

乳杆菌微胶囊化培养的研究*

叶子坚¹ 姚善泾²

(浙江大学化学工程与生物工程系 杭州 310027)

摘 要 采用 NaCS-PDMDAAC 微胶囊对两种乳杆菌进行了固定化发酵研究。结果表明,两种乳杆菌能够在微胶囊内很好地生长和繁殖,菌浓度可分别达到 1.8×10^{11} /mL 胶囊和 2.69×10^{11} /mL 胶囊,比游离培养高出十倍以上,并且能与游离发酵一样产生乳酸,糖耗时间可缩短 1/3~2/3。进行的多批次发酵显示了巨大的产酸能力。

关键词 固定化细胞培养,微囊化培养,乳酸发酵,NaCS-PDMDAAC 微胶囊

中图分类号:TQ453.5 文献标识码:B 文章编号:0001-6209(2000)05-0507-12

生物微胶囊是为器官移植所带动并发展起来的一种新兴的细胞固定化技术^[1,2],它能将酶、蛋白质或活细胞包封在构成微胶囊的亲水半透膜内,生物大分子和细胞被微胶囊的膜阻隔开来,培养基中的营养成分和细胞分泌的产物等小分子物质可以自由出入半透膜,从而达到催化、培养或免疫隔离的目的^[3-5]。

NaCS(Sodium cellulose sulfate,硫酸纤维素钠)-PDMDAAC(Polydimethyldiallyl ammonium chloride,聚二甲基二烯丙基氯化铵)微胶囊是由两种水溶性的聚电解质构成的体系,它已在生物技术中有不少成功的报道^[6-10],从中展示了它在进行细胞固定化培养时的一些优点,如膜层较薄(20~200 μ m),机械强度较高,生物相容性良好,传递和截留性质适宜,物化性质稳定,以及胶囊制备简单。特别在酒精酵母的微囊化培养中所显示的良好结果^[11],说明用该胶囊进行细胞固定化培养和高密度高效率生产目标产物的可行性。

乳酸是化学工业、食品工业、皮革工业和制药工业的一种重要的原料,一般均通过发酵方法得到,目前产乳酸水平比较稳定,但发酵周期稍长(约 40~70h)。如果通过微囊化培养,可以在保持现有发酵水平上缩短发酵周期,提高产酸效率,那就会对乳酸的生产具有新的促进作用,同时也为扩大微胶囊培养细胞范围,高效率生产生物产品提供一种更有效的方法。本文将用 NaCS-PDMDAAC 微胶囊体系进行乳酸杆菌的微囊化培养,以考察其在微胶囊内的生长繁殖和代谢规律。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)和 L. Z. G. 乳杆菌(*Lactobacillus* Z. G)由浙江工业大学提供,本研究所保藏。

*国家自然科学基金(29676039),国家教育部回国人员基金资助项目(1997)

¹来浙江大学访问学者,²联系人

作者简介:叶子坚(1962-)男,江西奉新人,江西萍乡高等师范专科学校副教授,现从事生化研究和教学工作

收稿日期:1999-07-30,修回日期:2000-02-03©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.1.2 培养基 :采用 MRS 培养基和发酵培养基,发酵培养基组成为(g/L):葡萄糖 30~150,胰蛋白胨 5,酵母膏 5, $MgSO_4$ 0.5, $NaCl$ 0.1, KH_2PO_4 0.5, pH 5.5~6.0,接种前加 3%~15% $CaCO_3$ 。

1.1.3 微胶囊材料 : $NaCS$ 由本实验室自制,PDMDAAC 购于美国 Aldrich 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 短乳杆菌和 L. Z. G 乳杆菌的培养 :短乳杆菌的培养 :将冻干管保藏的菌种先接入 MRS 斜面培养基上,30℃ 下培养 48h。然后接一环菌种于 MRS 液体培养基中(30℃, 48h) 定时测定菌浓度、产酸和糖耗情况,并取 10mL 移入含 90mL 发酵培养基的三角瓶中培养。在后来的发酵过程中,每次均取上一次发酵结束后的 10mL 发酵液移入到下瓶 90mL 发酵培养基中培养,经过多次转瓶发酵,使产酸和糖耗稳定,然后,由同一发酵瓶分别取 10mL 发酵液,用于游离发酵和固定发酵,进行同步比较。

L. Z. G 乳杆菌的培养 :与短乳杆菌的培养相类似,所不同的是温度为 40℃,菌种的活化和发酵均为发酵培养基。

1.2.2 短乳杆菌和 L. Z. G 乳杆菌的培养的微胶囊化 :配制 5.0% 的 $NaCS$ 和 2.0% 的 PDMDAAC 溶液,灭菌待用。在无菌条件下,将含短乳杆菌或 L. Z. G 乳杆菌的发酵液 10mL 与 $NaCS$ 溶液混合,滴入 PDMDAAC 溶液中,固化后即制成微囊化短乳杆菌和 L. Z. G 乳杆菌。将微囊化的短乳杆菌或 L. Z. G 乳杆菌分别接入相应的培养基中进行培养。

1.2.3 微囊化短乳杆菌和 L. Z. G 乳杆菌的多批次重复培养 :将 30mL 微囊化短乳杆菌和 L. Z. G 乳杆菌分别接入相应的 90mL 培养基中发酵培养,前者温度为 30℃,后者温度控制在 40℃,摇床的转速均为 80r/min。定时取样分析培养基中糖浓度、乳酸浓度和微胶囊中的菌体浓度。当糖耗尽时,更换培养基。如此重复该过程,分别培养了 19 批和 16 批。与之同时也进行这二个菌种的游离细胞培养。

1.3 方法分析

葡萄糖 :用 DNS 法测定。

乳酸 :用 EDTANa 滴定乳酸钙法,并换算成乳酸的浓度,并对某些点用高效液相色谱法验证乳酸的纯度。

总氮量 :用凯氏定氮法。

菌体浓度 :用血球板计数法测定总菌数,在检测微胶囊化细胞浓度时,取 10 个微胶囊,破壁释放出乳酸杆菌,确定细菌单位体积个数,然后除以微胶囊的总体积,得微胶囊内的菌浓度。

2 结果和讨论

2.1 微囊化的第一批培养与游离培养的比较

在两种乳杆菌分批发酵的过程中,第一批微胶囊化细胞培养与游离培养具有相似的产酸和糖耗过程,图 1 示出了短乳杆菌的第一批培养结果,图 2 则是 L. Z. G 乳杆菌的首批培养结果。图 1 和图 2 中葡萄糖和乳酸浓度与时间的关系均呈“S”形,与微生物游离培养规律相同。在短乳杆菌微囊化培养时,乳酸的转化率和产酸速率都低于游离培养,糖耗尽时间同为 40h,但是这时微胶囊中的细胞浓度已达到 4.0×10^{10} 个/mL 胶囊,而游离培

养的细胞浓度是 8.0×10^9 个/mL,总的细胞量游离培养略多一些,但细胞浓度微囊化培养比游离培养高 4 倍左右。在 L.Z.G 乳杆菌微囊化培养时,乳酸的转化率和产酸速率与游离培养几乎一致,由于游离培养的糖浓度略高,所以糖耗尽时间比游离培养时缩短了 17h。微囊中的细胞浓度为 1.3×10^{10} 个/mL 胶囊,而游离培养的细胞浓度为 2.8×10^9 个/mL。微囊化细胞在第一批培养时,由于细胞在经历了微囊化过程后有一个适应过程,结果稍差也是正常的。这种效应对短乳杆菌更明显一些。但随着微囊化培养的重复进行,结果将明显改善。

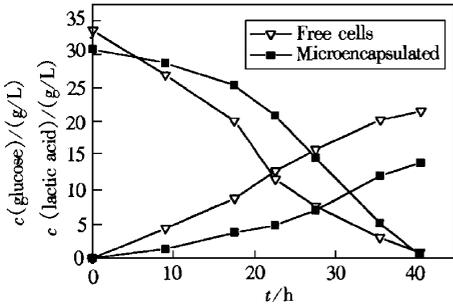


图 1 短乳杆菌的微囊化第一批培养和游离培养时糖耗和产乳酸结果比较

Fig. 1 Comparison of glucose consumption and lactic acid production in the first batch culture of encapsulated cells with in the free cells for *L. brevis*

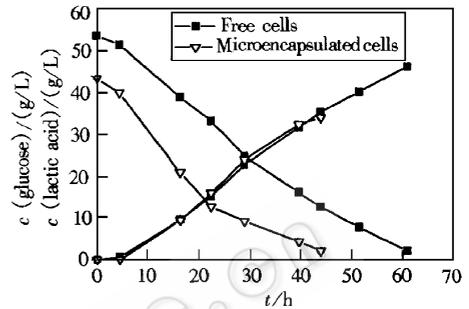


图 2 LZG 乳杆菌的微囊化第一批培养和游离培养时糖耗和产乳酸结果比较

Fig. 2 Comparison of glucose consumption and lactic acid production in the first batch culture of encapsulated cells with in the free cells for L. Z. G

2.2 乳杆菌固定化分批重复培养

在图 1 和图 2 中所示的两种乳杆菌第一批微囊化培养结果表明,微囊化培养并不优于游离培养,但是把第一批的发酵液移走加入新的培养液并继续该过程时,就会发现,培养结果逐步改善。图 3 和图 4 表示了部分发酵结果。图 3 为微囊化短乳杆菌的第一、第二和第五批发酵结果,第五批以后发酵达到稳定。这时微囊化培养的乳酸转化率为 57% ~

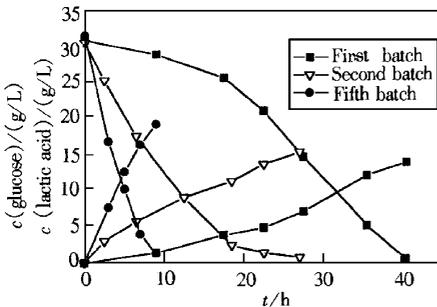


图 3 短乳杆菌在微囊化培养时第一批、第二批和第五批时糖浓度和乳酸浓度的变化关系

Fig. 3 Concentration of glucose and lactic acid of first ,

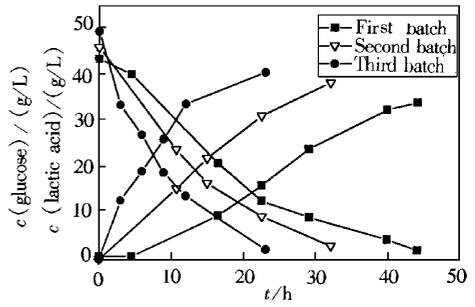


图 4 L. Z. G 乳杆菌在微囊化培养时第一批、第二批和第三批时糖浓度和乳酸浓度的变化关系

Fig. 4 Concentration of glucose and lactic acid curves of

first, second and third batches in the encapsulated cells

64.5% ,培养时间只需 7~9h 左右 ,产酸速率为 1.9~3.3g/L·h ,显然由于培养时间的缩短 ,使产酸速率明显高于游离培养 ,一般可高出 2~5 倍 ,微胶囊中的细胞浓度已达到 1.8×10^{11} 个/mL 胶囊 ,是游离培养的细胞浓度的 20 倍左右。图 4 是 LZG 乳杆菌的微囊化发酵第一至第三批的结果 ,第三批以后发酵达到稳定。在第三批微囊化培养以后 ,不仅产酸速率能提高 1~3 倍 ,而且乳酸的转换率也超过 90% ,有的已达到 100% ,培养时间为 14~32h ,约为游离培养的 30%~40%。此时微胶囊中的细胞浓度已达到 3.2×10^{10} 个/mL 胶囊 ,是游离培养的细胞浓度的 10 倍左右。

2.3 增加糖浓度对微囊化培养的影响

过多的葡萄糖一般会对菌体的生长产生抑制作用 ,所以在游离培养中 ,对糖的浓度有比较严格的限制。这种抑制作用是否在微囊化中有所减轻 ,本工作进行了两个方面考察。

2.3.1 在短乳杆菌的微囊化发酵中 ,从第十五批开始 ,初糖浓度由原来的 3% 增加到 5% ,培养基中其它成份保持不变。结果表明 ,刚开始乳酸的转化率和产酸速率略为下降 ,随即提高 ,到第十七批后又稳定到一个新的水平。此时 ,乳酸的转化率仍为 60% 左右 ,但产酸速率增加到 4.6g/(L·h) ,而且菌浓又开始增加 ,由原来的 1.8×10^{11} 个/mL 微胶囊增加到 2.7×10^{11} 个/mL 微胶囊 ,发酵的时间仍保持在 7~9h (图 5) 。很显然 ,适量的底物浓度不但不产生抑制作用 ,反而促进菌体的进一步生长。

2.3.2 对于 L.Z.G 乳杆菌 ,从第十批起 ,初糖浓度由 5% 增加到 9.5% ,平均乳酸转化率为 90.3% ,平均产酸 3.12g/(L·h) ,发酵时间略有延长(为 24h 左右 ,相应游离培养也延长到 72h 以上) ,细胞浓度增加了一倍左右。从第十四批起又将初糖浓度增加到 15% ,平均乳酸转化率为 80% 左右 ,平均产酸 3.02g/(L·h) ,发酵时间又进一步延长(46h) ,细胞浓度未见进一步提高。但在此浓度下 ,发酵后期的培养液中出现了乳酸钙结晶 ,如果搁置时间稍长几乎将整个发酵液结成固体状 ,此时 ,乳酸的浓度已达到 125g/L 以上 ,远远超过了乳酸钙的饱和浓度。而当在结晶的培养液中加入新鲜培养液 ,结晶的培养液重新溶解 ,发酵继续进行 ,直至出现新的结晶(图 6) 。

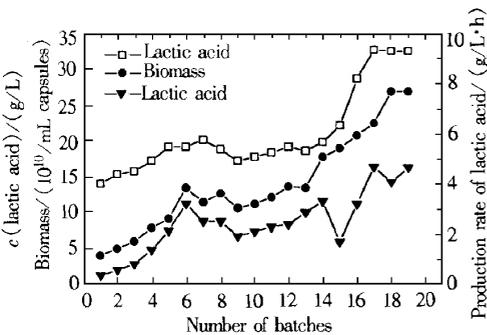


图 5 短乳杆菌微囊化多批次培养时的菌体浓度 ,乳酸浓度和产酸速率

Fig. 5 Variation of concentration of glucose , cells and lactic acid in encapsulated cells

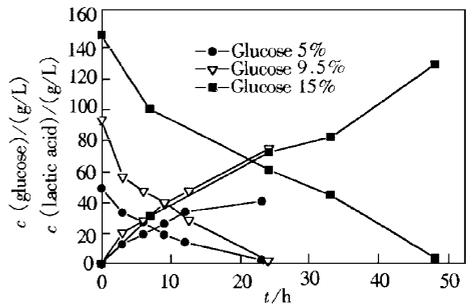


图 6 LZG 乳杆菌在不同初糖浓度时的糖耗和产酸情况

Fig. 6 Concentration of glucose and lactic acid at the different initial glucose concentration in encapsulated cells

由此可见,底物浓度在一定范围内增加,对微生物在微胶囊内的生长无影响,但达到很高时,有一定的影响,主要体现在乳酸的转化率有所下降,细胞浓度不再提高。同时即使产物浓度远远超过了其饱和浓度,对囊内的微生物的影响也很小。很显然,适当提高底物浓度有利于提高乳酸的产率。

2.4 微囊化培养的菌体浓度与产酸水平和速率之间的关系

在微囊化培养的刚初始时的菌浓度较低(如短乳杆菌菌浓为 $9.38 \times 10^7/\text{mL}$ 胶囊),产酸水平也就较低,产酸速率较慢。随着菌浓的增加,产酸水平和产酸速率逐步增高和加快(从第一批至第四批)。到了第五批达到稳定水平,乳酸的转换率为 $57.0\% \sim 64.5\%$,产酸速率可达 $2.0 \sim 3.3\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$,菌浓也稳定在一定的水平(1.3×10^{11} 个/ mL 胶囊)。当继续增加培养基中初糖浓度时,产酸水平和速率又有提高,并达到一个新的较高水平,菌浓也增加了 80% ,而发酵时间不变,显然这些对发酵有利。

2.5 L. Z. G 乳酸杆菌发酵培养中氮源的消耗

在游离培养过程中,多批重复发酵过程相似,氮源消耗不大,表 1 为其中第三和第四批的结果;在微囊化培养中,第一批培养时氮源的消耗相对较大,而以后几批消耗就减少。这些数据说明在 L. Z. G 乳杆菌发酵中,对氮源的需求除了在微囊化第一批培养中消耗氮源用于菌体生长外,其余需氮量都不是太大。

表 1 L. Z. G 乳杆菌游离培养和固定化培养中氮源的消耗

Table 1 Nitrogen consumption in free culture and immobilization for *Lactobacillus brevis* Z. G

Free culture			Encapsulation culture		
No.	Initial concentration of nitrogen/(g/L)	Final concentration of nitrogen/(g/L)	No.	Initial concentration of nitrogen/(g/L)	Final concentration of nitrogen/(g/L)
3	1.4090	1.3260	1	1.0244	0.7128
4	1.2600	1.2432	6	1.1270	1.0610

2.6 乳酸的定性定量检测

在用 EDTANa 法对发酵液中的乳酸钙的含量和纯度进行分析时,有可能受到产品中其它酸,如甲酸、乙酸等的干扰,因此本文又采用了高效液相色谱对发酵液进行检测。分析样品为 L. Z. G 乳杆菌的微囊化和游离培养溶液,用乳酸钙、乙酸钙和甲酸钙标准样品标定。结果显示微囊化和游离培养样品均在与标准样品乳酸钙相同的位置出现吸收峰,而在乙酸钙和甲酸钙的位置没有吸收峰,峰形的大小也一致。说明 L. Z. G 乳杆菌发酵主要产乳酸,但游离培养样品吸收稍有拖尾现象,而微囊化培养样品的吸收峰非常光滑,没有拖尾现象。

3 讨论

在第一批微囊化培养时,其目的就是在微囊内积累乳杆菌,再加之菌体对周围环境有一个适应过程,所以糖耗或产酸速率与游离培养相比无优越性,随着一批又一批发酵的进行,除了微胶囊内菌浓继续缓慢增加外,由于菌体浓度已处于较高的水平,产酸和糖耗的速度明显高于游离培养。通过对两种菌体分别进行十九批和十六批的微囊化培养,表明了乳杆菌在囊内能够很好地生长和繁殖,与游离培养一样正常甚至比游离培养更好地产生代谢产物。由于微胶囊内能聚集高密度的菌体,并能在分批发酵中重复利用,在保持乳

酸转化率不变的情况下,大大缩短了发酵时间,提高了产酸速率。有几批 L. Z. G 乳杆菌的转化率达到了 100%,并且还能在培养液中结晶。

实验还发现适当增加糖浓度不但没有抑制细胞生长,反而还可以刺激囊内菌体的新一轮生长和繁殖。在乳酸发酵已处于比较稳定的情况下,微囊化培养方式的出现使产酸率成倍增加,会对乳酸的发酵法生产困难有一个突破,即使利用原有的发酵罐,也可以生产出更多的乳酸。同时微囊化培养的料液中不含菌体,对简化后处理过程也具有积极的作用。

本文的结果以及我们在酒精微囊化的结果,都表明了菌体的高浓度和产品产率的成倍增加,从而说明该微胶囊体系在高密度细胞培养、高效率生产生物制品具有良好的发展前景。

参 考 文 献

- [1] Jen A C, Wake M C, Mikos A G. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50** :357.
- [2] 解玉冰,马小军,虞星炬,等.全国第八界化学工程论文报告会论文集.天津:天津大学出版社,1996.
- [3] 袁中一.生物工程学报,1990, **1** (8):81.
- [4] Rupp R G. *Large-Scale Mammalian Cell Culture*. New York: Academic Press, 1985. 19~38.
- [5] Lim F, Sun A M. *Science*, 1980, **210** :908.
- [6] Butler G B. U S Patent, 3 288 770, November 29, 1996.
- [7] 沈彧,姚善泾.化学工程与工艺,1999, **3** :213.
- [8] Dautzenberg H, Loth F, Fechner K, et al. *Makromol Chem Suppl*, 1985, **9** :211.
- [9] Yao S J. Verfahrenstechnische Auslegung einer Anlage fuer die Natrium-Cellulosesulfat-herstellung zur Immobilisierung von Biokatalysatoren. VDI-Verlag, Dusseldorf, Germany, Feb, 1996. 57~90.
- [10] 姚善泾.生物工程学报,1998, **1** (2):195.
- [11] 张惠勇,梅乐和,姚善泾.生物工程学报,1999, **1** (3):225.

CULTIVATION OF LACTOBACILLUS IN MICROCAPSULE*

Ye Zijian Yao ShanJing

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, 310027)

Abstract: The NaCS-PDMDAAC capsules were used to immobilize the two kinds of *lactobacillus*. The experiment results showed that two kinds of *lactobacillus* could grow well, and the densities of cells were $1.8 \times 10^{11}/\text{mL}$ eapsule and $2.79 \times 10^{11}/\text{mL}$ capsule, respectively which was much higher than that in free cell culture. The conversion rate of lactic acid could be 2~5 folds higher than that in free cell culture.

Key words: Cultivation of immobilized cells, Micro-capsules, Fermentation of lactic acid, NaCS-PDMDAAC system