

PVA 固定化的生黑醋菌生产 L-山梨糖的研究

储瑞葛 李凤庆* 李东阳 洪 民 袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

生黑醋菌可以将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖,用微生物将 D-山梨醇氧化为 L-山梨糖是维生素 C 生产的一个重要部分,目前工业上用的都是游离菌批式生产工艺。由于固定化活细胞作为生物催化剂具有生产的连续性和稳定性,操作简便,产物易于分离纯化等优点^[1],已有不少实验室研究用固定化微生物细胞将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖^[1~6],国内也有用海藻酸固定化生黑醋菌 *Acetobacterium melanogenum* 的报道^[2,3]。用海藻酸钙^[1~3]、聚丙烯酰胺^[4]、铝处理的海藻酸钙^[5]、水合聚丙烯酰胺与海藻酸钙混合固定化的微生物细胞^[6]转化 D-山梨醇成为 L-山梨糖,都有因机械强度差,而不适合在搅拌式发酵罐中生产的弱点。聚乙烯醇制备的固定化微生物细胞具有机械强度高、类似于橡皮的弹性、成本低等特性^[7]。因此,我们选择聚乙烯醇作为固定化生黑醋菌的材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂:聚乙烯醇(PVA-124,日本进口分装);海藻酸钠(Merck Co. Inc);酵母膏(Difco laboratories);玉米浆(上海第四制药厂);胰蛋白胨(Oxoid, Code L42, England);复合维生素 B(上海黄河制药厂);其余试剂均为分析纯。

1.1.2 菌种:生黑醋菌 *A. melanogenum* (Asl. 226)。

1.1.3 培养基:斜面培养基:10% 山梨醇,0.5% 酵母膏,1% CaCO₃,2% 琼脂粉,pH5.1。种子培养基:15% 山梨醇,0.35% 酵母膏,0.35% 胰蛋白胨,0.5% CaCO₃,4ml/100ml 无机盐,pH4.8~5.1。无机盐:0.05% MgSO₄,0.3% NH₄H₂PO₄,0.3% KH₂PO₄,0.2% K₂SO₄。发酵培养基:10% 山梨醇,0.04% 酵母膏,0.2% 玉米浆,0.1% CaCO₃,0.0013% 复合维生素 B,pH5.4。

1.1.4 菌种制备:将在种子培养基中 30℃ 摇床培养 24h 的种子液,8000r/min 离心 10min 收集菌体;无菌生理盐水洗涤一遍,8000r/min 离心 10min 收集菌体,最后用生理盐水制成 1.2g 湿菌体/ml 的菌悬液。

1.1.5 固定化细胞的制备:取 2ml 菌悬液与 8ml 含 0.6% 海藻酸的 6% 聚乙烯醇溶液混合均匀,通过注射器的 8# 针头注入含 1% CaCl₂ 的 5% 硼酸固定液中,制成直径 3mm 的颗粒,浸泡 4h 以上,滤出固定化颗粒,用生理盐水洗 3 遍。

1.1.6 发酵液中 L-山梨糖含量的测定:伯川式改良法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 实验设计

用聚乙烯醇(PVA)固定化生黑醋菌,所得到的固定化细胞的好坏,主要受固定化时的三个条件的影

* 华东理工大学九五届毕业实习生。

本文于 1996 年 2 月 26 日收到。

表1 正交实验方案

样品编号	PVA浓度/%	细胞浓度/%	硼酸浓度/%
A	4.8	24	5
B	4.8	8	4
C	4.8	16	3
D	6.4	24	4
E	6.4	8	3
F	6.4	16	5
G	5.6	24	3
H	5.6	8	5
I	5.6	16	4

响:PVA浓度、细胞浓度和硼酸浓度。我们用正交实验来综合考察这三个因素在对固定化生黑醋菌产糖能力影响中,哪个是主效因素,以及不同水平的发展趋势。对上述三个因素各选择了三个水平:(1)所包埋的湿细胞的终浓度为8%、16%和24%,按文献上的经验通常选10%~16%的浓度^[7,9];(2)PVA的终浓度定为4.8%、5.6%和6.4%,这是由于PVA的浓度小于4.8%不能在硼酸溶液中成型,大于6.0%粘度太大,不容易滴制固定化颗粒;(3)固定液中硼酸浓度为3%、4%和5%,因为如果小于3%,

PVA不能在其中成型,而5%的硼酸溶液已基本上达到饱和。将这三个因素三个水平随机安排在L₉(3⁴)正交表中(表1),并按该方案进行生黑醋菌的固定化,制得的9种固定化细胞,均按0.05g湿细胞的质量投入到30ml发酵液中进行转化,30℃,200r/min摇培,转化23h为一批,共观察了24批。

2.2 实验结果正交分析

表2 9种固定化细胞的24批转化结果的正交分析

批号	PVA浓度/%			细胞浓度/%			硼酸浓度/%			极差		
	Σ _{4.8}	Σ _{5.6}	Σ _{6.4}	Σ ₈	Σ ₁₆	Σ ₂₄	Σ ₃	Σ ₄	Σ ₅	PVA浓度	细胞浓度	硼酸浓度
1	198.7	180.0	188.5	185.2	186.0	187.0	183.3	184.1	190.9	9.7	1.8	7.5
2	192.3	189.4	199.3	185.2	199.3	196.3	185.3	181.5	214.2	9.9	14.3	32.7
3	243.0	226.2	247.5	230.1	245.5	241.5	233.4	231.1	252.6	21.3	15.4	21.5
4	247.7	236.3	249.5	236.0	251.5	246.0	233.4	237.1	263.0	13.2	15.5	29.6
5	250.2	241.0	246.4	234.3	257.0	246.3	239.0	239.1	259.5	9.8	22.7	20.5
6	257.0	235.1	246.5	234.5	254.7	249.4	235.8	236.0	266.8	21.9	20.2	31.0
7	240.7	231.5	258.3	243.8	246.5	240.3	238.3	235.3	257.0	26.9	12.8	21.7
8	225.0	229.2	233.1	225.2	232.9	229.2	218.2	227.3	241.8	8.1	7.7	23.6
9	217.9	242.2	231.6	219.5	242.8	229.4	195.4	234.7	261.6	24.3	23.3	66.2
10	234.9	233.8	236.8	231.0	231.8	242.3	198.9	224.4	281.8	2.6	11.3	82.9
11	241.9	242.5	247.3	243.5	244.0	244.2	214.1	223.5	294.1	5.4	0.7	80.2
12	248.8	238.3	258.8	242.9	250.6	252.4	216.3	223.6	386.0	20.5	9.5	89.7
13	262.3	250.7	261.6	264.7	257.4	252.5	224.3	237.2	313.1	11.6	12.2	88.8
14	254.5	225.5	228.2	233.5	226.1	247.6	217.5	227.2	262.4	29.0	21.5	44.9
15	244.2	225.2	245.5	229.7	250.2	235.6	216.5	216.6	281.6	26.3	26.5	65.3
16	257.9	247.1	257.5	259.7	254.5	248.3	229.9	225.1	307.5	10.8	11.4	82.4
17	248.5	243.8	248.4	245.3	247.5	248.0	229.1	222.4	289.3	4.7	2.7	66.9
18	243.9	234.5	234.5	233.9	240.2	238.8	226.2	221.7	265.0	9.4	6.3	43.3
19	243.5	245.4	247.7	241.4	241.6	253.6	224.4	231.6	280.6	4.2	12.2	56.2
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	239.6	242.9	244.4	241.0	241.5	244.7	229.8	233.8	263.3	4.8	3.7	33.5
22	247.7	253.9	255.8	244.5	254.6	258.3	236.9	238.6	281.8	8.1	13.8	44.9
23	259.5	242.4	245.9	240.4	252.3	255.1	230.7	236.4	280.7	14.1	14.7	50.0
24	275.5	251.9	279.3	253.4	275.7	277.6	242.8	250.0	313.9	27.4	24.2	71.1

注:Σ_{4.8}、Σ_{5.6}、Σ_{6.4}:指PVA浓度分别为4.8%、5.6%、6.4%的固定化细胞的产糖量之和(mg/ml);

Σ₈、Σ₁₆、Σ₂₄:指细胞浓度分别为8%、16%、24%的固定化细胞的产糖量之和(mg/ml);

Σ₃、Σ₄、Σ₅:指硼酸浓度分别为3%、4%、5%的固定化细胞的产糖量之和(mg/ml)。

将9种固定化细胞的24批转化结果,进行正交分析^[10](见表2),可见:(1)定型液中,硼酸的浓度是主效因素,细胞浓度和PVA浓度是次效因素。(2)就硼酸浓度而言,5%的固定化效果明显地好于4%和3%的。我们在实验中发现,随着固定液中硼酸浓度的降低,PVA在其中的成型速度放慢,形成的颗粒表面发粘,硬度和弹性下降。可能固定化颗粒的发粘和刚性不足造成氧、营养物质和底物传递障碍,使

产糖能力下降。(3)从表 2 的极差可以看出,PVA 浓度的变化对产糖量的影响不大,从经济和操作方便的角度,我们选择 PVA 的终浓度为 4.8%。(4)从表 2 看,细胞浓度为 8%、16%、24% 的固定化细胞产糖能力的差异不显著。为了进一步明确细胞浓度造成的影响,用 4.8% PVA 终浓度、5% 硼酸固定液制备了 5 种不同细胞浓度的固定化细胞(细胞浓度分别为 7.7%、15.4%、23.1%、30.8%、38.5%),30℃,200r/min 摇培 23h 为 1 批,将反应 10 批的产糖量作图 1。由图可见,细胞浓度最低的(7.7%)固定化细胞,前三批产糖量低,从第 4 批开始产糖能力逐渐提高,可能是开始时细胞密度低,转化能力弱,发酵几批后随着细胞生长密度提高,产糖能力也提高;细胞浓度最高(38.5%)的固定化细胞,其产糖量开始很高,但随时间增长,越来越低,这可能是因为颗粒中的细胞密度太高,而氧和营养的传递速度不能满足高密度的细胞生长的需要,久而久之,细胞衰退,产糖量下降;细胞浓度为 23.1% 的第 3 号固定化细胞从第二批起产糖一直保持在 95mg/ml 以上。因此,选择 24% 左右的细胞浓度进行固定化较合适。将细胞浓度为 23.1% 的固定化细胞继续转化共 30 批,产糖维持在 95mg/ml 以上,颗粒的机械强度不变。

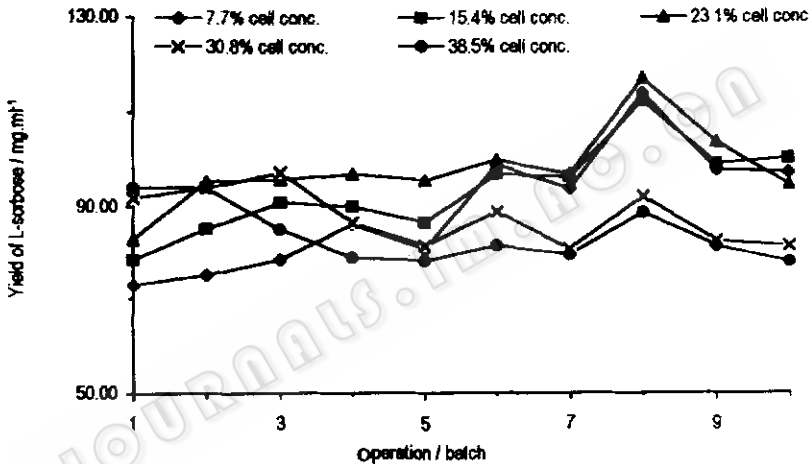


图 1 细胞浓度对 D-山梨醇转化为 L-山梨糖的影响

2.3 对 9 种固定化细胞转化能力稳定性的分析

将 9 种固定化细胞的 24 批产糖量分别绘在图 2 上,可见:(1)9 种固定化细胞的产糖量开始时都较低,产糖量在 60~65mg/ml,经过两批转化后各自达到比较稳定的水平,并且一直保持到第 24 批仍不见下跌的趋势;前两批转化低可能是固定化过程的不利因素使细胞处于休眠状态或受到伤害,要经过两批的培养恢复。(2)经过两批转化之后就产糖量而言可以分成两大类,其中第 1、第 6、第 8 种固定化细胞的转化能力最好,产糖量在 80~100mg/ml,第 2、4、7、9 种较差,产糖量为 65~80mg/ml。生黑醋菌经过固定化仍然具有将 D-山梨醇生物氧化为 L-山梨糖的能力,但是固定化条件不同,氧化能力不同。

3 小 结

用 PVA 固定化的生黑醋菌与游离细胞一样具有将山梨醇氧化转化为山梨糖的能力。当固定化所用的 PVA 终浓度为 4.8%、细胞浓度为 24%、硼酸浓度为 5% 时,制得的固定化细胞经过两第三批预培养之后可以将山梨醇 95% 以上转化为山梨糖,稳定性好,使用了 30 批转化仍大于 95%,机械强度不变。

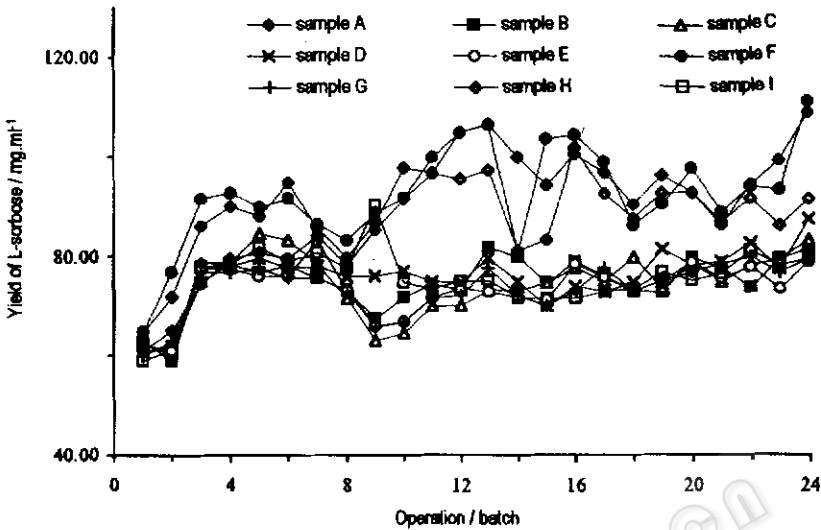


图 2 固定化细胞的细胞浓度、PVA 浓度和硼酸浓度对 D-山梨醇转化为 L-山梨糖的影响

参 考 文 献

- [1] Young-Min Park, Eui-Sung Choi, Sang-Ki Rhee, *Biotechnology letters*, 1994, 16(4):345~348.
- [2] 张洪泉, 曹淑娟, 安海平等, *微生物学通报*, 1986, 13(3):102~106.
- [3] 江苏省食品发酵研究所, *江苏食品与发酵*, 1984, p. 1~10.
- [4] Wayne Schnorr G, A Walter, SzaRek and J K N Jones, *Applied Environmental Microbiology*, Mar, 1977, p. 732~734.
- [5] Kosseva M, V Beschkov, Popov, *Journal of Biotechnology*, 1991, 19:301~308.
- [6] Trifonov A, Stefanova S, Konstantinov H *et al*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991, 28/29:397~405.
- [7] Kuo-Yin Amanda Wu, Keith D. Wisecarver, *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39:447~449
- [8] 中山大学生物系生化微生物学教研室, *(生化技术导论)*, 北京:人民教育出版社, 1979, p. 24.
- [9] Satour T, Kozo Y, Tetsuya, Lchiroc, *J Ferment Technol*, 1981, 59(6):489~493.
- [10] 郑用熙, *(分析化学的数理统计方法)*, 北京:科学出版社, 1986, p. 180~219.

Oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by PVA Immobilized *Acetobacterium melanogenum*

Chu Rui'ai Li Fengqing Li Dongyang Hong Ming Yuan Zhongyi
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract Immobilization of *A. melanogenum* cells using PVA and boric acid is described. To obtain the best immobilized cells, a suspension of cells containing 24% wet cells and 4.8% PVA was extruded into the saturated boric acid solution. The immobilized cells were used for bioconverting D-sorbitol into L-sorbose with yield over 95%. After repeatedly operated for 30 batches, the immobilized *A. melanogenum* kept over 95% of conversion rate.

Key words PVA, *A. melanogenum*, immobilization, L-sorbose