

利用固定化酵母细胞生产 1,6-二磷酸果糖的研究

阎浩林 周大成* 苏 昕 梁丽莉

(沈阳药科大学制药系 沈阳 110015)

目前对 1,6-二磷酸果糖(简称 FDP)生产基本采用 Leisola^[1]等人在 1974 年提出的以酵母菌为转化媒体,以蔗糖、磷酸盐为底物的酶促磷酸化法来进行制备,但在工艺条件上已经有了很大的改进。利用固定化细胞生产 FDP 是现在人们进行研究的主要方向^[2]。在对常用的几种固定化方法进行比较后,本试验采用聚乙烯醇(PVA)和海藻酸钠为复合载体,对酵母细胞进行包埋,然后在饱和硼酸和 CaCl_2 溶液中制成固定化小球。用其制备 FDP,转化能力增强,转化周期明显缩短。如果进行工业化生产,可大大提高设备利用率,简化工艺条件。

1 材料和方法

1.1 菌种

酿酒酵母 Y_{162} 由中科院沈阳应用生态研究所提供。

1.2 培养基

斜面培养基:麦芽汁(11 柏林)、琼脂 2.0%、pH6.5, 0.068MPa 灭菌。固定化细胞增殖培养基:麦芽汁(11 柏林)、pH6.5, 0.068MPa 灭菌。发酵(转化)培养基:麦芽汁(7 柏林)、蔗糖 8%、 NaH_2PO_4 5%、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、甲苯 4.5%、生物素 0.2%、pH6.8, 0.068MPa 灭菌。

1.3 试剂

聚乙烯醇(PVA-124, 平均聚合度 2400~2500)一进口分装;海藻酸钠—化学纯(上海化学试剂供应站);丙烯酰胺—进口包装;硅藻土—化学纯(宁波染化厂)。

1.4 方法

1.4.1 酵母细胞固定化方法:海藻酸钙凝胶:按文献[3]报道的方法进行制备,酵母细胞悬液浓度为 10^7 个/ml。PVA 凝胶:按文献[4]报道的方法进行制备,酵母细胞制成浓度为 10^8 个/ml 的悬液。PVA-硼酸凝胶:向 8ml 生理盐水中加入酵母细胞湿菌体 0.4g,摇匀后加入冷却至 40℃ 的 72ml 10% PVA 溶液中,充分摇动,装入注射器中,滴加于正在搅拌的饱和硼酸溶液中,制成固定化小球。PVA-硅藻土-硼酸凝胶:按文献[5]报道的方法,在 PVA-硼酸凝胶中加入 8% 的硅藻土。PVA-海藻酸钠-硼酸(CaCl_2)凝胶:在 PVA-硼酸凝胶制备中加入 0.25% 海藻酸钠,滴加于搅拌中的饱和硼酸- CaCl_2 溶液中,制成直径约为 3mm 的固定化凝胶球。聚丙烯酰胺凝胶:见文献[6],酵母细胞悬液浓度为 10^7 个/ml。

1.4.2 固定化酵母细胞的增殖:将按不同方法制备的固定化酵母细胞加入到增殖培养基中,30℃、振荡培养 24h,即得活化的固定化细胞。

1.4.3 固定化酵母细胞转化 FDP 的反应:取 30g 固定化细胞,加入到发酵(转化)培养基中(50ml/250ml 三角瓶),30℃ 振荡培养 12h,测定 FDP 含量。

1.4.4 FDP 含量的测定:见参考文献[7]。

* 本校 96 年毕业生。

本文于 1996 年 6 月 3 日收到。

2 结果和讨论

2.1 几种固定化酵母细胞生产 FDP 的比较

将一定量(20g)采用不同方法制成的固定化细胞分别接入增殖培养基,30℃振荡培养 24h,滤去培养液,转入发酵(转化)培养基,30℃振荡培养 12h,测定结果见表 1。

表 1* 不同类型固定化细胞性能比较

类型	FDP 产量 /mg·ml ⁻¹	凝胶强度
海藻酸钙凝胶(球)	11.9	较弱(有破碎)
PVA 凝胶(块)	9.1	弱(凝胶软化)
PVA-硼酸凝胶(球)	11.3	较强(无破裂)
PVA-硅藻土-硼酸凝胶(球)	12.7	较强(个别破碎)
PVA-海藻酸钠-硼酸(CaCl ₂)凝胶(球)	12.5	强(无破碎)
聚丙烯酰胺(PGA)凝胶(块)	6.4	较强(无破碎)

* 表 1 的数据为连续发酵 7 批的平均值。

制备方法。表 2 列举了各因素的影响结果。根据表 2,选择:PVA 浓度为 10%、海藻酸钠浓度为 0.25%,酵母细胞浓度 9%(湿菌体/体积)进行固定化凝胶球的制备,制成的凝胶球形态均一,机械强度高,经连续振荡培养无破碎现象。固定化凝胶球见图 1。

表 2* 各因素对固定化小球成形及转化 FDP 能力的影响

因素	酵母菌/%	海藻酸钠/%	PVA/%	小球机械强度	FDP/mg·ml ⁻¹
1	2.4	0	8.1	-(不成球)	—
2	2.4	0.12	10	+(不规则,有破碎)	12.1
3	2.4	0.25	12.1	++(球形,个别破碎)	10.6
4	5.9	0	10	++(扁球形,个别破碎)	12.5
5	5.9	0.12	12.1	+++ (扁球形,无破碎)	11.8
6	5.9	0.25	8.1	+(球形,有破碎)	12.9
7	9.1	0	12.1	+++ (扁球形,无破碎)	10.2
8	9.1	0.12	8.1	+-(不规则,有破碎)	—
9	9.1	0.25	10	+++ (球形,无破碎)	13.1

* 4 批连续发酵结果的平均值。

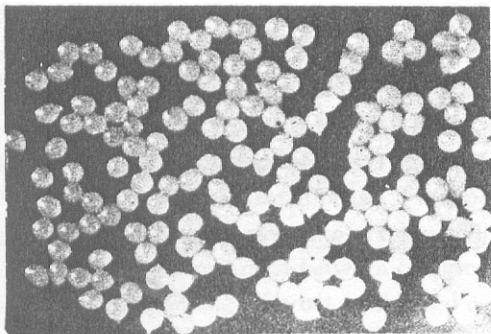


图 1 制成的固定化凝胶球

FDP 才达到最大程度的积累。二是转化能力强,固定化细胞在转化高峰其反应液中 FDP 浓度可达

从表 1 的结果看:以 PVA 为载体制成的球形固定化细胞机械强度高,尤其是当加入少量海藻酸钠或硅藻土后,转化能力均有一定程度的提高。经过 7 批连续发酵,最终选择机械强度高,转化率强的 PVA-海藻酸钠-硼酸(CaCl₂)凝胶球进行 FDP 的制备。

2.2 PVA-海藻酸钠-硼酸(CaCl₂)固定化方法的条件优化

采用正交设计,对几个重要因素进行考察,确定固定化凝胶球的最佳

2.3 固定化酵母细胞和游离酵母细胞制备 FDP 的结果

将一定量的固定化凝胶球(20g)与制备其凝胶球所用等量的酵母细胞在同样条件下进行增殖培养 24h 后,分别加入发酵(转化)培养液中(50ml/250ml 三角瓶),30℃振荡培养,定期取样,测定其 pH 及 FDP 随时时间变化的情况。结果见图 2。

图 2 表明,利用固定化细胞制备 FDP 要明显优于游离酵母细胞,其突出的优势在于:一是转化速度快,从图 2 可以看到固定化细胞发酵至 10h,其 FDP 的积累就达到了高峰;而游离酵母细胞在发酵至 14h 以后

13mg/ml 以上,而游离细胞最高只达到 11.8mg/ml。

从图 2 看两者 pH 变化不大,其中固定化细胞比游离酵母细胞略偏低一些。

2.4 固定化酵母细胞的稳定性试验

将一定量的固定化凝胶球经增殖活化后加入发酵培养基中(50ml/250ml 三角瓶),30℃ 振荡培养,每隔 12h 更换培养液,进行连续发酵,测定 FDP 含量,结果见图 3。虽经 10 批连续发酵,固定化酵母细

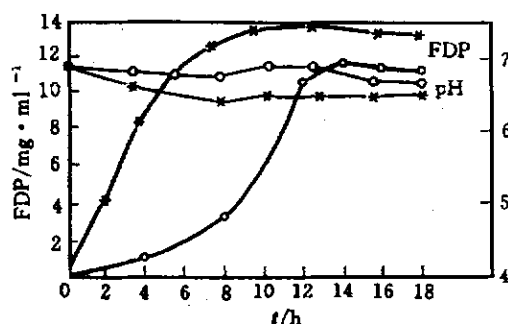


图 2 固定化细胞和游离酵母细胞的代谢曲线

* 固定化细胞,○ 游离细胞

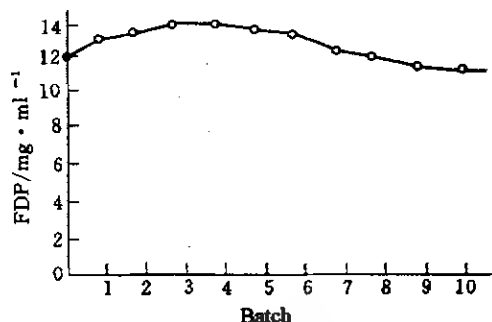


图 3 固定化细胞连续发酵情况

胞 FDP 的积累一直保持在较高的水平,虽然在发酵 6 批后 FDP 产量略有下降,但幅度很小。其凝胶球形态较完整,无破碎现象,这表明 PVA-海藻酸钠-硼酸(CaCl_2)凝胶是一种优良的固定化细胞载体,适合于对酵母细胞进行包埋固定,用该法制成的固定化酵母细胞可以应用于 FDP 的工业化生产。

参 考 文 献

- [1] Leisola M, Linko M. *Acta Chem Scandinavica*, 1974, 28:555.
- [2] 杜振宇、吴梧桐. *药学进展*, 1992, 16(3):145.
- [3] 阎浩林、马 莉、张秋霞. *沈阳药学院学报*, 1994, 11(4):282.
- [4] 李俊安、周 建. *微生物学报*, 1995, 35(3):232.
- [5] 杨 萍、董家灿、刘士清. *工业微生物*, 1992, 6:12.
- [6] Maddox I S, Dunnill P, Lilly M D. *Biotechnology and Bioengineering*, 1981, 23:345.
- [7] 杜振宇、吴梧桐. *中国生化药物杂志*, 1993, 2:59.

Studies on the Production of Fructose-1, 6-diphosphate by Immobilized Yeast Cells

Yan Haolin Zhou Dacheng Su Xin Liang Lili

(Department of Pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015)

Abstract A new method for preparing immobilized yeast cells by using PVA- H_3BO_3 -Ca-alginate was determined after comparing the results of preparation of FDP (Fructose-1, 6-diphosphate). The immobilized gel beads made by this means have great mechanical strength, high conversion rate of substrate to FDP and strong stability. When the gel beads were used for preparing FDP by continuous fermentation, the reaction period was obviously reduced. Tests show that it is superior to free yeast cells in many respects.

Key words FDP (Fructose-1, 6-diphosphate), immobilization, phosphorylation