

文章编号 1000-5013(2005)04-0408-04

固定化细胞海藻酸钙凝胶内的扩散特性

肖美添^① 黄雅燕^① 郭养浩^②

(^① 华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021; ^② 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要 采用浸入法, 测定葡萄糖、苯乙酮酸和扁桃酸等3种物质在固定化酵母细胞海藻酸钙凝胶内的有效扩散系数。实验结果表明, 相同条件下, 葡萄糖的有效扩散系数 D 。随着海藻酸钠浓度的提高而下降, 优化的海藻酸钠质量分数为 0.02。葡萄糖的有效扩散系数大于扁桃酸和苯乙酮酸。初始包埋量为 $54.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的固定化酵母细胞经增殖 8 h 后, 扁桃酸在胶珠内的有效扩散系数为 $0.36 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, 明显小于未增殖或未包埋细胞。

关键词 固定化酵母细胞, 扩散特性, 有效扩散系数, 海藻酸钙

中图分类号 TS 201.2⁺5; TQ 033; O 636

文献标识码 A

固定化细胞凝胶内的传质行为, 是影响固定化细胞反应特性的重要因素。了解扩散性能, 对改善固定化方法, 具有重要意义。近年来, 国内外开展了许多这方面的研究工作^[1-3]。Tanaka^[4]测定了低分子量的物质在海藻胶珠中的扩散情况, 认为其扩散几乎和在水中的扩散特性相同。Cheetham^[5]等报道蔗糖向海藻胶珠中的扩散速度受海藻酸钠浓度、氯化钙浓度, 以及酵母细胞包埋量的影响。Chai^[6]等测定葡萄糖、乳酸和氨基酸等低分子量底物在海藻酸钙微胶囊和膜的扩散系数 D_m 和 D_1 , 分别比在纯水中小 2%~12% 和 6%~50%。扁桃酸是合成环扁桃酯、羟苄唑、匹莫林等手性药物的重要中间体^[7]。我们已筛选出一酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae* sp.), 对底物苯乙酮酸和苯乙酮酸甲酯皆具有较高的转化活力和光学选择性^[8,9]。固定化细胞用于生物不对称还原反应, 具有产物分离容易、耐底物产物浓度高、能重复使用, 以及适合于连续化生产等特点。本文采用浸入法测定葡萄糖、苯乙酮酸和扁桃酸等3种物质在海藻酸钙凝胶内的有效扩散系数, 为研究固定化细胞不对称合成 *R*-(-)-扁桃酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养剂

酵母菌株由福州大学药物生物技术与工程研究所提供, 培养方法参见文^[8]。

1.2 固定化方法

1.2.1 无包埋细胞海藻胶珠的制备 取一定量海藻酸钠, 按不同比例加入蒸馏水, 加热搅拌, 使之完全溶解。然后, 用注射器滴入到 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液中, 固化后置于冰箱, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下冷藏备用。

1.2.2 包埋细胞海藻胶珠的制备 将含酵母细胞的培养液离心分离($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 并用生理盐水洗涤3次, 称其湿重。然后, 按一定比例加入到海藻酸钠溶液中, 充分搅匀后滴入到 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 的溶液中, 固化后置于冰箱, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下冷藏备用。

1.2.3 固定化颗粒体积和平均直径的测定 取出充分浸润的固化海藻胶珠, 用滤纸吸干表面附着水分。先在量筒内加入一定体积蒸馏水(V_1), 再加入海藻胶珠, 此时, 总体积为 V_2 。所测的海藻胶珠体积为 $V(V = V_2 - V_1)$ 。取20粒胶珠排列成直线, 测其总长度, 计算珠粒的平均直径, 重复3次。

收稿日期 2005-02-11

作者简介 肖美添(1968), 男, 副研究员, 博士, 主要从事手性药物中间体生物合成的研究。郭养浩(联系人), 男, 教授, E-mail: bioeng@fzu.edu.cn

基金项目 福建省科技计划重点基金资助项目(2003H023); 福建省自然科学基金资助项目(E0310019)

1.3 扁桃酸及苯乙酮酸的葡萄糖测定

苯乙酮酸和扁桃酸含量采用高效液相色谱仪测定^[9]; 葡萄糖测定采用苯酚 硫酸法^[10].

1.4 酵母死和活细胞的鉴别与活细胞的计数

(1) 胶珠的溶解. 海藻酸钙凝胶包埋体系, 容易被柠檬酸、磷酸等与钙离子有螯合作用的物质溶解. 取出 10 粒胶珠, 加入 10 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柠檬酸三钠水溶液, 振荡使其完全溶解, 得到酵母细胞的悬浮液. (2) 死、活细胞的鉴别. 取 1 mL 悬浮液, 稀释到合适浓度, 用质量分数为 0.001 吕氏碱性美蓝染色液染色, 在显微镜下鉴别死、活细胞. (3) 活细胞的计数. 采用血球计数法^[11]计数活细胞.

1.5 有效扩散系数的测定

本实验采用浸入法测定有效扩散系数. 把预先不含扩散组分的颗粒放入其已知浓度的溶液中, 记录凝胶颗粒加入时刻(为零时刻). 立即置于磁力搅拌器上快速搅拌, 定时取样测定主体溶液中扩散组分浓度随时间的变化.

1.7 有效扩散系数的数据处理

对于球形颗粒, 不考虑外扩散的影响, 颗粒中的扩散可用微分方程^[5]表示. 可以求得微分方程的分析解, 即颗粒表面浓度为

$$C_s(t) = \frac{C_{s0}}{1+\alpha} \left(1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1+\alpha)\exp(-D_e q_n^2 t/d^2)}{9+9\alpha+q_n^2 \alpha^2} \right), \quad (1)$$

在式(1)中, q_n 为下列方程的非零正解, 即 $\text{tg}q_n = 3q_n/(3+\alpha q_n)$. C_{s0} 和 C_s 分别为主体溶液的起始和某时刻的浓度, n 和 d 分别为珠粒的数目和平均直径(mm); D_e 为物质的有效扩散系数($\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$); α 为溶液体积与珠粒体积比. 对于给定的一组 d , n , α 和 C_{s0} 可假设一 D_e 值, 采用非线性拟合法可算出相应的 $C_s(t)$, 测量值 $C_s(t_i)^{(\text{exp})}$ 与计算值 $C_s(t_i)^{(\text{cal})}$ 的方差和 $R_{ss} = \sum_{i=1}^N (C_s(t_i)^{(\text{exp})} - C_s(t_i)^{(\text{cal})})^2$. 当 R_{ss} 取最小值时, D_e 值即为所求的有效扩散系数.

2 结果与讨论

2.1 海藻酸钠对葡萄糖扩散的影响

海藻酸钠聚合物的浓度是影响溶质在凝胶珠粒内扩散的最重要因素之一. 无包埋酵母细胞, 并且其他固定化条件均相同, 在海藻酸钠的质量分数(w 分别为 0.015, 0.020, 0.025 和 0.035 时(对应图 1 中曲线 1~4, $\alpha = 2.0$, $d = 4.2 \text{ mm}$), 测定葡萄糖在凝胶珠粒内的扩散情况. 主体溶液中的葡萄糖浓度随时间变化, 如图 1 所示. 采用非线性拟合法计算有效扩散系数, 拟合结果如表 1 所示. 葡萄糖在无限稀释水溶液中, 其扩散系数 D_m 为 $4.75 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. 实验结果表明, 凝胶珠粒内的有效扩散系数 D_e 均低于葡萄糖在水中的扩散系数, 且随着海藻酸钠质量分数的升高而降低. 从传质角度看, 海藻酸钠质量分数越小, 越有利于物质的扩散. 高质量分数的聚合物使总体积中能够容纳扩散物质的有效空间变小. 另外, 高质量分数的聚合物分子的不可渗透部分增大了溶质的扩散路径. 质量分数越高, 孔隙率越小, 弯曲因子越大, 有效扩散系数就越小^[5]. 但是, 海藻酸钠的质量分数又会影晌固定化细胞的机械强度. 当海藻酸钠质量分数低于 0.015 时, 固定化颗粒的机械强度太弱, 不易于工业化操作^[4]. 以下实验除有特别说明外, 所有的海藻酸钠质量分数均为 0.02.

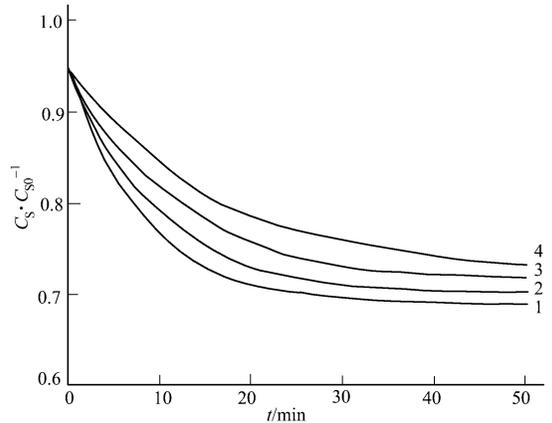


图 1 海藻酸钠质量分数对葡萄糖扩散的影响

表 1 葡萄糖向凝胶珠粒内扩散的 D_e .

w	$D_e / \times 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$
0.015	4.56
0.020	4.04
0.025	3.15
0.030	2.37

2.2 不同扩散物质在固定化颗粒中的扩散

葡萄糖是酵母细胞生长所必需的碳源,是辅酶 NADH 再生循环系统的能量来源,而且反应液的残余葡萄糖质量分数对产物的立体选择性影响极大.葡萄糖在凝胶内的扩散直接影响到还原反应速率的快慢,故本实验选择葡萄糖作为一个考察的扩散组分.苯乙酮酸和扁桃酸分别是还原反应的底物和产物,它们的扩散速率直接关系着还原反应的速率.故选择此 3 种物质作为所要考察的扩散组分,如图 2 所示.图中 $\alpha = 2.0$, $d = 4.2$ mm, 曲线 1~3 分别是葡萄糖、苯乙酮酸和扁桃酸.从图 2 可知,在质量分数为 0.02 的海藻酸钠包埋量,以及相同 d , α 的情况下,葡萄糖的有效扩散系数为 $3.95 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, 苯乙酮酸和扁桃酸的有效扩散系数 ($\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$) 分别为 1.54×10^{-4} 和 1.47×10^{-4} .这是由于苯乙酮酸与扁桃酸的分子量相近,且空间结构相似,电负性和亲水性相同,所以它们在固定化凝胶颗粒中的有效扩散系数相差不大.葡萄糖在胶珠内的扩散阻碍小于苯乙酮酸和扁桃酸,因而它的有效扩散系数比另外两种物质要大.扁桃酸与苯乙酮酸有效扩散系数相近,因而本实验主要研究扁桃酸的有效扩散系数.

2.3 扁桃酸在固定化酵母细胞凝胶珠粒内的扩散

将酵母细胞包埋于凝胶内,会引起凝胶基质密度的不均一,增加了扩散阻力,从而降低生物转化速率.实验中用质量分数为 0.02 的海藻酸胶包埋酵母细胞,细胞初始包埋量 C_c ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 每升固定化颗粒包含的细胞干重) 分别为 23.3, 54.4, 108.9 主体溶液(对应图 3 的曲线 1~3)的扁桃酸质量分数随时间的变化,如图 3 所示.图中 $d = 4.2$ mm, $\alpha = 1.5$. 计算结果如表 2 所示.扁桃酸在固定化酵母细胞珠粒内

$C_c / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	d / mm	$D_e / \times 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$
23.3	4.0	1.32
54.4	4.2	0.71
108.9	4.1	0.27

的有效扩散系数,随细胞包埋量的增加而显著下降.关于溶质在固定化细胞凝胶珠粒中的扩散有多种理论假设^[3],其中一种理论认为细胞对溶质的扩散不具渗透性,或认为溶质在细胞内的有效扩散系数很小.这样溶质在凝胶内的扩散系数就会相应减小.所以,采用固定化细胞进行还原反应,必须选择合适的初始细胞包埋量.

2.4 固定化珠粒内细胞增殖对扩散的影响

在合适的细胞培养环境中,活细胞在海藻酸凝胶内的空隙里仍会繁殖、生长.当细胞增殖一定时间,细胞的增殖与死亡处于动后态平衡状态.在增殖过程中,由于空间效应、分隔效应和传质阻力 3 种因素的影响,细胞在海藻酸钙凝胶珠粒内往往形成不均匀分布,这种分布会影响酵母细胞不对称还原反应的转化速率和立体选择性.因此,有必要研究细胞增殖对固定化细胞凝胶内扩散系数的影响.采用初始细胞包埋量为 $54.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的固定化颗粒,在葡萄糖质量分数为 0.01~0.02 的反应培养基中进行增殖实验,如图 4 所示.图中取不同增殖时间、大小均匀的固定化颗粒 10 粒,溶解在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸三

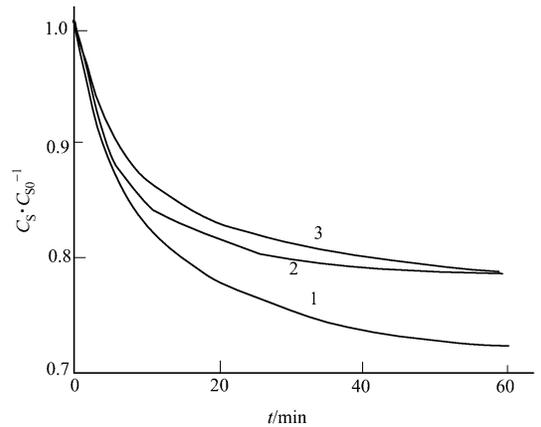


图 2 不同物质在固定化颗粒中的扩散

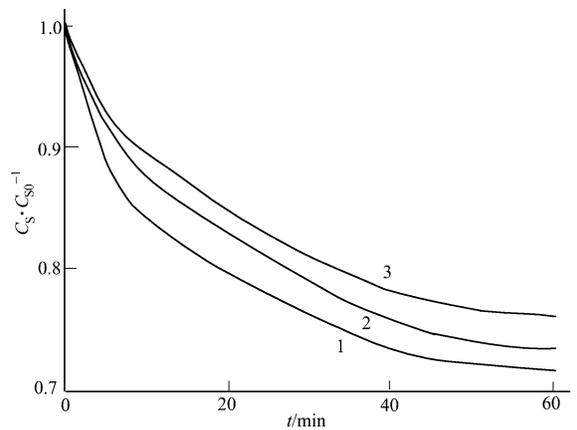


图 3 细胞包埋量对扁桃酸扩散影响

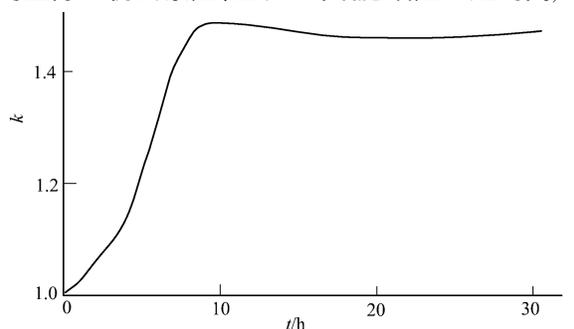


图 4 固定化珠粒内细胞的生长曲线

钠溶液中, 采用血球计数法计数并判别细胞死亡. 实验发现在增殖过程中有细胞死亡, 细胞增殖比例(k). 从图4可以看出, 固定化凝胶珠粒内的细胞在经过8h左右的增殖基本达到平衡; 从8h到30h阶段, 可以认为细胞生长和自溶处于一种动态的平衡状态, 凝胶内细胞质量分数几乎不变. 固定化细胞增殖对扩散的影响结果, 如表3所示. 从表3可看出, 增殖8h后固定化细胞凝胶的 D_e 明显比未包埋或未增殖时小. 据文[3]报道, 细胞增殖大多数处于颗粒外表层, 其细胞质量分数要远大于内部质量分数, 扩散物质在通过外表层时的阻力比未增殖均匀分布时增大, 有效扩散系数显著下降. 增殖8h后扁桃酸的有效扩散系数为 $0.36 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$.

表3 固定化细胞增殖对有效扩散系数 D_e 的影响

细胞	d/mm	$D_e/10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$
未包埋细胞	4.2	1.47
未增殖	4.2	0.71
增殖8h	4.4	0.36

3 结束语

研究基质在海藻酸钙凝胶内扩散性能, 得知固定化条件中海藻酸钠最优质量分数为0.02. 在相同条件下, 葡萄糖的有效扩散系数大于扁桃酸和苯乙酮酸; 细胞包埋质量分数越高, 扁桃酸的有效扩散系数越小. 初始细胞包埋量为 $54.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 固定化细胞增殖8h后, 凝胶内细胞质量分数达到稳定. 此时, 扁桃酸的有效扩散系数为 $0.36 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, 明显比未包埋或未增殖时小.

参 考 文 献

- 1 Handrikova G, Stefuca V, Polakovic M, et al. Determination of effective diffusion coefficient of substrate in gel particles with immobilized biocatalyst[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18(1): 581~ 584
- 2 Carballeira J D, Alvarez E, Sinisterra J V. Biotransformation of cyclohexanone using immobilized *Geotrichum candidum* NCYC49 Factors affecting the selectivity of the process[J]. *J Mol Catal (B): Enzym*, 2004, 28: 25~ 32
- 3 Wang D I C. Recent advances in immobilized cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 38: 261~ 269
- 4 Tanaka H, Matsumara M, Veliky I A. Diffusion characteristics of substrates in calcium alginate gel beads[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 26(1): 53~ 58
- 5 Pu H T, Yang R Y K. Diffusion of sucrose and yohimbine in calcium alginate gel beads with or without entrapped plant cells[J]. *Biotech Bioeng*, 1988, 32(1): 891~ 896
- 6 Chai Yi, Mei Lehe, Lin Dongqiang, et al. Diffusion coefficients in intrahollow calcium alginate microcapsules[J]. *J Chem Eng Data*, 2004, 49: 475~ 478
- 7 Challener C A. 手性中间体手册(影印版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 502
- 8 黄雅燕, 肖美添, 李忠琴, 等. $R(-)$ 扁桃酸脱氢酶产生菌的筛选[J]. *药物生物技术*, 2003, 10(4): 223~ 225
- 9 肖美添, 黄雅燕, 盛军, 等. 生物不对称合成 $R(-)$ 扁桃酸的影响因素[J]. *过程工程学报*, 2004, 4(1): 32~ 36
- 10 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 16~ 17
- 11 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2001. 90~ 92

Diffusion Peculiarity of Substrates in Alginate Gel with Immobilized Cells

Xiao Meitian^① Huang Yayan^① Guo Yanghao^②

(^① College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China;

^② Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, 350001, Fuzhou, China)

Abstract By immersion method, the authors measured the effective diffusivity of glucose, phenylglyoxylic phenylglyoxylic acid and mandelic acid within alginate calcium gel with immobilized yeast cells. Experimental results showed that, under the same conditions, although effective diffusivity of glucose decreased with the increase of alginate concentration, there existed an optimized concentration, 0.02 by weight fraction. The effective diffusivity of glucose was higher than that of the other two substrates. The effective diffusivity of mandelic acid with initial entrapped immobilized yeast cells of $54.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and passing through 8 hour incubation, attained $0.36 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, which was less remarkably than that of mandelic acid without incubation or without entrapped cells.

Keywords immobilization, yeast cells, diffusion peculiarity, effective diffusivity, alginate calcium