

吸附法固定化己酸菌*

孙志敏 鲁格 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

本文以多种无机材料和合成树脂为载体对己酸菌进行了固定化研究。发现吸附树脂、粒状焦渣、M₈载体等吸附材料对己酸菌有较好的固定化效率和较高的产酸率,以硅铝酸盐为主体的M₈载体物表现出独特的优越性,它可以使己酸菌的产酸期缩短78%;产酸率提高50—90%。还发现铍、铊、钽、镱、铟等稀有金属离子都不同程度地增加了己酸产量;而钴、镍等金属离子却使发酵体系的产酸量大大下降。

关键词 固定化细胞;己酸菌;吸附

利用己酸菌发酵产生己酸的主要问题之一是发酵时间太长(9—11天),其中由己酸菌孢子生长为成熟的己酸菌需要6—7天,产酸期只有3—4天。耗用了大部分时间长成的己酸菌在游离菌发酵过程中只被“使用”一次^[1-3]。

近年来发展迅速的固定化细胞技术为克服上述问题创造了条件^[10-12]。为此我们以多种无机材料及离子交换树脂和吸附树脂作为吸附载体,对己酸菌进行了固定化,研究了载体性质对固定化效果的影响,提高了产酸量,缩短了产酸期,进而探讨了金属离子对己酸菌发酵过程的生物作用^[4,5]。

材料与 方法

(一) 菌种、己酸菌发酵培养基、己酸含量测定

参照文献^[5-9]

(二) 吸附载体材料

1. 强酸型离子交换树脂, 2. 弱酸型离子交换树脂, 3. 强碱型离子交换树脂, 4. 弱碱型离子交换树脂, 5. 吸附树脂NK107。以上均为南开大学化工厂产品。

6. 颗粒状活性炭为北京光华活性炭厂产品。7. 粒状焦渣, 8. 粒状红砖渣, 9. M₈载体(7—9均为60—80目, 自制材料)。上述材料中, 离子交换树脂按常规离子交换树脂处理方法处理, 其他材料依次用5%盐酸、水、5%NaOH洗、煮, 最后用水洗至中性、灭菌后备用。

(三) 吸附固定己酸菌

将一定量的载体材料、浸入己酸菌培养液中、接入适量己酸菌, 于34℃培养7—9天, 分离去除发酵液, 即得吸附法固定化己酸菌。

结果与 讨论

(一) 固定化己酸菌载体上存活菌的检查

取0.2g吸附了己酸菌的载体颗粒, 依次在各装有5ml无菌水的A、B、C、D四支试管内充份洗涤, 将1—4次的洗涤液和洗涤后的载体颗粒分别涂布于己酸菌固

本文于1987年10月22日收到。

* 固定化己酸菌的研究第二报。

本工作得到国家科委科学基金的赞助和支持, 在此致谢。

体培养基平板上，34℃下培养。结果表明，第1、2次洗涤液中有游离己酸菌存在，经培养后在培养基平板上有己酸菌菌落形成，第3、4次洗涤液中没有发现菌落，但在培养基上经4次洗涤后的载体颗粒周围有菌苔生成。通过扫描电镜也观察到在载体颗粒表面有己酸菌存在，见图1。由此证明通过吸附方法可以将己酸菌固定到载体表面，并且有一定的吸附牢度。

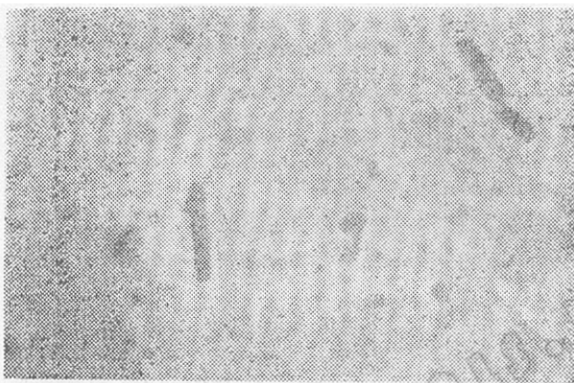


图1 吸附到载体表面上的己酸菌 (2500×0.6)
Fig.1 *C. caproicum* adsorbed on the surface of carrier

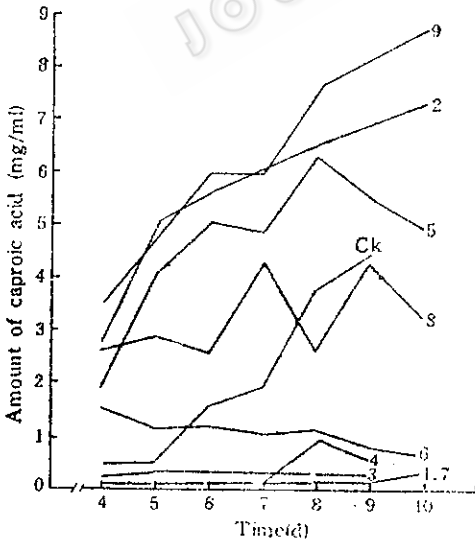


图2 吸附法固定化己酸菌产酸比较
Fig.2 Yield of caproic acid versus various carries
Ck, 液态法 Control liquid

(二) 载体对己酸菌的吸附及固定化己酸菌产酸情况

在40ml己酸菌营养液中，加入10ml己酸菌发酵液，分别加入2g不同载体，同时做一液态发酵对照，于34℃下进行一周期(9天)培养，定时取样测定己酸含量，比较之(图2)。由图可见，用不同载体吸附固定化己酸菌，在相同培养条件下，产己酸情况有明显不同，其中2、5、8、9号载体固定化己酸菌产己酸情况优于其他载体及游离菌。

吸附法固定化菌的效果应包括两个方面，一是载体与菌体间的结合牢度；二是载体性质对菌体生活状态、代谢功能、生化反应过程的影响。己酸菌表面带有负电荷、带有正电荷的碱性离子交换树脂应对己酸菌有较好的吸附能力，但实际上用强碱或强酸型离子交换树脂固定化己酸菌后产酸率都极低，这可能是它们在水溶液中呈现的酸碱性强，使载体上的己酸菌难以存活。此外吸附菌体的载体也可能吸附菌体的代谢产物，由乙醇发酵生成己酸的反应中，己酸是最终产物，当菌体周围环境中己酸浓度增高时，则不利于反应进行，生成的己酸也不易扩散到液相中(图3)。1、3号强酸强碱型离子交换树脂是以聚苯乙烯为主链结构，对己酸的吸附作用应主要产生在离子交换树脂亲油主链而非交换基团间。2、4号弱酸弱碱型离子交换树脂主链结构是丙烯酸酯的共聚物，亲油性比聚苯乙烯键要差，对己酸的吸附也少。无机物类的红砖渣、焦渣、活性炭、Mg载体等对己酸吸附量都较低。

此外载体表面的物理结构，比表面积、孔隙度、孔径大小都对菌体固定化效果有重要影响，同样粒度的载体比表面积大，布满孔洞，固定化菌的效果也要强

些。吸附法固定化己酸菌的载体材料中，由硅铝酸盐组成的 M_8 载体表现出较好的固定化效率，在相同条件下与游离己酸菌发酵相比，不仅产酸期缩短，而且产酸率也有提高。

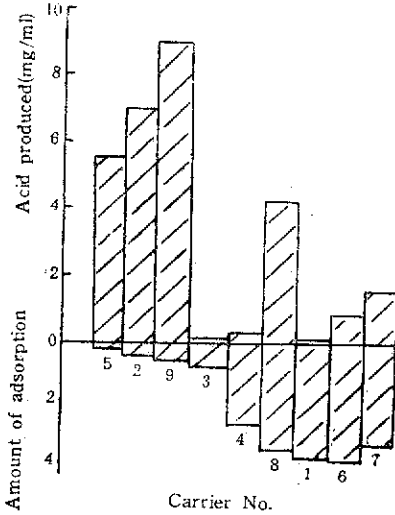


图3 不同载体产酸效果和对己酸的吸附
Fig.3 Relationship of acid adsorption by various carriers and acid production of immobilized bacteria

(三) M_8 载体物对己酸菌生长及产酸的影响

M_8 载体物是由含铝、硅、钠等盐类物质靠物理机械方法制成的硅铝酸盐晶体，其中含有多种微量元素。该无机载体的空腔直径为 6—15 Å，孔径为 3—10 Å，因此它可以根据分子和形状的不同选择吸附，在含有异构烷烃和芳香烃的混合物中，选择性吸附己烷烃。而硅胶、活性氧化铝和活性炭因为没有均匀的孔径、孔径分布范围十分宽广，因而没有选择性吸附的特性。 M_8 载体物对于极性分子和不饱和分子有很高的亲和力；在非极性分子中，对于极化率大的分子有较高的选择吸附优势。 M_8 载体孔穴中含有阳离子，而已酸菌是长 5—11 Å、宽 0.9—1.1 Å 表面带负电荷的细菌，因而决定了 M_8 载体对

己酸菌有较好的吸附能力，并有可能对己酸菌提供较优良的微环境，因而有可能促进己酸产率的提高。

将液态法己酸发酵体系和加入 M_8 载体物的己酸发酵体系平行定时取样测定产己酸量(图4)，可见添加 M_8 载体的发酵体系产己酸量有明显提高且产酸期大大提前。但是当以不同数量 M_8 载体加入到液体发酵体系中时，尽管加入发酵体系中 M_8 载体量增大(图5)，供菌体吸附的表面相应增加，因而固定到载体表面上的菌体亦应增多，体系中产己酸量亦应随之增多，然而事实上，体系中产生己酸量并

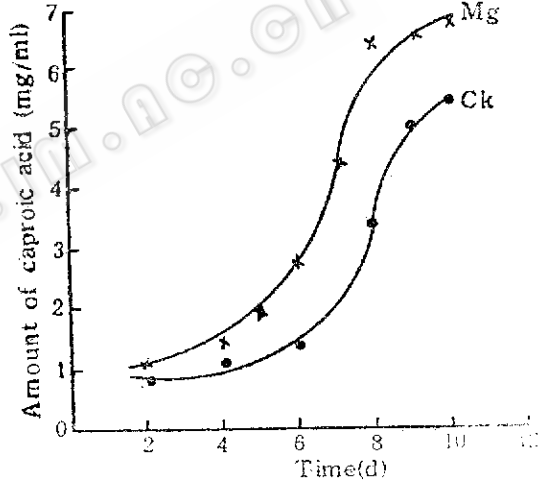


图4 M_8 载体对己酸菌发酵的影响
Fig.4 Caproic acid yield versus M_8 carrier
Ck: 液状法 Control liquid

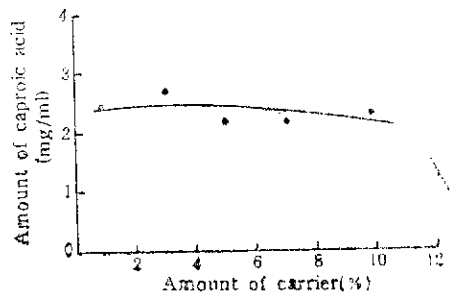


图5 M_8 载体量对己酸菌发酵的影响
Fig.5 Caproic acid yield versus amount of M_8 carrier used

未随M₀载体加入量的增多而增大。这一事实表明，M₀载体对已酸菌发酵的影响绝非仅仅在对已酸菌的吸附量上，由此推测，该体系中已酸量的增加可能与M₀载体物本身的某些化学因子有关，这些化学因子影响了已酸菌的生长过程和代谢活性；或者说M₀载体中可能存在有某些微量元素激活了菌体中与产已酸有关的特异性酶，因而造成M₀载体的加入使发酵体系中产已酸量提高78%，产已酸期提前2天。

(四) 金属离子对已酸菌发酵的影响

乙醇通过已酸菌发酵产生已酸是以一个复杂的途径依赖于环境因子。这些因子可以影响产酸酶的形成和酶的活性，环境也将影响各个不同代谢阶段酶的消耗及酸的形成，也有可能所有代谢步骤全受基因的控制。这些微环境因子对已酸形成的影响至今尚不清楚，它有待于产酸酶制备出来以后才能解决。我们的试验是在用无离子水配制的已酸菌发酵体系中加入微量(0.05%)各种金属离子同时做对照(不外加金属离子)试验。结果钹、铈、钽、镱、镱等稀有金属离子都不同程度地增加了已酸产量；而镍、钴等金属离子却使发酵体系中产酸量大大下降(表1)。但是，并非对产酸有促进作用的金属离子加入量愈多产已酸量愈高。实验表明，随着金属

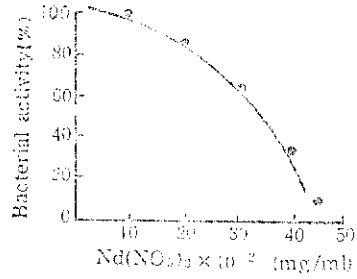


图 6 发酵液中金属离子含量对菌活力的影响
Fig.6 Amount of metallic ions versus activity of *C.caproicum*

离子加入量的增加，产已酸量反而有所下降(图6)。这足以证明，在已酸菌发酵过程中，某些微量金属元素的确参与了由乙醇产生已酸的反应过程；或者说，这些金属离子激活了发酵过程中产酸的酶，金属离子可以与酶结合又可以与底物结合成三位一体的酶-金属-底物的复合物、这些金属离子使底物更有利于同酶的活性催化部位和结合部位相结合，降低了产酸反应的活化能，加速了反应进行。但是当金属离子加入量过多时，以及某些金属离子有可能使酶的结合部位中毒，因而产酸量反而下降(图6)。由此可见，上述某些微量金属元素有可能就是M₀载体中所含的微量元素，当然它们的作用机制有待我们进一步研究。

表 1 金属离子对已酸菌发酵的影响
Table 1 Effect of different metallic ions

金属离子 Ions	Mn ²⁺	Al ³⁺	Gd ³⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Md ³⁺	Er ³⁺	Ho ³⁺	Yb ³⁺	Dy ³⁺	液态发酵 Control liquid
菌活力 (%) Bacterial activity (%)	106	109	116	7	9	138	132	133	127	128	100

(五) 吸附法固定化已酸菌的固定化效率

固定化细胞技术能否应用于生产实际中，菌体细胞的固定化效率和长期反复使

用也是一个很重要的指标。将吸附有已酸菌的载体2、5、9号各取10ml，分别加入40ml已酸菌营养液进行第二周期发酵培养，同样做液态对照，如此重复做第3、

表 2 吸附法固定化己酸菌的固定化效率
Table 2 Efficiency of immobilized *C. caproicum*

载体型号 Carriers No	期周 Period	I	II	III	IV	V	VI	液态法对照 Control liquid	平均固定化效率 Average immobilization efficiency (%)	
		产 己 酸 量 Amount of caproic acid (mg/mol)								
2		3.7	3.7	3.3	5.0	4.5	3.7	5.1	5.8	87.3
5		3.9	3.6	3.5	5.4	5.6	4.9	5.5	5.8	95.2
9		7.2	6.5	4.7	5.8	5.9	8.2	6.4	5.8	140.5

4、5等多周期培养(每周期9天)同时测定己酸产量,各载体体系中的己酸均生长良好,并有较好的产酸能力及较稳定的产酸值(表2)。由此可知,用吸附法固定化己酸菌在生产实际中的应用是很有希望的。

上述结果表明,用吸附法固定化己酸菌是可行的。弱酸型离子交换树脂、吸附树脂 NK 107、M₈载体等多种吸附材料与游离细胞相比,由于提供给菌体以附着物及较良好的微环境,提高了单位体

积中菌体的浓度,显示出具有较高的产酸率和较短的发酵周期等优点,并为发酵过程实现连续化创造了可能性。其中 M₈载体物显示出独特的优越性,少量 M₈载体物的加入可以使己酸菌发酵的产酸量提高20—50%,而使产酸期提前两天。某些金属离子等微量化学因子可明显改变发酵体系中己酸菌的产酸能力,为进一步探讨由乙醇经己酸发酵产生己酸的作用机制提出了供探讨的线索。

参 考 文 献

- [1] Barker, H.A. et al.: *J.Bact.*, 43: 347, 1942.
- [2] Bornstein, J.M. et al.: *J.Bact.*, 55: 223, 1943.
- [3] Navarro, J.M. et al.: *Ind.Alim.Agr.*, 93: 695, 1976
- [4] 鲁格等: 南开大学学报(1): 89, 1983.
- [5] 孙志敏等: 微生物杂志, 待发表。
- [6] 天津直沽酒厂: 天津微生物, (1): 1, 1978.
- [7] Daniels, S.L.: *Ind.Microbiol.*, 13: 211, 1972.
- [8] Rotmen, B.: *Bacteriological.Review*, 20: 251, 1960.
- [9] Paul, F. et al.: *Enzyme.Microb.Technol.*, 2: 281, 1981.
- [10] Shinmyo, A. et al.: *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 14: 7, 1982.
- [11] Nilsson, K. et al.: *Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 17: 319, 1983.
- [12] Tipayang, P. et al.: *J.Ferment.Technol.*, 60: 595, 1982.

IMMOBILIZATION OF *CLOSTRIDIUM CAPROICUM* BY ADSORPTION METHOD

Sun Zhimin Lu Ge Yu Yaoting

(*Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin*)

The present paper studies the adsorption properties of various inorganic materials and ion exchange resins as carriers for the immobilization of *C. caproicum* Prévot. Results showed that polymeric adsorbent, granular coke and M_8 silicate are good carriers for immobilization of bacteria. M_8 silicate has a unique property in shortening the fermentation cycle to 78% and enhancing the acid yield by 50—90%. We investigated the catalytic effect of various metals in the fermentation process and found that metallic ions, such as Nd^{3+} , Er^{3+} , Ho^{3+} , Yb^{3+} , Dy^{3+} etc, have a significant effect in raising the acid yield during fermentation; Co^{2+} and Ni^{2+} have a drastic effect in reducing the acid yield. This phenomenon showed that some trace elements in M_8 silicate probably involved in the bacteria metabolism.

Key words.

Immobilization of whole cell; *Clostridium caproicum*; absorption