

聚氨酯泡沫半固定化培养盘基网柄菌

梁兴超¹, 卢英华², 陈杰¹, 徐志南^{1*}

(1 浙江大学 化学工程与生物工程学系, 杭州 310027)

2 厦门大学 化学与化学工程系, 厦门 361005)

摘要: 研究了聚氨酯泡沫应用于固定化盘基网柄菌的可行性, 发现以简单处理过的聚氨酯泡沫为载体, 能够高效实现盘基网柄菌的固定化培养。考察了载体粒径大小、载体量和摇床转速等对固定化培养的影响, 在优化的培养条件和固定化条件下, 盘基网柄菌的最大细胞密度是悬浮培养的 2~4 倍。

关键词: 盘基网柄菌; 聚氨酯泡沫; 固定化培养

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1672-3678(2007)02-0052-05

Immobilized cultivation of *D. discoideum* with polyurethane foam

LIANG Xing-chao¹, LU Ying-hua², CHEN Jie¹, XU Zhinan¹

(1 Department of Chemistry and Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

2 Department of chemical and Biochemical Engineering Xiamen University, Xiamen 361006, China)

Abstract The immobilization of *D. discoideum* with polyurethane foam (PUF) was proposed and the effects of PUF's properties on the immobilization was examined. The results showed that PUF was a suitable carrier for the efficient immobilization of *D. discoideum*. The effects of PUF addition and culture conditions were optimized to attain high density of *D. discoideum*. Under optimized culture conditions, high cell density of *D. discoideum* (4.56×10^7 cells/mL) has been achieved in the shake flasks, which was 2~4 times higher than that of free-cell culture in the axenic medium.

Key words *D. discoideum*; polyurethane foam; immobilization

盘基网柄菌 (*D. discoideum*) 属真菌界的粘菌亚界的聚粘霉属 (*Acrasium zetes*)^[1]。作为一种异源蛋白表达载体, 盘基网柄菌 N-糖基化机制与高等真核生物很相似, 表达的蛋白具有生物活性; 培养过程不需要添加血清等特殊成分, 成本低廉^[2], 具有实现工业化生产的可能性; 盘基网柄菌中发现了几个高拷贝质粒, 如 Ddp1 和 Ddp2^[3], 从这些质粒出发可以构建既能在 *E. coli* 中复制又能在盘基网柄菌中复制的穿梭质粒; 盘基网柄菌无细

胞壁, 重组蛋白在盘基网柄菌中能够以膜结合、分泌等多种形式表达, 便于分离纯化^[2]。目前盘基网柄菌已经成功表达了 10 种左右的异源蛋白, 主要为复杂的寄生生物糖蛋白抗原、病毒的糖蛋白和人的糖蛋白。

但盘基网柄菌在无菌复杂培养基 (HL-5C 等) 上的最大细胞量只有 $(1 \sim 2) \times 10^7$ 个左右^[4], 倍增时间约为 8~12 h 在 FM^[5] 和 SH^[6] 培养基上的菌体量虽然有所增加, 分别达到 $(1 \sim 3) \times 10^7$ 个/mL, $(5 \sim 6) \times$

* 收稿日期: 2006-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370039)

作者简介: 梁兴超 (1981-), 女, 天津人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物固定化培养。

联系人: 徐志南, 教授, 博士生导师, E-mail: xuzh@zju.edu.cn

10^7 个/mL, 倍增时间则更长, 为 12~16 h, 这严重限制了盘基网柄菌的应用。为提高盘基网柄菌的培养密度, 研究者已采用了一些固定化方法来提高盘基网柄菌的培养量^[7-10]。

聚氨酯泡沫 (Polyurethane Foam, PUF) 作为固定化载体具有孔径与细胞尺寸相比较大, 内外表面都能作为固定化吸附界面; 孔隙率高, 便于传质; 载体为化学惰性, 对细胞不具毒害作用, 可与培养基共同灭菌, 培养结束后易于迅速获取细胞; 处理方便, 已成功应用于固定化培养霉菌^[11]和醋酸, 价格低廉, 适合作为工业化固定化载体等特杆菌^[12]。

本文对盘基网柄菌在 PUF 载体中的吸附性能进行了研究, 并对 PUF 固定化培养盘基网柄菌的条件进行了初步优化, 在优化条件下培养盘基网柄菌提高了菌体量。

1 材料与方法

1.1 菌株

盘基网柄菌 AX3-Lu8 菌株, 由厦门大学卢英华老师提供。

1.2 试剂

酵母膏, 胰蛋白胨购于 Oxoid, 月示蛋白胨为 Sigma 生产; 细菌用蛋白胨、二氢链霉素硫酸盐、遗传霉素 (G-418) 由 Amresco 提供; 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 培养基与缓冲液

HL-5C 复杂培养基 (C. Raymond) (g/L): D-葡萄糖 10, 酵母膏 5, 月示蛋白胨 5, 细菌用蛋白胨 2.5, 胰蛋白胨 2.5, KH_2PO_4 1.2, Na_2HPO_4 0.35, 调 pH 6.5。接种前加 G-418 氨卞西林钠, 二氢链霉素至终质量浓度 16.5, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

磷酸盐缓冲液: KH_2PO_4 1.99 g/L, Na_2HPO_4 0.35 g/L, 调 pH 至 6.0。

1.4 聚氨酯泡沫载体

市售聚氨酯泡沫, 密度为 27 kg/m^3 , 孔隙率高于 90%, 将其剪成立方体 (边长分别为 3.5, 10, 15 mm) 或饼状 (直径 7 cm, 高 1 cm)。

聚氨酯泡沫处理: 去离子水清洗, 沸水煮 30 min 烘箱烘干备用。培养后的载体可超声波清洗 1 h 再经以上方法处理备用。

1.5 实验方法

盘基网柄菌的培养: 250 mL 摇瓶加入培养基

25 mL, 接种为每 mL $\times 10^5$ 个左右, 22~23 $^\circ\text{C}$, 150 r/min 摇床培养 5~7 d。

盘基网柄菌在聚氨酯泡沫中吸附能力的测定: 250 mL 摇瓶, 加入 25 mL 培养好的菌液, 加入聚氨酯泡沫颗粒, 22~23 $^\circ\text{C}$, 150 r/min 测定菌体在载体中的吸附情况。具体实验条件根据不同实验设计而定。

1.6 分析方法

细胞密度通过血球计数板计数获得。

吸附率的测定: 培养好的菌液测定初浓度 C_0 , 初体积 V_0 , 加入 PUF 后测定载体外的菌浓度 C_{out} 和菌液体积 V_{out} , 则载体内菌的吸附率为

$$Q = \frac{C_0 V_0 - C_{out} V_{out}}{C_0 V_0}$$

2 实验结果与讨论

2.1 PUF 吸附性能的研究

首先确定 PUF 是否适合作为固定化培养盘基网柄菌的载体, 对细胞与载体的相容性进行初步研究。

2.1.1 菌体在 PUF 上吸附性的初步测定

250 mL 摇瓶加入菌液 25 mL, PUF 0.6 g, 分时段取样测定菌体吸附情况 (图 1)。由图 1 知, 约 100 min 后菌体在 PUF 中吸附基本达到平衡, 最终菌体在载体中的吸附率能达到 88%~93%。这初步说明载体 PUF 丰富的微孔结构和比表面积可以为盘基网柄菌提供良好的吸附条件。

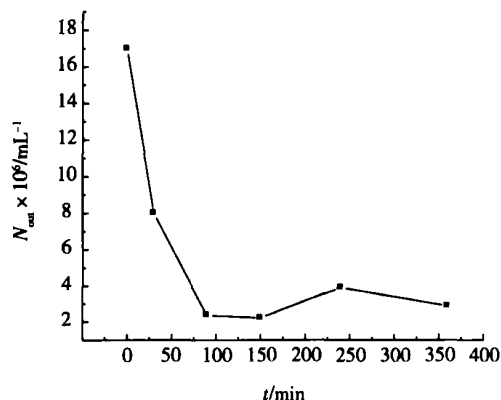


图 1 盘基网柄菌细胞吸附曲线

Fig 1 The adsorption curves of cells onto PUF

2.1.2 PUF 固定化培养盘基网柄菌的菌体分布

250 mL 摇瓶, 培养基 25 mL, 加入 PUF 0.8 g 接种培养后, 首先分离载体外菌液, 测定载体外菌量

及体积;将载体中加入磷酸盐缓冲液 50 mL,放入摇床,转速 150 r/min 测定缓冲液中菌量的变化,当菌量不再变化时,分离缓冲液与载体,测定液体体积与菌量;再将载体中放入磷酸盐缓冲液 10 mL,充分挤压洗涤后测定液体体积和菌量。结果表明,载体内外的液体体积基本相当,而载体内菌分布占到了 67.3%,而且大部分菌体(约 56%)能以不挤压载体的洗脱方式得到,表明这部分菌体是悬浮在 PUF 孔中的或者是吸附不太牢固的。所以严格意义上讲,PUF 固定化培养盘基网柄菌属于半固定化培养,不仅内外 PUF 表面为菌体提供了一个好的吸附界面,而且充分的微孔结构也为菌体提供了适宜的悬浮生长空间。

2.2 各种吸附影响因子的考察

为了更好地为 PUF 固定化培养盘基网柄菌的条件摸索作准备,进一步尝试研究了不同的培养条件对菌体吸附的影响。

2.2.1 转速对菌体吸附的影响

转速既决定菌体生长所必需的营养成分和氧的传递,同时也可能造成较大的剪切力,导致菌体死亡。盘基网柄菌为好氧生物,但菌体没有细胞壁,很可能对剪切力敏感,因此有必要先考察转速对菌体吸附的影响(图 2)。由图 2 可知:转速为 150 r/min 时 PUF 外菌量最低,载体内菌体吸附率最高,约为 81.1%。转速过低不利于菌液与 PUF 表面接触;转速过高载体晃动太剧烈,不利于菌体吸附。

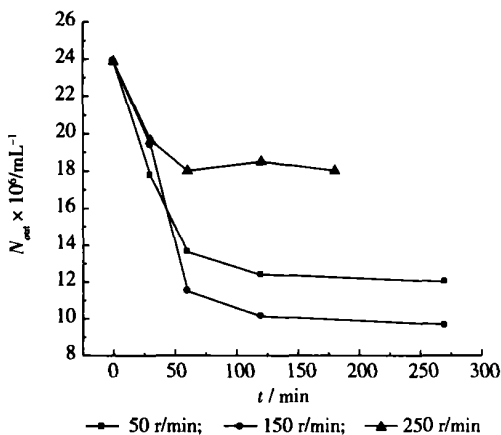


图 2 转速对细胞吸附的影响

Fig 2 Effects of agitation on the adsorption of cells onto PUF

2.2.2 PUF 量对菌体吸附的影响

载体添加量及载体尺寸直接影响固定化培养的效果,通过实验研究其对菌体吸附的影响,结果见图 3、4。

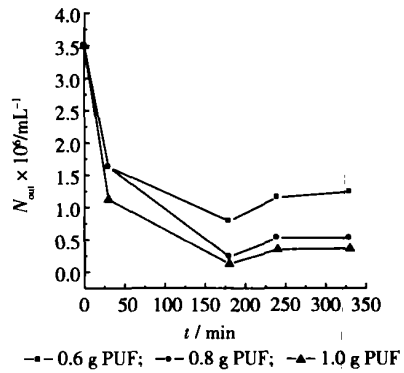


图 3 载体添加量对细胞吸附的影响

Fig 3 Effects of PUF amount on the adsorption of cells onto PUF

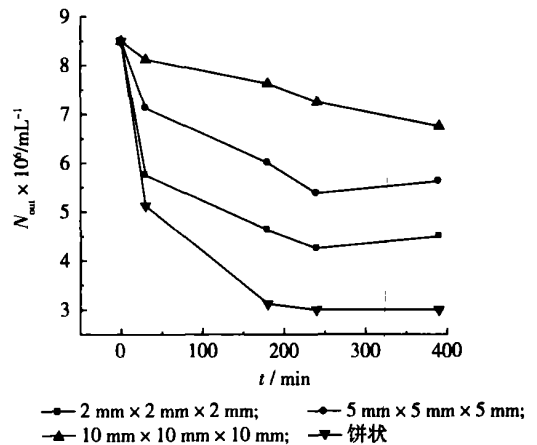


图 4 载体尺寸对细胞吸附的影响

Fig 4 Effects of PUF size to the adsorption of cells onto PUF

250 mL 摇瓶加入菌液 25 mL, PUF 分别为 0.6 0.8 1.0 g, 测定菌体吸附情况。如图 3 随着 PUF 量的增加,菌体吸附量呈上升的趋势。0.6 g PUF 吸附率 82.3%, 0.8 g PUF 吸附率 92.6%, 1.0 g PUF 吸附率达到 94.9%。进一步的实验显示继续增加载体量或降低载体量均会使吸附不稳定,因为载体量降至 0.4 g 时,载体量较少,不能为菌体生长提供充足的吸附界面,而且在 150 r/min 下载体在摇瓶培养过程中晃动较剧烈,很多载体粘在摇瓶壁上,不能与菌液接触,达不到固定化的作用;而 1.2 g PUF 加入量对于 25 mL 培养体系而言载体量过大,菌体吸附效果并没有提高(图 5)。

2.2.3 PUF 粒径对菌体吸附的影响

虽然 PUF 为大孔径,孔隙率高的载体,但载体粒径大小不同,载体提供的比表面积也不同,固定

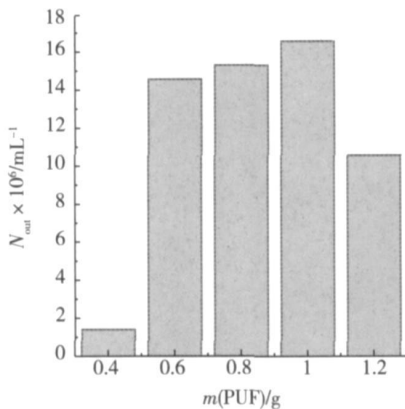


图5 载体添加量对细胞生长的影响

Fig 5 Effects of PUF amount

化效果也会有所差异。

250 mL摇瓶加入菌液 25 mL, 粒径分别为 2, 5, 10, 15 mm, 及饼状 (直径 7 cm, 高 1 cm) PUF 1.0 g 测定不同载体粒径对菌体吸附的影响 (图 6)。

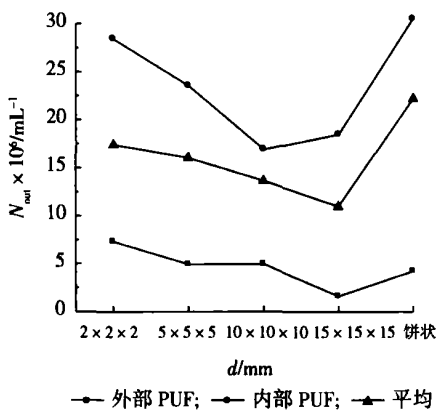


图6 载体尺寸对细胞生长的影响

Fig 6 Effects of PUF size

由图 6 可以看到, 载体粒径越小, 菌体吸附率越高, 这与推测相仿, 载体粒径小, 其比表面积相应增大, 与菌体接触面积增大, 而且粒径小的载体相应传递阻力减小, 有利于菌体的吸附。当载体粒径为 15 mm 时, 1.0 g PUF 颗粒数目较少, 在实验条件 150 r/min 下颗粒间会形成较大剪切力, 使得载体外的菌体受到影响, 测定时载体外菌量较小, 而且结果不稳定。饼状 PUF 基本与摇瓶底部大小相同, 实验条件下 PUF 晃动小, 而且载体基本能浸在菌液中, 能为菌体生长提供充足的微孔空间和吸附界面, 表现的吸附效果最好。

以上对载体吸附性的研究证明, PUF 具有很好

的生物相容性, 对盘基网柄菌细胞有较好的吸附固定作用, 可以尝试用 PUF 半固定化培养盘基网柄菌, 以期提高菌体量。

2.3 PUF 固定化培养盘基网柄菌条件优化

在确定 PUF 载体与菌体的良好生物相容性及分析部分影响因素后, 利用 PUF 半固定化培养盘基网柄菌, 并进一步优化了培养条件。

2.3.1 载体加入量的优化

在吸附载体加入量影响研究的基础上, 进一步研究了载体量对菌体固定化培养的影响。分别加入 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 g PUF, 比较载体加入量对菌体培养的影响。结果显示, 与吸附实验的最优效果载体加入量相同, 1.0 g 载体量固定化培养效果最佳。

2.3.2 PUF 粒径的优化

同样在吸附实验的基础上, 比较不同载体粒径固定化培养的效果。结果显示, 载体内菌浓度与吸附测定的结果基本相符, 饼状 PUF 的培养效果最佳, 因此有望通过设计薄片状的载体 PUF 实现规模化的盘基网柄菌固定化培养。

2.3.3 优化条件下的饼状 PUF 固定化培养盘基网柄菌

在优化培养条件下, 即 150 r/min, 22~23 °C, 饼状 PUF 加入量为 1.0 g 条件下培养盘基网柄菌。在培养 115 h 后, 测定载体内菌量为 4.56×10^7 个/mL, 为悬浮培养 ($(1 \sim 2) \times 10^7$ /mL) 的 2~4 倍。

3 结论

(1) 一系列 PUF 与载体的相容性研究实验显示, 载体与菌体间有很好的生物相容性, 可以用于盘基网柄菌的半固定化吸附载体, 实现了高菌体量培养。不仅 PUF 内外表面能为菌体提供丰富的吸附界面, 而且大量相对均一的微孔结构为菌体生长提供了生存空间, 传质效果良好。

(2) 在比较菌体量、载体加入量、载体粒径大小等条件对盘基网柄菌的固定化培养的效果后, 采用饼状 PUF 1.0 g, 22~23 °C, 150 r/min 条件下固定化培养盘基网柄菌, 在 115 h 左右, 载体内菌体量达到最大, 为 4.56×10^7 个/mL, 是悬浮培养 ($(1 \sim 2) \times 10^7$ /mL) 的 2~4 倍。

(3) PUF 载体廉价, 处理方便, 适合大规模工业化生产的需要。

参考文献:

- [1] Gerisch G, Albrecht R, Heizer C, et al Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dicystostelium* cells monitored using a green fluorescent protein: coronin fusion protein [J]. *Cur Bio* 1995, 5: 1280-1285
- [2] Lu Yinghua, Wu Xiaoxia, Xu Zhinan, et al Advances in *Dicystostelium discoideum* as a expression system [J]. *Chemical Journal on Internet* 2004, 6(9): 58
- [3] Skade M, Emalie K, Williams K L. Expression of recombinant glycoproteins in the simple eukaryote *Dicystostelium discoideum* [J]. *Biotech Genet Engin Rev* 1997, 14: 1-35
- [4] Stephan M, Beshay U, Fdehs K, et al Influence of medium composition on growth behaviour of *Dicystostelium discoideum* for cultivation on axenic media [J]. *Process Biochemistry* 2003, 39: 333-343.
- [5] Frank J, Kessin R. A defined minimal medium for axenic strains of *Dicystostelium discoideum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 2157-2161
- [6] Han Sangin, Friehs K, Flaschel E. Improvement of a synthetic medium for *Dicystostelium discoideum* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(8): 925-930
- [7] Lu Yinghua, Beshay U, Friehs K, et al Mass production of *Dicystostelium discoideum* in homogeneous and heterogeneous cultivation systems [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39 (12): 1859-1870.
- [8] Lu Yinghua, Knol J C, Linskens M H K, et al Production of the soluble human Fas ligand by *Dicystostelium discoideum* cultivated on a synthetic medium [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108: 243-251
- [9] Tiltcher H, Storr M. Immobilization of the slime mold *Dicystostelium discoideum* for the continuous production of recombinant human antithrombin III [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993, 40 (2/3): 246-250.
- [10] Beshay U, Friehs K, Azzam A E M, et al Cultivation of *Dicystostelium discoideum* in immobilized form by colonization of porous supports [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1521-1529.
- [11] Li Yubing, Bai Shu, Sun Yan, et al A double-layer reaction-diffusion model for immobilization *R. oryzae* with polyurethane foam cubes [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering* 1998, 49 (4), 462-466
- [12] Ignacio O, Romero L E, Cantero D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production: Sintered wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti* [J]. *Process Biochemistry* 2004, 39(5): 547-555.

国外动态

秘鲁将兴建南美最大的生物柴油工厂

美国 PURE 生物燃料(秘鲁)公司 2007 年 2 月 7 日在秘鲁西部港口城市卡亚俄开工兴建一座生物柴油工厂,这将是秘鲁首家也是南美规模最大的生物柴油工厂。

该公司董事长路易斯·戈伊苏埃塔称,公司计划先期投入 3 000 万美元用于工厂建设,预期 2007 年 9 月完工。经过一个月的试运营后,10 月份可正式投入生产,年产量将达到 18 万吨,到 2009 年,年产量将在此基础上翻一番,达到 36 万吨。

戈伊苏埃塔说,该工厂将每月进口 1.5 万吨油菜籽、棕榈等作物制造生物柴油,按一定比例与传统柴油混合。为节省成本,公司还计划在未来几年陆续投资 1 亿美元,在秘鲁当地开辟种植园,种植油菜籽、棕榈等原材料。

秘鲁山区出口计划委员会主席加斯东·本萨日前也表示,秘鲁政府计划在 5 年内投资 1.63 亿美元,开辟约 20 万公顷土地用于种植油菜籽,以满足生产生物柴油的需要。

(张春鹏)