

微胶囊固定化酵母培养的研究*

张惠勇 梅乐和 姚善泾**

(浙江大学化工学院生物化工系 杭州 310027)

摘 要 进行了 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化酒精酵母和产朊假丝酵母的实验研究。考察了这两种酵母的培养规律,发现微胶囊固定化酒精酵母的产酒精情况与游离培养基本一致,在连续发酵 16 批后,仍具有良好的性能。同时固定化产谷胱甘肽(GSH)的产朊假丝酵母的研究也表明固定化培养 GSH 产量与游离细胞产量相近。

关键词 NaCS-PDMDAAC 微胶囊,固定化,酵母,乙醇,谷胱甘肽

分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0297-100

微胶囊是一种众所瞩目的固定化方法,通过一层由半透膜围成的微囊将酶、蛋白质、微生物或动植物细胞包埋,使生物大分子或细胞留在微囊中,而培养基营养成分和细胞分泌的小分子物质可以自由出入,从而达到催化、培养或生产免疫物质的目的^[1-3]。

纤维素硫酸钠(NaCS)-聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDMDAAC)微胶囊体系出现于 80 年代中期^[4],在 90 年代发展很快。该体系的最大特点就是制备方法简单,即将 NaCS 水溶液液滴直接滴入 PDMDAAC 水溶液中,就会形成一种周围由半透膜包围的胶囊。并且还具有其它一些优点,如膜层较薄(20~100 μm),机械强度较高、良好的生物相容性、传递和截留性质适宜以及物化性质稳定^[5,6]。

包埋在 NaCS-PDMDAAC 微胶囊中的细胞,悬浮微胶囊中间,每个微胶囊就像是一个微型反应器,细胞按正常方式代谢、生长和繁殖以外,还受到了胶囊膜的保护,抵御外来物质(如噬菌体)的侵蚀和剪切力的影响。本文以酵母细胞为模拟体系,考察微胶囊作为生物微型反应器在细胞培养时的特点,为扩大微胶囊在细胞培养中的应用,寻求一般规律。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种:酒精酵母由浙江大学华家池校区提供,本研究所保藏。产朊假丝酵母(*Candida utilis*)为本研究所保藏。

1.1.2 培养基:酒精酵母:摇瓶培养基(g/L):葡萄糖 30.0(发酵培养基为 120),尿素 3.0,酵母膏 3.0,(NH₄)₂SO₄ 5.0,MgSO₄·7H₂O 0.5,K₂HPO₄·3H₂O 1.0,KH₂PO₄ 1.0。产朊假丝酵母:摇瓶培养基同酒精酵母摇瓶培养基。

1.1.3 微囊化材料:NaCS 由本实验室自制,PDMDAAC 购自美国 Aldrich 公司。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 29676039、29706009)。

** 联系人。

收稿日期:1998-07-17,修回日期:1999-03-18。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母培养: 将活化后的酵母菌接入试管斜面, 在无菌条件和 30℃ 下培养 2~3d, 然后接入一环酵母种子于液体三角烧瓶, 放入摇床中, 在 30℃ 和 200r/min 下培养 18h。产朊假丝酵母的菌种接至摇瓶培养基, 培养 24h。

1.2.2 酵母的微囊化: 配制 4.0% 的 NaCS 和 2.0% 的 PDMDAAC 溶液, 灭菌后待用。在无菌操作条件下, 将一定量的酵母与 NaCS 溶液混合, 滴入 PDMDAAC 溶液中, 固化约 1h, 制成微囊化酵母, 固化后的微胶囊粒径为 2.7~2.8mm。

1.2.3 微囊化酒精酵母的反复培养: 将 32mL 微囊化酒精酵母接入 200mL 发酵培养基中摇床培养(30℃, 200r/min), 定时取样分析, 糖耗尽时, 更换培养基, 分析培养液中的乙醇含量。如此重复该过程, 反复培养 16 批。

1.2.4 产朊假丝酵母的菌体收集: 微囊化的产朊假丝酵母经培养 24h 后取出微胶囊, 用纤维素酶破囊后离心分离, 由沉淀物得假丝酵母菌。乙醇萃取假丝酵母 1h, 离心分离, 分别收集上清液(含 GSH 的乙醇溶液)和沉淀物(酵母细胞), 由上清液可分析 GSH。

1.3 分析方法

葡萄糖: 采用蒽酮法。乙醇: 采用气相色谱法。

谷胱甘肽: 用 DTNB[5, 5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)]法测定样品中 GSH 的浓度^[7]。

细胞浓度: 游离细胞浓度采用血球板计数法。在检测微囊化细胞浓度时取 10 个微胶囊, 测定平均粒径, 微囊破壁后, 释放出酵母细胞。利用血球板计数法计算细胞个数, 再除以微胶囊的个数, 得单位胶囊细胞浓度。

2 结果和讨论

2.1 PDMDAAC 对酵母细胞生长情况的影响

考虑到合成高分子 PDMDAAC 可能会影响细胞的生长。将酒精酵母分别接入含有 PDMDAAC 的培养基中进行培养, 按时取样测菌浓度。结果见表 1。PDMDAAC 的分子量分别为 <200kD、200~350kD 和 400~500kD, PDMDAAC 的浓度则为 1.0% 和 2.0%。

由表 1 可见, 酵母细胞对 PDMDAAC 有一个适应的过程, 在培养的初期, 酵母的生长

表 1 含不同浓度的 PDMDAAC 培养基培养酒精酵母的实验数据

Table 1 Effects of the component PDMDAAC on yeast cells under different concentrations, residence time, and molecular weight

$c_{\text{PDMDAAC}}/\%$	Viable cells/(% of initial number)					
	0	30	70	110	150	390(min)
MW 400 000~500 000						
1.0	100	135	143	164	377	1870
2.0	100	104	107	188	264	2160
MW 200 000~350 000						
1.0	100	114	158	216	337	1670
2.0	100	94	107	208	218	2100
MW <200 000						
1.0	100	66.7	166.7	193	421	2520
2.0	100	53.6	97.6	202	412	2130
Normal medium	100	163	209	225	353	2469

较慢,随后生长变快。实验所用的三种 PDMDAAC 对酒精酵母生长的影响并不大,最终都能达到正常发酵;随 PDMDAAC 分子量的增加,影响程度会降低;另外,培养基中 PDMDAAC 浓度增加,对酵母生长的影响增大。

2.2 微囊化酒精酵母的培养

实验发现,微囊化酒精酵母有着与游离细胞相同形状的耗糖曲线和酒精生产曲线,表明微囊化对酒精酵母的生长和分泌产物生产没有影响。另外,胶囊外培养基中乙醇的增加速率略滞后于葡萄糖的消耗速率,这表明微囊膜对底物和产物传递的影响。在图 1 中示出了这些关系。

2.3 微囊化酒精酵母的反复培养

酒精酵母细胞经过微囊化固定后,可以进行多批培养,培养情况如图 2。第 1 批

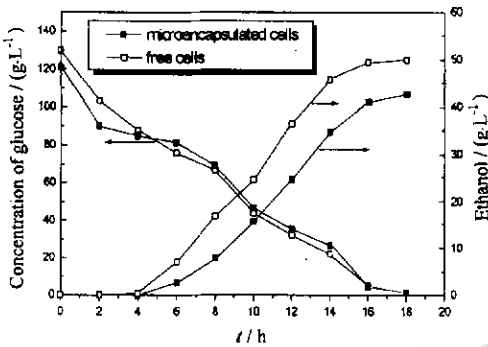


图 1 游离细胞和微囊化细胞发酵曲线
Fig.1 Glucose and ethanol curves of microencapsulated cells and free cells

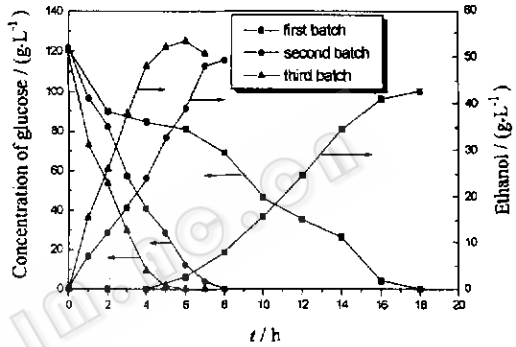


图 2 微囊化酵母 1,2,4 批发酵曲线
Fig.2 Glucose and ethanol curves of first, second and fourth batches of microencapsulated cells

经过 18h 的培养,葡萄糖被耗尽。第 2 批培养 7h,耗糖达 99%;而第 3 批培养 5h,就已经耗糖 99%。以后连续 12 批培养的耗糖情况与第 4 批的基本相同。乙醇浓度最高点比耗糖 99%的时间滞后 1h 左右。与耗糖曲线相同,前 3 批产乙醇情况变化较大,但第 4 批以后批次的产乙醇曲线与第 4 批的基本一致。

微囊化酵母细胞经过 16 批培养,在第 9 和第 10 批,细胞浓度达到最高,为 2.64×10^{10} /mL 微胶囊(见图 3),约合 4×10^9 /mL 发酵液。而普通游离细胞培养的细胞浓度只有 10^8 /mL 发酵液。可见,微囊化酵母可以提高单位体积培养液中的细胞数,从而提高发酵效率。从第 11 批后细胞浓度略有下降,但维持在 1.26×10^{10} /mL 微胶囊的水平。在培养 16 批后,微囊化酵母的粒径仍无明显变化,表面光滑,仍可以进一步使用。在第 8~10 批时,发酵液中的乙醇浓度达到最高值,其体积百分比为 5.95%,可折合为 47.0g/L 发酵液。按发酵液中的乙醇浓度计,微胶囊的

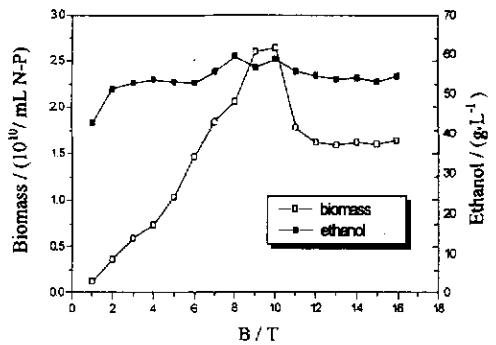


图 3 微囊化酵母重复培养菌浓和乙醇产量曲线
Fig.3 Biomass and ethanol curves of microencapsulated cells

体积产率为 $66.4\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 是普通连续培养($8\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$)的 8~9 倍。在多批培养中, 微胶囊的体积产率不低于 $55\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 也比普通的连续培养高 5~6 倍。可见微胶囊作为微反应器对提高生产能力有一定效果。

2.4 谷胱甘肽的生产

微囊化培养的主要目的是考察微囊化后的酵母产 GSH 的机能有无变化。经 24h 培养后, 测定 GSH 产量。结果表明, NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定的假丝酵母生产 GSH $9.67 \times 10^{-3}\text{g}/\text{g}$ 干菌体, 与游离的假丝酵母产 GSH 量为 $10.2 \times 10^{-3}\text{g}/\text{g}$ 干菌体的情况基本一致。这一实验说明, 假丝酵母经微囊化后, 不影响其产 GSH 的功能。

3 结 语

实验结果表明, NaCS-PDMDAAC 微胶囊材料, 对培养酵母具有良好的生物相容性; 通过利用 NaCS-PDMDAAC 微囊化技术进行酵母细胞培养, 可以容易地获得高细胞密度; 显然微胶囊作为微型反应器, 具有较高的生产能力; 同时我们发现, 酵母细胞经微囊化培养后可以反复多批次生产乙醇, 并能大大缩短发酵时间, 提高生产速率; 而且 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定细胞后, 对于胞内产物的产生机理没有影响。由此可知将该微囊体系用于细胞的微囊化培养, 不论对胞外代谢产物, 还是胞内产物都有积极意义。

参 考 文 献

- [1] 袁中一, 李 雄, 李士云等. 生物工程学报, 1990, 6(1):81~84.
- [2] R. G. Rupp. In: J. Fader, W. Tolbert Eds, Large-scale Mammalian Cell Culture, New York: Academic, 1985, 19~38.
- [3] F. Lim, A. M. Sun. Science, 1980, 210:908~909.
- [4] H. Dautzenberg, F. Loth, Makromol. Chem. Suppl., 1985, 9:211.
- [5] S. J. Yao. Verfahrenstechnische Auslegung Einer Anlage Fuer Die Natrium- Cellulosesulfat- Herstellung zur Immobilisierung von Biokatalysatoren, VDI-Verlag, Dusseldorf, Germany, Feb., 1996.
- [6] 姚善泾. 生物工程学报, 1998, 4(2):195.
- [7] 夏舜明. 营养学报, 1990, 12(1):18.

Study on the Yeast Cell Culture in Microcapsules*

Zhang Huiyong Mei Lehe Yao Shanjing

(Department of Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310012)

Abstract The NaCS-PDMDAAC microcapsulated cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* as a kind of micro-reactor has been investigated. The results showed that two kinds of yeast cells encapsulated in NaCS-PDMDAAC microcapsules had the same growth rules as the free cell culture. The encapsulated cells were fermented sequentially 16 batches. The highest cell density reached 2.64×10^{10} per mL of capsule and ethanol concentration 47.0g per liter of medium. The encapsulated *C. utilis* cells produced GSH in same amount as the free cells.

Key words NaCS-PDMDAAC microcapsule, immobilization, yeast, ethanol, GSH

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.29676039,29676009).