

# 海藻酸钠复合载体固定化细胞拆分D,L-泛解酸内酯

王雪梅 于明锐 谭天伟\*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘要:** 研究了海藻酸钠及其与聚丙烯酰胺(PAM)和聚乙烯醇(PVA)的复合载体对镰孢霉菌(*Fusarium oxysporum* BU-11)细胞的固定,该固定化细胞被用于手性拆分D,L-泛解酸内酯的反应体系。实验表明,海藻酸钠固定化细胞具有较好的扩散性和强度,在水解试验中与游离细胞相比,酶活收率可达到80%以上,而且具有较好的温度和批次反应稳定性,在底物质量浓度为200 g/L的3L搅拌式反应器中6h水解反应20批,水解率可以保持在初始的80%左右。PVA和PAM的加入可增强固定化细胞的强度,前者对酶活影响不大,后者使酶活略有增加。

**关键词:** 固定化细胞; 海藻酸钠; D-泛解酸内酯水解酶; D,L-泛解酸内酯; D-泛酸

**中图分类号:** Q8214.2

## 引言

D-泛酸,又名维生素B<sub>5</sub>,在动物体内是合成辅酶A的原料,其主要作用是参与蛋白质、脂肪和糖的新陈代谢,被广泛应用于医药、食品和饲料等领域。目前,合成D-泛酸钙的主要方法包括化学法和生物法。相对来说,生物法具有原料成本低、生产条件温和、操作安全和对环境友好等优点。Shimizu和Yamada<sup>[1-3]</sup>等对生物法合成中的菌种和合成路线等方面进行了较系统的研究。生产D-泛酸的主要技术是中间体D,L-泛解酸内酯的手性拆分技术。合成路线是通过拆分D,L-泛解酸内酯制备中间体(D-泛解酸或D-泛解酸内酯),再由D-泛解酸或D-泛解酸内酯与 $\alpha$ -氨基丙酸反应得到D-泛酸。在美国和日本等国家,生产D-泛酸钙的该技术已经在工业生产中被应用,相关的工艺还在不断改进。在国内,主要是利用化学法或物理法生产D-泛酸钙,生物酶法拆分的研究刚刚开始。汤一新等<sup>[4-5]</sup>进行了微生物酶法生产D-泛酸的研究,筛选到一株产D-泛解酸内酯水解酶的串珠镰孢霉菌(*Fusarium moniliforme*),确定了产酶条件和水解反应条件,在底物浓

度10%~20%的条件下,水解率可达到20%~30%,分批水解的过程可重复6次。为了提高酶的重复利用性,降低生产成本,固定化酶和固定化细胞技术的采用是大批量工业生产的必然趋势。

固定化细胞技术是在固定化酶的基础上发展起来的,因其具有酶活力损失少、成本低和生产周期明显优于固定化酶等优点,使其在工业上更具应用潜力。华蕾等<sup>[6]</sup>报道了卡拉胶包埋固定细胞拆分D,L-泛解酸内酯的研究。海藻酸钠是常见的包埋法固定化细胞载体,具有酶活损失少和制备简单的优点,但对不同的体系(尤其是磷酸盐体系)易出现载体破裂和细胞泄漏的现象。本研究中发现,对于用手性拆分D,L-泛解酸内酯的方法生产D-泛解酸的体系,海藻酸钠固定化细胞具有很好的稳定性和强度。而复合载体的加入可以优化固定化细胞的结构,使其具有更好的强度和扩散性。本文主要研究了海藻酸钠及其与聚丙烯酰胺(PAM)和聚乙烯醇(PVA)共混复合载体固定化细胞的制备,以及在D,L-泛解酸内酯水解制备D-泛解酸中的应用。

## 1 实验

### 1.1 实验材料

海藻酸钠(化学纯)、无水氯化钙(分析纯)、PVA(化学纯)、PAM(化学纯)、D,L-泛解酸内酯(化学合成,由浙江尤夫化工厂提供)。镰孢霉菌(*Fusarium oxysporum* BU-11),由本实验室筛选。

### 1.2 固定化细胞的制备

#### 1.2.1 海藻酸钠固定化细胞的制备 称取一定量

收稿日期: 2005-03-16

基金项目: 教育部博士点基金(2003001004); 国家自然科学基金(20136020/20325622/50373003); 北京市自然科学基金(2032013)

第一作者: 女,1970年生,博士生

\*通讯联系人

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

海藻酸钠加入去离子水中,加热至 60 ℃ 溶解,制成一定浓度的海藻酸钠溶液。将 20 mL 海藻酸钠溶液(40 ~ 80 g/L)与 20 mL 菌悬液(100 ~ 400 g/L)充分混合,然后用针管挤入一定浓度的  $\text{CaCl}_2$  溶液中,固定 2 h,得到一份固定化细胞,用去离子水洗净,称重,待用。

**1.2.2 复合载体固定化细胞的制备** 在 20 mL 海藻酸钠(60 g/L)溶液中加入 0.5 ~ 3.0 mL PVA 溶液(10%)和 20 mL 菌悬液(200 g/L),混合均匀。然后,用针管滴入含 10 g/L 硼酸的  $\text{CaCl}_2$  溶液中( $\text{CaCl}_2$  溶液的浓度为 20 g/L),固定 2 h,得到海藻酸钠-PVA 复合载体固定化细胞,用去离子水洗净,称重,待用。

称取 1 g 海藻酸钠和 0.1 ~ 0.8 g PAM,加入 20 mL 去离子水中,于 80 ℃ 水浴,磁力搅拌,完全溶解,制得含 PAM(5 ~ 40 g/L)和海藻酸钠(50 g/L)的水溶液。将该 20 mL 溶液与 20 mL 菌悬液(200 g/L)混合,然后用针管滴入  $\text{CaCl}_2$  溶液(25 g/L)中,固定 2 h,得到海藻酸钠-PAM 复合载体固定化细胞,用去离子水洗净,称重,待用。

### 1.3 固定化细胞酶活力和水解反应的测定

**固定化细胞酶活力测定方法** 将包埋量为 1 g 湿菌丝体的固定化细胞加入到 50 mL 底物溶液(含 100 g/L 泛解酸内酯、50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 0.2 mol/L Tris-HCl)中,在 40 ℃ 下摇床反应 1 h。真空抽滤,取清液,用 HPLC 分析测定泛解酸的生成量。在上述反应条件下,产生 1  $\mu\text{mol/min}$  脂肪酸所需的酶量为 1 个酶活力国际单位。在同组反应中,以最高酶活为 100%,其他反应点的酶活相对最高酶活所占的百分数,即为该反应点的相对酶活。

**固定化细胞水解反应的测定** 将一份固定化细胞与 60 mL 底物溶液(含泛解酸内酯 100 ~ 300 g/L)混合,放入摇床中,在 40 ℃ 下振荡,反应一定时间,用氨水控制 pH 值,使溶液的 pH 值在 7.0 ~ 7.5 之间。作为对照,用相同质量的游离细胞做水解反应。

### 1.4 分析和计算

**1.4.1 泛解酸内酯和泛解酸的 HPLC 测定** 色谱柱为 KovaSil C18 柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm),流速为 1 mL/min,紫外检测波长是 215 nm,流动相中乙腈与  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液(0.02 mol/L)的摩尔比为 1 : 9。用 0.1 mol/L HCl 调溶液的 pH 值,使流动相的 pH 值为 3.00(±0.05)。

泛解酸内酯标准品由 Acros 公司提供,比旋光

度是[ $\alpha$ ] $_{\text{D}}^{20}$  - 49.80,纯度为 99%。泛解酸标准品由泛解酸内酯经 NaOH 溶液水解得到。

### 1.4.2 固定化收率和水解率的计算

$$Y_I = \frac{A_I}{A_F}$$

式中:  $Y$  为固定化收率,%;  $A_I$  为固定化细胞的酶活, U;  $A_F$  为相同条件下游离细胞的酶活, U。

$$Y_H = \frac{0 - 1}{0}$$

式中:  $Y_H$  为固定化细胞水解率,%;  $0$  为反应前溶液中 D,L-泛解酸内酯的质量浓度, g/L;  $1$  为反应后溶液中 D,L-泛解酸内酯的质量浓度, g/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海藻酸钠固定化细胞的制备和水解条件的优化

**2.1.1 海藻酸钠固定化细胞的制备** 以 60 g/L 的海藻酸钠溶液和 200 g/L 的菌悬液制备不同粒径大小的固定化细胞,研究固定化细胞粒径大小对反应的影响。由图 1 可见,粒径越小,固定化收率和酶活

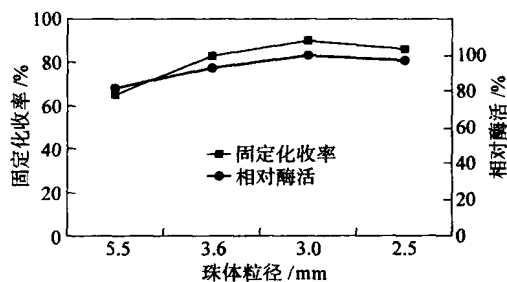


图1 珠体粒径对固定化细胞酶活收率和相对酶活的影响

Fig. 1 Effect of bead diameter on immobilization rate and relative enzyme activity of alginate immobilized cells

越高,这是由于较小的珠粒具有良好的扩散性,且在相同的硬化时间内硬化比较充分,强度较高。而粒径 2.5 mm 时收率和酶活有所下降,是由于针头过小,致使固定化过程中菌体包埋率下降。因此,取粒径 3 mm 为最佳点。

其他条件相同,配制不同浓度的菌悬液(100 ~ 500 g/L),制备海藻酸钠固定化细胞。在泛解酸内酯质量浓度为 200 g/L 的底物溶液中,水解反应 3 h,考察细胞的包埋量对反应的影响。由图 2 所示,随着细胞包埋量提高,相对酶活提高,但当菌悬液质量浓度大于 200 g/L 后,上升幅度不大。而固定化收率随着菌悬液质量浓度的提高在 300 g/L 处达到最

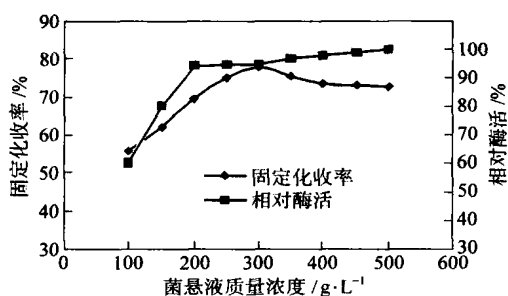


图2 菌体包埋量对固定化细胞酶活收率和相对酶活的影响

Fig. 2 Effect of cell load on immobilization rate and relative enzyme activity of alginate immobilized cells

高值,大于 300 g/L 以后收率明显下降。因此,菌悬液质量浓度为 200 ~ 300 g/L (相当于反应液中 67 ~ 100 g/L 的游离细胞质量浓度)较好。

表 1 是海藻酸钠溶液浓度对固定化的影响。海藻酸钠的浓度对酶活和收率的影响比较平缓。当海藻酸钠质量浓度低于 50 g/L 时,珠粒强度偏低,酶活和收率有所下降。因此,海藻酸钠的质量浓度应在 50 g/L 以上。

表 1 海藻酸钠的浓度对固定化收率和酶活的影响

Table 1 Effect of alginate concentration on immobilization rate and relative enzyme activity

海藻酸钠 / g L <sup>-1</sup>	40	50	60	70	80
固定化收率 / %	72.1	74.9	73.7	74.0	74.1
相对酶活 / %	83	100	90	93	83

菌悬液 = 250 g/L, CaCl<sub>2</sub> = 20 g/L, 珠体粒径 = 3 mm

表 2 是 CaCl<sub>2</sub> 溶液的浓度对固定化的影响。随着 CaCl<sub>2</sub> 溶液质量浓度的增大,固定化细胞的强度增强。当 CaCl<sub>2</sub> 质量浓度小于 15 g/L 时,强度过低,造成收率和比酶活性降低很大;CaCl<sub>2</sub> 溶液的浓度在 15 ~ 25 g/L 之间时,收率和比酶活都较好,而且变化不大。当 CaCl<sub>2</sub> 浓度大于 25 g/L 后,强度增大,扩散阻力也增大,从而使酶活降低。因此,CaCl<sub>2</sub> 溶液浓度取 25 g/L 为最佳点。

表 2 CaCl<sub>2</sub> 的质量浓度对固定化收率和酶活的影响

Table 2 Effect of CaCl<sub>2</sub> concentration on immobilization rate and relative enzyme activity

CaCl <sub>2</sub> / g L <sup>-1</sup>	10	15	20	25	30
固定化收率 / %	20.3	84.1	76.1	79.7	75.3
相对酶活 / %	22	100	90	95	80

菌悬液 = 250 g/L, 海藻酸钠 = 40 g/L, 珠体粒径 = 3 mm

2.1.2 海藻酸钠固定化细胞水解条件的优化 图 3 表示反应温度对海藻酸钠固定化细胞和游离细胞水解反应的影响。由该图可见,固定化细胞较游离细胞对温度的稳定性更高。固定化细胞的水解反应在 40 ~ 50 之间保持较高水平,到 60 才急剧下降;而游离细胞在反应温度超过 40 以后水解率即明显下降。

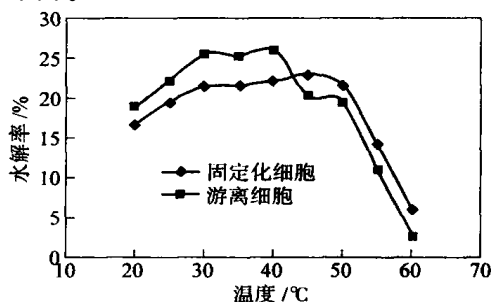


图3 温度对水解反应的影响

Fig. 3 Effect of temperature on hydrolysis reaction by immobilized cells and free cells

不同底物浓度下,海藻酸钠固定化细胞水解反应(5 h)的水解率和酶活的变化如图 4 所示,其中菌悬液的浓度为 200 g/L。由图 4 可见,随着底物的浓

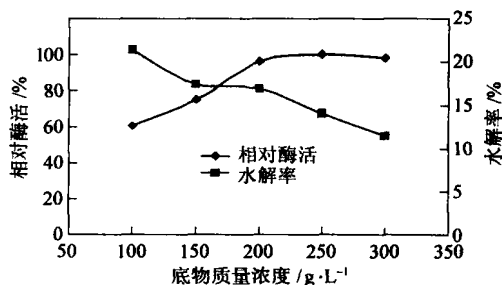


图4 底物浓度对固定化细胞水解反应的影响

Fig. 4 Effect of substrate concentration on hydrolysis reaction by alginate immobilized cells

度增大,固定化细胞的酶活相应增大,当底物浓度增加到 200 g/L 以后,曲线渐近平缓,酶活的增幅不大。同时,随着底物浓度的提高,水解率下降。综合考虑,水解反应较合适的底物质量浓度为 200 g/L。

用浓度为 200 g/L 的菌悬液制备固定化细胞,底物溶液质量浓度为 200 g/L,在 3 L 搅拌反应器中进行海藻酸钠固定化细胞酶水解,得到如图 5 所示的时间曲线。可以看出,水解率在最初的 10 h 内随时间的增加呈线性增加,水解率可达 25.5 %。此后,水解率提高趋缓,反应为 20 h 左右时水解率达到 30 %。

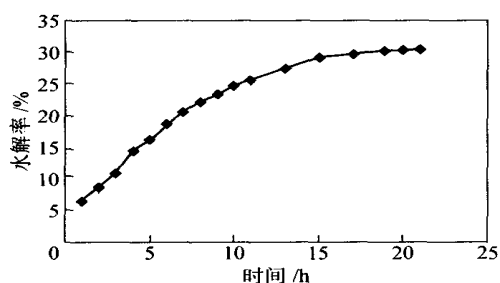


图 5 固定化细胞酶水解时间曲线

Fig. 5 Time course of hydrolysis conversion by alginate immobilized cells

**2.1.3 海藻酸钠固定化细胞的生命试验** 在 3 L 搅拌反应器中,将初始底物的浓度设定为 200 g/L,每次反应 6 h,进行海藻酸钠固定化细胞的反复水解试验。结果表明,进行了 20 批反应后,未见固定化细胞破碎现象,水解率保持在初始的 80 %左右(图 6)。这说明海藻酸钠固定化细胞具有良好的可重复操作性。显然,若在工业生产中采用该技术,生产成本会大幅降低。

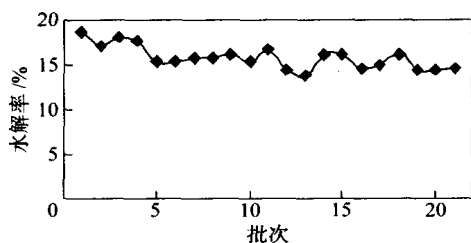


图 6 搅拌反应器中固定化细胞的批次水解反应

Fig. 6 Batched hydrolysis reaction by immobilized cells in stirred tank reactor

## 2.2 海藻酸钠复合载体固定化细胞的制备和初步评价

**2.2.1 海藻酸钠-PVA 复合载体固定化细胞** 在 20 mL 海藻酸钠 (60 g/L) 溶液中加入几毫升 PVA (体积分数 10 %) 溶液,制备海藻酸钠-PVA 复合载体固定化细胞。用不同的 PVA 添加量制备海藻酸钠-PVA 复合载体固定化细胞,其相对酶活(相应的海藻酸钠固定化细胞的酶活为 100 %)如表 3 所示。结果表明,由海藻酸钠添加 PVA 制成的复合载体包埋固定化细胞的成型效果好于单独使用海藻酸钠包埋的固定化细胞,颗粒均匀,而且强度高。复合载体固定化细胞的酶活略低于海藻酸钠固定化细胞的酶活,但相差不大。在 20 mL 海藻酸钠中添加 1.5 mL PVA(即复合载体中 PVA 的体积分数为 7.5 %)时

可达最佳效果,此时固定化细胞的酶活也最高。当 PVA 添加量大于 2 mL 以后,则形成的固定化细胞密度降低,易粘连,固化效果有所降低。

表 3 PVA 的含量对固定化的影响

Table 3 Effect of PVA content on immobilization

PVA 加入量 / mL	0	1	1.5	2.0	2.5
相对酶活 / %	100	91.7	95.6	91.1	—
成型效果	好	好	好	较好	较差

海藻酸钠 = 60 g/L, PVA = 10 %, 硼酸 = 10 g/L,  $\text{CaCl}_2$  = 20 g/L, 菌悬液 = 200 g/L, 珠体粒径 = 3 mm

**2.2.2 海藻酸钠-PAM 复合载体固定化细胞** 在 1 g 海藻酸钠中加入 0.1 ~ 0.8 g 聚丙烯酰胺,溶于 20 mL 水中,包埋菌体,制成海藻酸钠-PAM 复合载体固定化细胞。实验表明,添加聚丙烯酰胺后,复合载体的粘度明显高于相同浓度的海藻酸钠,因此在相同的成型效果情况下,可以降低海藻酸钠浓度,这使得成球更加容易,降低了对设备的要求。在 PAM 添加量不同的条件下,制备海藻酸钠-PAM 复合载体固定化细胞,其相对酶活(相应的海藻酸钠固定化细胞的酶活为 100 %)如图 7 所示。从图 7 中可见,海藻酸钠-PAM 复合载体固定化细胞的酶活与单纯

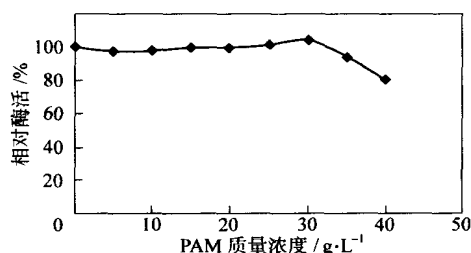


图 7 PAM 加入量对固定化细胞酶活的影响

Fig. 7 Effect of PAM content on immobilization

海藻酸钠固定化细胞酶活基本相当,甚至略好于后者。这可能是由于聚丙烯酰胺的酰胺基与海藻酸钠的羟基形成氢键,提高了载体强度,改善了凝胶结构,有利于底物和产物的扩散。

## 3 结 论

研究了海藻酸钠及其与 PAM 和 PVA 的复合载体对镰孢霉菌 (*Fusarium oxysporum* BU-11) 细胞的固定化,并将该固定化细胞应用于手性拆分 D,L-泛解酸内酯的反应体系。结果表明,海藻酸钠是固定具有较大菌丝体的霉菌的理想的包埋介质,制得的固定化细胞具有较好的扩散性和强度,在水解试

验中与游离细胞相比,酶活收率可达到 80 % 以上。而且固定化细胞具有较好的温度和批次反应稳定性,固定化细胞的水解反应在 40 ~ 50 之间仍保持较高水平;在 3L 搅拌式反应器中水解反应 20 批,水解率可以保持在初始的 80 % 左右。在海藻酸钠溶液中加入一定量的 PVA 和 PAM,可以优化载体的性能。加入 PVA 可以在酶活基本保持不变的情况下提高载体强度。而加入 PAM 不仅可以降低海藻酸钠浓度,使制备更容易,而且可以提高固定化细胞的酶活。

### 参 考 文 献

- [1] Sakamoto K, Hideaki Yamada H, Shimizu S. Process for the Preparation of D-Pantolactone [P]. USA 5275949, 1994-01-04.
- [2] Sunao N, Kakogawa, Hiroshi M, *et al.* Microbial process for producing calcium D-pantothenate [P]. USA 6013492, 2000-01-11.
- [3] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, *et al.* Lactonohydrolase-catalyzed optical resolution of pantoyl lactone: selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 333 - 338.
- [4] 汤一新,孙志浩,华蕾,等. 微生物酶拆分方法生产 D-泛酸的手性中间体 D-泛解酸内酯[J]. 工业微生物, 2001, 31(3): 1 - 5.
- [5] 汤一新,孙志浩,华蕾,等. D-泛解酸内酯产生菌的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 81 - 87.
- [6] 华蕾,汤一新,孙志浩,等. 固定化细胞拆分 D,L-泛解酸内酯的初步研究[J]. 工业微生物, 2001, 31(4): 5 - 8.

## Immobilization of fusarium oxysporum BU-11 cells by alginate composite for optical resolution of racemic DL-pantolactone

WANG Xue-mei YU Ming-rui TAN Tian-wei

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

**Abstract:** A processing of entrapping *Fusarium oxysporum* BU-11 in calcium alginate, alginate-PAM and alginate-PVA composite gel beads was investigated. The immobilized cells were applied in the optical resolution of racemic DL-pantolactone producing D-pantoic acid. It is shown that the alginate immobilized cells have good diffusivity and strength. Compared with the free cells, the enzyme activity of the immobilized cells reached to 80 %. Further more, the alginate immobilized cells showed a good temperature and operation stability. A batched hydrolysis by the immobilized cells was carried out in a 200 g/L substrate solution every 6 hours in a 3L stirred tank reactor. After 20 batches of the hydrolysis reaction, the enzyme activity reached 80 % of the original activity. It is shown that the addition of PVA enhances the strength of the immobilized cells, with little change in the enzyme activity, and while the addition of PAM induces the enhancement of not only the strength but also the enzyme activity of the immobilized cells.

**Key words:** immobilized cells; alginate; D-lactonohydrolase; D,L-pantolactone; D-pantothenic acid