

# 卡拉胶混合凝胶固定化延胡索酸酶生产 L-苹果酸

胡永红 欧阳平凯 杨文革

(南京化工大学生物工程与科学系 南京 210009)

目前,固定化延胡索酸酶生产 L-苹果酸的技术中一般采用单一的聚合有机电解质包埋体系,例如:聚丙烯酰胺凝胶,海藻胶,卡拉胶等,迄今为止,已公开发表了卡拉胶固定化产延胡索酸酶的产氨短杆菌、黄色短杆菌的方法,并认为以卡拉胶包埋体系细胞及延胡索酸酶的转化率最高<sup>[1]</sup>。

卡拉胶是一种含有许多硫酸根基团的多糖化合物,作为固定化材料具有稳定性好的优点,但它的凝固点太高,众所周知工业生产上固定化操作均在凝固点附近进行,这不仅给固定化成形带来困难,而且严重影响被包埋细胞及酶的活性。为了降低卡拉胶的凝固点,在较低的温度下具有良好的流动性,减少操作过程中细胞及酶活力的损失,本文建立了混合凝胶体系,在卡拉胶中加入明胶,羧甲基纤维素钠、琼脂等物,同时溶解后,此复合电解质的凝固温度将大大降低,这将使固定化操作范围扩大,包埋介质与细胞及酶有充分的机会均匀混合,固定化条件变得温和,较低的温度下具有很好的流动性,在工业生产上较易实现机械化成形制胶。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及药品

产氨短杆菌 MA-2,黄色短杆菌 MA-3,均为本实验室筛选获得;卡拉胶为青岛黄海海藻工业公司购买,其他药品均为市售。

### 1.2 菌种培养

1.2.1 种子培养:两株菌均在普通牛肉汁培养基上培养并保存。

1.2.2 发酵培养:产氨短杆菌 MA-2 在含有柠檬酸氢二铵 3%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,玉米浆 2.5%的培养基中培养 24h,温度为 32℃。黄色短杆菌 MA-3 在含有丙二酸 2%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,玉米浆 1%的培养基中培养 36h,温度为 30℃。

### 1.3 方法

1.3.1 固定化细胞的制备:卡拉胶固定化按文献[2]进行。卡拉胶混合凝胶的制备是将卡拉胶与明胶、羧甲基纤维素钠、琼脂按一定比例混合,加水,加热后溶解形成复合有机电解质溶液,冷却至混合凝胶凝固点附近,混入菌泥,充分搅拌,进行机械成形或手工成形。

1.3.2 凝胶强度的测定:取卡拉胶或其混合凝胶样品 1.00g,放入小烧杯中,加入 100ml 0.3mol/L KCl 溶液,置沸水浴中,搅拌至完全溶解,倒入 3 只 2.5mm×40mm 称量瓶中,冷却凝固,在 30℃ 恒温 1h 后,用凝胶强度测定器将凝胶压破时所需要的压力,以  $\text{g}/\text{cm}^2$  表示。

1.3.3 凝胶凝固点的测定:配制混合凝胶水溶液,加热溶解,取 10ml 放入管内,管上加橡皮塞,在橡皮孔中插入精密温度计,使温度从每分钟下降 1℃,缓缓降低,至将试管倾斜 45°角,液面不流动时的温度为凝固点。

1.3.4 富马酸的测定:见文献[3]。

1.3.5 苹果酸的测定:见文献[4]。

1.3.6 延胡索酸酶活力的测定:见文献[5]。

本文于 1994 年 4 月 26 日收到。

## 2 结果与分析

### 2.1 凝固点及强度性能比较

将卡拉胶及其混合凝胶, 按一定比例配制后, 测定其凝固点及凝胶强度, 结果如表 1。

表 1 凝固点及凝胶强度的比较

Immobilization method	Freezing point/°C	Gel strength/g · cm <sup>-2</sup>
K-carrageenan	52.5	258
K-carrageenan + gelatin	42.0	251
K-carrageenan + CMC	41.5	254
K-carrageenan + agar	40.5	249

由表 1 可知, 卡拉胶与明胶, 羟甲基纤维素钠及琼脂形成的复合有机电解质凝胶的凝固点较单一卡拉胶凝胶包埋体系降低近 10°C, 而凝胶强度变化不大, 这就为在较低温度下的卡拉胶固定化体系的颗粒成形实现机械化、连续化提供了方便, 减轻了工业生产上人工成形固定化颗粒的劳动强度, 提高工作效率, 同时避免了卡拉胶机械成形过程中凝胶阻塞喷嘴口及球形颗粒拖尾现象的发生。

### 2.2 不同固定化体系酶活力的比较

将延胡索酸酶产生菌产氨短杆菌 MA-2 及黄色短杆菌 MA-3 的细胞分别包埋于卡拉胶及其混合凝胶体系中, 分别测定酶活力并计算包埋过程中所造成的酶活损失率, 结果如表 2。

表 2 延胡索酸酶活力的比较

Immobilization method	Fumarase activity μmol malic acid/h · g (wet cells)		The loss of fumarase activity/%	
	<i>B. ammoniagenes</i> MA-2	<i>B. flavum</i> MA-3	<i>B. ammoniagenes</i> MA-2	<i>B. flavum</i> MA-3
	K-carrageenan	19850	27950	21.5
K-carrageenan + gelatin	22650	32600	10.5	11.1
K-carrageenan + CMC	23140	33020	8.5	9.9
K-carrageenan + agar	22580	32550	10.8	11.2
Free cell	25300	36650	0	0

由表 2 可见, 由于卡拉胶混合凝胶凝固点的降低, 固定化过程中的操作温度可以降低, 固定化条件变得温和, 因此延胡索酸酶在包埋过程中因温度偏高而造成的酶活力的损失率可由单一卡拉胶包埋体系的 20% 以上, 降低至混合凝胶体系的 10% 附近, 有效地提高了固定化延胡索酸酶的活力, 使酶活回收率高达 90%。

### 2.3 转化效率及稳定性的比较

将富含延胡索酸酶的菌泥与卡拉胶及其混合凝胶混匀, 在特制的卡拉胶成形机中加工成  $\varnothing 5\text{mm}$  的圆球, 经 0.3mol/L KCl 溶液固化及 0.6% 胆汁酸 1mol/L 富马酸钠溶液活化处理后, 分别装入 0.8L 固定化细胞反应器中, 以每小时 0.4L 左右的流速通入富马酸盐溶液, 观察卡拉胶及其混合凝胶体系中固定化延胡索酸酶转化富马酸盐生成 L-苹果酸的平均转化率及操作半衰期, 结果如表 3。

由表 3 的数据可以看出, 在卡拉胶混合凝胶体系中包埋的延胡索酸酶较单一卡拉胶包埋体系, 延胡索酸酶转化底物生成产物的平均转化率提高 5%~10%, 运行周期可提高 10~20 d。当然由于混合凝胶中添加的成分不同, 各复合有机电解质所带基团与酶及底物的相互作用也略有区别, 因此在消除了固定化操作温度过高对延胡索酸酶活力的影响后, 仍然出现不同混合凝胶体系平均转化率及半衰期数据的波动。

表 3 平均转化率及半衰期的比较

Immobilization method	<i>B. ammoniagenes</i> MA-2		<i>B. flavum</i> MA-3	
	Average yield/%	Half-life/d	Average yield/%	Half-life/d
K-carrageenan	63	95	70	110
K-carrageenan + gelatin	72	115	80	125
K-carrageenan + CMC	73	112	82.5	131
K-carrageenan + agar	69	106	78.5	119

### 3 讨 论

通过实验我们认为,卡拉胶与明胶、羟甲基纤维素钠、琼脂等物形成的混合凝胶在包埋延胡索酸酶产生菌生产 L-苹果酸的工艺中,能有效地克服目前工业生产上普遍采用的单一卡拉胶包埋体系因固定化操作温度过高造成的酶活力损失,有效地将固定化延胡索酸酶活力的回收率提高至 90% 左右,平均转化率及固定化酶操作半衰期可相对提高 10%~20%,大大降低了产品的成本。该法不仅适用于 L-苹果酸的生产,而且在 L-天门冬氨酸, L-丙氨酸固定化生产工艺上亦能十分有效地提高各体系的酶活性。

此外,混合凝胶凝固点的降低,使卡拉胶在较低的温度下具有良好的流动性,固定化操作范围扩大,包埋介质与细胞及酶有充分的时间均匀混合,克服了较高温度操作短时间内造成的局部混合不均的缺点,使卡拉胶细胞机械成型及大规模工业化成为可能,可减轻手工成型的工作强度,有利于固定化细胞及酶成型工艺的连续化、机械化,降低工业生产的成本。

### 参 考 文 献

- [1] Kitahara K, Fukui S, Misawa M. *J Gen Appl Microbiol*, 1960, **6**: 108.
- [2] Takata I, Tosa T, Chibata O. *J Solid-Phase Biochem*, 1977, **2**: 225.
- [3] Bock R M, Alberty R A. *J Am Chem Soc*, 1953, **75**: 1921.
- [4] Goodman A E, Stark J B. *Anal Chim*, 1957, **29**: 283.
- [5] Sidney P C, Nathan O K. *Methods in Enzymology*, 1987, **136**: 456.

## Immobilization of Fumarase with K-carrageenan Mixed Gel for Production L-malic Acid

Hu Yonghong Ouyang Pingkai Yang Wenge

(Department of Biotechnology and Bioengineering,

Nanjing University of Chemical Technology, Nanjing 210009)

**Abstract** Methods of immobilization fumarase with K-carrageenan mixed gel for production L-malic acid were established. The operation temperature of carrageenan entrapment could be decreased about 10°C. The yield of immobilized fumarase activity was improved.

**Key words** K-carrageenan, mixed gel, fumarase, L-malic acid