家骅, 夏素兰. 壳型琼脂凝胶-染料亲和吸附剂制备及其特性[J]. 高校化学工程学报, 1997, 11(3): 312 - 316.
- [10] Fraguas L F, Batista-Viera F, Carlsson J. Preparation of high-density concanavalin a adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 803(2): 237 - 241.
- [11] Lakhari H, Muller D. Insulin adsorption on coated silica based supports grafted with *N*-acetylglucosamine by liquid affinity chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 808(1): 35 - 41.
- [12] Shibusawa Y, Fujiwara T, Shindo H, et al. Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye-ligand affinity counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 799(2): 239 - 244.
- [13] 袁毅, 俞耀庭. 葡聚糖为载体的双亲型 LDL 吸附剂吸附动力学研究[J]. 离子交换与吸附, 2003, 19(1): 49 - 54.
- [14] Mateo C, Fernandez-Lorente G, Pessela B C C, et al. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes: New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 915(1/2): 97 - 106.
- [15] 董聿生, 梁峰, 余向阳, 等. 新型磁性葡聚糖亲和吸附剂的制备及在尿激酶纯化中的应用[J]. 色谱, 2001, 19(1): 21 - 24.
- [16] 文汉. 甲壳素亲和层析分离纯化稻胚凝集素[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(2): 212 - 215.
- [17] Kopacek P, Vogt R, Jindrak L, et al. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*[J]. Insect Biochem and Mol Biol, 1999, 29(11): 989 - 997.
- [18] Yang Q, Gong Z. Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*)[J]. Protein Expr Purif, 2002, 24(1): 76 - 82.
- [19] Liu R, Huang H, Yang Q, et al. Purification of α -Sarcin and an antifungal protein from mold (*Aspergillus giganteus*) by chitin affinity chromatography[J]. Protein Expr Purif, 2002, 25(1): 50 - 58.
- [20] Zhou Dao, Zhang Lina, Zhou Jinping, et al. Cellulose/chitin beads for adsorption of heavy metals in aqueous solution[J]. Water Research, 2004, 38(11): 2643 - 2650.
- [21] Roy I I, Sardar M, Gupta M N. Exploiting unusual affinity of usual polysaccharides for separation of enzymes on fluidized beds[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 27(1/2): 53 - 65.
- [22] 李艳利, 史永昶, 姜涌明, 等. 壳聚糖多孔珠作为亲和吸附剂载体纯化人尿胰蛋白酶抑制剂[J]. 药物生物技术, 2000, 7(4): 218 - 220.
- [23] 宋扬, 侯司, 赵辉, 等. 改性与修饰壳聚糖固定化酶纯化抑肽酶研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 21(1): 82 - 86.
- [24] 余艺华, 薛博, 孙彦, 等. 壳聚糖亲和磁性毫微粒的制备及其对蛋白质的吸附性能研究[J]. 高分子学报, 2000(3): 340 - 344.
- [25] 王斌, 谢苗, 曾竞华, 等. 磁性壳聚糖微球固定化褐藻酸酶的研究[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 253 - 259.
- [26] 申屠静灵, 贾之慎, 高慧. 活性蓝 F3GA 固载的壳聚糖微球对过氧化氢酶的吸附[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2005, 32(6): 674 - 678.
- [27] Shentu Jingling, Wu Jianmin, Song Weihua, et al. Chitosan microspheres as immobilized dye affinity support for catalase adsorption[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(1/2): 42 - 46.
- [28] 张静, 张政朴, 宋瑜, 等. 染料壳聚糖微球的制备及其对牛血清白蛋白(BSA)吸附性能的研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(12): 2363 - 2368.
- [29] 王雪峰, 杨龙寿, 陈天. 壳聚糖为载体金属亲和吸附剂的制备及性质[J]. 功能高分子学报, 2003, 16(3): 327 - 331.

表 1 产 2,3-丁二醇发酵菌株研究情况

菌种	学名	碳源	2,3-丁二醇最高 质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	得率 ^① / $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	文献
产气气杆菌	<i>Aerobacter aerogenes</i>	葡萄糖	36.5	0.30	[6]
解淀粉芽孢杆菌	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	葡萄糖	30	0.33	[7]
地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	葡萄糖、蔗糖、淀粉等	5.16	0.44	[8]
多黏芽孢杆菌	<i>Bacillus polymyxa</i>	葡萄糖	13	0.29	[9]
多黏芽孢杆菌	<i>Bacillus polymyxa</i>	淀粉	38	0.28	[10]
多黏类芽孢杆菌	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	葡萄糖	—	—	[11]
产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	葡萄糖	110	0.48	[12]
阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	玉米纤维来源的葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等	34.4	0.43	[13]
产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	木糖	49	0.33	[14]
产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	糖蜜	98.6	0.48	[15]
肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	乳清渗透物	13.7	0.39	[16]
肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	葡萄糖	39.6	0.43	[17]
黏质沙雷氏菌	<i>Serratia marcescens</i>	蔗糖	—	—	[18]

注:①以任何一种糖为碳源时,2,3-丁二醇的理论得率均为 $0.50 \text{ g/g}^{[14]}$ 。

进行系统的研究,分别研究了酸解、酶解以及混菌培养在该过程中的应用。Cao 等^[22]则直接将磨碎的玉米芯经预处理后作为 *K. oxytoca* ATCC 8724 发酵产 2,3-丁二醇的碳源。除上述糖类之外, Lee 和 Maddox 等^[16,23]还利用乳糖作为碳源进行了 2,3-丁二醇连续发酵研究。此外,糖蜜、蔗糖以及麦芽糖等也被作为碳源用于发酵产 2,3-丁二醇^[5,10,15]。

3 发酵工艺

3.1 pH 对发酵过程的影响

pH 在调节细菌的代谢过程中起着重要的作用,尤其是在含有大量复合产物的发酵过程中,pH 对发酵结果的影响尤为明显。2,3-丁二醇发酵过程中含有相当多的副产物,如 3-羟基丁酮、乙醇、乙酸、乳酸等。2,3-丁二醇生成路线以及这些副产物生成路线的相关酶最适 pH 并不一致,因而发酵过程中 pH 不仅会影响细菌的生长,还会影响细菌的代谢过程^[9]。一般,碱性条件有利于有机酸的生成,此时 2,3-丁二醇的产量较低;而在酸性条件下,有机酸的产量则下降至碱性条件下的 1/10,产物中的主要成

分为 2,3-丁二醇^[24]。Raspoet 等^[25]发现一株地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis*,以葡萄糖为碳源,当 pH 为 6.0 时 2,3-丁二醇的产量最高。Jansen 等^[14]发现 *K. oxytoca* 在厌氧条件下以木糖为碳源,当 pH 为 5.2 时菌体生长速度最快,2,3-丁二醇的产量也最高。因此,2,3-丁二醇发酵过程中的最佳 pH 与所使用的菌株以及底物相关。

3.2 溶氧对发酵过程的影响

虽然 2,3-丁二醇是典型的厌氧代谢产物,但是当以 *K. pneumoniae* 为出发菌株时,适当的通气可以增加 2,3-丁二醇的产量。Long 和 Patrick 对此的解释是:通气过程中伴随着搅拌,通过搅拌可使底物和产物在发酵液中均匀分散,因而可以提高发酵的效率。Laube 等^[26]发现, *B. polymyxa* 在静置摇瓶与振荡摇瓶中相比,消耗更少的底物木糖并产生较少的 2,3-丁二醇。他最初对此的解释是:后一种情况下,发酵过程中的产物 CO_2 能够及时释放,从而加快了木糖代谢的速率,提高了 2,3-丁二醇产量。然而进一步研究发现,当转速为 125 r/min 时,2,3-丁二醇的产量比转速为 300 r/min 时的产量高,故过多的通

(上接第 22 页)

[30] 孔德领,代军,陈长治,等.球形纤维素固定化 DNA 制备免疫吸附剂[J].高等学校化学学报,2000,21(12):1848-1851.

[31] 邹长军.球形纤维素固定 Anti-HBsAg 单克隆抗体制备免疫吸附剂[J].化学与生物工程,2004(1):32-33.

[32] Jolita A, Liesiene J, Niemeyer B. Evaluation of cellulose-based biospecific adsorbents as a stationary phase for lectin affinity chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 831(1/2):24-30.

[33] 李欣,李朝兴,何炳林.磁性珠状纤维素亲和吸附剂的制备与应用[J].高等学校化学学报,1998,19(6):994-999. ■