

亲水性和疏水性单体辐射共聚物 固定化酵母细胞

陆兆新

(江苏省农科院原子能利用研究所, 南京210014)

藤村卓

(日本原子力研究所高崎研究所, 日本高崎)

摘要 低温(-78°C)下辐射聚合亲水性单体羟乙基丙烯酸酯(HEA)和疏水性单体甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)的混合物, 用该聚合物 poly(HEA-GMA)固定化酵母细胞。固定化酵母具有比游离细胞高的生产乙醇能力, 但它们的生产乙醇能力随共聚物的组成而变化, 其中用 17%:6%(HEA:GMA)聚合的 poly(HEA-GMA)固定化酵母的生产乙醇能力最高, 为 $29\text{ mg/ml}\cdot\text{h}$, 是游离细胞的 4 倍。当单体浓度为 20%—30% 时, poly(HEA-GMA)能获得高活性的固定化酵母。还研究了 poly(HEA-GMA)的物理性质同固定化酵母活性的关系。

关键词 共聚物, 辐射聚合, 固定化, 酵母, 乙醇

近年来, 不少研究者进行了固定化酵母细胞的研究。Wada^[1] 等用角叉菜胶固定化酵母细胞, 其固定化酵母细胞具有较高的活性, 并且能连续发酵酒精三个月以上。Aykut等^[2] 用聚丙烯酰胺凝胶固定化的酵母细胞能较长时间地发酵生产酒精。此外, 固定化酵母细胞使用的载体有多孔玻璃、烧结玻璃、硅藻土、聚乙烯、赛璐璐和多孔砖等等。日本原子力研究所高崎研究所嘉悦勋应用低温辐射聚合技术, 合成了多种高分子材料进行酵母固定化, 获得了有较高活性的固定化酵母^[3-5]。本试验应用亲水性单体羟乙基丙烯酸酯(HEA)和疏水性单体甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)的辐射共聚物, 通过吸附增殖法固定化酵母, 研究了不同组成的辐射共聚物固定化酵母细胞的效果, 并讨论了高聚物性质与固定化酵母活性的关系。

1 材料和方法

1.1 微生物

本试验使用的酵母是 *Saccharomyces formosensis*。培养酵母种子的培养基组成是: 1%葡萄糖、0.1%蜜糖、0.5%蛋白胨、0.3%酵母提取液和 0.3%麦芽汁提取物。种子培养是在温度 30°C 的振荡器中振荡 24 h 进行的。固定化酵母的完全培养基组成为: 12%葡萄糖、1%蜜糖、0.15%酵母提取液、0.25% NH_4Cl 、0.1% NaCl 、0.001% CaCl_2 和 0.3%乳酸(pH 4.8)。

1.2 高聚物载体的制备及酵母的固定化

将单体 HEA(hydroxyethyl acrylate)、GMA(glyciolyl methacrylate)和蒸馏水分别按不同的比例混合, 置于试管中, 通过振荡器充分混合, 迅速将试管放入甲醇-干冰(-78°C)的保温瓶

收稿日期: 1991-10-14

中, 用 ^{60}Co γ 射线辐照 1 h, 照射剂量为 $1 \times 10^4 \text{ Gy}$ 。将辐射聚合的高聚物产物切成约 $3\text{—}5 \text{ mm} \times 3\text{—}5 \text{ mm}$ 的小块, 浸入过量的蒸馏水中, 使之吸水溶胀。约经 3 d 充分溶胀后, 用高压锅在 120°C 下灭菌 40 min。

取 10 cm^3 已灭过菌的高聚物材料放入三角瓶中, 加入固定化用培养基, 并交换二次, 使载体内充满培养基。然后, 加入 20 ml 培养液和 1 ml 预培养的种子培养液, 在有氧条件下于 30°C 振荡 72 h, 酵母细胞吸附于载体表面并逐渐进入载体内部, 这样酵母细胞被固定化。

1.3 固定化酵母的活性测定

经 72 h 有氧培养后, 在无菌条件下, 用培养基冲洗固定化酵母三次, 洗脱游离细胞和乙醇。在冲洗后的固定化酵母中加入 10 ml 完全培养基, 在 30°C 无氧条件下发酵 1 h, 发酵产生的乙醇量作为固定化酵母的活性指标。乙醇的测定用乙醇脱氢酶法^[9]。

游离细胞活性测定是将培养 72 h 的酵母无菌条件下离心 (4000 rpm), 然后按固定化酵母的发酵条件测定其乙醇量。

1.4 载体的结构和固定化细胞生长状态的观察

将载体和固定化酵母的载体切片, 用 NIKON DIAPHOT-TMD 相差显微镜观察并摄影。

1.5 高分子含水量的测定

充分溶胀的高分子载体在真空冷冻干燥机中干燥到恒重为止。

$$\text{水分含量} = \frac{w_2 - w_1}{w_2} \times 100\%$$

式中 w_2 为冷冻干燥前载体重量, w_1 为冷冻干燥后载体重量。

2 结果与分析

2.1 辐射聚合高聚物的机械强度和含水量

固定化细胞的载体需要具有一定的机械强度。为了获得适宜机械强度的高聚物载体, HEA 和 GMA 水溶液共混体系在 -78°C 下进行 γ 射线辐射共聚, 其共聚物的机械强度和含水量如表 1 所示。poly(HEA-GMA) 水凝胶的机械强度随共混体系中水的多少而变化, 含水越多, 聚合后的高聚物越软, 反之高聚物就越硬。在单体浓度 20%—30% 制备的高聚物载体具有较好的机械强度, 有一定弹性。poly(HEA-GMA) 在充分吸水溶胀后的含水量, 随聚合前单体浓度 (HEA 和 GMA 的和) 的增加而减少。根据最小二乘法, 对高分子的含水量 y 和单体浓度 x 进行了回归分析, 其回归方程为 $y = 111.325 - 0.9515x$, 相关系数 $r = -0.99960$ 。这结果说明了单体共混体系

Tab 1. The relation between monomer composition and water content of polymer, mechanical strength of polymer or ethanol productivity of immobilized yeast cells with the polymer carriers

Monomer composition/%			Water content	Mechanical strength	Ethanol productivity
HEA	GMA	water	in polymer /%	of polymer	/mg·ml ⁻¹ ·h ⁻¹
40	40	20	34.38	hard	12.0
17	6	77	90.96	better	29.0
11	9	80	92.60	better	28.0
20	10	70	85.20	better	28.0
7	7	86	94.58	soft	27.0

中单体浓度越大,水的比例越少,聚合解冻后高聚物内部的空孔就越少,结构越紧密,因此机械强度高,吸水性差;反之,内部空孔多,机械强度差,吸水性强,含水量高。

2.2 酵母的固定化及其活性

图1可表示出酵母细胞吸附在表面后逐步向载体内部“渗入”的过程。经24 h 有氧培养后,酵母细胞已“渗入”到载体内部的大部分地方。

在72 h 固定化后,固定化酵母在无氧条件下进行发酵。各种固定化酵母的活性由表1可以看到,用 poly(HEA-GMA)固定化酵母生产乙醇能力都显著高于游离酵母细胞。其中用 17%:6%(HEA:GMA)合成的 poly(HEA-GMA)固定化酵母的生产乙醇能力约是游离细胞的4倍。

2.3 固定化酵母培养时间和发酵时间对乙醇转化率的影响

图2表明了固定酵母的培养时间对乙醇转化率的影响,固定化酵母不仅具有较高的活性,而且固定化的酵母细胞能不断增殖,保持较长的使用寿命。

图3表示了固定化酵母的发酵时间对乙醇转化率的影响。用 17%:6%(HEA:GMA)合成的 poly(HEA-GMA)固定化酵母在60 min 无氧发酵后,其葡萄糖转化成乙醇的转化率超过40%,而游离细胞在60 min 发酵后,其转化率仅10%左右。

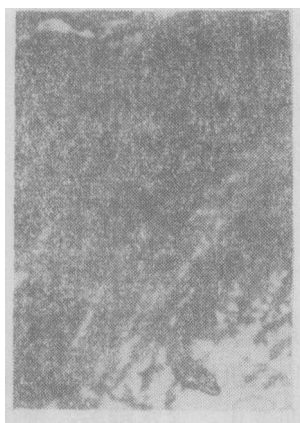


Fig 1. process of immobilization of yeast cell
black part: yeast cells entered to the carrier
white part: polymer carrier

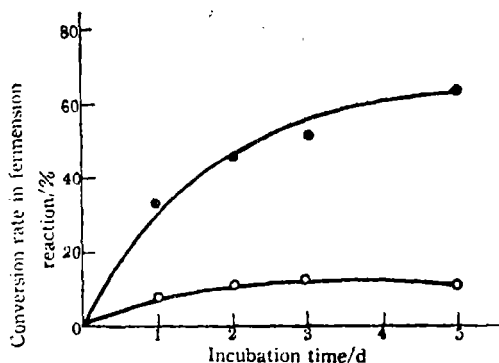


Fig 2. Effect of incubation time on ethanol conversion of glucose
Carrier: 20%:10% poly(HEA-GMA)
Fermentation time: 60 min
(●) immobilized cells (○) free cells

2.4 高聚物的性质同固定化酵母活性的关系

高聚物含水量同固定化酵母活性的关系如图4所示。随着高聚物含水量增加,固定化酵母的生产乙醇能力逐渐增加,当达到最大值后,高聚物含水量进一步增加,固定化酵母的活性迅速下降。这是由于单体共混溶液降到 -78°C 时,在共混溶液中的水结成冰块,并从单体溶液中析出。单体共混液辐射共聚后,在室温下,冰块融化,在高聚物内部形成了孔洞结构。当单体共混溶液中加入的水越多,高聚物含水量也越大,同时孔洞就越多,孔径也越大,酵母就容易通过孔洞进入高分子内部,氧气、底物和产物的扩散较容易,因此单位体积酵母数目增加,酵母也具有较高的活性,生产乙醇能力就较高。但是,当单体共混溶液中水的比例进一步增加,高聚物含水量更大,导致高聚物的机械强度下降,在较大的作用力下易破碎。另外,由于孔径过大,细胞易进入,也易泄漏,单位体积高聚物内的细胞数将减少,因此当高聚物的含水量超过一定值后,固定化酵

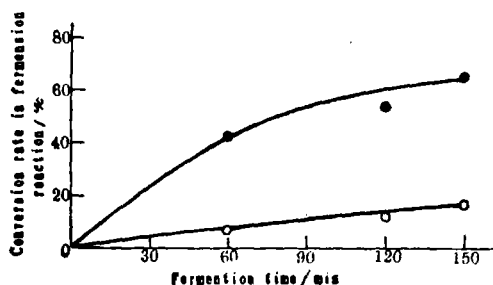


Fig 3. Time conversion curves of fermentation reaction with immobilized and free yeast cells
(●) immobilized yeast cells; yeast cells immobilized and incubated aerobically for 72 h, component of carriers for immobilization: HEA 17%, GMA 6 %
(○) free yeast cells

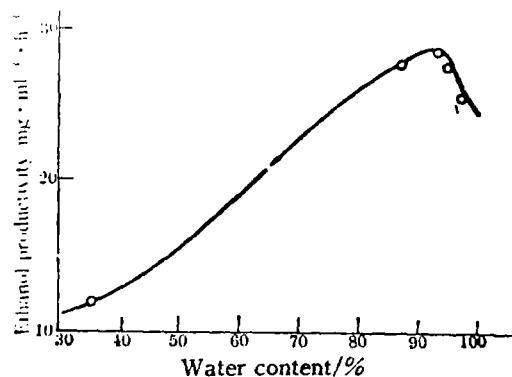


Fig 4. Dependence of ethanol productivity on the water content of polymer carriers with which immobilized yeast cells

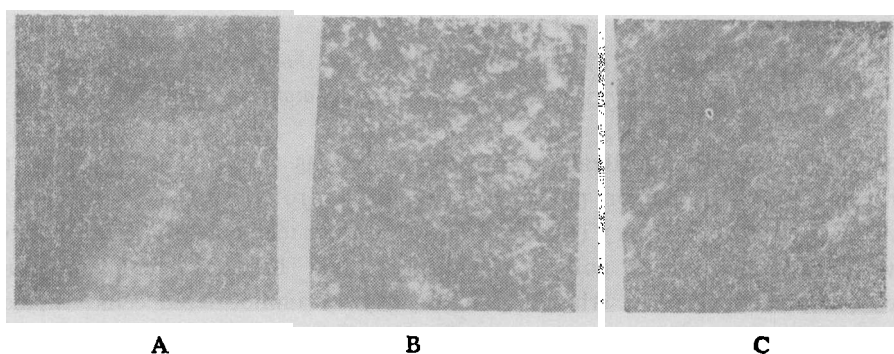


Fig 5. Stae of immobilized yeast cells with poly (HEA-GMA) polymer carriers at 30°C under aerobic condition for 72 h
HEA:GMA(A) 40%:40%, (B)17%:6%, (C)7%:7%

母的生产乙醇能力反而下降。

图 5 表示了高聚物载体内部结构和固定化酵母的生长状态。图 5 A 是由 40%:40%(HEA:GMA)合成的 poly(HEA-GMA), 内部结构非常致密, 仅有极少量的酵母被固定化, 因此, 生产乙醇能力较低; 而由 17%:6%合成的 Poly(HEA-GMA)的内部充满着酵母细胞, 因此具有较高的生产乙醇能力(B); 图 5C 表示了由 7%:7%合成的 poly(HEA-GMA)固定化酵母的生长状态, 载体孔径较大, 载体内部零星分散着酵母群, 说明了有些酵母已经流失, 因此生产乙醇能力稍低。因此可认为, 在低温辐射聚合高聚物固定化酵母细胞时, 可通过改变单体种类和单体溶液的浓度, 来制备适宜于固定化酵母的高聚物材料, 使之具有较高的固定化酵母活性。

另外, 通过吸附增殖法来固定化酵母细胞, 可避免在载体合成中存在有催化剂、交联剂或其它反应试剂等杂质以及剧烈的化学反应对细胞活性的影响, 从而可提高固定化酵母的活性。

参 考 文 献

- 1 Mitsura Wada, Jyoji Kato, Ichiro Chibata. Microbiol. Biotechnol., 1980, 10: 275
- 2 Ayknt G, Hasirci V N, Alaeddinoglu G. Biomaterials, 1988, 9: 169
- 3 Fujimura T, Kaetsu I. Int. J. App. Radiat. Isot., 1983, 34(6): 929
- 4 Fujimura T, Kaetsu I. Naturforsch, 1985, 40(c): 576
- 5 Fujimura T, Kaetsu I. Appl. Biochem. Biotechnol., 1983, 8: 145
- 6 Bonichsen R. Method of enzymatic analysis, 1971, Academy Press, New york, 285

IMMOBILIZATION OF YEAST CELLS WITH COPOLYMER BY RADIATION POLYMERIZATION OF HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC MONOMERS

Lu Zhaoxin

(*Institute of Application of Atomic Energy, Jiangsu Academy of
Agricultural Sciences, Nanjing 210014*)

Takashi Fujimura

(*Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic
Energy Research Institute, Takasaki*)

ABSTRACT The immobilization of yeast cells was carried out by using the copolymer produced by radiation polymerization of hydroxyethyl acrylate (HEA) and glyciolyl methacrylate (GMA) monomer at -78°C low temperature. The immobilized cells with the copolymer, poly (HEA-GMA) had higher ethanol productivity than free cells. However, the ethanol productivity of immobilized cells varied with the composition of copolymer, in which the ethanol productivity of immobilized yeast cells with the copolymer from 17% HEA and 6% GMA was the highest, 29 mg/ml·h, increasing by 3 times in comparison with that of free cells. And it was obvious that the activity of immobilized yeast cells was higer when the concentration of monomer was 20% —30%. In this work, the relation between the properties of copolymer and the ethanol productivity of immobilized yeast cells was also investigated.

KEYWORDS Copolymer, Radiation polymerization, Immobilization, Yeast cells, Ethanol