

生物催化剂的微囊化——海藻酸/聚赖氨酸技术的研究

袁中一 李雄 李士云 吴云

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

酶工程的20年历史^[1-4], 是单酶固定化→多酶系统固定化→细胞器和细胞的固定化。近年来, 哺乳动物、植物和基因重组细胞固定化要求保持细胞的生物学功能, 更要求细胞存活, 繁殖与代谢。海藻酸钙凝胶和卡拉胶正是众多固定化载体中的佼佼者。然而细胞在培养使用期间从固定化颗粒上的脱落和这些固定化生物催化剂的工作稳定性还有待改进^[5]。

多电解质之间的相互作用可以形成稳定的复合物。多阴离子海藻酸形成的凝胶微粒表面以多阳离子处理即可在界面上形成高分子的半透膜。Lim和Sun报道这一处理可以获得十分稳定的微囊化胰岛素。并为糖尿病治疗带来新的希望^[6]。本文报道了聚-L-赖氨酸作为固定化生物催化剂的微囊膜材料的研究结果。

方 法

(一) 微囊化方法

参照Lim和Sun报道的方法作部分修改。生物材料(酶或细胞)与1.5% (w/v) 海藻酸钠(简称ALG)充分混和, 通过针头以压缩空气喷入1.1% (w/v) CaCl₂溶液中, 形成珠状的海藻酸钙凝胶颗粒。凝胶珠用0.05% (w/v) 聚-L-赖氨酸HBr(sigma)处理, 再经0.1% (w/v) 2-N-环己胺乙基磺酸(简称CHES, sigma)处理, 生理盐水洗涤。进一步用0.15% (w/v) 海藻酸钠处理和生理盐水洗涤后, 以0.05mol/L 柠檬酸钠水溶液液化微囊内的海藻酸钙, 而得到近乎透明的微囊化的生物催化剂, 此微囊珠的直径约500μm。

(二) 红血球微囊化及血红蛋白的释放

新鲜的红血球细胞经生理盐水洗涤后, 离心, 除去溶血部分, 按上述微囊化方法制得微囊化红细胞, 用0.05mol/L 柠檬酸钠处理微囊造成囊内红细胞自溶, 跟踪其上清液540nm光密度的

变化, 考察血红蛋白的释放。

(三) 葡萄糖氧化酶和胰凝乳蛋白酶的微囊化及活力测定

葡萄糖氧化酶活力以过氧化物酶存在下氧化葡萄糖引起4-氨基安替吡啉显色进行度量^[7], 胰凝乳蛋白酶则以pH7.8水解苯甲酰-L-酪氨酸乙酯引起A₂₅₆变化测定活力。

(四) 啤酒酵母细胞的微囊化及对麦芽糖的转化

参照居乃晓等报道的方法^[8], 第五代啤酒酵母(0.22g酵母泥)悬于12ml ALG中, 喷入CaCl₂溶液中, 制得海藻酸钙包埋的珠粒约10ml。分成两部份: 一半继续用1.1% (w/v) CaCl₂溶液进一步固定化24h; 另一半则用PLL, CHES、ALG、柠檬酸钠处理制成微囊。然后, 两者分别接种于生产啤酒用的含酒花麦芽汁溶液中, 于10℃冷室中发酵。以苯酚-浓硫酸比色方法检测发酵液中还原糖的减少, 跟踪不同固定化啤酒酵母转化能力。

(五) 细胞染色

用机械方法破碎微囊, 囊内细胞用0.4% 苕酚蓝处理4min, 离心, 弃去上清液, 用生理盐水洗涤细胞三次, 在显微镜下观察, 若细胞能染上蓝色表明此细胞已死亡, 以不染色细胞数除以总细胞数即得存活率。

结 果

(一) 从蛋白质固定化看膜的通透性

以本文介绍的典型的微囊化技术无法固定胰凝乳蛋白酶, 说明分子量为25000的聚赖氨酸形成的微囊膜不可能截住分子量为25000的蛋白质。

本文于1988年6月23日收到。

本研究受到国家科委的资助, 特此致谢。

0.5ml葡萄糖氧化酶(220μg/ml)与5ml海藻酸钠溶液混和,喷珠后,以不同分子量25000、40000、65000、90000的聚赖氨酸复膜,再经液化,取0.7ml微囊在10ml葡萄糖-过氧化物酶-4-氨基安替吡啉混合液中反应,反应液在A₅₀₀随时间的反应曲线如图1所示。

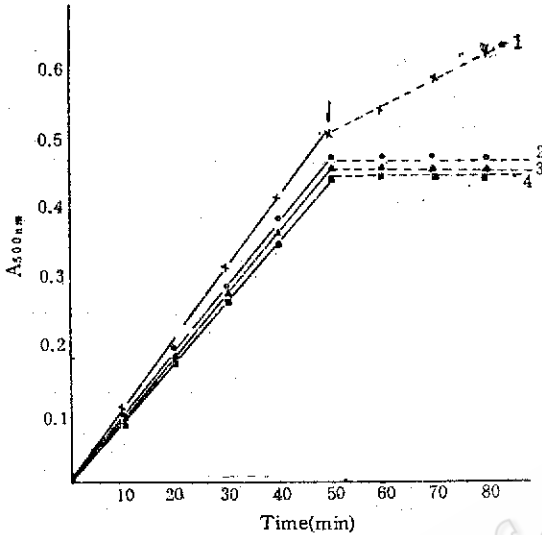


图1 反应时间对微囊化葡萄糖氧化酶活性的影响
Fig.1 Activity-time profile of microencapsulated glucose oxidase
1. enzyme from PLL MW 90000
2. enzyme from PLL MW 65000
3. enzyme from PLL MW 40000
4. enzyme from PLL MW 25000 separated microcapsules, kept incubation and read at 500nm

按图1, 分子量为25000—90000的聚赖氨酸均可以固定化分子量为160000的葡萄糖氧化酶, 固定化酶表现活力随PLL分子量的增加而增加。对25000、40000、65000这三种PLL形成的酶微囊来说, 若从反应系统中除去微囊, 反应液光密度并不随时间改变。说明反应过程中酶没有从微囊上脱落, 而90000聚赖氨酸微囊化的葡萄糖氧化酶从反应液中分去后, 反应液的A₅₀₀在保温过程中继续上升。这表明微囊中的确会通过半透膜部分脱落。

(二) 人血红细胞的固定化及血红蛋白的释放

人血红细胞按典型微囊化方法包裹情况良

好, 从整个操作过程中就可用肉眼看到很少有红细胞不被微囊化。微囊悬浮于0.05mol/L柠檬酸钠中时, 红细胞在低渗条件下发生自溶, 迅速释放血红蛋白。从图2所示结果可以看出, 分子量在25000以上的聚-L-赖氨酸构成的微囊胶囊半透膜均可使分子量为64500的血红蛋白通过。

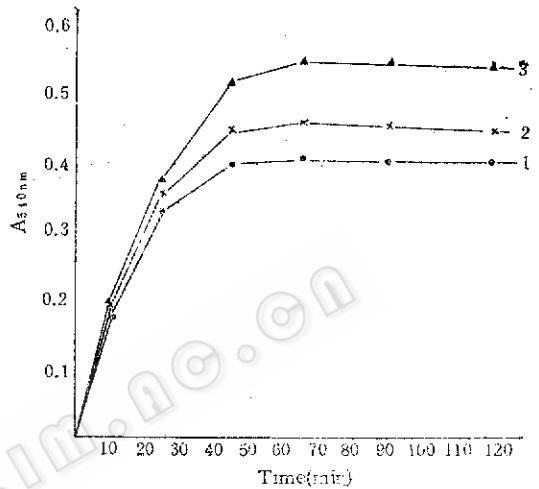


图2 在柠檬酸钠缓冲液中微囊化血红细胞的释放
Fig.2 Release of hemoglobin out of microencapsulated blood red cells when treated by sodium citrate buffer
1. Membrane was made of 25000PLL
2. Membrane was made of 40000 PLL
3. Membrane was made of 65000 PLL

(三) 聚-L-赖氨酸对固定化细胞的加固作用

海藻酸钙可以包埋许多微生物细胞, 可是它对产酸的过程以及需要磷酸缓冲液的工艺都有局限性。我们选择了啤酒酵母为对象进行海藻酸钙凝胶包埋与聚赖氨酸的复膜微囊化的试验。0.22g湿酵母泥与12ml 1.5%海藻酸钠混和制备包埋细胞颗粒。分一半以PLL复膜微囊化。包埋细胞与微囊化细胞分别投入20ml含酒花的麦芽汁中, 冷室10℃发酵。发酵过程中跟踪发酵液中还原糖的减少。如图3所示两种固定化酵母在生产过程中都存在着24h的复苏期, 用显微镜可见酵母细胞明显增殖。然后固定化细胞开始逐渐转化还原糖, 并随之酒香增加。120h以后滤去溶液, 又加入新的麦芽汁, 开始新一轮发酵。图3表明了第

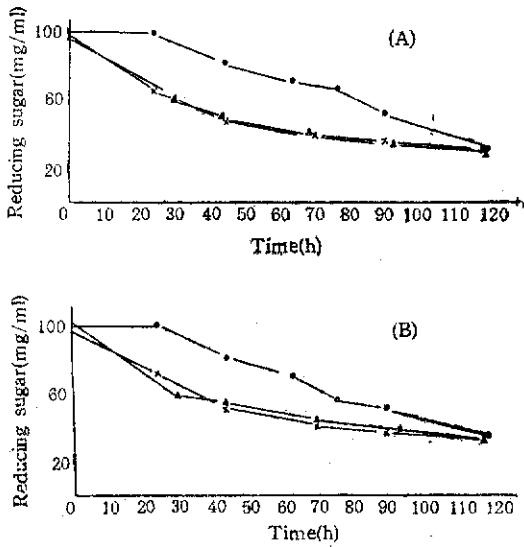


图3 微囊化和包埋酵母细胞转化还原糖过程

Fig.3. Microencapsulated and entrapped yeast cells converted the reducing sugar to beer

A. ALG-entrapped yeast cells

B. ALG-PLL microencapsulated cells

● First batch × Second batch ▲ Third batch

二、第三批的转化以更短时间达到平衡,第四批开始仍以每五天调换新的麦芽汁,前后10批测定其中包埋细胞与微囊化细胞的转化曲线基本相同。

啤酒酵母以海藻酸钙凝胶包埋和 ALG/PLL 微囊化制剂在显微镜下观察基本形态相似,只是微囊化细胞表面较光滑,颗粒也略比前者紧缩一些。说明半透性膜对颗粒的膨胀有一定的限制。这两种固定化啤酒酵母在发酵35天(反复发酵7批)后,海藻酸钙包埋细胞颗粒的表面明显变得粗糙,颗粒也明显变粗,显然这是由于细胞的繁殖和产物的分泌等使得固定化载体基质结构变得松散,而微囊化酵母细胞表面仍保持光滑,颗粒大小也无明显增大。反复发酵50天,PLL复膜的微囊仍然比较光滑,而未经复膜的海藻酸钙包埋制剂则表面已经破裂,部分菌体散布;固定化颗粒也变得酥脆,一经触碰立即碎裂。经历了50天发酵的包埋制剂和微囊化制剂在机械破碎后,用0.4% 萘酚蓝染色,未发现细胞染成蓝色。

参 考 文 献

- [1] Katchalski-Katzir K.: In "Enzyme Engineering", Vol.6, p.503, 1982.
- [2] Klein, J. & Vorlop, K.D.: In "Comprehensive Biotechnology", Vol.2, p.203, 1985.
- [3] Mosbach, K.: In "Methods in Enzymology", Vol.44, 1976.
- [4] 袁中一: 前进中的生物化学论文集, 沈明文主编, 中国科学技术出版社, p.268, 1987.
- [5] Birnbaum, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 3:393, 1981.
- [6] Lim, F. & Sun, A.M.: *Science*, 210:908, 1989.
- [7] 刘泽民等: 临床检验杂志, 3(2):1, 1985.
- [8] 居乃晓等: 食品与发酵工业, 8:17, 1986.
- [9] Haug, A. & Smidsrod, O.: *Acta Chem. Scand.*, 22:3098, 1968.

MICROENCAPSULATION OF BIOCATALYSTS WITH ALG-PLL TECHNIQUE

Yuan Zhongyi Li Xiong Li Shiyun Wu Yun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

On the principle of formation of strong complex between polycation and polyanion polymers, the alginate-polylysine (ALG-PLL) technique to microencapsulate biocatalysts has been developed. The semipermeable membranes prepared

from PLL (25000, 40000, and 65000) allowed chymotrysin, and hemoglobin diffuse in and out. In contrast, glucose oxidase (GOD) was well entrapped by all these PLL formed membranes. Though the PLL 90000 formed membrane could entrapped GOD, the enzyme was gradually leaked out during use. Apparently the pore size of the microcapsule membrane can be controlled by choosing a kind of PLL. The diameter of microcapsule is about 500 μ m with a thickness of membrane about 10 μ m. The microencapsulated and the ALG entrapped yeast cells were used for beer fermentation respectively. After 50 days, the surface of the capsulated preparation still kept smooth while the entrapped one was found to be disintegrated and to cause cell leakage. Microencapsulation strengthen the immobilized cells and improved the operational stability of immobilized cells.

Key words

Microencapsulation; microcapsule alginate-poly-L-lysine semipermeable membrane; entrapped enzymes; entrapped cells