

新型生物微胶囊体系的生物相容性研究

姚善泾

(浙江大学化工学院生物化工系 杭州 310027)

摘要 一种由硫酸纤维素钠(NaCS)和聚二丙烯基二甲基氯化铵(PDADMAC)形成的新型生物微胶囊已开始被用于生物物质的固定化。根据生物物质生长的情况,考察了这两种固定化材料各自对微生物和动物细胞生长的副作用及由 NaCS 和 PDADMAC 形成的微胶囊对微生物细胞生长的影响。实验结果表明这个新微胶囊体系具有良好的生物相容性。

关键词 硫酸纤维素钠,聚二丙烯基二甲基氯化铵,生物相容性,生物微胶囊,固定化
学科分类号 Q939.97

硫酸纤维素钠(Sodium cellulose sulfate, 简称为 NaCS)和聚二丙烯基二甲基氯化铵(Ploy-diallyl-dimethyl-ammonium chloride, 简称为 PDADMAC)形成的微胶囊是最近出现的一种新型固定生物物质的方法^[1~4]。前者为聚合物阴离子,后者为聚合物阳离子。当 NaCS 水溶液滴入含有 PDADMAC 的水溶液中时,NaCS 将立即与 PDADMAC 发生快速反应,形成厚约 20~100 μm 半透膜的胶囊。如果将生物物质(如酶、微生物、动植物细胞等)混于 NaCS 水溶液或者在制备中掺入其中,这些生物物质就会被这层半透膜包埋在胶囊中间被固定化。这种由空心小球给固定的生物物质液态的生活环境,比海藻酸-Ca 离子体系或 κ -卡拉胶离子体系等实心胶体更符合生物物质生长要求,因而倍受重视。

一个新的固定化体系,必须具有比较好的化学物理性质、较高的机械强度等以外,还必须考察该体系与生物物质的相容性,也即所用的固定化材料适应生物物质正常生长的性质。本文研究了单个材料和已形成的固定化胶囊对生物细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

NaCS 为柏林工业大学生物技术研究所提供^[5],平均聚合度为 1400,取代度为 0.4; PDADMAC 的型号为 T-921126,由德国 Teltow 高分子化学研究所提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 11775)、假丝酵母(*Candida bombicola*, ATCC 22214)、黑曲霉(*Aspergillus niger*, DSM 823)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, IFG-SA-07180)、Stamm 176/1 和麦角菌(*Claviceps purpurea* D1-nic)均由柏林工大生物技术研究所保藏;杂交瘤细胞(Hybridome-cell, Anti-CB03)为柏林洪堡大学免疫学研究所提供。各培养基根据一定的要求配制,所用化学品都是分析纯。

国家自然科学基金资助项目(批准号:29676039)。

收稿日期:1997-03-10,修回日期:1997-10-20。

1.2 实验方法

在各种生物细胞的培养液中分别加入 NaCS 和 PDADMAC 后,考察由于 NaCS 和 PDADMAC 的介入而引起的生物细胞生长规律的变化,可以确定这两种化合物给它们带来的副作用或被损害程度。

1.2.1 PDADMAC 对微生物细胞生长的影响: 在试验中将 PDADMAC 的浓度范围定为 0.0%~6.6% (制备胶囊的浓度为 1.0%~4.0%)。按一定比例将 PDADMAC 直接溶于已配制好的培养基中,进行高温灭菌处理(120℃、30min)后待用。取出 5ml 已培养到对数生长期的微生物溶液,接入上述含有 PDADMAC 的培养基中,放置于摇床上(转速 150 r/min),定时取出 1ml 样品,在高速离心机上离心分离 15min,用蒸馏水洗涤多次,于 105℃ 下干燥至恒重,称其重量,就可确定该时间下的微生物浓度,以得到不同 PDADMAC 浓度下各种微生物的生长曲线。

1.2.2 NaCS 对微生物细胞生长的影响: 用于制备胶囊的 NaCS 浓度为 2.0%~4.5%。由于 NaCS 的水溶液是高粘度流体,使得培养液在摇床中流动困难,这里采用以 NaCS 和琼脂为混合半固体培养基的方法。将一定量的 NaCS 溶于水中,然后与预先配好的培养液连同琼脂放入该溶液中充分混合,高温灭菌(120℃, 30min),再将这些混合液滴入琼脂板上。经预培养的菌种接入带有计数框的琼脂板上,保湿培养一定时间后,经稀释后在显微镜下读数。

1.2.3 NaCS-PDADMAC 胶囊对微生物细胞生长的影响: 这里以麦角菌 *Dl-nic* 发酵为例。麦角菌 *Dl-nic* 直接加入含有 NaCS 的培养基,并将这些溶液在胶囊制备装置^[6]中滴入 PDADMAC 溶液,制成中间为麦角菌 *Dl-nic*,周围为 NaCS-PDADMAC 膜的胶囊。30min 后取出这些胶囊,迅速洗净,放入培养液中,经过一定时间的培养,检测麦角菌 *Dl-nic* 细胞含量和代谢产物麦角生物碱(Ergotalkaloid),可确定 NaCS-PDADMAC 胶囊对麦角菌 *Dl-nic* 生长的影响。

2 结果与讨论

2.1 PDADMAC 对微生物细胞生长的影响

2.1.1 假丝酵母、酿酒酵母和大肠杆菌: 实验中配制了含有不同浓度 PDADMAC 的培养基,分别将 *C. bombicola*、*S. cerevisiae* 和 *E. coli* 置于其中,在摇床上培养,温度为 26℃,定时取样,离心洗涤干燥后,测定其细胞干重,得到了细胞的浓度变化实验结果见表 1。显而易见,在培养液中加入了 PDADMAC,对这 3 种微生物细胞生长的影响不大。

2.1.2 黑曲霉(*A. niger*): PDADMAC 浓度的取值与上面的相同。由于 *A. niger* 的菌丝较长,在溶液中分布不均匀,取样会产生相当误差。因此,将 PDADMAC 混于琼脂中培养 *A. niger*,观察其菌落的半径大小来确定 *A. niger* 的生长情况。图 1 示出了其实验结果。从图中可知,随着 PDADMAC 浓度的增加,菌落半径增加速度放慢,说明微生物的生长速度减慢。PDADMAC 对 *A. niger* 生长的影响,随浓度的增加而增大。

2.2 NaCS 的影响

考察了 NaCS 对 3 种微生物(*C. bombicola*, *S. cerevisiae*、*E. coli*)的生长情况,结果见

表1 假丝酵母、啤酒酵母、大肠杆菌在含 PDADMAC 培养基中的生长
Table 1 The growth of *C. bombicola*, *S. cerevisiae* and *E. coli* in medium containing different concentration of PDADMAC

Strains	t/min	Conc. of cell/g·L ⁻¹					
		Conc. of PDADMAC/%					
		0.0	0.5	1.1	2.2	4.4	6.6
<i>C. bombicola</i>	0	5.0	4.80	4.85	4.80	4.75	4.90
	30	5.52	5.40	5.65	5.70	5.67	5.66
	70	5.60	5.70	5.80	6.00	5.75	5.90
	120	6.55	6.58	6.60	6.77	6.85	6.58
	150	7.20	7.21	7.16	7.16	7.21	6.90
<i>S. cerevisiae</i>	0	1.50	1.48	1.50	1.50	1.50	1.50
	30	1.70	1.68	1.68	1.68	1.68	1.68
	60	2.13	1.92	1.92	1.97	2.05	2.10
	90	2.40	2.30	2.30	2.34	2.34	2.31
	120	2.75	2.75	2.78	2.75	2.77	2.75
	150	3.20	3.15	3.15	3.18	3.28	3.20
<i>E. coli</i>	0	0.95	0.95	0.95	1.00	0.85	1.05
	30	1.08	1.11	1.15	1.25	1.15	1.20
	60	1.35	1.35	1.32	1.35	1.25	1.42
	90	1.41	1.51	1.50	1.55	1.50	1.55
	120	1.80	1.81	1.78	1.76	1.78	1.70
	150	2.65	2.85	3.00	2.85	2.90	2.70

表2。表列数据是在含有 NaCS 琼脂板上的菌落数,培养时间为 60min。为了便于菌落数控制在 $3 \sim 10 \times 10^2$ 范围内,在数菌落数前,先把培养物稀释。NaCS 的浓度定为 4.4%。表中数据表明,NaCS 对这 3 种微生物几乎没有影响。

表2 NaCS 对微生物生长的影响

Table 2 Effect of NaCS on the growth of the microorganisms

	<i>S. cerevisiae</i>		Dilute times	<i>C. bombicola</i>		Dilute times	<i>E. coli</i>	
	NaCS/%			NaCS/%			NaCS/%	
Dilute times	0	4.4		0	4.4		0	4.4
10 ³	295	289	10 ⁴	454	457	10 ⁷	151	145
10 ⁴	21	18	10 ⁵	44	47	10 ⁸	14	16

2.3 NaCS、PDADMAC 对杂交瘤细胞培养的影响

类似于前面的方法分别考虑 NaCS、PDADMAC 对杂交瘤细胞培养的影响。培养基分别为磷酸盐缓冲液(PBS)、含有 3% NaCS 的 PBS 液和含有 1.8% NaCS 的细胞培养基

质,含有 2%PDADMAC 的 PBS 液和含有 2%PDADMAC 的细胞培养介质。杂交瘤细胞分别在上述 5 种培养基中,置于摇床中培养,定期取样观察细胞的死亡情况,结果分别示于图 2 和图 3 中。由于图中数据可知,杂交瘤细胞的死亡速率在含有 NaCS 或 PDADMAC 的溶液内比在不含这两种物质的溶液内要大一些,说明 NaCS 或 PDADMAC 对杂交瘤细胞的生存有一定影响。

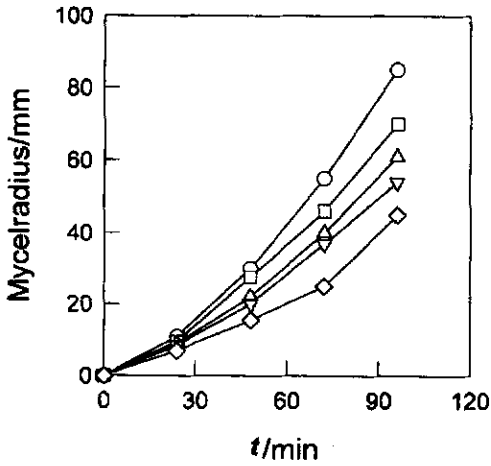


图 1 黑曲霉在含 PDADMAC 培养基中的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *A. niger* in media containing PDADMAC
PDADMAC concentration: ○0%; □1.1%; △2.2%; ▽4.4%; ◇6.6%

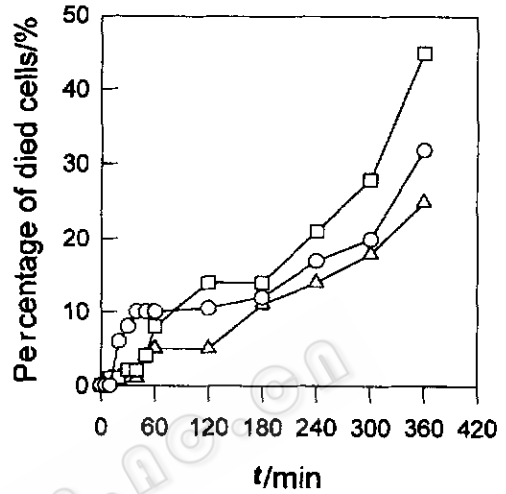


图 2 杂交瘤细胞在含 NaCS 溶液中死亡率

Fig.2 The died curve of hybridoma cell in solutions containing NaCS
△In PBS; □in PBS of 3% NaCS; ○In media of 1.8% NaCS

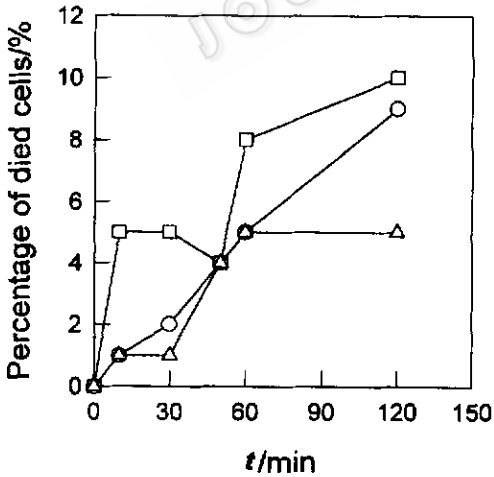


图 3 杂交瘤细胞在含 PDADMAC 溶液中的死亡率

Fig.3 The died curve of hybridoma cell in solutions containing PDADMAC
△In PBS; □In PBS of 2% PDADMAC; ○In media of 2% NaCS;

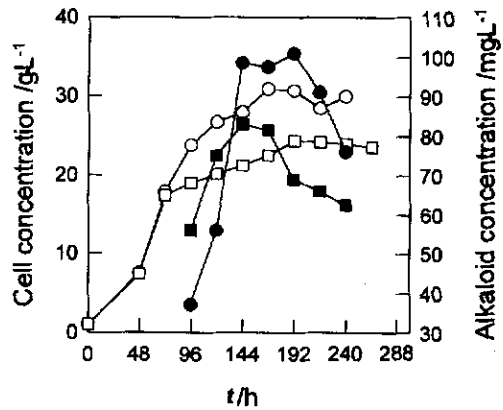


图 4 游离和固定化 *C. purpurea* D1-nic 细胞的生长曲线和其代谢产物生物碱的增长曲线

Fig.4 The growth curve of *C. purpurea* D1-nic and the increase curve of ergotalkaloid
○Cell conc. in free; □Cell conc. in immobili.; ●Alkaloid conc. in free; ■Alkaloid conc. in immobili.

2.4 NaCS-PDADMAC 胶囊对 *C. purpurea* D1-nic 细胞生长的影响

对麦角菌 D1-nic 生长的影响实验在摇床中进行,分两组试验,第一组为游离细胞培养,第二组为把麦角菌 D1-nic 固定 NaCS-PDADMAC 微胶囊中进行培养(固定化方法类似于杂交瘤细胞),在 26℃ 的恒温室内培养,定时取出样品,分析微生物浓度(干重)和产物浓度变化。经过 10d 的培养,得到了图 4 所示的结果,从图中数据可知,麦角菌 D1-nic 的生长曲线在游离细胞和固定化培养中具有相同的形状,所不同的是游离细胞的总浓度稍高于固定细胞培养,产物的浓度变化也有类似的情况。从某种意义上说,这种降低可能是受胶囊的传递性质的影响所致。

3 结 语

实验结果表明,作为新的固定化材料 NaCS 和 PDADMAC 除其优良的形成胶囊性质以外,还具备了良好的生物相容性,它们对所测试的微生物,除了个别以外(如 PDADMAC 对 *A. niger*),对抑制微生物正常生长的现象不严重。但在动物细胞培养中,由于动物细胞对培养环境的高度敏感性,NaCS 和 PDADMAC 的介入,还是会产生比较明显的影响,但是还会使动物细胞生长。因而,这一研究结果显示,该微胶囊体系有可能在微生物及部分动物细胞的培养中得于应用。

致 谢 本文的部分研究工作得到了柏林工业大学生物技术研究所 Buchholz 教授多方面的支持,在此表示诚挚的感谢!

参 考 文 献

- 1 Dautzenberg H, Lukanoff B, Manfeld J *et al.* 1992, DE 4 201 050
- 2 Manfeld J, Forster M, Dautzenberg H *et al.* Enzyme Microb Technol. 1991, 13(3):2400
- 3 Lukanoff B, Dautzenberg H. Das Papier, 1994, 6:287
- 4 Yao S J, Cho M G, Buchholz R, Chem Ing Tech, 1993, 65(9):1124
- 5 Yao S J, "Verfahrenstechnische Auslegung Einer Anlage Fuer NaCS-herstellung zur Immobilisierung von Biokatalysatoren", VDI Verlag, Duesseldorf, 1996
- 6 Cho M G, Buchholz R. Chem Ing Tech, 1993, 65(10):1221

Study on Biocompatibility in a New Biomicrocapsule System

Yao Shanjing

(Department of Biochemical Engineering Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract A new type of biomicrocapsule formed from sodium cellulose sulfact (NaCS) and poly-diallyl-dimethyl-ammonium chlorile (PDAD) MAC has been applied in the immobilization of biomass. The adverse effects of both capsule materials on the micro-organisms and animal cells were investigated and the effects of micro-capsule on the growth of some microorganisms was tested. The experimental results were shown that this micro-capsule system has good biocompatibility.

Key words Sodium cellulose sulfate, poly-diallyl-dimethyl-ammonium chloride, biocompatibility, biomicrocapsule, immobilization