

固定化诺卡氏菌细胞生产 L(+) 酒石酸的研究

孙志浩 郑 璞 戴雪泰 李 晖 金 梅

(江苏省微生物研究所 无锡 214063)

摘 要 用明胶包埋酒石酸诺卡氏菌 (*Nocardia tartaricans* SW13-57) 得到顺式环氧琥珀酸开环水解酶活力较高的固定化细胞。固定化细胞的最适温度为 30~45℃, 而游离细胞的最适温度为 35~45℃。两者的最适 pH 均为 8.0~9.0, 固定化细胞的表观米氏常数 K_m 为 0.256mol/L, 而游离细胞有底物抑制作用, 在底物浓度小于 0.45mol/L 时 K_m 为 0.246mol/L。用固定化细胞装柱 ($V=100\text{ml}$), pH8.5, 温度 37℃, 稀释速率 $D=0.25\text{h}^{-1}$, 以 0.5mol/L 浓度顺式环氧琥珀酸钠溶液为底物, 连续运转 53d, 平均产 L(+) 酒石酸 66.95g/L, 克分子转化率为 92.09%, 反应器生产能力达到 16.58g/L·h。

关键词 酒石酸诺卡氏菌 SW13-57, 固定化细胞, 顺式环氧琥珀酸, L(+) 酒石酸

L(+) 酒石酸为天然有机酸, 右旋型, 又称 d-酒石酸。主要作为酸味剂用于饮料、食品工业, 在制药工业中作为拆分剂大量使用, 在印染、照像显影、电镀、制革行业也有广泛用途。目前 L(+) 酒石酸的主要来源是从生产葡萄酒的副产物酒石中提取。由于酒石供应量有限, 来源不稳定, 导致酒石酸的供应和价格的较大波动。70 年代中期, 日本佐藤英次^[1], 三浦勇一^[2]等人报道了用顺式环氧琥珀酸水解酶 (Cis-epoxysuccinate hydrolase, ESH) 或其产生菌进行酶法转化顺式环氧琥珀酸生产 L(+) 酒石酸的研究, 最高达到转化率 90% 以上, 产酸 130g/L 以上的水平。90 年代初, 国内张建国^[3], 黄腾华^[4]等人也用筛选到的棒杆菌进行添加环氧琥珀酸的发酵法生产 L(+) 酒石酸的研究, 并进行了 8000L 罐的放大生产, 转化率 90% 以上, 产酸 69.4g/L。

我们筛选到一株产 ESH 酶活力较高的菌株经鉴定命名为酒石酸诺卡氏菌 (*Nocardia tartaricans* SW13-57)^[5], 我们用该菌株进行了固定化细胞转化顺式环氧琥珀酸生产 L(+) 酒石酸的研究取得了比较满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 固定化材料: 海藻酸钠 (上海化学试剂供应站分装); 卡拉胶 (汕头电化厂); 明胶 (上海明胶厂); 三醋酸纤维素 (无锡胶片厂); 戊二醛、聚乙烯亚胺 (PEI) (上海化学试剂商店进口分装)。其余试剂市售。

1.1.2 底物: 顺式环氧琥珀酸钠, 参照 Dayne G. B & Williams P. H 的方法^[6]由本实验室用顺酐和双氧水合成制备。

江苏省科委应用基础研究项目。

本课题组吴 燕、王 雷、刘济瑞同志也参加了研究工作。

本文于 1994 年 6 月 13 日收到。

1.2 菌种和培养方法

1.2.1 菌种: 酒石酸诺卡氏菌 *N. tartaricans* SW 13-57) 由本课题组筛选并鉴定。

1.2.2 培养方法: 参见文献 [5]。

1.3 固定化细胞制备方法

1.3.1 包埋法: 海藻酸钠、卡拉胶包埋参照 Takata. I. 等方法^[7]; 明胶包埋参见居乃琥等的方法^[8]; 三醋酸纤维素包埋参照 Marconi W. 等方法^[9]。

1.3.2 吸附法: 按孙志浩等的方法^[10], 用瓷环或 717 阴离子树脂进行吸附并增殖。

1.3.3 交联法: 参照 Bisso G. M. 等方法^[11]或用聚乙烯亚胺 (PEI) 或脱乙酰几丁质絮凝菌体后再用戊二醛交联。

1.4 分析方法

1.4.1 L (+) 酒石酸测定: 参照刘叶青等的方法^[12], 用偏钒酸铵比色法。

1.4.2 细胞酶活力测定: 参照佐藤英次等的方法^[1], 1min 转化顺式环氧琥珀酸生成 $1\mu\text{mol/L}$ L (+) 酒石酸的活性定义为 1 个酶活力单位 (u)。游离细胞酶活力测定参照文献 [1]。

1.4.3 固定化细胞酶活力测定: 用 1g 固定化细胞, 如 pH8.40 磷酸缓冲液 3.0ml, 和 1mol/L 顺式环氧琥珀酸钠溶液 1.0ml, 摇匀, 于 37°C 保温反应 1h, 取上清液测定酒石酸含量。其固定化细胞酶活力回收按其含游离细胞量及酶活力进行计算。

1.4.4 凝胶强度测定: 参照 Takata. I. 等方法^[7], 将凝胶切成 1cm 边长的立方块, 上盖平板玻璃, 压上砝码 5min, 至压扁不再弹回或压碎时的重量即为凝胶强度 (g/cm^2)。

2 结果和讨论

2.1 用不同方法制备的固定化细胞的比较

分别用 4 种载体包埋, 2 种载体吸附, 及不同絮凝剂絮凝后戊二醛交联的方法固定化细胞, 在同样条件下测定其转化顺式环氧琥珀酸钠盐的酶活力回收情况, 其结果如表 1 所示。

表 1 固定化方法对酶活力回收影响

Table 1 Effect of various methods of immobilization on yield of activity

Methods	carries	Yield of activity (%)
Entrapment	Sodium alginate	18.9
	K-carrageenan	26.4
	Gelatin	57.0
	Cellulose acetate	38.3
Adsorption	Ceramic rings	12.9
	Resin (717)	20.2
Closs-linkage	glutaraldehyde	35.0
	PEI, glutaraldehyde	90.9
	Chitin, glutaraldehyde	48.0

由表 1 可见, 采用 PEI 絮凝再交联的方法优于包埋、吸附或单一交联的方法。但是絮凝交联法不成型, 上柱操作比较麻烦。包埋法中以明胶包埋方法酶活力回收较高, 但凝胶强度不好, 易散易烂。通过本课题组研究, 筛选到一种硬化剂 B, 使强度得到改善。

2.2 固定化条件试验

用明胶包埋添加硬化剂 B，成型后再浸泡于戊二醛中进行交联的方法进行固定化条件试验。为了摸索适宜的明胶浓度和硬化剂 B 的浓度，采用均匀设计方法，试验不同条件固定化后的酶活力回收和凝胶强度。结果如表 2 所示。

表 2 均匀设计实验及结果

Table 2 Results of even design experiment

	1	2	3	4	5
A: Gelatine conc. /%	3	5	7	10	15
B: Hardening reagent B/%	5.0	10.0	2.5	7.5	12.5
Gel. strength/g·cm ⁻²	400	670	1050	1060	1065
Yield of activity/%	74.47	62.02	74.08	76.01	60.27

回归方程为：

$Y = 62.23 + 0.9748A + 351.1B - 39.09B^2$

$r = 0.9903 \quad F = 16.9$

计算得出 B 为 4.5%，A 浓度越大越好，由表 2 所示，当 A≥7% 时，凝胶强度已达到 1050g/cm²。因此选择 A 为 7%。即所确定的固定化条件为：明胶包埋的最终浓度为 7%。包埋时添加硬化剂 B 的浓度为 4.5%。胶凝后切成小块再浸于 0.5% 戊二醛溶液中进一步交联硬化。

2.3 固定化细胞的性质

2.3.1 温度对酶活力的影响：在不同温度下，分别测定固定化细胞和游离细胞的酶活力，结果见图 1。固定化细胞的温度适应范围较宽，在 30~45℃ 范围内均表现较高活力，而游离细胞的适宜温度范围则相对较小，在 35~40℃ 范围比较适宜。说明细胞固定化后耐温能力有较大幅度提高。

2.3.2 pH 对酶活力的影响：在不同 pH 条件下，分别测定固定化细胞和游离细胞在 37℃

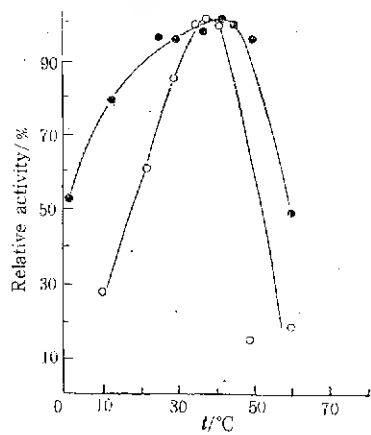


图 1 温度对酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the activity of immobilized and free cells
• — • Immobilized cells, o — o free cells

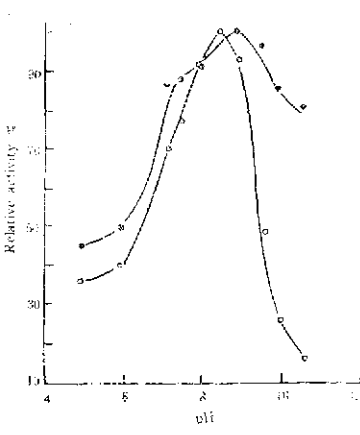


图 2 pH 对酶活力的影响

Fig. 2 Effect of pH on the activity of immobilized and free cells
• — • Immobilized cells, o — o Free cells

时的酶活力, 结果见图 2。细胞经固定化后, 耐 pH 范围稍有提高, 但最适 pH 均在 8.0 ~ 9.0 之间。

2.3.3 底物浓度对酶活力的影响及表现米氏常数 K_m 的测定: 在 pH 8.0, 温度 37℃ 条件下, 用不同底物浓度测定固定化细胞和游离细胞的酶活力, 用双倒数法作图 (图 3), 求出固定化细胞顺式环氧琥珀酸开环水解酶的表观米氏常数 K_m 为 0.256 mol/L。游离细胞酶的 K_m 为 0.246 mol/L。但图 3 表明, 当底物浓度在 0.45 mol/L 以上时游离细胞酶的转化能力下降, 用 $1/V$ 及 $1/[S]$ 作图得不到直线关系, 表现了高浓度底物的抑制作用。

2.3.4 固定化细胞转化时间曲线: 用 4L 酶柱 ($\varnothing 10\text{cm} \times 40\text{cm}$) 装 3kg 固定化细胞 (含细胞 2.0% 干重计) 加入 0.5 mol/L 底物 3L, 对照游离细胞反应液含细胞量 1.0% (干重计)。按不同时间测定转化产物 L (+) 酒石酸并计算克分子转化率。结果见图 4。

图 4 表明, 游离细胞反应 12h 后转化率达到 90%, 而固定化细胞在反应 3h 后即可达到 90% 以上。说明固定化细胞装柱后可使转化时间大大缩短。这可能是由于提高了反应体系中酶的浓度。

2.4 固定化细胞柱连续生产 L (+) 酒石酸

固定化诺卡氏菌细胞 60g, 装填于总容积 100ml ($\varnothing 3.0\text{cm} \times 20.0\text{cm}$) 的柱式反应器中保温 37℃, 稀释速度 $D=0.25\text{h}^{-1}$ 连续流过 0.5 mol/L 底物浓度 (pH 8.5)。连续运转 53d, 平均流速 24.8 ml/h, 平均产酸 66.95 g/L, 克分子转化率平均达 92.09%。以此计算反应器生产能力为 16.58 g/L · h。

进行了双柱串联补料试验, 第一柱流入 0.5 mol/L, 流速 25 ml/h。第二柱补料底物浓度为 2 mol/L, 流速 4 ml/h, 总流出液流速为 29 ml/h, 流出液产酸可达到 101.1 g/L, 克分子转化率 95.3%。

酶柱连续运转 53d 天以后, 未见酶活降低。酶块于冰箱中保存 1 个月以后测试, 其酶活仍保持不变。

经过 20L 酶柱连续运转 15d 以上的放大试验并已投入 1000L 酶柱的生产规模运转, 实验室研究结果得到了验证。

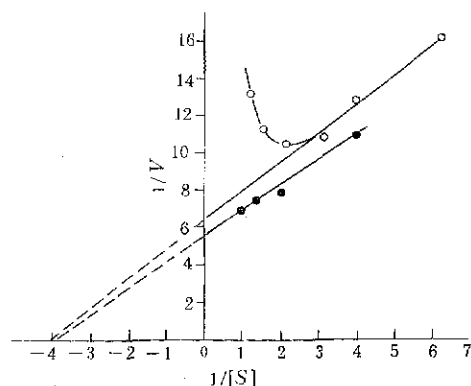


图 3 固定化细胞的 Lineweaver-Buck 图

Fig. 3 Lineweaver-Buck plots of initial rate of hydrolysis cis-epoxysuccinate by immobilized cells

—•— Immobilized cells, —○— Free cells

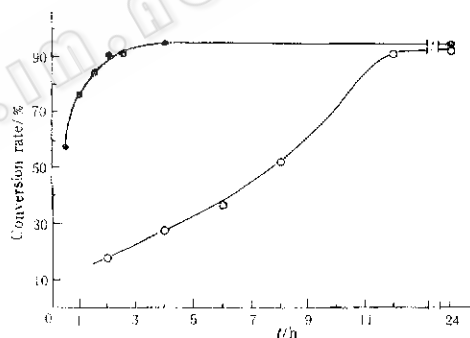


图 4 顺式环氧琥珀酸转化为 L (+) 酒石酸的时间过程

Fig. 4 Time course of transformation from cis-epoxysuccinate to L (+) -tartarate

—•— Immobilized cells, —○— Free cells

参 考 文 献

- [1] 佐藤英次、矢内显. 公开特许公报, 1975, 昭 50-140683.
[2] Yutani K, Takesue H, Miura Y *et al.* U S Patent, 1977, 4 017 362.
[3] 张建国、黄腾华. 工业微生物, 1990, 20 (2): 7~14.
[4] 黄腾华、钱晓梅. 工业微生物, 1991, 21 (4): 14~17.
[5] 郑 璞、孙志浩. 工业微生物, 1994, 24 (3): 12~17.
[6] Dayne G B, Williams P H. J organic Chemistry 1959, 24, 55.
[7] Takata I, Tosa T, Chibata I. J Solid-phase Biochem. 1977, 2 (3): 225~236.
[8] 居乃琥、朱 江. 工业微生物, 1991, 21 (6): 1~11.
[9] Marconi W, Cecere F, Monish F *et al.* J, Antibiotics 1973, XXVI (4): 228~232.
[10] 孙志浩, 王 舒, 吴 燕. 工业微生物, 1987, 17 (6): 18~22.
[11] Bisso G M, Melelli F. Process Biochem, 1986, 21 (4): 113~116.
[12] 刘叶青、严希康、周文龙等. 工业微生物, 1983, 13 (6): 32~37.

Production of L(+)-tartaric Acid by Immobilized *Nocardia tartaricans* SW13-57

Sun Zhihao Zheng Pu Dai Xuetai Li Hui Jin Mei

(Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi 214063)

Abstract *Nocardia tartaricans* SW13-57 were immobilized by entrapping in gelatin and the immobilized cells showed a high activity yield of cis-epoxysuccinate hydrolase. The optimum pH of immobilized cells and free cells was pH8.0~9.0. The optimum temperature of immobilized cells was 30~45°C, while that of the free cells was 35~40°C. The apparent Michaelis constant (K_m) of immobilized cells was 0.256mol/L, and that of free cell was 0.246mol/L, substrate inhibition was observed at high concentration of cis-epoxysuccinate (0.45mol/L or more). When the immobilized cells were packed in the column (100ml) and fed continuously with 0.5mol/L of sodium cis-epoxysuccinate at pH8.5 and at 37°C, the average yield of L(+)-tartaric acid after operating for 53 days was 66.95g/L, reaching a molar conversion rate of 92.09%. The productivity of the reactor reached 16.58g/L·h.

Key words *Nocardia tartaricans* SW13-57, immobilized cells, cis-epoxysuccinic acid, L(+)-tartaric acid