

研究论文

SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊固定化 枯草杆菌 HL-1 发酵生产纳豆激酶

梅乐和¹ 章小忠¹ 艾碧英² 盛清³ 林东强¹ 姚善泾¹ 朱自强¹

(¹ 浙江大学化学工程与生物工程系, 浙江 杭州 310027; ² 浙江省丽水市环境保护检测中心站, 浙江 丽水 323000;
³ 浙江理工大学生命科学院, 浙江 杭州 310018)

摘要 制备了海藻酸钠/纤维素硫酸钠-CaCl₂/聚亚基二胍氯化氢微胶囊 (SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊), 并以该微胶囊固定化培养枯草杆菌 HL-1 用于发酵制备纳豆激酶, 考察了 PMCG 对枯草杆菌生长的影响, 比较了微囊化培养与游离培养过程中的菌体生长、耗糖速率以及纳豆激酶产物分泌能力. 最后经过连续 6 批培养, 酶活可达到 2465 IU · ml⁻¹, 是游离培养过程的 3 倍.

关键词 SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊 固定化 纳豆激酶

中图分类号 TQ 920.4

文献标识码 A

文章编号 0438-1157 (2004) 08-1319-05

IMMOBILIZED CULTURE OF *Bacillus subtilis* IN SA/CS-CaCl₂/PMCG MICROCAPSULE FOR PRODUCTION OF NATTOKINASE

MEI Lehe¹, ZHANG Xiaozhong¹, AI Biying², SHENG Qing³,
LIN Dongqiang¹, YAO Shanjing¹ and ZHU Ziqiang¹

(¹ Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China;

² Center of Environmental Monitoring of Lishui, Lishui 323000, Zhejiang, China;

³ College of Life Science, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310018, Zhejiang, China)

Abstract A SA/NaCS-CaCl₂/PMCG microcapsule which can be used in biotechnology was prepared. The production of nattokinase from *Bacillus subtilis* immobilized in SA/CS-CaCl₂/PMCG microcapsule was studied. The effects of PMCG on the growth of *Bacillus subtilis* were investigated. The growth rate, consumption rate of xylose and production rate of nattokinase of microencapsulated cells were compared with suspension culture. The results showed that immobilized cells grew as suspension culture for a single batch. The encapsulated fermentation had advantage in multi-batch culture. The highest activities of 2465 IU · ml⁻¹ of nattokinase were reached, which was 2 times higher than that in suspension culture.

Keywords SA/NaCS-CaCl₂/PMCG microcapsule, immobilization, nattokinase

引 言

将酶、蛋白质、微生物及动植物细胞包埋, 使生物大分子或细胞截留在微囊中的微胶囊固定化技

术在许多领域内具有极好的应用前景. SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊是 Hunkeler David^[1]等在 20 世纪 90 年代开发成功的一种新型中空微胶囊, 是一种多组分生物微胶囊体系, 其中聚阴离子是 2 种

2003-05-26 收到初稿, 2003-09-15 收到修改稿.

联系人及第一作者: 梅乐和, 男, 39 岁, 博士, 教授.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 20176050) 和浙江省科技项目 (No. 2004C33036) 共同资助.

Received date: 2003-05-26.

Corresponding author: Prof. MEI Lehe. E-mail: meilh@che.zju.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20176050).

高聚物, 由此而增加的可调参数增大了微胶囊制备的自由度, 为制备出性能更好的微胶囊提供了空间. 已有的实验结果^[2,3]表明, 该体系具有良好的机械强度和球形度、较大的截留相对分子质量和较好的生物相容性, 并用于动物细胞的培养.

纳豆激酶 (Nattokinase, NK) 自 1987 年由须见洋行^[4]发现以来, 因其溶解血栓特异性好、半衰期长、可口服、易获得等优点, 已引起很多研究者的关注^[5,6]. 很多学者对其液体发酵进行了研究, 迄今为止, 尚未见固定化培养的文献报道. 本文采用 SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 胶囊体系固定化培养纳豆枯草杆菌, 探索培养效果, 同时考虑到纳豆激酶的相对分子质量远大于该微胶囊的截留相对分子质量, 期望在固定化培养过程中使纳豆激酶截留在微胶囊内, 并得到一定的富集, 以减轻后续分离过程的压力.

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种: 由本实验室从日本传统食品纳豆中筛选得到, 命名为 *Bacillus subtilis* HL-1. 纤维素硫酸钠 (NaCS) 由本实验室制备, 聚亚基二胍氯化氢 (PMCG) 为美国的 Scientific Polymer Products Co. 产品, 纤维蛋白原 (fibrinogen) 购自 Sigma 公司, 凝血酶 (thrombin)、尿激酶分别由杭康生物药业公司、苏州新宝制药厂生产. 海藻酸钠 (SA) 等其他试剂均为市售分析纯.

1.2 培养基

种子培养基: LB 培养基, 其组成为 1% 蛋白胨、0.5% 酵母抽提物、1% NaCl, pH 值 7.0.

发酵培养基: 优化的发酵培养基, 其组成为 2% 胰蛋白胨、1% 酵母膏、2% 木糖、0.6% Na₂HPO₄、0.15% NaH₂PO₄、0.02% CaCl₂、0.05% MgSO₄、0.9% NaCl, pH 值 7.0.

1.3 实验方法

1.3.1 微胶囊的制备过程 图 1 为微胶囊形成过程示意图.

制备过程中, 先将 SA 和 NaCS 的混合液滴入 CaCl₂ 溶液, 反应 30 min, 形成实心微胶囊, 然后, 将实心微胶囊转入 PMCG 溶液中, 经 PMCG 与 SA 和 NaCS 的快速界面反应, 在实心微胶囊周围形成一层很薄的膜, 约 10 min 后, PMCG 与 SA 和 NaCS 在膜的附近全部反应, 形成外面覆盖有一

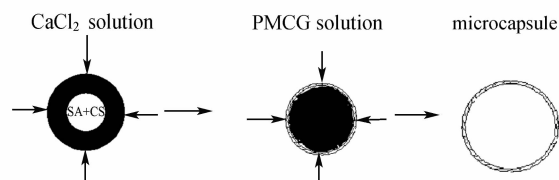


Fig. 1 Process of formation of SA/NaCS-CaCl₂/PMCG microcapsule

层膜的空心微胶囊.

1.3.2 纳豆枯草杆菌的游离培养 将保藏菌种接到种子斜面培养基活化, 在 30 °C 下培养 22 h 制得一级种子, 然后接种于三角瓶, 放入摇床, 30 °C 和 150 r · min⁻¹ 下培养 14 h, 作为游离和固定化培养的种子. 游离培养时将上述种子接入液体培养基, 在 30 °C 和 150 r · min⁻¹ 下进行振荡培养, 定时取样测定酶活.

1.3.3 纳豆枯草杆菌的微囊化培养 配制 5.0% NaCS、2.5% SA、2% CaCl₂ 和柠檬酸三钠溶液, 灭菌, PMCG 溶液只要用灭菌后的生理盐水配成 1% 即可. 在无菌操作条件下, 将等体积的 NaCS 和 SA 溶液混合均匀, 将一定量的种子液与混合均匀的 NaCS 和 SA 溶液相混, 并将含菌液滴入 CaCl₂ 溶液中, 制成实心的微胶囊, 然后将实心的微胶囊放入 PMCG 溶液, 使之与 PMCG 反应后形成一层膜, 最后用柠檬酸三钠溶液抽走微胶囊中间的 CaCl₂, 这样就制得了具有较大强度的微中空胶囊, 即微囊化纳豆枯草杆菌.

1.3.4 微囊化纳豆枯草杆菌的多次连续培养 将 30 ml 微囊化纳豆枯草杆菌接种到 50 ml 的发酵培养基中, 在 30 °C、150 r · min⁻¹ 下振荡培养, 并定时取样测定酶活. 前 2 批培养在菌体达到最高浓度时开始更换新鲜培养基, 后面批次则当发酵液中糖浓度接近零时再更换新鲜培养基, 取一定数量的微胶囊测定胶囊中的菌量和酶活. 重复此过程, 连续培养了 7 批.

1.4 分析方法

木糖浓度: 采用 DNS 法分析. 菌量: 采用吸光度法, 测定 660 nm 下的 OD 值. 酶活: 采用琼脂糖-纤维蛋白平板法^[7].

2 结果和讨论

2.1 PMCG 对纳豆枯草杆菌生长的影响

SA、NaCS 具有良好的生物相容性^[8~10], 而 CaCl₂ 是一种无机盐, 对微生物也几乎没有毒害作

用。所以本文仅对 PMCG 的生物相容性进行了考察。按 0、0.5%、1% 的浓度将 PMCG 直接溶解于培养基中, 灭菌后, 接入菌种, 放在摇床上 (30 °C, 150 r·min⁻¹) 进行培养, 定时取 1 ml 培养液, 在 660 nm 处测定 OD 值, 得到不同浓度 PMCG 下纳豆枯草杆菌的生长曲线 (图 2) 和糖浓度的变化曲线 (图 3)。从图中可以看出在培养液中加入 PMCG 后, 纳豆枯草杆菌基本上没有生长, 这说明 PMCG 对纳豆枯草杆菌的生长具有很强的毒害作用, 在实验范围内微生物的生长受到严重抑制, 该抑制作用几乎与浓度无关。

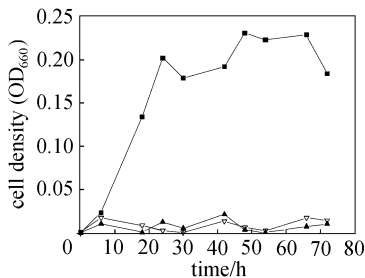


Fig. 2 Effects of concentration of PMCG on growth of *Bacillus subtilis* HL-1
■ no PMCG; ▲ 0.5% PMCG; ▽ 1% PMCG

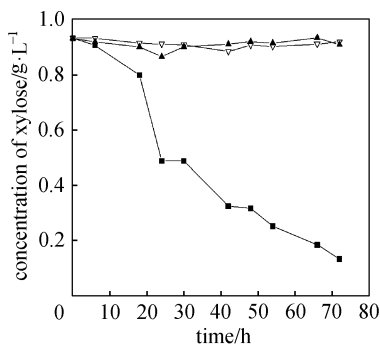


Fig. 3 Consumption curves of xylose under different concentrations of PMCG
■ no PMCG; ▲ 0.5% PMCG; ▽ 1% PMCG

由于 SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊制备过程中, PMCG 与 SA 和 NaCS 在膜的附近全部反应, 又由于小分子物质 Ca²⁺ 的竞争作用, 聚阳离子 PMCG 很难进入微胶囊的内部。同时, 虽然形成的膜很薄, 但比较紧密, 相对分子质量较大的 PMCG 不能透过, 因此, 在微胶囊内空间就不可能有 PMCG 的存在, 而可能会有微量的未反应的 SA 和 NaCS。这些 SA 和 NaCS 不会对微生物菌体的生长产生影响。黏附在微胶囊外壁的 PMCG 则可通过反复认真的清洗而除掉, 也不会对微胶囊内

的纳豆枯草杆菌产生不良影响。

2.2 SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊对纳豆枯草杆菌生长的影响

图 4~图 6 分别为纳豆枯草杆菌游离和微囊化培养过程中细胞生长曲线、木糖的耗糖曲线和纳豆激酶分泌情况的比较。由这些结果可以看出, 微囊化培养过程与游离培养过程的细胞生长曲线、木糖耗糖曲线和纳豆激酶分泌曲线十分相似, 表明 SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 生物微胶囊固定化过程对枯草杆菌的生长和纳豆激酶的分泌基本没有影响, 具有良好的生物相容性。但相比之下, 游离培养比微囊化培养的产酶能力要稍高一些, 这说明就单批次微胶囊培养而言, 由于传质等因素的限制, 微囊化在某种程度上影响其产酶能力, 并没有显示出比游离培养更利于产酶或使酶在囊内累积的优势。但与游离培养相比较, 微囊化培养的最大优势在于可以进行多批的连续培养, 因此, 有必要对微囊化枯草杆菌的连续化培养进行系统研究。

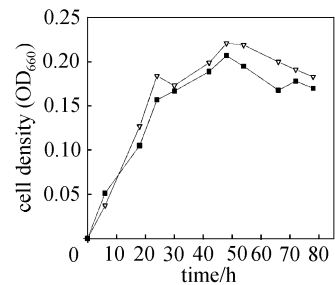


Fig. 4 Comparison of growth of *Bacillus subtilis* HL-1 between free and immobilized culture
▽ free culture; ■ immobilized culture

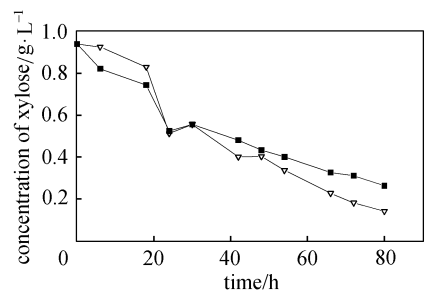


Fig. 5 Comparison of consumption of xylose by *Bacillus subtilis* HL-1 between free and immobilized culture
▽ free culture; ■ immobilized culture

2.3 微囊化枯草杆菌的连续培养

图 7~图 9 为微囊化枯草杆菌连续 3 批多次培养的结果, 其中图 7 为 1~3 批连续培养时菌体的

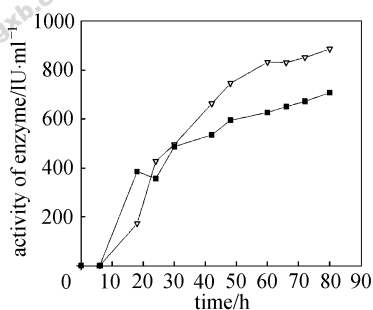


Fig. 6 Comparison of enzyme activity for microencapsulated cell suspension culture
▽ free culture; ■ immobilized culture

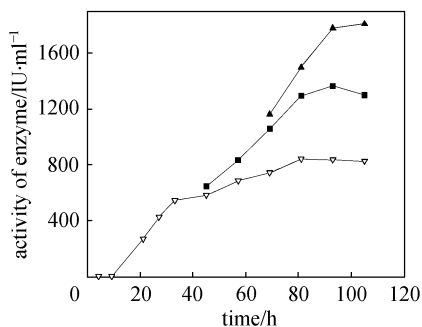


Fig. 9 Enzyme activity curves of first, second and third batches of microencapsulated cells
▽ first batch; ■ second batch; ▲ third batch

生长曲线, 图 8 为 1~3 批连续培养时培养基中木糖的耗糖曲线, 图 9 为 1~3 批连续培养时菌体的产酶曲线. 由图 7 可知每次更换培养基之后, 菌体都有明显的增长, 经过 3 批培养之后, 细胞浓度比第 1 批要高 1~2 倍, 同时也大大高于游离培养过程中的细胞浓度. 同样从图 8 中可以看出, 在第 1 批培养过程中, 完全糖耗时间需要 100 多个小时, 而到第 3 批时, 完全糖耗时间只需 50 h 左右, 大大加快了发酵速度. 而从产物纳豆激酶来看, 多次连续培养的优势就更加明显, 图 9 的结果显示, 第 3 批培养过程中最高酶活比第 1 批的最高酶活提高了将近 1 倍.

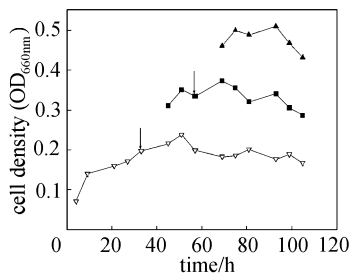


Fig. 7 Growth curves of first, second and third batches of microencapsulated cells
▽ first batch; ■ second batch; ▲ third batch

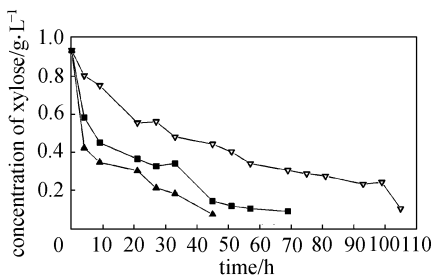


Fig. 8 Xylose consumption curves of first, second and third batches of microencapsulated cells
▽ first batch; ■ second batch; ▲ third batch

在上述研究的基础上, 本文进行了连续 6 批的微囊化枯草杆菌培养研究, 结果如图 10、图 11 所示.

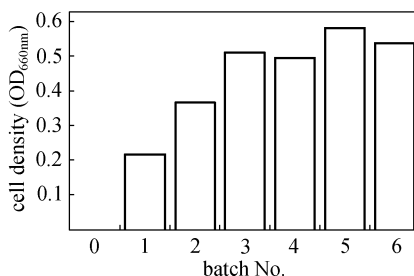


Fig. 10 Cell density of microencapsulated cells in batch culture

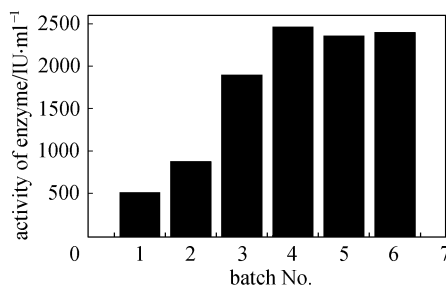


Fig. 11 Enzyme activity of microencapsulated cells in batch culture

从图 10 可以看出, 在前几批的培养过程中菌体浓度逐渐上升, 到第 3 批后增长就比较缓慢. 同样从图 11 可以看出, 在前几批培养过程中, 酶活增加非常迅速, 但第 4 批之后, 酶活的增长逐渐缓慢, 研究过程中发现在第 4 批培养过程中出现最高酶活, 此时酶活可高达 2465 IU · ml⁻¹, 约为普通游离培养的 3 倍, 充分显示出比游离培养更利于产酶或使酶在囊内累积的优势.

3 结 论

研究表明, SA/NaCS-CaCl₂/PMCG 微胶囊体系对纳豆枯草杆菌具有良好的生物相容性, 可用于对枯草杆菌进行微胶囊固定化培养. 作为一种微型反应器, 该微胶囊体系具有较高的生产能力, 经过多次发酵培养后, 可以达到比普通游离培养高几倍的产物和细胞浓度, 在研究的 6 批连续固定化培养过程中, 最高酶活可达到 2465 IU · ml⁻¹, 约为普通游离培养的 3 倍, 充分显示出比游离培养更利于产酶或使酶在囊内累积的优势. 利用该体系可以使发酵过程中菌体分泌出来的纳豆激酶在微胶囊内获得累积, 极有利于后续的分选过程的进行.

References

- 1 Prokop A, Hunkeler D, Powers A C, Whitesell R R, Wang T G. Water Soluble Polymers for Immunoisolation II: Evaluation of Multicomponent Microencapsulation Systems. *Advances in Polymer Science*, 1998, **136**: 54—73
- 2 Hunkeler D, Prokop A, Powers A C, Haralson M, Dimari S, Wang T. A Screening of Polymers as Biomaterials for Cell Encapsulation. *Polymer News*, 1997, **22** (7): 232—240
- 3 Wang T G. New Technologies for Bioartificial Organs. *Artificial Organs*, 1998, **22** (1): 68—74
- 4 Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A Novel Fibrinolytic Enzyme (nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; a Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet. *Experientia*, 1987, **43**: 1110—1111
- 5 Fujita M, Ito Y, Hong K, Nishimuro S. Characterization of Nattokinase-degraded Products from Human Fibrinogen or Cross-linked Fibrin. *Fibrinolysis*, 1995, **9**: 157—164
- 6 Fujita M, Hong K, Ito Y, Misawa S, Takeuchi N, Kariya K, Nishimuro S. Transport of Nattokinase Across the Rat Intestinal Tract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1995, **18** (9): 1194—1196
- 7 Astrup T, Müllertz S. The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, **40**: 346—35
- 8 YAO Shanjing (姚善泾). Study on the Biocompatibility of a New Biomicrocapsule. *Journal of Biotechnology (China)* (生物工程学报), 1998, **14** (2): 193—197
- 9 Prakash S, Chang T M S. Preparation and in Vitro Analysis of Microencapsulated Genetically Engineered *E. coli* DH5 Cells for Urea and Ammonia Removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **46**: 621—626
- 10 Rickert D A, Glatz C E, Glatz B A. Improved Organic Acid Production by Calcium Alginate-immobilized Propionibacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **22**: 409—414

信息与交流

2005 年我国将成为世界 PX 主要缺口国

20 世纪 90 年代以来, 随着中国聚酯行业迅速发展, PX 生产能力和产量不断增加, 但因缺口较大, 每年都需大量进口. 2003 年表观消费量突破 200 万吨达到 250.04 万吨, 创历史最高水平, 比 2000 年增长 72.1%, “十五”前 3 年年均增长率高达 19.8%. 目前, 中国 PX 大部分用于制造 PTA, 其消耗量约占 PX 总消费量的 85%. 2002~2003 年中国新增 PTA 产能近 180 万吨, 而 PX 新增产能仅 45 万吨. 至 2003 年底, 中国 PTA 产能达到 412 万吨, 对 PX 的需求量为 274 万吨, 而国内 PX 全部产能仅 236 万吨. 据海关统计, 2002 年中国进口 PX 27.48 万吨, 约占国内消费量的 16%; 2003 年进口量达到 101.86 万吨, 进口/表观消费量比例增大到 40.74%.

预测近期 PTA 生产对 PX 的需求量可能以每年 18% 以上的速度增长, 2004 年约需要 PX 240 万吨, 其他方面约需 PX 60 万吨, 总需求量约 300 万吨, 尽管产量可能超过 180 万吨, 但仍不能满足需求.

到 2006 年, 中国 PX 产能将增加 120.5 万吨, 达到 350 万吨以上. 但按 PTA 产能增长的保守估计, 届时国内 PX 供应缺口将达 160 万吨, 到 2010 年净进口量将超过 250 万吨. 2005 年后, 中国将成为世界 PX 主要缺口国.

(摘自: 中国化工信息网)