

三醋酸纤维素包埋产青霉素酰化酶的大肠杆菌细胞

寇秀芬 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

三醋酸纤维素包埋细胞较其他固定化方法有较多的优点, 制备过程既不用加热也无需冷冻; 有较好的机械强度, 为使用、保存、运输均带来了方便, 本文报道这一研究结果。

材料和方法

1. 材料: 三醋酸纤维素为保定胶片厂提供; 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(简称 7-ADCA)和重排酸为上海第五制药厂供给; 6-硝基-3-苯乙酰胺苯甲酸(简称 NIPAB)为天津市河北药厂供给; 其他均为市售商品。

2. 菌种和培养方法同前文^[1]。

3. 包埋细胞的制备: 1g三醋酸纤维素溶解在 20 ml 三氯甲烷中(5% W/V), 在室温下缓慢与 16g 湿细胞混合, 混合均匀后通过小孔挤压到甲苯凝固剂中, 获得直径为 2mm 左右的球型颗粒。待甲苯挥发后用 0.5% 的戊二醛溶液处理 1 小时, 洗去游离的戊二醛后备用。

4. 自然细胞和包埋细胞活力的测定方法同前文^[2]。

5. 7-ADCA 的测定: 参照 Merrelli 的方法^[3], 5% 的重排酸裂解液, 用蒸馏水稀释 300 倍。取 2ml 样品, 加入 0.1 ml 甲酸, 再加入 1ml 2% 的柠檬酸钠缓冲液, 最后加入 0.5 ml 5% 的茚三酮溶液, 混合均匀后于 22℃ 反应 15 分钟, 在分光光度计 405nm 处比色。以纯 7-ADCA 为标准求得裂解液中的 7-ADCA 的含量, 并计算转化率。

6. 7-ADCA 的结晶: 重排酸裂解液, 用 6N HCl 调至 pH2.5 左右, 加入等体积的醋酸丁酯, 放置过夜, 弃去上部醋酸丁酯, 再用 2N NaOH 调至 pH 3.7, 抽滤其结晶, 再用丙酮提取二次, 获得 7-ADCA 结晶, 干燥、称重、计算重量收率。

实验结果

(一) 有机溶剂对细胞酶活力的影响

为了考察固定化过程中有机溶剂对细胞酶活力的影响, 对使用有机溶剂进行了比较。

称取一定量的湿细胞, 分别用不同有机溶剂处理一定时间, 除去有机溶剂后, 用蒸馏水洗并制成细胞悬浮液, 测定剩余的酶活力。同样方法用蒸馏水处理的细胞测得酶活力为 100%。从图 1 可以看出, 甲苯、三氯甲烷、石油醚对细胞酶活力毫无影响; 丙酮处理 15 分钟后, 细胞酶活力丢失 20% 左右。因此, 采用三醋酸纤维素为包埋载体是合适的。其溶剂为三氯甲烷, 凝固剂为甲苯或石油醚。

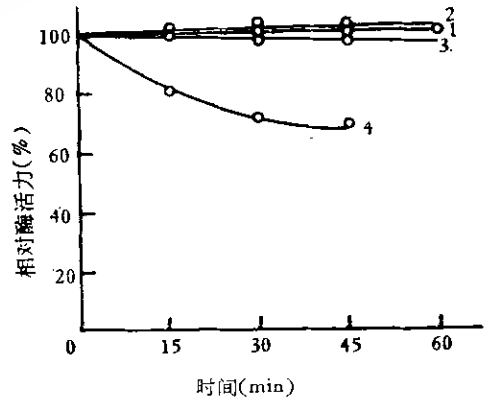


图 1 有机溶剂对细胞酶活力的影响

1. 三氯甲烷 2. 甲苯 3. 石油醚 4. 丙酮

(二) 三醋酸纤维素包埋大肠杆菌 AS1.76 细胞的最适条件

1. 三醋酸纤维素浓度对包埋细胞的影响, 1g 三醋酸纤维素制成不同浓度的溶液, 包埋 12g 湿细胞。实验结果表明, 包埋细胞的表现活力及活力收率随纤维素浓度的减少而增加,

包埋收率则趋于下降。这是由于孔径大小影响所致。考虑到包埋细胞不会漏出,又有较好的表现活力及活力收率,采用5%浓度为宜(图2)。

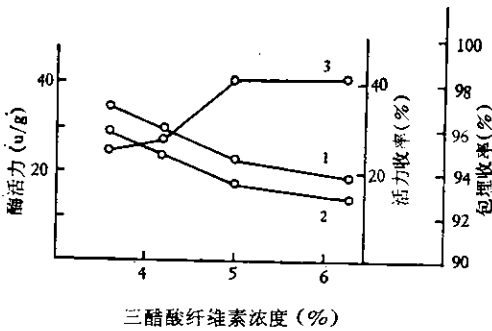


图2 三醋酸纤维素浓度对包埋细胞的影响

1. 包埋细胞的表现活力 2. 活力收率 3. 包埋收率

2. 包埋细胞量对包埋细胞活力的影响

5%浓度的三醋酸纤维素20ml,分别包埋不同重量的湿细胞。如图3所示,随着细胞量的增加包埋细胞表现活力也增加。但包埋16g以上的湿细胞时,表现活力增加的不多,而收率趋于减少,因此,选择1g三醋酸纤维素包埋16g湿细胞。

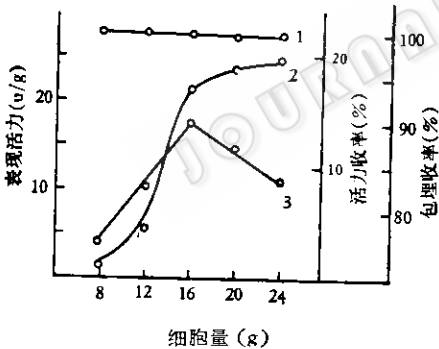


图3 包埋细胞量对包埋细胞活力的影响

1. 包埋收率 2. 表现活力 3. 活力收率

(三) 包埋细胞的性质

1. 最适温度: 0.2M磷酸盐缓冲液配制5%重排酸溶液20ml,加入0.4g包埋细胞,分别在不同温度下反应30分钟,测定7-ADCA的量并计算相对活力,结果表明,包埋细胞最适温度为55℃。

2. 最适 pH: 0.2M不同pH的磷酸缓冲液配制成5%浓度的重排酸溶液20ml,分别加

0.4g包埋细胞,37℃下反应30分钟,测定7-ADCA的量,计算相对活力,结果表明,包埋细胞的最适pH为7.6。

3. 包埋细胞pH稳定性: 0.4g包埋细胞,悬浮于0.2M不同pH的缓冲液中,于37℃保温24小时,水洗,测定剩余酶活力,计算相对酶活力,结果表明,包埋细胞在pH5.4—8.0范围内较稳定。

4. 包埋细胞的热稳定性: 0.4g包埋细胞,悬浮于20ml磷酸缓冲液(pH7.7)中,在不同温度下保温24小时以后,测定剩余酶活力,计算相对活力。结果表明,包埋细胞在40℃以下相当稳定,40℃以上酶活力开始下降,50℃保温24小时以后仍有50%的酶活力。

5. 保藏稳定性: 三醋酸纤维素包埋细胞,湿态冰箱保存11个月和干态室温存放5个月都没有失活。

(四) 包埋细胞制备7-ADCA的操作稳定性

51g包埋细胞装柱(柱床体积4.6×5.5cm),于37℃将5%的重排酸溶液(pH7.7)循环通过该柱,流速为每分钟50ml。滴加2N NaOH中和释放出的苯乙酸,维持裂解反应所需的pH值,在此条件下,包埋细胞柱裂解重排酸的时间曲线如图4所示。作用3小时,95%以上的重排酸转化为7-ADCA。44天内反复使用40批次,其转化率和7-ADCA的重量收率未见下降,

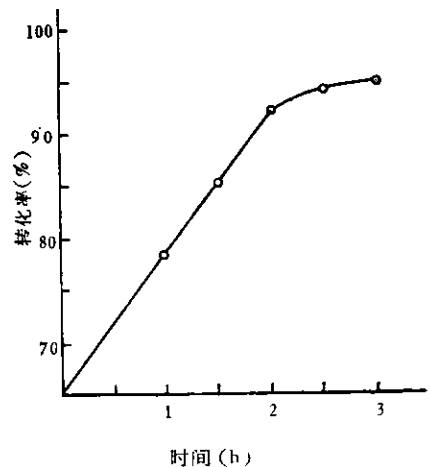


图4 包埋细胞柱裂解重排酸的时间曲线

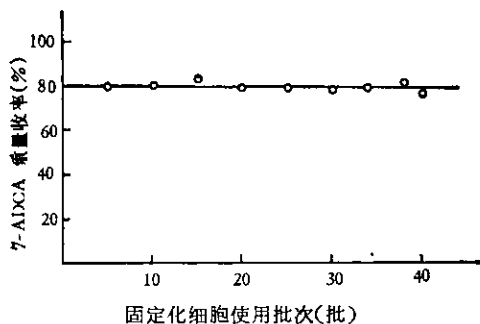


图5 包埋细胞工作稳定性(每5次平均值)

平均重量收率为78%，纯度为95%。可见三醋酸纤维素包埋细胞具有良好的操作稳定性(图5)。

讨 论

三醋酸纤维素包埋大肠杆菌 AS1.76 细胞, 具有较好的机械强度; 无论湿态或干态保存都有较好的酶活力。与洋菜固定化细胞比较, 作

用最适 pH 和温度基本相同, 但对热稳定性有明显差别, 50℃ 保温 24 小时以后前者有 50% 的剩余酶活力, 而后者仅有 8% 左右^[2]。

三醋酸纤维素包埋细胞的表现活力较低, 但裂解重排酸的效率并不低, 作用 3 小时转化率可达 95% 以上, 低的表现活力可能是由于包埋细胞的渗透性较差, 测定时间短(5 分钟), 底物和产物在其孔内的扩散作用受到了更大的限制。三醋酸纤维素包埋细胞的表现活力, 依赖于包埋时纤维形成孔的大小和数目, 这和水份对有机溶剂的比例有关^[4]。

参 考 文 献

- [1] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 302—308, 1979。
- [2] 王祯祥等: 微生物学报, 21(4): 477—481, 1981。
- [3] Merrelli, L. P.: *Pharmaceutacs Soi.*, 57: 219, 1968.
- [4] Marconi, W. and F. Morisi: *Appli Biochem. and Bioeng.*, 2: 219—258, 1979.