

棒状杆菌固定化细胞生产 L(+)-酒石酸

张建国 钱亚娟

(浙江大学生命科学学院 杭州 310027)

摘 要 以卡拉胶为载体,固定化棒状杆菌(*Corynebacterium sp.*)JZ-1 菌株细胞,再经活化处理,顺式环氧琥珀酸水解酶(ESH)酶活力总回收率在 100% 以上。摇瓶反应 10 批,酶活力没有明显降低。1500L 酶柱中连续运行 90d,酶稳定性很好。固定化后酶反应的最适温度(45℃)和最适 pH(9.0)没有改变,而热稳定性、pH 稳定性增强。

关键词 卡拉胶,固定化细胞,L(+)-酒石酸

中图分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0188-05

L(+)-酒石酸为天然有机酸,又称 d-酒石酸,具有广泛用途^[1]。它最初是从葡萄酒生产的副产品酒石中提炼获得的,因酒石供给不足,人们试图采用其它方法来生产。1972 年 Kotera 等报道了弱氧化葡萄糖杆菌 *G. suboxydans* 在葡萄糖基质上能产生 L(+)-酒石酸^[2],1973 年 Ivanov 等报道了拆分 DL-酒石酸为 L(+)-酒石酸^[3],虽然以上方法为 L(+)-酒石酸生产提供了可选择途径,但商业价值还不高。1976 年 Kamatani 等利用微生物转化顺式环氧琥珀酸产生 L(+)-酒石酸^[4],使 L(+)-酒石酸的商业化生产成为真正的可能。1990 年我们实验室采用棒状杆菌 *sp.* JZ-1 生产 L(+)-酒石酸^[5],1995 年孙志浩等人以明胶为载体固定化微生物细胞生产 L(+)-酒石酸^[6]。但未见有工业性试验成功的报道。本文在前文^[5]报道的基础上进一步探讨了细胞固定化的方法,找到了一种具有较高酶活性回收率和操作稳定性的固定化方法。

1 材料和方法

1.1 材料

顺式环氧琥珀酸二钠由本实验室合成制备,卡拉胶由海南省琼海市青葛琼脂厂生产,其余试剂均为市售化学纯或分析纯。

1.2 菌种

棒状杆菌 *Corynebacterium sp.* JZ-1,由本实验室筛选并保藏。

1.3 固定化细胞制备方法

1.3.1 游离细胞的制备:将细胞培养液在 4000

r/min 条件下离心 10min,所得湿细胞用生理盐水洗涤,离心备用。

1.3.2 固定化细胞的制备:琼脂包埋法、聚丙烯酰胺包埋法、明胶-戊二醛包埋交联法、卡拉胶包埋法、戊二醛交联法、PEI 絮凝-戊二醛交联法等分别参照文献[7~11]报道的方法。

1.4 分析方法

1.4.1 L(+)-酒石酸的测定:参照刘叶青等^[12]的偏钒酸铵比色法或比旋光度测定法。

1.4.2 细胞酶活力的测定:1h 转化顺式环氧琥珀酸二钠生成 1 μ mol L(+)-酒石酸的细胞量定义为 1 个酶活力单位(u)。游离细胞酶活力的测定采用如下方法:取 0.2g 湿细胞,加入 1mol/L, pH8.0 的底物溶液 5mL,在 37℃ 保温反应 1h,离心后取上清液测定酒石酸含量,并计算酶活力。

1.4.3 固定化细胞酶活力的测定:取固定化细胞一份(含湿细胞 0.2g),加入 1mol/L, pH8.0 的底物溶液 5mL,在 37℃ 保温反应 1h,取上清液测定酒石酸含量,并计算酶活力。

1.4.4 凝胶强度测定:参照 I. Takata 等的方法^[13]。

2 结 果

2.1 固定化方法的选择

2.1.1 不同方法制备的固定化细胞的比较:分别用 7 种方法固定化 *Corynebacterium sp.* JZ-1 菌体细胞,固定化细胞的酶活力回收情况见表 1。

表 1 不同固定化方法的比较

Table 1 Comparison of different immobilization method

Carriers	Recovery of enzyme activity/%
Agar	54.00
Poly-acrylamide	15.24
Gelatin	40.77
Carrageenan	69.13
Glutaraldehyde	0
PEI. Glutaraldehyde	16.20
PEI. Carrageenan	25.40

2.1.2 卡拉胶包埋后细胞的稳定性:考察用卡拉胶包埋的 3mm×3mm 固定化细胞的操作稳定性。用 1mol/L, pH 8.0 的底物在摇瓶中连续反应 10 批后固定化细胞形状不变,酶活力没有明显改变,说明其操作稳定性较好。

2.1.3 卡拉胶包埋后细胞的形态图:图 1 的扫描电镜图片显示了固定化前后的细胞形态。该图表明固定化以后细胞的形态没有显著改变。

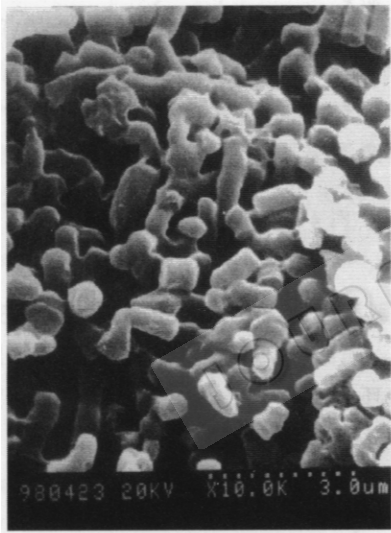


图 1-1 JZ-1 游离细胞的扫描电镜图片

Fig.1-1 SEM graph of JZ-1 free cells

2.2 固定化条件的研究

2.2.1 卡拉胶浓度对固定化细胞酶活力的影响:如表 2 所示,随着卡拉胶浓度的增加,固定化细胞的酶活力回收率增加,至 2.0% 浓度时回收率最高,以后逐渐降低。同时,随着卡拉胶浓度的增加,固定化细胞的机械强度一直呈上升趋势。考虑这两个因素,认为 2.7% 的卡拉胶浓度是最适宜的。

2.2.2 细胞浓度对固定化细胞酶活力的影响:用 2.7% 的卡拉胶包埋不同浓度的细胞生理盐水悬浮液,结果见表 3。随着细胞浓度的增加,固定化细胞酶活力回收率逐渐上升,但浓度过高容易造成硬度下降。综合考虑,13.4% 的细胞浓度是适宜的。

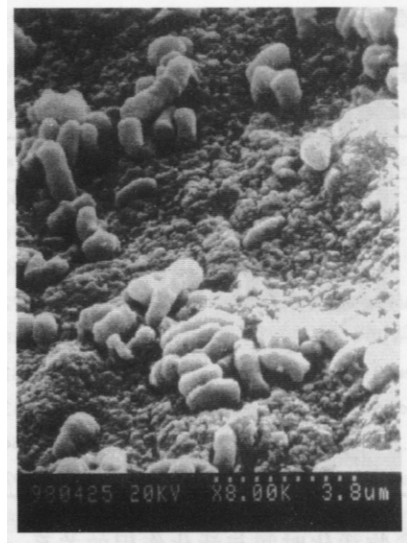


图 1-2 JZ-1 固定化细胞的扫描电镜图片

Fig.1-2 SEM graph of JZ-1 immobilized cells

表 2 卡拉胶浓度对固定化细胞酶活力的影响

Table 2 Effect of carrageenan concentration on activity of immobilized cells

Concentration of carrageenan/%	Activity/u*	Recovery of enzyme activity/%	The gel strength /(g/cm ²)
1.3	3502.5	64.1	483
1.7	3745.7	68.5	551
2.0	4039.7	73.9	669
2.4	3841.9	70.3	722
2.7	3157.4	57.8	945
3.0	2838.4	51.9	1134
3.3	2738.3	50.1	1231

* The initial activity of free cells:5465.6u

表 3 细胞浓度与固定化细胞酶活力关系

Table 3 Effect of cell concentration on activity of immobilized cells

Concentration of cells/%	Activity/u*	Recovery of enzyme activity/%
3.2	3208.2	64.7
6.5	3522.8	71.1
13.4	4849.2	97.8
20.2	5612.2	113.2

* The initial activity of free cells:4956.2u

2.3 固定化细胞的活化作用

2.3.1 活性剂的选择:不同活性剂对固定化细胞的活化作用如表 4 所示。所采用的活性剂均能大幅度提高固定化细胞的酶活力,其中底物的活化作用最

好,这主要是增加了细胞膜对底物的通透性。

表4 底物、表面活性剂对固定化细胞活化作用的比较

Table 4 Comparison of different active agents

Active agents	Relative activity/%
Control	100.0
0.2% DOS	176.5
1.0% SDS	160.4
0.2% Emulsifying agent OP	172.6
0.02% Tween 20	180.4
0.02% Tween80	181.6
0.02% Hexadecyltrimethylammonium bromide	143.4
0.02% SLS	154.7
Substrate 1mol/L	192.0

2.3.2 底物活化时间与活化作用的关系:考察底物活化固定化细胞的时间对固定化细胞酶促反应速率的影响。随着活化时间的延长,酶相对活力升高,在36h后达最大值,以后逐渐下降。认为底物活化时间在24~48h是适宜的。

2.4 固定化细胞的性质

2.4.1 酶促反应的最适 pH 值:在不同 pH 条件下分别测定固定化细胞和游离细胞在 37℃ 时的酶活力,如图 2。二者酶促反应的最适 pH 均为 9.0。

2.4.2 酶促反应的最适温度:在 pH 9.0,不同温度的条件下分别测定固定化细胞和游离细胞的酶活力,如图 3。二者酶促反应的最适温度均为 45℃。

2.4.3 酶的热稳定性:pH 9.0,温度 30℃ 的条件下,分别测定在不同温度下经 30min 热处理的固定化细胞和游离细胞的酶活力。如图 4。固定化后酶的热稳定性有较大提高。

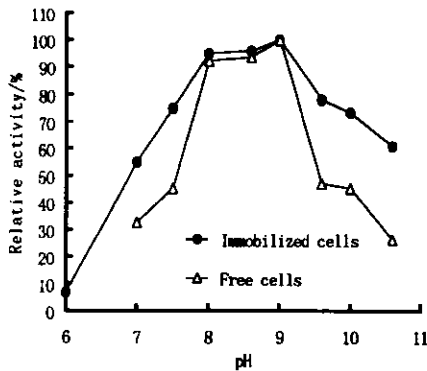


图2 pH对酶促反应速率的影响

Fig.2 Effect of pH on reactive activity
pH6.0~8.0 H₃PO₄ buffer
pH 8.6~10.6 Gly-NaOH buffer

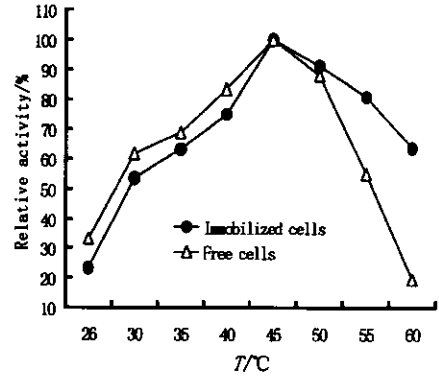


图3 温度对酶促反应速率的影响

Fig.3 Effect of temperature on reactive activity

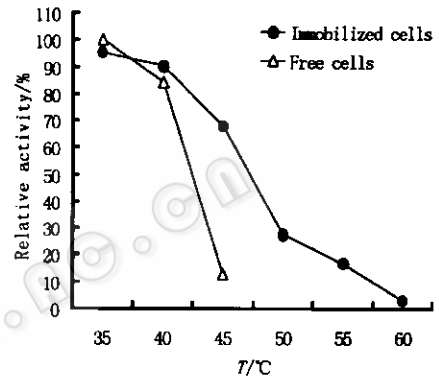


图4 温度对酶稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature on enzymatic stability

离细胞分别浸泡在不同 pH 的缓冲液中,23h 后测定酶的活力。如图 5。固定化细胞和游离细胞的酶在 pH 8.0 的环境中稳定性较好。而且,经固定化后细胞的酶的 pH 稳定性有显著改善。

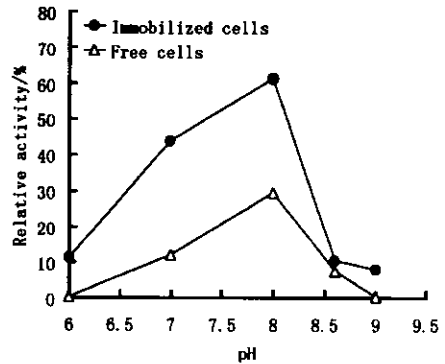


图5 pH对酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of pH on enzymatic stability
pH 6.0~8.0 H₃PO₄ buffer
pH 8.6~10.6 Gly-NaOH buffer

2.4.4 酶的 pH 稳定性:37℃ 下将固定化细胞、游

2.4.5 底物对酶热稳定性的影响:在 45℃ 恒温条件下分别用生理盐水和底物(pH 8.0,1mol/L)浸泡

固定化细胞和游离细胞。在30℃,pH9.0的环境下测定酶的残存活力。实验结果表明底物能明显改善固定化细胞和游离细胞的热稳定性。

2.4.6 固定化细胞的贮藏稳定性:将固定化细胞浸泡在0.2mol/L底物溶液中,于4℃冰箱中保存。每隔一定时间测定固定化细胞的剩余酶活力,以此为标准判断其贮藏稳定性。经过90d贮藏证明其稳定性较好。

2.4.7 固定化细胞的生产稳定性:将细胞含量为8%的固定化细胞900kg装入直径1m,筒体高2m的酶柱中,于37℃通入浓度为1mol/L,pH8.5的底物,体积流速控制在 0.1h^{-1} 左右,摩尔转化率在98%以上。连续运行90d,结果如图6所示。该图表明此固定化细胞稳定性很好,符合工业性生产的要求。

3 讨论

我们采用卡拉胶作为载体制得的固定化细胞具有较高的酶活性回收率和良好的化学和机械稳定性,从固定化方法的选择标准来看亦是可行的^[14]。固定化细胞经过底物活化处理后顺式环氧琥珀酸水解酶酶活性回收率在100%以上,摇瓶连续反应10批,酶活性没有明显改变,进一步的中试表明该固定

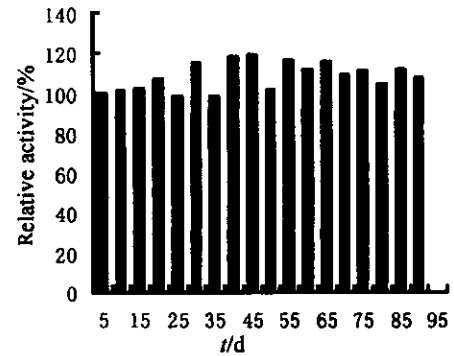


图6 固定化细胞的生产稳定性

Fig. 6 The production stability of immobilized cells

化细胞的操作稳定性很好,能适应大规模工业化应用。

另外此固定化细胞的贮藏稳定性也较好,经0.2mol/L底物溶液浸泡,在4℃冰箱中贮藏90d酶活性基本不变。

实验中发现底物和表面活性剂能大幅度提高固定化细胞的酶活性回收率。这主要是增加了细胞膜对底物的渗透性或造成菌体的自溶。当JZ-1菌体自溶时,酶被截留在凝胶腔内,不会由凝胶逸出,而底物和产物则易由凝胶网逸出,维持了固定化细胞较高的稳定性。

参 考 文 献

- [1] 黄腾华,钱晓梅. 食品与发酵工业,1987,6:68~70
- [2] Kotera U, Umehara K, Kodama T *et al.* *Agr Biol Chem*, 1972, 36(8):1307~1313
- [3] Ivanov M A, Koroleva M I. *USSR*, 408,943
- [4] Kamatani Y, Okazaki H, Imai K *et al.* *Ger Offen*, 2,600,682
- [5] 张建国,黄腾华. 工业微生物,1990,20(2):7~14
- [6] 孙志浩,郑 璞,戴雪泰等. 生物工程学报,1995,11(4):372~376
- [7] 杨廉婉,钟丽婵. 微生物学报,1980,20(3):296~302
- [8] Chibata I, Tosa T, Sato T *et al.* *Appl Microbiol*, 1974, 27(5):878~885
- [9] 居乃璇,仇昌明,黄国英等. 微生物学通报,1983,10(1):8~11
- [10] Takata I, Kayashima K, Tosa T *et al.* *J Ferment Technol*, 1982, 60(5):431~437
- [11] 孙志浩,吴 燕,王 蕾等. 工业微生物,1996,26(2):7~12
- [12] 黄腾华,钱晓梅. 工业微生物,1989,19(4):37~40
- [13] Takata I, Tosa T, Chibata I *et al.* *J Solid Phase Biochem*, 1977, 2(3):225~236
- [14] 陈石根,周润琦编著. 酶学,长沙:湖南科学技术出版社,1987,p. 337

Production of L(+)-tartaric Acid by Immobilized *Corynebacterium sp.* JZ-1

ZHANG Jian-Guo QIAN Ya-Juan

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract *Corynebacterium sp.* JZ-1 cells, which showed a high enzymatic activity of cis-epoxysuccinate hydrolase, were immobilized by entrapping in κ -carrageenan, then treated with some active agents. The recovery of enzyme was over 100%. In shake flask, the stability of immobilized cells was satisfactory after they reacted with disodium cis-epoxysuccinate for 10 batches. The same result was attained in column(1500L) with the substrate fed in continuously for 90 days. The optimum pH value of the immobilized cells was 9.0, the optimum temperature was 45°C.

Key words κ -carrageenan, immobilized cells, L(+)-tartaric acid, *Corynebacterium sp.*

中国微生物学会“迎接 21 世纪微生物学研讨会” 首轮征文通知

由中国微生物学会主办的“迎接 21 世纪微生物学研讨会”定于 2000 年 7 月下旬在山东省烟台市召开。

本次综合性微生物学研讨会的目的是迎接新世纪到来,综合我国微生物学领域多学科实力,发挥集体智慧,相互交流,使我国微生物学工作者掌握最新学科发展动态,促进我国微生物学水平的发展,以崭新的面貌跨入 21 世纪。

会议期间将邀请数名专家进行微生物多样性、现代战争中反细菌战的问题、微生物分子生物学研究进展、细菌基因组学、工业微生物学新能源、微生物与环境保护等方面的专题报告,其后分基础、工、农、医微生物学四大部分进行学术交流。为了使会议内容更加丰富多彩,会议还将邀请众多与微生物学有关的生产厂家前往会场展示产品。会议热忱欢迎全国微生物学工作者参加。

征文内容:

1. 微生物生物多样性;2. 病毒的致病性及流行;3. 细菌与病毒性腹泻;4. 疫苗(包括 DNA 疫苗的进展);5. 生物固氮;6. 生物杀虫;7. 环境的生物治理;8. 生物技术;9. 抗生素耐药性;10. 涉及基础、工、农、医微生物学方面的研究工作。例如:病原微生物的致病机理、医学免疫学、细菌检验、肝炎病毒、艾滋病及 HIV 病毒、医学及普通真菌学及分子生物学、生物制品及干扰素细菌因子研究、生物过程模型化与控制、微生物克隆系统的进展、菌种遗传育种、人兽共患病的基础等,酶工程以及新酶开发、微生物在环境保护中的作用、工业微生物发展、农业微生物……

征文要求:

1. 与会者需提交未公开发表的论文摘要(限 400 字)。
2. 摘要需应用激光打印机打印于 A4 纸上,上下左右均至少留 2.5 厘米的页边距,以便统一装订会议论文摘要集。
3. 论文应用 word6.0 或 7.0 软件排版,请将软盘随稿件一同邮寄或通过中国微生物学会 E-mail: csm@sun.im.ac.cn 提交。
4. 论文摘要不进行审稿,文责自负。

论文截止期:

2000 年 3 月 31 日截止,请用大号信封挂号邮寄,并在信封正面左下角注明“研讨会论文”,同时标明你将参加交流的分会场名称(基础、工、农、医)即“研讨会论文,工”或“研讨会论文,农”……。

寄至北京海淀区中关村北一条 13 号中国微生物学会办公室收 邮编:100080 电话/传真:010-62554677

敬请附上你的详细联系地址(邮政编码、电话(单位及住宅)、传真以及 E-mail 地址),以便我们下发轮通知。

中国微生物学会
2000 年 2 月 16 日