

Fe₃O₄/海藻酸盐微胶囊固定化细胞生长特性*

温惠云, 齐智涛, 薛伟明, 薛美辰, 孙维娜, 沈艳佐

(西北大学化工学院, 陕西 西安, 710069)

摘 要 采用脉冲电场液滴制备工艺,以海藻酸钠、壳聚糖为载体材料,纳米 Fe₃O₄ 粉末为磁性材料,地衣芽孢杆菌为细胞模型,制备具有超顺磁性的微尺度载细胞微胶囊。以地衣芽孢杆菌的生长量为考察指标,考察不同磁含量、磁场引力、粒径和初始菌浓等因素的影响。实验结果表明,磁性材料 Fe₃O₄ 的引入对地衣芽孢杆菌的生长没有影响。制备磁性固定化地衣芽孢杆菌微胶囊的最适条件为:Fe₃O₄ 含量 0.003 g/mL,初始接种密度为 1.5 倍菌浓(6.25×10^6 个/mL),微囊的平均粒径为 350 μ m,磁场环境的引入对地衣芽孢杆菌的生长无明显影响。论证了磁性壳聚糖/海藻酸钙微胶囊固定化细胞工艺进行在线分离、连续化操作的可行性。

关键词 壳聚糖,海藻酸钠,Fe₃O₄,固定化细胞,微胶囊

固定化细胞(cell immobilization)技术^[1~4]是指采用适当的载体材料和方法负载细胞,在一定程度上保护细胞免受发酵过程的机械搅拌剪切损伤、增加细胞浓度和发酵强度、为实现细胞与产物分离提供便利。已有的细胞固定化技术在发酵工艺操作中存在的主要问题是:(1)固定化载体尺寸过大(通常>3 mm),难以在发酵容器中稳定悬浮,传质差;(2)发酵液与固定化细胞分离为间歇过滤操作,费时费力,生产效率低;(3)在分离过程中倒罐问题易导致细胞污染,且细胞不能再利用,发酵成本增大。因此,本文旨在寻求一种能够实现发酵产物与细胞在线分离、实现发酵生产的连续操作、提高细胞利用率的新型细胞固定化方法。

本文的设计思路是将具有超顺磁性的纳米粉末引入到微尺度载细胞微胶囊中。由于 Fe₃O₄ 磁性粒子的引入,借助外部磁场或向发酵设备通入电磁场,使磁性微球携带细胞定向移动并附着在发酵罐器壁上,排出发酵液后,取消电磁场,在 Fe₃O₄ 粉末超顺磁性作用下,微球重新良好悬浮于新鲜培养液中,进行 2 次发酵。并期望通过固定化细胞与发酵液快速便捷的在线分离,消除发酵产物对细胞代谢的抑制,进行连续发酵,达到细胞生长量的再利用,从而实现固定化细胞简单、方便地回收和磁性导向^[5,6]。

第一作者:硕士研究生(薛伟明教授为通讯作者)。

*国家自然科学基金资助项目(No. 50373046),陕西省教育厅专项科研计划资助项目(No. 07JK386),西北大学研究生创新基金资助项目(No. 07YZ223,08YZ249),陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2008ZBKG-58)

收稿日期:2008-12-29,改回日期:2009-02-27

本文以生物相容性优良的天然多糖海藻酸盐、壳聚糖为载体材料,以纳米 Fe₃O₄ 粉末为磁性材料,以地衣芽孢杆菌为细胞模型,采用脉冲电场液滴制备工艺,制备微尺度的磁性载细胞微胶囊,探讨了工艺条件对固定化地衣芽孢杆菌生长特性的影响,为其在工业上的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海藻酸钠(化学纯,西安精细化工厂),壳聚糖(浙江金壳生物化学有限公司),无水 CaCl₂(分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心),Fe₃O₄(分析纯,上海化学试剂采购供应站试剂厂),地衣芽孢杆菌(陕西微生物研究所),琼脂(食品级,福建石狮副食品加工厂),蛋白胨(生物制剂,天津市大茂化学试剂厂),NaCl(分析纯,天津市博迪化工有限公司),牛肉膏(生物制剂,北京奥博星生物技术有限责任公司),硫酸锰(分析纯,西安化学试剂厂)。

1.2 主要仪器

脉冲电场微球制备仪(自制),WZ-50C2 型注射泵(浙江大学医学仪器有限公司),XDS-1B 型倒置生物显微镜(重庆光电仪器总公司),BCM 生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),HI8314 便携式微电脑 pH 测试仪(北京哈纳科技有限公司),可微量移液器(20~200 μ L)(芬兰 Proline Pipette 公司),5415D Eppendorf 离心机(北京博益伟业仪器有限公司),YLE-1000 气浴恒温振荡器(江苏金坛市宏华仪器厂),LS-B35L 立式压力蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂),722 型可见光光栅分光光度计(上

海精密科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 磁性载细胞壳聚糖/海藻酸钙凝胶珠的制备

无菌操作条件下,将细胞与 3 mL 22 mg/mL 海藻酸钠溶液及 Fe_3O_4 微粒均匀混合,经静电液滴装置滴入 20 mg/mL CaCl_2 溶液中进行凝胶化反应,形成磁性载细胞海藻酸钙凝胶珠。胶珠与 30 mL 10 mg/mL 的壳聚糖成膜反应 15 min 形成磁性载细胞壳聚糖/海藻酸钙微胶囊。

1.3.2 培养基的配制

地衣芽孢杆菌斜面保存培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,NaCl 5 g,琼脂 15~20 g,硫酸锰 0.005 g, H_2O 1 000 mL,pH = 7.0。

地衣芽孢杆菌天然培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,NaCl 5 g,硫酸锰 0.005 g, H_2O 1 000 mL,pH = 7.0。

1.3.3 载磁微胶囊固定化细胞的培养

无菌条件下,将所得磁性载细胞微胶囊接入装有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37℃、200 r/min 恒温摇床中进行培养,隔时取样观察微胶囊形态与囊内细胞生长情况,并检测细胞生物量的变化。

1.3.4 细胞的游离培养

无菌条件下,取悬浮培养所得的种子液 6~12 mL,离心处理后,弃上清,将细胞接入装有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,同时加入 Fe_3O_4 粉末,于 37℃、200 r/min 恒温摇床中进行培养,隔时取样检测细胞生物量的变化。

1.3.5 微胶囊形态观察及粒径分布分析

形态观察:在生物倒置显微镜下观察磁性载细胞微球形态、粒径大小及细胞与磁性 Fe_3O_4 负载状态。

粒径分布分析:在生物倒置显微镜下,随机读取 40 个微球粒径,采用 SPSS 软件对粒径分布进行分析。

1.3.6 细胞生物量测定方法——比浊测定法^[7]

无菌操作移取 0.4 mL 磁性载细胞微胶囊,按体积比 1:2 比例加入破囊液进行破囊,以破囊液为参比液,使用 722 型分光光度计于 650 nm 处测定细胞光密度值。标准曲线方程为 $OD_{650} = 0.035\ 19C - 0.050\ 3$, $R^2 = 0.997\ 7$ 。式中, OD_{650} 为 650 nm 下细胞光密度值; C 为单位体积培养液中细胞个数,个/mL。

1.3.7 化学破囊方法^[8]

破囊液基本组成为 0.2 mol/L NaHCO_3 和 0.06 mol/L $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,pH7.8~8.2。将破囊液与壳聚糖/海藻酸钙微胶囊以体积比 10:1 混合,30 s 内可完成破囊操作。

2 结果与讨论

2.1 Fe_3O_4 对地衣芽孢杆菌游离生长特性的影响

Fe_3O_4 对地衣芽孢杆菌游离生长的影响如图 1 所示。结果表明,100 mL 培养基中, Fe_3O_4 添加量在 0~0.05g 范围内,地衣芽孢杆菌的生长曲线都接近重叠,且均呈现典型的微生物细胞“S 型”^[9] 生长特征。可见, Fe_3O_4 在细胞培养体系中的引入对细胞生长特性和状态无明显影响,具有良好的细胞相容性,可作为固定化细胞的磁导向材料。

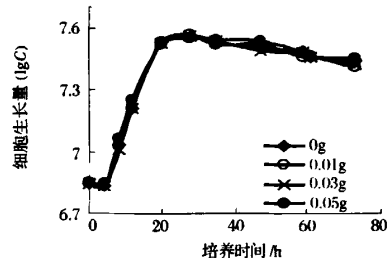


图1 Fe_3O_4 对地衣芽孢杆菌游离生长的影响

2.2 磁性载细胞微胶囊形态

隔时在倒置生物显微镜下观察囊内细胞的生长状况(见图2)。

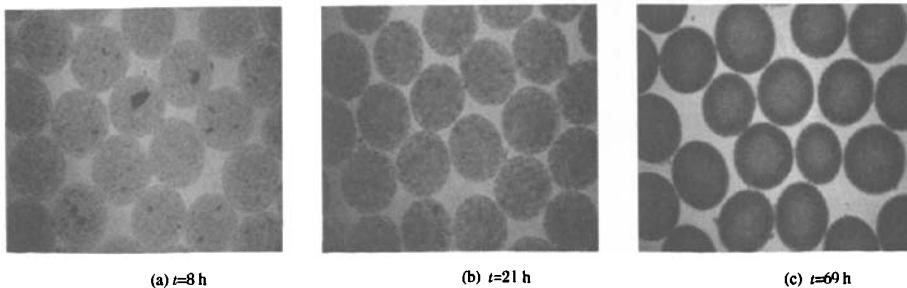


图2 微胶囊内地衣芽孢杆菌生长情况(光学显微镜照片 400×)

由图2显微照片可以看出,培养8 h时微球内部细胞呈丝状、脉络形态,能清晰观察到 Fe_3O_4 在细胞内聚集;培养21 h时微囊内细胞生长旺盛,各细胞团之间边界分明;培养69 h时微球颜色呈深褐色,囊内细胞仍生长良好,微囊形态完好。这是因为微囊内的孔状结构有利于细胞附着,增大了细胞生长的比表面积,说明微胶囊的三维支架结构能够给细胞提供一个良好的生长空间。

2.3 微囊化培养体系对地衣芽孢杆菌生长特性的影响

图3为游离培养和微囊化培养体系中细胞生长曲线的比较,2种培养体系中均添加0.03 g的 Fe_3O_4 。

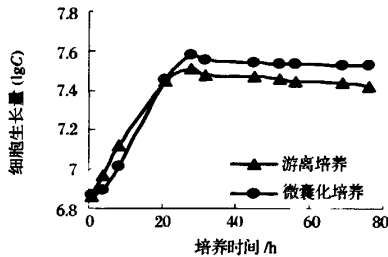


图3 微囊化培养与游离培养生长曲线

由图3可看出,微囊化培养初期细胞密度略低于游离培养,但到培养后期,最大细胞密度超过游离培养密度,微囊化培养生长曲线平稳,稳定期更长。这是由于微囊膜及微胶囊本身对培养基中营养物质扩散进入囊内具有一定的阻滞效应,同时微胶囊内部结构对细胞的生长也具有一定程度的空间限制作用,使得微囊化培养初期细胞浓度较游离培养略小。但当细胞经历了适应过程后,由于微胶囊能够给细胞的生长提供一个相对稳定、均匀的微环境,从而消除了代谢产物抑制作用,降低了细胞因机械搅拌剪切而导致的损伤,使细胞密度超过游离培养细胞密度。

由图4采用高压静电法制备微胶囊的粒径分布曲线可以看出:粒径分布符合正态分布,粒径分布窄,大多集中在340~360 μm 。窄的粒径分布保证了载细胞磁性微球在外磁场下的移动速度均一,无滞后,分离效率高。

2.4 磁性材料对微囊化地衣芽孢杆菌生长特性的影响

将磁材料 Fe_3O_4 与细胞一起封装在微胶囊内,在细胞培养过程中考察其生长特性。图5为微囊中添加不同磁含量地衣芽孢杆菌生长曲线图。由图5可

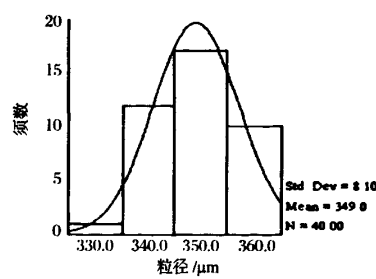


图4 微胶囊粒径分布曲线

看出,在 Fe_3O_4 引入及含量增加的条件下, Fe_3O_4 对地衣芽孢杆菌生长几乎没有影响。

地衣芽孢杆菌的培养约在28 h达到最大细胞密度,表1为此培养时间不同磁含量条件下微囊内细胞生长量。令不同磁含量下的微囊内细胞数目常用对数值 $\lg C$ 为 X ,假定 X 随磁含量 n 成正态分布。则, \bar{X}

$$= \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} = 7.535, \text{ 方差 } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.041, \text{ 当置信水平 } \alpha = 0.05, \alpha = 0.1 \text{ 时, 置信区间 } P \left\{ \left| \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}} \right| > \tau_{n-1, \alpha} \right\} \text{ 分别为 } (7.47, 7.60) \text{ 和 } (7.49, 7.58)。$$

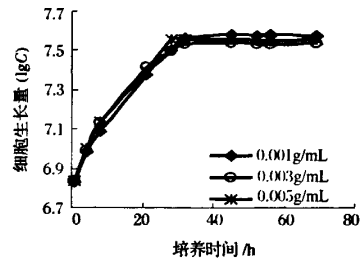


图5 磁含量对地衣芽孢杆菌微囊化培养生长特性的影响

表1 载磁固定化地衣芽孢杆菌最大细胞生长量测定数据(培养时间 $t = 28 \text{ h}$)

磁含量(n)/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\lg C$
0	7.579 777
0.001	7.504 810
0.003	7.495 447
0.005	7.558 477
均值	7.534 628

结果表明,90%的把握证明不同磁含量条件下细胞最大生长量在7.49~7.58。表明细胞培养体系中的 Fe_3O_4 的引入对整个微囊化培养体系中的细胞生长无明显影响, Fe_3O_4 具有良好的细胞相容性。

但 Fe_3O_4 添加量并非越多越好, Fe_3O_4 含量的过度增加会导致单位体积微球质量显著增大, 加快微球沉降过程, 使载磁微球在发酵容器中不能良好悬浮, 影响营养底物与代谢产物的良好传质; 另一方面, 增大的质量会减慢微球在外磁场中的移动速度, 不利于微球在发酵体系中的在线分离。因此, 在保证微球具有足够磁响应性的前提下, 本实验中选择原料液中最优 Fe_3O_4 含量 0.003 g/mL 。

2.5 磁场环境对微囊化地衣芽孢杆菌生长特性的影响

通过向发酵设备通入磁场, 使磁性微球携带细胞定向移动并附着在容器器壁上, 排出发酵物料后, 取消磁场, 在 Fe_3O_4 超顺磁性作用下, 微球重新良好悬浮于新鲜培养液中。可见磁场的引入使批次发酵成为可能。

图 6 为磁场环境对微囊化地衣芽孢杆菌生长特性的影响。结果表明, 与无外加磁场的培养样品相比, 细胞的生长曲线几乎一致, 说明培养体系外加磁场环境对地衣芽孢杆菌的生长并不产生影响, 细胞仍能正常生长, 这就为磁性微球在外加磁场下正常生长及在线分离提供一定的保障。

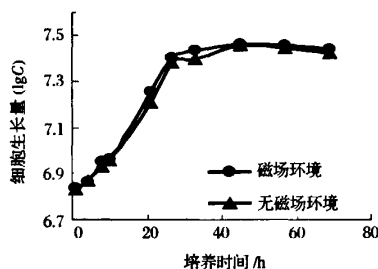


图6 磁场引力对地衣芽孢杆菌微囊化培养生长特性影响

2.6 初始接种密度对微囊化地衣芽孢杆菌生长特性的影响

图 7 为地衣芽孢杆菌不同初始接种密度下微囊化培养生长曲线图。从图 7 中可以看出, 当初始接种密度不大时, 如 1.5 倍菌浓 (6.24×10^6 个/mL) 与 1 倍菌浓 (4.16×10^6 个/mL) 相比较, 微囊化培养最大细胞量差异不大。3 倍初始接种密度 (12.48×10^6 个/mL) 下微囊化培养的最高细胞生物量则明显增加。

但初始接种密度并非越大越好, 一方面微胶囊内细胞的生长空间是有限的, 细胞初始接种密度过大, 培养后期由于生长空间限制会影响细胞在囊内正常

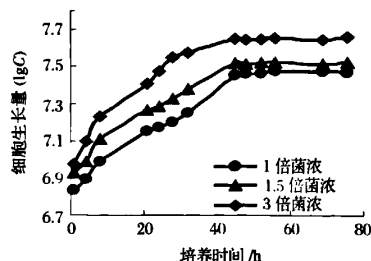


图7 不同初始菌浓对磁性微囊化地衣芽孢杆菌生长特性的影响

生长; 另一方面初始接种密度过大, 当微囊化细胞转入批次培养后, 微胶囊机械强度降低, 很容易破损。

故综合考虑细胞的生长及培养过程中细胞膜稳定性, 选择最优菌浓为 1.5 倍菌浓。

2.7 微球粒径对微囊化地衣芽孢杆菌生长特性的影响

图 8 为不同粒径微胶囊对地衣芽孢杆菌生长的影响。经过 70 h 培养, 平均粒径 $350 \mu\text{m}$ 的微胶囊体系中, 细胞生长量优于其他 2 种粒径样品。

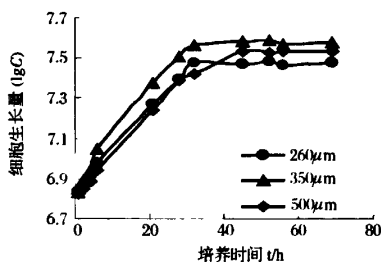


图8 不同微球粒径对地衣芽孢杆菌微囊化培养生长特性影响

作为细胞生长代谢的微尺度反应器, 大粒径微胶囊机械强度低, 培养后期和批次培养过程中观察到大粒径微胶囊破损严重。据文献报道^[10], 用电子显微镜观察包埋于聚丙烯酰胺凝胶中细胞生长情况, 发现接近凝胶表面处细胞生长旺盛, 而在凝胶中心处细胞数量较少, 说明增大微胶囊的比表面积有利于细胞生物量提高。这是由于微囊的粒径小, 营养物质等的扩散路径短, 氧气和营养物质能够迅速进入微胶囊, 同时细胞代谢产物也可及时地扩散到微囊外, 产物抑制作用减小。但是微囊粒径过小, 细胞生长空间有限, 不利于细胞生长。因此取最适地衣芽孢杆菌生长的微胶囊平均粒径为 $350 \mu\text{m}$ 。

3 结论

本文针对细胞发酵生产中面临的在线分离和连

续操作问题,通过负载磁性材料 Fe_3O_4 ,以具有选择性透过膜的微胶囊作为固定化细胞生长代谢的微反应器,其最大优点在于能够借助外部磁场,对磁性微胶囊进行简单方便的回收和磁性导向。以地衣芽孢杆菌为细胞模型,考察微胶囊形态,粒径分布,探索磁材料及壳聚糖/海藻酸钙微胶囊培养体系的生物相容性,并以磁性微胶囊体系对细胞生长特性的影响为指标,优化制备工艺条件。研究得出适宜细胞生长最优工艺条件为: Fe_3O_4 含量 0.003 g/mL ,初始接种密度 1.5 倍菌浓,微胶囊平均粒径为 $350 \mu\text{m}$ 。

研究发现 Fe_3O_4 及磁场的引入并不影响细胞的正常生长。初步论证了磁性壳聚糖/海藻酸钙微胶囊固定化细胞工艺进行在线分离,连续化操作的可行性。这就给磁性载细胞微胶囊体系在发酵工业的实际应用尤其是后续目标产物的分离纯化提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Atkinson B, Mavittuna F. Immobilized cell systems[J]. Biochem Eng & Biotech, 1991(2): 768
- 2 崔建涛,李建新,王育红,等. 细胞固定化技术的研究进展

- [J]. 农产品加工, 2007(1): 24 ~ 26
- 3 Willaert R, Nedovic V. Primary beer fermentation by immobilized yeast—a review on flavour formation and control strategies [J]. Chem Technol Biotechnol, 2006, 81: 1 353 ~ 1 367
- 4 张立央. SA/CS - CaCl_2 /PMCG 微胶囊及其固定化细胞的培养[D]. 杭州:浙江大学博士学位论文, 2003. 6
- 5 袁定重,张秋禹,张和鹏,等. 磁性高分子微球研究进展及其在生化分离中的应用[J]. 材料科学与工程学报, 2006, 24(2): 306 ~ 310
- 6 冠灵梅,李冰,郭祀远,等. 磁性壳聚糖微球的表征及其响应性[J]. 华南理工大学学报, 2006, 34(12): 92 ~ 96
- 7 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1999. 95 ~ 96
- 8 薛伟明,于炜婷,刘袖洞,等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(7): 1 342 ~ 1 346
- 9 沈萍,陈向东. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2006. 135 ~ 136
- 10 Morikawa Y, Ochiai K, Arube I, et al. Bacitracin production by whole cells immobilized in polyacryamide gel [J]. Antimicrobial, Agents and Chemotherapy, 1979(1): 126

The Growth Property of Cell Immobilized in Fe_3O_4 / Alginate-based Microcapsules

Wen Huiyun, Qi Zhitao, Xue Weiming, Xue Meichen, Sun Weina, Shen Yanzuo

(College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT Taking chitosan and sodium alginate as the carrier, nano- Fe_3O_4 as the magnetic material, *B. licheniformis* as the cell model, magnetic microcapsule which has super-magnetism was prepared by the Impulsive Electrostatic Preparation process. Choosing the growth of *B. licheniformis* as the detecting target, the optimum condition to prepare magnetic immobilized *B. licheniformis* were as follows: Fe_3O_4 concentration 0.003 g/mL ; the initial inoculation density was 1.5 times (6.25×10^6 cells/mL); the average diameter of magnetic microcapsules were $350 \mu\text{m}$. It also showed that the introduction of magnetic field had no significant effect. The study proved the possibility to separate on-line of the magnetic material and immobilized cell Fe_3O_4 chitosan/calcium alginate microcapsules and kept continuous operation.

Key words chitosan, sodium alginate, Fe_3O_4 , immobilized cells, microcapsule

行 业 动 态

我国首条百万吨生物基化工醇生产线将于 2011 年投产

我国首条百万吨生物基化工醇生产线将于 2011 年建成投产。该项目经国家发改委和国家环保总局批准,由长春大成集团投资建设,位于吉林省长春市东北部的兴隆山镇。

该项目具有完全自主知识产权,在生物基化工醇的制备、合成工艺、产品分离等关键环节均实现了新的技术突破,单位体积生产能力增加 5%,生产成本降低 10%,能够保证连续生产时数达到 330 天/年。2011 年生产线建成后,将实现产值 65 亿元,利税 15 亿元。该项目完工后不仅是我国首条百万吨生物基化工醇生产线,在世界上也处于领先地位。

生物基化工醇是以玉米等为原料开发石油化学品替代物,可最大限度地利用农业资源替代石油资源,走出一条可再生资源的可持续发展之路。发展生物基化工醇,将有助于减少对石油的依赖,减少石油的进口,在一定程度上缓解国内石油供应的压力。