

粟酒裂殖酵母细胞絮凝研究

马 悦 吴佩琮 周祥山

(无锡轻工大学生物工程学院,无锡 214036)

摘要 利用一株具有自身絮凝能力的粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 变异株作为进行无载体固定化细胞酒精发酵的出发菌株,对影响其絮凝的环境因子和诱导操作条件进行了研究,并利用响应面分析技术 (RSA) 对此菌株的絮凝诱导操作工艺进行优化,建立了经验模型和快速高效絮凝细胞颗粒技术的最佳工艺条件。

关键词 粟酒裂殖酵母;絮凝颗粒;诱导;响应面优化

中图分类号 TS261.11

0 前 言

固定化酵母细胞技术是当今酒精连续发酵工艺的重要研究方向之一^[1,2]。近年来利用某些发酵性能优良并具有强自身絮凝能力的菌株形成颗粒,以此作为一种固定化细胞的方法实现酒精连续发酵的研究正在进行^[3~10]。与常规的各种载体固定化细胞技术相比,具有方法简单、无辅助材料附加费用、对细胞无毒副作用、反应器内细胞浓度高等突出优点,对于酒精这种大宗价廉的发酵产品展示为更为现实的工业化前景,是固定化细胞技术的一个深入发展和趋势。

我们选用一株具有强自身絮凝能力粟酒裂殖酵母变异株,对该酵母菌株形成絮凝颗粒的环境因子和营养条件进行了研究,确立了关键诱导因素,并利用 RSA 法进行优化分析,以期建立一种快速、高效的细胞絮凝颗粒技术,为发展无载体固定化高强度酒精发酵系统和实现这一技术工业化提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及细胞颗粒培养方法

1.1.1 菌种 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 变异株,由无锡轻工大学生物工程学院再生资源研究室提供。该菌株具有强自身絮凝能力,且酒精发酵性能良好。

1.1.2 培养基 摇瓶活化种子培养基 (g/L): 葡萄糖 50,酵母膏 5,蛋白胨 5,麦芽汁 30 (10°Bx), pH 自然;絮凝培养基组分及 pH 随实验要求而定。培养基均在 0.08 MPa 压力下灭菌 20

收稿日期: 1996-03-21

第一作者: 马 悦,男,1970年3月生,工学硕士

min.

1.1.3 细胞颗粒培养方法 斜面菌种接入活化种子培养基中,在 30℃, 150 r/min 下回转摇瓶培养直至细胞浓度达到 10¹¹ /L 时,以 10% 的种量接入絮凝培养基,静置 24 h 后摇瓶培养 (100 r/min),振荡培养时间及其它培养条件根据实验要求而定。

1.2 絮凝性评价方法

1.2.1 絮凝体积法 将摇瓶内培养物摇匀,全部倾倒入 50 ml 量筒 (分度值 0.1 ml) 内,将量筒反复倾覆 5 次,垂直静置 5 min,读取絮凝菌体沉降所占体积数^[11]。

1.2.2 絮凝细胞检测法 将摇瓶内培养物全部倾倒入量筒内,静置 5 min,取液面下 2 cm 处 0.5 ml 样液稀释 1 倍,用血球计数板在显微镜下计数,得游离细胞数;将剩余样液于 90℃ 水浴中搅拌加热 5 min,摇匀后取 0.5 ml 样液作为样品稀释 10 倍后在血球计数板上计数,得培养物总细胞数,两者之差值即为絮凝细胞数^[11]。

2 结果与讨论

2.1 生理阶段和操作条件的确定

2.1.1 生理阶段的影响 微生物的絮凝是其生活史中的一个特殊阶段,必须在特定的生长时期进行有效的诱导才能使具备了絮凝潜力的细胞形成絮凝颗粒。

粟酒裂殖酵母的絮凝行为是其从无性繁殖生长路线进入有性繁殖阶段的标志,称之为性致絮凝 (Sex-Directed)^[11]。确定这一生长路线的转折点成为有效诱导的关键。从表 1 的实验结果来看,最佳诱导时期为对数生长末期和平衡初期之间一段比较狭小的阶段。

表 1 絮凝诱导生理阶段确定

生理阶段	迟滞期	对数初期	对数中期	对数末期	平衡初期	平衡中期	平衡末期	衰退期
絮凝程度	-	-	-	+++	+++++	++	+	-

注: - 表示不产生絮凝体; + 表示形成絮凝体

2.1.2 操作条件的确定 粟酒裂殖酵母细胞间的聚集是依靠彼此细胞壁上的糖蛋白中氢键的连接而完成的^[11],因此在不影响氢键力的条件下,促进细胞间有效碰撞接触,将加速絮凝颗粒的形成。表 2 反映了机械剪切力对絮凝的影响。可以看出,往复式摇床的机械剪切力较大,对氢键结合力的破坏作用强烈,不宜培养絮凝体;回转式在 150 r/min 以下都可形成颗粒,从快速建立细胞絮凝颗粒技术的角度,最佳操作条件为 100 r/min。

表 2 摇床转速对絮凝诱导的影响

摇床转速 /r min ⁻¹	50 (回转)	100 (回转)	150 (回转)	250 (回转)	50 (往复)	150 (往复)
颗粒形成时间 /h	12~ 15	3~ 5	24	-	48 以上	-

注: - 表示不形成絮凝颗粒

2.2 环境因子的影响及关键因子确定

粟酒裂殖酵母絮凝颗粒的形成涉及到许多环境条件 (包括营养条件),对此国内外许多学者进行过大量研究和报道^[9, 12, 13],但由于研究目的不同,菌株差异以及考察指标的各异,研究结果存在着明显的不一致,甚至相反的结论。为此,笔者根据研究的目的,在分析了有关文献的基础上,采用 Fractional factorial design 方法^[14],对葡萄糖、蛋白胨、pH 等 7 项因素进行了筛选考察实验。因素水平、设计方案及结果见表 3。以絮凝颗粒单位时间内 (5 min) 沉降

体积和絮凝细胞百分数作为响应值

表 3 考察实验设计方案及结果

序号	葡萄糖 /g. L ⁻¹	蛋白胨 /g. L ⁻¹	酵母膏 /g. L ⁻¹	麦芽汁 /g. L ⁻¹	pH	振荡时间 /h	通气量	絮凝体积 /ml	絮凝细胞 (%)
1	50	2	2	10	4	3	L	2.0	72.0
2	50	2	2	50	6	6	A	2.7	74.6
3	50	2	8	10	6	3	A	1.8	65.3
4	50	2	8	50	4	6	L	2.1	70.5
5	50	8	2	10	6	6	L	3.6	78.8
6	50	8	2	50	4	3	A	3.4	83.5
7	50	8	8	10	4	6	A	2.6	75.5
8	50	8	8	50	6	3	L	1.9	67.4
9	150	2	2	10	4	6	A	1.2	31.3
10	150	2	2	50	6	3	L	0.9	42.9
11	150	2	8	10	6	6	L	1.0	50.7
12	150	2	8	50	4	3	A	1.4	53.8
13	150	8	2	10	6	3	A	2.3	78.4
14	150	8	2	50	4	6	L	2.5	74.3
15	150	8	8	10	4	3	L	1.8	51.9
16	150	8	8	50	6	6	A	2.5	62.5
17	100	5	5	30	5	4.5	A	4.2	78.9
18	100	5	5	30	5	4.5	A	4.2	78.4
19	100	5	5	30	5	4.5	A	4.1	79.0

注: L- 限氧通气; A- 强通气.

2.2.1 关键因子确定 运用 Pareto chart法^[14]和 Normal plot法^[15]对实验结果进行效应评估: 葡萄糖、蛋白胨、振荡时间(开始通气时间)对絮凝体积具有显著影响(见图 1,图 2),其中高糖浓度有抑制作用,蛋白胨和振荡时间两因素则起积极影响;以絮凝百分数为响应值,葡萄糖、蛋白胨和它们的交互项效应显著,(见图 3,图 4),低水平葡萄糖浓度有利于絮凝诱导;碳氮比在某个特定范围起积极作用. 综合分析,确定葡萄糖、蛋白胨、振荡时间为絮凝诱导关键因子.

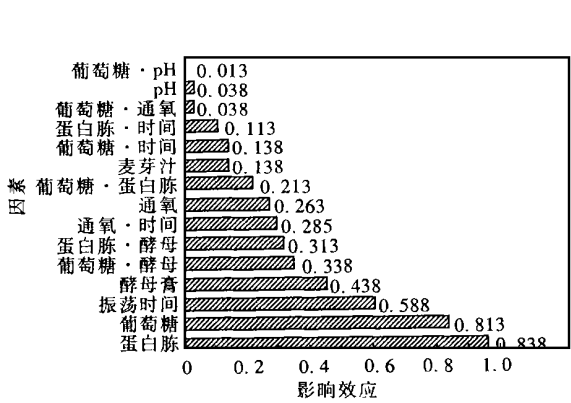


图 1 性能准则为絮凝体积的 Pareto 点绘

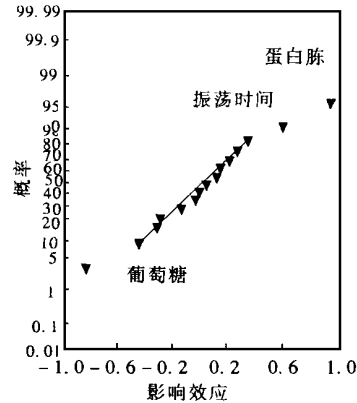


图 2 性能准则为絮凝体积的正态概率点绘

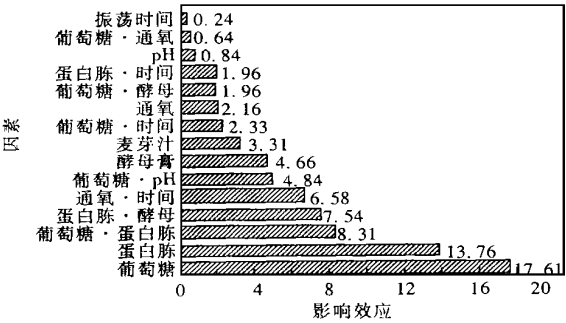


图 3 性能准则为絮凝细胞百分数的 Pareto 点绘

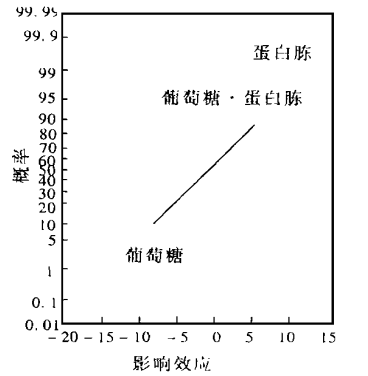


图 4 性能准则为絮凝细胞百分数的正态概率点绘

2. 2. 2 其它环境因子的影响

1) 氢离子浓度 从图 1 和图 3 中可以看出,在试验范围内 pH 值对絮凝几乎没有什么影响。事实上, Calleja, G B^[16] 的研究已证明,对于粟酒裂殖酵母来说,在 pH2~ 1 的氢离子浓度范围内,其细胞絮凝体表现出良好的稳定性。因此,为简化培养基配制,采用 pH 自然 (pH5.4~ 5.8)。

2) 酵母膏与麦芽汁 在已有的研究文献中,这是一个较有争议的方面。轻工总会发酵研究所的裴疆森等人^[9]的研究认为:酵母膏具有促进絮凝的正面效应。笔者对此做了大量反复实验,结果与 Calleja, G B 等人^[12, 13, 17]的结论相一致,认为酵母膏为限制性因素。相反,麦芽汁具有一定的促絮凝作用。另一方面,从同样作为氮源的蛋白胨效应分析,二者具有排斥性,可能是由于其中所含的氨基酸等含氮物质不同所致,这与国外许多学者假设的絮凝诱导需要合成某些特殊的细胞质蛋白的絮凝机理相吻合^[11]。

3) 供氧量 絮凝作为 *S. pombe* 有性繁殖的必经阶段,满足菌株正常生长所需氧量是必需的。具体到内部机制,目前比较一致的看法是细胞絮凝所需的某些代谢物的合成、线粒体发育及细胞生长所需能量都需要充足的供氧。笔者曾做过厌氧诱导试验,结果十分明确:无氧环境不能形成絮凝颗粒。

2. 3 絮凝诱导培养的响应面优化分析

根据以上筛选考察试验的分析结果,我们采用响应面分析 (RSA) 法对粟酒裂殖酵母的颗粒诱导培养条件进行了优化。以葡萄糖、蛋白胨、振荡时间 3 个因素为自变量,絮凝体积和絮凝细胞百分数为响应值,设计了三因素三水平的实验;其它培养条件为:酵母膏 2 g/L,麦芽汁 30 g/L, pH 自然,强通气。实验因素与水平选取见表 4。15 个试验点分为 2 类,其一是析因点,自变量取值在 X_1 , X_2 , X_3 所构成的三维顶点,共 12 个析因点;其二是零点,为区域的中心点,试验重复 3 次,用以估计试验

表 4 RSA 试验因素与水平取值

因素	编码	因素取值	水平
葡萄糖 /g · L ⁻¹	X ₁	- 1	50
		0	100
		1	150
蛋白胨 /g · L ⁻¹	X ₂	- 1	4
		0	8
		1	12
振荡时间 /h	X ₃	- 1	4.0
		0	6.0
		1	8.0

误差。以絮凝体积 (Y_1)、絮凝细胞百分数 (Y_2) 为响应值,经回归拟合后,各试验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$Y_1(\text{或 } Y_2) = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3$$

从方差分析表(见表 5)可以看出,方程一次项、二次项的影响都是高度显著的,因此各个具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。对于方程 Y_2 来说,各因子之间的交互项作用高度显著,这与因素筛选考察试验所分析的结论是一致的。对回归方程进行一阶偏导求解最佳点的值,得到:葡萄糖 82.98 g/L 蛋白胨 8.03 g/L 振荡时间 4.98 h(絮凝体积);葡萄糖 81.10 g/L 蛋白胨 8.20 g/L 振荡时间 5.90 h(絮凝细胞百分数)。综合两方面的考虑,并考虑到实际配制和操作的方便,得出实际最佳诱导培养条件为:葡萄糖 80 g/L 蛋白胨 8 g/L 振荡时间 5.5 h。*S. pombe*在此培养条件下诱导培养 30 h,得到絮凝体积 5.2 ml (50 ml培养液),絮凝细胞百分率 90%的较好结果,与计算值非常吻合。

表 5 回归方程各项的方差分析表

方差来源	自由度	均方	F值	显著性
方程 Y_1 : 一次项	3	1.323	396.751	* *
二次项	3	5.117	1535.18	* *
交互项	3	0.298	89.2502	*
失拟项	3	0.039	11.7502	
误差	2	0.003		
方程 Y_2 : 一次项	3	194.798	1217.475	* *
二次项	3	406.483	2540.498	* *
交互项	3	37.2983	233.1129	* *
失拟项	3	1.53249	9.578	
误差	2	0.16		

$$f_{0.01}(3, 2) = 99.2 \quad f_{0.05}(3, 2) = 19.2 \quad f_{0.1}(3, 2) = 9.16$$

根据摇瓶实验分析优化结果,采用木薯粉糖化液添加玉米浆配制成工业用培养基,在 3 L气升悬浮式反应器内进行小罐絮凝培养,10 h内即可得到满足发酵要求的性能优良的絮凝颗粒,且颗粒沉降分离特性和稳定性大大优于摇瓶结果,这可能是由于木薯粉糖化液内含有某些促絮凝因子,有待进一步研究。

3 结 论

- 1) 粟酒裂殖酵母的絮凝现象是其生活史中一个积极的生理行为,环境因素及操作程序对其影响明显,必需在适宜诱导因素的调节下,才能形成物性良好的颗粒。
- 2) 最佳诱导调节时机应选在对数生长期的最后一代,为建立快速高效颗粒技术,摇床转速定为 100 r/min较好。
- 3) 充分的供氧量对絮凝颗粒的形成和生长是必需的,厌氧条件不形成颗粒。粟酒裂殖酵母的絮凝颗粒在很宽的 pH范围内表现出稳定性,酵母膏为絮凝培养的限制性因素,应控制在较低水平(2 g/L)。
- 4) 葡萄糖、蛋白胨、振荡时间(通氧时间)是诱导关键因素,高糖浓度抑制颗粒形成,碳氮比在一定的范围内有最大效应。RSA优化的最佳培养条件为:葡萄糖 80 g/L 蛋白胨 8 g/L 振荡时间 5.5 h。

参 考 文 献

- 1 Nagashima M. Continuous Ethanol Fermentation Using Immobilized Yeast Cell. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 26: 992
- 2 Nunez M J, Lema J M. Cell immobilization Application to alcohol production. *Enzyme Microb Technol*, 1987, 9: 642
- 3 Hsiao H Y. Ethanol Fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25: 263
- 4 Jones S T. Ethanol Fermentation in a Continuous Tower Fermentor. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 26: 742
- 5 Limtong S. Continuous Ethanol Production by a Concentrated Culture of Flocculating Yeast. *J Ferment Technol*, 1984, 62: 55
- 6 Kida K. High-Ethanol Fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *J Ferment Bioeng*, 1989, 68: 107
- 7 Kida K. Continuous High-Ethanol Fermentation from Cane Molasses by a Flocculating Yeast. *J Ferment Bioeng*, 1990, 69: 39
- 8 秦金来. 絮凝颗粒酵母均匀悬浮体系生长动力学研究. *生物工程学报*, 1995, 11(2): 139~ 144
- 9 裴疆森, 王薇青. 裂殖酵母 IFF11792的絮凝作用及其酒精发酵的性质. *食品与发酵工业*, 1991, (1): 11~ 19
- 10 冯朴荪. 粟酒裂殖酵母颗粒酒精发酵. *生物工程学报*, 1989, 5(1): 70
- 11 Calleja G B. *Microbial Aggregation*, New York: CRC, 1984
- 12 Calleja G B, Johnson B F. Flocculation in a fission yeast. *Can J Microbial*, 1971, 17: 1175
- 13 Calleja G B. Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbial*, 1970, 64: 247
- 14 Haaland P D. *Experimental Design in Biotechnology*. New York: Decker, 1989
- 15 Box G E P, Hunter W G. *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: Wiley, 1990
- 16 Calleja G B. On the Nature of the Forces Involved in the Sex-Directed Flocculation of a Fission Yeast. *Can J Microbial*, 1974, 20: 797
- 17 Calleja G B. Role of Mitochondria in the Sex-Directed Flocculation of a Fission Yeast. *Arch Biochem Biophys*, 1973, 154: 382

Study on Optimization of Flocs from *Schizeosaccharomyces pombe* by RSA

Ma Yue Wu Peicong Zhou Xiangshan

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract Inducing yeast cells to self-flocculate as a cell immobilization method, the environmental factors and manipulative conditions of the flocs from *Schizeosaccharomyces pombe* were studied. Based on the results of screening experiment, glucose, peptone and shaking time were decided as the important induced factors. Using Response Surface Analysis method, the suitable cultivated condition of the flocs was obtained. Under the optimal condition, the cell in flocs(%) induced in flask by *S. pombe* was 90% and the volume of flocs in culture (50 ml) was 5.2 ml.

Key words *Schizeosaccharomyces pombe*; flocs; inducing; RSA; optimization

(责任编辑: 陈 娇)