

固定化玫瑰微球菌发酵产海藻糖合成酶系

张欣 袁其朋* 蒋利伟 许雅琴

(北京化工大学生命科学学院, 北京 100029)

摘要:以聚氨酯为载体固定化培养玫瑰微球菌,发酵生产海藻糖合成酶系麦芽糖苷基海藻糖合成酶 MTSase 和麦芽糖苷基海藻糖水解酶 MTHase。考察了细胞固定化对菌体生长及产酶的影响,对固定化细胞重复批次发酵换液条件进行了初探。固定化细胞发酵 40 h,酶活达到最大值,产酶周期缩短了 56 h,细胞干质量和酶活分别达到 12 g/L 和 52 u/mL,比游离细胞发酵提高了 12% 和 33%。重复批次发酵最佳的换液条件为发酵 40 h 后,以 40% 的换液量每隔 24 h 以等量新鲜培养基替换发酵液。在此条件下,重复发酵 9 批,连续 230 h 菌体生物量及酶活无明显下降。在 10 L 发酵罐中进行放大实验,酶活最高达到 80 u/mL,重复发酵 7 批,连续 180 h 菌体生物量及酶活无明显下降,酶的时空产率达到 56.9 u/(L·h),比单批发酵提高了 42.5%。

关键词:固定化;玫瑰微球菌;MTSase;MTHase

中图分类号:TQ925

D-海藻糖作为一种天然保鲜剂,可有效抑制淀粉老化、蛋白质变性、脂质氧化和微生物污染等引起食品变质^[1],而且无毒无害,已被美国食品药品监督管理局和欧洲立法系统批准为一种安全的食品添加剂^[2],此外,用作生物制剂的保存剂和化妆品的保湿成分等亦有良好效果^[3-4]。自从能够以淀粉为原料,通过酶转化生产海藻糖以来,其价格大幅度下降,使其在各个应用领域的广泛应用成为可能。

本文采用微球菌发酵产胞内酶系麦芽糖苷基海藻糖合成酶 MTSase 和麦芽糖苷基海藻糖水解酶 MTHase,全细胞酶反应催化淀粉转化为海藻糖,其中发酵产酶是整个过程中关键性步骤,因此有必要对其进行更进一步的研究。利用细胞固定化技术提高细胞生长速率、活性及稳定性,实现连续培养,在国内外已有报道。对发酵产胞内酶而言,固定化发酵过程可以是一部分菌体吸附在多孔载体上,另一部分菌体随发酵液被移出,用于进行下一步酶反应。在移出发酵液的同时,不断流加新鲜培养基,从而实现连续培养,提高酶的时空产率,此方面研究在国内外鲜有报道。本文以聚氨酯为载体,考察了固定化

细胞对菌体生长和产酶活力的影响,以及固定化细胞重复批次发酵效果,在摇瓶中初步探索了重复批次发酵较适宜的换液量和换液时间的基础上,在 10 L 发酵罐中进行了放大试验。结果显示固定化不仅大大缩短了发酵周期,提高了酶的时空产率,而且简化了发酵过程,省去不断进行种子培养和接种的繁杂工作,降低了能耗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 玫瑰微球菌为本实验室自筛选诱变而得。

1.1.2 培养基(g/L) 固体培养基:可溶性淀粉 20,蛋白胨 10,牛肉膏 5,NaCl 5,pH 7.0。种子培养基:葡萄糖 30,牛肉蛋白胨 10,酵母浸粉 5,牛肉粉 3,K₂HPO₄·3H₂O 1,NaH₂PO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 0.5,CH₃COONa 0.1,pH (8.0 ±0.5),过膜添加 VB₁₂ 0.005%。摇瓶发酵培养基:葡萄糖 20,蛋白胨 5,酵母浸粉 1,K₂HPO₄·3H₂O 2,MgSO₄·7H₂O 0.5,pH (8.0 ±0.5)。发酵罐培养基:葡萄糖 20,玉米浆 50,黄豆饼粉 5,K₂HPO₄·3H₂O 2,MgSO₄·7H₂O 0.5,pH (8.0 ±0.5)。

1.1.3 载体 由北京恒跃海绵制品厂购得 5 种聚氨酯,记为 A、B、C、D 和 E 型。

1.2 实验方法

1.2.1 游离细胞培养 摇瓶培养:将菌种由斜面接

收稿日期:2006-02-23

基金项目:北京化工大学郑煤基金资助项目(2000168)

第一作者:女,1980年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

种到种子培养基中,装液量 50 mL/250 mL,30 , 140 r/min,培养 20 h;后以 10 %的接种量转接于摇瓶发酵培养基中,30 ,180 r/min,培养 96 h。发酵罐培养:将菌种由斜面接种到种子培养基中,装液量 50 mL/250 mL,30 ,140 r/min,培养 20 h;以 10 %的接种量转接到摇瓶发酵培养基中,30 ,180 r/min,培养 18 h;最终以 10 %接种量转接到 10 L 发酵罐中,装液量 5 L,30 ,200 ~ 250 r/min,通气量 9 L/min,培养 48 h。

1.2.2 固定化细胞培养 载体预处理:将聚氨酯处理成 5 mm × 5 mm × 5 mm 的小块,用蒸馏水洗净并浸泡 24 h,121 灭菌 20 min,烘干待用。固定化:将一定量经预处理的载体小块加入摇瓶或发酵罐培养基中共同灭菌后接种,进行固定化细胞培养,发酵条件与游离细胞培养相同。重复批次发酵换液:固定化细胞培养至酶活达到最大值,无菌条件下移出一定量发酵液,测定其生物量和酶活等参数,再将等量新鲜培养基加入反应器内,与剩余发酵液及固定化细胞共同继续培养,一定时间间隔后,再重复上述操作。

1.2.3 发酵参数测定 细胞质量浓度测定:细胞质量浓度(g/L)采用细胞干重法。菌体于 60 烘干至恒重,精确称重。残糖浓度测定:残糖浓度测定采用 DNS^[5]法,标准曲线方程为 $y = 3.526x + 0.0056$,线性相关系数 $R = 0.9974$,其中 x 为 550 nm 波长下的吸光度, y 为还原糖浓度(mg/mL)。酶活测定:发酵液 3000 r/min 离心 10 min,收集菌体,生理盐水洗涤 2 次,离心备用。将 1 g 湿菌体悬浮于 5 mL 0.1 M, pH = 8 的磷酸缓冲液中,经甲苯透性化处理^[6]后,加入相同体积的浓度为 15 %的淀粉液化液,30 振荡反应 4 h。11000 r/min 离心 2 min,取上清,测定海藻糖含量。海藻糖含量测定采用 HPLC 法^[7-8]。高效液相色谱为日立 LA-10vp 型,采用 ZORBAX-NH₂ 柱(150 cm),柱温 30 ,流动相为乙腈-水,体积比为 78:22,流速 1 mL/min;示差折光检测器。以上各参数每个数值点测定 3 次,取平均值 ± 标准偏差为最终测定结果。酶活定义为每分钟转化淀粉得到 1 μg 海藻糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(u)^[9]。酶的时空产率定义为每升发酵液发酵 1 h 产酶的酶活,单位为 u/(L·h)。

2 结果与讨论

2.1 载体选择

以相同的添加量 8 g/L,将 A、B、C、D 和 E 5 种聚氨酯经预处理后添加到培养基中,固定化细胞培养 96 h,测定酶活。

由图 1 可见,以 B 型聚氨酯为载体的固定化细胞发酵产酶的酶活最高。因此选择 B 型聚氨酯为固定化载体。

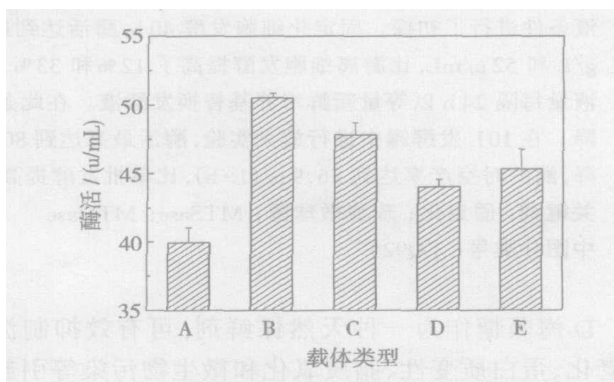


图 1 载体类型对酶活的影响

Fig. 1 Effect of different carriers on MTSase and MTHase activity

2.2 载体添加量选择

图 2 为 B 型聚氨酯载体添加量对固定化细胞培养产酶的影响。如图所示酶活随载体添加量的变化在不同范围内呈现不同趋势,添加量小于 6 g/L 时,酶活随载体添加量的增大而升高,在 6 ~ 10 g/L 范围内酶活保持稳定,大于 10 g/L 时,酶活随载体添加量的增大而下降。从成本角度考虑,选择 6 g/L 为载体添加量。

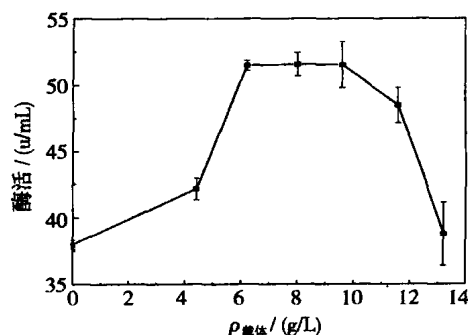


图 2 载体添加量对酶活的影响

Fig. 2 Effect of concentration of carrier on MTSase and MTHase activity

2.3 固定化发酵与游离细胞发酵菌体生长及产酶动力学比较

在相同培养条件下,分别进行固定化细胞与游离细胞培养各 96 h,考察固定化对发酵产酶的影响,结果如图 3 所示。其中固定化细胞载体为 B 型聚氨酯,载体添加量为 6 g/L。

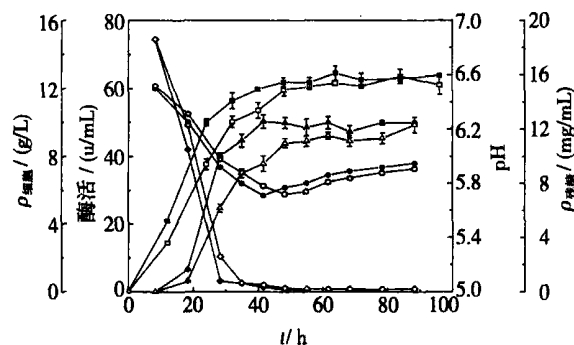


图 3 游离细胞与固定化细胞摇瓶发酵细胞生长及产酶动力学的比较

Fig. 3 Comparison of the kinetics of free cells and immobilized cells in flask fermentation

图 3 描述了固定化与游离细胞两种培养方式下细胞质量浓度、产酶活力、残糖浓度及 pH 随发酵时间变化的差异。由图可见,在发酵周期的前 50 h,固定化细胞培养菌体生长速率及产酶活力明显大于游离细胞。发酵 40 h,固定化细胞培养获得最高酶活,达到 52 u/mL,比游离细胞培养提高了 33%,固定化对细胞生长及产酶起到促进作用。这可能是由如下两方面原因造成的:一是固定化载体对细胞起到保护作用,使细胞免受高剪切力的作用,维持细胞内 pH 值稳定和防止酸化,限制有毒副产物的局部浓度^[10];二是固定化使得培养过程中发酵液的溶氧提高了。由于大量发酵液被吸入载体内,反应器内液态部分比相同装液量条件下游离细胞培养减少了约 50%,溶氧水平与较小装液量条件的发酵相当,在保证设备利用率的前提下,为菌体呼吸和产酶提供更加充足的氧,促进菌体生长和产酶。而这种促进作用只有在适宜的固定化载体添加量范围内才能表现。如果无限制的增加载体,反应器内发酵状态将越来越趋于固态发酵,可能导致基质膨胀程度降低,菌体生长受抑制,因此图 2 中载体添加量超过 9 g/L 之后,酶活反而逐渐降低了。

2.4 固定化细胞与游离细胞重复批次换液效果的比较

分别进行固定化细胞培养和游离细胞培养,至二者获得各自最大酶活后,均以 40% 的换液量每隔 24 h 进行换液。由图 4 可见游离细胞换液培养各批次细胞质量浓度及酶活波动较大,进行 5 批换液后,生物量急剧下降。而固定化细胞表现出良好的稳定性,连续 9 批换液生物量及酶活无明显下降,且各批次发酵得到的菌体平均细胞质量浓度达到 12 g/L,与游离细胞相比提高 54%,平均酶活达到 69 u/mL,比游离细胞培养增大了 1 倍。

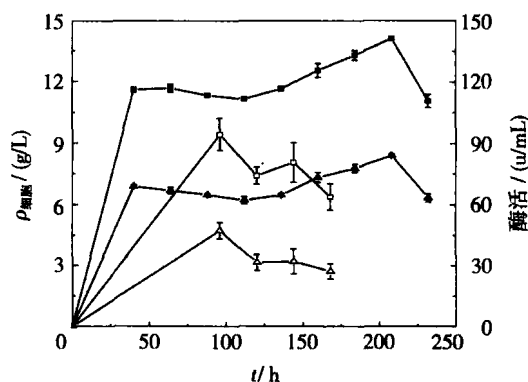


图 4 游离细胞与固定化细胞摇瓶发酵重复批次发酵的比较

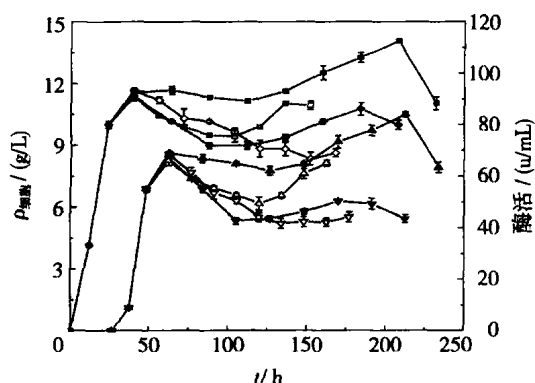
Fig. 4 Comparison of the activities free cell and immobilized cells in repeated batch rpyckng flask fermentation

2.5 换液条件的选择

由于各批次换液量决定了下一批发酵种子量的大小,从而影响其细胞生长及产酶速率,因此分别选择 16 h、24 h 两个时间间隔,30%、40% 和 50% 三个换液量,进行重复批次换液实验,同时对换液量和换液时间两个条件进行选择。结果如图 5 所示。

对比 16 h & 30% 和 16 h & 40% 两组条件,二者细胞质量浓度差异不大,但 16 h & 40% 各批发酵的酶活均高于 16 h & 30%,这可能是由于 16 h & 40% 移出发酵液量较大,副产物去除较彻底,使得菌体生长及产酶受副产物的影响较小,稳定性较好。

对比 24 h & 40% 和 16 h & 40% 两组条件,在 24 h & 40% 条件下,细胞质量浓度和酶活均明显高于 16 h & 40%。这可能是由于 16 h 发酵时间过短,细胞生长时间不充分,而且从酶活与菌体生长的关系上看,酶活最高点比菌体生长达稳定时间相对滞后,因此 24 h & 40% 对产酶较有利。



细胞: 40 % & 24 h, 40 % & 16 h, 50 % & 24 h, 30 % & 16 h;
酶活: 40 % & 24 h, 40 % & 16 h, 50 % & 24 h, 30 % & 16 h

图 5 固定化细胞摇瓶重复批次发酵换液条件的优化实验

Fig. 5 Optimization of conditions for rocking flask fermentation with immobilized cells

对比 24 h & 40 % 和 24 h & 50 % 两组条件, 24 h & 40 % 优于 24 h & 50 %。这可能是由于 24 h & 50 % 条件下, 换液量过大, 部分吸附在载体内菌体随发酵液被移出, 导致下一批发酵的种子量较少, 因此菌体生长及产酶效果不如 24 h & 40 %。

综上所述, 摇瓶固定化细胞培养较适宜的换液条件为发酵 40 h 后, 以 40 % 的替换量每隔 24 h 以新鲜培养基替换发酵液, 在此条件下, 重复换液 9 批, 230 h 细胞质量浓度及酶活无明显下降。

2.6 发酵罐换液试验

参考摇瓶最优载体添加量和换液条件, 在 10L 发酵罐内进行固定化细胞重复批次发酵的放大实验, 各批次菌体生长及产酶情况如图 6 所示。

发酵罐内培养, 细胞质量浓度及酶活最高分别达到 17 g/L 和 80 u/mL, 比摇瓶培养提高了 40 % 和 60 %, 重复换液 7 批, 连续 180 h 细胞质量浓度维持

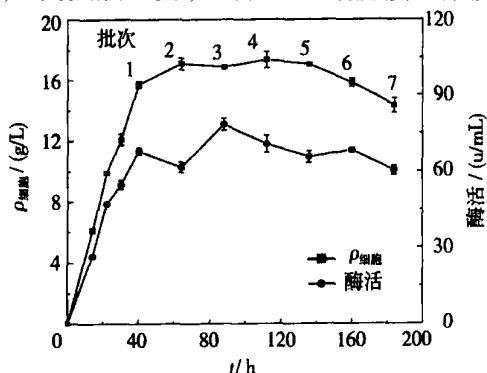


图 6 重复批次发酵发酵罐放大试验

Fig. 6 Activity in repeated-batch fermentation in a fermenter

在 15 g/L 以上, 酶活维持在 60 u/mL 以上, 酶的时空产率达到 56.9 u/(L · h), 比游离细胞培养单批发酵提高 42.5 %。

3 结论

(1) 通过载体类型和载体添加量的选择, 以及游离细胞与固定化细胞培养的对比发现, 在一定的载体添加量范围内, 固定化对菌体生长及产酶起到促进作用。

(2) 将固定化细胞与游离细胞培养进行重复批次换液的对比后得出结论, 游离细胞稳定性差, 重复批次发酵是不可行的, 只有固定化才能实现重复批次发酵。

(3) 参考摇瓶重复批次发酵最适宜的换液条件在 10L 发酵罐中进行的放大实验, 生物量明显高于相同条件下的摇瓶发酵, 最高酶活与之相比提高 60 %, 但平均酶活与之相当, 而且只能重复换液 7 批, 连续发酵 180 h, 不如摇瓶发酵持续时间长。因此换液条件、替换培养基的成分、pH 值和搅拌转速等参数还有待优化, 固定化细胞重复批次发酵产酶有望达到更佳的效果。

参考文献:

- [1] 张玉华, 凌沛学, 籍保平. 海藻糖的研究现状及其应用前景[J]. 食品与药品, 2005, 7(3): 8 - 12.
- [2] LAERE A V. Trehalose reserve and/or stress metabolite [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1989, 63: 201 - 210.
- [3] 蔡宏, 贾晓明, 吴志谷. 海藻糖对低温保存皮肤的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(2): 238 - 240.
- [4] BEATTIE G M, CROWE J H. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves functions of human pancreatic islets after long-term storage [J]. Diabetes, 1997, 46(3): 519 - 521.
- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 10 - 11.
- [6] 高惠玲, 袁其朋, 周延. 用透性化细胞技术合成海藻糖[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 92 - 96.
- [7] 刘传斌, 云战友, 鲁济青. 海藻糖的分析方法[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(5): 40 - 42.
- [8] JULIO C F, VANIA F P, ANITA D P, et al. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts[J]. Food Chemistry, 1997, 60 (2): 251 - 275.
- [9] 周海燕, 周大寨, 吴永尧. 发酵法生产魔芋葡甘聚糖

酶的研究[J]. 中国食品添加剂, 2005, 13(3): 21 - 25.

[10] 王建龙. 固定化对微生物生理变化的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 62 - 65.

Production of MTSase and MTHase by fermentation with immobilized *Microoccus roseus*

ZHANG Xin YUAN QiPeng JIANG LiWei XU YaQin

(College of Life Science and Tecnology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Production of the enzymes MTSase and MTHase, which are capable of converting starch into trehalose, by fermentation with *Microoccus roseus* immobilized on polyurethane foam (PUF), has been studied. Immobilization was found to lead to a marked increase in the activity of *Microoccus roseus*, giving a significant reduction in production time compared with that for the free cells (40 h vs. 106 h). After fermentation for 40 h, the observed value of the the dry cell weight was 12 g/L and that of the enzyme activity 52 u/mL; these represent increases of 12 % and 33 % respectively over the values obtained with the free-cells. The optimum conditions for repeated-cycle batch fermentation were found to be: after an initial 40 h of fermentation, 40 % of the medium is replaced with fresh medium every 24 hours. Under these conditions, the immobilized cells could be used in 9 batch cycles, lasting 230 h in total in flask fermentation and in 7 batch cycles lasting 180 h in total in a 10 L fermenter without any significant loss of biomass of activity. The rate of enzyme production reached a maximum of 56.9 u/(L · h), an increase of 42.5 % over that observed in a single fermentation.

Key words: immobilization; *Microoccus roseus*; MTSase; MTHase

(上接第 8 页)

Separation performance of sweep gas membrane distillation used in the removal of ammonia from water

DING ZhongWei LI ZhaoMan LIU Li Ying YANG ZuRong

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The performance of sweep gas membrane distillation (SGMD) in the removal of ammonia from water has been evaluated. A mass transfer equation and equations for evaluating mass transfer coefficients and selectivity have been derived by taking into account the dissociation of ammonia in water. SGMD experiments were conducted under various operating conditions in order to measure the ammonia concentration and transmembrane flux. The mass transfer coefficients and selectivity were calculated from the experimental data. Within the range of experimental parameters employed, mass transfer coefficients of up to 2.2×10^{-5} m/s and selectivities of up to 14 were obtained. It was found that high feed temperatures result in higher mass transfer coefficients, but lower selectivity. The feed velocity has very little influence on either mass transfer coefficient or selectivity, but they both can be increased by increasing the velocity of the sweep gas. While mass transfer coefficient and selectivity decrease slightly with rising feed concentration, they can be greatly increased by increasing the feed pH.

Key words: sweep gas membrane distillation; ammonia removal; mass transfer coefficient; selectivity