

包埋法制备珠型固定化细胞

孙万儒

(中国科学院微生物研究所,北京)

随着固定化酶技术的进步,固定化细胞技术随之发展起来。第一代固定化细胞大部分是催化比较简单的酶反应,如水解酶、异构酶等。第二代固定化细胞主要是利用细胞内复杂的酶体系或整个代谢过程生产某些产品,因此需要固定化活细胞。细胞固定化后仍可增殖,进行正常代谢。主要是细菌和酵母的固定化,用于传统发酵产品如酒精,丙酮丁醇,柠檬酸,乳酸,甘油等的连续生产。它们的特点是细胞生长快,生物量高,发酵时间短,生产易连续化,产品纯^[1,2]。

近年来,固定化技术与细胞培养技术相结合,用于动、植物细胞的固定化,解决了动、植物细胞大规模培养时生长慢,对机械作用敏感,需支持物及集结生长和连续生产产品的问题。这是第三代固定化细胞^[3]。

目前,用于固定化细胞方法虽有吸附法,共价结合法,交联法,但以包埋法最为有效。因为:①方法简便。将细胞与单体或聚合物一起聚合或凝胶化;细胞即包埋在形成的聚合物中。②条件温和。可选用不同聚合物为载体,不同的包埋系统和条件,以便保持细胞的酶活力和生长能力。③细胞不易漏出,稳定性好。④包埋后载体可防止蛋白酶作用和机械损伤细胞。⑤有较高的容量。包埋法制备的固定化细胞其细胞含量可达50—70%,全部载体体积均可利用。

但包埋法制备的固定化细胞也有缺点:

1. 由于载体存在扩散限制作用,不是所有细胞都处于最适底物浓度下。
2. 载体聚合物形成的孔隙大小有一定,对高分子底物的通透性差。

目前,报道了许多制备固定化细胞的方法,但大多数固定化细胞是形状不规则的颗粒。其机械性能差,使用中易磨损破坏,或成形方法复杂,效率低,不适于大批量生产。本文根据笔者1976年以来的工作和有关文献对制备珠型固定化细胞技术作一简单介绍。

一、包埋原理及载体选择

包埋法是利用线性或网状结构的高分子聚合物的夹裹作用将细胞截留在形成的高分子材料内。大部份为物理或机械作用,但部份载体也可和细胞形成化学键。

所用载体主要有人工合成的聚合物,多糖类和蛋白质类材料。在选择载体时以下因素可供考虑。

1. 制备固定化细胞的方法及成形的难易。
2. 载体的稳定性,包括对温度、pH、微生物和化学试剂的稳定性。
3. 机械强度。
4. 毒性。包括对人、对酶活力,对细胞存活性的影响。
5. 来源和成本。

由于使用的载体不同,制备的固定化细胞有凝胶型和“干胶”型。聚丙烯酰胺、琼脂、琼脂糖、海藻酸钙、明胶等材料制备的固定化细胞为凝胶型,含水量大约在80%以上,具有较大的孔,对底物和产物的扩散限制作用小,酶活力较高,缺点是机械性能略差。而醋酸纤维素、环氧树脂等制备的固定化细胞多为“干胶”型。由于结构致密,孔隙小,含水少,对底物和产物扩散限制作用大,酶活力低,但机械性能好。

二、固定化及成珠方法

不规则形状的固定化细胞易磨损,在柱反应器内受压易变形,流速不好。而珠型固定化细胞没有这些问题。解决固定化细胞的成型问题是一个技术关键。

水与许多有机溶剂互不混溶,当水分散在有机溶剂相中时,以小滴存在。利用这一现象,将细胞与聚合物单体或某些聚合物混合悬浮在有机溶剂中进行聚合或凝聚,即可制备珠型固定化细胞。在选择有机溶剂时,应当考虑以下条件:

1. 与水不混溶,互溶性越小越好,两相易分离;
2. 无毒性,包括对人,对细胞中的酶及细胞生长无不良影响;
3. 挥发性低,沸点高,不易燃;
4. 比重接近于细胞与聚合物混合物的比重。为达到这一目的,也可采用不同比例的可互溶的有机溶剂混合液;
5. 粘变较低,易从固定化细胞上清液洗掉;
6. 成本低廉。

以下有机溶剂可供选择:苯、甲苯、液体石蜡、煤油、氯仿、四氯化碳、甲苯与氯仿或四氯化碳混合物(如

73:27)、醋酸丁酯、醋酸异戊酯、磷酸三丁酯、邻苯二甲酸丁酯、豆油、硅油等。

为获得较小的珠型固定化细胞、防止有机溶剂粘着在固定化细胞上及固定化细胞间的粘连,可在有机溶剂中加入低浓度非离子型表面活性剂,浓度一般为0.05%(W/V)左右。其它影响因素将在具体方法中讨论。

以下介绍的制备珠型固定化细胞的方法适用于各种细菌、酵母、放线菌细胞、真菌菌丝体和孢子的固定化、某些也适用于动、植物细胞的固定化。下面主要以产青霉素酰化酶的大肠杆菌及产二氢嘧啶酶的假单胞菌细胞固定化为例,介绍几种制备珠型固定化细胞的方法。

三、方法

(一) 以琼脂和琼脂糖为载体

称取4.0g琼脂或琼脂糖,加入46ml缓冲液,于杀菌锅中加热溶解成均匀溶液,室温下冷却到60℃。将细胞浓度为40—80%的菌悬液于40℃下保温,然后与琼脂或琼脂糖溶液混合均匀。流加到搅拌下的500ml、温度为30℃的醋酸丁酯中,加完后继续搅拌3分钟,到琼脂-细胞混合物分散成小滴。迅速加入300ml的冷醋酸丁酯,再搅拌2—5分钟。停止搅拌后,倾去醋酸丁酯;抽滤干,用缓冲液或蒸馏水洗至珠型固定化细胞无醋酸丁酯味^[4,5]。

用此法制备的固定化细胞为直径1—3mm的小珠,包埋率在97%以上,酶活力回收为50%以上。

影响成珠的因素:

1. 酯溶剂温度:如图1所示,成珠时有机溶剂温度较低时,直径较大的珠型固定化细胞制备比例高,直径小的比例低。提高温度,小珠的比例增加,大的减少。因此,可根据要求,掌握成珠有机溶剂温度,基本

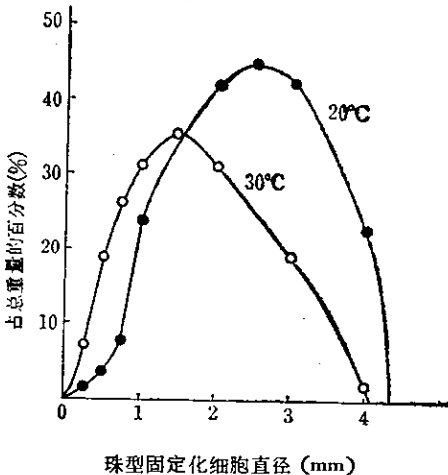


图1 温度对固定化细胞成珠大小及分布的影响
搅拌速度: 350rpm; 1. 20℃, 2. 30℃

可控制制成的固定化细胞的颗粒大小及比例。

2. 搅拌速度: 搅拌是水相的琼脂-细胞混合物在油相的有机溶剂中分散成小滴的动力。如图2所示,搅拌速度越高小珠的比例增加;大珠比例明显减少。

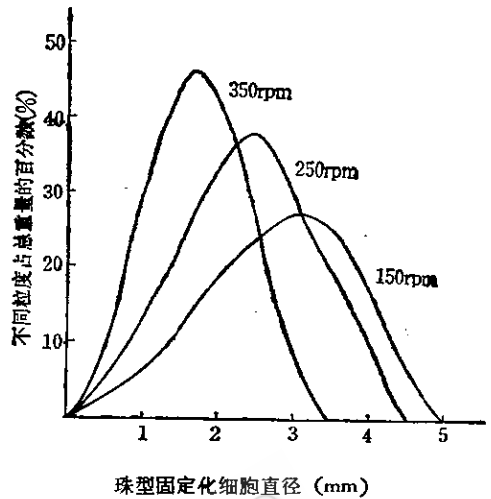


图2 搅拌速度对成珠大小及其分布的影响
有机相为醋酸丁酯,温度为30℃

3. 琼脂-细胞混合物粘度: 影响琼脂-细胞混合物粘度有琼脂及细胞的浓度。不言而喻,浓度越高粘度越大;更重要的因素是温度,温度低于40℃琼脂就会凝结,温度越高粘度也越小。但高温对细胞的存活、酶的活力均有不利影响。试验证明琼脂浓度为2—7%,细胞浓度在60%以下,温度为40℃时均可制备较理想的珠型固定化细胞。

4. 浴比: 一般为琼脂-细胞混合物与使用成珠有机溶剂之比以1:5(V:V)为宜。高于此值时对成珠大小影响不大,但低于1:3时,会产生珠间粘连现象。

5. 表面活性剂: 表面活性剂的作用是促进和稳定水相在有机相中的分散,以制备直径更小且较均匀的珠型固定化细胞,并且有使有机溶剂容易从固定化细胞上洗脱下来的作用。一般使用非离子型的表面活性剂,如Triton x-100,使用0.05%的浓度即可达到预期效果。

6. 容器及搅拌器的形状: 为保证珠型固定化细胞的完整及成珠均匀度,一般以无挡板的圆形容器为佳。采用推进式螺旋桨型搅拌器,可使琼脂-细胞混合物在有机相中均匀分布,获得最佳效果。

综上所述,要制备大小适当,粒度均匀的珠型固定化细胞,适当控制上述条件即可奏效。

(二) 以海藻酸钙为载体

取6g海藻酸钠,加94ml蒸馏水或生理盐水,于高压灭菌锅中加热溶解,取出后冷却到40℃,取20ml与20ml细胞浓度为50%的菌悬液混合均匀。然后流加到搅拌下的200—500ml的醋酸丁酯中,搅拌使之分

散成小滴,迅速加入 5ml 1.0M 的 CaCl_2 溶液,继续搅拌 5—10 分钟。停止搅拌,自然沉降,倾出醋酸丁酯,再加入 50ml 0.1M 的 CaCl_2 溶液,浸泡 1 小时,进一步固化。然后用蒸馏水或生理盐水彻底洗涤即得珠型固定化细胞。直径为 1—3mm,包埋率为 95% 以上,活力回收 40% 以上。

用此法可制备含海藻酸钠 2—6%, 细胞含量(湿细胞)为 50% 以下的珠型固定化细胞。

在技术上,此法比以琼脂为载体制备珠型固定化细胞更容易。珠大小主要与搅拌速度有关。海藻酸钠和细胞浓度较高时,混合物粘度大,搅拌速度需相应提高。

若将海藻酸钠和细胞混合液加到注射器内,向搅拌下的 0.1M 的 CaCl_2 溶液中滴加,或采用多头的注射器,用气体加压,将混合物压出滴口,滴入搅动下的 CaCl_2 溶液中,也可制备珠型固定化细胞。此法是世界多数实验室最常采用的方法^[12]。

(三) 以 k-角叉菜胶为载体

用加热法制备 8% 的 k-角叉菜胶溶液,室温下冷却到 60℃,取 20ml 加到 20ml 的细胞浓度为 40% 的菌悬液中,混合均匀,流加到搅拌下的保温 30℃ 的醋酸丁酯中,直到分散成小珠,加入 10% 的 KCl 溶液,继续搅拌 10 分钟,停搅拌后,滤去醋酸丁酯,再加入 2% 的 KCl 溶液,浸泡 1 小时固化,然后用水或 KCl 溶液彻底洗涤,得直径为 1—3mm 的珠型固定化细胞。

此法实为琼脂和海藻酸钙为载体制备珠型固定化细胞的混合法,影响因素也相同。

(四) 以二醋酸纤维素为载体

取 1.0g 二醋酸纤维素加到 15ml 丙酮中,搅拌使之溶解,与 5.0ml 的细胞浓度为 60% 的菌悬液混合,搅拌均匀,装入注射器中,向搅拌下的蒸馏水中滴加,可迅速形成珠型固定化细胞。此法包埋率为 70—80%,活力回收为 10—30%。在成珠时,水会混浊,主要是部份细胞漏出。使用过程中也会有部份细胞漏出。

此法成珠大小取决于注射针头的粗细以及二醋酸纤维素与细胞混合物的稠度。由于许多酶及细胞对丙酮敏感,因此往往制备的固定化细胞活力低,另一个原因是扩散阻力大。此法使用不广泛。

(五) 三醋酸纤维素为载体

将 2g 的三醋酸纤维素溶于 15ml 的氯仿和二氯乙烷的混合物中,加入 5ml 50% 细胞浓度的菌悬液,充分搅拌成乳浊液,装入注射器中,滴加到搅拌下的甲苯或甲苯与四氯化碳的混合液中,凝固后,得扁珠形的固定化细胞,直径为 3mm 左右。此法得到的固定化细胞机械性能好。但活力低,主要是载体对底物和产物的扩散阻力大。包埋率高于二醋酸纤维素。

也可用此法制备条状的固定化细胞。

(六) 以明胶为载体

用加热法制备 14% 的 pH5.0 的明胶溶液,室温

下冷却到 40℃,取 10ml 与 10ml 细胞浓度为 60% 的菌悬液,温度为 40℃,混合均匀。流加到 200ml 搅拌下的温度为 20℃ 左右的醋酸丁酯中,待明胶-细胞混合物分散成小珠,迅速加入 5ml 5% 的戊二醛溶液,继续搅拌 5—10 分钟,停止搅拌,倾出醋酸丁酯,水洗得到的珠型固定化细胞,再于 50ml 的 pH5.0 的戊二醛溶液中浸泡 30 分钟,然后彻底洗涤,得直径 1—3mm 的珠型固定化细胞,包埋率为 95% 以上,活力回收为 30% 左右。

用此法制备珠型固定化细胞时,明胶的浓度不得低于 6%, 否则机械性能不好。增加明胶用量和戊二醛用量固定化细胞的机械强度增加。

固定化细胞的珠体大小,主要取决于成珠时的搅拌速度。也可采用另一种方法:明胶-细胞混合物搅拌下加到 20℃ 左右的醋酸丁酯中,使之分散均匀后,加入冷却到 0℃ 的醋酸丁酯,使成珠系统冷却到 10℃ 以下,明胶即凝固。然后加入 10ml 的 5% 的戊二醛溶液,继续搅拌 30 分钟,进行交联。除去醋酸丁酯后,可以再交联一次,即得珠型固定化细胞。

戊二醛的交联程度,除与使用的戊二醛量和浓度有关外,也与交联时的 pH 有关, pH4.5—8 下均可进行。似乎弱碱性条件下交联更好。但固定化细胞的酶活力以 pH4.5 交联为最高。

(七) 以血纤维蛋白为载体

将 10ml 用 pH7.0 的磷酸缓冲液配制的 3% 的血纤维蛋白原溶液与 10ml 的 50% 的细菌浓度的菌悬液混合均匀,再加入凝血酶(约 4 单位)的缓冲液 20ml,混合均匀后,加到搅拌下的 200ml 的液体石蜡中,使之分散成小滴,继续搅拌,直到小滴完全凝固。除去液体石蜡,用缓冲液洗涤,得珠型固定化细胞^[4]。

本法是依据血纤维蛋白原在凝血酶作用下,形成不溶于水的血纤维的原理。凝固反应应在 10 分钟内完成,否则制备的固定化细胞小珠不规则,因凝血酶量对成珠是重要的影响因素。凝固过程中,分散小滴的粘度不断增加,为防止珠体形状不整齐,凝聚开始几分钟后,可适当降低搅拌速度。

(八) 聚丙烯酰胺为载体

将 17.6g 丙烯酰胺和 1.2g N-N'-甲撑双丙烯酰胺溶于 pH7.0、0.05M 的 Tris-HCl 缓冲液中,取 20ml 与 5g 的湿菌体混合均匀,加入 50μl 的 40% 的过硫酸铵,混匀后加到豆油中或液体石蜡中,搅拌分散成小滴,迅速加入 250μl 的四甲基乙二胺,小滴即很快聚合形成小珠,除去有机相后,用水或缓冲液充分洗涤^[7]。若要制备更小的珠型固定化细胞,可在有机相中加入 0.05% 的 Triton X-100,以提高分散度。

此法可在较大范围内改变丙烯酰胺和 N-N'-甲撑双丙烯酰胺的用量,以制备凝胶孔大小不同,机械性能

(下转第 32 页)

不同的珠型固定化细胞。四甲基乙二胺是游离基诱发剂,它的用量对聚合速度有很大影响,为得到规则的小珠,四甲基乙二胺的用量要保证聚合反应在 10 分钟内完成。当然小珠的大小与搅拌速度有重大关系,在加入四甲基乙二胺前,要将单体与细胞混合物分散开,形成大小适当的小滴。聚合过程中搅拌速度不可降低,以防粘连。

本法制备珠型固定化细胞的包埋率在 95% 以上,活力回收为 20—50%。

用以上几种方法制备固定化细胞小珠的大小总有差别,可采用在水中悬浮过筛的方法将其分级,得到大小比较接近的珠型固定化细胞。

以上方法不仅简便,适用性强,可以根据不同要求选择有机相,通过一、二个因素的控制即可制备不同大小的珠型固定化细胞。这些方法不仅适合实验室内

使用,也适合大批量的工业生产。因此这些技术有较大的实用价值。

参 考 文 献

- [1] Klaus-Dieter, V. and Joachim, K.: *Enzyme-Technology*, pp. 219—225, Ed. by Lefferty, R. M., Spring-Verlog, Berlin, 1983.
- [2] Bucke, C.: *Phil. Trans, R. Soc. Lond., B.* 300, pp. 369—389, 1983.
- [3] Nilsson, K.: *Immobilized Animal and Plant Cells*, Lund University, 1983.
- [4] 孙万儒: *微生物学报*, 20(4): 407—414, 1980.
- [5] 孙万儒: *微生物学论文集*, 科学出版社, 北京, 1985年, 第 91—98 页。
- [6] Gianfrada, L. et al.: *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.*, 11: 6, 1980.
- [7] Kleinand, S.: *Solid Pharse. Biochem.*, 5: 61, 1980.