

利用渗透交联固定化细胞促进生物转化

石屹峰* 金凤燮 吴怡莹 严 复

(大连轻工业学院食品工程系 大连 116001)

虞星炬 袁 权

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116012)*

固定化技术已在生物工程中得到广泛的实际应用,特别是应用于生物转化以提高酶或细胞的稳定性,实现连续操作等。对于含胞内酶的细胞的生物转化,一般先破碎细胞,使酶释放出来,再进行酶固定化。由于酶的稳定性通常与细胞膜的结合有关^[1],细胞破碎中常导致酶的失活。如果不破碎细胞,对完整细胞固定化,又会有传质困难抑制酶活力的发挥。我们研究出渗透交联固定化细胞技术以解决这个矛盾。先采用某种试剂(多为表面活性剂)处理细胞,提高细胞的通透性,再进行交联固定化,可以保证酶的活力破坏较小,又减小了传质阻力。既提高了固定化细胞的稳定性,又提高了固定化细胞的表现酶活。称这种固定化技术为渗透交联固定化细胞技术。Prabhune等采用CTAB-戊二醛处理聚丙烯酰胺凝胶包埋的含青霉素酰化酶 *E. coli* 细胞^[2]。Nishida采用1,6-己二胺-戊二醛处理含天冬氨酸酶的 *E. coli* 细胞^[3]。渗透交联固定化处理会损伤细胞和酶是这种技术的一个矛盾。本文采用多乙烯多胺-戊二醛处理方法,因多乙烯多胺既起到表面活性剂的作用,又是交联剂,而且渗透能力比CTAB和1,6-己二胺为低,故对细胞和酶损伤较小。

1 材料和方法

1.1 试剂

反丁烯二酸(山东省周村有机化工厂),戊二醛(沈阳试剂三厂),多乙烯多胺(天津市化学试剂一厂),κ-卡拉胶(青岛海洋研究所),其余为市售化学品。

1.2 产酶菌种及培养条件

E. coli SF-D4 产天冬氨酸酶(Aspartase)(本实验室选育),培养基(%):1,反丁烯二酸 1,玉米浆 1,蛋白胨 0.7, KH_2PO_4 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 0.02$, 氨水调 pH7.2。摇瓶培养 37℃, 24h。

Pseudomonas dacnhae MD121 产 L-天冬氨酸, β-脱羧酶(L-aspartate-β-decarboxylase), 本实验室选育,培养基(%):蛋白胨 0.9, 酪蛋白水解液 0.5, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 氨水调 pH7.2。摇瓶培养 30℃, 24h。

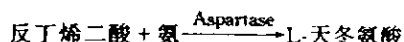
1.3 κ-卡拉胶固定化方法

将培养好的菌体离心(5000r/min, 10min)收集,用生理盐水洗净。取 1g κ-卡拉胶溶于 45ml 80℃ 生理盐水中,冷却至 45℃, 8g 湿菌在 8ml 生理盐水中调好预热至 40℃, 与 κ-卡拉胶溶液混合均匀,用注射器滴入约 15℃ 0.3mol/L 的 KCL 溶液中,形成直径 3mm 的小球,浸泡 4h。

1.4 渗透交联方法

游离或凝胶包埋的菌体于 pH7.0 磷酸盐缓冲液中(5℃),先加 2% 多乙烯多胺处理 10min,再加 2% 戊二醛处理 30min,反应中连续搅拌,反应后用生理盐水洗净。

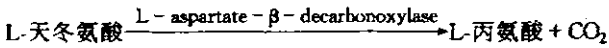
1.5 反应体系及分析方法



* 目前联系地址:清华大学化学工程系,北京 100084。

本文于 1995 年 7 月 25 日收到。

1mol/L 反丁烯二酸用氨水溶解调 pH8.5, 加 1mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 反应温度为 37℃。用 KMnO_4 滴定反丁烯二酸测定反应速度; 0.2ml 反应液加 20ml 去离子水和 5ml 浓硫酸用 0.1mol/L KMnO_4 滴定至红色不褪(60℃左右)。



1mol/L L-天冬氨酸用氨水溶解调 pH8.5, 加 0.1mmol/L 5-磷酸吡哆醛, 反应温度为 37℃。分析方法采用高效液相色谱法, 色谱仪为 HITACHI 638-50, 色谱柱为 YWG-C18(200mm × 4.6mm), 紫外检测波长为 360nm, 流动相是 50% 甲醇和 50% 的 0.02mol/L NaAc-HAc 缓冲液(V/V), pH6.45。反应样品预先用 2,4-二硝基苯(金山化工厂)的甲醇溶液, 60℃ 水浴 1h(避光)。加 7ml pH7.0 磷酸盐缓冲液终止反应, 冷却至室温测定。

酶活都是测定反应 1h 的反应速度。半衰期测定是将固定化细胞或原细胞置于底物溶液中连续转化, 定期测定其酶活。测定硬度是利用压力器将凝胶包埋固定化细胞压碎所需压力。交联情况(大小)通过将细胞革兰氏染色后显微镜(OLYMPUS CHA 1600 倍)观察。

2 结果和讨论

2.1 渗透交联 κ-卡拉胶固定化细胞

κ-卡拉胶固定化 *Escherichia coli* SF-D4 细胞经多乙烯多胺-戊二醛渗透交联处理后, 酶学性质得到改善, 而且固定化小球的机械强度也提高了。在填充床反应器中连续转化反丁烯二酸为 L-天冬氨酸, 转化率接近 100%, 已通过 20L 填充床反应器的工业中试和鉴定。

表 1 κ-卡拉胶固定化 *E. coli* SF-D4 细胞渗透交联前后酶学性质的变化

酶学性质	最适/pH	最佳温度/℃	相对酶活/%	半衰期/d	相对硬度/%
未处理	8	40	100	120	100
渗透交联处理	8	45	120	200	250

2.2 渗透交联游离细胞

中空纤维膜反应器有较大的催化表面, 利用膜对细胞的截留可以实现固定化连续反应⁽⁴⁻⁶⁾。然而细胞在底物中极易自溶, 导致酶迅速失活。渗透交联不仅改善 *Pseudomonas dacnhae* MD121 细胞的稳定性, 提高了表观酶活, 还可以根据膜孔径的需要制成较大颗粒的交联细胞, 减少对膜的阻塞作用。反冲式操作(底物外腔进内腔出)转化 L-天冬氨酸为 L-丙氨酸, 转化率超过 90%。

表 2 *Pseudomonas dacnhae* MD121 细胞渗透交联前后酶学性质的变化

酶学性质	最适/pH	最佳温度/℃	相对酶活/%	半衰期/d	相对大小/倍
原细胞	6.0	37	100	4	1
渗透交联细胞	6.0~7.0	52	153	12	100

3 结 论

渗透交联固定化细胞是针对含胞内酶的细胞固定化方法, 可用于游离细胞或包埋细胞的固定化处理, 以提高其活力和稳定性, 本文采用多乙烯多胺-戊二醛处理方法, 对于产 L-天冬氨酸和 L-丙氨酸的细胞固定化都有显著效果, 为固定化细胞技术提供了新的思路和参考依据。

参 考 文 献

- [1] Tosa T Sato T, Nishida Y *et al.* Biochim Biophys Acta, 1977, 483:193-202.
- [2] Prabhune A A, Rao B S, Pundle A V *et al.* Enzyme Microb Technol, 1992, 14:161~163.

- [3] Nishida Y, Sato T, Tosa T *et al.* Enzyme Microb Technol, 1979, 1:95~99.
- [4] Jandel A S, Hustedt H, Wandrey C *et al.* Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1982; 15:59~63
- [5] 时国栋, 虞星炬, 袁 权. 化工学报, 1990, 41:645~652.
- [6] 马士洪, 都绛瑛, 曲天明等. 生物工程学报, 1992, 8:77~81.

Improvement of Immobilized Cells Through Permealilizing and Crosslinking

Shi Yifeng* Jin Fengxie Wu Yiying Yan Fu

(Department of Food Engineering, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116001)

Yu Xingju Yuan Quan

(Dalian Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Dalian 116012)*

Abstract In order to achieve high activity of enzymatic catalysis, the method of permealizing and crosslinking treatment has been suggested for immobilizing cells with endocellar enzymes. Polyethene-polyamine and glutardehyde was used to enhance the activity and stability of *E. coli* having aspartase entrapped in κ -carrageen gel and intact *Pseudomonas dacunhae* cells having aspartate- β -decarboxylase. The strength and enlargement effects, which favor the performance of catalysis in packed bed reactor and membrane reactor respectively, were also obtained from the experiment results.

Key words Immobilized cells, permealizing, crosslinking, polyethene-polyamine, glutardehyde, L-aspartic acid, L-

alanine