

光交联聚氨酯作载体的固定化细胞 产生 α -淀粉酶的研究

贾德民 吴耀根 郭勇 林影

(华南理工大学, 广州)

将可光交联的聚氨酯预聚物与枯草杆菌细胞悬浮液混匀后经紫外光照射交联, 制得固定化细胞, 用于产生 α -淀粉酶。探讨了交联和固定化条件对载体结构和固定化细胞产酶性能的影响, 研究了这种固定化细胞的使用特性。结果表明: 光交联聚氨酯能有效地固定枯草杆菌细胞, 进行正常增殖和产酶; 改变交联和固定化条件能调节载体的孔容、孔径和比表面, 从而调节固定化细胞的产酶性能和其它使用特性; 枯草杆菌经光交联聚氨酯载体固定化后对温度和pH的适应性提高; 在同样条件下, 这种固定化细胞的产酶能力比游离细胞提高约30%, 亦高于用 κ -角叉菜胶作载体的固定化细胞。

关键词 可光交联树脂预聚物; 光交联聚氨酯; 载体; 固定化细胞, α -淀粉酶

可光交联树脂预聚物是国外新近发展的一类新型固定化载体, 具有固定化条件温和、组成和结构可调节、强度高等优点。目前已合成了多种不同结构的预聚物, 用于多种酶和微生物细胞的固定化^[1-3]。

近年来开始重视固定化细胞生产 α -淀粉酶的研究^[4-6], 但未见用光交联树脂作载体的固定化枯草杆菌细胞产生 α -淀粉酶的研究报道。

本文报道用光交联聚氨酯(PCPU)作载体包埋枯草杆菌细胞, 用于生产 α -淀粉酶, 研究了光交联和固定化条件对载体结构形态和固定化细胞性能的影响, 并对PCPU载体固定化细胞的使用特性进行了评估。

材料和方 法

(一) 材料

可光交联聚氨酯预聚物: 自制。其主链为聚醚聚氨酯结构, 末端为含C=C双键

的甲基丙烯酸酯基团。

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis* BF-7658) 华南理工大学生物工程研究所提供。

(二) 固定化细胞的制备

将预聚物配成20—45%水溶液, 加1%光敏剂B, 用高压蒸汽消毒, 冷却到室温后加入枯草杆菌细胞悬浮液, 搅匀后倒入玻璃模框摊平, 用波长365nm、强度66.2mW/cm²的紫外光照射3min, 即得PCPU固定化细胞。用无菌水洗3次, 剪成5×5mm小块备用。

(三) 增殖和发酵

在250ml锥瓶内加入50ml增殖培养基和10—15g PCPU固定化细胞, 放入往复恒温摇床于37°C和110次/min条件下增殖培养20h, 然后用发酵培养基代替增殖培养基, 在同样条件下发酵, 定时取样分析。

增殖培养基组成(%): 麦芽糖3.0,

本文于1987年4月9日收到。

国家科委生物工程开发中心对本工作给予资助, 本院王孟钟教授、彭志英副教授对本工作热情支持特此致谢。

酵母膏 0.5, 蛋白胨 1, K_2HPO_4 0.8, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4, NH_4Cl 1。

发酵培养基组成 (%)：可溶性淀粉 5, 蛋白胨 1, 牛肉膏 2, K_2HPO_4 1, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $CaCl_2$ 0.2。

(四) 分析测定

1. α -淀粉酶活力测定：按 D_{540} 消色法^[7]。在 pH6.0、60°C 条件下，每小时催化 1g 可溶性淀粉成为糊精的酶量为一个酶活力单位。

2. 漏菌量测定：用 581 型分光光度计测定样品在 650nm 波长下的吸光度 A_{650} ，以发酵开始时 (0 小时) 的 A_{650} 为对照，以此表示漏菌量。

3. 细胞存活率测定^[8]：取 6 个直径相同的培养皿，分别加入等体积、等浓度的枯草杆菌细胞悬浮液，在相同条件下用紫外线分别照射不同时间，然后按 10 倍稀释法将各样品稀释，分别涂布在琼脂固体培养基平板上，于 37°C 培养 24h，计算各平板上的菌落数，进而计算细胞存活率：

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{照射后活细胞数}}{\text{照射前活细胞总数}} \times 100\%$$

4. 孔容测定^[9]：使载体在 20°C 蒸馏水中溶胀至平衡，求出每克载体的吸水量，即得孔容 V_p (cm^3/g)。

5. 比表面测定^[9]：采用亚甲基蓝吸附法。把亚甲基蓝染料配成 $5 \times 10^{-2} mg/ml$ 溶液，在 25ml 该溶液中加入 50mg 载体。用 721 型分光光度计测定吸附前后光密度的变化，求得吸附染料的质量 ΔW ，然后通过下式计算比表面 S 。

$$S = 2.45 \times \frac{\Delta W}{W} \quad (m^2/g)$$

式中 W 为样品质量 (g)， ΔW 单位为 mg。

6. 平均孔径测定：由上面测出的 V_p 和

S 值按公式 $\bar{r} = 5V_p/2S$ 计算得出。

7. 电镜观察：用 JOEL JSM-T300 扫描电镜观察载体的形态和细胞的分布与变化。

8. 机械强度测定^[10]：按 GB-1040-79 标准方法在 XLL-100A 型拉力试验机上测定湿态下载体的拉伸强度 (MPa) 和断裂伸长率 (%)，采用 III 型试样。

结果与讨论

(一) 紫外光照射对细胞存活率的影响

由图 1 可见，在固定化所采用的紫外光强度下，照射 3 min，细胞存活率在 90% 以上，表明 BF-7658 枯草杆菌对紫外线有一定的耐受力，在所采用的固定化条件下使细胞保持绝大部分存活是完全可能的。

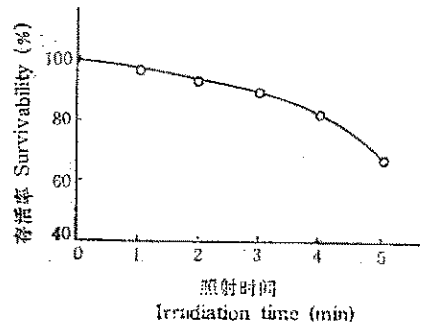


图 1 紫外光照射对枯草杆菌细胞存活率的影响
Fig.1 Effect of irradiation under UV-light on survivability of *Bacillus subtilis* cells
(紫外光强度 $66.2 mW/cm^2$)

(二) 交联和固定化条件对载体结构和固定化细胞性能的影响

1. 预聚物分子量的影响：当预聚物分子量较大时，PCPU 交联点间的分子量 (M_c) 较大，凝胶中聚合物与水的分离和聚集程度较显著，因而形成较大的孔容和孔径，同时比表面减小 (图 2)。这不仅能提供较大的细胞生命活动空间，而且有利于氧气、养分和酶产物的传输，因而

固定化细胞的产酶能力较强。但由于孔径的增大，细胞泄漏也有所增加。

时平均孔径虽略有增加，但漏菌量仍减少，这显然是由于孔数较少的缘故。综合考虑产酶、漏菌和机械强度（见后）。预聚物浓度采用20—30%较适宜。

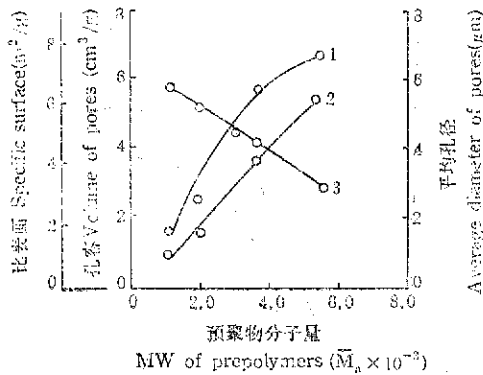


图2 预聚物分子量对PCPU载体结构的影响
Fig. 2 Effect of molecular weight of prepolymer on the structure of the carrier

1. 孔容 Volume of pores 2. 平均孔径 Average diameter of pores 3. 比表面 Specific surface

从产酶能力和漏菌情况综合考虑，使用分子量适中（例如 $M_n = 4450$ ）的预聚物较适宜。

2. 预聚物浓度的影响：图3和4表明，在预聚物浓度20—45%范围内，固定化细胞产酶能力随浓度增加而下降的原因主要是载体孔容和比表面的减少。浓度大

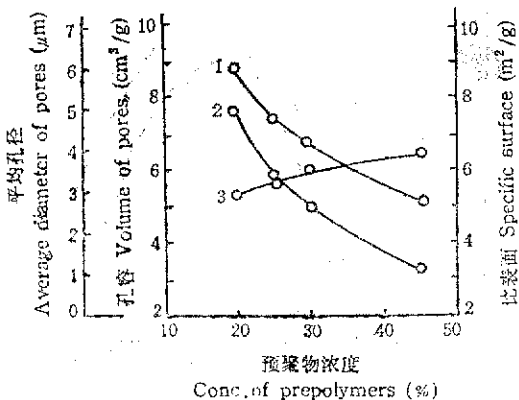


图3 预聚物浓度对PCPU载体结构的影响
Fig. 3 Effect of prepolymer concentration on structure of PCPU carrier

1. 孔容 Volume of pores 2. 比表面 Specific surface 3. 平均孔径 Average diameter of pores

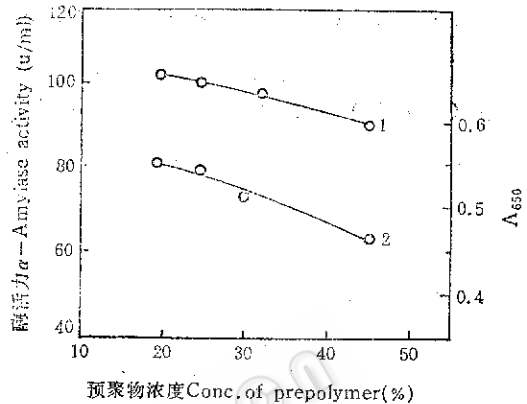


图4 预聚物浓度对PCPU固定化细胞产酶性能的影响
Fig. 4 Effect of prepolymer concentrations on α -amylase activity and cells leakage of PCPU immobilized cells

1. 酶活力 α -Amylase activity 2. 吸光度 Absorbance

3. 成膜厚度的影响：厚度的增加使载体的比表面减少，固定化细胞的产酶量下降（图5）。这是由于厚度的增加使传

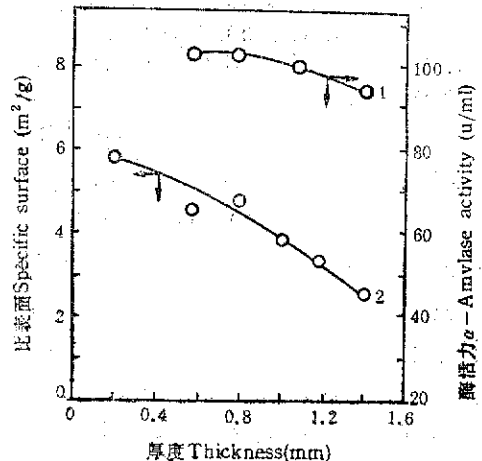


图5 成膜厚度对载体比表面和固定化细胞酶活力的影响

Fig. 5 Effect of film thicknesses on specific surface of the carrier and α -amylase activity of immobilized cells

1. 酶活力 α -Amylase activity 2. 比表面 Specific surface

质面积减少,从而使氧气和营养物供应不良所致。为了提高产酶能力,应尽量降低固定化细胞的成膜厚度。

4. 包埋菌量的影响:由图6可见包埋菌量为4—6%时,PCPU固定化细胞产酶性能最佳。包菌量不足(1—2%)时细胞难以增殖到足够的浓度,包菌量过多(>6%)时,细胞增殖过密,供氧和营养不良,均会导致固定化细胞的产酶能力下降。

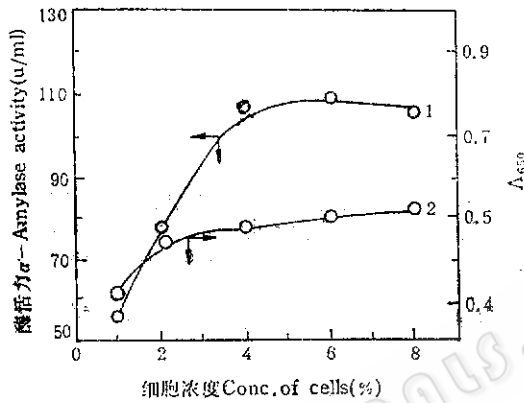


图6 包埋菌量对PCPU固定化细胞产酶性能的影响
Fig. 6 Effect of the amount of entrapped cells on α -amylase activity and the leakage of cells of PCPU immobilized cells

1. 酶活力 α -Amylase activity 2. 吸光度 Absorbance

5. 载体的机械强度:载体的机械强度是影响固定化细胞使用寿命的因素之一。载体的力学性能受预聚物分子量和浓度的影响。预聚物分子量增大,则载体的交联密度减小,因而拉伸强度减小,断裂伸长率增大。预聚物浓度增加,则凝胶中聚合物含量增加,因而拉伸强度增大。

(三) 光交联聚氨酯固定化细胞的使用特性

1. 产酶性能:用活细胞数相同的固定化细胞与游离细胞在同样条件下进行发酵产酶试验,结果表明,PCPU固定化细胞的产酶能力比游离细胞高约

30%,也高于 κ -角叉菜胶载体固定化细胞,且漏菌情况相差不大(图7)。因此可以认为,将PCPU应用于包埋枯草杆菌细胞产生 α -淀粉酶是有优越性的。

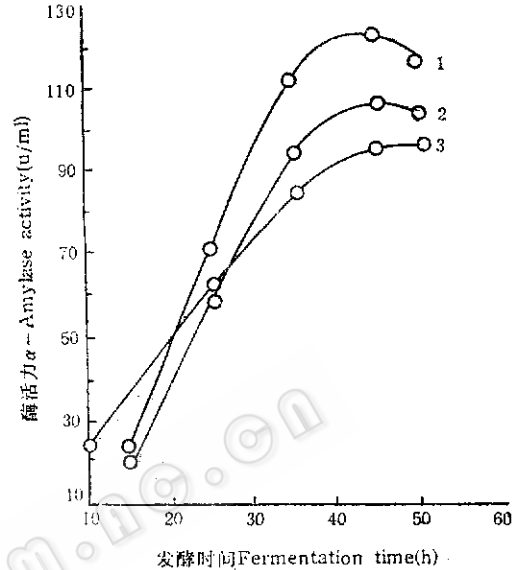


图7 固定化细胞与游离细胞酶活性的比较
Fig. 7 Comparison of α -amylase activity between immobilized cells and free cells
1. PCPU固定化细胞 Immobilized cells with PCPU carrier 2. κ -角叉菜胶固定化细胞 Immobilized cells with κ -carrageenan carrier 3. 游离细胞 Free cells

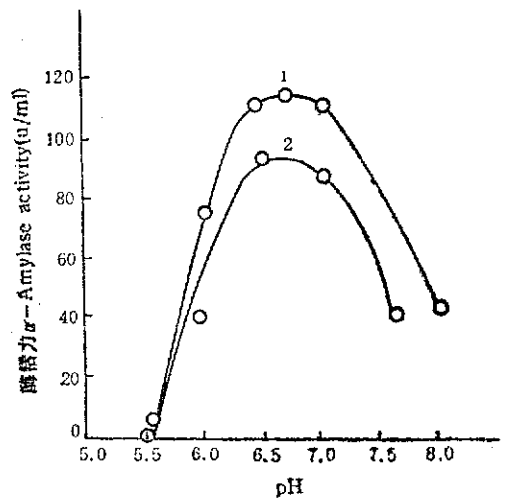


图8 PCPU固定化细胞对pH的适应性
Fig. 8 pH adaptability of PCPU immobilized cells

1. PCPU固定化细胞 PCPU immobilized cells 2. 游离细胞 Free cells

2. 对pH的适应性: 图 8 表明 PCPU 固定化细胞的最适pH值为6.7, 对pH的适应范围比游离细胞扩大, 说明载体的微环境对提高枯草杆菌的 pH 适应性有利。

3. 对温度的适应性: 由图 9 可见, PCPU 固定化细胞与游离细胞的最适温度均为37°C, 但固定化细胞的使用温度范围比游离细胞扩大, 说明载体对细胞有一定的保护作用。

4. 固定化细胞的半连续重复使用: PCPU 固定化细胞在重复使用时仍能有效地产酶。在一次摇瓶半连续发酵试验中, 第一次发酵后酶活力为96u/ml, 第二次 111 u/ml, 第三次 120u/ml。在另一次试验中, 重复使用 7 次后其相对酶活力仍保持在126% (以游离细胞的最佳反应状态的酶活力为100%)。

为了防止杂菌污染, 保证半连续发酵的正常进行, 可加入四环素, 以抑制革兰氏阳性杆菌和球菌等生长。在四环素添加量为500u时, 对杂菌抑制效果较好, 同时不会影响枯草杆菌的生长和产酶。

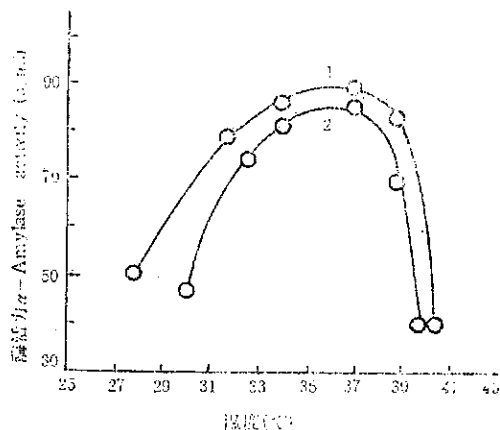


图 9 PCPU 固定化细胞对温度的适应性
Fig. 9 Temperature adaptability of PCPU immobilized cells

1. PCPU 固定化细胞 PCPU immobilized cells
2. 游离细胞 Free cells

(四) 细胞在载体内的状态

扫描电镜观察 (图10) 表明, 载体是一种多孔的、表面很不规整的材料 (a), 细胞被包埋在载体孔穴内并进行生长、增殖和新陈代谢 (b)。特别是在靠近载体表层处, 细胞的生长更为旺盛。

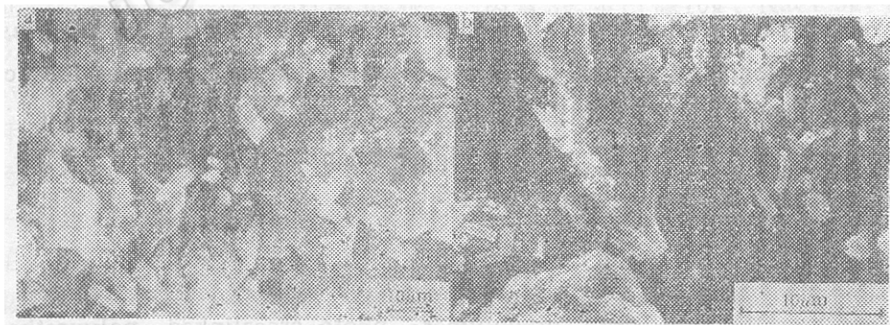


图 10 PCPU 固定化细胞的扫描电镜照片

Fig. 10 SEM photograph of PCPU immobilized cells
(a) 载体表面形态 Morphology of the surface of the carrier
(b) 细胞存在于载体孔穴中 The cells in the pores of the carrier

参 考 文 献

- [1] Fukui, S. et al.: *Biochimie*, 62:381, 1980.
- [2] 园元谦二, 田中渥夫: 发酵工学 (日文), 61(3):153, 1983.
- [3] Fukui, S. & Tanaka, A.: *Adv. Biochem. Engin. Biotech.*, 29:1, 1984.
- [4] Kokubu, T. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5:233, 1978.

- [5] Shinmyo, A. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14:7, 1982.
[6] Lin Ying et al.: *China-Japan Joint Symposium in Applied Microbiology*, p.111, 1986.
[7] 郭 勇: 酶工程, 华南工学院, 广州, p.115—116, 1987.
[8] 无锡轻工学院等: 微生物学, 轻工业出版社, 北京, p.488—489, 1980.
[9] 厦门大学化学系高分子组: 石油化工, (5): 472, 1977.
[10] 浙江省皮革塑料工业公司编: 塑料标准手册, 浙江科学技术出版社 p. 568, 1982.

STUDY ON THE PHOTO-CROSSLINKABLE POLYURETHANE PREPOLYMER AS THE CARRIER OF IMMOBILIZED CELLS PRODUCING α -AMYLASE

Jia Demin Wu Yaogen Guo Yong Lin Ying

(South China University of Technology, Guangzhou)

Bacillus subtilis living cells were entrapped into the photo-crosslinked polyurethane by irradiation under UV-light. After multiplication the immobilized cells can be used to produce α -amylase. The effects of conditions of crosslinking and immobilization on the structure of the carrier and properties of the immobilized cells were investigated. The results show that volume of pores, average diameter of pores and specific surface of the carrier have remarkable effects on the ability of production of α -amylase and other properties of the immobilized cells. These parameters of the carrier can be controlled by changing molecular weights and concentrations of the prepolymers as well as thicknesses of the carrier films. After immobilization the adaptability of *Bacillus subtilis* cells to temperature and pH is increased. In same conditions the activity of α -amylase produced by the immobilized cells is about 30% higher than that produced by free cells, and also higher than that produced by the cells immobilized with κ -Carrageenan carrier.

Key words

Photo-crosslinkable resin prepolymer; photo-crosslinked polyurethane; carrier; immobilized cells; α -Amylase