

大孔型 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化细胞在摇床和鼓泡塔中的培养研究

Immobilization of Cells by Macro-porous NaCS-PDMDAAC Capsules and Cultivation in Shaking Flask and Bubble Bioreactor

张 俊,姚善泾*,应小姣,关怡新,林东强

ZHANG Jun, YAO Shan-Jing*, YING Xiao-Jiao, GUAN Yi-Xin and LIN Dong-Qiang

浙江大学化学工程与生物工程学系,杭州 310027

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

摘 要 NaCS-PDMDAAC 生物微胶囊囊膜较为致密,影响胶囊内外物质的交换,从而影响胶囊内细胞的生长。利用淀粉酶对致孔剂淀粉的降解作用制备了一种大孔型的纤维素硫酸钠-聚二甲基二烯丙基氯化铵(NaCS-PDMDAAC)生物微胶囊,实验表明胶囊的孔径和通透性能都有了很大的提高。将酵母和大肠杆菌作为模型细胞包埋于胶囊中分别通过摇瓶和鼓泡塔半连续培养,在鼓泡塔中胶囊内细胞的密度要高于摇床,表明氧气的传递是胶囊内好氧细胞生长的限制因素,大孔胶囊由于囊膜孔径变大,氧气的传递更为快速,在鼓泡塔中大孔型胶囊内的最大细胞密度比常规胶囊要高出 20% ~ 110%。由于对氧气的需求量的不同,大肠杆菌菌浓提高的程度要高于酵母。

关键词 大孔型胶囊,NaCS-PDMDAAC,扩散,固定化

中图分类号 Q939.7 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0633-05

Abstract The membrane of sodium cellulose sulphate (NaCS)-poly dimethyldiallylammonium chloride (PDMDAAC) microcapsule is compact and has low molecular weight cut-off, which would delay the mass transfer and affect the cell growth immobilized in the capsule. Macroporous NaCS-PDMDAAC microcapsules were prepared using the degradation of the starch by amylase in the membrane of the capsules. The pore size and the permeability in the membrane were improved obviously. As model cells, the *Candida krusei* CK1 and *E. coli* EC1 immobilized in the capsules were cultured in the shake flask and bubble column respectively. It was shown that the cell density immobilized in the microcapsules cultured in the bubble column was higher than that cultured in the shaking flask. It implied that the limiting factor of the cell growth in the capsule lied in the diffusion of the oxygen. Since the rate of the oxygen transporting across the membrane was greatly enhanced due to the enlarged pore size, the maximum cell density in the macroporous capsules was 20% ~ 110% over than that in the standard capsules in the bubble column. However, the extent of *E. coli* cell density increasing was higher than that of the yeast, which may be due to the difference of the oxygen requirement between the two microbes.

Key words macro-porous capsules, NaCS-PDMDAAC, diffusion, immobilization

Received: January 12, 2005; Accepted: April 5, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 20276065).

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

国家自然科学基金资助项目(No. 20276065)

纤维素硫酸钠-聚二甲基二烯丙基氯化铵 (NaCS-PDMAAC) 生物微胶囊是一种新型的细胞固定化体系, 由于其制备简单、物化性能稳定、机械强度高、生物相容性好^[1]等优点而受到广泛关注, 目前已应用于器官移植、高密度细胞培养和微生物发酵连续化生产等方面^[2-5]。

由 NaCS-PDMAAC 阴阳聚电解质在界面快速形成的半透性胶囊膜为细胞提供了一个条件温和的生长环境, 胶囊内部是水环境, 细胞通过胶囊膜与外界进行物质交换, 采用补料或更换外部培养基的方法, 可以达到细胞高密度培养的目的。普遍认为细胞的高密度培养的限制因素主要是细胞代谢营养物质的供应不足, 代谢产物积累引起的产物抑制和氧气供应的限制^[6,7], NaCS-PDMAAC 生物微胶囊的囊膜较为致密^[8], 有可能会引起这一系列传质问题, 因此有必要对该体系胶囊膜进行改造。

本文利用淀粉酶对淀粉的快速酶催化降解作用, 通过改造膜的结构来制备得到一种大孔型 NaCS-PDMAAC 生物微胶囊, 并以微生物培养中较为常见的酵母和大肠杆菌为模型细胞包埋于胶囊中, 考察胶囊膜性能改善后对固定化细胞生长繁殖代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

酵母 *Candida krusei* CK1、大肠杆菌 *E. coli* EC1 由浙江大学生物工程研究所保存。纤维素硫酸钠 (NaCS) 由浙江大学生物工程研究所合成^[9], 取代度为 0.36; 聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDMAAC MW = 200000 ~ 350000, 20%) 购自 Aldrich 公司; 木薯淀粉购自上海美峰食品有限公司; 淀粉酶 (6000u/g) 购自无锡酶制剂厂。分光光度计为 Ultrospec 3300pro, 由 Amersham Bioscience 制造。

1.2 培养基成分

酵母培养基 (g/L): 葡萄糖 250, 玉米浆 9, 尿素 9, K_2HPO_4 3.5, pH 值自然;

大肠杆菌培养基 (g/L): 葡萄糖 5, 胰蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5, pH = 7.0。

1.3 实验方法

1.3.1 常规 NaCS-PDMAAC 微胶囊制备方法: 将 4% (wt) 的 NaCS 通过注射器滴入 8% (wt) 的 PDMAAC 溶液中, 搅拌 40min 后用去离子水洗涤 3 次, 保存于 0.9% (wt) 的 NaCl 溶液中。

1.3.2 大孔型 NaCS-PDMAAC 微胶囊的制备方法:

将冷水分散的木薯淀粉倒入沸水中制成 1.2% 的糊化淀粉悬浊液, 用此溶液配制成 4.0% (wt) 的 NaCS 溶液, 通过注射器将其滴入 8% (wt) 的 PDMAAC 溶液中, 搅拌 40min 后用去离子水洗涤 3 次, 将胶囊置于 1% (wt) 的淀粉酶液中 40min (pH = 7.0, 30°C), 再次洗涤后保存于 0.9% (wt) 的 NaCl 溶液中。

1.3.3 胶囊扩散测定: 采用氨基酰化酶 I、溶菌酶、 VB_{12} 、葡萄糖为模型底物, 取一定量的空白胶囊加入这些溶液中, 定时测量溶液中溶质浓度的变化。

1.3.4 细胞游离培养: 将 *Candida krusei* CK1 接种到酵母培养基中, 250mL 三角瓶装液量 10%, 30°C, 200r/min 培养 24h。将 *E. coli* EC1 接种到大肠杆菌培养基中, 250mL 摇瓶装液量 10%, 37°C, 200r/min 培养 18h。

1.3.5 细胞的固定化: 取游离培养后的细胞种子液 1mL, 2g NaCS 与 49mL 糊化淀粉溶液或去离子水混合均匀后, 采用 1.2.1 和 1.2.2 方法进行细胞微囊化, 制备得到固定化细胞的常规和大孔微胶囊。所用试剂都经过灭菌处理, 所有操作在无菌工作台进行。

1.3.6 固定化细胞的摇瓶培养: 取固定化细胞胶囊 10mL 加入 40mL 培养基中, 500mL 摇瓶中 150r/min 培养, 包埋 *Candida krusei* CK1 培养温度 30°C, *E. coli* EC1 为 37°C。定时测定细胞浓度和葡萄糖浓度, 当葡萄糖基本被消耗后, 更换新鲜培养基。

1.3.7 固定化细胞的鼓泡塔培养: 实验中使用的鼓泡塔装置如图 1 所示; 反应器体积 150mL, 装液量 100mL, 气速 50mL/min。把 20mL 胶囊和 80mL 培养基加入鼓泡塔中, 同时在鼓泡塔中滴加泡敌 0.05mL。包埋 *Candida krusei* CK1 培养温度 30°C, *E. coli* EC1 为 37°C。定时测定细胞浓度和葡萄糖

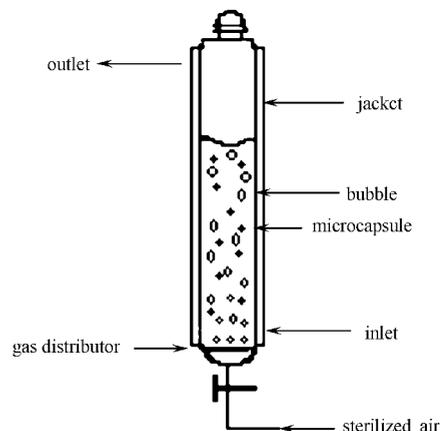


图 1 鼓泡塔装置示意图

浓度,当葡萄糖基本被消耗后,更换新鲜培养基。

1.4 分析方法

酵母细胞计数:取 10~20 颗胶囊,挤破后吸取 100 μ L,稀释一定倍数后利用血球计数板法计算胶囊内液体的细胞浓度。

大肠杆菌计数:将大肠杆菌菌悬液稀释成不同倍数,在 600nm 处测定吸光值,同时采用稀释平板法确定不同倍数菌悬液细胞浓度,得到 OD_{600} 与菌浓的线性关系。取 10~20 颗胶囊,挤破后吸取 100 μ L,稀释一定倍数后测定 OD_{600} 得到细胞浓度。

葡萄糖浓度测定:采用 DNS 法,在 500 nm 下测量吸光值来确定。

氨基酰化酶 I、溶菌酶、VB₁₂ 的浓度测定:配制一系列浓度的溶液,氨基酰化酶 I、溶菌酶在 280nm 处测定吸光值,VB₁₂ 在 360nm 处测定吸光值,得到吸光值与溶液浓度的线性关系。测量时每次取 100 μ L,稀释到吸光值与浓度的线性范围,用分光光度计测量吸光值来确定其浓度。

2 结果与讨论

2.1 大孔胶囊的扩散性能

常规的 NaCS-PDMAAC 微胶囊由于胶囊膜较为致密而影响细胞代谢底物和产物的传递,比较适合于小分子目标产物的固定化细胞培养。本工作采用淀粉作为致孔剂,添加在成囊的聚合物溶液中,阴阳聚电解质络合成囊时镶嵌于膜中,利用淀粉酶的高活性降解淀粉形成相应孔径,制备了一种大孔型的生物微胶囊,在前期工作中我们已对这种胶囊的制备方法进行了优化^[10]。

分别采用氨基酰化酶 I、溶菌酶、VB₁₂ 和葡萄糖作为目标底物测定这些物质在大孔和普通胶囊中的扩散,结果见图 2~图 5。小分子的葡萄糖和 VB₁₂ 能透过常规胶囊,而氨基酰化酶 I、溶菌酶不能透过;对于在大孔型胶囊中的扩散情况,氨基酰化酶 I (MW = 86kD) 不能透过,而溶菌酶、VB₁₂ 和葡萄糖都能透过,本实验采用的淀粉酶 (MW = 60kD) 能透过胶囊降解胶囊内部淀粉,因此可以得到大孔胶囊的截留分子量在 60kD 到 86kD 之间,常规胶囊的截留分子量小于 14kD (溶菌酶)。由此可见加入致孔剂后得到的大孔型胶囊的孔径有明显的增大,更多的底物和产物能透过胶囊。对比葡萄糖和 VB₁₂ 在大孔和普通胶囊中的扩散,可以看到分子量为 180 的葡萄糖在两种胶囊中的扩散差别并不是很大,而随

着底物分子量的提高,分子量为 1355 的 VB₁₂ 在这两种胶囊中的扩散差别就非常的明显,大孔型胶囊的传质性能也有了很大的提高。

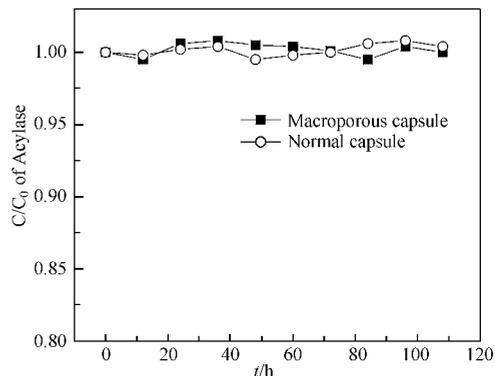


图 2 氨基酰化酶 I 扩散进入大孔型胶囊和普通胶囊
Fig.2 Diffusion of Acylase I solution into macroporous capsules and normal capsules

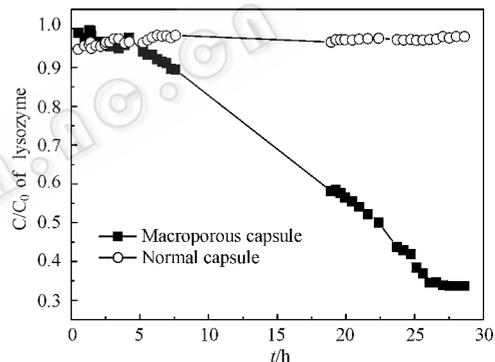


图 3 溶菌酶扩散进入大孔型胶囊和普通胶囊
Fig.3 Diffusion of lysozyme solution into macroporous capsules and normal capsules

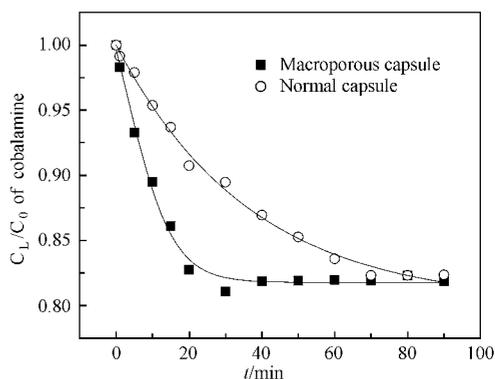


图 4 VB₁₂ 扩散进入大孔胶囊和普通胶囊
Fig.4 Diffusion of VB₁₂ solution into macroporous capsules and normal capsules

2.2 酵母细胞固定化半连续培养

把酵母 *Candida krusei* CK1 固定于大孔型胶囊和常规胶囊中分别在摇床和鼓泡塔中进行半连续培

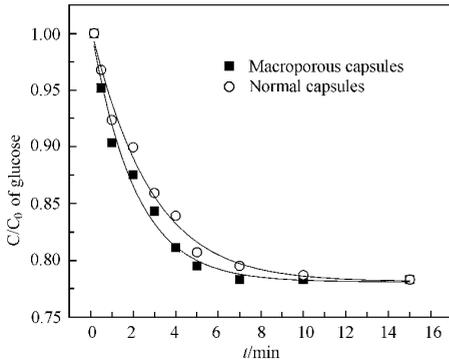


图5 葡萄糖扩散进入大孔胶囊和普通胶囊
Fig.5 Diffusion of glucose solution into macroporous capsules and normal capsules

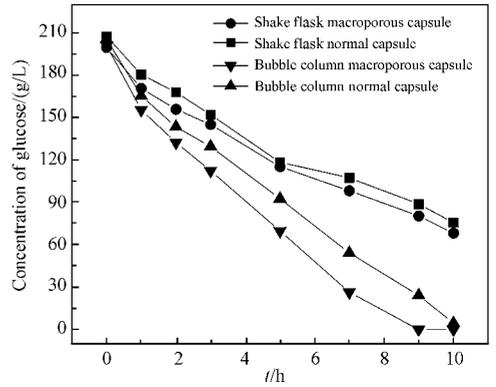


图7 固定化细胞达到最大细胞浓度后的糖耗曲线
Fig.7 Glucose consumption curves of the encapsulated cells when the cell density had reached the maximum

养结果示于图6和图7中。从图6的半连续培养中胶囊内细胞密度随时间变化可以看出,在摇床培养过程中,两种胶囊的最高细胞密度的差别不是很明显。由于酵母培养基中大部分都是小分子的物质,胶囊膜对分子量在100左右的小分子扩散的影响并不是很大,葡萄糖在15min内即能达到内外溶质浓度的平衡(图5),而糖消耗完全需要9h以上(图7),葡萄糖的扩散速率远大于溶液中糖的消耗速率,由此可见小分子物质的扩散不是影响胶囊内细胞密度的主要因素。

细胞在胶囊中生长的主要因素。从实验过程中还能观测到,在鼓泡塔培养过程的初期,大孔胶囊内有微小气泡,在培养一段时间后逐渐消失,可见氧在大孔型胶囊膜上的传递不仅是通过溶解在液体中的氧,而且还可以使极其微小的气泡进入胶囊,更有利于固定化后细胞的生长。

2.3 大肠杆菌固定化半连续培养

把大肠杆菌 *E. coli* EC1 固定于大孔型胶囊和常规胶囊中,分别在摇床和鼓泡塔中进行半连续培养,结果示于图8中。从图中大肠杆菌培养菌浓随时间的变化可以看出,无论在摇床还是鼓泡塔中,大孔胶囊的细胞密度都明显高于普通胶囊,由于大肠杆菌是一种兼性好氧细菌,对氧气的敏感程度较高,摇床培养培养基中的氧含率较低,而胶囊内菌体对氧的消耗很快,因此溶氧在膜中的扩散是氧传递的限制步骤,大孔型胶囊膜对氧的扩散能力有显著的提高,因此即使在摇床中培养其细胞密度也有较大

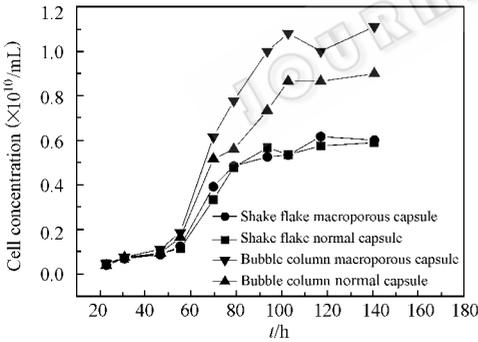


图6 鼓泡塔和摇床培养胶囊内 *Candida krusei* CK1 细胞浓度的变化

Fig.6 The time course of *Candida krusei* CK1 cell density in the capsules cultured in the bubble column and shaking flasks

从图6中可以看到,当采用鼓泡塔进行微囊化细胞培养时,胶囊内细胞密度的变化较为明显,常规胶囊和大孔型胶囊中的细胞密度比摇床都有很大的提高,大孔型胶囊中细胞密度达到 1.1×10^{10} /mL,比普通胶囊鼓泡塔培养提高了20%。由于两种反应器中除氧气传递外其他条件基本相同,而鼓泡塔中液体培养基的溶氧量明显高于摇床中,细胞密度的提高与增加氧传递关系密切,说明氧的传递是影响

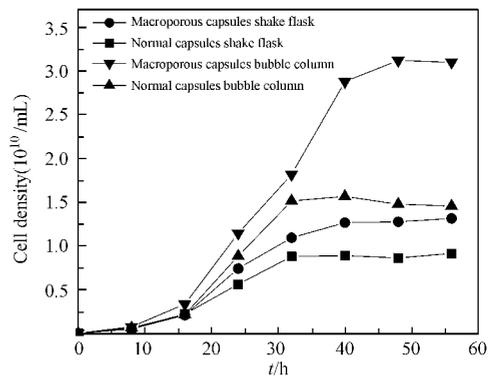


图8 在鼓泡塔和摇床中培养胶囊内 *E. coli* EC1 菌浓的变化

Fig.8 The time course of *E. coli* EC1 cell density in the capsules cultured in the bubble column and shaking flasks

的提高。在鼓泡塔中,大肠杆菌在大孔胶囊和常规胶囊中的差别更为明显,由于氧气传递的速率加快,胶囊内细胞的浓度更进一步提高,大孔型胶囊内的最高细胞浓度可达到 $3.1 \times 10^{10}/\text{mL}$,比常规胶囊提高了 110%。这表明了氧气的传递对细胞生长的重要性,由于膜孔径的增大,使大孔型胶囊内部细胞生长环境有了较大的改善。这些结果也表明采用淀粉-淀粉酶在胶囊膜上致孔是一种条件温和对细胞没有损伤的制备大孔型胶囊的方法。

2.4 细胞微囊固定化比较

表 1 是酵母和大肠杆菌在固定化胶囊中的最大细胞浓度的比较,从表中可以看出,微囊化细胞半连续培养的胶囊内细胞密度能达到普通游离培养的几倍到几十倍,实现了高密度培养的目的。不同种类的细胞微囊化培养效果也有差别,酵母细胞微囊化后细胞密度可达到游离培养的数十倍,而大肠杆菌固定化后细胞密度提高的倍数不如酵母。文献报道酵母的临界氧浓度为 $4.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$,而大肠杆菌为 $8.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ^[11],因此大肠杆菌对氧的供应更为敏感。酵母是一种兼性厌氧的微生物,在氧气不充足的环境下也能通过酵解提供能量,而大肠杆菌是兼性好氧的微生物,氧气的供应量决定了细胞的生长密度。由此可见氧的传递对于高密度培养中的氧敏感细胞更为重要,胶囊膜通透性能的提高主要为细胞提供了更好的氧环境。

表 1 微生物固定化培养比较

Table 1 The comparison of cell density between the *Candida krusei* CK1 and *E. coli* EC1

	<i>Candida krusei</i> CK1	<i>E. coli</i> EC1
Free culture(cells/mL)	10^8	$10^9 \sim 10^{10}$
Encapsulated culture(cells/mL)	$10^9 \sim 10^{10}$	10^{10}
Encapsulated/Free(times)	10 ~ 50	2 ~ 5
Macroporous capsule /normal capsule in shaking flasks(times)	1.0	1.5
Macroporous capsule /normal capsule in bubble columns(times)	1.2	2.1

3 结语

以淀粉为致孔剂,淀粉酶为降解物质,针对 NaCS-PDMAAC 生物微胶囊体系膜较为致密,制备了一种大孔型微胶囊。大孔胶囊中的传质速率要明

显高于普通胶囊。以酵母和大肠杆菌为模型细胞分别固定于大孔和普通胶囊中在摇床和鼓泡塔中培养,鼓泡塔胶囊中的细胞密度高于同样培养条件下摇床胶囊内细胞密度,大孔胶囊高于普通胶囊。研究表明氧气的传递是细胞在胶囊中生长的限制因素,大孔型胶囊由于膜孔径扩大,氧气的传递更快,胶囊内细胞密度也有很大的提高。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Yao SJ (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
- [2] Ye ZJ (叶子坚), Yao SJ (姚善泾). Cultivation of *Lactobacillus* in microcapsule. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2000, **40**(5): 507 - 512
- [3] Mei LH (梅乐和), Yao SJ (姚善泾), Zhu ZQ (朱自强). Cultivation and kinetics of encapsulated *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Industry and Engineering* (化工学报), 2002, **53**(5): 493 - 497
- [4] Sittinger M, Lukanoff B, Burmester GR *et al.* Encapsulation of artificial tissues in polyelectrolyte complexes: preliminary studies. *Biomaterials*, 1996, **17**(10): 1049 - 1051
- [5] Mansfeld J, Forster M, Hoffmann T *et al.* Coimmobilization of *Yarrowia lipolytica* cells and invertase in polyelectrolyte complex microcapsules. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, **17**(1): 11 - 1
- [6] Li Y (李毅), Pu Q (蒲勤), Zhao ZL (赵忠良). High density fed-batch culture of *Escherichia coli* DH5 α /pDH-B₂m with DO feedback control of nutrient feeding. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(6): 718 - 723
- [7] Shen YJ (沈毅君), Yao JE (姚见儿), Yi JH (易进华) *et al.* Advance in high density cultivation of recombinant *E. coli*. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术), 2000, **7**(4): 243 - 247
- [8] Yao SJ (姚善泾), Mei LH (梅乐和). A new NaCS-PDADMAC microcapsule and its applications in the immobilization of biomass. *Membrane Science and Technology* (膜科学与技术), 1999, **19**(1): 19 - 23
- [9] Yao SJ. An improve process for the preparation of sodium cellulose sulphate. *Chem Eng J*, 2000, **78**(2 - 3): 199 - 204
- [10] Zhang J (张俊), Yao SJ (姚善泾). Preparation of macroporous NaCS-PDMAAC microcapsule. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应与工艺) 2005, **21**(1): 65 - 69
- [11] Yu JH (俞俊棠), Tang XX (唐孝宣). *Biotechnology*. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 1992