第 19 卷第 1 期
2000 年 1 月

无锡轻工大学学报
Journal of Wuxi University of Light Industry

Vol. 19, No. 1
Jan., 2000

文章编号：1009-038X(2000)01-0005-04

PEI 对固定化增殖细胞性质的影响*

江 波， 史 锋， 王 璋
（无锡轻工大学食品学院，江苏无锡 214036）

摘　要：以海藻酸钙为载体包埋黑曲霉 AS0023 孢子，培养后得到的固定化增殖细胞用于生产低聚果糖. 利用材料试验仪研究了聚乙烯亚胺(PEI)对固定化增殖细胞强度的影响，并研究了 PEI 对固定化增殖细胞酶活及最适 pH 值的影响. 结果表明，经 PEI 处理后，尽管固定化增殖细胞酶活略有降低，最适 pH 值由 5.5 降至 4.0，但凝胶强度有明显改善. 起始机械强度由 0.06 N/粒增加到 0.279 N/粒，而机械强度衰减率仅为未处理组的 9.27%.

关键词：聚乙烯亚胺；固定化增殖细胞；机械强度；海藻酸钙；低聚果糖
中图分类号：Q533　　**文献标识码：** A

Effect of Polyethyleinimine on Properties of Immobilized Growth Cells

JIANG Bo, SHI Feng, WANG Zhang
(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: The spores of *Aspergillus niger* AS0023 were entrapped in calcium-alginate gels for growth to form immobilized growth cells which were used for the production of fructooligosaccharides(FOS). The effect of polyethyleinimine(PEI) on the gel strength of immobilized growth cells was measured by Lloyd 1 instrument 1000S. The effects of PEI on its enzyme activity and on the optimum pH were also studied. The results showed that with the treatment of PEI, the gel strength improved obviously, although the enzyme activity of immobilized growth cells decreased a little and the optimum pH changed from 5.5 to 4.0. The initial mechanical strength increased from 0.06 N/bead to 0.279 N/bead, and the decreasing ratio of mechanical strength was 9.27% comparing with the group without treatment of PEI.

Key words: polyethyleinimine; immobilized growth cells; mechanical strength; calcium-alginate; fructooligosaccharides

固定化细胞技术作为一种新的有效的生物工程技术，已用于低聚果糖的研究[1~4]. 海藻酸钙是一种较好的固定化材料，它具有无毒、形成凝胶的方法简单、固定化条件温和、固定化细胞酶活与产量高等优点，但同时它又有凝胶强度不强这个缺点[5~6]. 目前国际上对固定化颗粒强度的研究已取得一定进展[7~9]，而国内还鲜见报道. 虽然海藻酸钙凝胶的机械强度一般能够达到固定化要求，但由

* 收稿日期：1999-05-03；修订日期：1999-11-01.
基金项目：国家科委“九五”科技攻关项目(96-C03-01-01).
作者简介：江波(1962 年 12 月生)，男，江苏无锡人，工学博士，副教授.
万方数据

于反应体系中磷酸盐或柠檬酸盐等对 Ca^{2+} 有螯合作用,二价离子如 Mg^{2+}、Ba^{2+} 等对 Ca^{2+} 有置换作用,因此海藻酸钙的机械强度很快降低.在工业化生产中所用的柱子床体积较大,这时固定化材料的强度就必须足够高.因此有必要提高海藻酸钙的凝胶强度.聚乙烯亚胺(polyethyleinimine,PEI)是一种多功能性的脂肪族胺,具有强化海藻酸钙凝胶珠壁强度的作用,已被用于强化凝胶强度[8~11],而且聚乙烯亚胺无毒,可用于食品工业.因此探讨用聚乙烯亚胺来处理海藻酸钙包埋的固定化增殖细胞,以改善其化学强度,并建立起一套合适的测量凝胶珠强度的方法,即 Lloyd 材料试验仪法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 黑曲霉 AS0023 由作者所在实验室从土壤中选育得到.

1.1.2 培养基 蔗糖175 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,七水硫酸镁 1 g/L,磷酸氢二钾 1 g/L,氯化钙 0.5 g/L.

1.2 实验方法

1.2.1 固定化增殖细胞制备方法 见参考文献[3].

1.2.2 聚乙烯亚胺对凝胶珠的处理方法 将培养好的固定化增殖细胞珠(或海藻酸钙凝胶珠)加入 2.5 倍凝胶珠体积的 2%PEI 溶液中(含 50 mmol/L 钙离子),室温下搅拌过夜,之后用蒸馏水洗 3 次.然后将此固定化增殖细胞加入 2 倍凝胶珠体积的 1%戊二醛溶液中,室温下搅拌 30 s,立刻用蒸馏水洗 3 次.

1.2.3 固定化增殖细胞化学处理条件 将固定化增殖细胞珠(或海藻酸钙凝胶珠)30 粒浸泡于 12.5 mL 0.05 mol/L 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中,室温下放置一定时间后于材料试验仪上测其机械强度,以反映其凝胶强度.

1.3 分析方法

1.3.1 固定化增殖细胞酶活力测定方法 见参考文献[3].

1.3.2 糖含量分析方法 见参考文献[3].

1.3.3 固定化增殖细胞机械强度测定方法 采用 Lloyd 材料试验仪.所用探头直径为 13 mm,在其下方一个直径约 1.5 cm 的盖子内摆 10 粒固定化增殖细胞珠,当探头以 10 mm/min 的行进速度向下压迫凝胶颗粒时,随着凝胶珠由表面被压下 2.5 mm,探头所感受到的凝胶表面压力不断增加,并通过显示屏显示出来.机械强度即探头压迫单珠凝胶颗粒 1 mm 处的压力,每个样均测两次.

2 结果与讨论

固定化增殖细胞(IGC)经聚乙烯亚胺处理后,不仅凝胶强度发生了变化,其酶活也可能有所变化,且由于聚乙烯亚胺是一种聚阳离子,因此经它处理后,固定化增殖细胞的最适 pH 值也会发生移动,对此分别进行了研究.

2.1 聚乙烯亚胺对固定化增殖细胞凝胶强度的影响

将固定化增殖细胞珠用或不用聚乙烯亚胺处理,然后分别将其浸泡于 pH 5.0、0.05 mol/L 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液中,放置一定时间后测其机械强度,从其起始机械强度及机械强度随浸泡时间的衰减率的不同,分析聚乙烯亚胺的作用.它们的起始机械强度是不同的,见表 1.

表 1 起始机械强度表

Tab.1 The table of initial mechanical strength

材 料	起始机械强度/(N/粒)
IGC(经 PEI 处理)	0.279
IGC(无 PEI 处理)	0.060

可见,经聚乙烯亚胺处理后,固定化增殖细胞起始机械强度得到显著改善,提高了 3.65 倍.

接着对比了有无经过聚乙烯亚胺处理的固定化增殖细胞珠的机械强度衰减率,如图 1 所示.由于未经聚乙烯亚胺处理的固定化增殖细胞珠的凝胶强度太低,无法记录探头压迫凝胶珠 1 mm 处的压力,故而改为记录探头压迫凝胶珠 2 mm 处的压力.

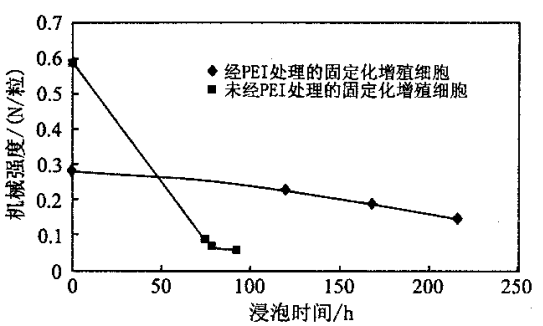


图 1 固定化增殖细胞珠凝胶强度图

Fig.1 Gel strength of immobilized growth cells

曲线 1(经 PEI 处理)的线性回归方程为 $S = 0.286\ 3 - 5.677 \times 10^{-4} t$,相关系数 $R^2 = 0.954\ 5$;

万方数据

线性回归标准偏差 $Y\sigma_{n-1}$为 0.053 87 式中：S——凝胶机械强度(N/粒)；t——浸泡时间(h).

曲线 1 的多项式回归方程为 $S=-2\times10^{-6}t^2-2\times10^{-4}t+0.279\ 2$，相关系数 $R^2=0.999$.

曲线 2(未经 PEI 处理)的线性回归方程为 $S=0.578\ 3-6.170\ 3\times10^{-3}t$，相关系数 $R^2=0.978\ 2$ 线性回归标准偏差 $Y\sigma_{n-1}$为 0.260 5；

曲线 2 的多项式回归方程为 $S=6\times10^{-5}t^2-1.11\times10^{-2}t+0.589\ 1$，相关系数 $R^2=0.999\ 4$.

经 PEI 处理的 IGC 其机械强度衰减率为5.677×10^{-4} N/(粒·h)，而未经 PEI 处理的 IGC 其机械强度衰减率为 $6.170\ 3\times10^{-3}$ N/(粒·h)．即经聚乙烯亚胺处理后，其机械强度衰减率仅为未处理组的 9.27%，IGC 强度得到明显改善.

固定化增殖细胞经聚乙烯亚胺处理后，聚乙烯亚胺依靠其氨基的正电荷与海藻酸钙的负电荷发生静电相互作用，从而于海藻酸钙凝胶网络结构外面包裹上一层碱性膜，既能防止细胞的逸出，又增强了抗螯合能力，提高了其凝胶强度；除此之外，由于体系中还存在有很多细胞，这些细胞中含有蛋白质，使得聚乙烯亚胺能更有效地附着在固定化增殖细胞珠表面，聚乙烯亚胺的氨基与酶的羧基之间形成肽键，从而稳定了聚乙烯亚胺的碱性膜作用．另一种观点是聚乙烯亚胺的氨基经戊二醛作用形成了醛基侧链，从而与酶发生偶合作用．于是，聚乙烯亚胺能够有效地在海藻酸钙表面形成碱性膜，从而使其凝胶强度得到显著改善.

2.2　聚乙烯亚胺对固定化增殖细胞酶活的影响

对于固定化增殖细胞，除了其凝胶强度外，酶活也是它最重要的性质．聚乙烯亚胺虽说能够有效地改善固定化增殖细胞珠的凝胶强度，但只有在酶活没有多大损失的情况下才具有实际意义．因此研究了经 PEI 处理后其酶活的变化，见表 2.

表 2 固定化增殖细胞酶活测定表

Tab.2　The table of enzyme accivity for immobilized growth cells

指标	未经 PEI 处理的 IGC	经 PEI 处理的 IGC
葡萄糖质量分数/%	9.35	5.87
蔗糖质量分数/%	84.20	87.74
蔗果三糖质量分数/%	5.21	4.27
蔗果四糖质量分数/%	1.24	2.12
低聚果糖质量分数/%	6.46	6.39
酶活/(U/粒)	0.43	0.35

万方数据

由表 2 可见，经聚乙烯亚胺处理后，固定化增殖细胞的酶活虽有损失，但损失不大，降低了不到 20%；而蔗果四糖的质量分数甚至更高，总低聚果糖质量分数基本没有变化．因此总的来说，酶活基本没有损失，而且在此低聚果糖质量分数下，经聚乙烯亚胺处理的固定化增殖细胞珠中的葡萄糖质量分数较低，这对最终低聚果糖的生产是很有利的.

2.3　聚乙烯亚胺对固定化增殖细胞最适 pH 值的影响

由于聚乙烯亚胺是一种多功能脂肪族胺，它带有许多亚氨基，因此是一种聚阳离子，固定化增殖细胞经它处理后，由于表面电荷发生了变化，其最适 pH 值也可能发生变化．经聚乙烯亚胺处理的固定化增殖细胞与对照组的酶活与 pH 的关系见图 2 和图 3.

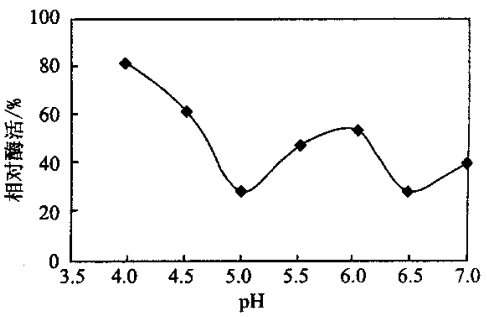


图 2　经 PEI 处理的 IGC 酶活与 pH 关系

Fig.2　The relationship between enzyme activity and pH volue for IGC with the treatment of PEI

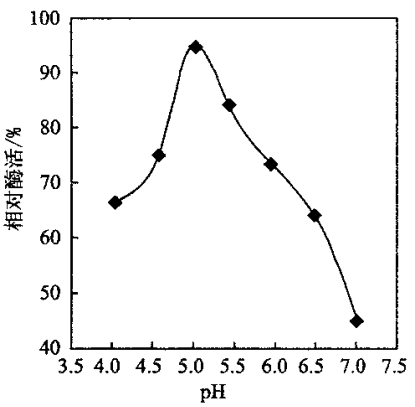


图 3　未经 PEI 处理的 IGC 酶活与 pH 关系

Fig.3　The relationship between enzyme activity and pH volue for IGC without the treatment of PEI

从图 2 和图 3 可以看出，未经聚乙烯亚胺处理的固定化增殖细胞的最适 pH 值为 5.0，而经聚乙烯亚胺处理的固定化增殖细胞珠的最适 pH 值有两个，分别为 pH 4.0(最高峰)及 pH 6.0(次高峰)，pH

6.0时酶活约为最高峰的66%.可见经聚乙烯亚胺处理后固定化增殖细胞的最适pH值发生了酸移.这是由于聚乙烯亚胺是一种多功能性脂肪族胺,带有很多正电荷,当固定化增殖细胞珠外面包裹了这样一层正电荷后,由于氢离子和氢氧根离子在固定化酶的表面和体相溶液中不相等的分布,即氢氧根离子聚集于固定化酶的表面,因此固定化增殖细胞珠表面的pH值就高于体相的pH值,为了使酶表面的pH值达到其最适pH值5.0,则体相的pH值就要低于5.0,因此其最适pH值降低.

3 结 语

固定化增殖细胞经PEI处理后,其酶活略有损失,对低聚果糖的生产影响很小;其最适pH值由5.5降至4.0,并出现次高峰(pH 6.0);但它的凝胶强度却得到明显改善,起始机械强度提高了近4倍,于柠檬酸-磷酸盐缓冲液中机械强度衰减率仅为对照组的9.27%,有益于用固定化方法进行较大规模的连续化生产.

参考文献

[1] HAYASHI S, TUBOUCHI M, TAKASAKI Y, et al. Long-term continuous reaction of immobilized β-fructofuranosidase[J]. **Biotechnol Lett**, 1994, 16(3):227~228

[2] YUN J W, JUNG K H, OH J W. Semibatch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of Aureobasidium pullulans[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1990, 24/25:299~308

[3] 江波. 固定化黑曲霉生产低聚果糖的研究[D],无锡:无锡轻工业学院,1992.

[4] 魏远安,马丽,杨海等.固定化酶法合成蔗果低聚糖的研究[J].食品与发酵工业,1995,(4):12~16

[5] COUGHLAN MICHAEL P, KIERSTAN MAREK P J. Preparation and application of immobilized microorganisms:a survey of recent reports[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1988(8):51~90

[6] 居乃琥.固定化细胞技术研究与应用的现状展望[A].西安:全国固定化生物催化剂学术讨论会,1988.

[7] EIKMEIER H, REHM H J. Stability of calcium-alginate during citric acid production of immobilized Aspergillus niger[J], **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1987, 26:105~111

[8] CHAO K C, HAUGEN M M, ROYER G P. Stabilization of K-carrageenan gel with polymeric amines:Use of immobilized cells as biocatalysts at elevated temperatures[J]. **Biotechnol And Bioeng**, 1986, 28:1289~1293

[9] JOUNG J J, AKIN C, ROYER G P. Immobilization of growing cells by polyethyleneimine-modified alginate[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1987, 14:259~274

[10] BAHULEKAR R, AYYANGAR N R, PONRATHNAM S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1991, 13:858~868

[11] SALTER G J, KELL D B. New materials and technology for cell immobilization[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 1992, 3(2):115~118

(责任编辑:秦和平)

万方数据