

固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 反应动力学的研究

胡永红* 沈树宝 欧阳平凯

(南京工业大学制药与生命科学学院,南京 210009)

关键词 固定化细胞,产氨短杆菌 MA-2,黄色短杆菌 MA-3,动力学研究

中图分类号 TQ920.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0235-04

多年来虽然有不少学者对固定化细胞生产 L-苹果酸的方法进行过探讨^[1-6],但对过程动力学的研究报道并不多见^[2,7]。在富马酸铵转化体系中的表观动力学及本征动力学模型还未见报道,本文对富马酸铵转化体系中固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞的动力学进行了探讨,测定了两种固定化细胞的表观动力学常数,并进一步求解了相应的本征动力学常数,这一结果便于从理论上指导富马酸铵转化过程的工业化生产。

1 材料和方法

1.1 试剂

富马酸,工业级,苏州合成化工厂;碳酸钙,工业级,泗联化工厂。

1.2 菌株

本文所用的菌株是由我院筛选并保存的产氨短杆菌 MA-2 (*Brevibacterium ammoniagenes* MA-2) 和黄色短杆菌 MA-3 (*Brevibacterium flavum* MA-3)。

1.3 培养基组成

1.3.1 斜面培养基:上述两株菌均于普通肉汤培养基中培养,其成分为:蛋白胨 1%,牛肉膏 0.5%,氯化钠 0.5%。

1.3.2 产氨短杆菌 MA-2 发酵培养基成分:柠檬酸二铵 3%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,玉米浆 4.5%,用 30%NaOH 调节 pH 至 7.5 左右,灭菌后备用。

1.3.3 黄色短杆菌 MA-3 发酵培养基成分:丙二酸 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,玉米浆 2%用 30%NaOH 调节 pH 至 7.5 左右,灭菌后备用。

1.4 培养条件

产氨短杆菌 MA-2 于 32~34℃ 下培养 24~36 h,摇瓶接种量为 10%,摇床转速 180 r/min。黄色短杆菌 MA-3 培养温度为 30~32℃,其余条件同产氨短杆菌 MA-2。

1.5 仪器

DU650 分光光度计(Beckman),MD100-2 电子分析天平

(上海第三分析仪器厂),JJ-1 型定时电动搅拌机(金坛国华仪器厂),CS501 型超级恒温器(重庆试验设备厂),HL-1 恒流泵(上海沪西仪器厂),HZ-81 型回转振荡器(太仓仪器设备厂)。

1.6 分析方法

富马酸含量的测定详见文献[2],苹果酸含量的测定详见文献[3]。

1.7 固定化方法及其活化

固定化方法按文献[1]所述方法进行,为了增加固定化细胞透性及阻遏琥珀酸的生成,需将其浸于内含 0.6%胆汁酸的 1mol/L 富马酸铵(或钠)溶液中,37℃ 活化处理 24 h。

1.8 动力学测定方法

用间歇测定法,加入一定量的固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 颗粒,分别考察了底物富马酸铵和产物苹果酸铵对反应初速率的影响,测定温度为 37℃,实验中检测一定的初始条件下组成随时间的变化,进而求得反应的初速率。

2 结果与讨论

2.1 外扩散对固定化细胞转化反应的影响

众所周知,当反应达到稳态时,传质速率与反应速率相等,而在实际操作上,则通过改变底物富马酸铵溶液的流动状态就能够消除外扩散的影响。

实验中将颗粒直径为 3mm 的固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞分别装入直径为 40mm 柱高为 800mm 的带有夹套的玻璃柱反应器中,通过调节蠕动泵转速,改变反应液的流速,考察外扩散对反应速率的影响。初始富马酸铵浓度取 1.8mol/L 进行实验,结果如图 1 所示。由图可见,随着反应液流速的增加,反应速率逐渐增加,当流速大于 2×10^{-3} m/s 时,流速对固定化产氨短杆菌 MA-2 和固定化黄色短杆菌 MA-3 细胞反应速率基本上没有影响,这是由于高流速流动增加了流体的湍动状态。当流速增加到一定程度时,可以认为外扩散阻力已经消除,在以下的实验中采用的

收稿日期 2001-08-27,修回日期 2001-12-03。

基金项目 江苏省教育厅自然科学基金(No.01KJD530003),国家自然科学基金(No.29976019)和化工部'95'攻关项目(No.98-G-06)资助。

* 通讯作者。Tel 86-25-3316755;Fax 86-25-3411316;E-mail hyh@njuct.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

流速为 $2.5 \times 10^{-3} \text{ m/s}$

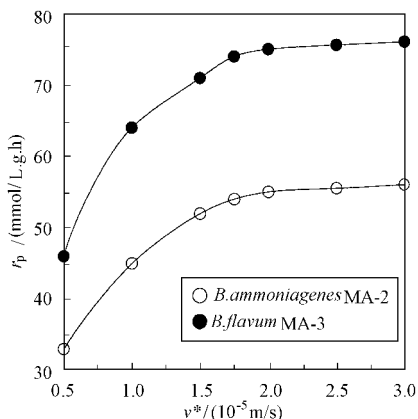


图 1 流速对固定化细胞反应速率的影响

Fig.1 Effect of superficial velocity of fluid in the immobilized cell reactor on the reaction rate

2.2 内扩散对固定化细胞反应动力学的影响

在固定化细胞的内部不存在流体流动,其传质完全依赖于扩散作用。在消除外扩散影响的情况下,考虑分布在卡拉胶球形颗粒载体上的产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞,假设符合下列条件:

- (1) 基质浓度只存在径向梯度。
- (2) 球形颗粒内部,物质扩散服从 Fick 定律。
- (3) 整个反应是恒温的,扩散与反应处于稳态。
- (4) 一般固定化细胞反应动力学能用下述反应动力学模型来描述^[8]:

$$r_p = [r_{max} C_S / (K_m + C_S)] \cdot [K_i / (K_i + C_S)] \cdot [1 - C_p / C_{pm}] \quad (1)$$

作者以前的研究表明^[5],固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞在富马酸铵转化体系中不存在底物抑制,所以 $K_i / (K_i + C_S)$ 这一项忽略不计,虽然高浓度产物对反应有一定的抑制作用,但由于 C_{pm} 很大,所以 $(1 - C_p / C_{pm})$ 亦可近似为 1,则方程(1)变为:

$$r_p = r_{max} C_S / (K_m + C_S) \quad (2)$$

即该反应符合米氏方程。

对一半径为 R 的球形固定化颗粒,在距球体中心为 r 处取一厚度为 dr 的微元壳体,稳态时,对反应底物富马酸铵进行物料衡算,并代入边界条件,有:

$$\frac{d^2 y}{dx^2} + \frac{2 dy}{x dx} = \phi^2 \frac{ay}{a + y} \quad (3)$$

这里 $\phi^2 = \frac{R^2 r_{max}}{D_e K_m}$ $x = r/R$ $y = C_S / C_{S0}$ $a = K_m / C_S$

代入无因次边界条件,根据方程式(3)并参考 Hamilton B^[9]报道可以得出:

$$K_m^* = f(\phi^*) \quad (4)$$

$$r_{max}^* = f(\phi^*) \quad (5)$$

式(4)和式(5)表明表观最大速率和表观米氏常数是表观无因次数 ϕ^* 的函数。因为 ϕ^* 是反应内扩散影响的无因

次数,所以当 $\phi^* \rightarrow 0$ 时,可以认为不存在内扩散阻力,此时的动力学常数可以认为是本征动力学常数,即:

$$K_m = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} K_m^* = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} f(\phi^*) \quad (6)$$

$$r_{max} = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} r_{max}^* = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} f(\phi^*) \quad (7)$$

采用直径约为 3mm 的球形固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞进行实验,在富马酸铵浓度为 0.005 mol/L ~ 1.8 mol/L 范围内测定固定化细胞的反应初始速率,结果如图 2 及图 3。由图可知,在低底物浓度下,随着底物浓度 C_S 增加反应速率 r_p 也急剧增加, $r_p - C_S$ 基本成正比,此时反应属于一级反应,随着底物浓度的继续增加,反应由 0 ~ 1 级过渡到 0 级反应,反应速率曲线也开始弯曲,当底物浓度 C_S 升高至一定数值时, r_p 就不再升高,此时反应达最大速率 r_{max} 。在低浓度范围内,由 $1/r_p$ 对 $1/C_S$ 进行线性拟合,可得产氨短杆菌 MA-2 反应体系米氏常数 k_m 为 $6.25 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$,最大反应速率 r_{max} 为 $58 \text{ mmol/(L} \cdot \text{g} \cdot \text{h)}$,黄色短杆菌 MA-3 反应体系米氏常数 k_m 为 $4.76 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$,最大反应速率 r_{max} 为 $76 \text{ mmol/(L} \cdot \text{g} \cdot \text{h)}$,由图还可看出,当底物富马酸铵浓度增大时,反应速率并未显著下降,说明在该反应体系中不存在明显的底物抑制现象。

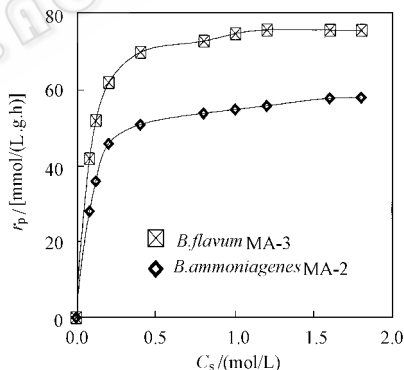


图 2 反应速率与底物浓度曲线

Fig.2 Effect of the substrate concentration on the reaction rate

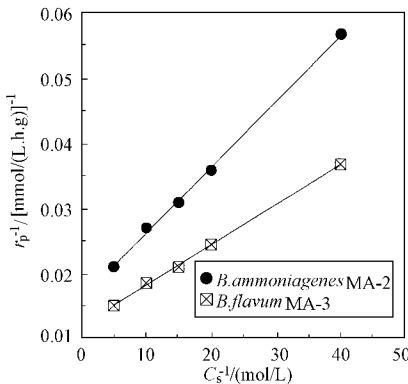


图 3 r_p^{-1} 与 C_S^{-1} 关系曲线

Fig.3 The curve of r_p^{-1} versus C_S^{-1}

同样,以直径不同的固定化颗粒进行上述实验,并分别进行双倒数图解,求得不同颗粒大小的固定化产氨短杆菌

MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞的表观动力学常数 结果如表 1 所示。

表 1 不同颗粒大小的固定化细胞表观动力学常数

Table 1 The apparent kinetic parameters of immobilized cells at different particle diameters of gel

Particle diameters d/mm	<i>B. ammoniagenes</i> MA-2			<i>B. flavum</i> MA-3		
	Φ^*	K_m^* (mmol/L)	r_{max}^* (mmol/L·g·h)	Φ^*	K_m^* (mmol/L)	r_{max}^* (mmol/L·g·h)
2.2	16.28	59.7	63	23.02	44.2	85
3.0	20.82	62.5	58	25.17	47.6	76
4.2	26.2	70.8	53	29.96	58.9	68
5.5	30.8	78.9	47	33.67	69.4	59

表观常数 $\phi^* = R\sqrt{r_{max}^*(K_m^* \cdot D_e)}$ 中 D_e 和固定化细胞载体性质有关,因此可以认为不同粒径的固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 的 D_e 值相同。根据有关报道的方法^[8] 采用扩散膜池,以稳态操作的方法测定,通过稳态时的物料衡算,计算出了卡拉胶固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞颗粒的 D_e 值分别为 $3.21 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $3.78 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 。

表 1 为不同直径大小的固定化产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 细胞的表观动力学常数,由表可见,表观米氏常数 K_m^* 随着固定化细胞颗粒直径的增加而增加,表观最大反应速率则相反,将表观动力学常数 K_m^* 和 r_{max}^* 对表观常数 ϕ^* 作图(见图 4、5)后,采用多项式及线性回归法拟合,发现颗粒直径对 K_m^* 的影响更显著,它与 ϕ^* 近似成二次函数关系, r_{max}^* 则与 ϕ^* 成线性关系,结果如下:

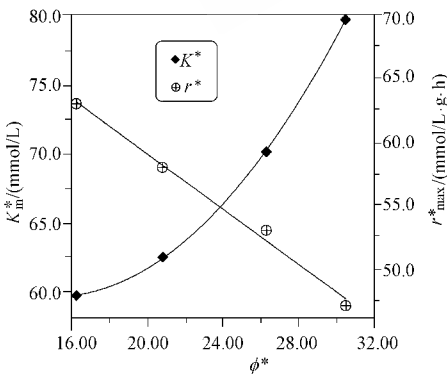


图 4 固定化产氨短杆菌 MA-2 颗粒表观动力学常数 (K_m^* , r_{max}^*) 随表观常数 ϕ^* 的变化

Fig.4 Changes in the apparent kinetic parameters (K_m^* , r_{max}^*) of immobilized *B. ammoniagenes* MA-2 as a function of the apparent constant ϕ^*

对于固定化产氨短杆菌 MA-2 颗粒有:

$$r_{max}^* = f(\phi^*) = -1.0966\phi^* + 80.9941 \quad (8)$$

$$K_m^* = f(\phi^*) = 45.1079 + 0.60455\phi^* + 0.01533(\phi^*)^2 \quad (9)$$

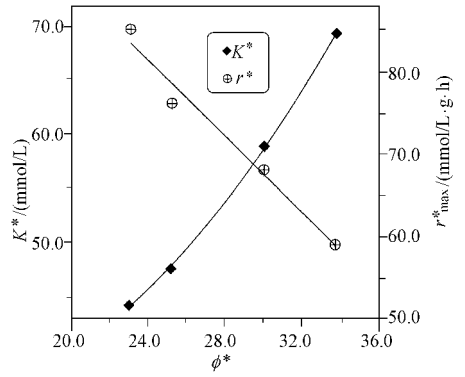


图 5 固定化黄色短杆菌 MA-3 颗粒表观动力学常数 (K_m^* , r_{max}^*) 随表观常数 ϕ^* 的变化
Fig.5 Changes in the apparent kinetic parameter (K_m^* , r_{max}^*) of immobilized *B. flavum* MA-3 as a function of the apparent constant ϕ^*

采用外推法求得本征动力学常数:

$$r_{max} = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} f(\phi^*) = 80.99 \text{ mmol}(\text{L} \cdot \text{g} \cdot \text{h}) \quad (10)$$

$$K_m = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} f(\phi^*) = 19.72 \text{ mmol/L} \quad (11)$$

同样对于固定化黄色短杆菌 MA-3 颗粒有:

$$r_{max}^* = f(\phi^*) = -2.2911\phi + 136.0486 \quad (12)$$

$$K_m^* = f(\phi^*) = 17.3456 + 0.155056\phi^* + 0.0412(\phi^*)^2 \quad (13)$$

采用外推法求得本征动力学常数:

$$r_{max} = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} f(\phi^*) = 136.04 \text{ mmol}(\text{L} \cdot \text{g} \cdot \text{h}) \quad (14)$$

$$K_m = \lim_{\phi^* \rightarrow 0} f(\phi^*) = 1.88 \text{ mmol/L} \quad (15)$$

符号说明:

- C_{S0} —底物富马酸铵起始浓度, mol/L;
- D_e —载体内部的扩散系数, $\mu\text{m}^2/\text{s}$;
- C_s —与 r 相应的底物富马酸铵浓度, mol/L;
- K_m^* —表观米氏常数, mol/L;
- K_m —本征米氏常数, mol/L;
- r —距球形中心的距离, μm ;
- r_{max}^* —苹果酸形成的表观最大反应速率, mmol(L·g·h);
- r_{max} —苹果酸形成的本征最大反应速率, mmol(L·g·h);
- r_p —苹果酸形成的瞬时反应速率, mmol(L·g·h);
- $\phi^* = R\sqrt{r_{max}^*(K_m^* \cdot D_e)}$ —表观无因次常数

REFERENCES (参考文献)

[1] Takata I, Kayashima K, Tosa T et al. Improvement of stability of fumarase activity of *B. flavum* by immobilization with K-carrageenan and polyetheneimine. *Journal of Fermental Technology*, 1982, **60** (5) 431 ~ 439

[2] Neufeld R J, Peleg Y, Pines O et al. L-Malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase. *Enzyme Microbiol Technol*, 1991, **13** (12) 991-997

- [3] Takata I, Tosa T *et al.* Reasons for the high stability of fumarase activity of *B. flavum* cells immobilized with K-carrageenan gel. *Applied Biotechnology*, 1983, **8**(1): 39 ~ 48
- [4] Kozo Y, Tetsuya T, Kiyokazu Y. Continuous Production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. *European Journal of Applied Microbiology*, 1976, **3**: 169 ~ 175
- [5] HU Y H (胡永红), OUYANG P K (欧阳平凯). A new method and the kinetics of production of L-malic acid on immobilized cells. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应工程与工艺), 1995, **11**(1): 13 ~ 17
- [6] HU Y H (胡永红), OUYANG P K (欧阳平凯). New method for separation of fumaric acid from L-malic acid production and conversion to L-aspartic acid by immobilized cells. *Journal of Nanjing University of Chemical Technology* (南京化工大学学报), 1995, **7**(2): 58 ~ 62
- [7] ZHU B H (朱必凤), MA H Y (马海燕), DENG S F (邓少平). Study on fermentation kinetic of the yeast cells immobilized in the carriers of ceramics. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1996, **12**(2): 227 ~ 229
- [8] LI Q K (李清彪), CHEN H K (陈洪钊). The modeling of diffusion-reaction problem of immobilized non-growing yeast cells. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应工程与工艺), 1994, **10**(1): 82 ~ 86
- [9] Hamilton B, Gardner C R, Colton C K. Effect of Diffusional Limitations on Lineweaver-Burk Plots for Immobilized Enzymes. *AICHE Journal*, 1974, **20**: 503 ~ 510

Study on the Kinetics of Immobilized Cells of *Brevibacterium ammoniagenes* MA-2 and *Brevibacterium flavum* MA-3

HU Yong-Hong* SHEN Shu-Bao OUYANG Ping-Kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract The kinetics of immobilized cells of *Brevibacterium ammoniagenes* MA-2 and *Brevibacterium flavum* MA-3 cells were studied. By means of both a theoretical analysis of diffusion in the gel particles and an experimental determination of apparent kinetic parameters, the intrinsic kinetic parameters of immobilized cells of *B. ammoniagenes* MA-2 and *B. flavum* MA-3 cells were obtained.

Key words immobilized cells, *B. ammoniagenes* MA-2, *B. flavum* MA-3, kinetics

Received 08-27-2001

This work was supported by grants from Educational Department of Jiangsu Province (No. 01KJD530003), the National Natural Science Foundation of China (No. 29976019) and China Ministry of Chemical Industry (No. 98-G-06).

* Corresponding author. Tel 86-25-3316755; Fax 86-25-3411316; E-mail yhy@njuct.edu.cn

安捷伦科技向中国清华大学教学实验室捐赠化学分析设备

安捷伦科技日前举办盛大的捐赠仪式,向中国清华大学化学分析教学实验室捐赠仪器。清华大学拥有中国最大的生物芯片研究计划,并以生物化学为重点,率先开展中草药的研究。本次捐赠是根据安捷伦科技的大学关系慈善事业设备捐赠计划进行的,这一计划为世界各地的教学课程开发提供积极支持。本次捐赠的设备价值 41 万美元。

安捷伦本次捐赠化学分析仪器,将大大改善清华大学分析中心(ACTU)的教学环境。此前,安捷伦科技还向清华大学的无线通信教学实验室捐赠了系统和产品,通过这两次捐赠的设备,莘莘学子每年将能够进行 40 000 小时的研究工作。

这两个实验室一个用于现代通信研究,另一个则用于教学和开展生命科学和中草药分析研究,使清华学生有机会采用安捷伦最先进的化学分析产品和技术完成试验工作。这将促进清华大学生命科学和中草药分析的开发研究。本次捐赠还将推进清华大学分析中心在相关化学物质分离和分析方面的试验。

安捷伦本次向清华大学捐赠的化学设备包括:Agilent 2100 芯片生物分析仪、Agilent 1100 系列液-质联用系统、Agilent 1100 系列高效液相色谱系统、Agilent 8453 紫外分光光度计和 Agilent 3DCE 毛细管电泳系统和相关软件。

(刘燕萍 供稿)