

# 利用中空纤维超滤装置过滤培养酵母和乳酸菌\*

汪恩浩 罗薇 张炎林 陈新 周玲 朱相远

(北京市营养源研究所)

**摘要** 利用国产中空纤维超滤装置构建过滤培养微生物细胞的实验系统。经过滤培养克氏酵母 (*Kloeckera magna*) 和乳脂链球菌 (*Streptococcus cremoris*)，菌体浓度分别达到 160 和 170 OD<sub>550nm</sub>，是分批培养的 8 倍和 17 倍。整个系统运转稳定，未发现过滤速度减缓和超滤膜被堵塞现象。

**关键词** 中空纤维；过滤培养；酵母；乳酸菌

利用固定化细胞进行发酵生产的优点在于细胞密度大且可重复多次使用、基质和代谢产物浓度可以控制、生产连续化等，从而生产率大大提高。利用能截留细胞的微孔或超滤膜材料进行过滤培养可以看作固定化细胞的一个特例。它除了具有固定化细胞的长处外，还有其独特之处：不用载体，没有载体产生的扩散阻力或空间效应；可得到不含细胞的清澈滤液；基质和代谢产物浓度可分别控制；通用性强等。实验证明过滤培养可使细胞浓度提高几十倍。这不仅意味着生产率的相应提高，而且因后处理工序简单，废液减少，其潜在的经济效益极为明显<sup>[1]</sup>。

近年来膜材料和膜分离技术的飞跃发展使得过滤培养这一细胞培养工程新技术变得越来越诱人。它首先已在培养动物细胞生产干扰素、单克隆抗体等方面获得了应用<sup>[2,3]</sup>，在过滤培养微生物生产乙醇<sup>[4]</sup>、乳酸<sup>[5]</sup>、维生素 B<sub>12</sub><sup>[6]</sup>、丙酮丁醇<sup>[7]</sup>，培养具有保健作用的双歧杆菌<sup>[8]</sup>和基因重组菌<sup>[9]</sup>、以及在过滤培养过程的计算机联机监控<sup>[10]</sup>等方面近年来也有大量论文、专利发表。

作者首次利用国产中空纤维超滤装置构建了一套实验规模微生物过滤培养系统，使酵母和乳酸菌的高密度过滤培养初获成功。

## 材料与方 法

### 1. 菌种：大克勒克酵母 (*Kloeckera magna*,

ATCC 20109, 简称克氏酵母), 购自美国菌种保藏中心; 乳脂链球菌 (*Streptococcus cremoris*), 购自中国科学院微生物研究所。

2 培养方法: 克氏酵母的培养基见表 1。在 pH 4.5、30℃、少量通气和缓慢搅拌 (50r/min) 条件下培养。乳脂链球菌使用 MRS<sup>[10]</sup> 培养基, 在 pH 6.2、30℃、搅拌 (400r/min)、不通气条件下培养。通过恒 pH 计自动加入 5N 氨水 (克氏酵母) 或 Ca(OH)<sub>2</sub> (乳脂链球菌) 维持 pH 恒定。在过滤培养开始以后, 泵 7 将罐内培养液打入中空纤维超滤装置 2, 滤液通过阀 8 不断流出, 被浓缩的培养液返回发酵罐 1。罐内培养液体积为 1 升, 液位计 4 自动控制泵 6 从贮罐 3 向发酵罐内补料以维持发酵体积恒定 (图 1)。

表 1 克氏酵母培养基 (%)

	摇瓶	发酵罐	流加
葡萄糖	4	6	6
蛋白胨	1	1	0.2
酵母膏	0.5	0.5	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	0.2	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1	0.02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1	0.1	0.1

中空纤维超滤装置系天津纺织工学院提供。截留分子量 15—17 万, 过滤面积 0.3m<sup>2</sup>。

\* 本研究为国家自然科学基金资助项目。

天津纺织工学院哈鼎文同志对实验提供过宝贵意见; 本所李东同志协助做了部分工作, 在此表示感谢。

用 0.1% NaOCl 灭菌,使用前用无菌水充分冲洗。

3. 分析方法: 菌体浓度用 SX721 分光光度计测定  $OD_{570nm}$  表示。以接种前培养基作空白。

残糖浓度: 用斐林液还原糖直接滴定法<sup>[11]</sup>。

乳酸钙: 参照“中国药典”(1985 年版)第二部(第 240 页)的方法测定。

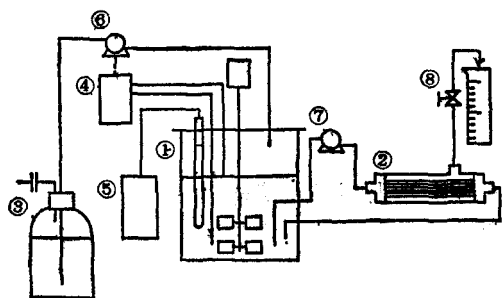


图 1 过滤培养系统简图

① 发酵罐; ② 中空纤维超滤器; ③ 流加培养基贮罐; ④ 液位计 ⑤ 恒 pH 计; ⑥、⑦ 泵; ⑧ 阀

## 结 果

**克氏酵母:** 乙醇是其主要代谢产物。细胞生长受乙醇浓度的抑制。为测定抑制作用大小,在 6 支试管中分装 8ml 培养基。接种后 5 小时分别加入不同量的乙醇。继续培养 4 小时后测  $OD_{570nm}$ 。实验结果见图 2。确认了乙醇

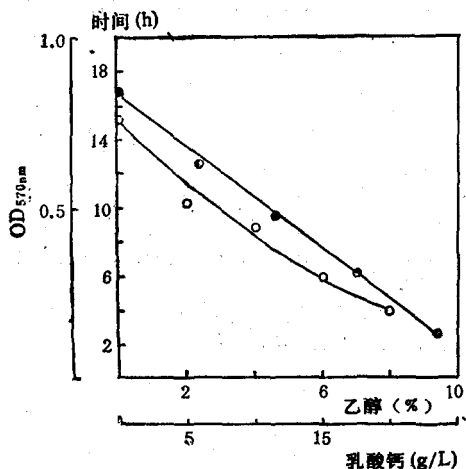


图 2 乙醇和乳酸钙分别对克氏酵母和乳脂链球菌细胞生长的抑制

○ 乙醇, ● 乳酸钙

对克氏酵母的增殖有强烈的抑制作用。由于代谢产物(主要是乙醇)的抑制,在分批培养条件下,菌体浓度在 12 小时达到最大值  $20OD_{570nm}$  (见图 3 中虚线)。分批培养 8 小时后开始过滤培养。由图 3 可见,  $OD_{570nm}$  在过滤培养开始后迅速上升,12 小时后达  $162OD_{570nm}$ , 是分批培养的 8 倍。

**乳脂链球菌:** 菌体生长受其代谢产物乳酸及其盐类的抑制。测定乳酸钙对乳脂链球菌增殖的试验同克氏酵母,只是乳酸钙是在接种前加入的。接种后 10 小时测  $OD_{570nm}$  (图 2)。发现菌体浓度的下降与乳酸钙浓度的增加恰成直线关系。

乳脂链球菌在分批培养条件下(接种量 10%)14 小时后菌体浓度达最大值  $8.5 OD_{570nm}$  (见图 4), 图 4 还表示了乳脂链球菌先经 5 小时分批培养,然后转入过滤培养的情形。为了

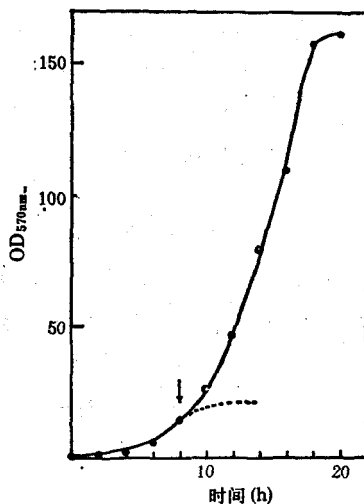


图 3 克氏酵母的生长曲线

缩短分批培养时间,将 1200ml 摇瓶菌种离心后,倾去上清液,仅把菌体接入罐中。图 3、图 4 中的箭头表示分批培养和过滤培养的转折点。图 4 用对数表示细胞浓度,故可直观地看出乳酸钙浓度对菌体增殖速率的影响。在分批培养阶段,细胞经过 1 小时的调整期后转入迅速增殖期。但因乳酸钙浓度不断增加,对数生长期很短,细胞增殖速率很快不断降低。转入

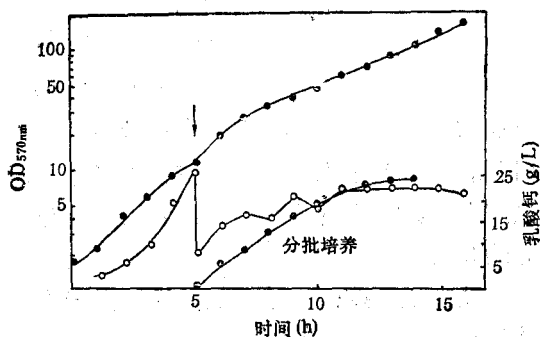


图4 乳脂链球菌的生长曲线  
○ 乳酸钙 (g/L); ● 生长曲线

过滤培养后,因培养基的置换,乳酸钙浓度急剧下降,而细胞的增殖速率相应上升。在9—16小时之间,乳酸钙浓度基本维持在22g/l左右。由图4可见,在这段时间内细胞仍呈对数增长,但其增长速率却明显低于分批培养的初期,显然这是由于乳酸钙浓度的影响。残糖测定数据表明,在整个培养过程中还原糖浓度未低于1%,证明在营养充分的条件下,细胞增殖速率取决于乳酸钙浓度。在16小时罐内泡沫急剧增加,被迫中止实验。此时 $OD_{570nm}$ 已达170。只要控制好泡沫,相信细胞密度还可大幅度提高。

在10—15小时期间,平均过滤速度为1.3 l/h,乳酸生产率为23.6g/h·l,比生产率为0.24g/l.h.OD;在分批培养阶段,乳酸生产率为4.1g/h.l,平均比生产率为0.57g/l.h.OD。二者比较,生产率前者约为后者6倍,比生产率前者却为后者的42%。

## 讨 论

试验证明,利用国产中空纤维超滤装置能够有效地进行微生物的过滤培养。在很短时间内得到了比分批培养高7倍(克氏酵母)和16倍(乳脂链球菌)的菌体浓度。如改进培养条件

和操作方法,菌体浓度可望进一步提高。乳酸的生产率提高5倍,但比生产率却下降很多,说明单位菌体产酸能力低于分批培养,原因有待进一步研究。由于细胞密度比分批高16倍,所以生产率仍大大超出分批培养。

比较图2和图4可以看出菌体生长受乳酸钙的抑制程度相差很大。在图2的实验中细胞生长抑制物乳酸钙在接种前加入,而在图4的实验中是伴随着细胞的生长而产生的。这说明了细胞在生长的不同阶段对抑制物的敏感程度大不相同。

提高菌体浓度不是我们追求的直接目标。在实际生产上还必须综合考虑产物浓度、基质转化率等因素。如何精确地控制过滤培养过程使其处于最优、最经济状态是今后面临的重要课题。在将过滤培养技术应用于生产之前,过滤装置的长期有效运转和再生方法、过滤培养条件对细胞生理的影响、过程的自动检测与控制等研究课题需先行解决。细胞过滤培养新技术的高效率令人激动,然而这一技术的实用化尚须艰苦努力。

## 参 考 文 献

1. 汪恩浩: 生物工程学报, 3(2): 86—89, 1987。
2. Brennan A: U.S.Pat., 4727040, 1987。
3. Corrigan A H: *Bio/Technology*, 6 (7): 784—786, 1988。
4. Inloes D S et al.: *Appl. Microtechnol.*, 23:85, 1985。
5. Ohleyer E et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11: 457, 1985。
6. Hatanaka H et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27:470, 1988。
7. Ferras E et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28:523, 1986。
8. 日本公开特许, 62: 34588, 1987。
9. 谷口正元等: 日本发酵工学会大会讲演要旨集, 152, 1986。
10. Wang E H et al.: *J. Chem. Eng., Japan*, 21(1), 36, 1988。
11. 中山大学生化系微生物教研室编: 生化技术导论, 人民教育出版社, 北京, P.24—25, 1978。