

聚乙烯醇复合凝胶固定化黑曲霉细胞研究

郑孝贤 孙 菲 张云开 梁智群

(广西大学生命科学与技术学院, 南宁, 530004)

摘 要 以聚乙烯醇(PVA)复合凝胶为载体, 利用冻融法固定产 α -葡萄糖转苷酶的黑曲霉 M-1 菌丝。由于 PVA 冻胶的多孔性, 高分子底物可以穿透载体与细胞酶直接反应。细胞经过固定化后, 机械性能和化学稳定性都得到提高, 可以重复多次对甲基 α -D-葡萄糖苷进行水解反应。同时对该自由细胞和固定化细胞进行酶学特性研究。发现 2 者的最适 pH 值同为 pH 6.0, 最适反应温度分别为 55℃、60℃。固定化细胞的 V_m 值为 2.84 $\mu\text{mol} [L \cdot \text{min} \cdot g]$, 大于自由细胞的 V_m 1.71 $\mu\text{mol} [L \cdot (\text{min} \cdot g)]$, 固定化细胞的 K_m (11.88 mmol/L) 小于自由细胞的 K_m (20.50 mmol/L)。细胞经固定化, 提高了细胞酶的操作、温度和贮藏稳定性。

关键词 聚乙烯醇(PVA)复合凝胶, 固定化细胞, 黑曲霉, 冻融法

聚乙烯醇(PVA)是亲水性载体, 因具有无毒性及制备方法简单等优点, 利用它作为包埋微生物和酶的载体一直是国内外研究的热点^[1~3]。

固定化细胞正受到越来越多的关注, 它可替代发酵, 与固定化酶来生产所需产品, 省去了酶的连续纯化步骤^[4,5]。固定化细胞可分为 2 种类型: 固定化死细胞和固定化活细胞。采用哪种类型固定化细胞主要考虑酶的来源(胞内酶或胞外酶)、细胞膜通透性、酶分子质量以及底物的产物结构^[5]。

异麦芽低聚糖被称为双歧因子, 对人类的健康有利。这种糖对哺乳动物小肠消化酶系有抗性, 但可以在大肠内发酵^[6~8], 能提高哺乳动物大肠内菌群的生长效率^[9,10]。异麦芽低聚糖的生产是以淀粉为原料, 经 α -淀粉酶水解为麦芽糊精后, 再由葡萄糖淀粉酶和 α -葡萄糖转苷酶共同作用而成。

降低异麦芽低聚糖生产成本的关键是降低葡萄糖转苷酶的生产成本。国外对固定化酶法生产异麦芽低聚糖进行了大量研究^[11~13], 但有关利用固定化细胞生产的研究较少, 国内未见报道。Yun 等人^[14]利用海藻酸钠法固定 *Aureobasidium pullulans* 细胞催化反应获得较高的异麦芽低聚糖产率(大部分为潘糖)。

文中以 PVA 为载体, 就本实验室保藏的菌种黑曲霉 M-1 进行固定化, 并对其理化性质进行了研究。该菌株产的 α -葡萄糖转苷酶主要为胞内酶, 由该菌株发酵得到的异麦芽低聚糖的含量已达到或超过日本药用品级产品指标(88.6%), 远远高于国内外同类产品^[15], 具有广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑曲霉 M-1: 广西大学生命科学与技术学院自主筛选产 α -葡萄糖转苷酶菌株; 过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、甲基 α -D-葡萄糖苷均购自 Sigma 公司; 4-氨基安替比林: 上海化学试剂公司。

聚乙烯醇(PVA, M_w 72 ku): 汕头市达濠精细化学品公司; 海藻酸钠: 上海化学试剂公司; 明胶: 上海化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种的培养

将菌种接种于斜面, 28℃ 培养箱中培养 72 h。接孢子于装有 200 mL 培养基的 500 mL 锥形瓶中, 28℃, 140 r/min 培养 72 h, 培养基成分为 3% 麸皮, 3% 淀粉。抽滤, 弃上清液, 用蒸馏水洗涤, 抽滤, 4℃ 保存。

1.2.2 霉菌的固定化

将发酵得到的菌体分别与 10% PVA 溶液、10% PVA + 0.24% 的海藻酸钠溶液、10% PVA + 0.4% 明胶溶液以一定的菌胶比(1:9)充分混合, 置入匀浆机搅拌成均一溶液, 倒入平板, 置入 -20℃ 冰箱, 反复冻融多次(冷冻 24 h 后取出平板, 溶解 0.5 h 再冷冻)。切成(3×3) mm 小块, 用 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)洗 3 次, 4℃ 下保存。

1.2.3 酶活力测定

取 0.2 mol/L、pH 5.0 乙酸缓冲液 9 mL, 菌丝体 0.5 g, 固定化酶 4 g, 加入 1 mL 的甲基 α -D-葡萄糖苷溶液(2%), 在 40℃ 水溶液振荡 1 h。取 1 mL 反应液测其葡萄糖含量^[16]。另取 9 mL 蒸馏水, 0.5 g

第一作者: 硕士研究生(梁智群为通讯作者)。

收稿日期: 2005-05-20, 改回日期: 2005-09-02

菌体,沸水浴中加热 10 min 灭酶活,加入 1 mL 的甲基 α -D-葡萄糖苷溶液(2%),其余方法同上,作空白管。酶活力定义为 40℃ 下酶作用于甲基 α -D-葡萄糖苷 1 h 生成 1 μ g 葡萄糖的酶量为 1 个活力单位。

2 结果与讨论

PVA 复合物是一种多羟基的强亲水分子材料,在固定化酶方面应用非常广泛^[1,3,17~20]。在固定化应用上一般有 4 种方法:(1)将 PVA 与酶混合后滴入饱和硼酸^[17]。(2)将 PVA 与酶混匀后一起滴入植物油中,然后用冻融法反复冻融^[1],或者将 PVA 滴入植物油形成小球后用羰基化试剂活化 PVA 的羟基,与酶共价结合^[2]。这 2 种方法做的固定化酶载体外硬内软,强度太小,而且在较酸环境下固定化酶的活性损失较大。(3)将 PVA 与酶低温冷冻处理,反复冻融,这样形成的载体强度高。(4)将 PVA 与惰性水溶性物质(如 PEG)进行光交联反应,取代聚乙烯醇上的羟基,以此来固定化细胞^[18,19]。本实验采用第 3 种方法,以制备颗粒状的固定化细胞。

表 1 不同载体的固定化细胞的酶活回收率

载体	表观活性 / $\text{u} \cdot \text{g}^{-1}(\text{gel})$	酶活力回收率 /%
10% PVA	1 423	200
10% PVA + 海藻酸钠	1 660	230
10% PVA + 明胶	1 800	250

从表 1 可以看出,利用 PVA 为载体固定化黑曲霉 M-1 细胞比自由细胞活力提高 1 倍以上。简单地用 10% PVA 固定黑曲霉 M-1 可以达到较好的效果,酶活力回收率达 200%。但在反应过程中,酶活力迅速下降,反复使用次数不够理想。加入海藻酸钠和明胶有助于阻止酶活力的漏失,保护细胞酶活力不受环境影响而迅速丧失,其中明胶有保护细胞作用,使酶活力回收率达 250%。

图 1 显示了只用 PVA 固定化细胞,利用 6 次后,

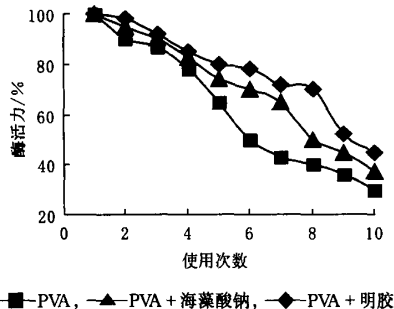


图 1 不同载体的固定化细胞的酶活力

酶活力迅速下降,剩余 50%。而在 PVA 中加入海藻酸钠和明胶,反复利用 6 次,各剩下 70%, 78%。以下对酶活力回收率最高的 PVA-明胶法固定化细胞与自由细胞进行酶学性质比较。

2.1 米氏常数的测定

以不同浓度(5、10、25、40、50 mmol/L)的甲基 α -D-葡萄糖苷为底物,40℃,pH 5.0, 0.2 mol/L 醋酸缓冲液反应 10 min,然后测定自由细胞和固定化细胞的初速度。作 Lineweave-Burk 双倒数曲线计算动力学参数 V_m 和 K_m 得出:自由细胞的 $V_m = 1.71 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g})$, $K_m = 20.50 \text{ mmol/L}$,固定化细胞的 $V_m = 2.84 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g})$, $K_m = 11.88 \text{ mmol/L}$ 。当细胞固定在 PVA 复合凝胶时 V_m , K_m 产生了显著变化。固定化细胞的 V_m 比自由细胞的 V_m 要大得多, K_m 比自由细胞的 K_m 还要小。说明固定化过程提高了细胞酶和底物之间的亲和力,其原因可能是细胞的固定化增加了细胞膜的通透性,使细胞酶更易于与外界的底物作用生成产物。也可能是聚乙烯醇多孔网状结构中的亲水环境有利于反应产物方向进行。

2.2 最适温度的测定

于不同温度下(35、40、45、50、55、60、65、70℃)测定固定化细胞与自由细胞的酶活力,结果如图 2 所示。自由细胞和固定化细胞最适温度分别为 55℃ 和 60℃,固定化细胞的最适温度高于自由细胞,而且固定化细胞的最适作用温度范围明显变宽(50~60℃)。说明载体在防止细胞酶在高温下失活中起保护作用,固定增加了细胞酶的稳定性^[21]。

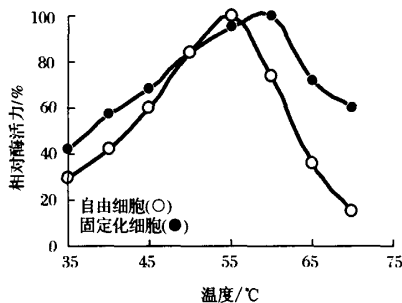


图 2 自由细胞和固定化细胞的最适温度

2.3 温度稳定性

一般来说,由于细胞的固定化减少了细胞酶的构型柔韧性,所以固定化细胞比自由细胞具有较高的热稳定性。在 0.2 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0),无底物存在时分别于 40、45、50、55、60、65、70℃ 处理固定化

细胞和自由细胞 30 min, 再于 40℃ 加入底物反应 1 h, 测定残余酶活力。如图 3 所示随着温度升高, 自由细胞和固定化细胞的活性都有所降低。自由细胞从温度 55℃ 起, 活力急剧下降, 到 70℃ 残余活力仅余 40%, 而固定化细胞活力失去 40%。这个结果表明, 固定化细胞热稳定性高于自由细胞。将细胞固定于 PVA 多孔网络中保护了细胞酶的结构, 使细胞酶免于因为环境因素发生构型变化^[22]。

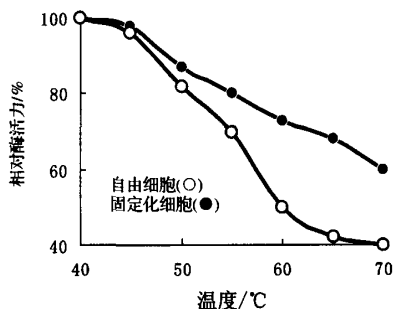


图3 自由细胞和固定化细胞的温度稳定性

2.4 最适 pH 值

配制 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 磷酸缓冲液和 8.0、9.0 的巴比妥钠-盐酸缓冲液, 在 40℃ 下测定固定化细胞和自由细胞的活力, 结果如图 4 所示。固定化细胞与自由细胞最适 pH 都是 6.0, 但固定化细胞在 pH 4.0~8.0 之间都保持较高酶活力, 而且自由细胞的 pH 作用范围明显狭窄很多, 特别在酸性方向酶活力急剧下降, 在 pH 3.0 时酶活力剩下 10%。

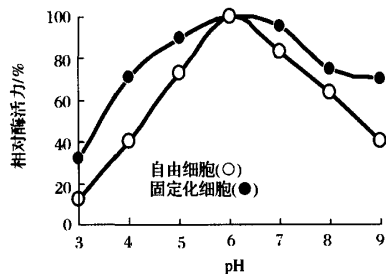


图4 自由细胞和固定化细胞的最适 pH

2.5 pH 值稳定性

在不同 pH 下处理 30 min 测定自由细胞和固定化细胞的残余酶活力, 结果如图 5 所示。

自由细胞耐碱较强而耐酸性较弱, 经过 PVA 固定化之后细胞的耐酸性得到提高。

将固定化细胞 4℃ 贮存于 pH 5.0 的 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液, 1 个月后酶活力无明显下降。经过固定化之后细胞酶的贮藏稳定性大大加强。

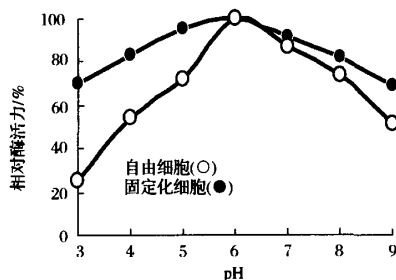


图5 自由细胞和固定化细胞的 pH 稳定性

3 结论

我国关于 α -葡萄糖转苷酶的研究主要集中于菌种筛选和固定化酶方面, 关于其他方面的研究几乎空白。本文于国内首次提出利用固定化细胞法连续生产异麦芽低聚糖^[23]。研究结果表明, 采用聚乙烯醇复合凝胶包埋黑曲霉-M1 酶活力回收率高达 250%, 而且方法简便, 成本低廉, 操作简单。固定化细胞机械性能好, 更加耐酸耐碱, 其稳定性大大提高, 能满足工业应用要求。

参考文献

- 1 Miroslawa S, Edward G, Stanislaw B. PVA-biocatalyst with entrapped viable *Bacillus subtilis* cells[J]. J Mol Catal Part B: Enzym, 2001, 11: 671 ~ 676
- 2 Sinan A, Yasemin K, Adil D, et al. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic poly-vinylalcohol microspheres[J]. Food Chem, 2001, 74: 281 ~ 288
- 3 Miroslawa S, Tadeusz A, Malgorzata R. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier[J]. J Mol Catal Part B: Enzym, 2002, 19~20: 261 ~ 268
- 4 Ohmiya K, Ohashi H, Kobayashi T, et al. Hydrolysis of lactose by immobilized microorganisms[J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33(1): 137 ~ 146
- 5 Yasemin N, Sibel S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system[J]. Process Biochem, 2004, 39: 703 ~ 709
- 6 Gibson O R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [J]. J Nutr, 1995, 125: 1 401~1 412
- 7 Tomomatsu H. Health effects of oligo-saccharides[J]. Food Technol, 1994, 48: 61 ~ 65
- 8 Monsan P, Paul F. Oligosaccharides feed additives. In: Wallace RJ, Chesson A, editors. Biotechnology in Animal Feed

- and Animal Feeding[M]. Weinheim: VCH, 1995. 233 ~ 235
- 9 Spiegel JE, Karabell P, Frankos VH, et al. Safety and benefits of fruct- oligosaccharides as food ingredients[J]. Food Technol, 1994, 48: 85 ~ 89
 - 10 Crittenden R G, Playne M J. Production properties and applications of food-grade oligosaccharides[J]. Trends Food Sci Technol, 1996, 7: 353 ~ 61
 - 11 Kueikui T, Yanase M, Takata II, et al. A new way of producing isomaltose oligo- saccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 953 ~ 959
 - 12 Lelina K, Barbara S, Stanislaw B. Immobilization of dextransucrase and it use with soluble dextranase for gluco-oligosaccharides synthesis [J]. Enzyme Microb Technol, 2004, 34: 555 ~ 560
 - 13 Norihiro K, Sohei S, Fujio T. Isomaltose synthesis in the reversed hydrolysis catalyzed by amycoglucosidase immobilized in the thermosensitive gel[J]. Materials Science and Engineering C, 2001, 17: 155 ~ 160
 - 14 Yun J W, Lee M G, Song S K. Continuous production of isomalto-oligosaccharides from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aurobasidium pullulans*[J]. Biotechnol Lett, 1994, 16: 1 145 ~ 1 150
 - 15 马 丽,蒋世琼,甘宾宾,等. 功能性异麦芽芽低聚糖的高效液相分析[J]. 食品科学, 1999(9): 60 ~ 62
 - 16 中华人民共和国国家标准. 食品中葡萄糖的测定方法和酶比色法和酶-电极法[S]. GB/T 16285 - 1996
 - 17 Wu K, Wisecarver K. Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid. Biotech[J]. Bioeng, 1992, 39: 447 ~ 449
 - 18 Penka A, Elka P, Hristo K. Enhancement of acid proteinase production by the fungus *Humicola lutea* 120 - 5 immobilized in crosslinked poly(vinyl alcohol) mixed with poly (ethylene glycol)[J]. Process Biochemistry, 1998, 33(7): 725 ~ 728
 - 19 Hertzberg S, Moen E, Vogelsang C, et al. Mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate gels for cell entrapment[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 43: 10 ~ 17
 - 20 Manolov R J. Batch and continuous ribonuclease production by immobilized *Aspergillus clavatus* cells in a bubble-column bioreactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37: 32 ~ 36
 - 21 Jiang B, Zhang Y. Immobilization of catalase on crosslinked polymeric hydrogels effect of anion on the activity of immobilized[J]. Eur Polym J, 1993, 29: 1 251 ~ 1 254
 - 22 Senay A C, Nurserin H Oztop. Immo- bilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads[J]. Enzyme and Microbiol Technol, 2003, 32: 889 ~ 894
 - 23 岳振锋,陈小霞,彭志英. α -葡萄糖转苷酶研究现状及进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(3): 63 ~ 67

Immobilization of *Aspergillus niger* using a PVA-gelatin Carrier System

Zheng Xiaoxian Sun Fei Zhang Yunkai Liang Zhiquan

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

ABSTRACT *Aspergillus niger* cells produced α -transglucosidase were entrapped in polyvinyl alcohol (PVA)-cryogel beads by a freezing-thawing method. Due to the porosity of PVA-cryogels, high molecular-weight substances can penetrate beads of the biocatalyst. The immobilization in cryoPVA-gel stabilized the cell and ensured high mechanical and chemical stability of the biocatalyst, which could be used many times for α -D-Glucopyranoside hydrolysis. Various characteristics of immobilized cells such as thermal and pH optimum, pH and thermal storage stability were evaluated. Among them the pH optimum of free and immobilized cell were found to 6.0 and the thermal optimum of free cell was 55°C whereas that of immobilized cell was 60°C. Immobilization increased in V_m value from 1.71 to 2.84 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min} \cdot \text{g})$ (cell) and the K_m value of immobilized cell (11.88 mmol/L) was lower than that of free cell (20.50 mmol/L). It was observed that operational, pH, and thermal stabilities of the Membrane-bound enzyme were increased with immobilization.

Key words PVA-cryogel, immobilized cells, *Aspergillus niger*, freezing-thawing method