

海藻酸钠/壳聚糖微胶囊固定化大肠杆菌的研究

付颖丽 雄 鹰 刘袖洞 于炜婷 王一力 虞星炬 马小军*

(中科院大连化学物理研究所生物医用材料工程组,大连 116023)

关键词 微胶囊,壳聚糖,大肠杆菌

中图分类号 R318 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0239-03

本文以大肠杆菌 DH5 α 为模型体系,探索了大肠杆菌 DH5 α 用海藻酸钠/壳聚糖(ACA)微胶囊培养的可行性,并观察了微囊化大肠杆菌 DH5 α 细胞生长与物料渗透性能,通过将 ACA 微胶囊移植到实验组小鼠体内,考察了 ACA 微胶囊作为口服药物载体的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

壳聚糖,本实验室改性所得;海藻酸钠,Kelco Div of Merck Co. Inc. USA;其它试剂均为国产分析纯。大肠杆菌 DH5 α ,长春生物制品所;LB 培养基,华美生物制品公司提供。昆明系小白鼠 18~20g,解放军大连高等医学专科学校实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的微囊化 参照王勇等^[1,2]制备 ACA 微胶囊的方法略加改动。将悬浮培养所得的对数生长期的大肠杆菌 DH5 α 经离心分离后,与浓度为 1.5%(W/V)的海藻酸钠均匀混合。在高压电场作用下滴入 100mmol/L 的氯化钙溶液中进行凝胶化反应,制备海藻酸钙凝胶珠,然后与 0.3%(W/V)的壳聚糖溶液进行成膜反应,最后用 0.15%(W/V)的海藻酸钠覆膜,以 55mmol/L 的柠檬酸钠液化其内核。

1.2.2 微囊化大肠杆菌的培养 将 ACA 微囊化的大肠杆菌 DH5 α 放入 250mL 的锥形瓶中,加入 LB 培养基适量,于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中培养,隔时取样。

1.2.3 大肠杆菌 DH5 α 生长曲线测定方法 采用菌体光密度法测定其生长曲线。将取出的 ACA 微胶囊样品机械破碎后,用柠檬酸钠液化,离心去除微胶囊碎片,收集菌体,于波长 600nm 处测定光密度值。

1.2.4 ACA 微胶囊的通透性能 以牛血红蛋白(分子量 68 000)为模型物质,将 2mL 包埋有大肠杆菌 DH5 α 的 ACA 微胶囊放于 50mL 离心管中,加入 20mL 浓度为 0.4mg/mL 的牛血红蛋白溶液,初始吸光度 A_0 。隔时取样,通过测定吸光度分析牛血红蛋白溶液的浓度变化,记为 A_t 。

1.2.5 动物口服实验 将 ACA 微胶囊口服灌注到小鼠胃肠内,隔时处死小鼠并解剖小肠取样,考察微胶囊在动物肠胃内的粘附性能。以同样方法考察 APA 微胶囊在动物肠胃内的粘附性能。

2 结果

2.1 大肠杆菌 DH5 α 在 ACA 微胶囊内的生长特性

为了解大肠杆菌 DH5 α 在微胶囊内的生长、繁殖、代谢以及死亡的动态过程,以传统的海藻酸钙凝胶珠固定化培养以及悬浮培养作对照,考察微囊膜的引入对大肠杆菌 DH5 α 生长的影响。将微囊化的大肠杆菌分成 19 等份,分别加入相同体积的 LB 培养基,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养,每隔 2 h 取样,按上述方法破碎后,测定大肠杆菌 DH5 α 的密度,结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出:ACA 微囊化培养的大肠杆菌 DH5 α 的生长曲线同悬浮培养和海藻酸钙凝胶珠固定化培养一样,均呈现“S 型”。但是微囊化培养以及海藻酸钙凝胶珠固定化培养的细胞密度总体上低于悬浮培养得到的细胞密度,生长曲线较为舒缓。悬浮培养 12 h 后,大肠杆菌 DH5 α 开始进入死亡期,细胞密度下降很快,而微囊化培养时,大肠杆菌处于稳定期的时间明显长于悬浮培养和凝胶珠固定化培养。在进行长期培养时(>30h)发现,微囊化培养的大肠杆菌 DH5 α 的细胞密度基本维持在稳定期时的细胞密度,表明微胶囊能够为大肠杆菌 DH5 α 提供一个较为稳定的生长微环境。

实验还发现:大肠杆菌 DH5 α 在微囊化培养一段时间后,菌体开始聚集,出现大小不一的团块,并保持一定时期(见图 2)。与悬浮培养和凝胶珠固定化培养相比,由于微囊膜能提供稳定的、均匀的微环境,对细胞具有支持和保护作用^[3],因此微囊化培养有利于大肠杆菌 DH5 α 的长期生长和生产。

2.2 ACA 微胶囊的通透性能

微胶囊膜的通透性能直接影响到包埋物的营养供给和代谢产物的跨膜传递,因此细胞培养用微胶囊应满足:维持

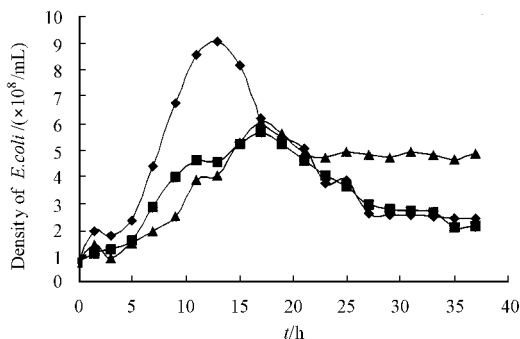


图 1 大肠杆菌的生长动力学曲线

Fig.1 Growth kinetics curves of *E. coli*

◆ Suspension ■ Gel bead ▲ Microcapsule

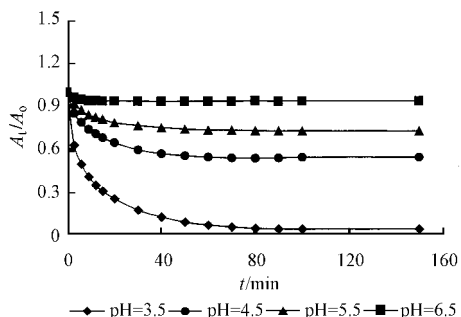


图 3 壳聚糖溶液 pH 值对微胶囊通透性能的影响

Fig.3 Effect of pH of chitosan solution on the permeability of microcapsules

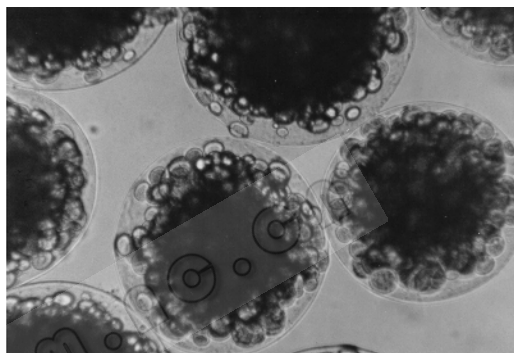
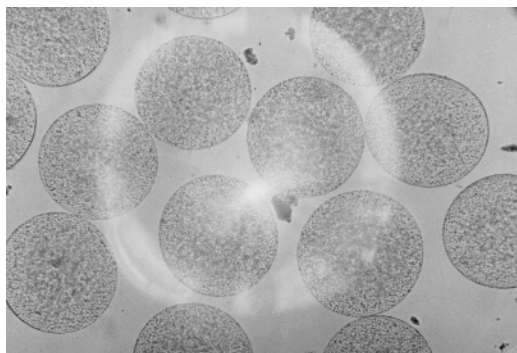


图 2 微囊化大肠杆菌培养前(左 20×)和培养后(右 50×)

Fig.2 Culture of microencapsulated *E. coli*, pre-culture (left 20×), post-culture (right 50×)

细胞生长和代谢的营养物质以及小分子的细胞表达产物能够自由通过微囊膜,而细胞以及大分子产物等能被截留在微胶囊内。为此,本实验对包埋有菌体的微胶囊通透性能进行了考察。由于微生物对 pH 值的要求较为苛刻,而且 pH 值对微胶囊的成膜反应有重要影响,因此本文主要给出了不同 pH 值壳聚糖溶液制备微胶囊的通透性能。由图 3 可以看到,随着壳聚糖溶液 pH 值的升高,微囊膜对牛血红蛋白的通透性能降低。

对于细胞培养来说,通透性能好,营养物质通过微囊膜容易,对细胞的生长有利,因此,应适当降低壳聚糖溶液的 pH 值,但同时细胞对 pH 值的敏感性又意味着单纯考虑通透性的要求是不够的,所以必须综合考虑 pH 值对细胞活性及微囊膜通透性的影响。

2.3 动物实验结果

药物载体的粘附性能是决定药物载体停留时间长短的关键性因素,口服药物载体在肠道内的停留时间长短,直接影响到药物的利用度和给药频率,停留时间越长,药物的作用时间越长,给药频率越低。为考察 ACA 微胶囊的粘附性能,分别将粒径为 400 μ m 的 ACA 和 APA 微胶囊 0.2mL 通过灌注的方式,灌注到小鼠的胃中,隔时处死小鼠并解剖小肠与胃,于显微镜下观察。实验发现 5h 后 APA 微胶囊已经全部排出小肠,而 ACA 微胶囊 48h 后在小肠部位仍停留很多且保存完好,说明 ACA 微胶囊具有较强的亲粘膜性能,并能经

受胃液和肠液的长时间作用。上述实验结果表明:ACA 微胶囊具有较强的亲粘膜性能,可望成为口服药物的良好载体。

3 讨论

目前,基因工程药物大多是以大肠杆菌为基因载体,并通过工程菌的悬浮培养技术生产。鉴于培养过程采用批式操作,目的基因表达产物的分离纯化步骤繁多,不仅使工业生产存在很多不便,其高成本也限制了基因工程药物的推广应用。如果在生产基因工程药物时,利用微胶囊对基因工程菌进行固定化培养,可以大大简化目的产物的分离纯化步骤,甚至直接利用微囊化工程菌作为一种口服药剂直接使用,既无需分离纯化,又发挥了微胶囊的控制释放作用。已经有研究报道,大肠杆菌 DH5 α 可以在海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(APA)微胶囊内生长,相应的制剂可用于口服去除体内增高的胺和尿素来治疗尿毒症^[4,5]。聚赖氨酸是人工合成的高分子化合物,目前完全依赖进口。因此选择方便易得、具有自主知识产权和规模生产的天然生物材料取代聚赖氨酸对发展微囊化基因工程药物有着重要的作用。

壳聚糖(Chitosan)是自然界含量仅次于纤维素的一种天然多糖,广泛存在于虾、蟹等的壳中。它来源丰富,价格低廉,机械性能和生物相容性好,特别是它的侧链结构中含有大量的伯氨基,能够在水溶液中与海藻酸钠等阴离子聚电解质发生络合反应形成聚电解质络合物,因此它是一种良好的

成膜材料。从理论上分析,它可以代替聚赖氨酸用于生物微胶囊的制备。同时作为一种天然多糖类物质,它还具有很好的生物相容性和亲粘膜性能。

用 ACA 微胶囊对大肠杆菌进行固定化培养,实验发现大肠杆菌在微胶囊内可以保持存活,并能进行正常的生长和代谢。大肠杆菌在进行微囊化培养时,稳定期较悬浮培养及传统的凝胶固定化培养显著延长,长期培养时囊内大肠杆菌的密度变化不大。这种现象可以使转染目的基因的大肠杆菌 DH5 α 反复培养,并可提高细胞对目的产物的表达能力。从动物实验结果可以看出,ACA 微胶囊具有良好的生物相容性和亲粘膜性,ACA 微囊化的大肠杆菌能在动物小肠内较长时间停留,证明了利用微囊化胞内基因工程产物作为口服药物的可能性。

REFERENCES (参考文献)

[1] WANG Y (王勇), XIE Y B (解玉冰), MA X J (马小军). Progress

of studies on chitosan/alginate microcapsule. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展), 1999, **19**(2): 13 ~ 15

[2] WANG Y (王勇). Modification of chitosan and preparation of microcapsules. 1998, Dissertation for Master degree. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian

[3] XIE Y B (解玉冰). Microencapsulation of plant cell culture. 1998, Dissertation for Ph. D. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian

[4] Prakash S, Chang T M S. Growth and survival of renal failure rats that received oral microencapsulated genetically engineered *E. Coli* DH5 cells for urea removal. *Art Cells Blood Subs and Immob Biotechnol*, 1998, **26**(1) 35 ~ 51

[5] Prakash S, Chang T M S. Growth kinetics of genetically engineered *E. Coli* DH5 α in artificial cell APA membrane microcapsules: preliminary report. *Art Cells Blood Subs and Immob Biotech*, 1999, **27**(3) 291 ~ 301.

Study of Alginate/Chitosan Microcapsules for Immobilization of *Escherichia coli* DH5 α

FU Ying-Li XIONG Ying LIU Xiu-Dong YU Wei-Ting WANG Yi-Li Yu Xing-Ju MA Xiao-Jun*

(Laboratory of Biomedical Material Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract Objective proteins synthesized from genetically recombined *Escherichia coli* strain (*E. coli*) have been successfully produced by microbe fermentation, but complicated separation and purification steps always make against the maintenance of activities as well as increase the cost. Aiming at simplifying the process, an idea of administrating directly the microencapsulated genetically recombined *E. coli* is proposed. In this paper, study on culture of *E. coli* DH5 α immobilized in alginate/chitosan (ACA) microcapsule is presented. It was found that *E. coli* DH5 α grew well in the microcapsule with stable growth period longer than that of suspension culture, and cell aggregation phenomenon was observed. *In vivo* experiments showed that ACA microcapsules with *E. coli* DH5 α stayed over 48 h in mouse intestine, and the morphology of microcapsules was kept intact. These preliminary results have demonstrated that administration of microencapsulated *E. coli* DH5 α is safe, which laid the foundation for microencapsulated genetically recombined *E. coli* as carriers of gene engineering drugs.

Key words microcapsule, chitosan, *E. coli* DH5 α

Received: 10-08-2001

This work was supported by a grant from Special Support Project in Chinese Academy of Sciences (No. ST-00-08).

* Corresponding author. Tel: 86-411-4671991 ext879; E-mail: maxj@dicp.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>