

固定化黄曲霉生产 L -苹果酸的研究^{*}

胡纯铨

(华侨大学化工学院, 泉州 362011)

摘要 报道采用海藻酸钠包埋法, 以制备固定化黄曲霉生产 L -苹果酸. 确定最佳固定化条件和最适固定化细胞发酵条件. 这些条件分别为海藻酸钠浓度 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 浓度 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙烯多胺和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛交联, 菌体浓度 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖浓度 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 起始 pH 值为 $6.0 \sim 7.0$, 培养温度 32°C , 固定化细胞质量/培养基体积比例为 $15/50$. 最终结果, 固定化细胞可经过重复连续 8 批次发酵试验, 颗粒活性和机械强度及稳定性仍好, 平均产酸率达 $27.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 以单位体积固定化细胞计算的平均产酸速率达 $15.0 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$.

关键词 固定化细胞, 黄曲霉, 苹果酸发酵

分类号 TQ 921

固定化酶和固定化细胞是国外六七十年代发展起来的一项新的生物技术, 与传统方法相比, 利用固定化细胞生产微生物产品具有很多优势. 例如, 固定化细胞可反复使用, 发酵过程易于控制, 后提炼工艺简化及降低成本和可实现连续发酵等. 因此, 固定化技术代表了现代发酵技术的发展方向, 它已广泛应用了工业、医学、化学分析、环境保护、能源开发等各个方面. 在发酵领域中, 固定化技术已应用于乙醇、氨基酸、有机酸、酶制剂和抗生素等产品的生产. L -苹果酸主要应用于食品工业, 可作为一种优良的酸味剂和保鲜剂. 在临床上, 可用于治疗贫血、肝功能不全和肝衰竭等疾病. 它还是一种高效除臭清洁剂和饲料添加剂, 并能改善水泥性能和汽车排气质量. 因此, 它的应用前景十分广阔^[1,2]. 随着固定化技术的兴起和发展, 人们将该技术引入 L -苹果酸发酵的研究中. 1974 年 Yamamoto 等人^[3]采用聚丙烯酰胺固定化产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) 进行 L -苹果酸的生产, 1982 年 Takata 等人^[4]报道卡拉胶固定化黄色短杆菌(*Brevibacterium flavus*) 延胡索酸酶(又名富马酸酶)稳定性提高的研究, 等等. 但到目前为止, 固定化技术生产 L -苹果酸主要集中于对细菌微生物的固定化作用, 有关利用固定化丝状真菌真正从事 L -苹果酸发酵的研究尚少见到报道. 本工作采用海藻酸钠对黄曲霉进行包埋, 并开展固定化细胞 L -苹果酸发酵的研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

经菌种筛选获得几株黄曲霉 L -苹果酸产生菌, 再通过紫外线、氯化锂和亚硝基胍复合诱

变选育, 得到产酸水平相对较高的 H-98 菌株。

1.2 培养基

斜面保藏培养基为马铃薯葡萄糖培养基。种子培养基同斜面保藏培养基, 但不加琼脂。发酵培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为葡萄糖 100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, KH_2PO_4 0.1, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, MnSO_4 0.1, NaCl 5×10^{-5} , CaCO_3 70(分开灭菌), pH 自然。

1.3 细胞固定化方法⁶⁾

采用海藻酸钠包埋法, 制备固定化黄曲霉。取经种子培养的湿菌体, 与海藻酸钠溶液均匀混合。混合物通过内径 1.5 mm 胶管在恒流泵带动下滴入 CaCl_2 溶液中, 制得 3 mm 左右的圆球形固定化细胞。固定化颗粒在 CaCl_2 溶液中钙化 2 h, 然后取出用蒸馏水洗涤, 接着用聚乙炔多胺 (PEPA) 溶液搅拌处理 2.5 h。水洗后, 用戊二醛交联 2 min, 最后用蒸馏水洗涤备用。

1.4 固定化细胞的培养

将制备好的固定化黄曲霉接入装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶内, 摇床培养, 温度 30 °C, 转速 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 周期 6 d。

1.5 分析方法

L-苹果酸的定性测定, 采用纸层析法^{0,2)}。L-苹果酸的定量测定, 则采用 2,7-萘二酚法⁶⁾。其他测定方法⁷⁾, 可用蒽酮法测定糖, 用酸度计测 pH, 用称重法测定菌体量和用凝胶强度测定器测定将凝胶压破时所需的压力以表示凝胶强度等。

2 结果

2.1 固定化条件的确定

2.1.1 细胞浓度的影响 在通常情况下, 菌体浓度越大, 底物转化为产物的速度越快。为了考察菌体浓度对固定化细胞产酸活性和颗粒凝胶强度的影响, 分别称取不同质量的湿菌体, 与等体积 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的海藻酸钠溶液混合, 按前述方法制成不同细胞浓度的固定化细胞, 进行产酸试验, 结果总结于表 1。从表中可以看出, 当细胞浓度 (C_c) 不超过 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 固定化细胞的产酸率 (C_{LMA}) 和相对活性 (A_R) 都随

细胞浓度的增大而提高, 且都具有较高的机械强度 (MS); 当细胞浓度超过 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 产酸率和相对活性反而随细胞浓度的增加而降低, 机械强度也相对较低。在实验过程中观察到, 当细胞浓度过高时, 易造成海藻酸钠和菌体过早出现凝聚, 影响固定化细胞的制作。 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的细胞浓度比 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的细胞浓度虽产酸率略高, 但凝胶的机械强度比后者低, 所以最后确定细胞浓度为 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 海藻酸钠浓度的影响 分别于等体积不同浓度的海藻酸钠溶液中加入等量的黄曲霉

表 1 细胞浓度对固定化细胞产酸和机械强度的影响^①

$C_c / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{LMA} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_R / (\%)$	MS
30	18.1	46.3	+++
60	19.4	49.6	+++
90	23.2	59.4	+++
120	24.0	61.4	++
150	16.6	42.5	+
180	15.3	39.1	+

① 以 1 L 固定化细胞含有的湿细胞质量表示细胞浓度; 1 L 发酵液中含有的 L-苹果酸质量表示产酸率; 相对活性 = 固定化细胞产酸率 / 游离细胞产酸率 $\times 100\%$; “+” 越多, 表示机械强度越大

湿菌体,使凝胶中的细胞浓度为 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,按前述方法制备固定化细胞($C_{\text{CaCl}_2} = 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),并进行发酵产酸,以考察海藻酸钠浓度(C_A)对固定化细胞产酸活性和凝胶强度的影响,结果如表2所示.当海藻酸钠浓度在 $15 \sim 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时,固定化细胞的机械强度随载体浓度的增加而提高;当海藻酸钠浓度超过 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,固定化细胞的机械强度反而随载体浓度的增加而降低.在实验过程中可注意到 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 海藻酸钠制得的固定化细胞虽然坚硬,但缺乏弹性而易裂.同时,这两种浓度制备的固定化细胞的产酸活性较低.这可能与海藻酸钠浓度较高、凝胶网格通透性降低从而增加传质阻力有关.用 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 载体浓度制备的固定化细胞活性均较高.从固定化细胞使用的重复性和长期性特点考虑,都要求固定化颗粒有足够的强度.因此,选择 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 海藻酸钠作为固定化载体.

2.1.3 CaCl_2 浓度的影响 将一定量湿菌体和一定体积 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的海藻酸钠混匀,控制细胞浓度为 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别滴入不同浓度的 CaCl_2 溶液中,其他条件不变,按前述方法制备固定化细胞.然后进行发酵,以考察 CaCl_2 浓度对固定化细胞产酸和机械强度的影响,结果如表3所示.当 CaCl_2 浓度不超过 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 CaCl_2 浓度增加,固定化细胞的机械强度递增.当 CaCl_2 浓度达 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,制得的固定化细胞坚硬、无弹性,颗粒易破裂,显示整体机械强度差,且固定化细胞活性低,产酸率低.当 CaCl_2 浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,制得的固定化细胞产酸活性和机械强度均较理想,故选择 CaCl_2 浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

表2 海藻酸钠浓度对固定化细胞产酸和机械强度的影响

$C_A / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{\text{LMA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_R / (\%)$	MS
15	22.3	57.5	+
20	23.1	59.5	++
25	23.6	60.8	+++
30	21.1	54.4	++++
35	18.2	46.9	++
40	13.6	35.1	+

表3 CaCl_2 浓度对固定化细胞产酸和机械强度的影响

$C_{\text{CaCl}_2} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{\text{LMA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_R / (\%)$	MS
10	19.0	48.8	++
15	22.1	56.8	+++
20	23.5	60.4	++++
25	18.2	46.8	+++++
30	17.3	44.5	+++
40	16.7	42.9	+++

2.1.4 聚乙烯多胺和戊二醛浓度的影响 控制菌体浓度为 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,载体浓度为 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,按前述方法制备固定化细胞.分别用不同浓度的聚乙烯多胺(PEPA)和戊二醛(PDA)进行硬化处理,然后进行产酸试验,结果列于表4.从表中可以看出, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙烯多胺和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛组合处理最有效,使固定化细胞的产酸率和机械强度均有明显提高.

表4 聚乙烯多胺和戊二醛浓度对固定化细胞产酸和机械强度的影响^①

$C_{\text{PEPA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{\text{PDA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$					
	5		10		15	
	$C_{\text{LMA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	MS	$C_{\text{LMA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	MS	$C_{\text{LMA}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	MS
5	23.0	±	23.1	±	23.4	±
10	23.8	+	25.3	+++	24.3	++
15	23.4	±	23.8	+	24.0	+

① 表中用“±”符号,表示机械强度与对照组(未经聚乙烯多胺和戊二醛处理的固定化细胞)相等;用“+”符号,表示机械强度高于对照组

2.2 固定化细胞生产 L-苹果酸条件的确定

2.2.1 葡萄糖浓度对产酸的影响 选择最适固定化条件制备固定化细胞, 分别接入含有不同葡萄糖(G)浓度的发酵培养基中, 于 30 °C 发酵 6 d, 以考察葡萄糖浓度对产酸的影响, 结果见表 5. 葡萄糖浓度(C_G)在 40 ~ 80 $g \cdot L^{-1}$ 范围内, 产酸率(C_{LMA})和转化率(R_T)均随糖浓度的增加而提高, 且葡萄糖的利用较为彻底. 当葡萄糖浓度超过 80 $g \cdot L^{-1}$ 时, 产酸率和转化率随糖浓度的增加而降低, 发酵液中留有较多的残糖(RS). 根据以上结果, 选择 80 $g \cdot L^{-1}$ 葡萄糖作为发酵底物.

2.2.2 培养温度对产酸的影响 控制葡萄糖浓度(C_G)为 80 $g \cdot L^{-1}$, 在不同培养温度(θ)下进行产酸试验, 以考察温度对产酸的影响, 结果如图 1 所示. 发酵 4d 或 5d, 最适温度为 35 °C

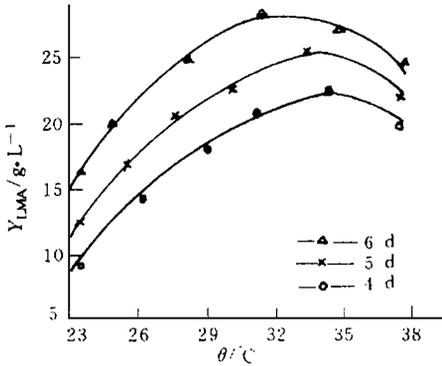


图 1 培养温度对固定化细胞产酸的影响

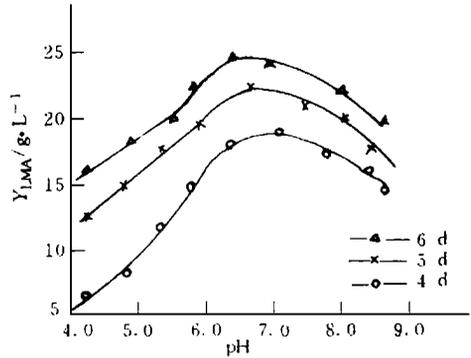


图 2 起始 pH 对固定化细胞产酸的影响

; 发酵 6 d, 最适温度为 32 °C, 此时产酸率达 28.0 $g \cdot L^{-1}$. 由于 4, 5 d 周期在最适温度下产酸率达不到 6 d 周期的水平, 所以控制 32 °C 作为固定化细胞的培养温度.

2.2.3 起始 pH 对产酸的影响 发酵培养基灭菌前用 HCl 或 NaOH 调至不同的 pH 值, 分别接入等量的固定化细胞, 在 32 °C 下发酵. 然后, 分别测定 4, 5 d 和 6 d 时发酵液中的苹果酸含量(C_{LMA}), 结果如图 2 所示. 固定化细胞的最适 pH 范围为 6.0 ~ 7.0.

2.2.4 固定化细胞质量与发酵培养基体积不同比例(M/V)对产酸的影响 在前面的实验中均采用 15 g 固定化细胞投入 50 mL 培养基中进行产酸发酵. 为了考察固定化颗粒投入量对产酸的影响, 设定一系列固定化细胞质量(M)/培养基体积(V)不同比例(M/V)的发酵体系进行产酸实验, 结果列于表 6. 由表中可见, 在同一培养周期(t)内, 15/50 的比例最理想. 在每一

表 5 葡萄糖浓度对固定化细胞产酸的影响

$C_G/g \cdot L^{-1}$	$C_{LMA}/g \cdot L^{-1}$	$C_{RS}/g \cdot L^{-1}$	$R_T/(%)$ ①
40	10.5	0	35.2
60	20.2	0.8	45.7
80	26.7	6.6	48.7
100	25.0	21.0	42.4
120	20.3	42.5	35.1
140	16.8	58.6	27.6

表 6 M/V 比例对产酸($g \cdot L^{-1}$)的影响

M/V	t/d		
	4	5	6
5/50	12.2	16.7	21.1
10/50	13.2	18.0	22.6
15/50	20.1	23.0	28.1
20/50	14.6	20.6	23.5
25/50	14.1	19.3	22.4

① 所生成 L-苹果酸对消耗葡萄糖的摩尔转化率

分别超过 10/15 比例中 5, 6 d 的产酸率. 然而, 超过 15/50 比例时, 提高固定化颗粒投入量并未能缩短周期和提高产酸率. 因此, 在 50 mL 培养基中投入 15 g 固定化细胞最为理想.

2.3 固定化细胞连续多批次发酵

按前面确定的最佳固定化条件和最适产酸条件, 进行固定化细胞重复连续多批次发酵, 以考察固定化细胞生产 *L*-苹果酸的稳定性. 操作时, 将固定化细胞投入发酵培养基, 发酵周期 6 d. 每批发酵结束后取出固定化颗粒, 在同样培养基中和培养条件下进行下一批发酵. 表 7 总结连续 8 批次发酵的实验结果, 历时近 50 d. 所得最高产酸率为 $29.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均产酸率为 $27.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;

以单位体积固定化细胞计的最高产酸速率为 $16.2 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, 其平均产酸速率为 $15.0 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, 显示固定化颗粒活性稳定性高. 另外, 在连续 8 批次发酵过程中, 固定化颗粒未出现形状和强度的变化, 显示颗粒物理性质的稳定. 因此, 所制备的固定化细胞适合进一步探索更多批次的发酵及连续发酵.

3 讨论

本工作采用海藻酸盐包埋黄曲霉湿菌体制备固定化细胞生产 *L*-苹果酸. 固定化条件摸索实验表明, 颗粒机械强度是凝胶弹性和硬度的综合效果. 弹性过大, 颗粒易变形; 硬度过大, 颗粒易裂开. 同时, 实验结果显示在这两种情况下, 菌体的产酸率都明显下降. 这可能因为较高浓度海藻酸钙制备的固定化细胞的凝胶网格通透性差, 增加了培养液中底物和氧通过凝胶网格传递到菌体表面的阻力. 另外, 一般而言, 在其他条件相同的情况下, 菌体浓度越高, 底物转化为产物的速度越快. 然而, 表 6 的实验结果揭示, 当固定化细胞/培养基比例超过 15/50 时, 产酸率却随两者比例的提高而下降, 这其中可能与通气量有关.

经过固定化条件和发酵条件的优化, 固定化细胞的产酸水平有明显提高. 经过重复连续 8 批次发酵, 颗粒产酸活性和机械强度稳定性好, 这与适当浓度的聚乙烯多胺和戊二醛对固定化细胞的稳定性处理有关. 另外, 也可能与发酵液中有较高浓度的 CaCO_3 , 发酵产物也为 *L*-苹果酸钙盐, 均有一定浓度的 Ca^{2+} 贡献有关.

目前固定化工艺生产 *L*-苹果酸, 主要依靠含有高活性富马酸酶的细菌类微生物将富马酸经一步加水反应转化为 *L*-苹果酸, 如 Yamamoto 和 Takata 等人^[6,4]采用的方法. 不过, 这种工艺以富马酸为原料, 原料成本较高. 基于这种情况, 本工作尝试将发酵糖质原料的 *L*-苹果酸产生菌黄曲霉^①, 进行固定化并开展产酸试验, 取得较理想的实验结果. 即固定化黄曲霉具

表 7 固定化细胞连续多批次发酵结果^①

批次	$C_{LMA}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	R_L		$R_T/(%)$
		$R_V/\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$	$R_C/\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$	
1	24.8	4.1	13.8	42.0
2	25.3	4.2	14.1	45.1
3	28.3	4.7	15.7	48.3
4	29.2	4.9	16.2	49.6
5	28.0	4.7	15.6	47.5
6	27.0	4.5	15.0	48.4
7	26.7	4.5	14.8	46.8
8	26.3	4.4	14.6	44.1
平均值	27.0	4.5	15.0	46.5

① R_V, R_C 分别表示以发酵器工作容积计、固定化细胞堆体积计产 *L*-苹果酸的速率($\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$)

有较高的产酸率和较稳定的产酸活性, 适合进一步探索更多批次的发酵及连续发展. 迄今为止, 有关利用丝状真菌复杂的多酶反应体系转化糖类为 L-苹果酸的固定化工艺, 其研究尚少. 因此, 本研究工作颇有理论和实践意义.

参 考 文 献

- 1 胡纯铿, 陈哲超, 施巧琴等. L-苹果酸产生菌 *Aspergillus flavus* HLD-12 产酸条件的研究. 福建师范大学学报(自然科学版), 1994, 10(2): 75~80
- 2 胡纯铿. L-苹果酸产生菌黄曲霉 *Aspergillus flavus* H-98 发酵特性的研究. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 19~22
- 3 Yamamoto K, Tosa T, Yamashita K, et al. The production of L-malic acid by *Brevibacterium ammoniacogenes* immobilized with polyacrylamide gel. Eur. J. Appl. Microbiol., 1976, (3): 169~175
- 4 Takata I, Kayashima K, Tosa T, et al. Improvement of stability of fumarase activity of *Brevibacterium flavum* by immobilization with κ -carrageenan and polyethyleneimine. J. Ferment. Technol., 1982, 60(5): 431~437
- 5 严复, 曲立民, 全夙雯等. 交联海藻酸钙固定化酵母的制备及其化学稳定性的研究. 生物工程学报, 1985, 1(1): 81~82
- 6 Goodban A E. A method for rapid determination of L-malic acid. Anal. Chem., 1957, 29: 283~287
- 7 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1985. 30~31

Immobilizing *Aspergillus flavus* for Producing L-Malic Acid

Hu Chunkeng

(College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract For producing L-malic acid by immobilized *Aspergillus flavus*, the method of alginate entrapping is adopted to immobilize *Aspergillus flavus*. The optimal conditions for both the immobilization and the fermentation of immobilized cells are determined respectively as follows: an alginate concentration of $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a CaCl_2 concentration of $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a cross linking of $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ polyvinyl polyamine with $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pentyl di-aldehyde, a thallus concentration of $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; a glucose concentration of $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, an initial acidity of pH 6.0~7.0, a culture temperature of 32°C , a ratio of 15 g immobilized cells to 50 ml culture medium. As the final results, eight batches of repeated and continuous fermentation tests reveal that the immobilized cells keep good grain activity and mechanical strength and stability, the mean yield of L-malic acid acid approaching $27.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, and the average L-malic acid producing rate per unit volume immobilized cells approaching $15.0 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$.

Keywords immobilized cells, *Aspergillus flavus*, fermentation of L-malic acid.