

评论

微生物的过滤培养及其利用

汪恩浩

(北京市营养源研究所, 北京)

微生物反应所生成的有用代谢产物, 有的在菌体内部, 有的分泌到菌体外。其产量, 前者与菌体量成比例, 后者增加菌体浓度, 产率不一定能增加, 但在其他条件不变的情况下, 代谢产物的生成速度与菌体量成比例。显而易见, 为提高反应器单位体积的产率是提高菌体浓度极为有效的方法。

通常微生物培养的对数生长期很短, 很快就转为减速期和停止增殖的稳定期。一般认为其原因是 (1) 能源不足; (2) 培养液 pH 的变化; (3) 氮、磷、溶解氧、各种金属盐等营养成分的缺乏; (4) 增殖阻遏物的积累等。如能除去这些因素的限制, 就能维持对数生长, 在短时间内获得很高的菌体浓度。

过滤培养是一种新的细胞培养方法。它是在普通的培养装置上, 附加一套过滤系统, 用泵使培养液流过滤过器, 过滤器表面的微孔结构使得微生物细胞不会漏出。滤液流出培养体系而被浓缩的培养液返回培养罐。同时由液面计控制的流加泵添加新鲜培养基以维持培养液体积不变。此法的特点是在进行连续培养的同时利用超滤把细胞保留在反应体系内, 是连续培养与超滤的结合。代谢产物因过滤而被除去, 营养物质因流加而得到补充, 微生物细胞因超滤而不会流失。因此过滤培养能实现高浓度菌体培养和达到很高的反应产率。随着过滤材料和分离技术的飞跃发展, 人们期待这一新型的培养方法将大规

模地应用于生物工业^[1-8]。

方法和原理

过滤培养常用高分子聚合膜做成的空心纤维过滤器 (Hollow fiber module)。其典型构造是将一束各向异性的空心纤维粘接在一个容器上, 形成一个壳体和管路组成的构件 (图 1)。这种空心纤维有一

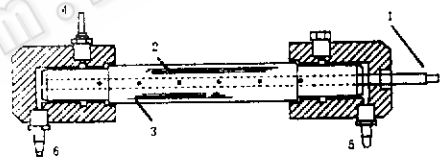


图 1 空心纤维培养器示意图

- 1. 细胞孵育管
- 2. 空心纤维
- 3. 空心纤维外壁毛细管空间
- 4. 空心纤维外壁毛细管空间出口
- 5. 培养液入口
- 6. 培养液出口

层 1—2 μm 的微孔表皮和支持此表皮层的 50—70 μm 厚的大孔状疏松载体。膜表面微孔的直径可达 0.2 μm 。因此这种膜能允许底物和产物通过, 同时截留住微生物细胞, 它有很大的比表面积和过滤速度, 又不易被堵塞。当细胞培养到一定浓度时 (通常是在对数生长后期) 开动循环泵, 驱使培养液以很高的流速通过过滤器。在压力的作用下, 滤液透过空心纤维膜流出, 而细胞返回到培养罐中。由于菌液与滤液的流动方向成直角, 故过滤面时被流动的培养液更新。与通常的同方向

本文于1986年12月20日收到。

过滤不同,其滤饼厚度不会随着过滤的进行而增加,故能进行长时间连续有效的过滤。这种过滤方法又称为交叉流动过滤(Cross flow filtration)。

中空纤维膜过滤器的缺点是强度小,不耐高温高压和强碱强酸,因此不能用蒸汽灭菌和强酸强碱洗涤,常用甲醛或次氯酸钠溶液灭菌。为了克服这些缺点,有人采用微孔陶瓷烧结管^[2],也有人在碳管内镀上一层陶瓷用作过滤材料^[9]。陶瓷过滤器可用高压蒸汽灭菌和用强酸强碱处理,甚至可用电加热到1000度以上,在瞬间烧去滤饼层而使过滤性能恢复。但其比表面积要小于中空纤维过滤器。

实验发现过滤速度随菌液流速和过滤压力的增加而增加,但流速过高或压力产生的剪应力对细胞生产不利^[10]。当过滤速度经长时间操作而下降时,可用压缩气体进行脉冲式反冲,实验表明也很有效^[10]。

研究方向和实例

(一) 高浓度菌体培养

为了生产酸奶、干酪等发酵乳制品,对乳酸菌菌母的需求量愈来愈大。一般常用离心法得到菌母,如能培养高浓度的乳酸菌,不仅可省去操作,且可避免离心操作中菌活性的下降和污染。乳酸菌的增殖受到其代谢产物乳酸的抑制。乳脂链球菌(*S. cremoris*)在分批培养时浓度只能达到2.8g/L(干重)左右。采用过滤培养方法,最终菌体浓度达到82g/L^[11]。作为浓缩菌母这一浓度已足够了。

具有保健作用的肠内细菌双歧细菌(*Bifidobacteria*)的增殖同样受到乳酸、乙酸等代谢产物的抑制。分批培养8h,活菌数达最大值 3.0×10^9 /ml,以后开始减

少。10h开始过滤培养,7h以后活菌数达 1.1×10^{11} /ml,提高了37倍^[12]。

(二) 代谢产物的生产

乙醇是初级代谢产物。菌体起催化剂作用,必须有很高的浓度才能高效率地生产乙醇。用过滤培养方法提高乙醇产率的文献很多^[7,8,13-15]。据报道乙醇产率达到27g/L/h,比批发酵法高20多倍^[13]。

发酵法生产丙酮丁醇时,由于乙醇和自溶素等抑制因子对菌体生长和生产的强烈作用,难以进行有效的操作。过滤培养方法使得菌体浓度达到了125g/L,溶剂产率比其他方法高5.4倍^[9]。

对维生素B₁₂生产菌谢氏丙酸杆菌(*Propinibacterium shermanii*)进行过滤培养,70h菌体浓度高达227g/L,维生素B₁₂浓度达52mg/L^[16]。

作者用中空纤维膜过滤器进行乳酸菌的过滤培养。利用计算机记录pH并控制加碱泵的动作时间和速度,并据此推算乳酸生成的速度和浓度,对滤液泵的开启实行在线控制,使滤液中乳酸浓度维持在20g/L左右达14h之久^[17]。

(三) 基因重组菌的培养

色氨酸启动基因是强力启动基因。在分批培养的初期添加色氨酸以抑制转录,待菌体增殖到一定浓度后开始过滤培养,培养液中的色氨酸被滤去,转录开始进行,生产遗传基因的产物。用这种方法培养了用带有 β -半乳糖苷酶遗传基因*lacZ*质粒进行转化的大肠杆菌C600株。菌体浓度达到60g/L,生成了相当于总蛋白量10%的 β -半乳糖苷酶^[11]。

(四) 过程控制与最优化

过滤培养既然是一种新型的培养方法,其培养过程的控制和最优化等问题自然有其特殊性。迄今这方面的报道甚少。如以培养高浓度菌体为目的,如何控制过

滤速度,使得消耗的基质最少,是很有趣的研究课题。如果培养的目的在于取得代谢产物,则过滤培养开始的时间、过滤的策略、最优化菌体浓度和产物浓度的确定和控制方法以及流加培养基成分的确定等因素都影响到最优化的目标,需综合考虑。

评价与展望

与其他培养方法比较,过滤培养有以下一些特点:

1. 过滤培养能在不损失细胞的情况下除去生长抑制物或代谢阻遏物。在过滤速度的允许范围内可任意选择稀释率而不用担心洗出的危险。由于对数生长期的延长,故细胞浓度可在短期内要比分批或连续培养高几倍乃至上百倍。因此,大大提高了单位体积的产率。菌体浓度的提高不仅增加产率,缩小反应器体积,而且减少了培养废液,减轻后处理工序的负担。

2. 透析培养,即利用透析膜使培养液中的产物和外部贮罐内的营养物进行交换和产物的培养方法。虽可得到高浓度的细胞^[3],但与过滤培养相比,由于物质的传递是通过透析进行的,是一种扩散过程。因此为了得到足够的扩散速度,营养贮罐与培养罐的体积比需很大,显然难以放大和推广使用的,而且很难控制培养液内各组分的浓度。在过滤培养中,基质流加和代谢产物的除去是分别进行的,过滤速度可通过调节流速和压力来控制。培养液的营养物浓度也通过流加基质的浓度来控制,因此过滤培养易控制,操作范围广。

3. 在培养的同时,用减压蒸馏法除去代谢阻遏成分的培养法适用于低沸点物质(如乙醇)^[10]。萃取培养法则是在培

养液中加入有机溶剂,利用代谢阻遏物在溶剂和水中分配系数之差达到解阻遏的效果^[20]。然而,寻找无毒、安全、分配系数大、价廉、易回收的溶剂并非易事,且因研究的对象而异。但是过滤培养不受这些条件限制,只要不形成菌丝的微生物细胞几乎都可以运用。

4. 固定化细胞反应器有很高的细胞密度和单位体积产率,也能实现长期稳定生产。过滤培养也可以看成是固定化增殖细胞的特例。不同的是前者属多相反应体系,细胞与培养液中的基质、代谢产物之间的传质受扩散阻力的影响。后者属均相反应体系,不存在传质阻力。

在培养好氧性细菌和酵母菌时,如果细胞浓度太高,则很难供应足够的溶解氧。此时宁可牺牲些产物生成速率,也要控制细胞的增殖,使其与供氧能力相适应。控制的方法包括营养限制或饥饿、生长抑制剂的添加或积累等。过滤培养是均相体系,容易检测细胞浓度和液氧水平,因此也便于进行最优控制。

5. 将培养液连续离心,同时使部分细胞回流培养罐的方法与过滤培养的原理一致,是一个有可能大规模采用的方法^[21]。由于离心机和联接管道所占的体积,要求培养液体很大,故不适宜实验室规模的研究。中空纤维膜的过滤培养系统装置简单,体积也小得多。

过滤培养技术开始于60年代末,近几年来随着膜分离技术和陶瓷材料的飞跃发展而日益受到人们的关注。这一简单的技术消除了生物过程固有的速率限制作用,使得工程师有可能选择发酵罐的生产率。这种装置又是研究抑制现象和高密度细胞培养物生理的有力的实验工具,因为稀释速率和菌体浓度可以独立地在很大范围内变动。当然这一技术要进入大规模工业过

程，还须等待超滤材料和技术的进一步发展。过滤培养的优越性已为许多实验所证实。一旦高分子超滤膜和微孔陶瓷材料廉价出现于市场时，发酵工业就会发生一场

技术革命。我们应密切注视这一领域的动向，并希望积极研究开发适用于微生物过滤培养的材料和技术。

参 考 文 献

- [1] Sortland, L.D. and Wilke, C.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 11:805, 1969.
- [2] Bull, D.N.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23:373, 1981.
- [3] Hamilton, K.M. and Howell, J.A.: Proc. Conference, Adv. Ferm., London, (Suppl. Proc. Biochem.,) p.171, 1983.
- [4] Omstead, D.R. et al.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 10:247, 1980.
- [5] Vick Roy, T.B. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 5:665, 1983.
- [6] Inloes, D.S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:264, 1983.
- [7] Lee, J.H. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 25:659, 1983.
- [8] Janssens, J.H. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 26:1, 1984.
- [9] Ferras, E. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28:523, 1986.
- [10] 小谷伸始：名古屋大学工学部修士论文，p.31, 1986.
- [11] 谷口正之等：日本发酵工学会大会讲演要旨集，p.152, 1986.
- [12] 丹野克俊等：同上，p.553, 1986.
- [13] Nishizawa, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 61:599, 1983.
- [14] Nishizawa, Y. et al.: *ibid.*, 62:41, 1984.
- [15] Inloes, D.S. et al.: *Appl. Microtechnol.*, 23:85, 1985.
- [16] 畑中英孝等：日本发酵工学会大会讲演要旨集，p.121, 1986.
- [17] 汪恩浩等：同上，p.218, 1986.
- [18] Gallup, D.M. and Gerhardt, P.: *Appl. Microbiol.*, 11:506, 1963.
- [19] Cysewski, G.R. and Wilke, C.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 19:583, 1977.
- [20] Taya, M. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 63:181, 1985.
- [21] Fukuda, H. et al.: *ibid.*, 56:354, 1978.