



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105579571 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201480045675.6

(22) 申请日 2014.07.10

(30) 优先权数据

1301631 2013.07.10 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.02.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/064800 2014.07.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/004228 FR 2015.01.15

(71) 申请人 J·舒福莱企业公司

地址 法国塞纳河畔诺让

申请人 巴黎城市物理化工高等学院

(72) 发明人 J·I·加尼卡罗德里格斯

L·布瓦塔尔 A·S·D·德勒韦勒

J·比贝特

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

C12M 3/06(2006.01)

C12M 1/12(2006.01)

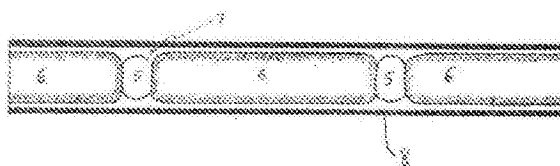
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

用于培养被限制在微型生物反应器中的微生物的新方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于培养被限制在微型生物反应器中的微生物的新方法。所述方法包括使用毛细管,毛细管中运载流体用于移动液滴的队列向前流动,所述毛细管包括微型生物反应器,微型生物反应器中发生所述微生物的培养,其中所述微型生物反应器被隔离流体隔开,隔离流体为气体。微型生物反应器(5)的直径小于毛细管(8)的直径,并且所述隔离流体的泡(6)的尺寸在所述毛细管(8)的直径的2至10倍范围内。该方法可用于培养微生物,例如丝状的真菌或浮游藻。



1. 一种用于培养被限制在微型生物反应器中的微生物的方法,其中所述微型生物反应器(5)是这样的一种类型,其在毛细管(8)的内部包含旨在向前移动的载体流体,由微型生物反应器(5)形成的液滴的队列,在所述队列中发生微生物的培养,从而能够改变所述液滴的界面,其中所述微型生物反应器(5)被隔离流体隔开,其特征在于所述隔离流体为气体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述气体是空气。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述气体是氮气和二氧化碳的混合物。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于,所述微型生物反应器(5)的直径小于所述毛细管(8)的直径。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述微型生物反应器(5)的所述直径在所述毛细管(8)的直径的80%和85%之间。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,所述隔离流体是泡(6)的形式,其尺寸在所述毛细管(8)的直径的2至10倍范围内。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其特征在于,所述载体流体来源于水饱和的贮液器。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其特征在于,所述培养的微生物是丝状真菌。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述丝状真菌是米曲霉*Aspergillus Oryzae*或黑曲霉*Aspergillus Niger*。

10. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其特征在于,所述培养的微生物是浮游藻。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于所述藻是莱茵衣藻*Chlamydomonas Reinhardtii*。

用于培养被限制在微型生物反应器中的微生物的新方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于培养被限制在微型生物反应器中的微生物的新方法。

[0002] 更具体地,本发明允许在限制的介质中,持续长孵育时间(>24h)动态监测微生物的培养。

背景技术

[0003] 具体地,根据法国专利号11/00659已知在限制的介质中实施微生物的培养;该申请具体地描述了方法和装置,用于在水相贮液器(réservoirs aqueux)中动态监测与限制的微生物的反应。该方法基于在管中一系列的水相贮液器的关联(référencement),其中一连串的水相贮液器被隔离流体(fluide d'espacement)隔开并且被载体流体(fluide porteur)运载。然而,所述方法不允许检测具有生长或者生物活性的微生物,所述生长或者生物活性将改变界面。在这种情况下,在24h时及其后,贮液器的完整性不再保留:它们或融合一起,或者它们再分为更小的贮液器。一旦失去至少一个贮液器,则同样失去关联,那么不再可能对实验结果进行解释,和/或当一个所述贮液器的尺寸存在变化时,例如通过渗漏;在这后一种情况下,内部测量的代谢物的浓度将会通过浓度效应而被人为地增加,并不是因为所考虑的所述贮液器中所含的微生物是代谢物的超级生产者。

[0004] 一般来说,现有技术不允许有效限制所有类型的微生物的持续时间长于24h。

发明内容

[0005] 本发明的目的是可以研究整个生命周期,而无需考虑微生物的类型、它们的生物活性和生长率。

[0006] 更具体地,本发明用于培养被限制在微型生物反应器中的微生物的方法,其中所述微型生物反应器是这样的一种类型,其包含毛细管,毛细管中流通有旨在引起液滴的队列(train de gouttes)向前移动的载体流体,所述微型生物反应器被隔离流体隔开,这种流体为气体。

[0007] 根据本发明的一个优选的实施方案,发生所述微生物的培养的微型生物反应器的直径小于所述毛细管的直径。

[0008] 有利地,所述隔离流体的泡的尺寸在所述毛细管的直径的2至10倍范围内。

附图说明

[0009] 本发明的方法通过参照附图阅读以下说明将更好理解,附图以示意方式单独给出,其中:

[0010] -图1示意性地示出了现有技术中液滴队列的构成;

[0011] -图2为现有技术中内部流通有液滴队列的毛细管的纵剖面图;

[0012] -图3为根据本发明内部流通有液滴队列的毛细管的纵剖面图;以及

[0013] -图4为本发明的方法中所使用的装置组件的简化图示。

具体实施方式

[0014] 如图1所示,如通常情况,液滴队列由三个互不混溶的相(I)、(II)和(III)形成,其中各个相来源于贮液器(未示出),阀(例如,电磁阀或者气动阀,未示出)允许不同的相释放至它们各自的管(1)、(2)和(3),所述的管(1)、(2)和(3)聚合至十字路口交叉点,在该处形成所述液滴,其中的一个分支(4)是毛细管,液滴队列在其内部流通。相(I)形成载体流体,相(II)形成培养微生物的液滴,以及相(III)形成隔离流体,这些将在本说明中进一步详细说明。不同液滴间的尺寸和间距取决于交叉点的几何结构以及相的注射流速间的比例。最后,将微生物包裹在相(II)的液滴内部遵循泊松定律。

[0015] 现有技术以及尤其是在法国专利号11/00659中,教导了如何形成前述的液滴队列;本发明不涉及这种获得所述液滴队列的方法。

[0016] 图2提供了由液滴(5)所形成的传统的液滴队列的部分更清晰的视图,液滴(5)包含反应混合物,微生物在其中发育,液滴队列彼此被隔离流体的液滴(6)隔开以防止液滴(5)融合一起;通过在毛细管(8)内部的载体流体(7)向前运载液滴(5)和(6),所述载体流体(7)允许液滴的移动和毛细管(8)的润滑,防止连贯的液滴(5)之间的污染。毛细管是指一种内径小于2mm的管。

[0017] 如前所述,液滴队列是由三个不混溶的相所形成。载体流体(I)通常为全氟化油(“液态聚四氟乙烯”),其对包含在微型生物反应器中的微生物不具有任何毒性。为确保队列适当的形成,以及避免液滴之间的任何污染问题,与对其他相相比,该载体油对毛细管具有更高的亲和力(*affinité*)。

[0018] 第二水相(II)含有细胞和培养介质。

[0019] 最后,第三相(III)不与前二者混合;它可由流体形成,例如碳氢化合物或矿物油。

[0020] 已经回顾了现有技术中形成的液滴队列,允许在这些液滴中培养微生物,本说明现在将关注已知方法的改进,从而克服所述方法的缺陷。

[0021] 在本说明余下内容中,培养微生物的液滴(5)将被称为微型生物反应器5。

[0022] 本发明的方法可应用于不同的微生物,且尤其是丝状真菌(*champignons filamenteux*)和浮游藻(*algues planctoniques*)。

[0023] 丝状真菌形成疏水性细丝(*filaments*)(菌丝),能够从一个微型生物反应器穿过载体流体,延伸至另一个。如果使用由碳氢化合物组成的隔离流体,细丝能够借此完全穿过直至临近的微型生物反应器。它们还可在微型生物反应器/碳氢化合物界面形成生物膜,其将逐渐地完全阻塞毛细管的横截面。这种现象导致队列的破坏以及实验的终止。

[0024] 这是本发明的方法的特征之一,已发现为解决该问题可以使用气体作为隔离流体。然而,如果微型生物反应器过大且与毛细管具有实质性接触表面区域,同样地可能发生由丝状真菌的发育所导致的阻塞现象。这引起微型生物反应器(5)之间的污染问题,以及由于细丝与毛细管(8)的相互作用导致的液滴队列稳定性问题。

[0025] 关于浮游藻,在水相微型生物反应器(5)中和隔离泡(6)中,在液滴队列的边缘已观察到自乳化的现象。这意味着在两种类型的隔室(*compartiments*)中,一个相中的液滴在另一个中自发地形成。最可能的解释是在微型生物反应器中存在与藻共生的细菌。这些细菌能够合成表面活性剂从而促进自乳化,且导致液滴队列的瓦解(*effondrement*)。

[0026] 对于浮游藻,使用气体作为隔离流体足以解决自乳化的问题。

[0027] 然而,对于丝状真菌,这种替换不足以确保队列的稳定性。这是本发明的方法的另一个特征,随后该解决方案是减小微型生物反应器的尺寸,以便减少细丝与毛细管(8)的壁之间的相互作用。

[0028] 在可以用作隔离流体的不同的气体中,由空气构成的使用是有利的,首先由于它的湿润性,以及其次因为它提供了与在固体介质中发酵相接近的条件。

[0029] 根据实施方案的一个变化,使用氮气/二氧化碳的混合物作为隔离流体;当培养的微生物为藻时,这种流体是尤其有利的,因为该混合物促进光合作用活性。

[0030] 不论所使用的隔离流体如何,其可以是气体混合物的形式,所述隔离流体必须:

[0031] -与载体流体和微型生物反应器的内含物是不可混溶的;

[0032] -不与微生物相互作用,即微生物一定不能在隔离流体中生长或繁殖;

[0033] -没有毒性,即对微生物的生长有害。

[0034] 根据本发明的方法的一个优选的实施方案,微型生物反应器(5)的直径小于毛细管(8)的直径;更优选地,微型生物反应器(5)的直径在毛细管(8)的直径的80和85%之间的范围内。当在微型生物反应器(5)中培养的微生物是丝状真菌时,所述结构是尤其有利的。低于80%的值,具有一连串空气泡形成的隔离流体(6)可能去接触微型生物反应器(5)底部的风险,这将迅速引起隔离泡(6)和微型生物反应器(5)的融合。

[0035] 按照以下操作模式有利地制备用于丝状真菌生长的液滴队列。

[0036] 丝状真菌的孢子悬浮在PGS介质中(葡萄糖10g/L,胰蛋白胨6g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5g/L,KH₂PO₄ 0.5g/L,FeSO₄·7H₂O 0.5mg/L,pH调整至5)。载体流体由Novec 7500氟化油(HFE)组成。队列在内径为0.5mm的十字路交叉点形成,十字路交叉点连接至长度为15m且内径为0.75mm的FEP毛细管。PGS介质和HFE油通过注射泵分别以5.0和3.5mL/h的流速注射。通过长度为50cm和内径为0.2mm的管,通过电磁阀以0.5巴的压力注射空气。该管允许建立足够的水动阻力(résistance hydrodynamique)以产生均匀的队列。在队列的每一边注射长度为10cm的空气泡,以允许限制队列。

[0037] 此外,关于藻和丝状真菌的生长,观察到由于微型生物反应器(5)内部的生物活性(呼吸和光合作用)导致的隔离空气泡(6)随时间减小。因此,如果隔离泡(6)在本发明的方法的起始时太小,当其中一些消失时,导致已被隔开的微型生物反应器(5)的合并。有利地,为获得超过90h的稳定队列,隔离泡(6)的尺寸必须比毛细管(8)的内径大至少10倍。

[0038] 研究了长持续时间的动力学,观察到边缘效应发生。这导致在队列两边的微型生物反应器(5)的尺寸的减小,这能导致微型生物反应器(5)与其相邻近的合并。这种效应也与这样的事实有关,即使用空气作为隔离流体促进蒸发。为克服这种现象,在本发明的方法的一个优选的实施方案中,载体流体贮液器是经水饱和的,以允许队列的再循环(recirculation)。

[0039] 现描述本发明的方法的实施方案的实施例。

[0040] 1/溶液的制备:

[0041] -在培养介质中的微生物的悬液具有与目标占有率(细胞的数量/-微型生物反应器)相对应的浓度

[0042] -添加有全氟化表面活性剂(0.06%)的水饱和的全氟化油

- [0043] 2/使用以下生成液滴队列：
- [0044] -载体流体：HFE7500全氟化油+0.06%表面活性剂
- [0045] -隔离流体：压缩空气
- [0046] -反应物：微生物的悬液
- [0047] 调整三种流体的流速/压力的比例以获得：
- [0048] a)微型生物反应器(5)的尺寸在管(8)内径的80%和85%之间；
- [0049] b)隔离泡(6)的尺寸为管(8)内径的至少3倍；
- [0050] 以上在a)和b)中给出的尺寸特征在图3中显示。
- [0051] 3/在液滴队列的起点和末端以长泡(6)的形式添加隔离流体的终端塞。
- [0052] 4/通过图像分析，质量控制液滴队列(80%<微型生物反应器的尺寸<85%)。
- [0053] 5/在探测器(9)的前面通过液滴队列的向前和向后移动进行动态监测。
- [0054] 6/分析对每个微型生物反应器所记录的数据。
- [0055] 下表以示意方式归纳不同参数(隔离流体、微型生物反应器或隔离流体泡的尺寸)，以及给出了微生物的最大孵育时间作为这些参数的函数。

试验号	微型生物反应器的尺寸(占毛细管的内径的百分比)	隔离流体	隔离流体的液滴或泡的尺寸(占管的内径的百分比)	最大孵育时间
1	100%	矿物油	200%	48h
2	100%	矿物油	200%	34h
3	100%	矿物油	200%	28h
4	100%	PDMS(100cSt)	200%	13h
[0056] 5	100%	PDMS(50cSt)	200%	20h
6	100%	角鲨烯	200%	25h
7	100%	空气	1000%	22h
8	95%	空气	1000%	30h
9	85%	空气	1000%	91h
10	85%	空气	600%	60h
11	90%	空气	1200%	68h
12	90%	空气	1200%	162h
13	90%	空气	1500%	109h

- [0057] 以上表培养以下微生物：
- [0058] -米曲霉(*Aspergillus Oryzae*)(丝状真菌)用于试验1-7和11；
- [0059] -黑曲霉(*Aspergillus Niger*)(丝状真菌)用于试验8-10；
- [0060] -莱茵衣藻(*Chlamydomonas Reinhardtii*)(单细胞藻)用于试验12-13。
- [0061] 关于上述的丝状真菌，在稳定性方面，试验9、10和11获得最佳结果。
- [0062] 通过本发明的方法所带来的改进，其可以证实可以在微型生物反应器中监测生长和生物活性动力学，持续至今本领域技术人员难以达到的时间长度。
- [0063] 尽管藻和酵母在它们生长期间不会穿过载体油/培养介质屏障，该限制方法导致液滴队列的稳定性提高，降低培养介质的液滴和管壁间的相互作用，需记住由于微生物在它们生长时所分泌的代谢物导致的表面张力的下降，随时间影响队列的稳定性。最后，利用气泡可允许调节气体交换，其作为氧气(丝状真菌的呼吸)或二氧化碳(藻的光合作用)的贮

库起作用。

[0064] 微型生物反应器(5)以线性队列排列,其可在数百至数千样本间变化。每一微型生物反应器(5)通过其在队列中的排名而被识别。因此,对于确保持续长时间反应,微型生物反应器的队列的完整性是至关重要的。设置微型生物反应器(5)不断地运动,以保持膜的润滑,通过再循环使得微型生物反应器均匀化。如图3所示,队列以一个方向然后以另一个方向经过探测器(9)的前面,可随时间监测每一微型生物反应器(5)内部的反应。微型生物反应器(5)的队列也可以总是以相同的方向在探测器的前面经过,确保再循环回路,允许随时间监测在每个微型生物反应器内发生的反应。

[0065] 此探测器(9)整合在一个孵育模块(10)中,孵育模块(10)具体包括一个泵(11)和阀(12)(例如电磁阀或气动阀),以允许微型生物反应器的队列以一个方向然后以另外一个方向流通,队列在部分A加载,接着向部分B移动到探测器(9)的前面。出口(13)的存在允许除去不良的微型生物反应器(5)以及实验终止时清理回路。模块(14)使本系统完整(complete),在该模块中形成液滴队列(微型生物反应器和流体泡),其与图1相一致,具有含有相(I)、(II)和(III)的不同贮液器。

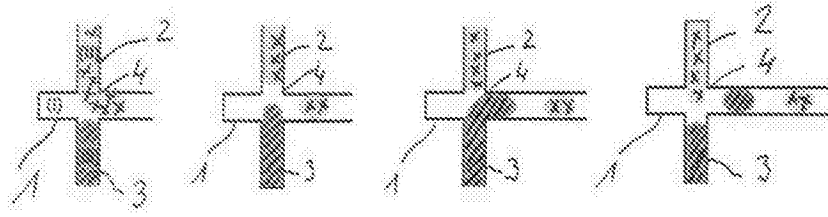


图1

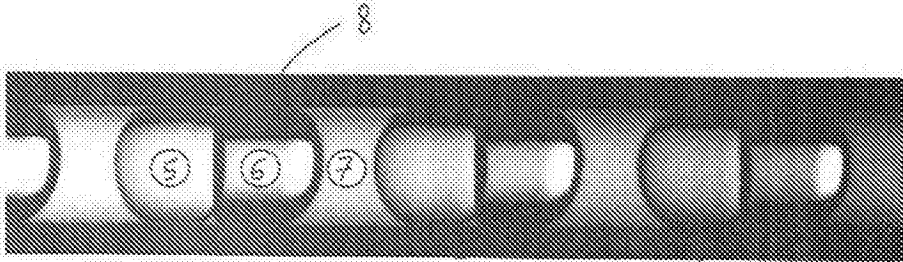


图2

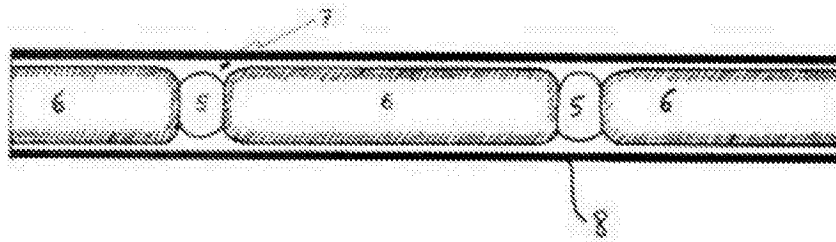


图3

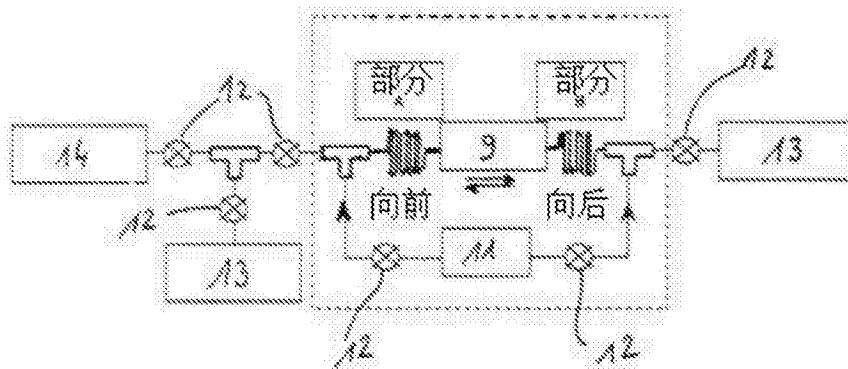


图4