

在 50L 反应器中用固定化黑醋杆菌增殖 细胞转化山梨醇为山梨糖的研究

张洪泉 曹淑娟 安海平 杨励生 吴振萍

(江苏省食品发酵研究所, 南京)

冯婉华 魏国兰 钟华明

(南京制药厂)

近几年来已有许多文献报道采用适当的固定化技术制成固定化活细胞, 不仅其中的细胞存活, 而且能够生长繁殖^[1-13]。它的优点是: (1)适用多酶体系产品的生产, 如乙醇、谷氨酸等; (2)由于细胞的固定化增加了细胞密度, 加快了反应速度; (3)简化了培养液的组成成份, 如固定化 *Bacillus* sp. 活细胞连续产杆菌肽过程中只需添加蛋白胨; (4)使发酵醪中不含或含少量菌体, 这给产物的纯化带来方便, 提高了收

率, 降低了成本; (5)效率高, 固定化活细胞可以长期连续使用数十次。因此, 它在某些发酵产品的生产上具有一定的实用价值。但是, 从已发表的资料来看, 对兼性厌氧菌活细胞的固定化研究较多, 而对需氧菌活细胞的固定化研究成功的尚少, 其主要困难是需氧菌活细胞的固定化方法和氧的传递问题。

本工作得到王宜庆、胡安身两位先生的热忱指导, 深表感谢。

本文在利用海藻酸钙凝胶固定化黑醋杆菌活细胞(以下简称凝胶球)小试验基础上,进行50L反应器规模的转化山梨醇为山梨糖工艺的研究,现将结果报告如下。

材料和方法

1. 海藻酸钠, JHN 型, 温州助剂厂出品。
2. 氯化钙, 工业品。
3. 固定化黑醋杆菌 (*Acetobacter melanogenum*) 增殖细胞的制备: 在无茵条件下, 取一定量的二级培养菌液, 加入 5L 已灭菌的 2.5% 海藻酸钠溶液中, 充分混匀, 用 JGB-2 型调速乳胶泵通过带有 $\phi 2\text{mm}$ 细管的喷淋头, 将溶液滴入已灭菌的 CaCl_2 溶液中, 形成直径 3—4mm 的凝胶球, 置于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 保温交联 1—2 小时, 然后用无茵空气压出 CaCl_2 溶液, 凝胶球备用。
4. 反应器: 采用 50L 标准不锈钢发酵罐, 具有二组平叶搅拌机, 单管通风, 内有挡板, 另按装 $\phi 1\text{mm}$ 筛孔不锈钢出料器, 转速 200r/min。
5. 培养基和转化: 除另有说明外, 均用生产配方。先将凝胶球用无茵水洗一次, 用无茵空气压入反应器, 然后再将已灭菌的冷却至 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 的培养基压入反应器, 控制一定通气量进行批式转化。
6. 测定: 转化率按伯川氏改良法, 蛋白质按凯氏定氮法。

结果与讨论

(一) 凝胶球内细胞的观察

分别对空白、增殖前和增殖后的凝胶球进行切片显微观察, 可明显发现球内菌密度由里向外逐渐增加。从照片 1—2 可见增殖培养后球内菌数明显增多。

(二) 凝胶球的含菌数

将凝胶球进行增殖培养, 其条件为温度 $34—36^\circ\text{C}$, 振幅 7cm, 频率 120 r/min, 时间 24 小时, 其它条件同前述。增殖完毕, 量取 50ml 洗涤过的凝胶球, 加无茵水至 100ml, 在碱性条件下匀浆 15 min, 然后将含菌液分别用计数器法测总菌数, 用平板培养法测定活菌数。

1. 凝胶球增殖前后的含菌数: 经包埋交联后的凝胶球和增殖培养 24 小时后的凝胶球含菌数见表 1。

2. 正常转化时凝胶球的含菌数: 用凝胶球转化山梨醇, 当转化率达到 95% 以上时, 测定球内和球外山梨糖液中的含菌数, 并和游离菌发酵进行对照, 结果见表 2。

由上结果可知, 增殖后的凝胶球含菌数约为增殖前的 100 倍。正常转化时凝胶球内活菌数是一般游离菌发酵法的 10 倍左右。

(三) 海藻酸钠浓度对凝胶球强度的影响

分别用 2.0%、2.5% 和 3.0% 浓度的海藻酸

表 1 增殖前后凝胶球的含菌数

批号	增 殖 前		增 殖 后	
	总菌数(个/ml 球)	活菌数(个/ml 球)	总菌数(个/ml 球)	活菌数(个/ml 球)
1	1.96×10^8	2.15×10^8	2.06×10^{10}	2.56×10^{10}
2	4.44×10^8	4.55×10^8	1.12×10^{10}	2.07×10^{10}

表 2 正常转化时凝胶球内外的含菌数

批号	凝胶球内(个/ml 球)		球外发酵液中总菌数(个/ml)	转化率(%)
	总菌数	活菌数		
1	1.0×10^{10}	1.55×10^{10}	1.4×10^7	103.3
2	1.1×10^{10}	1.89×10^{10}	6.0×10^7	101.8
游离菌			1.31×10^9	100.0

表 3 不同海藻酸钠浓度制成的凝胶球使用寿命

转化率(%) 批式转化次数	浓度(%)	2.0	2.5	3.0
		1	99.0	97.5
2	97.2	98.6	101.4	
3	98.1	98.5	102.0	
4	99.8	102.1	99.9	
5	破碎	102.2	102.5	
6	—	98.0	102.0	
7	—	96.0	101.0	
8	—	102.3	101.2	

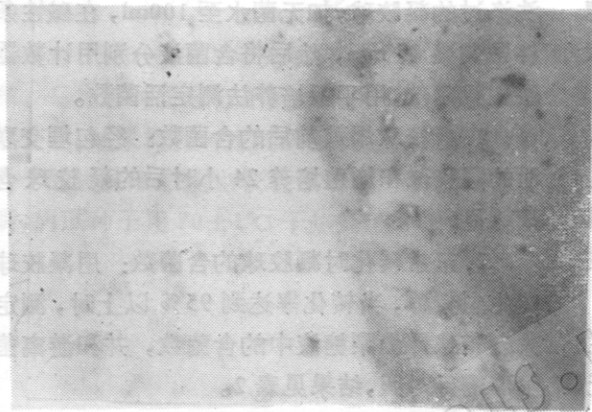


图 1 增殖前凝胶球切片(10×40×7)
(图中黑点为被包裹的活菌体)

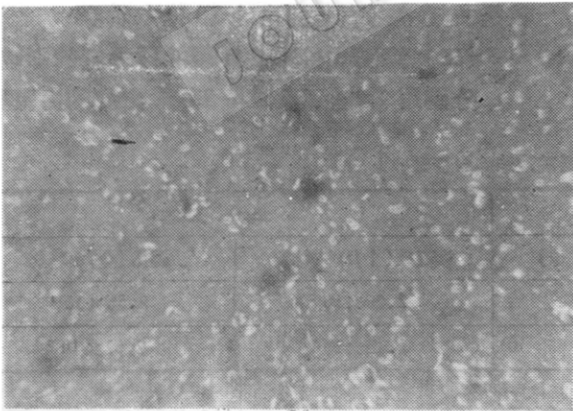


图 2 增殖后凝胶球切片(10×40×7)
(白圈中黑点为活菌体)

钠制成凝胶球,进行批式转化试验,观察凝胶球使用寿命。条件:山梨醇浓度 20%,pH5.4,装液量 30l,温度 $36 \pm 1^\circ\text{C}$,风量 1:1 v/v/m。结果见表 3。

由表 3 可知,海藻酸钠浓度对凝胶球强度影响很大,当浓度为 2.0% 时,在 200 r/min 搅拌条件下反复使用 4 次,很快破碎了。而浓度为 2.5~3.0% 的凝胶球强度高,可达 8 次,转化率 95% 以上。

(四) 凝胶球的大小对转化率的影响

制备直径分别为 1.5—2.0、3.0—4.0 和 4—5 mm 的凝胶球,进行批式转化,结果见表 4。

表 4 凝胶球大小对转化率和稳定性的影响

凝胶球直径(mm)	1.5—2.0	3.0—4.0	4.0—5.0
第一天转化率(%)	93.1	100.4	103.1
第二天转化率(%)	104.0	104.0	108.3
达到转化率 96% 的维持考核天数	54 天以上	54 天以上	39 天

以上结果说明球直径为 1.5—2 mm 较好,其原因和比表面积有关,在相同条件下,小球比表面积大,传质优于大球,同时球的粒径直接影到底物或产物在球内的扩散阻力,内部扩散阻力小,对酶的作用有利,表现出高的反应活性。因此能维持长时间的正常转化,稳定性高。但从实际考虑,以直径 3—4 mm 为宜。

(五) 交联 pH 对凝胶球强度的影响

以不同 pH 的 CaCl_2 溶液对海藻酸钠进行交联。试验结果表明,当 $\text{pH} \geq 7$ 时,凝胶不成球形,强度很差。当 pH 4—5 时,凝胶球强度

表5 减少酵母膏用量对转化率的影响

批式转化次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
酵母膏用量	原量	''	''	''	''	''	''	''	''	''	减半	''	''	''	''
转化率(%)	106.0	99.0	108.6	100.2	109.6	106.8	103.6	103.2	106.2	103.1	101.0	105.7	107.0	100.6	101.1

表6 转化时间与转化率的关系

次数	1	2	3	4	5	6	7	8
时间(h)	35	22	26	14	15	24	23	24
转化率(%)	100.8	101.4	102.0	99.9	106.5	106.0	101.7	101.2

好,在 50 L 罐里可使用 9 次。

(六) 固定化黑醋杆菌增殖细胞转化山梨醇的过程曲线

在 50 L 反应器中分别对细胞总数相同的凝胶球和游离细胞进行相同条件的转化试验,视不同时间测定相应的转化率和 pH,反应条件同前。转化山梨醇为山梨糖的过程曲线见图 3。

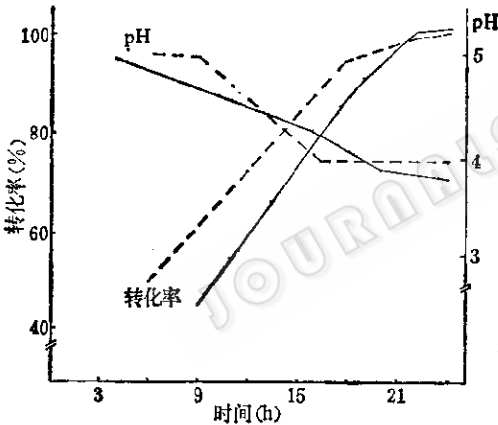


图3 固定化细胞和游离细胞转化山梨醇过程的 pH 和转化率变化曲线
——固定化细胞
----游离细胞

由图 3 可见,在相同转化时间内,细胞总数相同的凝胶球和游离菌转化山梨醇为山梨糖的脱氢氧化趋向相同,但在前期,前者较后者慢,在后期,凝胶球上升快。而 pH 变化在 16 小时前,凝胶球又较游离细胞降得慢,在 16 小时后,前者又比后者降得快,这与转化率变化相符合,即脱氢加快,转变成山梨糖多,转化率升高,而 pH 降低。由此可见,在发酵前期,凝胶球内溶

解氧的浓度较发酵液中低,因为前者要克服固-液屏障。但是,当凝胶球里的溶解氧达到一定浓度时,由于细胞密度高反应快,山梨糖生成多,所以后期转化率较游离发酵升得快。

(七) 减少酵母膏用量对转化山梨醇的影响

在固定化增殖细胞时,减少传代、保持存活是维持稳定性的关键,它不需要固定在凝胶球内的活细胞大量繁殖,只需要维持生命代谢活动的氮源即可。我们将转化用的培养基酵母膏用量比游离发酵的三级发酵培养基用量减少一半,用它进行批式连续转化,结果见表 5。

从表 5 可以看出,用凝胶球转化山梨醇,三级转化液的酵母膏用量减半,转化率正常。

(八) 转化时间与转化率的关系

在使用凝胶球转化山梨醇的过程中,当批式连续转化次数增多,转化时间是否要延长?

第一次使用周期较长,这是由于增殖后的活细胞量不足所致。以后,当凝胶球内达到一定活细胞数时,发酵周期缩短。由结果可见,只要维持一定的活细胞量,则转化时间变化范围不大(表 6)。

(九) 50 L 反应器批式连续转化结果

用凝胶球在 50 L 反应器内进行批式连续转化,结果见表 7。

由表 7 可见,正常转化均可使用 8 次以上,最高达 15 次。

(十) 成本方面的一些估算

本试验的一些成本估算系以凝胶球在 50L 罐中按研究所内试验的实际原材料消耗和所用

表7 七批转化的使用次数和转化情况

转化率% 批次	次数														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	99.0	97.2	98.1	99.8	98.7	98.7	99.3	100.3	98.7						
2	100.4	98.4	101.7	103.6	99.5	行修									
3	108.8	100.2	101.3	99.6	99.6	101.9	97.0	99.5	100.6						
4	100.8	101.4	102.0	99.9	106.5	106.0	101.7	101.2							
5	98.0	84.0	99.3	102.2	101.4	101.4	染菌								
6	100.8	101.4	102.0	106.5	99.9	106.0	101.2	99.5							
7	106.0	99.0	108.6	100.2	109.6	106.8	103.6	103.2	106.2	103.1	101.0	105.7	107.0	100.6	101.1

设备的电耗,进行固定化菌和游离菌两种工艺的平行试验比较。因为本试验以固定化菌的活性稳定性和凝胶球的机械强度为主要研究内容,所以从山梨糖生成最终产品维生素C的后道工序是与厂里的大生产合在一起的,没有单独做后道提取收率的工作。但从固定化菌生产的山梨糖来看,其菌体蛋白质含量低,将有利于提高后道收率。

采用固定化增殖细胞新工艺,虽然在正常转化时可省去游离菌工艺的一级、二级种子培养和三级发酵培养基酵母用量减半,但是在固定活菌工艺中要消耗固定化的材料和电耗,所以当使用8次时固定化菌工艺每公斤山梨糖消耗的原材料费反比游离工艺多0.01元,但在电耗方面可降低0.20元,实际可获利0.19元,即每生产1吨山梨糖可降低成本190元,节电2000度。若可稳定使用15次,则新工艺每公斤山梨糖消耗原材料费可降低0.16元,电耗降低0.22元,一共获利0.38元。即每生产1吨山梨糖可降低成本380元,节电2200度。

由于试验所得山梨糖少,不能在大生产设备中单独做后道提取收率,但从新工艺所得山梨糖液菌体蛋白质较游离发酵少27%来看,提高后道提取收率是有潜力的。

利用海藻酸钙固定化增殖细胞进行好气发酵,试验证明是可行的。固定化的细胞密度大于常规发酵,因此需氧量必然增大,特别是在增殖初期,溶解氧必须克服气-液-固界面阻力才能达到凝胶内部被细胞所利用,因此,这时的通气量是整个发酵过程中最大的,否则增殖将是

不完全和缓慢的,有碍于整个发酵。结果表明,在2.5%海藻酸钠,0.2M CaCl₂溶液,pH 4—5,温度30℃条件下,制成的活细胞凝胶球可连续使用8次以上,最高达15次,转化率达96%以上。经平行试验成本方面的一些估算和分析,采用固定化新工艺生产山梨糖,较游离发酵工艺每吨可降低成本190元,若稳定使用15次以上,则每吨山梨糖可降低成本约380元。

本试验中凝胶球使用寿命尚不理想,其原因一是海藻酸钙凝胶中的钙可被发酵液中的某些离子所置换,造成凝胶机械强度减小,这有待在制备工艺和配方中加以改进。

参 考 文 献

- [1] Ohlson, O. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20(8): 1267—1284, 1978.
- [2] Martín, C. A. and D. Perlman: *ibid*, 18(2): 217—237, 1976.
- [3] Morikawa, Y. et al.: *ibid*, 22(5): 1015—1023, 1980.
- [4] Wada, M. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58(4): 327—331, 1980.
- [5] Chua, J. W. et al.: *ibid.*, 58(2): 123—127, 1980.
- [6] Wada, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22 (6): 1175—1188, 1980.
- [7] Yamamoto, K. et al.: *ibid*, 22(10): 2045—2054, 1980.
- [8] Makiguchi, N. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58 (27): 167—169, 1980.
- [9] Cheetham, P. S. J. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21 (12): 2155—2168, 1979.
- [10] Makiguchi, N. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58 (4): 333—337, 1980.
- [11] Tosa, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21 (10): 1697—1709, 1979.
- [12] Kolt, F. B.: *Process Biochem.*, 19(1): 7—11, 1984.
- [13] Black, G. M. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 26(9): 1003—1005, 1984.