

## 根瘤菌 BK-20 固定化细胞生产 L(+)-酒石酸

兰翔, 鲍文娜, 潘海峰, 谢志鹏, 张建国

浙江大学 生命科学学院生物化学研究所, 浙江 杭州 310058

兰翔, 鲍文娜, 潘海峰, 等. 根瘤菌 BK-20 固定化细胞生产 L(+)-酒石酸. 生物工程学报, 2014, 30(2): 315-319.

Lan X, Bao WN, Pan HF, et al. Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Rhizobium* strain BK-20. Chin J Biotech, 2014, 30(2): 315-319.

**摘要:** 顺式环氧琥珀酸水解酶(CESH)是根瘤菌 BK-20 生产 L(+)-酒石酸的关键酶。为提高其生产效率和生产稳定性, 首先优化根瘤菌 BK-20 的产酶条件, 然后利用固定化细胞连续生产 L(+)-酒石酸。结果显示, 优化后游离细胞酶活达(3 498.0 ± 142.6) U/g, 较优化前提高 643%。固定化细胞酶活达(2 817.2 ± 226.7) U/g, 其最适包埋剂、菌体浓度和凝胶浓度分别为海藻酸钠, 10% (W/V)和 1.5% (W/V)。固定化细胞连续反应 10 批后, 其形状和酶活均无明显改变, 单批次转化率达 98%以上, 具有良好的生产稳定性。

**关键词:** 顺式环氧琥珀酸水解酶, L(+)-酒石酸, 根瘤菌, 优化, 细胞固定化

## Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Rhizobium* strain BK-20

Xiang Lan, Wenna Bao, Haifeng Pan, Zhipeng Xie, and Jianguo Zhang

Institute of Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

**Abstract:** The *cis*-epoxysuccinate hydrolase (CESH) from *Rhizobium* strain BK-20 is the key enzyme for L(+)-tartaric acid production. To establish a highly efficient and stable production process, we first optimized the enzyme production from *Rhizobium* strain BK-20, and then developed an immobilized cell-culture process for sustained production of L(+)-tartaric acid. The enzyme activity of free cells reached (3 498.0 ± 142.6) U/g, and increased by 643% after optimization. The enzyme activity of immobilized cells reached (2 817.2 ± 226.7) U/g, under the optimal condition with sodium alginate as carrier, cell concentration at 10% (W/V) and gel concentration at 1.5% (W/V). The immobilized cells preserved high enzyme activity and normal structure after 10 repeated batches. The conversion rate of the substrate was more than 98%, indicating its excellent production stability.

**Keywords:** CESH, L(+)-tartaric acid, *Rhizobium*, optimization, cell immobilization

L(+)-酒石酸为天然小分子有机酸, 最初是从葡萄酒生产过程中的副产物酒石中提炼得到, 在食品、化工、制药、纺织以及电镀等多行业具有十分广泛的用途<sup>[1-4]</sup>。目前酒石酸的主流生产方法是利

Received: June 17, 2013; Accepted: September 4, 2013

Corresponding author: Zhipeng Xie. Tel/Fax: +86-571-88206983; E-mail: xzp@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-12-06

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131206.0847.004.html

用特异微生物产生的立体选择特异性顺式环氧化物水解酶(*cis*-epoxysuccinate hydrolase, CESH)直接水解顺式环氧琥珀酸(盐),产生 L(+)-酒石酸。该方法因操作简单、产率高且无副产物等优点受到人们越来越多的关注。因此,含有 CESH 的微生物菌种的筛选和酶活力的提高成为该方法的关键。1974 年,日本佐藤英次等首次建立了利用无色杆菌 *Achromobacter tartarogens* 来水解顺式环氧琥珀酸盐生产 L(+)-酒石酸的技术路线;近年来,潘克侠、潘海峰等<sup>[5-6]</sup>分别筛选出产 CESH 的红球菌 *Rhodococcus ruber* M1 和博德特氏菌 *Bordetella* sp. BK-52, 细胞酶活力分别可达 750 U/g 和 764 U/g, 用于生产 L(+)-酒石酸取得了良好的效果。

在发酵工业中人们常常利用细胞固定化技术来实现产酶细胞的稳定高效利用。张建国等<sup>[7-8]</sup>从土壤中分离到的一株产 CESH 的棒状杆菌 *Corynebacterium* JZ-1, 对该菌进行细胞固定化处理, 实现酶活回收率达 100%以上。孙志浩等<sup>[9-11]</sup>筛选到一株诺卡氏菌 *Nocardia tartaricans* SW 13-57, 其固定化细胞酶活力达 120 U/g, 将其用于 L(+)-酒石酸的生产也获得了成功。

本文采用单因子试验对一株产 CESH 酶的根瘤菌(编号为根瘤菌 BK-20)进行了产酶条件的初步优化与细胞固定化技术的初步研究, 为该菌进行 L(+)-酒石酸的工业化生产提供初步的试验基础和技术参数。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

本实验室保存的一株具有产 CESH 酶能力的根瘤菌(编号根瘤菌 BK-20)。

#### 1.1.2 初始培养基与培养条件

种子培养基参见文献[12];

初始培养基: 顺式环氧琥珀酸二钠 10 g/L, 葡

萄糖 10 g/L, 硝酸铵 1 g/L, 玉米浆 5 mL/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L。

初始培养条件: 种龄 24 h, 初始 pH 7.0, 装液量 25%, 接种量 1%, 30 °C、220 r/min 培养 24 h。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 产酶条件和细胞固定化条件的优化

以  $OD_{600}$  和细胞酶活力为测定指标, 采用单因子试验依次对培养基主要组分、培养条件进行优化, 得到高酶活细胞后进行固定化, 并考察其相关技术参数。

#### 1.2.2 细胞固定化方法

分别称取 1.5 g 琼脂、明胶、-卡拉胶溶于 20 mL 蒸馏水, 于 45 °C 保温, 分别与约 3 g 湿细胞(终浓度 10%)的 10 mL 生理盐水悬浮液混匀, 于 4 °C 冷却凝固后切成 3 mm×3 mm×3 mm 的小块; 另取约 2 g 湿细胞(终浓度 10%)用 5 mL 生理盐水悬浮后, 与 15 mL 2%海藻酸钠溶液混匀, 用 7 号针头滴入 0.1 mol/L  $CaCl_2$  溶液中形成直径 3 mm 的小球, 然后依次在 2%聚乙烯亚胺溶液中浸泡 30 min, 1%戊二醛溶液中浸泡 60 s 进行交联强化处理, 防止其在底物中发生溶解。获得固定化细胞后依次用蒸馏水和生理盐水冲洗后, 取相当于 0.1 g 湿细胞的固定化细胞, 测定酶活力和酶活回收率。

#### 1.2.3 酶活的测定

取约 0.1 g 湿细胞, 于 5 mL 1 mol/L 的顺式环氧琥珀酸二钠溶液 (pH 8.0), 30 °C 振荡反应 1 h, 离心取上清测酒石酸含量, 计算酶活。一个酶活力单位定义为: 1 g 湿细胞 1 h 内转化产生 1  $\mu$ mol 酒石酸所需的酶量, 单位用 U/g 表示。

酒石酸的含量采用偏钒酸铵比色法<sup>[13]</sup>来测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基主要组分的优化

依次对培养基中诱导剂、碳源、无机和有机氮源的种类及其浓度进行了优化, 综合考察菌体生长

情况和细胞酶活力水平。结果如图 1 所示。最终确定该根瘤菌 BK-20 的最适诱导剂、最适碳源、最适无机和有机氮源分别为：L(+)-酒石酸钠、蔗糖、氯化铵和玉米浆。分别对其最适浓度进行考察后，确定 L(+)-酒石酸钠、蔗糖、氯化铵和玉米浆的最适浓度分别为：5 g/L、1 g/L、0.5 g/L 和 1 mL/L。首次发现 L(+)-酒石酸钠对该菌产 CESH 的诱导作用大于顺式环氧琥珀酸钠的诱导作用。

## 2.2 培养条件的优化

依次对种龄、初始 pH、培养温度、培养时长、装液量、接种量等因素进行考察。综合考察菌体生长情况和细胞酶活力水平。最终确定该根瘤菌 BK-20 的最适培养条件为：种龄 36 h，初始 pH 8.0，

培养温度 30 °C，培养 24 h，装液量 10%，接种量 1%。

使用优化后培养基，在优化后的培养条件下进行验证试验，最终获得细胞酶活达  $(3\,498.0 \pm 142.6)$  U/g，较优化前的细胞酶活  $(462.6 \pm 52.5)$  U/g 提高了 643%。

## 2.3 细胞固定化条件的优化

### 2.3.1 固定化载体的选择

使用不同载体对根瘤菌 BK-20 进行固定化处理(表 1)。相同细胞浓度条件下，用海藻酸钠包埋后的固定化细胞表现出最高的酶活力和酶活回收率水平，且显著高于其他载体，这可能与聚乙烯亚胺和戊二醛的渗透强化处理有关，验证了金同立等<sup>[14]</sup>的研究结果。

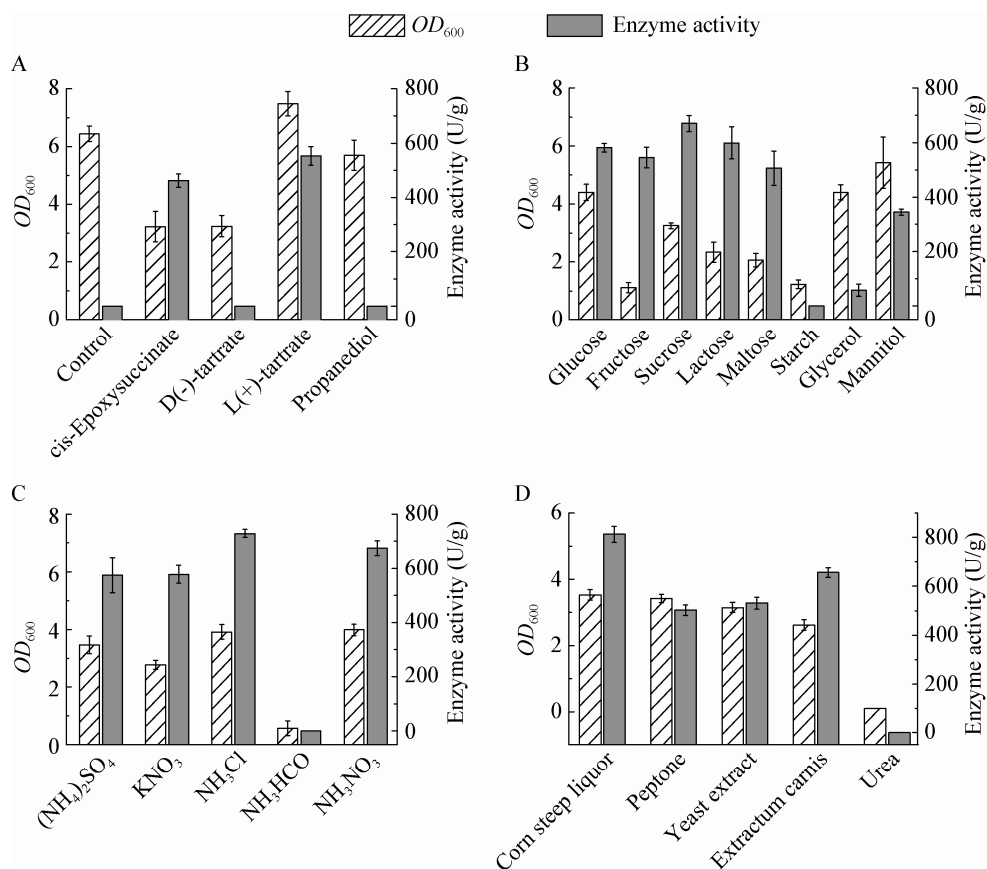


图 1 不同诱导剂(A)、碳源(B)、无机氮源(C)、有机氮源(D)对细胞生长和酶活力的影响

Fig. 1 Effect of different inducers (A), carbon sources (B), inorganic nitrogen (C), organic nitrogen (D) on cell growth and enzyme activity.

表 1 不同载体对固定化细胞酶活力及酶活回收率的影响

Table 1 Effect of different embedding carriers on enzyme activity and recovery of enzyme activity

Embedding carriers	Average enzyme activity (U/g)	Recovery of enzyme activity (%)
Agar	132.3	5.19
Glutin	346.6	13.59
Sodium alginate	2 525.1	99.04
$\kappa$ -Carrageenan	600.8	23.56

### 2.3.2 固定化细胞的最适菌体浓度和凝胶浓度

依次考察不同菌体浓度和凝胶浓度对固定化细胞酶活力的影响,结果如图 2 所示。固定化细胞的酶活力在菌体浓度为 10% (W/V) 时达最大 ( $2\ 813.3 \pm 256.4$ ) U/g, 菌体浓度超过 10% 后, 过高的菌体包埋率可能产生空间位阻效应<sup>[15]</sup>, 使得固定化细胞的酶活力开始下降; 而海藻酸钠的浓度为 1.5% (W/V) 时, 固定化细胞的酶活达最大 ( $2\ 767.6 \pm 261.1$ ) U/g。可见, 凝胶浓度过小, 则固定化细胞结构松散, 细胞泄露损失; 凝胶浓度过大, 则固定化细胞内部空间缩小, 限制了酶活力的发挥。因此, 选择固定化细胞的最适菌体浓度和最适凝胶浓度分别为 10% 和 1.5%。在此条件下制备固定化细胞进行验证试验, 最终获得固定化细胞的最大酶活力为 ( $2\ 817.2 \pm 226.7$ ) U/g。

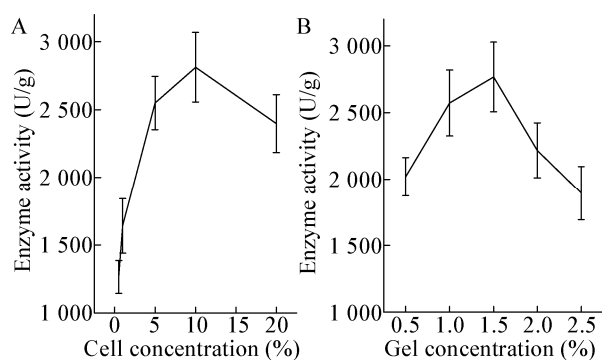


图 2 不同菌体浓度(A)、凝胶浓度(B)对固定化细胞酶活力的影响

Fig. 2 Effect of different cell concentrations (A), gel concentrations (B) on enzyme activity of immobilized cells.

### 2.3.3 固定化细胞的稳定性

取 1 g 固定化细胞于 20 mL 1 mol/L 底物 (pH 8.0) 中进行转化, 单批次摩尔转化率达 98% 以上。连续反应 10 批后, 固定化细胞的形状和酶活力都没有明显改变; 将固定化细胞浸泡在生理盐水中, 于 4 °C 冰箱贮藏 60 d 后, 其酶活力依然达到 ( $2\ 514.7 \pm 174.3$ ) U/g, 没有显著下降, 证明其具有良好的生产稳定性和贮藏稳定性。

## 3 结论

本文首次对根瘤菌 BK-20 顺式环氧琥珀酸水解酶(CESH)的产酶条件进行初步优化, 得到此株根瘤菌 BK-20 的较合适培养基组分和培养条件: L(+)-酒石酸钠 5 g/L, 蔗糖 1 g/L, 氯化铵 0.5 g/L, 玉米浆 1 mL/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L; 种龄 36 h, 初始 pH 8.0, 培养温度 30 °C, 培养 24 h, 装液量 10%, 接种量 1%。并首次发现, L(+)-酒石酸钠对该菌产 CESH 的诱导作用大于顺式环氧琥珀酸钠的诱导作用。优化后, 细胞酶活力可达 ( $3\ 498.0 \pm 142.6$ ) U/g, 较优化前提高 643%。

本文也首次对该根瘤菌 BK-20 的细胞固定化条件进行优化, 确定了以海藻酸钠作为最适固定化载体, 最适菌体浓度和最适载体浓度分别为 10% 和 1.5%; 获得的固定化细胞保持了较高的酶活力 ( $2\ 817.2 \pm 226.7$ ) U/g, 单批次转化率达 98% 以上, 并且表现出优良的生产稳定性和贮藏稳定性, 证明此株根瘤菌 BK-20 具有一定的 L(+)-酒石酸工业化生产潜力。

## REFERENCES

- [1] Lou JF, Zhang JG. Research on microbial productions of L(+)-tartaric acid. Food Sci Technol, 2006, 31(11): 162-164 (in Chinese).  
楼锦芳, 张建国. 酶法合成 L(+)-酒石酸的研究进展. 食品科技, 2006, 31(11): 162-164.
- [2] Peng LL. Studies on fermentation of *Nocardia*

- tartaricans* in production of *cis*-epoxysuccinate hydrolase. Baoding: Hebei University, 2010 (in Chinese).  
彭亮亮. 酒石酸诺卡氏菌发酵产顺式环氧琥珀酸水解酶的研究. 保定: 河北大学, 2010.
- [3] Pan HF. Study on the catalytic mechanism of a novel hydrolase CESH and its catalytic process with a high efficiency. Hangzhou: Zhejiang University, 2011 (in Chinese).  
潘海峰. 新颖水解酶 CESH 的催化机制及其高效催化工艺研究. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [4] Shen SB. Electroless Cu-plating with tart rate of high stability. *Surf Technol*, 1990, 19(3): 44–48 (in Chinese).  
申顺保. 高稳定性酒石酸盐化学镀铜. 表面技术, 1990, 19(3): 44–48.
- [5] Pan KX, Min H, Xia Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Rhodococcus* sp. strain M1 producing *cis*-epoxysuccinate hydrolase and optimization of production conditions. *Acta Microbiol Sin*, 2004, 44(3): 276–280 (in Chinese).  
潘克侠, 闵航, 夏颖, 等. 产顺式环氧琥珀酸水解酶的红球菌 M1 菌株的分离鉴定及其产酶条件优化. 微生物学报, 2004, 44(3): 276–280.
- [6] Pan HF, Xie ZP, Bao WN, et al. Isolation and identification of a novel *cis*-epoxysuccinate hydrolase-producing *Bordetella* sp. BK-52 and optimization of enzyme production. *Acta Microbiol Sin*, 2008, 48(8): 1075–1081 (in Chinese).  
潘海峰, 谢志鹏, 鲍文娜, 等. 产顺式环氧琥珀酸水解酶的博德特氏菌 BK-52 的筛选、鉴定及其产酶条件优化. 微生物学报, 2008, 48(8): 1075–1081.
- [7] Zhang JG, Huang TH. Productivity of L(+)-tartaric acid using microbial conversion method. *Ind Microbiol*, 1990, 20(2): 7–12, 24 (in Chinese).  
张建国, 黄腾华. 微生物转化法生产 L(+)-酒石酸的研究. 工业微生物, 1990, 20(2): 7–12, 24.
- [8] Zhang JG, Qian YJ. Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Corynebacterium* sp. JZ-1. *Chin J Biotech*, 2000, 16(2): 188–192 (in Chinese).  
张建国, 钱亚娟. 棒状杆菌固定化细胞生产 L(+)-酒石酸. 生物工程学报, 2000, 16(2): 188–192.
- [9] Sun ZH, Zheng P, Jin M, et al. *Cis*-epoxysuccinate hydrolase production by *Nocardia tartaricans* SW 13–57. *Acta Microbiol Sin*, 1996, 36(2): 109–114 (in Chinese).  
孙志浩, 郑璞, 金梅, 等. 顺式环氧琥珀酸水解酶产生菌的筛选及产酶条件. 微生物学报, 1996, 36(2): 109–114.
- [10] Sun ZH, Zheng P, Dai XT, et al. Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Nocardia tartaricans* SW 13–57. *Chin J Biotech*, 1995, 11(4): 372–376 (in Chinese).  
孙志浩, 郑璞, 戴雪泰, 等. 固定化诺卡氏菌细胞生产 L(+)-酒石酸的研究. 生物工程学报, 1995, 11(4): 372–376.
- [11] Rosenberg M, Miková H. Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(6): 491–495.
- [12] Huang TH, Qian XM. Production of L(+)-tartaric acid. *Ind Microbiol*, 1990, 20(6): 14–17 (in Chinese).  
黄腾华, 钱晓梅. L(+)-酒石酸的生产. 工业微生物, 1990, 20(6): 14–17.
- [13] Liu YQ, Yan XK, Zhou WL, et al. The colorimetry mensuration for tartaric acid. *Ind Microbiol*, 1983, 13: 32–37 (in Chinese).  
刘叶青, 严希康, 周文龙, 等. 酒石酸的比色测定法. 工业微生物, 1983, 13: 32–37.
- [14] Jin TL, Zhang PD. Studies on increasing turnover rate of endoenzyme of immobilized cells by permeabilizing and crosslinking method. *Ind Microbiol*, 2003, 33(1): 14–18, 22 (in Chinese).  
金同立, 张培德. 采用渗透交联固定化方法提高细菌内酶转化率的研究. 工业微生物, 2003, 33(1): 14–18, 22.
- [15] Jung ES, Kim HJ, Oh DK. Tagatose production by immobilized recombinant *Escherichia coli* cells containing *Geobacillus stearothermophilus* l-arabinose isomerase mutant in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(4): 1335–1340.

(本文责编 陈宏宇)