

SA/CS-CaCl₂/PMCG 微胶囊的生物相容性研究

张立央 关怡新 姚善泾*

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 介绍了一种新型多组份生物微胶囊体系——SA/CS-CaCl₂/PMCG 微胶囊。考察了 PMCG 和 SA/CS-CaCl₂/PMCG 微胶囊体系对大肠杆菌和酿酒酵母生长的影响,并用 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊进行了固定化培养大肠杆菌和酿酒酵母的研究。结果表明,与其它合成聚阳离子类似,PMCG 组分对细胞生长有明显的抑制作用,但是在制胶囊过程中以及在用 SA/CS-CaCl₂/PMCG 微胶囊对大肠杆菌和酿酒酵母培养过程中,都显示了良好的生物相容性,因此作为整个体系来说,该微胶囊可用于微生物细胞的固定化培养。

关键词 SA/CS-CaCl₂/PMCG 微胶囊,细胞固定化,生物相容性

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0709-04

在多种生物物质的固定化技术中,利用形成胶囊将生物物质包埋起来的微胶囊固定化技术,以其制备简单、损耗小、生物相容性好、后处理方便等特性,占有重要地位,一直受到许多研究者的关注^[1]。到目前为止,已开发出了不少生物微胶囊体系,主要有海藻酸钠类、壳聚糖类、聚丙烯酸酯类、琼脂类、纤维素硫酸钠和聚二甲基二烯丙基氯化铵等^[2-5]。

近年来出现的由海藻酸钠(Sodium alginate,SA)/纤维素硫酸钠(Sodium cellulose sulfate,CS)氯化钙(CaCl₂)聚亚甲基二胍·氯化氢(Poly-methylene-co-guanidine-hydrochloride,PMCG)等构成的微胶囊体系,是一种多组份生物微胶囊体系,其中聚阳离子是两种高聚物,由此而增加的可调参数增大了微胶囊制备的自由度,为制备出性能更好的微胶囊提供了空间。从已有的实验结果看^[6,7],该微胶囊是由一层厚约 15~160 μm 的多孔性膜围成的中空微囊,可以为固定化的生物物质提供液态环境,把空间效应减到最小,更符合生物物质的生长要求,正受到研究者的关注。

一个新的固定化体系,除了应该具备良好的化学物理性质外,还必须具有良好的生物相容性,也即该体系不能影响生物物质的正常生长。因此本文通过在培养液中添加单个成囊物质和添加形成的微胶

囊,以及将微生物固定在胶囊内,考察在这些条件下对微生物生长的影响情况,确定该体系的生物相容性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

纤维素硫酸钠(CS)由浙江大学生物工程研究所制备,聚亚甲基二胍·氯化氢(PMCG)购自美国的 Scientific Polymer Products Co.,酿酒酵母和大肠杆菌由浙江大学生物工程研究所保藏,其余试剂均为市售分析纯。

酿酒酵母摇瓶培养基:葡萄糖 20g/L,尿素 3g/L,酵母膏 3g/L, (NH₄)₂SO₄ 5g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5g/L, K₂HPO₄·3H₂O 1g/L, KH₂PO₄ 1g/L。

大肠杆菌摇瓶培养基:胰化蛋白胨 10g/L,酵母提取物 5g/L,氯化钠 5g/L, pH 为 7.0~7.5。

1.2 实验方法

1.2.1 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊的制备 配制 2.0% 的 SA、2.5% CS、1.0% CaCl₂ 和 1.5% PMCG 溶液,灭菌后,将 SA 和 CS 的混合液用注射器滴入 1.0% CaCl₂ 溶液,固化 30min,收集预胶囊,用无菌水洗涤数次后,转入 1.5% PMCG 溶液,搅拌 10min,收集微胶囊,用无菌水彻底洗去残留的 PMCG,经柠檬

酸钠溶液液化后,储存备用。

1.2.2 酿酒酵母或大肠杆菌的固定化 将酿酒酵母或大肠杆菌的菌悬液加入到 SA 和 CS 混合液中,搅拌均匀,按 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊的制备方法,将酿酒酵母或大肠杆菌包埋在 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊内。

1.2.3 葡萄糖含量测定 采用苯酚-硫酸法。

1.2.4 菌浓测定 采用分光光度法。

2 实验结果与讨论

2.1 PMCG 对大肠杆菌、酿酒酵母生长的影响

在构成微胶囊体系的四种物质(SA/CS-CaCl₂/PMCG)中,海藻酸钠是天然多糖,已成为制备微胶囊的常用原料,其生物相容性不容置疑^[8,9],CS 的生物相容性也有文献报道^[10,11],认为对微生物的生长基本无毒害作用,CaCl₂ 则为无机盐,所以这里不再考察这三种组分的生物相容性。一般而言,合成的聚阳离子物质对微生物均有一定的毒害作用,因此,本文重点考察 PMCG 的生物相容性。

在实验中,将已灭菌的 PMCG 按 0.5%、1.5% 的浓度直接溶解于已配制好的培养基中,接入一定量的大肠杆菌或酿酒酵母菌悬液,进行摇瓶培养(大肠杆菌 37℃,155r/min;酿酒酵母 30℃,210 r/min),每隔一定时间取出一定量的培养液进行分析。对大肠杆菌,测定其在 600nm 处的 OD 值,可得到不同 PMCG 浓度下大肠杆菌的生长曲线;对酿酒酵母,则分别测定在 560nm 和 490nm 处的 OD 值,可得到不同 PMCG 浓度下酿酒酵母的生长曲线和耗糖曲线。图 1 为 PMCG 浓度对大肠杆菌和酿酒酵母生长的影响,图 2 为 PMCG 浓度对酿酒酵母耗糖的影响。从图中可看出,在培养基中加入 PMCG 后,大肠杆菌和酿酒酵母基本没有生长,这说明与其它聚阳离子类似,PMCG 对大肠杆菌和酿酒酵母的生长具有毒害作用,在实验范围内,微生物的生长受到了严重影响,从结果来看,PMCG 在浓度达 0.5% 以上后对大肠杆菌和酿酒酵母生长的抑制作用几乎与浓度无关。

2.2 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊对大肠杆菌、酿酒酵母生长的影响

实验中,将无菌条件下制得的一定量微胶囊(部分破碎)加入到已配制好的培养基中,接入一定量的大肠杆菌或酿酒酵母菌悬液,进行摇瓶培养(大肠杆菌 37℃,155r/min;酿酒酵母 30℃,210r/min),每隔

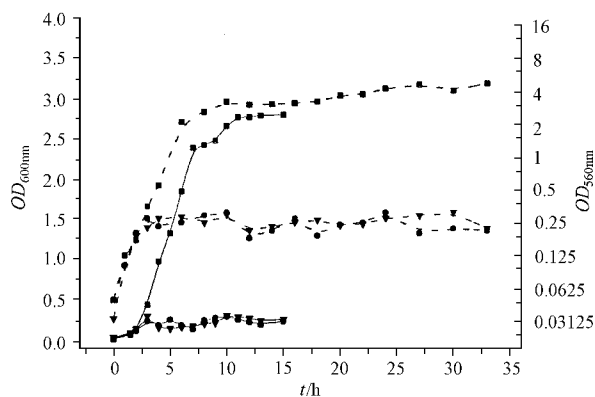


图 1 PMCG 浓度对大肠杆菌和酿酒酵母生长的影响

Fig.1 The effects of PMCG on the growth of *E. coli* and *S. cerevisiae*
■ 0% PMCG ; ● 0.5% PMCG ; ▼ 1.5% PMCG ;
— *E. coli* ; - - - *S. cerevisiae*

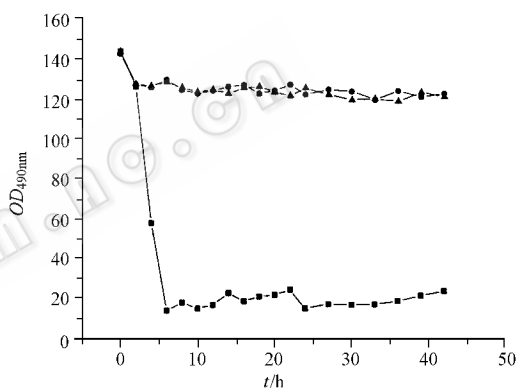


图 2 PMCG 浓度对酿酒酵母耗糖的影响

Fig.2 The effects of PMCG on the glucose concentration in culture of *S. cerevisiae*
■ 0% PMCG ; ● 0.5% PMCG ; ▲ 1.5% PMCG

一定时间取出一定量的培养液进行分析,同样,对大肠杆菌而言,在 600nm 处测定 OD 值,得到大肠杆菌的生长曲线;对酿酒酵母,分别在 560nm 和 490nm 处测定 OD 值,则分别得到酿酒酵母的生长曲线和耗糖曲线。图 3 为空胶囊对游离大肠杆菌和酿酒酵母生长的影响,图 4 的曲线之一表示了空胶囊对游离酿酒酵母耗糖的影响。从图中可看出,在培养基中加入空胶囊后,大肠杆菌和酿酒酵母的生长几乎与对照组没什么区别。说明 PMCG 一旦反应形成微胶囊膜后,其毒性就消失了,这说明微胶囊体系适合于微生物的培养。

2.3 大肠杆菌、酿酒酵母固定化培养与游离培养的比较

将已制备好的包埋有大肠杆菌和酿酒酵母的微胶囊分别接入各自的培养基进行培养,培养条件:大

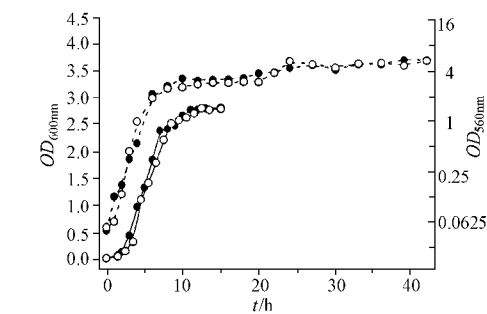


图3 培养液中添加胶囊对大肠杆菌和酿酒酵母生长的影响

Fig.3 The effects of capsules added to medium on the growth of *E. coli* and *S. cerevisiae*

● Without capsules ; ○ Addition of capsules ;
— *E. coli* ; - - - *S. cerevisiae*

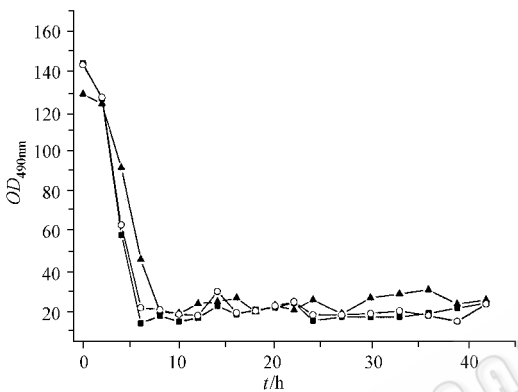


图4 培养液中添加胶囊及酿酒酵母固定化分别对其耗糖的影响

Fig.4 The effects of capsules and immobilization on the consumption of glucose by *S. cerevisiae*

■ Free culture(without capsules) ; ○ Free culture(addition of capsules) ;
▲ Immobilized culture

肠杆菌 37℃、155r/min 酿酒酵母 30℃ 210r/min。定时取样分析。图 5 为大肠杆菌和酿酒酵母微胶囊固定化培养与游离培养时的比较,从图中看出,大肠杆菌和酿酒酵母微胶囊固定化培养和游离培养的生长曲线具有相似的形状,只是在微囊化培养时,大肠杆菌和酿酒酵母的对数生长期延长,且最终菌浓略低于游离培养的情况。

图 4 曲线之一为酿酒酵母微胶囊固定化培养与游离培养时耗糖的比较。从图中结果可以看到,两者耗糖曲线的形状是近似的,只是微胶囊化培养的酿酒酵母耗糖速率略低于游离培养的酿酒酵母,其耗糖终点比游离培养的要滞后一些,且其残糖浓度要略高于游离培养的残糖浓度。

上述实验结果还可以从本实验微胶囊形成过程

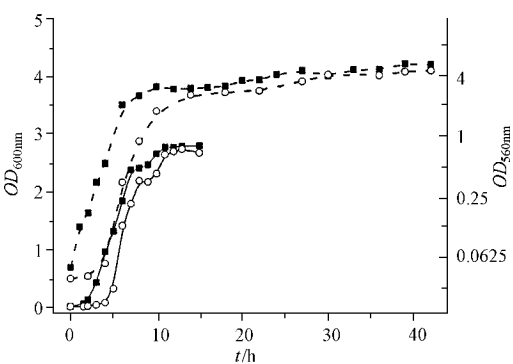


图5 大肠杆菌和酿酒酵母微胶囊固定化培养与游离培养生长曲线的比较

Fig.5 Comparison of the growth of *E. coli* and *S. cerevisiae* in free culture with immobilized culture

■ Free culture ; ○ Immobilized culture ;
— *E. coli* ; - - *S. cerevisiae*

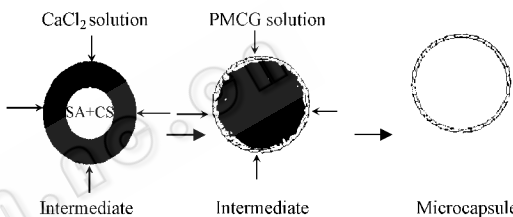


图6 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊形成过程示意图

Fig.6 The process of the formation of SA/CS-CaCl₂/PMCG microcapsule

加以解释。图 6 为微胶囊形成过程示意图,在制备过程中,先将 SA 和 CS 的混合液滴入 CaCl₂ 溶液,反应 30min,形成实心微胶囊,然后,将实心微胶囊转入 PMCG 溶液中,经 PMCG 与 SA 和 CS 的快速界面反应,在实心微胶囊周围形成一层很薄的膜,约 10min 后,PMCG 与 SA 和 CS 在膜的附近全部反应,形成外面覆盖有一层膜的实心微胶囊,一方面,由于小分子物质 Ca²⁺ 的竞争作用,聚阳离子 PMCG 很难进入微胶囊的内部,另一方面,这层膜虽然很薄,但比较紧密,不能透过大分子的 PMCG,因此在微胶囊囊内空间就不存在 PMCG,粘附在微胶囊外壁的 PMCG 则可通过反复洗涤去掉,不会对囊内的微生物产生不良影响。

3 结 论

上述实验结果表明,在大肠杆菌和酿酒酵母培养液中直接加入 PMCG(浓度在 0.5% 以上),微生物生长会受到严重抑制,但是,若加入已制备好的微胶囊,微生物生长基本不受影响。与游离细胞培养相

比,大肠杆菌和酿酒酵母在 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊中,对数生长期略有滞后,生长过程相似,且最终菌浓略有降低。因此,作为整个体系来说,新型的 SA/CS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊可望发展成为一种有发展前途的微生物固定化方法。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Jen C R , Hancher D J . Review :Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* , 1996 , **50** :357 ~ 364
- [2] Lim F , Sun A M . Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* , 1980 , **210** :908
- [3] Sefton M V , Dawson R M , Broughton R L . Microencapsulation of Mammalian Cells in a Water - insoluble Polyacrylate by Coextrusion and Interfacial Precipitation. *Biotechnology and Bioengineering* , 1987 , **29** :1135 ~ 1143
- [4] ZHANG H Y (张惠勇) , MEI L H (梅乐和) , YAO S J (姚善泾) . Cultivation of Encapsulated yeast cells in NaCS - PDMDAAC poly-electrolyte complexes. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 1999 , **15** (3) :165 ~ 170
- [5] Yao S J . Improved Process for Preparation of Sodium Cellulose Sulfate. *Chemical Engineering Journal* , 2000 , **78** (2 ~ 3) :199 ~ 204
- [6] Hunkeler D , Prokop A , Powers A *et al.* . A screening of polymers as biomaterials for cell encapsulation. *Polym News* , 1997 , **22** :234 ~ 240
- [7] Wang T G . New technologies for bioartificial organs , *Artif. Organs* , 1998 , **22** (1) :68 ~ 74
- [8] Prakash S , Chang T M S . Preparation and *in vitro* analysis of micro-encapsulated genetically engineered *E coli* DH5 cells for urea and ammonia removal. *Biotechnology and Bioengineering* , 1995 , **46** :621 ~ 626
- [9] David A R , Charles E G , Bonita A G . Improved organic acid production by calcium alginate immobilized propionibacteria. *Enzyme and Microbial Technology* , 1998 , **22** :409 ~ 414
- [10] YAO S J (姚善泾) . Study on biocompatibility in a new biomicrocapsule system , *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 1998 , **14** (2) :193 ~ 197
- [11] Forerster M , Mansfeld J , Dautzenberg H , Schellenberger A . Immobilization in polyelectrolyte complex capsules :encapsulation of a gluconate - oxidizing *Serratia marcescens* strain. *Enzyme Microbial Technol* , 1996 , **19** :572 ~ 577

Biocompatibility of SA/CS-CaCl₂/PMCG Microcapsule in Cell Culture

ZHANG Li-Yang GUAN Yi-Xin YAO Shan-Jing*

(Department of Chemical and Biochemical Engineering , Zhejiang University , Hangzhou 310027 ,China)

Abstract A novel multi-components microcapsule—SA/CS-CaCl₂/PMCG system was introduced. The effects of PMCG and SA/CS-CaCl₂/PMCG microcapsules on the growth of free *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* were studied respectively. In addition , the growth of immobilized *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* were also investigated. The results showed that Just like other synthetic polycations , PMCG above certain concentration(0.5%) strongly inhibited the growth of free *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* , but SA/CS-CaCl₂/PMCG microcapsules almost had no effects on their growth and on the consumption of glucose concentration by *Saccharomyces cerevisiae* . What 's more , immobilized *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* grew almost as normally as free cultivation. As a whole , SA/CS-CaCl₂/PMCG microcapsules had good biocompatibility and can be used as a new immobilization system.

Key words SA/CS-CaCl₂/PMCG microcapsule , immobilization , biocompatibility

Received : 07-05-2002

This work was supported by National Natural Science Foundation of China(No.20076042) and Foundation for University Key Teacher by the Ministry of Education(No.20010335036) .

* Corresponding author. Tel : 86-571-87951982 ; Fax : 86-571-87951015 ; E-mail : yaosj@che.zju.edu.cn