

# 聚氨酯泡沫半固定化培养盘基网柄菌

梁兴超<sup>1</sup>, 卢英华<sup>2</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 徐志南<sup>1\*</sup>

(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-chao<sup>1</sup>, LU Ying-hua<sup>2</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, XU Zhinan<sup>1</sup>

(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* ( $4.56 \times 10^7$  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*)<sup>[1]</sup>。作为一种异源蛋白表达载体, 盘基网柄菌 *N*-*O*-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<sup>[2]</sup>, 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*<sup>[3]</sup>, 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<sup>[2]</sup>。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<sup>[4]</sup>, 倍增时间约为 8~12 h 在 FM<sup>[5]</sup> 和 SH<sup>[6]</sup> 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: [zxu@zju.edu.cn](mailto:zxu@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<sup>[7-10]</sup>。

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, 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<sup>[11]</sup>和醋酸, 价格低廉, 适合作为工业化固定化载体等特杆菌<sup>[12]</sup>。

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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.99 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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  $\text{kg}/\text{m}^3$ , 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。

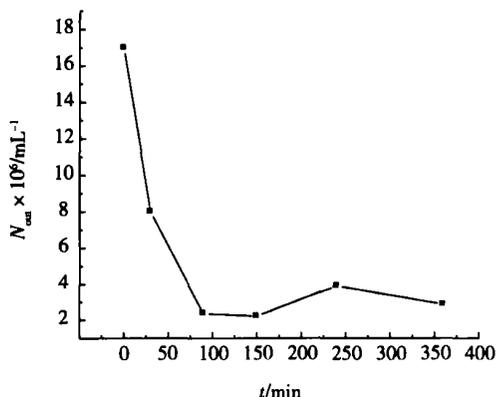


图 1 盘基网柄菌细胞吸附曲线

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。

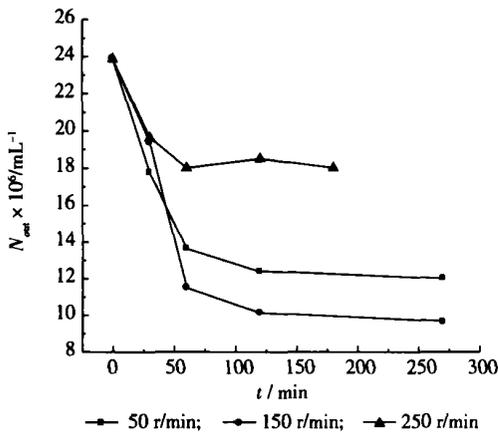


图 2 转速对细胞吸附的影响

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。

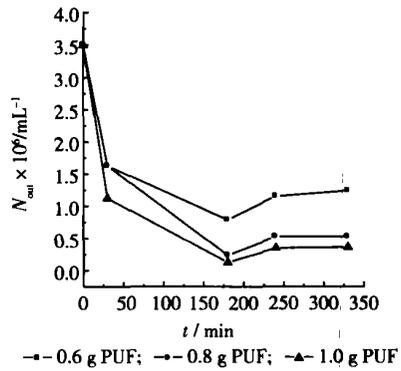


图 3 载体添加量对细胞吸附的影响

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

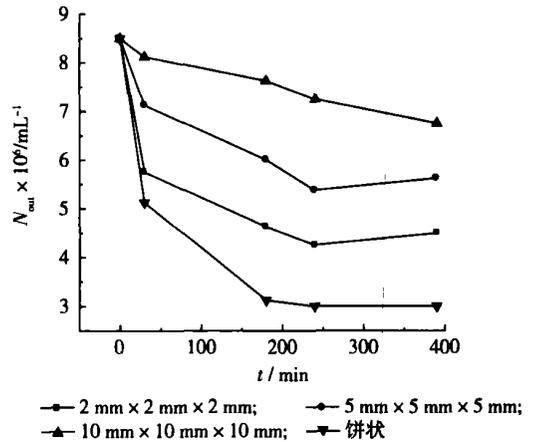


图 4 载体尺寸对细胞吸附的影响

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

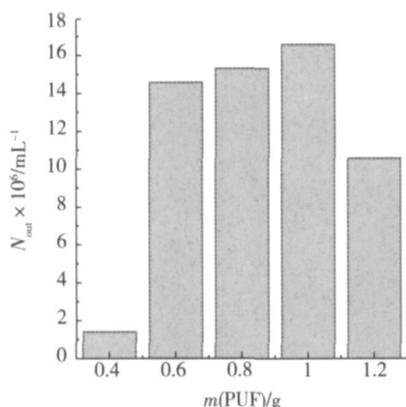


图5 载体添加量对细胞生长的影响

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)。

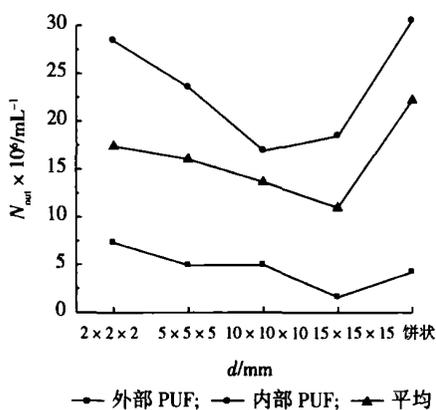


图6 载体尺寸对细胞生长的影响

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  $4.56 \times 10^7$  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  $4.56 \times 10^7$  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)