

生物微胶囊固定化 *Candida krusei* 的研究

陈 国¹, 沈冬钱², 张光亚¹, 方柏山¹, 姚善泾²

1(华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建泉州, 362021)

2(浙江大学化学工程与生物工程系, 浙江杭州, 310027)

摘要 以一种新型 NaCS/PDMAAC (sodium cellulose sulfate/ poly[dimethyl(diallyl)ammonium chloride]) 生物微胶囊体系包埋耐高渗型产甘油酵母 *Candida krusei* ICM-Y-05。较详细研究了 *C. krusei* 在囊内的生长曲线, 以及葡萄糖和甘油在囊内外随培养时间变化的情况。结果表明, 经生物微胶囊包埋后的细胞在囊内具有二次生长现象。对固定化细胞培养过程中传质系数的测定表明, 细胞在囊内的生长对胶囊传质特性有较大的影响, 而囊内活细胞数随培养时间的变化并没有减少的趋势, 从侧面证明了传质会部分改变囊内细胞生理代谢特性。

关键词 微胶囊, 包埋, 细胞固定化, 细胞培养, 传质系数

微胶囊固定化细胞, 以其能获得高密度细胞、重复利用、高产率及低污染的优势, 已经成为生物工程领域研究的一个热点^[1]。纤维素硫酸钠(NaCS)/聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDMAAC)微胶囊以其制备简单、较好的稳定性和良好的生物相容性^[2], 成为中空液态微胶囊的一个典型代表。利用该体系包埋不同细胞已经取得一些比较成功的研究成果, 但是在相关文献中, 对囊内外细胞、底物、产物的代谢情况以及细胞生长的胶囊传质特性的改变等报道极少。

甘油是一种比较常见的化工原料, 有着广泛的用途。利用耐高渗酵母发酵葡萄糖生产甘油的研究已经有较多报道^[3, 4], 但是利用固定化细胞发酵生产甘油的报道并不多见。考虑到甘油是一种小分子的物质, 其分子质量小于 NaCS/PDMAAC 胶囊的截留分子质量^[5], 可以在囊内外自由进出。因此本文将耐高渗型产甘油酵母 *C. krusei* 包埋在微囊内, 使其不断利用葡萄糖, 生成甘油, 而细胞重复利用, 同时发挥胶囊的截留作用, 减轻下游甘油分离的负担。本文主要考察了 NaCS/PDMAAC 胶囊包埋耐高渗产甘油假丝酵母 *C. krusei* 细胞后, 菌体的生长、底物的消耗、产物的积累、胶囊传质系数和囊内活菌数等一系列特性随培养时间的变化情况。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

NaCS 由浙江大学生物工程研究所合成, 取代度

为 0.36; PDMAAC (M_w 200~350 ku, 20% 水溶液) 购自 Aldrich 公司; 不同分子质量的聚乙二醇购自上海生工。其余试剂均为市售分析纯。

耐高渗产甘油假丝酵母 *C. krusei* ICM-Y-05 由中科院过程工程研究所提供, 浙江大学生物工程研究所保存。

平板培养基: 葡萄糖 100 g/L、玉米浆 3.0 g/L、尿素 3.0 g/L、琼脂 20 g/L。

种子斜面培养基: 葡萄糖 200 g/L、玉米浆 3.0 g/L、尿素 3.0 g/L、琼脂 20 g/L。

种子培养基: 葡萄糖 100 g/L、玉米浆 3.0 g/L、尿素 3.0 g/L。

发酵培养基: 葡萄糖 200 g/L、玉米浆 3.0 g/L、尿素 2.5 g/L、 KH_2PO_4 3.5 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的微囊化

细胞包埋过程中的所有操作均在无菌条件下进行, 细胞不进行洗涤而直接包埋, 以减少染菌的几率。具体操作如下: 首先在 200 mL 无菌水中加入 50 mL 的 *C. krusei* 种子培养液, 将种子培养液稀释到原浓度的 1/5。取 100 mL 稀释后的种子液与 4g NaCS 混合, 搅拌均匀, 用于滴制胶囊。此溶液脱气后, 通过气流微囊发生器滴入质量浓度为 6% 的 PDMAAC 溶液中。室温下温和搅拌, 反应 30 min 后, 洗去表面残余的 PDMAAC, 即得待培养的含细胞微胶囊。制备微囊化细胞的装备如图 1 所示。

1.2.2 细胞培养

种子液制备: 将酵母 *C. krusei* 种子从斜面接种到平板活化后, 转接到 100 mL 种子培养基摇瓶中,

第一作者: 博士, 讲师。

* 本课题受福建省青年人才项目 (2006F3080), 华侨大学高层次人才科研启动基金 (06BS214) 支持

收稿日期: 2006-12-01, 改回日期: 2007-01-09

35℃下,转速 150r/min 培养 24h,即为细胞种子液。

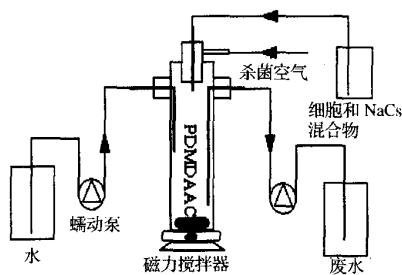


图1 胶囊的自动滴制示意图

细胞游离培养:将 5 mL 种子培养液接种到 50 mL 发酵培养基中(pH=4.5),35℃下,转速 150 r/min 摇床培养 120 h。

固定化细胞培养:将 25 mL 包菌后的胶囊,加入到含 50 mL 培养基(pH=4.5)的摇瓶中,转速 150 r/min 摇床培养 120 h。

1.2.3 传质系数的测定

利用多个摇瓶同时培养测定发酵过程中胶囊传质系数,每隔一定的培养时间,取出其中一个摇瓶中的胶囊,用去离子水洗涤多次后,将胶囊浸泡在 0.9%的 NaCl 溶液中,每隔一段时间更换新鲜的 NaCl 溶液,直到 NaCl 溶液中不再检测到葡萄糖为止。用差量法量取 30mL 胶囊,向其中加入 30 mL 葡萄糖溶液,25℃下快速搅拌,每隔一定时间取样 50 μ L。测量样品的葡萄糖浓度,可得葡萄糖由囊外传递到囊内的动态扩散曲线。假设胶囊各向同性,快速搅拌下,忽略液膜传质阻力情况下,按方程 1 计算其传质系数^[6] k ,

$$\frac{C}{C_0} = \frac{C_{eq}}{C_0} + \left(1 - \frac{C_{eq}}{C_0}\right) \exp\left[-\left(\frac{1}{V_0} + \frac{1}{V_c}\right)kAt\right] \quad (1)$$

式中 C 是主体溶液的浓度, C_{eq} 平衡时主体溶液的浓度, C_0 是主体溶液的初始浓度, V_0 是溶液的体积, V_c 胶囊的体积, k 是传质系数, t 是时间, A 是胶囊的表面积定义为 $6 V_c/D$, D 为胶囊的直径。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量、葡萄糖浓度和甘油浓度的测定

生物量的测定采用比浊法,利用预先建立的 650 nm 下浊度与细胞干重之间的关系计算细胞干重。葡萄糖浓度的测定采用 DNS 法。甘油含量测定采用改进的高碘酸氧化滴定法。

1.3.2 囊内囊外待测菌液的制备

囊外的菌液的制备:稀释一定倍数,同上述方法

测定菌浓,离心后,测葡萄糖和甘油浓度。

囊内菌液的制备:取 50 颗胶囊,吸干表面的液体,放入试管中,按实际计算的需要,加入一定体积的无菌水,计算胶囊的稀释倍数。用玻璃棒充分破碎胶囊,让胶囊内含物释放,可得到一定稀释比例的囊内菌悬液。然后,可按 1.3.1 方法测定囊内菌浓、葡萄糖和甘油浓度。

1.3.3 活细胞数的测定

取准备好的囊内菌悬液,用无菌水进行系列稀释后,取 0.1 mL 放入平板培养基,表面涂匀后,放入培养箱中,35℃下,24h 后通过数菌落得到活菌数。

1.3.4 相对总浓度的计算方法

由于囊内的初始葡萄糖浓度为 0,随着发酵的进行,葡萄糖扩散进入囊内,甘油扩散出囊外,囊内与囊外的浓度并不一致。为便于比较,我们假设囊内的浓度为 0,将囊内的浓度折算为囊外的浓度,得到相对总浓度。这样便于与游离培养比较葡萄糖的消耗趋势和甘油的生成趋势。葡萄糖和甘油的相对总浓度分别按方程 5.2 和 5.3 式进行,

$$C_{g(glu)} = (C_{m(glu)} \times V_m + C_{c(glu)} \times V_c) / V_m \quad (2)$$

$$C_{g(gly)} = (C_{m(gly)} \times V_m + C_{c(gly)} \times V_c) / V_m \quad (3)$$

$$Y_{gly/glu} = \frac{C_{g(gly)}}{C_{i(gly)} - C_{g(gly)}} \times 100\% \quad (4)$$

$$P = S_{g(gly)} / t \quad (5)$$

式中 $C_{g(glu)}$ 、 $C_{m(glu)}$ 和 $C_{c(glu)}$ 分别是葡萄糖的相对总浓度、葡萄糖在囊外培养基中的浓度、葡萄糖在囊内的浓度; V_m 和 V_c 分别为培养基体积和胶囊体积; $C_{g(gly)}$ 、 $C_{m(gly)}$ 、 $C_{c(gly)}$ 和 $C_{i(glu)}$ 分别是甘油的相对总浓度、甘油在培养基中的浓度、甘油在囊内的浓度和葡萄糖在培养基中的初始浓度; t 是培养时间, $Y_{gly/glu}$ 表示甘油 / 葡萄糖转化率, P 表示甘油产率。

2 结果与讨论

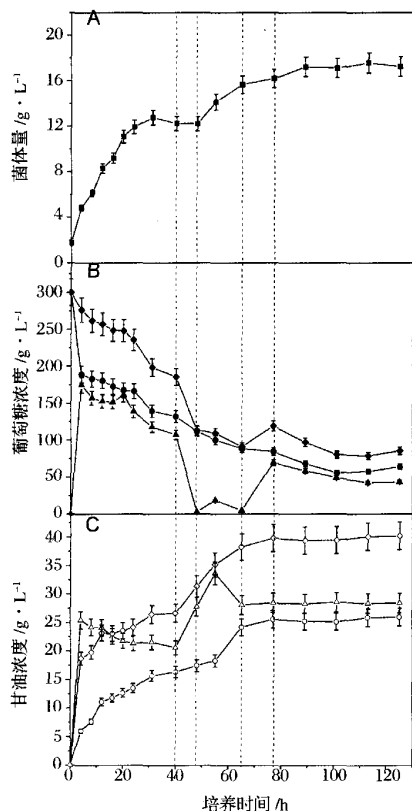
2.1 囊内细胞生长、底物消耗和产物生成曲线

图 2 中详细描述了细胞经包埋后,细胞在囊内的生长、囊内囊外葡萄糖和甘油的变化情况。

图 2(A)表示了细胞在囊内的生长情况。从图中可以看出,细胞在囊内的生长可以区分为 2 个阶段,表现为二次生长的特性,从 0~48h 为第 1 次生长,从 48~120h 为第 2 次生长。

图 2(B)显示了囊内外葡萄糖浓度及折算后的总糖浓度随时间变化的情况。囊内的初始葡萄糖浓度近似为 0,囊外的葡萄糖迅速向囊内扩散,故初始阶

段囊外葡萄糖浓度快速下降,囊内葡萄糖浓度快速上升,同时囊内的葡萄糖不断被细胞消耗,一定时间后囊内外葡萄糖浓度的变化形成动态平衡。在40h到48h,囊内的葡萄糖浓度迅速下降,说明菌体消耗葡萄糖的速率大于葡萄糖扩散进入囊内的速率,囊内菌体的代谢处于非常旺盛的时期,葡萄糖向囊内的扩散不能满足菌体消耗的需求。随着囊内糖浓度的快速降低,抑制了菌体的进一步生长和继续快速的代谢,菌体的生长和死亡达到一个平衡,于是呈现出第1次生长静止期的特征。菌对糖的消耗需求随之降低,同时葡萄糖继续向囊内扩散,相对应的囊内菌体逐渐开始第2次生长。但是囊内极低的葡萄糖浓度已经不可能为菌体提供一个高渗的环境,菌体发生了相应的代谢迁移现象,表现为这一阶段菌产甘油的效率低于第1次生长阶段。



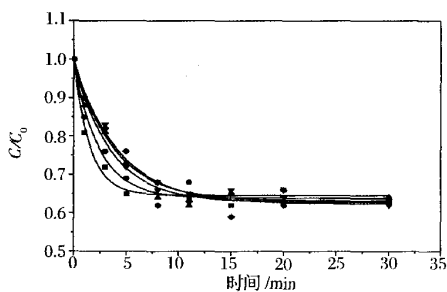
囊内浓度:细胞量(■),葡萄糖(▲),甘油(△);
囊外浓度:葡萄糖(●),甘油(○);
总相对浓度:葡萄糖(◆),甘油(◇)

图2 微胶囊包埋培养 *C. krusei* 的菌体生长、葡萄糖及甘油在囊内外浓度变化

图2(C)表示了囊内和囊外甘油浓度及折算后的总甘油浓度随时间变化的情况。由图可知,初始阶段

也是甘油快速生成的阶段。从40~56h,是细胞快速生产甘油的阶段,甘油产生的速率高于甘油从囊内向囊外的扩散速率,致使囊内和囊外甘油浓度迅速增长,此阶段也是葡萄糖消耗最快的阶段。从56~65h,甘油产生速率降低,甘油向囊外的扩散速率比甘油的生产速率快,造成囊内的甘油浓度下降,囊外的甘油浓度快速增加。65h后甘油的产生速率及葡萄糖的消耗速率明显减慢。葡萄糖的消耗速率低于葡萄糖从囊外到囊内的传递速率,于是囊内的葡萄糖浓度又逐渐增高,直至达到一个新的平衡。

图2中的菌体生长、葡萄糖及甘油浓度变化曲线,是菌体生长及底物产物在囊内外扩散相互作用、动态平衡的结果。与游离培养相比较,固定化后葡萄糖的消耗与之相近。游离培养时葡萄糖浓度从 $200 \pm 10.5 \text{ g/L}$ 变化到 $0 \pm 5.0 \text{ g/L}$,而固定化后经折算的总葡萄糖是从 $300 \pm 15.0 \text{ g/L}$ 降低到 $100 \pm 5.0 \text{ g/L}$ 。由于发酵液体积相同,所以均消耗了约 200 g/L 葡萄糖。固定化细胞及游离细胞培养最终甘油浓度均为 40 g/L 左右,但是固定化培养只需要 76 h 即可,而游离培养约需要 96 h 。最终的囊内菌体密度为 $16 \pm 1.3 \text{ g/L}$,也远高于游离培养时的菌体密度 $7 \pm 0.5 \text{ g/L}$ 。Liu 等^[4]人在游离培养时得到的甘油浓度为 40 g/L ,所需要的发酵时间为 $4 \sim 5 \text{ d}$,转化率与本文相当。所以固定化有利于产生较高的菌浓,缩短发酵时间,获得较高的甘油产率,但是囊内较高的菌浓同时也对底物的传递提出了更高的要求,而且固定化后有利于细胞的重复利用。



0h(■), 33h(●), 56h(▲), 68h(▼), 80h(◆), —(计算值)

图3 含菌胶囊经不同培养时间后葡萄糖透过胶囊的扩散动力学曲线

2.2 固定化后底物透过胶囊传质系数

囊内葡萄糖浓度的迅速降低,一方面是因为囊内菌的生长,囊内菌浓不断增加,于是要求单位时间内从囊外进入囊内的葡萄糖增加,而囊内外的葡萄糖浓

度差却逐渐变小,传质的推动力变小;另一方面是由于胶囊本身的扩散系数的降低所引起。图3表示了随着细胞在囊内生长,葡萄糖的动态扩散曲线。由图3可知,随培养时间的增加,囊内菌浓不断增加,底物透过胶囊的传递变慢,达到底物动态平衡的时间变长。这可能是由于菌体在囊内生长,随着囊内营养的限制,细胞越来越集中于膜壁生长,细胞密度在胶囊内由外向内逐渐降低^[7,8]。由图中底物透过胶囊的动态扩散曲线,根据公式1可计算得底物由囊外向囊内传递的传质系数。

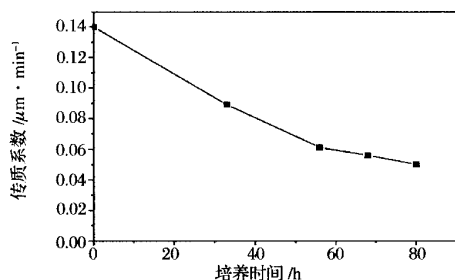


图4 葡萄糖透过胶囊的传质系数随培养时间的变化

图4表示了传质系数随时间的变化情况。从图4可看出,葡萄糖透过胶囊的传质系数逐渐减小,在培养前期减小的幅度较大,后期逐渐趋于平稳。因为细胞开始阶段生长比较旺盛,菌浓相对变化较大,所以会强烈影响传质系数。随着培养时间的增加,细胞越来越集中于膜壁附近,相当于囊壁不断增厚,表现为传质阻力不断增加,传质系数逐渐变小,膜壁附近的细胞密度与最终底物传递进入的速率达到平衡。

2.3 固定化培养过程中囊内活细胞数

为了解囊内细胞二次生长是否由于细胞活性降低而引起,考察了囊内活细胞数量随培养时间变化的情况,结果如图5所示。

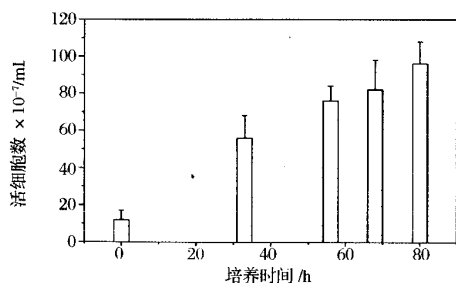


图5 囊内活细胞数随培养时间的变化

结果表明,随培养时间增加,活细胞数量并没有减少,反而还在增加。所以我们认为细胞二次生长的原因可能是由于扩散引起囊内微环境的变化,引起细胞代谢迁移而造成的。

3 结 论

通过 NaCS/PDMDAAC 生物微胶囊包埋耐高渗酵母 *C. krusei* 的培养过程的考查,详细描绘了囊内细胞浓度、囊内外葡萄糖和甘油浓度随培养时间的变化,发现使用生物微胶囊包埋 *C. krusei* 时会出现二次生长的现象。通过对培养过程中胶囊传递特性的变化和细胞随培养时间在囊内生长的特性的分析,一方面胶囊传质系数随培养时间增加不断减小,另一方面囊内活细胞数随培养时间增加不断增加。因此认为由于传递问题导致的囊内底物浓度偏低不能为细胞提供高渗环境,导致细胞因外界环境变化而产生代谢迁移,是出现细胞二次生长的主要原因。

参 考 文 献

- 1 Park J K, Chang H N, Microencapsulation of microbial cells[J]. Biotechnol Advan, 2000, 18: 303~319
- 2 姚善泾. 新型生物微胶囊体系的生物相容性研究[J]. 生物工程学报, 1998, 14(2): 193~197
- 3 Wang Z X, Zhuge J, Fang H Y, et al, Glycerol production by microbial fermentation: a review[J]. Biotechnol Adv, 2001, 19: 201~223
- 4 Liu H J, Liu D H, Zhong J J, Novel fermentation strategy for enhancing glycerol production by *Candida krusei*[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19: 1 615~1 619
- 5 Zhang J, Yao S J, Guan Y X. Preparation of macroporous sodium cellulose sulphate/poly (dimethyl -diallylammonium chloride) capsules and their characteristics [J]. J Membrane Sci, 2005, 255: 89~98
- 6 Lewińska D, Rosiński S, Hunkeler D, et al. Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules[J]. J Membr Sci, 2002, 209: 533~540
- 7 Walsh P K, Malone D M, Cell growth patterns in immobilization matrices[J]. Biotech Adv, 1995, 13: 13~43
- 8 Monboudette H G, Sayles G D, Ollis D F. Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behavior: model and experiment[J]. Biotechnol Bioeng, 1989, 35: 609~629

(下转第 21 页)

- 10 Czuchajowska Z, Otto T, Paszczynska B, Bsik B-K. Composition, thermal behavior, and gel texture of prime and tailings starches from garbanzo beans and peas [J]. Cereal Chemistry, 1998, 75: 466~472
- 11 傅翠真, 李安智, 张丰德. 食用豆种质资源品质鉴定及营养特性[J]. 中国农业科学, 1994, 27: 33~38
- 12 Hoover R, Sosulski F W. Composition, structure, functionality, and chemical modification of legume starches; a review[J]. Canadian Journal of Physiology Pharmacology, 1991, 69: 79~92
- 13 Tester R F, Karkalas J. The effects of environmental conditions on the structure features and physico-chemical properties of starches [J]. Starch, 2001, 53: 513~519
- 14 Norman W H, Cheetham L T. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study [J]. Carbohydrate Polymers, 1998, 36: 277~284
- 15 Kosenko L V. Comparative characteristics of carbohydrate binding by lectins from broad bean, pea, common vetch, and lentil seeds [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2002, 49: 641~646
- 16 Hoover R, Sosulski F W. Effect of crossing-linking on functional properties of legume starches [J]. Starch, 1986, 38: 149~155

Physicochemical Properties of Starch from Four Cultivars Faba Bean in China

Pan Yuanfeng¹, Tang Shuze¹, Tan Bin²

1(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

2(Academy of State Administration of Grain of People Republic of China, Beijing 100037, china)

ABSTRACT Four high yield and quality cultivars of faba bean, Chongli, Maya, Baipidou and Touxinlv, to analyze their starch physicochemical properties respectively. Physicochemical properties of the selected faba bean were analyzed. Faba bean starch granular appears round, oval-shaped or irregular sphere, with the size of 12~32 μm . The pasting had of 30 mL to 32 mL, with better than cereal starch past but worse than potato starch past. The past transparency was better than cereal starches but worse than potato starch. Water binding capacity and amylose content higher was than pea and lentil starches.

Key words faba bean, starch, physicochemical properties

(上接第 16 页)

Study on Immobilization of *Candida krusei* by Biocapsule

Chen Guo¹, Shen Dongqian², Fang Baishan¹, Peng Yiqiang¹, Yao Shanjin²

1(Key Laboratory of Industrial Biotechnology(Fujian Province University), Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

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

ABSTRACT Encapsulation of osmotic tolerant yeast *Candia krusei* ICM-Y-05 by a novel biocapsule system composed of NaCS/PDMAAC (sodium cellulose sulfate/ poly [dimethyl(diallyl) ammonium chloride]) was studied in this work. The growth of *C. krusei* in capsules, and the variation of glucose and glycerol concentration inside/outside capsules associated with the cultivation time were described in detail. The diauxic growth phenomenon of encapsulated cells was observed according to the growth curve. The transfer coefficients of capsules were measured at different culture time. The results showed the obvious effect of cell growth on transfer characteristics of capsules. At the same time, according to the experiment, the number of viable cell in capsules did not decrease with the culture time, which partly verified metabolism properties of cells changing partially due to transfer limitation.

Key words capsule, encapsulation, immobilization, culture, transfer coefficient