

产延胡索酸酶的皱褶假丝酵母固定化细胞

杨廉婉 钟丽婵

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1. 比较了用聚丙烯酰胺凝胶、琼脂凝胶和明胶三种包埋方法制备的固定化细胞的酶活力和回收率。其中以聚丙烯酰胺凝胶包埋的细胞酶的表现活力和回收率最高, 表现活力最高为 7237 单位/克细胞⁽¹⁾, 回收率最高为 90% 左右。

2. 比较了固定化细胞和自然细胞延胡索酸酶的一般性质: pH, 温度和二价金属离子对两者的酶促反应速度的影响。固定化细胞热稳定性比自然细胞好一些。Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ 和 Fe⁺⁺ 二价金属离子对两种细胞酶的热钝化均无保护作用。

3. 固定化细胞在 4—6°C 冰箱贮存 91 天, 酶活力保持不变。

4. 固定化细胞柱可用于连续生产 L-苹果酸, 包埋 6 克湿菌体的固定化细胞在柱反应器中, 在 30°C 可稳定工作 2 个月, 可将 12.24 升 1M 延胡索酸铵转化为 L-苹果酸 (转化率 82—85%)。酶活力的半衰期为 95 天。

依靠微生物从液体石蜡生产工业和医药的产品已有许多报道^[1]。反丁烯二酸研究小组^[2]曾筛选到一株利用液体石蜡发酵生产延胡索酸 (又名反丁烯二酸) 的菌株——皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*) C₉₀ 该菌在发酵过程中, 不仅产生延胡索酸, 同时还产生少量的琥珀酸, α-酮戊二酸和 L-苹果酸。鉴于该菌在碱性条件下, 能将延胡索酸只转化成 L-苹果酸的特点, 因此可利用生产延胡索酸后的废菌体来生产 L-苹果酸。L-苹果酸在工业和医药等方面有许多用途^[3]。为填补我国在 L-苹果酸生产方面的空白, 我们进行了产延胡索酸酶的皱褶假丝酵母 C₉₀ 固定化细胞生产 L-苹果酸的研究。

材料和方法

(一) 材料

丙烯酰胺和 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 为英国 BDH 厂产品; N, N'-甲撑双丙烯酰胺 (BIS), 过硫酸钾和明胶 (珠状) 为北京化工厂产品; 苹果酸为英国 L. Light 厂产品; 戊二醛

为英国 Koch-Light 厂产品; 液体石蜡是锦西炼油五厂产品, 主要成份为 C₁₄-C₁₇ 的直链烷烃; 琼脂是青岛水产加工厂产品; 延胡索酸 (含量为 97.8% 的工业品) 为无锡溶剂厂产品; 其它试剂均为化学纯或分析纯。

(二) 菌株

皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*) C₉₀ 系本所反丁烯二酸研究小组提供, 通常在麦芽汁培养基中培养保存。

(三) 培养基和培养条件

1. 种子培养基 (%): NH₄Cl 0.3, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 酵母膏 0.05, 液体石蜡 4。于 500 毫升三角瓶中装入 30 毫升培养基, 在旋转摇床 (转速 200 次/分钟, 偏心距 2.5 厘米) 上, 28—30°C 培养 48 小时。

2. 发酵培养基 (%): NH₄Cl 0.3, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 酵母膏 0.05, 液体石蜡 6, CaCO₃ 3。于 500 毫升三角瓶或挡板摇瓶中装入 30 毫升培养基, 接入 10% 种子液, 在旋转摇床上 28—30°C 培养 4 天。

(四) 固定化细胞的制备方法

本文于 1979 年 4 月 23 日收到。

1) 克细胞指包埋于凝胶中的 1 克湿细胞。

发酵液离心(9000 转/分钟) 10 分钟, 倾出上清液, 用生理盐水洗一次, 离心收集细胞(每克湿细胞约相当于 400 毫克干重)。用三种包埋方法制备固定化细胞。

1. 聚丙烯酰胺包埋法: 参照 Chibata 等^[5] 报道的方法。取 1 克湿细胞悬浮于 4 毫升生理盐水中, 加入丙烯酰胺 750 毫克, BIS 40 毫克, 5% TEMED 0.5 毫升和 2.5% 过硫酸钾 0.5 毫升, 抽真空, 在 10 分钟内完全聚合, 得到最终浓度为 15.0% 的聚丙烯酰胺凝胶, 切成边长 3—4 毫米的小块, 分别用 100 毫升蒸馏水和生理盐水洗涤, 抽滤至干。

2. 琼脂凝胶包埋法: 1 克湿细胞加 4 毫升生理盐水悬浮, 加 9% 琼脂胶液(48—50°C) 8 毫升, 最终浓度为 6%, 凝固后切成边长 3—4 毫米的小块, 洗涤操作同上。

3. 明胶包埋法: 10% 的明胶溶液 10 毫升在 32—34°C 下加 1 克湿细胞, 凝固后切成边长 3—4 毫米的小块, 然后加 2.5% 戊二醛 10 毫升, 在室温下搅拌 2 小时。分别用 400 毫升蒸馏水和生理盐水洗涤, 抽滤干。

(五) 延胡索酸酶的活力测定

1. 自然细胞的酶活力测定: 取 16 毫升 1 M, pH 8.5 的延胡索酸铵溶液, 加到 100 毫升三角瓶中, 于 37°C 平衡 10 分钟后, 加入 4 毫升(内含 1 克湿细胞) 细胞生理盐水悬浮液, 搅拌反应 1 小时, 取 2 毫升置沸水浴中加热 5 分钟以终止反应。空白用预先煮沸的细胞悬浮液代替活细胞悬浮液, 其它操作相同。离心(3000 转/分钟) 10 分钟后, 分别取 0.2 毫升上清液用 0.1 N 高锰酸钾滴定延胡索酸。空白和样品滴定值的差为延胡索酸的消耗。在上述条件下, 每小时催化消耗 1 微克分子底物的酶量定义为一个酶活力单位^[6]。

2. 固定化细胞酶活力测定: 取 1 份固定化细胞(通常内含 1 克湿细胞)于 100 毫升三角瓶中, 加入 20 毫升 1 M、pH 8.5 的延胡索酸铵, 于 37°C 搅拌平衡 5 分钟, 立即吸 0.2 毫升反应液作为空白。继续搅拌 1 小时, 再吸 0.2 毫升反应液。两个样品按上述方法用 0.1 N 高锰酸钾溶液滴定。

(六) L-苹果酸的定量测定

参照 Goodman^[7] 等的方法, 用比色方法进行测定。

(七) 纸层析^[2]

用 30 厘米 Whatman No.1 滤纸, 在甲酸:丁醇:水 = 3:10:10 的展开剂中上行 5—7 小时。有机酸的显色液为 pH 7.5、0.08% 的溴甲酚绿水溶液。

结 果

(一) 固定化细胞制备方法的比较

各取 1 克湿细胞(酶活力 7237 单位), 分别用 15% 聚丙烯酰胺凝胶, 6% 琼脂凝胶和 10% 明胶包埋, 制备得固定化细胞。测定固定化细胞的酶活力(即表现活力)。结果如表 1 所示, 聚丙烯酰胺凝胶包埋的酶活力比较高, 为 6332 单位/克细胞, 回收率为 87%。

表 1 三种包埋方法的比较

包埋方法	固定化细胞	
	表现活力(单位)	回收率(%)
聚丙烯酰胺凝胶	6332	87
琼脂凝胶	4071	56
明胶	1508	21

(二) 聚丙烯酰胺凝胶包埋皱褶假丝酵母 C₉₀ 的最适条件

1. 细胞浓度的影响: 用 15% 的聚丙烯酰胺凝胶包埋不同浓度的细胞生理盐水悬浮液, 结果见表 2。随着细胞浓度的增加, 酶活力的回收率逐渐下降。

2. 丙烯酰胺和 BIS 浓度的影响: 在 5 毫升生理盐水中, 分别将 1 克湿细胞包埋于不同量的丙烯酰胺和 BIS 凝胶中。结果表明(表 3), 随着丙烯酰胺浓度的增加, 固定化细胞的酶活力逐渐提高。而表 4 说明, 不同量 BIS(5—40 毫克) 制得的固定化细胞在表现活力上没有明显的差异。

(三) 聚丙烯酰胺凝胶包埋皱褶假丝酵母 C₉₀ 固定化细胞酶的一般性质

1. 酶反应的最适 pH: 在不同 pH 条件下, 分别测定自然细胞和固定化细胞的酶活力。如图 1 所示, 两者的最适 pH 均为 8.5。

表 2 细胞浓度对固定化细胞酶活力的影响

湿细胞重 (克)	给酶量 (单位)	固定化细胞	
		表现活力 (单位)	回收率(%)
1	6410	5876	91.6
2	12820	11217	87.5
3	19230	16025	83.3
4	25640	20031	78.1
5	32050	21901	68.3

表 3 丙烯酰胺浓度对固定化细胞酶活力的影响

丙烯酰胺		BIS		固定化细胞酶 的表现活力 (单位)
重量 (毫克)	浓度(%)	重量 (毫克)	浓度(%)	
250	5.0	40	0.8	4975
375	7.5	40	0.8	5729
500	10.0	40	0.8	5880
750	15.0	40	0.8	6031

给酶量 6935 单位/克细胞

表 4 BIS 浓度对固定化细胞酶活力的影响

丙烯酰胺		BIS		固定化细胞酶 的表现活力(单位)
重量 (毫克)	浓度(%)	重量 (毫克)	浓度(%)	
500	10	5	0.1	6483
500	10	10	0.2	6483
500	10	20	0.4	6332
500	10	40	0.8	6483

给酶量: 6885 单位/克细胞

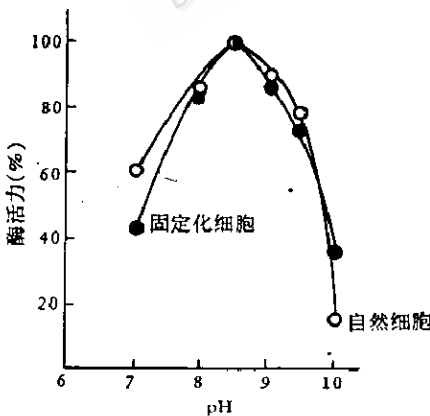


图 1 pH 对酶反应速度的影响底物浓度 1M, 用氨水调到各指定的 pH

2. 酶反应的最适温度: 在不同温度下分别测定自然细胞和固定化细胞的酶活力。图 2 说明两者的最适温度均为 45℃。

3. 二价金属离子对酶反应速度的影响: 在不同金属离子的存在下测定自然细胞和固定化细胞的酶活力。表 5 说明四种金属离子对酶反应速度均无明显的影响。

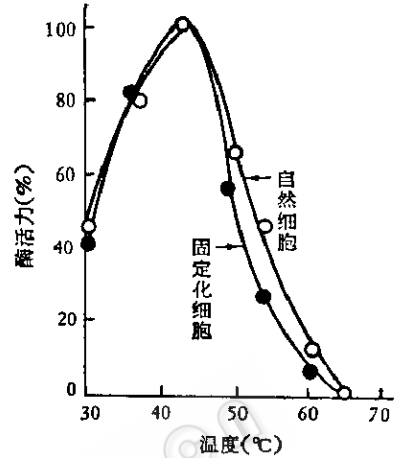


图 2 温度对酶反应速度的影响

表 5 二价金属离子对酶反应速度的影响

金属离子*	延胡索酸酶活力(%)	
	固定化细胞	自然细胞
无	100	100
Mn ⁺⁺	104	103
Mg ⁺⁺	104	103
Ca ⁺⁺	100	100
Fe ⁺⁺	100	97

* 金属离子浓度为 1 毫克分子

4. pH 稳定性: 将自然细胞和固定化细胞分别悬浮于 0.1 M 不同 pH 的缓冲液中, 于 37℃ 保温 22 小时后, 分别测定其酶活力。图 3 表明两者均在 pH 6—8 较稳定。

5. 热稳定性和二价金属离子的影响: 用生理盐水分别悬浮固定化细胞和自然细胞, 在不同温度下处理 30 分钟, 然后测定酶活力。图 4 表明固定化细胞的热稳定性比自然细胞好。在生理盐水悬浮的自然细胞和固定化细胞中分别加入四种二价金属离子, 经 45℃ 热处理 30 分钟后测活。结果(表 6) 表明二价金属离子对固定化细胞

和自然细胞的热钝化均无保护作用。

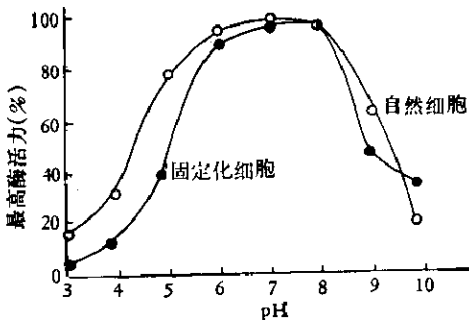


图3 pH稳定性

pH 3—6 为 0.1 M 柠檬酸缓冲液; pH 7.2—9 为 0.1 M Tris-HCl 缓冲液; pH 10 为 0.1 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液。

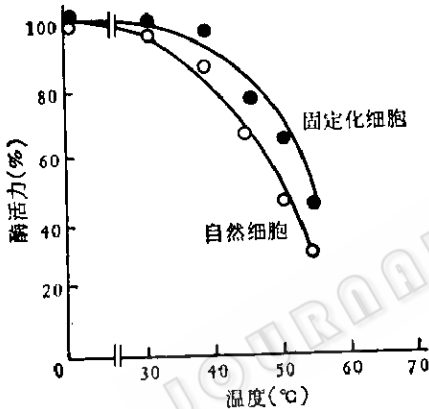


图4 热稳定性未经热处理的酶活力为 100%

表6 二价金属离子对酶热钝化的影响

金属离子*	延胡索酸酶活力(%)**	
	固定化细胞	自然细胞
无	85	50
Mn^{++}	88	50
Mg^{++}	88	50
Ca^{++}	88	52
Fe^{++}	85	54

* 金属离子浓度为 1 毫克分子

** 未经热处理的酶活力为 100%

6. 保存试验: 包埋 1 克湿菌体的固定化细胞在 10 毫升 1 M pH 8.5 的底物溶液中, 于 4—6°C 冰箱保存 91 天, 固定化细胞酶活力保持不变(表 7)。

表7 保存的稳定性

保存时间(天)	0	10	20	30	40	50	75	91
酶活力(%)	100	98	98	98	102	100	98	98

(四) 柱式转化

1. 在不同 pH 下, 底物溶液的流速与转化率的关系: 将包埋 18 克湿菌体的固定化细胞(表现活力为 5168 单位/克细胞)分成三等份, 每份装入 2×7 厘米柱反应器中, 分别通过 pH 7.5、8.0 和 8.5 的 1 M 底物溶液, 调节流速使其达到最高转化率。结果表明(图 5), 随着底物溶液 pH 的增加, 达到最高转化率(85%)所需的流速提高。在底物溶液 pH 7.5、8.0 和 8.5 的条件下, 达到最高转化率的流速分别为 3 毫升/小时 ($\text{SV} = 0.14$), 7 毫升/小时 ($\text{SV} = 0.32$) 和 8.5 毫升/小时 ($\text{SV} = 0.38$)。

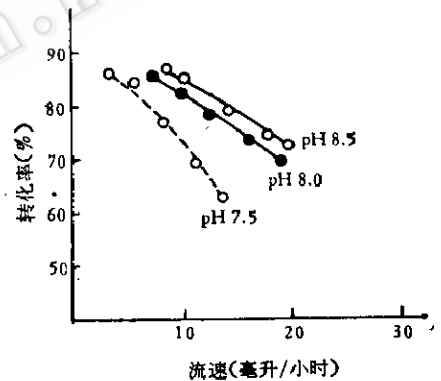


图5 不同 pH 下底物溶液的流速与转化率的关系

2. 在不同温度下, 底物溶液的流速与转化率的关系: 将包埋 18 克湿菌体的固定化细胞(表现活力为 6062 单位/克细胞)分成三等份, 每份装入 2×7 厘米柱反应器中, 分别在 30°C、37°C 和 45°C 下, 通过 1 M pH 8.5 的底物溶液, 调节底物溶液的流速, 使其达到最高转化率。结果表明(图 6), 随着温度提高, 达到最高转化率(84%)时的流速也提高。在 30°C、37°C 和 45°C 下, 达到最高转化率的流速依次为 8.5 毫升/小时 ($\text{SV} = 0.38$), 10 毫升/小

时 (SV = 0.45) 和 12 毫升/小时 (SV = 0.54)。

3. 在不同温度下固定化细胞柱的稳定性: 在三根 2 × 7 厘米柱反应器中, 分别装入包埋 6 克湿菌体的固定化细胞 (表现活力 6062 单位/克细胞)。将 1 M, pH 8.5 的底物溶液分别于 30°C、37°C 和 45°C 下, 以达到最高转化率的流速 (转化率 82% 以上) 通过柱反应器。结果表明 (图 7), 在 37°C 和 45°C 柱反应器中的固定化细胞酶失活很快, 而在 30°C 的固定化细胞柱可稳定工作 30 天以上。

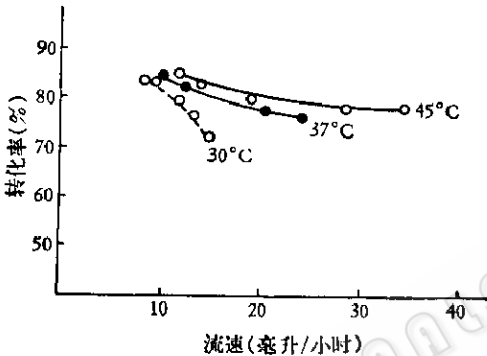


图 6 不同温度下底物流速与转化率的关系

4. L-苹果酸的连续生产: 将包埋 6 克湿菌体的固定化细胞 (表现活力 5318 单位/克细胞) 装在 2 × 7 厘米柱反应器中, 在 30°C 以每小时 8.5 毫升的流速通过 pH 8.5 的 1 M 底物溶液, 连续工作 2 个月, 固定化细胞酶活力没有下降。固定化细胞酶活力的半衰期为 95 天 (图 8)。

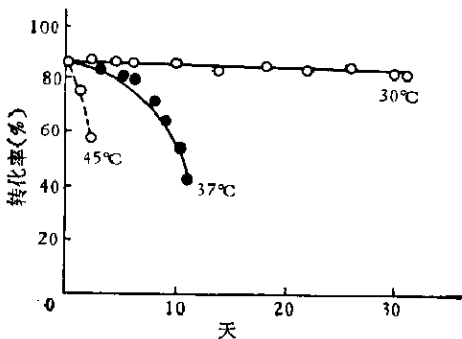


图 7 在不同温度下固定化细胞稳定性的比较

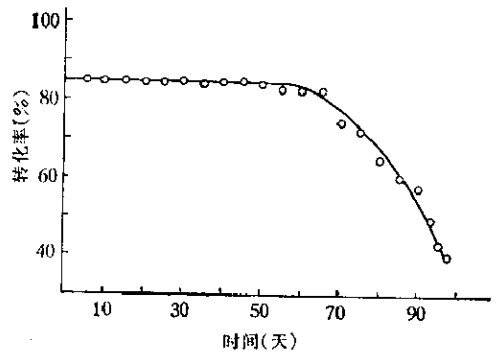


图 8 柱反应器工作期间转化率的变化

(五) L-苹果酸的制备和鉴定

1. 制备: 1 升固定化细胞柱流出液中加 38% 的盐酸 200 毫升, 在室温下放置 1 小时后过滤除去延胡索酸沉淀。滤液中加入约 72 克氢氧化钙, 调节 pH 6—7, 然后在 4—6°C 冰箱中放置 10 小时以上。过滤收集苹果酸钙, 50°C 下烘干, 约得到 160 克苹果酸钙, 收率为苹果酸铵的 90—94%。

取 160 克苹果酸钙, 悬浮于 1 升蒸馏水中, 加入 76 毫升硫酸 (98% 硫酸: 水 = 3:1), 搅拌反应完全后过滤除去硫酸钙沉淀。滤液通过 150 毫升 Amberlite IR-120 (H⁺ 型) 树脂柱, 用 200 毫升蒸馏水洗涤柱。然后, 将此阳柱流出液再通过 150 毫升 Amberlite IR-45 (OH⁻ 型) 树脂柱, 用 500 毫升蒸馏水洗涤柱子。

把通过树脂柱的 L-苹果酸在 60°C 下减压浓缩, 结晶, 过滤收集 L-苹果酸, 在

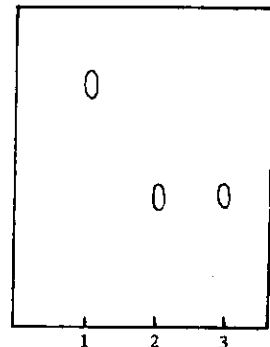


图 9 酶促反应产物纸层析图谱
1. 标准延胡索酸 2. 标准苹果酸 3. 产物

50℃ 下烘干得 50—55 克 L-苹果酸 (收率为苹果酸钙二水盐的 50% 左右)。母液可套用。

2. 鉴定: L-苹果酸的结晶成品于 5% 水溶液中测定比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = -2.2$ 。纸层析后显色斑点 $R_f = 0.46$, 与苹果酸标准品一致 (图 9)。熔点为 100—104℃, 结晶成品的含量为 99% 以上。

讨 论

聚丙烯酰胺凝胶包埋法是目前制备各种固定化细胞最常见的方法^[8]。在我们选用的三种包埋方法中, 用聚丙烯酰胺凝胶包埋法制备的固定化细胞酶活力和回收率最高。同时, 这种包埋方法简便, 所制得的固定化细胞机械性能较好, 适用于工业生产。

利用皱褶假丝酵母 *C.*₉₀ 的固定化细胞在碱性底物溶液中进行催化反应只产生 L-苹果酸的优点, 对产品的精制很有利。这与 Yamamoto^[9] 等报道产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagens*) 的固定化细胞酶催化底物得到的产物不同, 后者除产生 L-苹果酸外, 还产生不易与 L-苹果酸分开的琥珀酸, 因此, 他们要加胆汁提取物处理固定化细胞抑制琥珀酸的产生。

把液体石蜡发酵生产延胡索酸后的废菌体包埋于聚丙烯酰胺凝胶中用来生产 L-苹果酸, 一举两得。因此, 在一定量的

载体中尽可能多包埋一些湿菌体, 以得到较高酶活力的固定化细胞用于生产。我们把常规包埋 1 克湿菌体的聚丙烯酰胺凝胶用来包埋 3 克湿菌体, 得到了既有一定硬度又有一定弹性的固定化细胞, 机械性能良好。这样, 既节省载体, 又使固定化细胞装柱的体积明显减小。

由于皱褶假丝酵母 *C.*₉₀ 对温度很敏感, 在 37℃ 和 45℃ 柱反应器中稳定性很差, 而在 30℃ 柱反应器中稳定性很好。在转化率达到 82—85%, 底物溶液以 $SV = 0.38$ 的流速通过柱反应器的条件下, 可连续而又稳定地工作 2 个月, 固定化细胞酶活力的半衰期为 95 天。

参 考 文 献

- [1] Yamada, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**(11): 1563—1622, 1977.
- [2] 反丁烯二酸研究小组: *微生物学报*, **15**(1): 15—20, 1975.
- [3] Moxey, P.: *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, **35**(12): 56—59, 1964.
- [4] Szam, I. et al.: *Inter. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **6**: 260—265, 1972.
- [5] Chibata, I. et al.: *Appl. Microbiol.*, **27**(5): 878—885, 1972.
- [6] 福井作藏: *实验化学讲座*, 卷 25, (赤堀四郎编), 丸善株式会社, 1958, pp. 57.
- [7] Goodman, A. E.: *Anal. Chem.*, **29**: 283, 1957.
- [8] Durand, G. et al.: *Process Biochemistry*, **13**(9): 14—23, 1978.
- [9] Yamamoto, K. et al.: *European J. Appl. Microbiol.*, **3**: 169—183, 1976.

THE IMMOBILIZED CELLS OF *CANDIDA RUGOSA* POSSESSING FUMARASE ACTIVITY

Yang Lian-wan Zhong Li-chan

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The immobilized cells of *Candida rugosa* C₉₀ possessing fumarase activity were prepared by different methods, and the most active immobilized cells were obtained by entrapment in polyacrylamide gel.

The enzymatic properties of immobilized *Candida rugosa* C₉₀ cells were investigated and compared with those of the native cells. The effects of pH, temperature and bivalent metal ions on the reaction rate of both immobilized and native cells are the same. The heat stability of the immobilized cells was somewhat higher than that of the native ones. Bivalent metal ions such as Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ and Fe⁺⁺ could not protect the enzyme from

thermal inactivation.

The enzyme activity remained constant during 91 days of storage at 4—6°C.

The immobilized cell column can be used for continuous production of L-malic acid from 1 M fumarate at 30°C. When a solution of 1 M substrate (pH 8.5) was passed through immobilized cell column at a flow rate of space velocity (SV) = 0.38, the highest conversion rate 82—85% was attained. The immobilized cell column operated steadily for two months. Half-life of the fumarase activity of the immobilized cell column at 30°C was 95 days.