

## 固定化细胞生产 $\alpha$ -淀粉酶

林影 郭勇 彭志英 袁振远

(华南工学院 生物工程研究所, 广州)

用固定化细胞取代游离细胞发酵生产酒精<sup>[1]</sup>、有机酸、氨基酸<sup>[2]</sup>、抗生素<sup>[3]</sup>和胞外酶等已经有过报道。1978年Karubu等人用聚丙烯酰胺包埋枯草杆菌生产 $\alpha$ -淀粉酶<sup>[4]</sup>；1982年Shinmyo等人又进行了角叉菜胶包埋淀粉液化芽胞杆菌细胞生产 $\alpha$ -淀粉酶的研究<sup>[5]</sup>。

本研究以角叉菜胶等为载体制备固定化枯草杆菌 BF7658-细胞用于 $\alpha$ -淀粉酶生产的研究。比较了固定化细胞与游离细胞的产酶情况，并进行了半连续发酵的试验。

### 材料与 方法

#### (一) 菌种与药品

枯草杆菌 BF7658 系华南工学院生物化工教研组保存菌株；角叉菜胶为湛江市第一食品厂生产；光交联树脂 PLPUR 前体由华南工学院材料科学研究所研制；其他药品均为市售。

#### (二) 培养基

1. 斜面培养基(%)：马铃薯 20—30,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005, 琼脂 2。

2. 种子培养基(%)：麦芽糖 3, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 1,  $K_2HPO_4$  0.8,  $(NH_4)_2SO_4$  0.4,  $NH_4Cl$  1。

3. 增殖培养基；同种子培养基。

4. 发酵培养基(%)：可溶性淀粉 5, 牛肉膏 1, 蛋白胨 1,  $K_2HPO_4$  1,

$(NH_4)_2SO_4$  0.4,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01  $CaCl_2 \cdot 0.2$ 。

#### (三) 游离细胞的培养

枯草杆菌 BF7658 在斜面上37°C培养72h后，接一环种于50ml的种子培养基中，在250ml三角瓶内，37°C、110次/min往复振荡培养14h。离心(4000rpm, 10min)培养液收集湿菌体。湿菌体1.2g加入装有40ml发酵培养基的250ml三角瓶中，37°C、110次/min振荡好气发酵。

#### (四) 固定化细胞的制备

6g湿菌体在20ml无菌生理盐水中制成菌悬液(37°C)，角叉菜胶溶于80ml生理盐水中成胶体溶液(灭菌)，菌悬液与胶体溶液在50°C下混合，用针筒把混合胶液迅速滴入2% KCl溶液中成球状，并在2% KCl中、4°C下浸泡过夜。称取胶粒20g置于装有40ml增殖培养基的250ml三角瓶中进行菌体增殖，再转到新鲜发酵培养基中发酵产酶。

#### (五) 半连续发酵

一次发酵后，取出胶粒，洗净，转到新鲜的发酵培养基中继续发酵，这样周而复始，不断进行下去。

#### (六) PLPUR固定化细胞的制备

PLPUR-4000 浓度30%，湿菌体含量4%，BEE 1%。PLPUR预聚体和BEE分别灭菌后，混合加入无菌水适量，在50—

本文于1986年10月14日收到。

本研究承国家科委生物工程中心资助。

60℃内熔融,冷却到室温,加入菌悬液搅匀。把预聚体和细胞的混合液摊成薄层,在近紫外光的照射下交联,所成交联薄片剪成5×5mm的小片。同上述法发酵产酶。

### (七) 测定

1.  $\alpha$ -淀粉酶活力测定:在60℃、pH 6.0的条件下,于2%可溶性淀粉溶液20ml中加入0.5ml稀酶液,使淀粉水解为糊精。以碘液为指示,用比色法确定终点,记录达到反应终点所需的时间。

酶活力单位:在60℃、pH6.0的条件下,每小时将1g可溶性淀粉水解为糊精的酶量定义为1个酶活力单位。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力单位}(D_{540}^{\%}) = \left( \frac{60}{t} \times 20 \times 2\% \times f \right) + 0.5 = 48 \frac{f}{t}$$

$f$  为稀释倍数,  $t$  为反应时间。

2. 凝胶强度的测定:被测凝胶于天平左侧的培养皿内,天平右侧是一烧杯。使其平衡后,在右边烧杯上加水,左边凝胶与其上面的压杆作用,一旦凝胶破裂,停止加水,计算水重便是凝胶所能承受的最大压力。

$$\text{凝胶强度} = \frac{\text{最大压力(kg)}}{\text{受压面积(cm}^2\text{)}}$$

3. 细胞浓度测定:以650nm波长下测定发酵液的光密度(OD)表示。

## 结果与讨论

### (一) 角叉菜胶浓度的选择

不同角叉菜胶浓度直接影响到固定化细胞的产酶和稳定性,选择不同角叉菜胶浓度水平进行对照实验,结果如图1所示。选择4%角叉菜胶浓度作为最适的包埋浓度,能保证 $\alpha$ -淀粉酶的生产,减少菌体的泄漏,并能达到一定的凝胶强度。

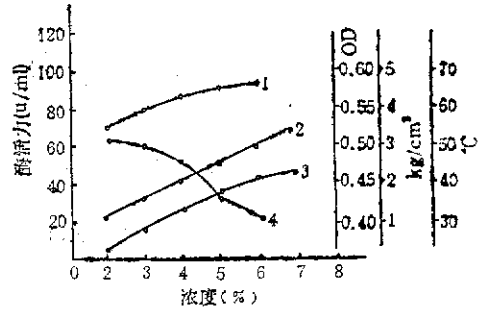


图1 角叉菜胶浓度的影响

1. 发酵产酶 2. 凝胶熔点 3. 凝胶强度 4. 漏菌浓度

### (二) 不同发酵温度对固定化细胞产酶的影响

如图2所示,在条件相同,种量相等下,固定化细胞产酶的最适温度与游离细胞相同为37℃;当温度低于37℃时,固定化细胞优于游离细胞;当温度高于37℃时,固定化细胞与游离细胞一样耐高温能力差。

### (三) 发酵初始 pH 不同对发酵产酶的影响

使用1N NaOH或1N AcOH调节培养基的pH,配成初始pH不同的发酵培养基序列,在种量以及其他发酵条件相同

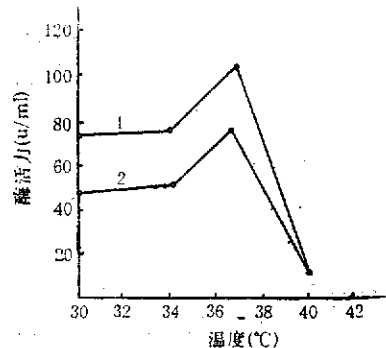


图2 温度对 $\alpha$ -淀粉酶生产的影响

1. 固定化细胞 2. 游离细胞

的情况下,进行发酵试验比较,若初始pH在6.0—8.0内,发酵45h后,pH变化均落在pH6.2—6.4的范围内,且 $\alpha$ -淀粉酶生产保持高水平,如图3所示。固定化细胞

对发酵初始 pH 的适应范围由原来游离细胞的 pH6.4—7.0<sup>[1]</sup> 扩展到 pH6.0—8.0。

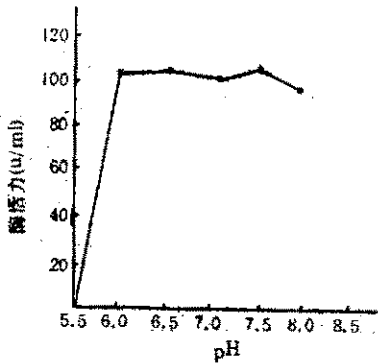


图 3 初始 pH 对产酶的影响

#### (四) 固定化细胞半连续发酵生产 $\alpha$ -淀粉酶

图 4 显示了由固定化细胞生产 $\alpha$ -淀粉酶的结果。在半连续发酵中， $\alpha$ -淀粉酶的积累随着反应循环次数的增加而增加。把固定化细胞和游离细胞进行对照实验，在相同的发酵种量和发酵条件下，固定化细胞的产酶活力比游离细胞高 30—40%。固定化细胞能重复使用一个月。

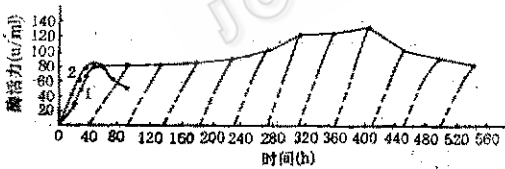


图 4 固定化细胞半连续发酵生产 $\alpha$ -淀粉酶  
1. 固定化细胞 2. 游离细胞

#### (五) 用电子显微镜观察粒子内细胞的生长

通过扫描电镜观察角叉菜胶凝胶粒子

的结构和胶粒内活性细胞的生长情况 (图略)。角叉菜胶作为一种天然多聚凝胶是多孔材料，这种多孔网状结构适于菌体生长，和有利于养份及产物的传输，活性细胞在凝胶粒子中能繁殖生长，并可长时间保持在稳定期内，适合于固定化细胞的 $\alpha$ -淀粉酶的生产。

#### (六) 用其他材料进行固定化生产 $\alpha$ -淀粉酶的试验

结果 PLPUR-4000 作固定化材料强度极高 (与通常固定化载体：海藻酸钙、角叉菜胶、聚丙烯酰胺等进行比较)，选取最适包埋浓度 30%，其拉伸强度达  $4\text{kg}/\text{cm}^2$ 。调节适当的预体分子量及浓度，获得有效的交联孔容、孔径和比表面积，从而得到足够的细胞良好生长空间 (图略)。用于固定化 BF7658 生产 $\alpha$ -淀粉酶较角叉菜胶的产酶活力高 15%。我们将作进一步的研究。

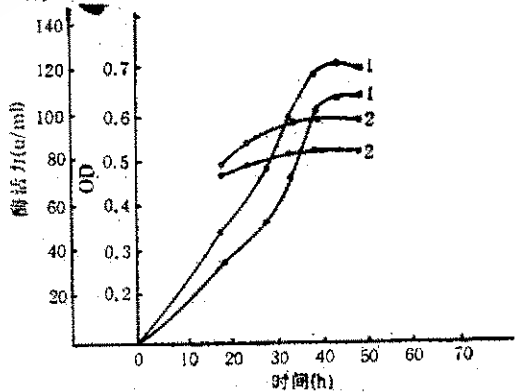


图 5 使用新型载体 PLPUR-4000 的产酶比较  
• PLPUR-4000 • 角叉菜胶  
1. 酶活力 2. 细胞浓度

### 参 考 文 献

[1] Moo-Young, M. et al., *Biochnol. Lett.*, 2:541, 1980.  
 [2] Slowinski, W. and Charm, S.E., *Biotechnol. Bioeng.*, 15(5):973—979, 1973.  
 [3] Morikawa, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 22(5):1015—1023, 1980.  
 [4] Kokubu, T. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5:233, 1978.  
 [5] Shimmyo, A. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14:7, 1982.  
 [6] 广东化工学院微生物专业编：酶制剂生产工艺, p.32.