

固定化细胞生产D-异抗坏血酸的研究

钟晓红 尹光琳 林海

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200032)

近年来葡萄糖经微生物发酵制备2-酮基-D-葡萄糖酸(2-KDG)正日益受到重视。2-KDG是合成食品抗氧化剂—D-异抗坏血酸(即异维生素C)的重要前体。自1935^[1]年以来,国外对2-KDG的产生和发酵进行了广泛的研究^[2,3]。近几年来国内也进行了这方面的研究^[4]。但是通过固定化细胞进行发酵产酸的研究尚未见报道。

本文选用三种较实用的载体,分别包埋恶臭假单胞杆菌SCB905,通过对载体包埋细胞后的稳定性及产酸效果等研究,选用了海藻酸钠作为较理想的载体,并对海藻酸钠固定化细胞的生长,发酵代谢过程及半连续发酵过程进行了研究。同时对固定化的细胞形态作了一些探索。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 恶臭假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*) SCB905
2. 载体: 海藻酸钠 Alginate (Protan A/S, Drammen, Norway), K-卡拉胶 E-F-1 (中国科学院广州化学所产品), 脱乙酰几丁质 (Sigma产品)
3. 培养基
 - (1) 斜面培养基(%): 蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 牛肉膏 0.3, 琼脂 2.2, pH7.0。
 - (2) 种子培养基(%): 葡萄糖 1.0, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 1.0, 硫酸镁 0.1, 氯化钠 0.25, pH7.0。
 - (3) 发酵培养基(%): 葡萄糖 16.0, 尿素 0.1, 玉米浆 1.0, 碳酸钙 4.5, 磷酸二氢钾

0.06, 硫酸镁 0.04, pH7.0。

(二) 方法

1. 游离细胞的培养: 恶臭假单胞杆菌SCB905于种子培养基中, 28℃, 250r/min振荡培养18h, 培养液离心(4000r/min, 10min)收集湿菌体, 湿菌体生理盐水洗涤后制成1g/100ml的菌体悬浮液(约 2×10^7 cells/ml), 以5%的接种量移入发酵培养基中振荡培养(28℃, 250r/min)。
2. 固定化细胞的制备: 参照G.A.King等人^[5]和Gudmund等^[6]的报道, 得到海藻酸钠固定化细胞。卡拉胶固定化细胞的获得, 参照Tetsuya Tosa等的方法^[7]。参照K.D. Vorlop和J. Klein的方法^[8], 1.1%的脱乙酰几丁质与菌悬液以10:1的比例混匀喷入1%亚铁氰化钾中形成粒径为2.5mm的颗粒。

上述所得的固定化细胞按所含菌悬液占发酵培养基总体积的5%接种量, 置于种子培养基中增殖培养18h, 再投入新鲜的发酵培养基中发酵产酸, 一个周期48-72h。

一次发酵72h后, 取出固定化颗粒, 洗净, 转到新鲜发酵培养基中进行新一轮发酵, 如此周而复始, 反复进行。

3. 2-KDG总量测定: (1) 参照Stubbs等人^[9]的旋光法测定产酸量。(2) 转化碘量法^[10]; 用硫酸将2-KDG转化成异维生素C, 再以碘液滴定。(3) 依计算机统计处理旋光度, 葡萄糖浓度与2-KDG浓度之间的关系式而获得发酵液中的产酸量。

本文于1991年9月23日收到。

结果与讨论

(一) 不同载体固定化效果的比较

表 1 不同载体固定化效果的比较

载体	机械强度(g/cm)	菌体泄漏	平均2-KDG产率(6%,72h/批)	反复利用时间(h)
海藻酸钠	119	*	47.1	864
K-卡拉胶	326	*	42.2	720
脱乙酰几丁质	23.9	***	57.9	216
游离细胞	—	—	61.5	—

由上述三种载体制备的固定化细胞 28℃ 振荡培养后分析, 见表 1。

由表 1 可知, 海藻酸钠和卡拉胶两种载体

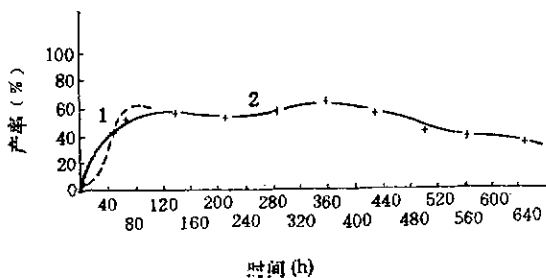


图 1 海藻酸钠固定化细胞的半连续发酵
1. 游离细胞 2. 固定化细胞

各方面的效果基本接近。由于海藻酸钠溶液制备方便, 不受温度控制, 因此比卡拉胶更有实用意义。而脱乙酰几丁质虽保持有较高的转化率, 但重复使用率太低, 没有使用价值。比较这三种载体与游离细胞的转化率可知, 固定化细胞能够接近游离细胞产酸量。同时, 在半连续发酵中, 2-KDG 产量能保持一定的稳定性。以海藻酸钠固定化细胞为例, 其重复使用时间达 1 个月以上(以转化率 30% 为最低限, 参见图 1)

(二) 海藻酸钠固定化细胞生长过程的形态分析

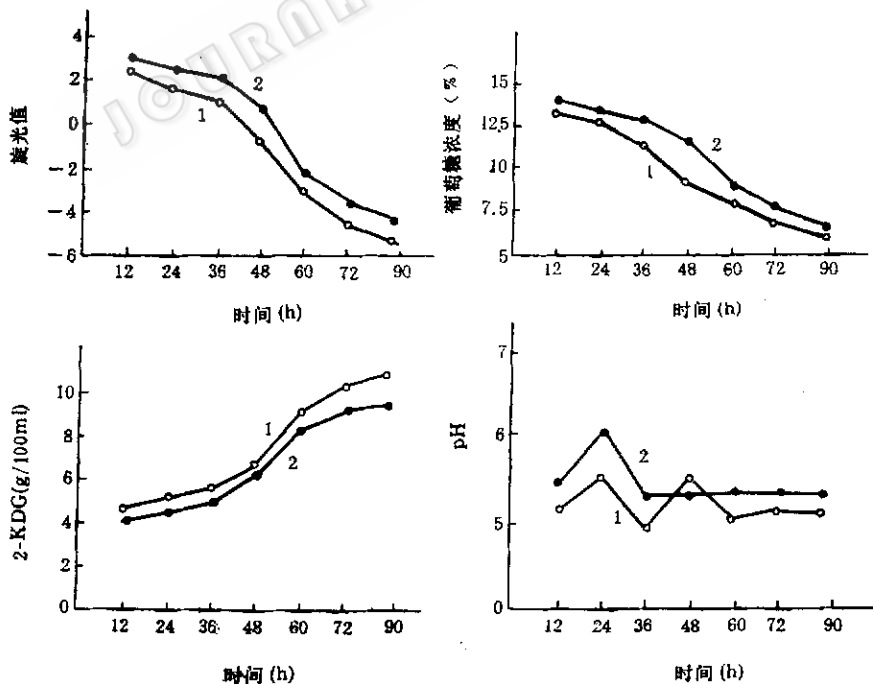


图 2 海藻酸钠固定化细胞生长及发酵代谢图谱
1. 游离细胞, 2. 固定化细胞

光学显微镜观察海藻酸钙固定化细胞的横切面可以看到细胞分布的变化。随着时间的增加,最初在凝胶内均匀分布的细胞逐渐集中,并趋向固定化颗粒的边缘,表明该菌生长代谢过程好氧,而由于凝胶的扩散限制作用,使凝胶表层有效营养成分最高,氧含量充足,既适合细胞生长,又有利于细胞分泌物代谢物质,

因此就在表层形成了高密度的细胞薄层。

(三) 海藻酸钙固定化细胞发酵代谢图谱

为了解 SCB905 固定化后的发酵全过程,跟踪测定葡萄糖消耗、2-KDG 产生、发酵液旋光值和 pH 值。游离细胞相应测定值对照如图 2 所示。

参 考 文 献

- [1] Bemhaner, K. and B. Gororlch: *Biochem*, 2:280-367, 1935.
- [2] Nunheimer, Th. D. and philips, T.: U. S. Patent, Vol. 3, pp. 255-093, 1964.
- [3] Miseuheimer, T. J. et al.: *Appl. Microoid*, 13:385, 1965.
- [4] 蒋明珠等: *生物研究通讯*, 2(3):31-34, 1984.
- [5] King, G. A. et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 34:1085-1095, 1989.
- [6] Gudmund Skjnk-Brak: *Biotechnology and Bioengineering*, 33:90-94, 1989.
- [7] Tetsuya Tosa: *Biotechnology and Bioengineering*, 21: 1697-1703, 1979.
- [8] Vorlop, K. D. and J. Klein: *Methods in Enzymology*, Vol.135.
- [9] Stubbs, J. J. et al.: *Ind. Eng. Chem.*, 32: 1626-1631, 1940.
- [10] 梁改芹等: *微生物学通报*, 14(6):246-248, 1987.

Immobilization of *Pseudomonas putida* Cell for Production of 2-keto-D-gluconic Acid

Zhong Xiaohong Yin Guanglin Lin Hai

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Science, Shanghai 200233)

Yuan Zhongyi

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Immobilized cells offer an interesting alternative to the conventional fermentation. The cells of *Pseudomonas putida* SCB905 were grown in a seed culture medium at 28°C for 18h, harvested by centrifugation and used for immobilization studies. Among entrapment techniques of alginate-CaCl₂, carrageenan-KCl and chitosan-K₃[Fe(CN)₆] systems, the Ca-alginate was the best procedure to consider from the points of mechanical strength, maintenance of cells, productivity and operational stability. There is no difference between the morphology of the immobilized cells and that of the free cells under electron microscope. In semi-continuous fermentation, immobilized cells were used over one month.

Key words Immobilization of *P. putida* cell; 2-keto-D-gluconic acid; D-iso-ascorbic acid