

莫格假丝酵母微胶囊化生产木糖醇的研究

陈宏文^{1,2}, 许传鹏², 张媛², 方柏山^{2,*}, 胡宗定¹

(1. 天津大学化工学院生化工程系, 天津 300072 2. 华侨大学生物工程与技术系, 福建 泉州 362011)

摘 要: 研究用高压微胶囊成型装置制备莫格假丝酵母 NaCS-PDMAAC 微胶囊生产木糖醇。考察了 PDMAAC 浓度对微胶囊性能的影响及推进速度、电压、针头内径对微胶囊直径的影响。摇瓶条件下, 微胶囊细胞连续发酵 9 批, 粒径 2.0mm 的微囊得到最大木糖醇浓度为 27.6g/L, 发酵时间从游离培养的 103h 缩短为 75h, 最大生产能力为 0.37g/(L·h), 比游离细胞提高 9.1%。

关键词: 木糖醇; NaCS-PDMAAC 微胶囊; 固定化

Study on Xylitol Production by Immobilized *Candida mogii* in Microcapsules

CHEN Hong-wen^{1,2}, XU Chuan-peng², ZHANG Yuan², FANG Bai-shan^{2,*}, HU Zong-ding¹

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Department of Bioengineering Biotechnology, Hua Qiao University, Quanzhou 362011, China)

Abstract: The production of xylitol by *Candida mogii* in NaCS-PDMAAC microcapsules prepared in high-voltage electrostatic field was studied. The influences of PDMAAC concentration on gel bead characteristics, push speed, type of pinhead and voltage on microcapsule diameter were investigated. The encapsulated cells were fermented sequentially into 9 batches in shaking flasks. The optimum concentration of xylitol was 27.6g/L when the mean diameter of microcapsules was 2.0mm. The optimum xylitol productivity was 0.37g/(L·h), which was increased 9.1% in comparison with free cells.

Key words: xylitol; NaCS-PDMAAC microcapsule; immobilization

中图分类号 Q815

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)09-0092-04

木糖醇(分子式 $C_5H_{12}O_5$)是一种五碳糖醇, 是人体正常代谢的中间产物^[1]。木糖醇集甜味剂、营养剂、治疗剂于一体, 具有多种优良特性, 广泛用于国防、医药、化工、日化、涂料及食品等行业^[2]。木糖醇微生物发酵法与工业化规模的化学合成法相比, 具有条件温和、操作简便、副产物少、环境污染低等特点, 利用生物技术由可再生资源生产木糖醇已逐渐成为研究热点。但是木糖醇的得率、质量浓度和生产能力一直是限制大规模发酵法生产木糖醇的“瓶颈”问题。固定化细胞技术相对于游离细胞培养有助于提高生产能力、降低产品成本。在多种固定化技术中, 新型 NaCS-PDMAAC 生物微胶囊体系以其稳定的化学物理性质、良好的生物相容性、较高的机械强度以及制备简便的特点, 受到人们的关注^[3]。近年来, NaCS-PDMAAC 生物微胶囊已在柠檬酸^[4]、乳酸^[5]、酒精^[6]等生物转化过程中取得成功, 但目前还未见到有关 NaCS-PDMAAC 微

胶囊生产木糖醇的报道。本文尝试用高压微胶囊成型装置^[7]制备 NaCS-PDMAAC 微胶囊, 通过制备条件优化, 力求缩短木糖醇发酵周期、提高木糖醇得率和生产能力。

1 材料与方法

1.1 菌种

莫格假丝酵母(*Candida mogii* ATCC 18364)源于美国 Rockville, MD, 4℃下用马铃薯琼脂保存。

1.2 原料和试剂

微囊化材料 NaCS 由浙江大学生物化工系姚善泾教授提供, PDMAAC 系美国 Aldrich 公司产品, D-木糖由福建漳州糖厂提供, 木糖醇系美国 Sigma 公司产品, 其它药品均为常规药品。

1.3 主要仪器与设备

高压微胶囊成型装置 上海理工大学 HYG-II 旋转

收稿日期 2003-12-01

*通讯联系人

基金项目: 国家自然科学基金(20276026); 福建省自然科学基金资助(D0120002)

作者简介: 陈宏文(1969-), 女, 讲师, 在职博士, 主要从事生物化学工程研究。

方柏山(1957-), 男, 教授, 博导, 主要从事生物化学工程与基因工程研究。

恒温摇床柜 上海新蕊自动化设备有限公司 高速冷冻离心机3K30 德国 Sigma。

1.4 培养基

斜面培养基：马铃薯琼脂培养基。

种子培养基(g/L)：木糖 40，葡萄糖 50， $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1， KH_2PO_4 4， MgSO_4 1，酵母浸膏 6，蛋白胨 6.5，pH5。

发酵培养基(g/L)： $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5， KH_2PO_4 10， MgSO_4 0.5，酵母浸膏 10，蛋白胨 4， CaCl_2 0.1，木糖 60。木糖应与其它营养成分分开灭菌(121℃，20min)。

1.5 培养方法

种子培养：挑取保存在斜面上的菌种三环，接到盛有 170ml 种子培养基的 300ml 三角瓶中，于 30℃ 下旋转摇床培养 48h，摇床转速 200r/min。所得菌体离心洗涤两次，悬浮于 5ml 无菌生理盐水中备用。

发酵培养：将 5ml 种子悬浮液接入装有 220ml 发酵培养基的三角瓶中，30℃ 下培养 103h，摇床转速 200r/min。

1.6 微胶囊的制备和培养方法

配制 5.0% 的 NaCS(20ml) 和含有 0.9%NaCl 一定浓度的 PDMDAAC(100ml) 溶液，121℃ 灭菌 30min 待用。无菌条件下，将 5ml 莫格假丝酵母种子液与 NaCS 溶液充分混合，成为 4.0% 的 NaCS 菌悬液。在高压微胶囊成型装置形成的高压静电场中，利用定量输液泵的推动，将菌悬液通过注射器(一定型号针头)滴入磁力搅拌下的 PDMDAAC 溶液中，针头距离液面 25mm，搅拌(固化) 1.5h，收集微胶囊，用无菌生理盐水充分洗涤，去除表面残留的 PDMDAAC。将微囊化的莫格假丝酵母接入 220ml 发酵培养基中，30℃、200r/min 旋转式摇床培养，定时取样分析，当木糖耗尽时更换培养基。如此反复培养多批。

1.7 分析方法

游离细胞含量测定采用光密度法 600nm 测定，木糖和木糖醇分别用对 - 溴苯胺试剂^[8]、Nash 试剂分光光度法测量^[9]。微胶囊直径测量方法是取 20 个微胶囊，用游标卡尺分别测其最大直径，计算平均值即得单个微胶囊直径。

2 结果与讨论

2.1 PDMDAAC 对莫格假丝酵母生长的影响

考虑到合成高分子 PDMDAAC 可能会影响细胞的生长，我们考察了培养基中含不同分子量(<200kD 低分子量和 400~500kD 高分子量)不同浓度(1% 和 2%)的 PDMDAAC 对莫格假丝酵母生长过程的影响。以初始接种量 OD 值为 100%，每隔一段时间取样，稀释适当倍数，测定其 OD 值(平行测定 3 次，取平均值)，菌体在

含不同浓度、分子量的 PDMDAAC 培养基中的生长情况如图 1 所示。

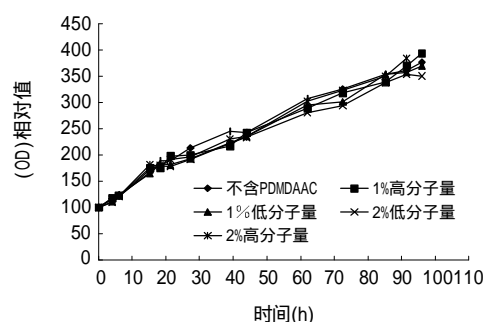


图1 不同浓度和分子量 PDMDAAC 对菌体生长的影响

从图 1 可以看出，菌体在含不同浓度和分子量 PDMDAAC 和不含 PDMDAAC 培养基中的生长曲线基本吻合，说明 PDMDAAC 对菌体生长的影响并不大，它是一种具有良好生物相容性的微胶囊材料。

2.2 NACS-PDMDAAC 微胶囊的制备方法优化

2.2.1 PDMDAAC 的浓度对微胶囊性能的影响

配制不同浓度不同分子量的 PDMDAAC 溶液(含 0.9%NaCl)制备微胶囊，微胶囊的机械强度和外观特征如表 1 所示。由实验结果可知，2% 低分子量的 PDMDAAC 溶液制备微胶囊效果较好。

表 1 不同浓度和分子量的 PDMDAAC 对微胶囊性能影响

分子量及浓度	机械强度	外观特征
2% 的低分子量	较强	表面光滑,弹性好,膜厚 50~100 μm。
2% 的高分子量	较弱	表面欠光滑,易破裂。
6% 的低分子量	较强	膜较厚,内含液体较少。
6% 的高分子量	较弱	几乎不成囊,轻轻晃动即破裂。

2.2.2 输液泵推进速度对微胶囊直径的影响

固定电压 $4 \times 2/3\text{kV}$ (即电压表刻度 4 格,每格 $2/3\text{kV}$)，选用 7 号针头，调节不同推进速度，微囊直径与推进速度的关系见图 2。由图可知，开始微囊的平均直径随推进速度的提高而增大，但当推进速度在 30~60mm/h 之间时，囊径变化不大，基本上维持在 3mm 大小。因此推进速度不适合作为改变微胶囊直径的主要参数。

2.2.3 电压对微胶囊直径的影响

固定推进速度为 50mm/h，选用 7 号针头，改变电压，微囊直径与电压的关系见图 3。从图中可看出，当电压小于 $4 \times 2/3\text{kV}$ 时，囊径几乎不变，而电压从 $4 \times 2/3\text{kV}$ 增加到 $5.5 \times 2/3\text{kV}$ 时，囊径从 3.1mm 逐渐减小到 1.1mm，这说明在该电压范围内电压对囊径的影响较大，因此电压可以作为改变微胶囊直径的主要参数。

2.2.4 针头型号对微胶囊直径的影响

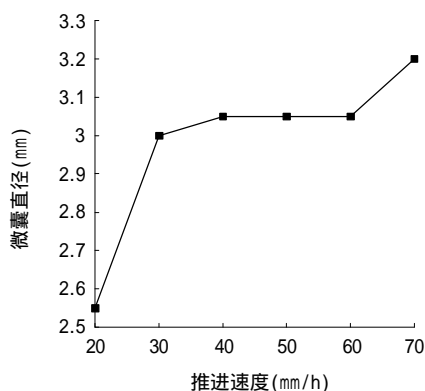


图2 推进速度对微囊直径的影响

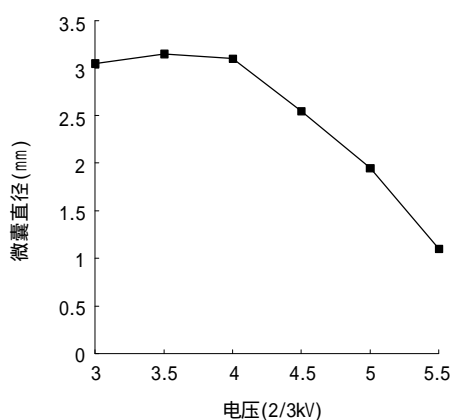


图3 电压对微囊直径的影响

将电压固定为 $4 \times 2/3\text{kV}$ 格, 推进速度固定为 50mm/h , 改变不同针头型号(4.5#、6#、7#、9#、12#), 微囊直径与针头型号的关系见图4所示。从图中看出, 尽管微囊直径随针头型号增加而增大, 但微囊直径的变化范围不大($2.5 \sim 3.2\text{mm}$), 因此针头型号不适合作为改变微囊直径的主要参数。

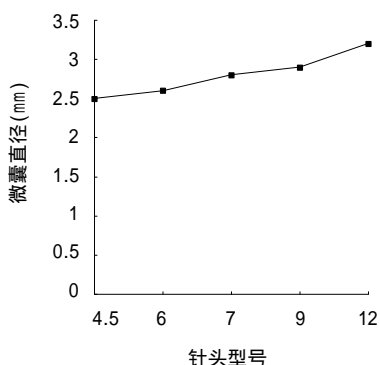


图4 针头型号对微囊直径的影响

通过上述实验优化了利用高压微胶囊成型装置制备微胶囊的方法, 即采用2%低分子量PDMDAAC溶液作为制备微胶囊的反应液, 输液泵的推进速度为 50mm/h ,

选用7#针头, 通过改变电压制备不同囊径的微胶囊。

2.3 不同囊径微胶囊固定化多批次培养

通常在非高压静电场中, 通过手推得到的微囊直径约 4mm , 利用高压微胶囊成型装置可制得 $1.0 \sim 3.0\text{mm}$ 不同囊径的微胶囊。在一定范围内, 随着微囊直径减小, 其与培养基接触的比表面积增加, 培养基扩散到微囊中心的距离缩短, 有利于提高传质效果。将各种粒径的微胶囊固定化细胞与游离细胞分别进行多批次培养, 以每批游离细胞木糖耗尽时间为发酵终点, 前三批的实验结果见图5~7。由图可知, 对于第一、二批培养, 微胶囊细胞培养木糖醇浓度低于游离细胞培养, 这表明微胶囊膜对传质的影响。从第二批开始, 囊径为 2.0mm 的微胶囊产木糖醇的浓度高于其它粒径的微胶囊, 到第三批时开始优于游离细胞, 重复使用的游离细胞转化能力下降较大。培养到第六、第七批其它粒径的微胶囊破损程度较为严重, 有的甚至超过70%, 而粒径 2.0mm 的微囊培养到第九批, 基本没有破损。因此, 对于莫格假丝酵母微囊化培养, 其囊径控制在 2mm 较为理想。

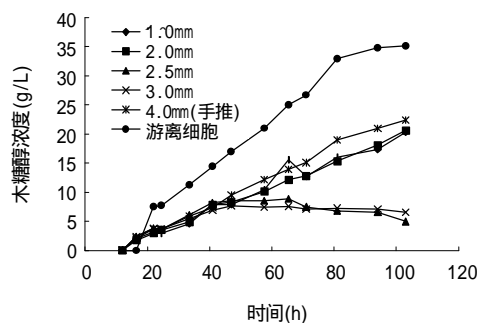


图5 第一批培养微胶囊直径与木糖醇浓度的关系

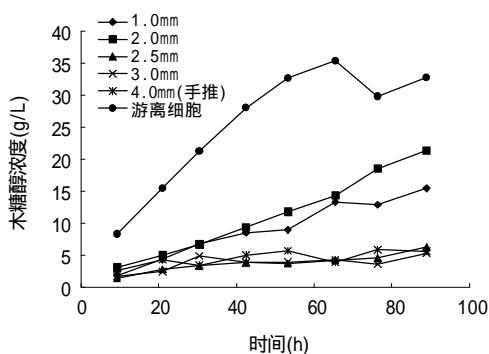


图6 第二批培养微胶囊直径与木糖醇浓度的关系

囊径 2mm 微胶囊前三批发酵过程曲线如图8。第一批莫格假丝酵母培养 103h , 木糖醇浓度为 20.7g/L 。第二批培养 89h , 木糖醇浓度为 21.4g/L , 而第三批培养 75h , 木糖就已耗完, 木糖醇浓度为 27.6g/L 。从第四批开始直至第九批产木糖醇的曲线与第三批基本一致。由此看出, 微胶囊固定化生产木糖醇相比于游离培养, 木糖醇的发酵时间由 103h 缩短为 75h , 生产能力为 $0.37\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$,

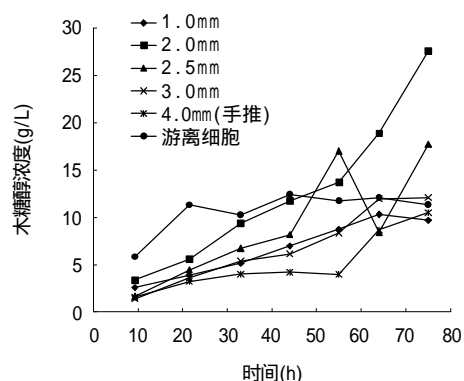


图7 第三批培养微胶囊直径与木糖醇浓度的关系

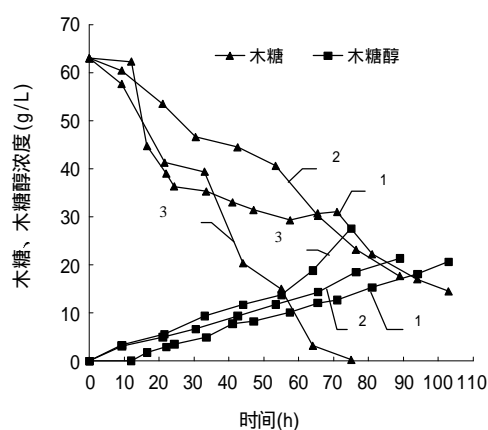


图8 2mm微胶囊前三批发酵过程曲线

比游离细胞提高9.1%。有文献报道,高密度细胞培养有助于提高木糖醇的生产能力^[10], NaCS-PDMAAC 微胶囊培养一般会使细胞浓度提高一个数量级(10倍)^[6]。实验结果也证明,莫格假丝酵母在NaCS-PDMAAC微胶囊培养中实现了高密度细胞培养,从而提高了木糖醇的生产能力。我们曾利用海藻酸钠-壳聚糖(ACA)微胶囊生产木糖醇^[11],其生产能力仅维持在0.12g/(L·h),且重复利用3批后,细胞开始破损,而NaCS-PDMAAC微胶囊重复利用9批后,几乎没有明显变化,仍可进一步使用,其良好的机械强度充分体现出来。

3 结论

本文利用高压微胶囊成型装置制备出不同囊径的NaCS-PDMAAC生物微胶囊,并将其用于木糖醇的固

定化培养。实验结果表明,NaCS-PDMAAC微胶囊对莫格假丝酵母具有良好的生物相容性,囊径2mm、2%低分子量PDMAAC制得的微胶囊可实现高密度细胞培养,且大大缩短发酵时间,提高了生产能力,同时微胶囊可反复利用,显示良好的机械强度。

参考文献:

- [1] Hollmann S, Touster O. The L-xylulose-xylitol enzyme and other polyol dehydrogenase of guinea pig liver mitochondria [M]. Biol Chem, 1957. 225-87.
- [2] 尤新. 木糖醇的生产和应用[M]. 北京: 轻工业出版社, 1984. 1-3.
- [3] Manfeld J, Foster M, Dautzenberg H, et al. Immobilization of Yarrowia lipolytica cells and invertase in polyelectrolyte complex microcapsules[J]. Enzyme Microbial Technology, 1995, 17: 11-17.
- [4] Forster I, Mansfield J, Schellenberger A, et al. Immobilization of citrate-producing Yarrowia lipolytica cells in polyelectrolyte complex capsules[J]. Enzyme Microbial Technology, 1994, 16: 777-784.
- [5] 叶子坚, 姚善泾. 乳杆菌微胶囊化培养的研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(5): 507-512.
- [6] 张惠勇, 梅乐和, 姚善泾. 微胶囊固定化酵母培养的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(3): 297-300.
- [7] 陈爱政, 王士斌, 刘源岗, 等. 高压微胶囊成型装置制备用于成囊的海藻酸钙胶珠[J]. 山东生物医学工程, 2002, 21(4): 21-23.
- [8] Lise D, Ernest K C Y. A simple pentose assay for biomass conversion studies[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1986, 24: 379-385.
- [9] Song H B, Arnold L D. An improved colorimetric assay for polyols[J]. Analytical Biochemistry, 1977, 81: 18-20.
- [10] Yahashi Y, Hatsu M, Horitsu H, et al. D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using Candida tropicalis immobilized on a non-woven fabric[J]. Biotechnol Lett, 1996, 12: 1395-1400.
- [11] 万宁. 应用生物微胶囊固定化技术进行木糖醇发酵[D]. 华侨大学硕士论文, 2000.

欢迎订阅 2005 年《食品科学》杂志