

学校代码: 10251
学 号: 030091137

華東理工大學

硕 士 学 位 论 文

题 目 利用菊粉和木薯淀粉生产高浓度山梨醇和葡萄
糖酸的生物技术

专 业 生物化工

研究方向 生物质能源

姓 名 安克红

导 师 鲍杰教授 胡凤仙副教授

定稿时间: 2012年4月10日

分类号: Q815 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学

硕士专业学位论文

利用菊粉和木薯淀粉生产高浓度山梨醇和葡萄糖酸的生物技术

安克红

指导教师姓名: 鲍杰 教授 胡凤仙 副教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2012-4-10 论文答辩日期: 2012-5-17

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 储矩教授

评阅人: 李志敏副教授 张小希高级工程师

作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

利用菊粉和木薯淀粉生产高浓度山梨醇和葡萄糖酸的生物技术

摘要

本课题利用菊粉和木薯淀粉这两种廉价丰富的生物质原料来生产山梨醇和葡萄糖酸。首先,在菊粉的水解过程中,糖化酶 GA-L NEW 以菊粉为基质时表现出菊粉酶的性质,其酶活达到 20 U/mL。利用这种价格低廉且商业化的糖化酶代替菊粉酶水解菊粉,同时添加液化后的木薯淀粉进行共糖化,获得含有等摩尔果糖和葡萄糖的混合水解液。在固含量 50% (w/w)的菊粉和木薯淀粉混合水解液中,高糖浓度形成的渗透压对重组运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* ZM4) Entner-Doudoroff (ED)途径中的关键酶形成强烈抑制,从而有效遏制了副产物乙醇的生成,山梨醇对果糖底物的得率近 100%,产率达到 6.80 g/(g cells h)。将未经任何处理的新鲜细胞固定在聚乙烯醇-海藻酸钠载体上,催化混合水解液中的果糖和葡萄糖,乙醇的生成也被完全抑制。固定化细胞可以有效循环利用 4 次,山梨醇的浓度达到 180 g/L,果糖的转化率为 97.3%。本研究提出了一种利用廉价的商业酶同时水解菊粉和木薯淀粉,经重组的运动发酵单胞菌作为细胞催化剂进行生物转化制备山梨醇和葡萄糖酸的新过程技术,从而得到高浓度的山梨醇和葡萄糖酸混合物,为生物法生产山梨醇和葡萄糖酸开辟了一个新的基质来源。

关键词: 山梨醇; 菊粉; 木薯淀粉; 糖化酶 GA-L NEW; 固定化重组运动发酵单胞菌

Biotransformation of Inulin and Cassava Starch into High Titer Sorbitol and Gluconic Acid

Abstract

A new bioprocess for production of sorbitol and gluconic acid from two low value biomasses, inulin and cassava starch was proposed. A commercial glucoamylase GA-L NEW demonstrated high inulinase activity of 20 U/mL in the hydrolysis of inulin, and it was used for simultaneous saccharification of inulin and cassava starch to obtain the mixed hydrolysate with equimolar glucose and fructose, replacing the inulinase used for inulin hydrolysis. Under the solids content 50% of mixed hydrolysate, the key enzymes in the ED pathway of *Zymomonas mobilis* cells were inhibited strongly by the high osmotic stress of fructose and glucose in the bioconversion, so the formation of ethanol was restrained completely. A satisfactory sorbitol yield close to the theoretical level (100%) and the high specific sorbitol productivity of 6.80 g/(g cells h) were obtained. The fresh recombinant *Z. mobilis* cells immobilized on the polyvinyl alcohol (PVA)-alginate carriers were used to convert the inulin and cassava starch hydrolysate into sorbitol and gluconic acid without permeabilization or ions treatment, and the formation of ethanol byproduct was efficiently inhibited. The process were performed for multiple successive batches, and a high sorbitol concentration of 180 g/L and a high yield of 97.3% were obtained using the inulin and cassava starch hydrolysate. The present study provided a practical process to produce high titer sorbitol and gluconic acid from the low cost feedstocks using the fresh recombinant *Z. mobilis* cells as catalyst and the commercial glucoamylase for simultaneous saccharification of inulin and cassava starch, proposing an efficient way for sorbitol and gluconic acid production from low value biomasses.

Keywords: sorbitol; inulin; cassava starch; commercial glucoamylase GA-L NEW; immobilized recombinant *Zymomonas mobilis*

目录

前言	1
第一章 文献综述	2
1.1 山梨醇和葡萄糖酸的理化性质以及工业应用	2
1.2 运动发酵单胞菌利用果糖和葡萄糖生物法生产山梨醇和葡萄糖酸	3
1.3 利用不同生物质生物法生产山梨醇和葡萄糖酸	7
1.4 固定化方法生产山梨醇和葡萄糖酸	8
1.5 菊粉和木薯淀粉的糖化及应用	9
1.6 本课题的研究内容与意义	10
第二章 材料与amp;方法	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 原料	11
2.1.2 菌种和培养基	11
2.1.3 实验仪器与试剂	11
2.2 分析方法	13
2.2.1 细胞干重的测定方法	13
2.2.2 葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的测定方法	14
2.2.3 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖	17
2.2.4 各种组分的液相测定方法	19
2.3 运动发酵单胞菌的培养过程	18
2.3.1 菌种保藏方法	18
2.3.2 菌种培养方法	18
2.3.3 细胞固定化方法	18
2.4 酶液表观动力学研究	19
2.4.1 温度和 pH 对酶液酶活以及稳定性影响	19
2.4.2 金属离子对酶液酶活的影响	19
2.4.3 表观动力学参数的确定	19
2.5 菊粉和木薯淀粉水解过程	19
2.5.1 木薯淀粉液化条件的确定	20
2.5.2 菊粉和木薯淀粉共水解过程	20

2.6	利用新鲜游离的细胞生产山梨醇和葡萄糖酸.....	21
2.6.1	不同固含量水解液对生物催化过程的影响.....	21
2.6.2	不同细胞量对生物催化过程的影响.....	21
2.6.3	新鲜游离的细胞循环利用生产山梨醇和葡萄糖酸.....	21
2.7	利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸.....	21
2.7.1	固定化细胞催化生产山梨醇和葡萄糖酸.....	21
2.7.2	不同温度和 pH 条件下的生物催化过程.....	21
2.7.3	固定化细胞酶活损失原因的探索.....	21
2.8	木薯淀粉水解液培养细胞.....	22
2.9	转化率的定义.....	22
第三章 实验结果和讨论.....		24
3.1	糖化酶以菊粉为底物的表观动力学研究.....	24
3.1.1	温度和 pH 对酶液酶活以及稳定性影响.....	24
3.1.2	金属离子对酶液酶活的影响.....	24
3.1.3	表观动力学参数的确定.....	26
3.2	菊粉和木薯淀粉水解过程.....	27
3.2.1	木薯淀粉液化条件的确定.....	27
3.2.2	菊粉和木薯淀粉共水解过程.....	27
3.3	利用新鲜游离的细胞生产山梨醇和葡萄糖酸.....	29
3.3.1	不同固含量水解液对生物催化过程的影响.....	29
3.3.2	不同细胞量对生物催化过程的影响.....	30
3.3.3	新鲜游离的细胞循环利用生产山梨醇和葡萄糖酸.....	31
3.4	利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸.....	34
3.4.1	固定化细胞载体的选择及改进.....	34
3.4.2	利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸.....	35
3.4.3	不同温度和 pH 条件下的生物催化过程.....	36
3.4.4	固定化细胞酶活损失原因的探索.....	38
3.5	木薯淀粉水解液培养细胞.....	40
第四章 结论与展望.....		41
4.1	以菊粉为基质, 糖化酶 GA-L NEW 的表观动力学研究.....	41
4.2	菊粉和木薯淀粉的共水解过程.....	41
4.3	新鲜细胞催化菊粉和木薯淀粉混合水解液生产山梨醇和葡萄糖酸.....	41
4.4	固定化方法的应用及催化过程.....	43
4.5	展望.....	43

参考文献.....	44
致谢.....	48
硕士期间发表论文.....	49

前言

山梨醇是一种非常重要的化学中间体,在工业上主要作为甜味剂、润湿剂、调质剂、软化剂等^[1]。目前,山梨醇的生物法生产主要是利用运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)周质空间内的葡萄糖果糖氧化还原酶(GFOR)将果糖和葡萄糖分别转化为山梨醇和葡萄糖酸^[2]。但是由于葡萄糖和果糖这两种原料价格相对较高,目前一些价格低廉的生物原料,比如甘蔗糖蜜^[3]、菠萝汁^[4]、菊芋^[5]等逐渐成为代替葡萄糖和果糖基质的选择。其中菊芋的主要成分为菊粉,它是由 β -2,1-糖苷键连接的聚果糖直链结构,其末端连接葡萄糖残基。菊粉作为一种廉价的基质可以用来生产生物乙醇^[6]、单细胞油脂^[7]、乳酸^[8]以及其他生物化学产品。

利用固定化的运动发酵单胞菌作为催化剂来生产山梨醇和葡萄糖酸的研究有很多,通常细胞先经过渗透处理在进行固定化以避免副产物乙醇的生成^{[9][10][11]}。但是, Jang 等人指出渗透处理的固定化细胞在高糖浓度下进行催化时,有相当一部分的果糖和葡萄糖剩余,从而导致产物得率的降低^[12]。此外, Kim 等人报道了一种利用菊芋这种廉价的基质和葡萄糖来生产山梨醇和葡萄糖酸的方法,先将真空干燥后的壳聚糖和菊粉酶液体混合,并利用戊二醛进行交联,将壳聚糖和细胞悬浮固定于海藻酸钠颗粒上;在连续操作的过程中,利用一种循环填充床式反应器来进行山梨醇的生产,但是最终山梨醇和葡萄糖酸的最终得率仅为 44.4%^[4]。因此,在固定化的运动发酵单胞菌作为催化剂生产山梨醇和葡萄糖酸的过程中,果糖的转化率以及山梨醇的得率有待提高。

本文的主要研究目标是利用菊粉和木薯淀粉这两种廉价丰富的基质来开发一种新型的山梨醇和葡萄糖酸的生物生产技术。首先我们发现商业化的糖化酶 GA-L NEW 可以水解菊粉。其次,将菊粉和木薯淀粉共同水解,获得含有等摩尔葡萄糖和果糖的混合水解液。最后,本课题对运动发酵单胞菌的固定化过程以及生物转化过程进行研究。考察不同固含量水解液对生物转化过程的影响,利用高糖浓度下副产物乙醇的生产被抑制的原理,获得合适的水解液固含量。考虑到催化剂在整个生产过程中占据的成本,对细胞进行固定化,实现细胞的重复循环利用。将重组运动发酵单胞菌固定在聚乙烯醇-海藻酸钠载体上,用于转化混合水解液中的果糖和葡萄糖生产山梨醇和葡萄糖酸。整个过程中,固定化细胞循环利用 4 次,山梨醇的浓度为 180 g/L,转化率和比产率分别为 97.33% 和 0.98 g/(g cells h)。本文开发了一种利用廉价的基质菊粉和木薯淀粉以及廉价的商业酶来生产山梨醇和葡萄糖酸具有商业前景的生物技术。

第一章 文献综述

1.1 山梨醇和葡萄糖酸的理化性质以及工业应用

山梨醇广泛存在于水果中，比如苹果、樱桃、李子、梨等，它的甜度是蔗糖的 60%。在工业上主要作为甜味剂、润湿剂、调质剂、软化剂等来使用；接近一半的山梨醇是以溶液的形式使用，大概有 1/4 是用于维生素 C 的合成^{[1][13]}。

目前，山梨醇的工业生产方法主要是 D-葡萄糖浆催化加氢的方法。在间歇反应生产方式中，首先将 3%-6% (w/w) 的镍悬浮于 50% 的葡萄糖溶液，然后在 pH 5-6、120-150 °C、70 bar 进行 2-4 h 的催化反应；在连续生产方式中，首先固定 2% 的镍，然后在 140-170 °C、180-200 bar 进行催化。最后将山梨醇溶液冷却，经沉淀和过滤收集山梨醇，在通过离子交换柱纯化得到山梨醇^[4]。

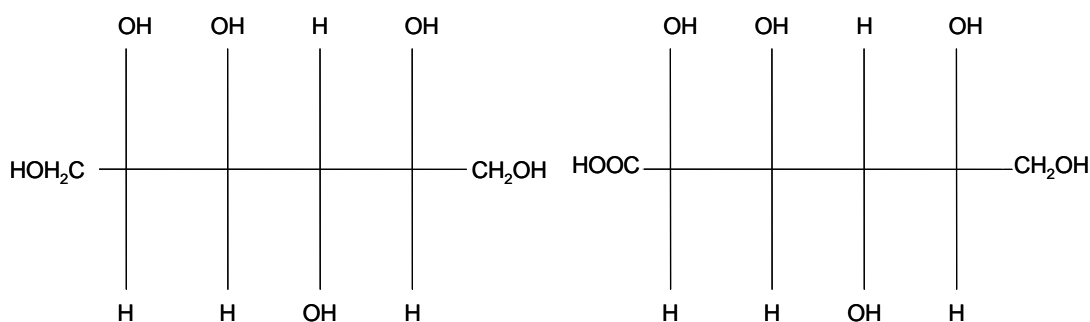


图 1.1 山梨醇（左）和葡萄糖酸（右）的化学结构式

Fig. 1.1 The structural formula of sorbitol (left) and gluconic acid (right)

葡萄糖酸，一种无腐蚀性的、无挥发性的、无毒的温和型的有机酸，在工业上主要用作缓冲剂、固化剂等。在全球市场上，除了抗生素和氨基酸，葡萄糖酸是第三大发酵类产品。目前，葡萄糖酸的氧化法工艺比较简单，转化效率比较高，但是在整个反应过程中存在一些副反应，会给后续的分选纯化过程造成很大的麻烦，因此生物发酵法逐渐收到人们的青睐。而生物发酵法主要有两种，一种是利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 消耗葡萄糖，然后发酵液经过浓缩结晶纯化等过程得到葡萄糖酸盐，由于生物发酵过程中存在菌体，需要后续的无菌化操作过程；另一种是利用运动发酵单胞菌催化果糖和葡萄糖来生产山梨醇和葡萄糖酸，此过程由于基质较为昂贵，产品的分离纯化存在一定问题，目前还没有实现工业化生产。

1.2 运动发酵单胞菌利用果糖和葡萄糖生物法生产山梨醇和葡萄糖酸

运动发酵单胞菌是一种革兰氏阴性菌，属于兼性厌氧微生物，在 25-31 °C 无氧环境下生长最好，有氧条件下也可以存活，电镜照片如图^[14]。

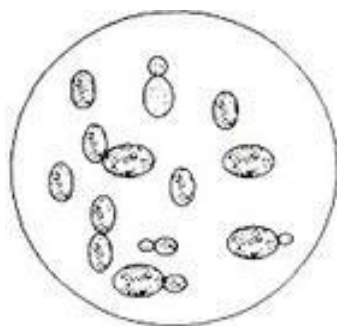


图 1.2 运动发酵单胞菌的电镜照片

Fig 1.2 The electron micrograph of *Zymomonas mobilis*

运动发酵单胞菌的代谢过程研究主要分为几个方面。第一，运动发酵单胞菌在厌氧条件下可以将 1 分子葡萄糖分解为 2 分子的乙醇和 2 分子的二氧化碳；在此代谢过程中，仅得到 1 摩尔的三磷酸腺苷（ATP）。第二，运动发酵单胞菌在以葡萄糖为单一碳源时，大部分的葡萄糖分解为乙醇和二氧化碳，其中大约有 2-5% 的葡萄糖用于自身生物体的生长；在以果糖为单一碳源时，大部分的果糖转化为乙醇和二氧化碳，例如在 15% 的果糖浓度下，乙醇的转化率为理论值的 90%，但是细胞的得率仅为同等浓度葡萄糖下的一半，与此同时，有一些副产物比如甘油、山梨醇、二羟基丙酮，其中山梨醇是在果糖消耗的过程中产生的，而甘油和二羟基丙酮是在发酵结束之后产生的；在以葡萄糖和果糖同时作为碳源时，运动发酵单胞菌利用周质空间内的葡萄糖果糖氧化还原酶将葡萄糖和果糖转化为葡萄糖酸和山梨醇，同时会有部分乙醇产生，这主要取决于基质条件；在以蔗糖为碳源的情况下，蔗糖在细胞外转化为葡萄糖和果糖，然后通过单向的传递系统不消耗任何代谢能量的进入细胞周质空间内^[15]。

葡萄糖果糖氧化还原酶经过研究得到不断的发展。Barrow 等人首先证明了在运动发酵单胞菌中山梨醇的生成是由果糖而来，这个过程并不是在磷酸化阶段形成，而是果糖在一种还原酶作用下转化为山梨醇^[16]。继而 Leigh 等人正确提出了运动发酵单胞菌生产山梨醇和葡萄糖酸的路径，他们指出首先葡萄糖在葡萄糖脱氢酶的作用下生成葡萄糖酸内酯，然后自发转化为葡萄糖酸盐，而果糖在一个未知的聚合脱氢酶作用下转化为山梨醇^[17]。随后 Zachariou 和 Scopes 研究了运动发酵单胞菌中山梨醇生成的关键酶葡萄糖果糖氧化还原酶，并将此酶纯化，测定其分子量为 40KD。第一，葡萄糖果糖氧化还原酶较为适合的 pH 为 6.2；第二，葡萄糖果糖氧化还原酶和 NADP 相连接并作为氢的载体；第三，葡萄糖果糖氧化还原酶在以葡萄糖为单一碳源时表现出较高的酶活，而当果

糖存在时酶活会受到一定的抑制,这可能是因为果糖为碳源时无法产生葡萄糖酸内酯酶^[18]。Hardman 和 Scopes 指出此催化反应的机制是典型的乒乓机制,葡萄糖转化为葡萄糖酸为第一个步骤,此过程中释放出葡萄糖果糖氧化还原酶,然后再将果糖转化为山梨醇^[19]。Loos 等人对葡萄糖果糖氧化还原酶进行纯化均质,并利用免疫金电子显微镜标签法对此酶进行定位,指出葡萄糖果糖氧化还原酶位于运动发酵单胞菌的周质空间内^[20]。

Gollhofer 等人研究了在催化过程中阻止不可逆转的酶钝化的方法。葡萄糖果糖氧化还原酶在 25 °C 时对于任何产物和底物的存在,酶活都可以保持稳定;但是随着催化过程的进行,酶活会被快速钝化;半胱氨酸的丢失可能是造成酶活损失的重要原因,但是硫醇试剂、活性谷胱甘肽和尿素等能有效保护葡萄糖果糖氧化还原酶的酶活^[21]。张晓梅等人指出存在于运动发酵单胞菌中的葡萄糖果糖氧化还原酶可以还原木糖为木糖醇,目前这个机制的具体原因还不清楚,可能类似于产生山梨醇和葡萄糖酸的乒乓机制^[22]。

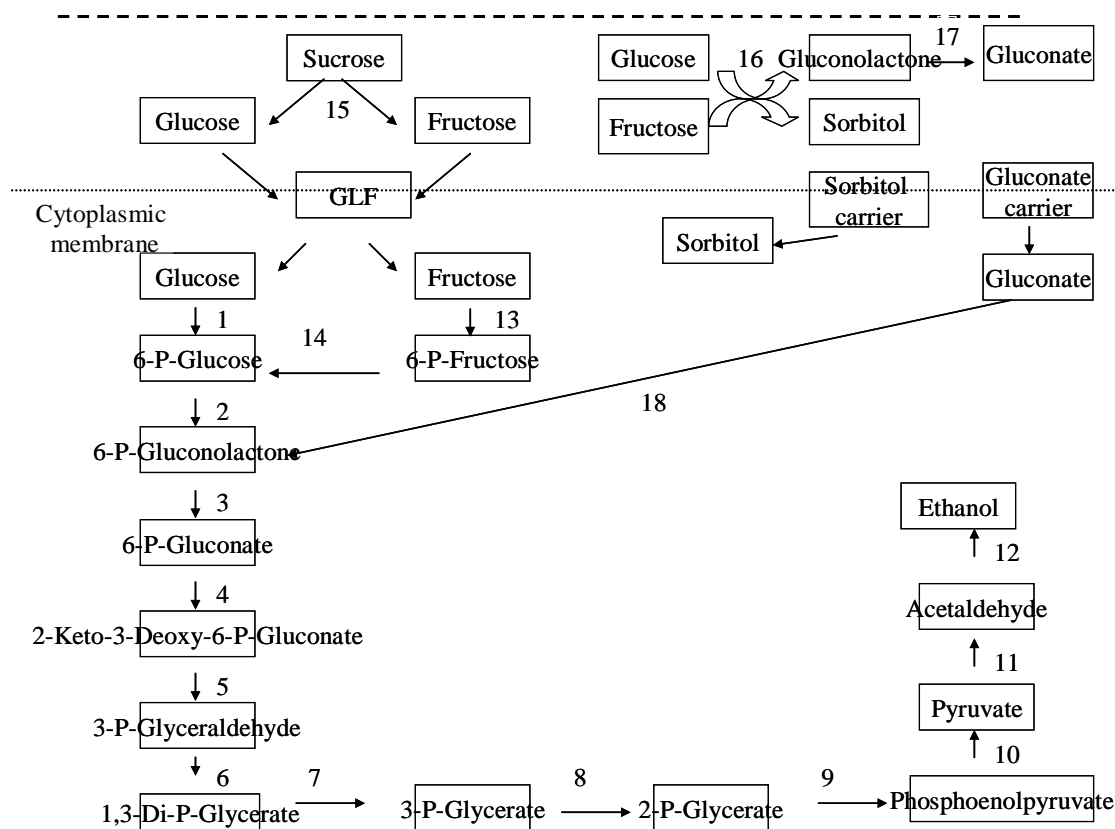


图 1.3 葡萄糖、果糖和蔗糖在运动发酵单胞菌体内的代谢路径

Fig. 1.3 Mechanism of glucose and fructose and sucrose in *Z. mobilis*

注: GLF, 葡萄糖运输载体。编号对应的酶为: 1. 葡萄糖激酶 (glucokinase); 2. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose 6-phosphate dehydrogenase); 3. 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶 (phosphogluconolactonase); 4. 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶 (6-phosphogluconate); 5. 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶 (2-keto-3-deoxy-gluconate

aldolase); 6. 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); 7. 磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase); 8. 磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglyceromutase); 9. 烯醇酶 (enolase); 10. 丙酮酸激酶(pyruvate kinase); 11. 丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase); 12. 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase); 13. 果糖激酶 (Fructokinase); 14. 6-磷酸葡萄糖异构酶 (6- phosphate -Glucose isomerase); 15. 蔗糖酶 (levansucrase); 16. 葡萄糖果糖氧化还原酶 (glucose-fructose oxidoreductase); 17. 葡糖酸内酯酶 (gluconolactonase); 18. 葡糖酸激酶 (gluconate kinase)。

山梨醇的生产过程经过一系列的发展过程。Viikari 在 1984 年以蔗糖为基质利用运动发酵单胞菌生产乙醇，由于寡糖和山梨醇的形成，乙醇的得率明显降低，其中有 8% 和 11% 的蔗糖分别转化为寡糖和山梨醇^[23]。随后 Barrow 等人利用运动发酵单胞菌来生产山梨醇，在 250 g/L 的蔗糖浓度下可以得到 43 g/L 的山梨醇^[16]。Bringer-Meyer 等人在 1985 年得到一株运动发酵单胞菌的突变株，将果糖激酶活性降低以减少果糖向乙醇的转化，从而提高山梨醇的产量，最终可以得到 60 g/L 的山梨醇，但是在山梨醇的生产过程中伴随有乙醛、葡萄糖酸盐和乙偶姻的产生^[24]。

为了提高山梨醇的得率，将运动发酵单胞菌经过各种处理以阻断乙醇生成途径，其中处理细胞的方法之一包括：甲苯或 CTAB 等强离子剂的渗透处理、干燥或冻融处理、金属离子渗透处理等。

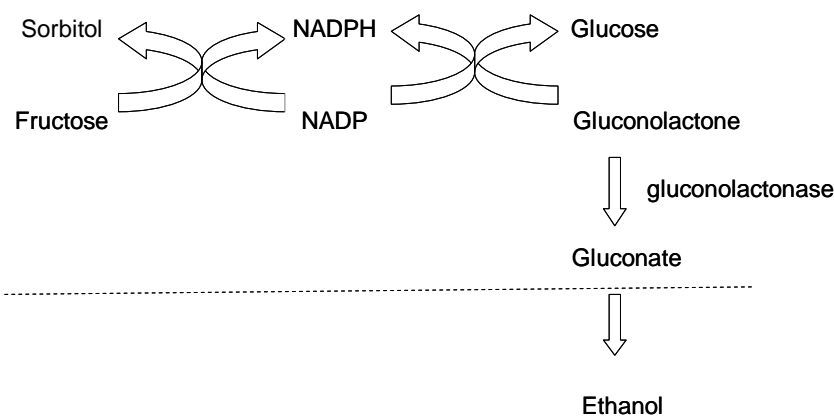


图 1.4 渗透处理的运动发酵单胞菌生产山梨醇和葡萄糖酸的机制

Fig. 1.4 The mechanism of sorbitol and gluconic acid production from fructose and glucose using permeabilized *Z. mobilis*

注：虚线以下的路径被阻断。

Chun 和 Rogers 利用经过甲苯处理过的运动发酵单胞菌来催化 60% 的糖溶液（300 g/L 葡萄糖和 300 g/L 果糖），最终得到 290 g/L 的山梨醇和 283 g/L 的葡萄糖酸^[9]。Rehr 等人将葡萄糖作为唯一碳源来培养运动发酵单胞菌，然后利用未经任何处理的细胞转化

超过 60% 的葡萄糖果糖溶液，山梨醇的最大浓度仅为 240 g/L；以强离子聚合剂处理过的细胞进行转化过程，山梨醇和葡萄糖酸的最大浓度达到 295 g/L，且过程中没有乙醇生成^[10]。Ichikawa 等人将菌体进行干燥处理，乙醇生成途径中的一些关键酶受到损害，最终得到高浓度的山梨醇和葡萄糖酸^[25]。Bringer-Meyer 和 Sahn 通过冻融的方式将细胞进行处理（先在 -20 °C 进行冷冻处理然后再常温下进行解冻），山梨醇和葡萄糖酸的产率几乎接近 100%^[26]。Jang 等人利用经过溴化十六烷基三甲胺（CTAB）处理过的运动发酵单胞菌来生产山梨醇，其中最合适的处理条件为 0.2% 的 CTAB 在 4 °C 处理 10 min，山梨醇和葡萄糖酸的产率接近 100%^[27]。Chang 等人构建了一株基因工程菌使葡萄糖果糖氧化还原酶过量表达，构建的基因工程菌酶活是野生菌的两倍多，随后他们考察了各种金属离子对乙醇和山梨醇生成的影响，结果表明 Zn^{2+} 可以有效抑制 ED 途径，山梨醇的产率增加到 100%；而 Ca^{2+} 也同样提高山梨醇的产率，同时过程中形成的葡萄糖酸钙使得分离过程更加容易^[28]。

但是这些处理方式会造成葡萄糖酸和山梨醇的化学污染，在食品工业应用时会增加分离纯化的工序等。Silveira 等人利用未经任何处理的新鲜细胞催化果糖和葡萄糖生成山梨醇和葡萄糖酸进行了研究，在总糖浓度达到 650 g/L，两种产物的转化效率达到 91%，其中葡萄糖酸和山梨醇的产率分别为 1.6 g/(g cells h) 和 1.5 g/(g cells h)；当总糖浓度达到 750 g/L，产率并没有进一步增加，这主要是由于催化时间有所延长，而产物浓度没有提高。作者认为这种高转化效率是底物和产物代谢过程的连续抑制导致葡萄糖果糖氧化还原酶/葡萄糖酸内酯酶优先利用果糖和葡萄糖生成山梨醇和葡萄糖酸，而没有首先经过 ED 途径代谢生成乙醇^[29]。

在山梨醇和葡萄糖酸的生产过程中，不同糖浓度所产生的渗透压有所不同，对代谢产物有一定影响。Loos 等人认为在高糖浓度下山梨醇的生成有利于运动发酵单胞菌的存活，当运动发酵单胞菌以 36% (w/v) 的蔗糖为基质时，通过生成山梨醇克服高糖浓度所带来的渗透压，且没有其他副产物的产生^[30]。Barros 等人研究了运动发酵单胞菌在高糖浓度下生长时超声对山梨醇释放过程的影响，他们认为超声处理不会改变山梨醇的浓度，且山梨醇的最好的浓度是在培养 36 h 时为 36.09 g/L^[31]。同时 Barros 等人考察了在高糖浓度下山梨醇在运动发酵单胞菌中的合成情况，在蔗糖向葡萄糖和果糖转化的过程中增加了基质的渗透压，但是过度的增加渗透压可能会降低山梨醇的产量；在 200 g/L 的蔗糖浓度下，添加转化酶和不添加转化酶，山梨醇的浓度分别为 42.35 g/L 和 38.42 g/L；而在 300 g/L 的蔗糖浓度下，添加转化酶和不添加转化酶，山梨醇的浓度分别为 60.4 g/L 和 19.14 g/L^[32]。

在山梨醇的生产过程中，除了运动发酵单胞菌，还有一些其他菌株。比如 Boeck 等人描述了一株缺失山梨醇转运系统和甘露醇-1-磷酸脱氢酶的干酪乳杆菌菌株生产山梨醇的过程，利用工业生产的废弃物-乳清渗透物，9.4% 的乳糖转化为山梨醇^[33]。Duvnjak 等人将克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 进行原生质体融合，然后找到一株基因稳定性融合体，既具有菊粉酶活性，又可以生产

山梨醇；在适合的发酵条件下，以菊芋为基质山梨醇的最大浓度为 4.87 g/100 mL，但是在代谢过程中，山梨醇逐渐被消耗，而且后续山梨醇和乙醇的分离没有得到进一步的研究^[34]。Tani 和 Vongsuvalert 将 D-葡萄糖通过木糖异构酶转化为 D-果糖，山梨醇脱氢酶和博伊丁假丝酵母(*Candida boldinii*) 细胞内部甲醇氧化酶系统中的 NADH 相连接，可以将 D-果糖还原为山梨醇；但是由于此过程中山梨醇脱氢酶需要大量纯化，目前仅能适用于实验室规模^[35]。

在葡萄糖酸的生产过程中，还有一些其他菌株。Znad 等人利用黑曲霉在纯氧和空气两种不同条件研究葡萄糖酸的生成^[36]；Roukas 等人研究固体培养基中利用黑曲霉 ATCC10577 进行葡萄糖酸和柠檬酸的生产，最终柠檬酸和葡萄糖酸的得率分别为 8% 和 63%^[37]。

1.3 利用不同生物质生物法生产山梨醇和葡萄糖酸

在山梨醇和葡萄糖酸和生物法生产中，由于市场中葡萄糖酸和山梨醇相比于果糖和葡萄糖来说价格较为低廉，所以利用廉价的基质来代替葡萄糖和果糖显得极其重要。

Ro 和 Kim 利用蔗糖和葡萄糖混合物中生产山梨醇和葡萄糖酸^[11]。Barros 等人利用蔗糖生产山梨醇，在 200 g/L 的蔗糖中，加入转化酶后，山梨醇浓度 42.35 g/L，未加入转化酶时，山梨醇浓度 38.42 g/L^[31]。利用蔗糖作为葡萄糖和果糖的替代物，主要是因为工业上有大量的糖溶液作为废弃物被扔掉，而这些糖溶液一般含有 30-40% 的蔗糖。与此同时，蔗糖在转化酶的作用下很容易被水解为果糖和葡萄糖，然后将蔗糖水解的果糖和葡萄糖转为山梨醇和葡萄糖酸。

Kim 等人利用运动发酵单胞菌的葡萄糖果糖氧化还原酶和菊粉酶，从菊芋和葡萄糖混合物中生产山梨醇和葡萄糖酸。干菊芋块茎中含有 80% 的聚果糖-菊粉，而菊粉可以通过菊粉酶的水解快速转化为果糖，因此利用菊粉代替果糖和部分葡萄糖来生产山梨醇和葡萄糖酸可以减少基质成本。但是本文在利用液体菊粉酶水解菊粉的过程中，果糖的得率可以达到 98%；而将菊粉酶固定在海藻酸钙上水解菊粉，果糖的得率为 80%；在将几丁质与戊二醛交联固定菊粉酶，再用甲苯处理运动发酵单胞菌，然后与菊粉酶形成藻酸盐固定床，最终菊粉的利用率仅为 44%，因此有大量的果糖剩余而没有被利用，这对于山梨醇和葡萄糖酸的生产来说基质的成本并没有降低，而且底物和产物的同时存在对最终的分离过程造成很大的困扰^[5]。

Cazetta 等人利用甘蔗糖蜜生产山梨醇的方法。甘蔗糖蜜是一种工业生产的副产物，其中蔗糖浓度较高，本文主要优化了糖浓度、温度、搅拌以及时间等培养条件，在最优的条件下 300 g/L 总糖浓度、35 °C、培养 36 h 山梨醇达到最大浓度。本文的研究对象主要是集中在培养条件方面，阐明了生物质培养过程中条件的重要性，在山梨醇合成的过程中葡萄糖酸被逐步代谢成乙醇等物质，山梨醇的浓度也比较低^[2]。

Aziz 等人利用运动发酵单胞菌的葡萄糖果糖氧化还原酶和商业转化酶共同作用将

菠萝汁内的糖类转化为山梨醇。首先转化酶将菠萝内的聚糖转化为单糖，转化率最大为 80%；然后将果糖和葡萄糖分别转化为山梨醇和葡萄糖酸。果糖和葡萄糖的转化率主要受催化初始 pH 的影响，在不控制 pH 情况下，运动发酵单胞菌的葡萄糖果糖氧化还原酶酶活由于葡萄糖酸的生成而不断下降；在控制 pH 的情况下，糖溶液的转化率达到 80%，从而可以得到含有山梨醇的低热量甜味剂。这个过程主要是降低溶液中的热量值，从食品的健康方面考虑^[3]。

这些利用生物质进行的研究中，山梨醇和葡萄糖酸产物的浓度都较低，后续的下游分离工程中会造成大量水资源的浪费，因此得到高浓度的产物是非常值得考虑的因素。

1.4 固定化方法生产山梨醇和葡萄糖酸

Rehr 等人用卡拉胶固定 CTAB 处理过的运动发酵单胞菌，并且用聚乙烯亚胺增加颗粒硬度，在 75 天后细胞的转化率依然没有明显的下降。在连续的两阶段过程中，葡萄糖酸和山梨醇的单位时间的产率分别为 0.19 g/g/h 和 0.21 g/g/h^[10]。

Ro 和 Kim 从蔗糖中生产葡萄糖酸和山梨醇。首先，几丁质与戊二醛交联固定转化酶，首先用甲苯处理运动发酵单胞菌，然后与转化酶形成藻酸盐固定床。在连续搅拌釜中，葡萄糖酸和山梨醇的最大产量分别为 4.51 g/L/h 和 4.60 g/L/h，其中 20% 的基质稀释速率 0.055 h⁻¹，但是由于固定床的阻碍存在，所以操作稳定性很差。在 RPBR 反应器中，250 h 后固定化酶依然保持良好的酶活，没有任何损失^[11]。

Kim 和 Kim 利用菊芋和葡萄糖混合物中生产葡萄糖酸和山梨醇。首先，几丁质与戊二醛交联固定菊粉酶，运动发酵单胞菌甲苯处理，然后与菊粉酶形成藻酸盐固定床。在连续搅拌釜中，葡萄糖酸和山梨醇的最大产量分别为 19.3 g/L/h 和 21.3 g/L/h，但是由于固定床的阻碍存在，所以操作稳定性很差。在 RPBR 反应器，葡萄糖酸和山梨醇的最大产量 23.4 g/L/h 和 26.0 g/L/h，其中 20% 的基质稀释速率 0.35 h⁻¹，循环速率 900 mL/h^[5]。

Jang 等人卡拉胶固定 CTAB 处理过的运动发酵单胞菌，在 60% 含水量的卡拉胶溶液中加入 40% 的多元醇（25 g 甘油和 15 g 丙二醇），然后利用干燥颗粒进行 72 h 的半连续催化过程，酶活损失少于 10%。在两阶段连续反应溶液内，干燥颗粒和未干燥的颗粒都可以获得高的转化率^[12]。

Ferraz 等人研究了不同的固定化方法，较好的方法是将 CTAB 处理过的运动发酵单胞菌固定在中空纤维膜上，其中反应速率为 33 g gluconate/ (g protein h)，而在海藻酸钠固定的细胞中反应速率为 4 g gluconate/ (g of protein h)。在所有的实验中，酶活都有一定的损失，这主要是反应过程中有葡萄糖酸的生成^[38]。

Malvessi 等人考察了基质浓度，pH 以及温度对海藻酸钠固定的运动发酵单胞菌内葡萄糖果糖氧化还原酶的影响。他们指出在 pH 7.8-8.2、47-50°C 比在 pH 6.4、39 °C 条件下酶活提高 80%。进一步研究发现海藻酸钠颗粒影响催化过程中葡萄糖酸的转移。在催化后期，pH 7.8、47 °C 条件下，催化过程停止，这主要是因为颗粒内部 pH 较高，严

重影响了葡萄糖果糖氧化还原酶的酶活。最后，作者提出了一种在催化过程中转换 pH 和温度的策略提高转化效率^[39]。

利用固定化的运动发酵单胞菌作为催化剂通常细胞先经过渗透处理以避免副产物乙醇的生成。但是，当经过渗透处理的固定化细胞在高糖浓度下进行催化的过程中，有相当一部分的果糖和葡萄糖剩余，导致产物得率的降低。此外，Kim 等人报道的一种利用菊芋这种廉价的基质和果糖来生产山梨醇和葡萄糖酸的方法，最终山梨醇和葡萄糖酸的最高得率仅为 44.4%^[41]。因此，在固定化的运动发酵单胞菌作为催化剂生产山梨醇和葡萄糖酸的过程中，果糖的转化率以及山梨醇的得率是非常值得考虑的因素。

1.5 菊粉和木薯淀粉的糖化及应用

菊粉是由 β -2, 1-糖苷键连接的聚果糖直链结构，其末端连接葡萄糖残基，主要存在于菊芋、菊苣等植物的块茎中。菊粉由于其丰富性、廉价性、可再生性受到很多的关注；同时菊粉可以用来生产果糖、乙醇、单细胞蛋白、单细胞油脂、柠檬酸、聚果糖以及其他生物化学产品。目前菊粉酶的生产过程主要是要寻找高活性高产量的菊粉酶。

克鲁维酵母不仅具有菊粉酶活性而且可以生产乙醇，所以利用菊粉可以直接生产生物乙醇。Bajpai 和 Margaritis 利用克鲁维酵母 SM 16-10 从含有 20% 初始还原糖的菊芋汁中发酵乙醇，7 h 后获得 92 g/L 的乙醇。不过由于克鲁维酵母不能耐受高浓度乙醇，所以相对于酿酒酵母来说，在乙醇的浓度和得率上没有优势可言。同时使用黑曲霉突变株 817 和酿酒酵母 1200 进行同步糖化与发酵过程，最终乙醇的浓度可以达到 20%-21%^[40]。Ge 等人将黑曲霉 SL-09 和乳酸菌 (*Lactobacillus sp. G-02*) 在菊芋中共培养，菊粉酶和蔗糖转化酶的合成明显提高，在经过 12 h 的培养时间，菊粉酶的酶活为 275.6 U/mL，转化酶的酶活为 571.8 U/mL，最终乳酸的浓度为 120.5 g/L，得率为 98%^[8]。Zhang 等人将毕赤酵母 (*Pichia guilliermondii*) 中的菊粉酶基因 *INU1* 克隆到酿酒酵母中，形成重组菌株 *Saccharomyces sp. W0*。在 2 L 发酵实验中，乙醇最终浓度为 14.9% (v/v)，其中 95% 的菊粉转化为乙醇、二氧化碳和细胞体^[6]。Zhao 等人利用圆红冬孢酵母 (*Rhodotorula mucilaginaosa*) TJY15a 发酵菊芋水解液来生产单细胞油脂，细胞体内含油率为 48.8%，细胞干重达到 14.8 g/L^[7]。

木薯淀粉主要用来生产乙醇、乳酸、单细胞油脂、果糖糖浆、2, 3-丁二醇、氢气等物质，用木薯淀粉生产葡果糖浆的过程主要是利用糖化酶和葡萄糖异构酶的共同作用，将一部分葡萄糖转化为果糖。目前霉菌主要用作工业糖化酶的生产。糖化酶含有淀粉的结合部位和催化部位，其中结合部位的蛋白质作用于可溶性的淀粉，在不断的水解过程中蛋白质逐渐失去活性。以可溶性淀粉为基质糖化酶最适合的 pH 范围是 4.5-6.5，最合适的温度范围是 50-70 °C。现在糖化酶由于其低廉的价格不仅在淀粉类物质的水解以及发酵上得到应用，在抗生素药物、氨基酸的生产方面都有非常广泛的应用。

目前利用菊粉和木薯淀粉为原料生产山梨醇和葡萄糖酸的研究还没有报道，因此利

用这两种廉价丰富的生物质来生产重要的化学中间体非常值得研究。

1.6 本课题的研究内容与意义

山梨醇是一种非常重要的化学中间体，在工业上的主要应用是作为甜味剂、润湿剂、调质剂、软化剂等。目前，山梨醇的工业化学生产方法可以被污染小较为环保的生物法生产所代替。生物法的主要问题之一是基质的成本问题。

本课题选用菊粉和木薯淀粉这两种廉价丰富的生物质原料做为底物得到果糖和葡萄糖，从而来生产山梨醇和葡萄糖酸。在菊粉的水解过程中，我们发现糖化酶 GA-L NEW 可以水解菊粉，并表现出较强的酶活。目前，菊粉或菊芋的水解主要是依靠菊粉酶，而菊粉酶现在尚未实现工业化规模的生产，价格较为昂贵，利用糖化酶 GA-L NEW 这种价格低廉的糖化酶可以大大降低菊粉水解的成本，代替菊粉酶使用。

本课题对菊粉水解过程的表观动力学常数进行研究。在以往的文献中，有很多关于利用黑曲霉发酵生产菊粉酶的报道，本实验中使用的商业化的糖化酶 GA-L NEW 由黑曲霉发酵所得，且此酶并不是单一的纯化的糖化酶，那么在生产过程中可能会有一部分菊粉酶产生。将此糖化酶 GA-L NEW 假定作为一种单一的酶，以菊粉为底物进行表观动力学研究。

本课题对菊粉和木薯淀粉的共同水解过程进行研究。在运动发酵单胞菌催化生产山梨醇和葡萄糖酸的过程中，菊粉水解后可以得到果糖和部分葡萄糖，因此需要添加部分的葡萄糖到菊粉水解液中以平衡葡萄糖的不足，从而得到等摩尔的果糖和葡萄糖基质。考虑到糖化酶 GA-L NEW 以溶解性的淀粉为基质时糖化酶酶活为 100,000 WU/mL；在以菊粉为基质，菊粉酶酶活为 20 U/mL，将木薯淀粉进行水解代替葡萄糖基质。

本课题对游离的新鲜运动发酵单胞菌催化生产山梨醇的过程进行研究。考察不同固含量水解液，获得高糖浓度的水解液，在高糖浓度下抑制副产物乙醇的生产，并研究不同细胞量对生物转化过程的影响，尽量减少生物催化剂的使用。

为了进一步减少培养细胞的成本，本课题尝试了固定化细胞的方法在这个生物转化过程中的应用。考察在高固含量的水解液中固定化细胞进行催化反应，实现细胞的重复循环利用，生产高浓度的山梨醇和葡萄糖酸溶液。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 原料

菊粉购买于上海郎瑞精细化学品有限公司（中国，上海），在菊粉酸水解液中测定还原糖浓度，测定方法如下：利用 5 mol/L 的硫酸在 $1 < \text{pH} < 2$ 的范围内酸化菊粉，然后再 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行水解，最后利用液相的方法测定还原糖^[42]。1 g 菊粉完全水解后得到 0.23 g 葡萄糖和 0.78 g 果糖。

木薯淀粉购买于琼中奔鹿淀粉有限公司（中国，海南），利用双酶法测定淀粉转化为还原糖的效率，测定方法如下：先用 20 μL 的耐高温淀粉酶 HTAA 和 1 mL 的 1% 的菊粉溶液（pH 6.0）进行混合，然后在 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液化 3 h，随后降温并加入 8880 μL 的乙酸钠缓冲液（pH 4.0）和 100 μL 的糖化酶 GA-L NEW 溶液，在 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 糖化 4 h。最后将溶液冷却至常温，然后进行过滤，最后用液相的方法测定还原糖^[43]。1 g 木薯淀粉完全水解后得到 0.88 g 葡萄糖。混合水解液中菊粉和木薯淀粉的质量比为 1: 0.63。

耐高温淀粉酶 HTAA（Lot number 7201455498）和糖化酶 GA-L NEW（Lot number 7201417190）购买于杰能科生物有限公司（中国，苏州）。以溶解性的淀粉为基质，耐高温淀粉酶 HTAA 和糖化酶 GA-L NEW 的酶活分别为 22, 000 WU/mL 和 100, 000 WU/mL。在标准条件下（ $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，pH 6.0）单位时间内（分钟）液化 1 mg 可溶性淀粉所需要的酶量为 1 U（耐高温淀粉酶 HTAA 的酶活单位定义）。在标准条件下（ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，pH 4.6）单位时间内（小时）生产 1 mg 葡萄糖所需要的酶量为 1 U（糖化酶 GA-L NEW 的酶活单位定义）。

以菊粉为基质，糖化酶 GA-L NEW 的酶活为 20 U/mL。其中糖化酶 GA-L NEW 的酶活单位定义为：在标准条件下（ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，pH 4.0）单位时间内（分钟）生产 1 微摩尔还原糖所需要的酶量为 1 U。反应条件如下：100 μL 稀释的糖化酶 GA-L NEW 酶液和 900 μL 1% 菊粉（溶解于 0.1 M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min，经过后续处理之后在 540 nm 下测定溶液的吸光值。

2.1.2 菌种和培养基

重组的运动发酵单胞菌构建于本实验室^{[32][44]}，将全细胞用于山梨醇和葡萄糖酸生产的生物催化剂。种子培养基的组成为 20 g/L 葡萄糖，5 g/L 硫酸铵，5 g/L 酵母粉，0.5 g/L 七水硫酸镁，1 g/L 磷酸二氢钾。

发酵液培养基组成为葡萄糖，100 g/L；七水硫酸镁，0.5 g/L；硫酸铵，5 g/L；磷酸二氢钾，1 g/L；酵母粉，5 g/L。以上培养基灭菌条件为： $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，20min。

2.1.3 实验仪器与试剂

本研究过程中所使用的主要仪器见表 2.1.

表 2.1 实验仪器

Table 2.1 Experimental instrument

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	BS223S	梅特勒(上海)有限公司
自动电位滴定仪	ZD-2	上海雷磁仪器厂
自动高温灭菌锅	YXQ-1S-75S II	上海博迅实业有限公司
立式振荡培养箱	HZ-9311K	太仓华利达有限公司
可见分光光度计	722N	上海精科实业有限公司
超声波细胞破碎仪	JY92-II	宁波新芝生物科技有限公司
超声波清洗机	KWT-100A	科伟达超声波设备有限公司
Eppendorf台式冷冻离心机	5415D	Eppendorf公司
Eppendorf台式离心机	5415R	Eppendorf公司
移液器	Research	Eppendorf公司
Beckman大型高速离心机	J-26	Beckman
低温水槽	SDC-6	宁波新芝生物科技有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科技有限公司
制冰机	XB-70	宁波新芝生物科技有限公司
-80 °C冰箱	Forma-86C	Thermo公司
冰箱	BCD-239VC	海尔公司
pH计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
高效液相色谱仪	IC-20AD	岛津公司
超纯水机	Milli-Q	Synthesis Millipore
四联发酵罐	Biotech-4BG	保兴生物设备工程有限公司

本研究过程中所使用的主要试剂见表 2.2.

表 2.2 实验试剂

Table 2.2 Experimental reagent

试剂名称	规格	生产厂家
BSA	GC	Acros Organics
K-MES	AR	Acros Organics
果糖	AR	Amresco Inc.
葡萄糖酸	AR	Amresco Inc.
山梨醇	AR	Amresco Inc.
四环素	AR	Sigma-Aldrich
对硝基苯酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
3,5-二硝基水杨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
苯酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
CaCl ₂	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
CuSO ₄ · 5H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
CoCl ₂ · 6H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
MnSO ₄ · H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
亚硫酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
盐酸	AR	上海菲达工贸有限公司
EDTA	GR	上海美兴化工有限公司
考马斯亮蓝 G-250	AR	上海朝瑞生物科技有限公司
氢氧化钠	AR	上海振兴化工工厂

2.2 分析方法

2.2.1 细胞干重的测定方法

细胞干重的测定方法是取 20 mL 菌液在 8000 rpm 离心 5 min, 然后除去上清液之后, 加入蒸馏水悬浮离心。重复三次。然后在 105 °C 烘箱烘干至恒重得到细胞干重。

表 2.3 OD₆₀₀ 与细胞干重之间的关系

Table 2.3 The relationship between OD₆₀₀ and the dry weight of cells

OD ₆₀₀	细胞干重(g/L)
2.22	0.71
4.71	1.51
7.40	2.36
9.82	3.14
10.46	3.35

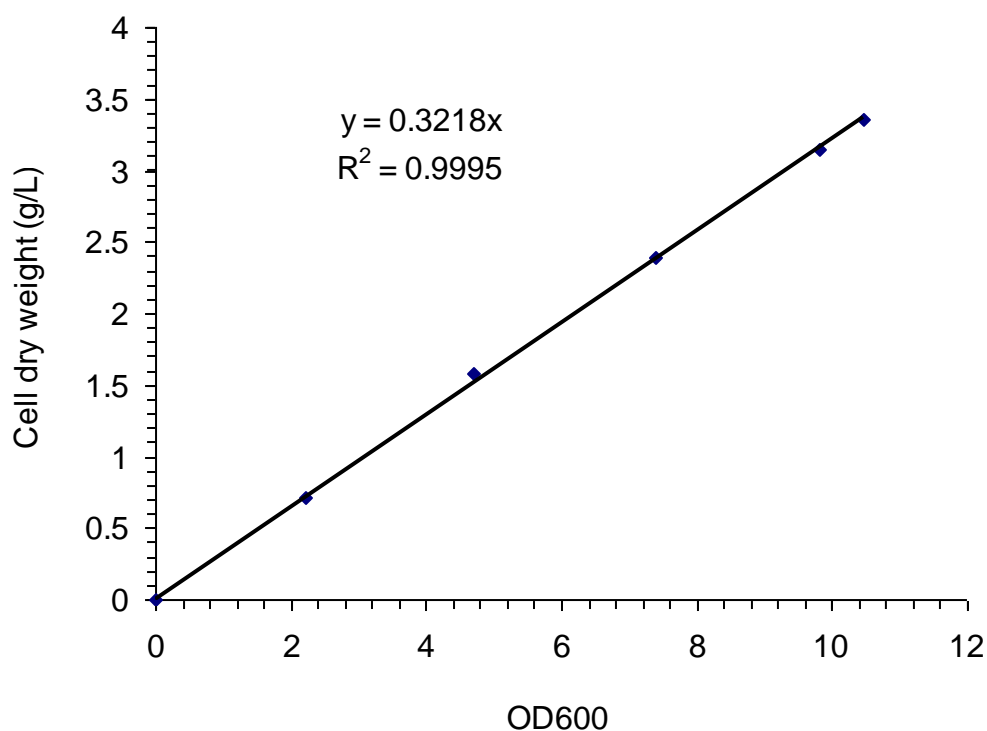


图 2.1 OD₆₀₀ 和细胞干重的标准曲线

Fig. 2.1 The relationship between OD₆₀₀ and the dry weight of cells

2.2.2 葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的测定方法

绘制蛋白质标准曲线见表 2.4。葡萄糖果糖氧化还原酶酶活标准曲线测定体系及测定值见表 2.5。

表 2.4 蛋白质标准曲线测定体系

Table 2.4 The determine system of protein standard curve

BAS (μg)	K-MES buffer (μL)	Bradford (mL)	A_{595}
0	200	2	0
2.5	195	2	0.0936
5	190	2	0.195
7.5	185	2	0.287
10	180	2	0.402
12.5	175	2	0.510
15	170	2	0.607

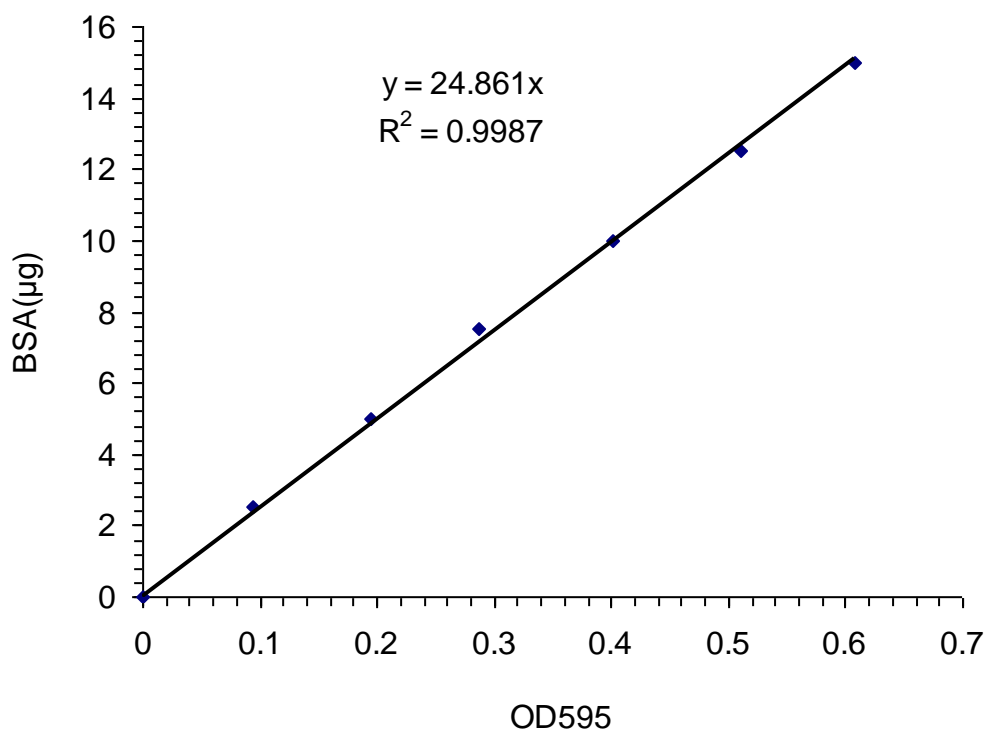


图 2.2 蛋白质含量标准曲线

Fig. 2.2 Standard curve of protein

表 2.5 GFOR 酶活标准曲线测定

Table 2.5 The determination of GFOR enzyme standard curve

HCl (μmol)	K-MES buffer (μL)	对硝基苯酚 (mL)	A_{405}
0	40	4	0.407
0.02	36	4	0.372
0.04	32	4	0.344
0.06	28	4	0.318
0.08	24	4	0.287
0.10	20	4	0.266
0.12	16	4	0.236
0.14	12	4	0.220

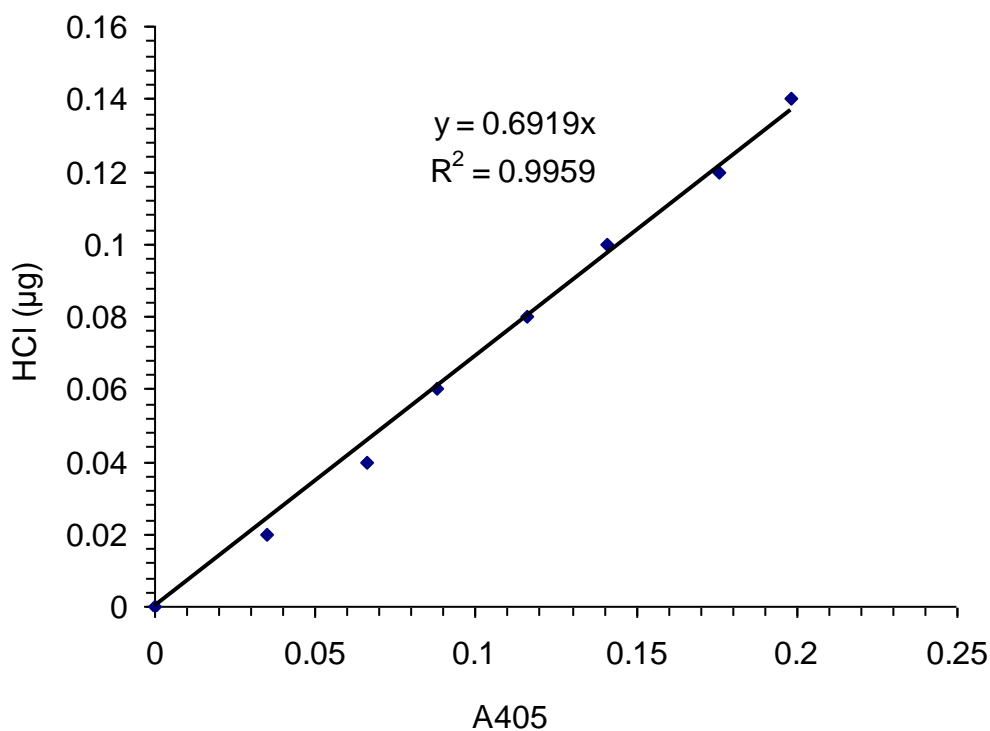


图 2.3 HCl 含量的标准曲线

Fig. 2.3 Standard curve of the concentration of HCl

样品细胞破碎的过程：将样品中的细胞进行收集，在 8000 rpm 离心 5 min，然后除去上清液，加入 20 mL K-MES 缓冲液振荡混合，然后再离心。重复五次使细胞 pH 保持

在 6.4。继而将细胞浓缩于 4 mL 的 K-MES 缓冲液中，利用超声波破碎仪进行破碎。最后将破碎细胞在 16000 rpm 下离心 20 分钟，取出上清液放于 4 °C 备用。

样品中蛋白质含量的测定方式：取细胞离心破碎后的上清液 10 μL ，然后吸取 190 μL 缓冲液，加入 2 mL Bradford 工作液，振荡混合均匀，然后测定吸光度值。样品中酶活测定方法：首先配置葡萄糖果糖溶液，将葡萄糖和果糖（0.8 mol/L 和 0.4 mol/L）溶解于 K-MES 缓冲液，pH 6.4。测定样品时，首先离心破碎的细胞上清液吸取 100 μL ，然后迅速加入 100 μL 备好的葡萄糖果糖溶液，混合后迅速放入 25 °C 恒温水槽中，反应 2 min 后投入沸水浴中煮 3 min。然后进行离心（16000 rpm，20 min），除去沉淀物。根据标准曲线图 2.3 计算出葡萄糖果糖氧化还原酶酶活。重复三次。

2.2.3 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖

DNS 标准曲线是通过 DNS 方法在 540 nm 下测定 3-氨基-5-硝基水杨酸的吸光度值，标准曲线测定体系及测定值见表 2.6。

糖化酶 GA-L NEW 酶液经过适当稀释后，取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 1% 菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH4.0），在 60 °C 下反应 10 min，然后迅速加入 3 mL DNS，经过后续处理后测定吸光值。

2.2.4 各种组分的液相测定方法

葡萄糖、果糖、山梨醇、乙醇浓度通过 HPLC 的方法测得。高效液相色谱是日本岛津公司的 LC-20AD，RID-10A 检测器。在柱温 65 °C，0.005 mol/L 的硫酸流动相以 0.6 mL/min 进行。测得组分含量之前先测得各种单一组分的标准曲线，然后根据标准曲线计算组分含量。

表 2.6 DNS 法标准曲线测定体系

Table 2.6 The determination of reducing sugar by DNS method

管号	葡萄糖标准液		DNS	A_{540} (average)
	2 mg/mL (mL)	蒸馏水		
0	0	2	3	0
1	0.2	1.8	3	0.0904
2	0.4	1.6	3	0.1924
3	0.6	1.4	3	0.2945
4	0.8	1.2	3	0.3803
5	1	1	3	0.4728
6	1.2	0.8	3	0.5566

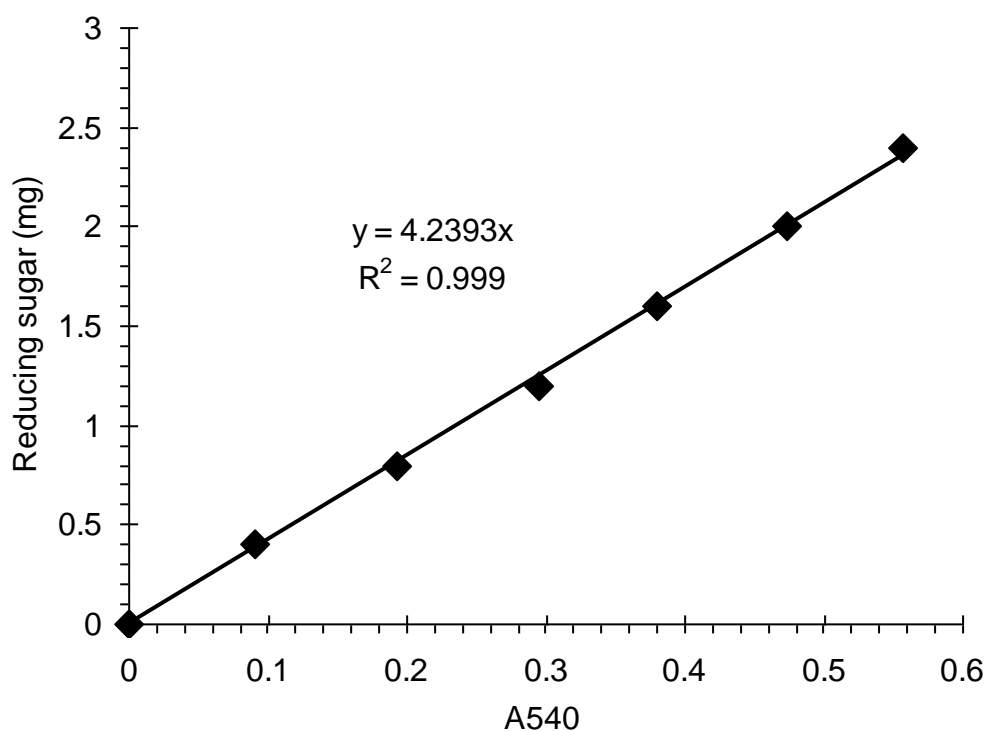


图 2.4 DNS 法标准曲线测定体系

Fig. 2.4 The determination of reducing sugar by DNS method

2.3 *Zymomonas mobilis* 培养过程

2.3.1 菌种保藏方法

菌种的长时间保存是在 -80°C 中进行, 方法为先培养细胞, 待细胞生长到对数中期后, 将菌液与 60% 的甘油进行 1: 1 的混合装入冻存管, 然后用液氮迅速冷冻, 最后放入 -80°C 超低温冰箱中。

2.3.2 菌种培养方法

在无氧、 30°C 、pH 6.0、150 rpm、接种量 10% (v/v) 条件下, 培养 18 h 后, 发酵培养液经过离心 (8000 rpm, 5 min) 获得湿细胞(5 g/L 细胞干重)。

2.3.3 细胞固定化方法

在不通气、 30°C 、pH 6.0、150 rpm、接种量 10% (v/v) 条件下, 培养 18h 后经过离心 (8000 rpm, 5 min) 获得湿细胞(5 g/L 细胞干重)。首先, 将 12.5% (w/v) 的聚乙烯醇溶液和 0.125% 的海藻酸钠溶液加热溶解, 冷却室温后将悬浮至 150 g/L 的细胞溶液 (20 mL) 进行混合 (聚乙烯醇溶液和细胞溶液体积比 4: 1), 磁力搅拌 1 h, 以达到混合均匀。然后, 将混合液通过蠕动泵滴加到饱和硼酸溶液 (含有 0.3 M 氯化钙), 之后搅拌 3 h。颗粒的平均直径 4 mm, 最后将颗粒用大量超纯水清洗, 以除去颗粒表面的硼酸溶液。其中颗粒直径的计算方式如下: 任意取 100 个颗粒, 计算其体积, 然后确定颗粒平均直径。实验重复次数为 3 次。

2.4 酶液表观动力学研究

2.4.1 温度和 pH 对酶液酶活以及稳定性影响

pH 对酶活活性的影响选择在 pH 3.6-5.6、60 °C，以 1% 的菊粉为底物测定酶活。取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 1% 菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH 3.6-5.6），在 60 °C 下反应 10 min，然后迅速加入 3 mL DNS，经过后续处理后测定吸光值。以不同 pH 条件下酶活最高的为 100%，表示酶液的相对活力（relative activity）。

pH 对酶活稳定性的影响是测定相应 pH 下处理 2 h 后酶液在标准条件下表现的酶活。首先将酶液在不同 pH 下处理 2 h，然后取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 1% 的菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在 60 °C 下反应 10 min，经过后续处理后测定吸光值。以 pH 4.0 条件下酶活为 100%，表示酶液的相对活力（relative activity）。

温度对酶活的影响选择温度范围为 30 °C-80 °C，以 1% 的菊粉为底物测定不同温度下的酶活。取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 1% 的菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在不同温度（30 °C-80 °C）下反应 10 min，经过后续处理后测定吸光值。以不同温度条件下酶活最高的为 100%，表示酶液的相对活力（relative activity）。

酶液热稳定性试验是测定相应温度下处理 2 h 后的酶液在标准条件下表现的酶活。首先将酶液在不同温度（30 °C-80 °C）下处理 2 h，然后取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 1% 菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在 60 °C 下反应 10 min，经过后续处理后测定吸光值。以 4 °C 下放置的酶液测定的酶活为 100%，表示酶液相对活力。

2.4.2 金属离子对酶活的影响

不同金属离子的影响主要选 CaCl_2 ， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ （1mmol 的金属盐溶解于 100 mL 的 0.1 M 醋酸缓冲液）等金属化合物。首先将酶液在不同的金属化合物溶液中处理 1 h，然后取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 1% 菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在 60 °C 下反应 10 min，经过后续处理后测定吸光值。在测定金属离子对酶活影响过程中，以未加入金属离子的酶液测定的酶活为 100%。

2.4.3 表观动力学参数的确定

选择 900 μL 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L、20 g/L、40 g/L 菊粉（溶解于 pH 4.0 的 0.1 M 醋酸钠缓冲液）进行反应。取 100 μL 稀释酶液和 900 μL 菊粉（溶解于 0.1M 醋酸钠缓冲液，pH 4.0），在 60 °C 下反应 10 min，经过后续处理后测定吸光值。以菊粉为底物初始反应速率通过双倒数作图法来确定表观米氏常数 K_M 和表观最大反应速率 V_{max} 。

2.5 菊粉和木薯淀粉水解过程

2.5.1 木薯淀粉液化条件的确定

木薯淀粉 (30% w/w、40% w/w、50% w/w) 在 1 L 摇瓶中进行液化试验 (装液量 300 mL), 在液化完成之后, 加入糖化酶 GA-L NEW 比较不同固含量木薯淀粉生成葡萄糖的浓度。液化条件: 选择不同温度 (80 °C、90 °C) 不同液化时间 (1 h、2 h) 和不同耐高温淀粉酶 HTAA 酶量 (11 WU/g cassava starch、22 WU/g cassava starch) 在 pH 6.0 条件下进行液化。液化之后, 降温至 60 °C、调节 pH 至 4.0, 然后加入 100 WU/g cassava starch 进行木薯淀粉的糖化过程。比较 12 h 后木薯淀粉转化为葡萄糖的生成量。

2.5.2 菊粉和木薯淀粉共水解过程

如图 1, 首先分开制备木薯淀粉水解液和菊粉水解液。第一, 菊粉 (30% w/w、40% w/w、50% w/w) 在摇瓶中进行水解试验, 60 °C、pH 4.0、糖化酶 GA-L NEW 酶量 1 U/g inulin, 水解进行至 48 h; 第二, 木薯淀粉 (30% w/w、40% w/w、50% w/w) 在 90 °C、耐高温淀粉酶 HTAA 酶量 11 WU/g starch、pH 6.0 条件下液化 1 h, 然后降温并调整 pH 至 4.0。最后, 将 30% w/w、40% w/w、50% w/w 液化后的淀粉溶液分别加入到菊粉溶液中, 继续水解 12 h, 获得水解液用于催化过程。其中菊粉和木薯淀粉的质量比为 1:0.63。

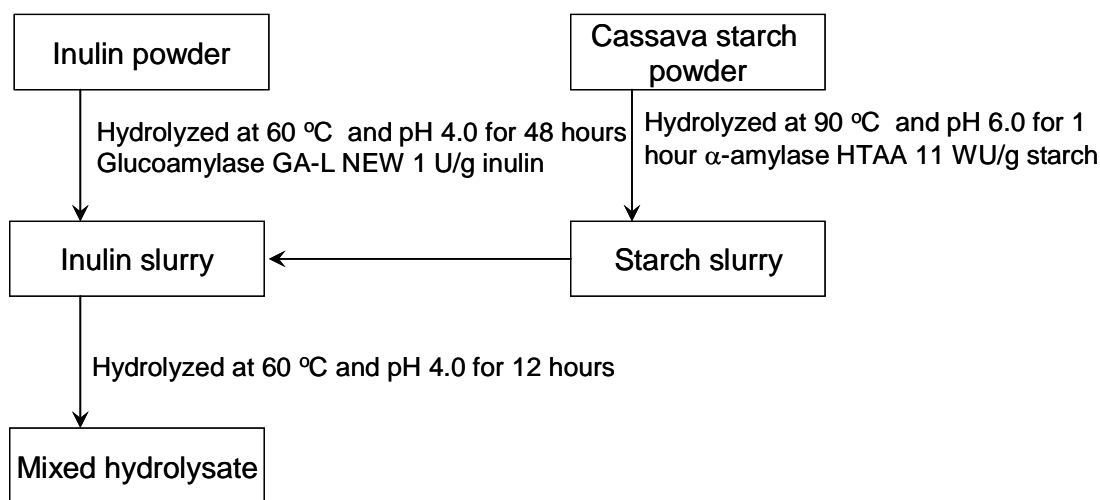


图 2.5 利用菊粉和木薯淀粉得到果糖和葡萄糖的过程

Fig. 2.5 The experimental procedure of fructose and glucose production from inulin and cassava starch

2.6 利用新鲜游离的细胞生产山梨醇和葡萄糖酸

2.6.1 不同固含量水解液对生物催化过程的影响

在不通气、30 °C、pH 6.0、150 rpm、接种量 10% (v/v) 条件下, 培养 18h 后, 发酵培养液经过离心 (8000 rpm, 5 min) 获得湿细胞 (5 g/L 干重)。在 3 L 反应器中加入 500

mL 不同固含量的水解液和 10 g/L 的细胞, pH 6.4 (14 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。

2.6.2 不同细胞量对生物催化过程的影响

在不通气、30 °C、pH 6.0、150 rpm、接种量 10% (v/v) 条件下, 培养 18h 后, 发酵培养液经过离心 (8000 rpm, 5 min) 获得湿细胞 (5 g/L 干重)。在 3 L 反应器中加入 500 mL 水解液和不同浓度的运动发酵单胞菌, pH 6.4 (14 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。

2.6.3 新鲜游离的细胞循环利用生产山梨醇和葡萄糖酸

选择 5 g/L、7.5 g/L、10 g/L (细胞干重) 细胞浓度进行催化循环试验, 在第一次细胞催化结束之后, 将催化液进行离心 (8000 rpm, 10 min), 然后用于第二次催化过程。在 3 L 反应器中加入 500 mL 水解液和离心后的运动发酵单胞菌, pH 6.4 (14 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。

2.7 利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸

2.7.1 固定化细胞催化生产山梨醇和葡萄糖酸

首先得到混合水解液的过程, 将菊粉 (50% w/w) 进行水解试验, 然后将液化后的木薯淀粉 (50% w/w) 加入到菊粉溶液中, 继续水解 12 h, 获得水解液用于催化反应。然后将培养的新鲜细胞固定在聚乙烯醇-海藻酸钠载体上。最后在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和固定化的细胞颗粒, pH 6.4 (4 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。

2.7.2 不同温度和 pH 条件下的生物催化过程

在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和固定化的细胞颗粒, 在不同 pH 和温度条件下, 进行催化反应。

2.7.3 固定化细胞酶活损失原因的探索

固定化颗粒的葡萄糖-果糖氧化还原酶酶活稳定性是将固定化细胞颗粒储存在 4 °C 中放置不同时间, 然后取出细胞颗粒, 进行催化反应。反应条件如下: 在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和处理过的固定化细胞颗粒, pH 6.4 (4 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。

基质和产物对固定化细胞中的葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的影响, 设定一下几种不同的溶液: 水溶液; 250 g/L 葡萄糖; 250 g/L 果糖; 250 g/L 葡萄糖酸; 250 g/L 山梨醇。首先, 将细胞颗粒在 300 mL 以上溶液中进行分别处理 48 h, 处理条件为 39 °C, pH 6.4, 60 rpm。然后, 将细胞颗粒取出, 在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和处理后的固定化细胞颗粒, 在 pH 6.4 (4 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。通过转化过程初始第一小时的山梨醇生成量来确定山梨醇的生成速率, 以水溶液作为对照, 比较基质和产物葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的影响。

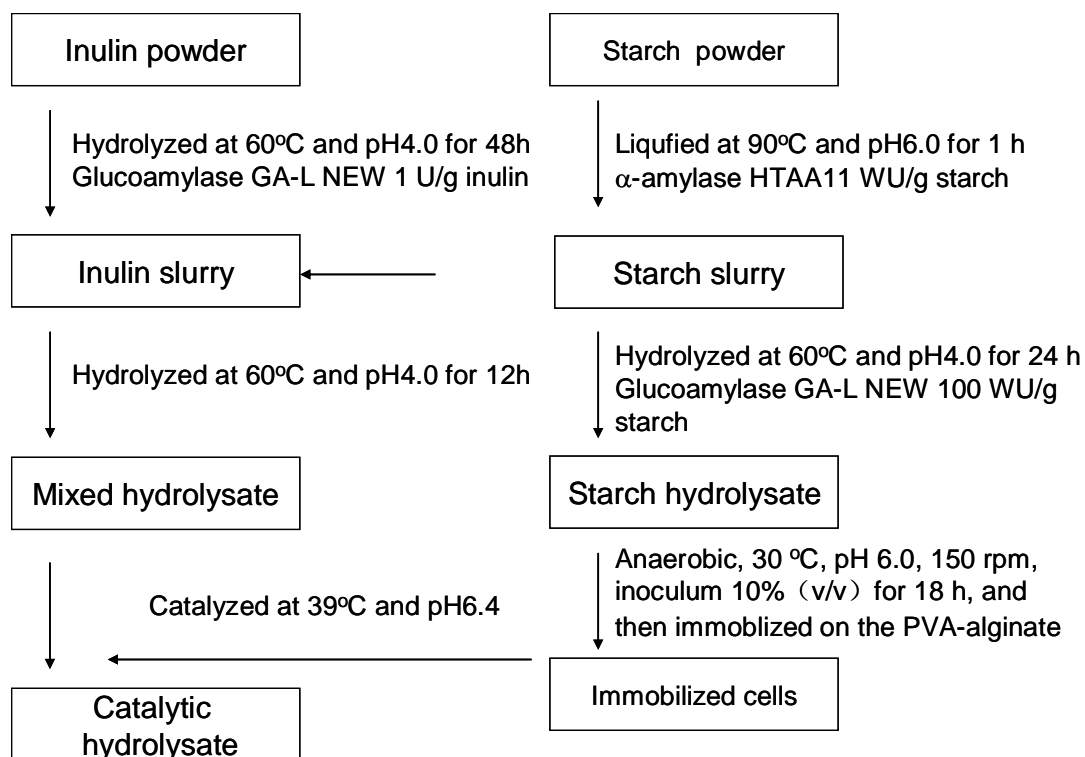


图 2.6 利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸的生物转化过程

Fig. 2.6 The experimental procedure of sorbitol and gluconic acid production from inulin and cassava starch using immobilized cells

2.8 木薯淀粉水解液培养细胞

25% (w/w)木薯淀粉在 90 °C、pH 6.0、耐高温淀粉酶 HTAA 酶量 11 WU/g starch 条件下液化 1 h，得到淀粉液化液，然后降温至 60 °C，调节 pH 至 6.0。此时加入糖化酶 GA-L NEW，酶用量为 100 WU/g cassava starch，在 60 °C、pH 4.0 条件下糖化 24 h。将糖化后得到的水解液进行灭菌、离心（超净台操作）。配置无机盐溶液：10 g/L 酵母粉，2 g/L 磷酸二氢钾，5 g/L 硫酸铵，1 g/L 七水硫酸镁。取离心后的 1 L 木薯淀粉糖化液和 1 L 无机盐溶液，在灭菌后发酵罐中进行发酵。在无氧、30 °C、pH 6.0、150 rpm、接种量 10% (v/v) 条件下，培养 18 h 后，发酵培养液经过离心（8000 rpm, 5 min）获得湿细胞。

2.9 转化率的定义

利用糖化酶 GA-L NEW 水解过程中果糖得率计算的公式为：

$$Fructose\ yield = \frac{[Fructose] \times V_0}{W_{inulin} \times 0.78} \times 100\% \quad (2-1)$$

V_0 : 混合水解液的总体积 (L);

[Fructose] : 混合水解液中果糖的浓度 (g/L);

W_{inulin} : 水解反应过程中使用菊粉的质量 (g);

0.78: 每克菊粉完全水解所得到的果糖的质量 (g/g)。

在果糖和葡萄糖向山梨醇和葡萄糖酸转化过程中山梨醇的得率计算的公式为:

$$Sorbitol\ yield = \frac{[Sorbitol]_t \times V_1}{[Fructose]_0 \times V_2} \times \frac{180}{182} \times 100\% \quad (2-2)$$

V_1 : 催化结束时的溶液体积 (L);

V_2 : 催化开始时的溶液体积 (L);

[Sorbitol]_t : 催化结束时山梨醇的浓度 (g/L);

[Fructose]₀ : 催化开始时候果糖的浓度 (g/L);

180 and 182 : 果糖和山梨醇的分子量。

第三章 实验结果和讨论

3.1 糖化酶以菊粉为底物的表观动力学研究

3.1.1 温度和 pH 对酶液酶活以及稳定性影响

在本文中,在以菊粉为基质糖化酶 GA-L NEW 表现出 20 U/mL 的菊粉酶酶活,这可以替代菊粉酶来水解菊粉获得果糖和部分葡萄糖。糖化酶 GA-L NEW 表现出的这种性质目前尚不是很清楚,可能是因为糖化酶 GA-L NEW 的蛋白结构和菊粉酶有相似之处,然后作用于菊粉;也可能是因为糖化酶 GA-L NEW 的商业化生产过程中,有菊粉酶的生成,因为目前,生产菊粉酶的霉菌菌株主要是黑曲霉^{[45][46]},那么在利用黑曲霉生产糖化酶的过程中很可能黑曲霉产生一部分的菊粉酶。

在 pH 3.6-5.6、60 °C,以 1%菊粉为底物测定酶活。pH 对酶活稳定性的影响是测定相应 pH 下处理 2 h 后酶液在标准条件 (pH 4.0、60 °C、1%菊粉) 下表现的酶活。以不同 pH 条件下酶活最高的为 100%,表示酶液的相对活力 (relative activity)。Fig. 3.1 (a) 表明酶液的最适合 pH 是 4.0,在 pH 3.6-5.0,酶活基本保持稳定,而 pH 5.6,酶活迅速下降,稳定性变差,在 pH 5.6 处理 2 h 后,酶液的活性急剧下降。

温度对酶活的影响选择温度范围为 30 °C-80 °C,以 1%菊粉(溶解于 pH 4.0 的 0.1 M 醋酸钠缓冲液)为底物测定不同温度下的酶活。酶液热稳定性试验是测定相应温度下处理 2 h 后的酶液在标准条件 (pH 4.0、60 °C、1%菊粉) 下表现的酶活。Fig. 3.1 (b) 表明在 30-60 °C,酶活稳定;而在 60 °C 下处理 2h 之后,酶液保持较高的活性。但是温度高于 65 °C,酶活开始逐渐下降,而且稳定急剧变化,仅有 17.18%的酶活残余。这表明酶液在以菊粉为底物,最适合的温度和 pH 分别是 60 °C、pH4.0。另外,此结果与菊粉酶的性质有一定的相似之处,菊粉酶在 45 - 60 °C 和 pH 4.35 - 5.35 的范围内表现出较高的酶活^{[41][47]}。

3.1.2 金属离子对酶液酶活的影响

不同金属离子的影响主要选 CaCl₂, CuSO₄ · 5H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O, FeSO₄ · 7H₂O, CoCl₂ · 6H₂O, MnSO₄ · H₂O (1 mmol 金属化合物溶解于 100 mL 0.1 M 醋酸缓冲液)。Table 3.1 表明 Co²⁺、Ca²⁺对酶活有明显的促进作用,Cu²⁺对酶活有一定的抑制,而 Zn²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺对酶活没有明显影响。Fig. 3.2 表明 Co²⁺浓度为 1 mM 时对酶活促进作用最强,当浓度高于 1 mM 酶活下降,这可能是高浓度的金属离子对酶液有一定的毒害作用。

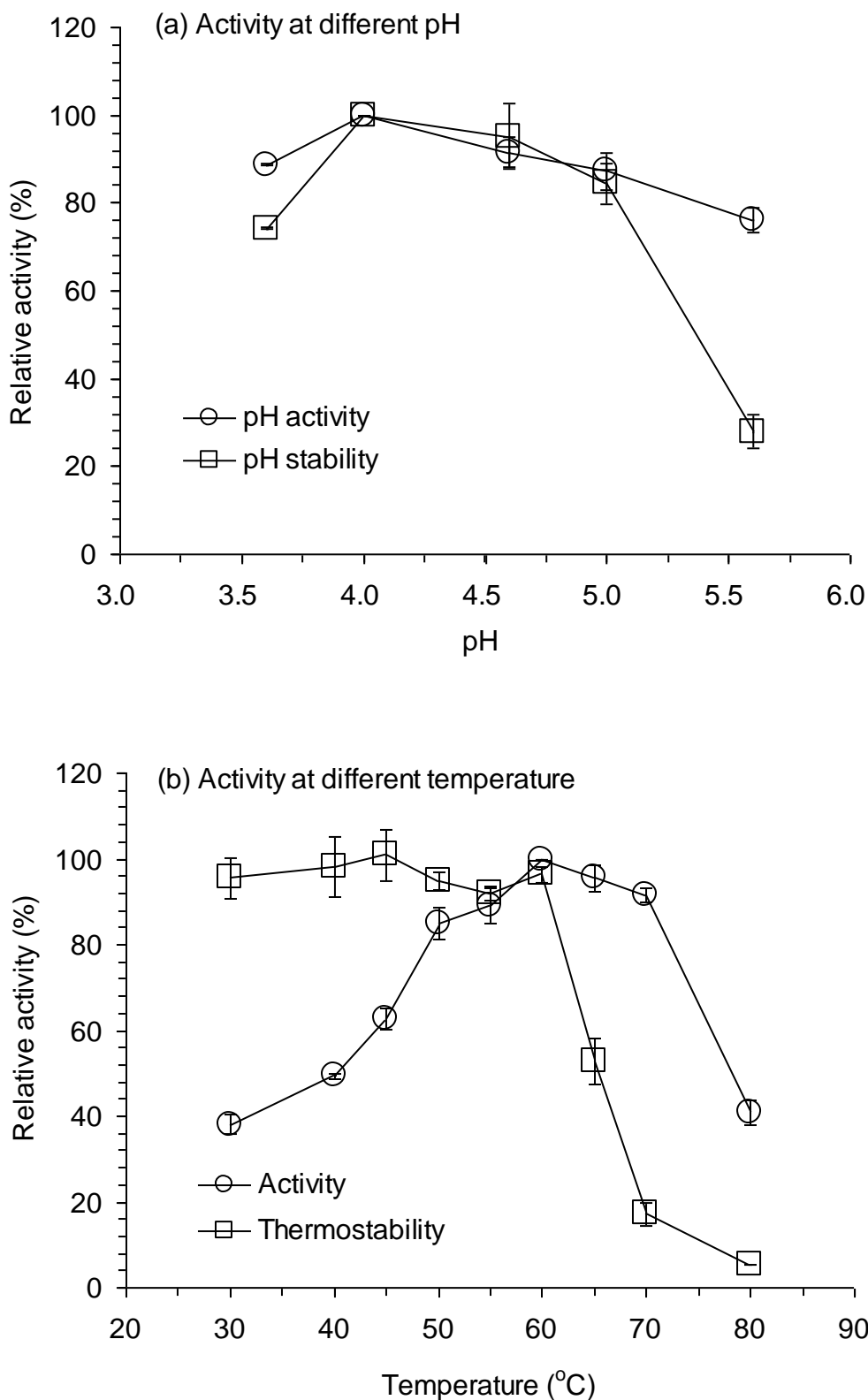


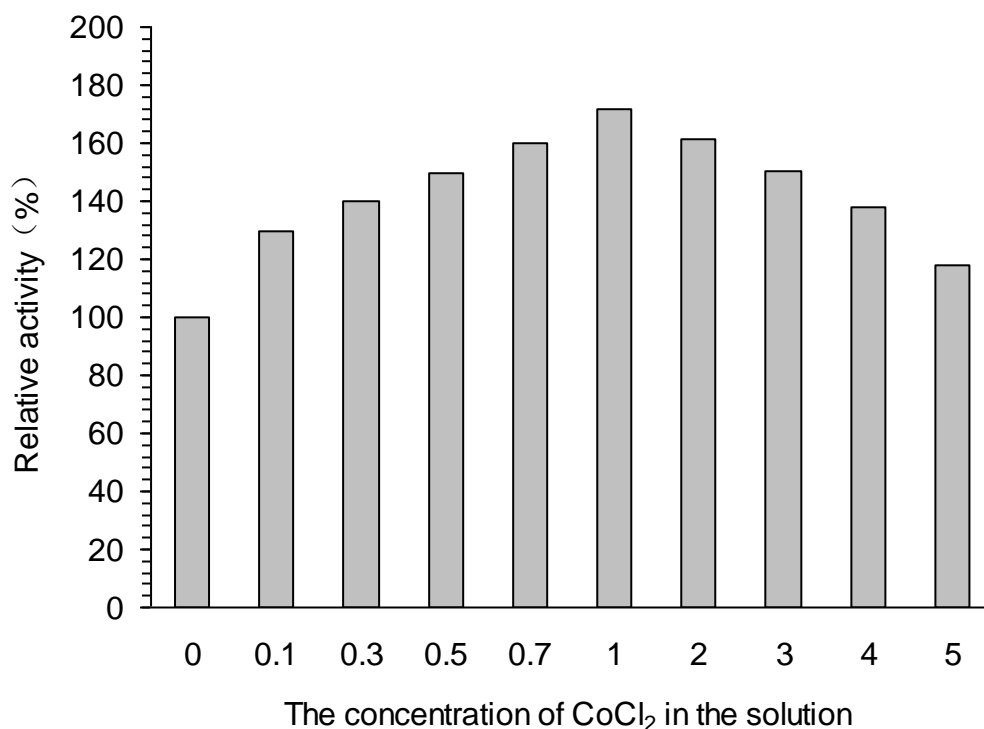
图 3.1 温度和 pH 对酶液酶活和稳定性的影响

Fig. 3.1 Effect of temperature and pH on enzyme activity and thermostability

表 3.1 不同金属离子对酶活的影响

Table 3.1 Effects of different metal ions on enzyme activity

Compounds	Concentration (mM)	Relative enzyme activity (%)
Control	0	100.0
CaCl ₂	10	110.6 ± 5.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	10	96.7 ± 0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10	102.2 ± 0.4
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10	100.2 ± 0.4
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10	101.1 ± 1.9
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10	165.8 ± 3.8
MnSO ₄ · H ₂ O	10	101.2 ± 2.4

图 3.2 Co²⁺离子对糖化酶 GA-L-NEW 以菊粉为底物时酶活的影响Fig. 3.2 Effects of Co²⁺ on enzyme activity

3.1.3 表观动力学参数的确定

选择 900 μL 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L、20 g/L、40 g/L 菊粉（溶解于 pH4.0 的 0.1M 醋酸钠缓冲液）与 100 μL 酶液进行反应（pH 4.0、60 °C），通过双倒数作图法

得到 K_M 和 V_{max} 分别为 19.29 g/L 和 0.092 g/(L min)。以菊粉为基质糖化酶 GA-L NEW 的 K_M 数值类似于 *Cryptococcus aureus* (20.06 g/L)^[48], *Pichia guilliermondii* (21.1 g/L)^[49], *Kluyveromyces marxianus* (11.9 g/L)^[50]。但是 V_{max} 数值和这些报道差异性很大^[51], 其中 *Cryptococcus aureus* (0.0085 mg/min)^[48], *Pichia guilliermondii* (0.0085 mg/min)^[49], 这表明糖化酶液中水解菊粉基质的酶活不高。

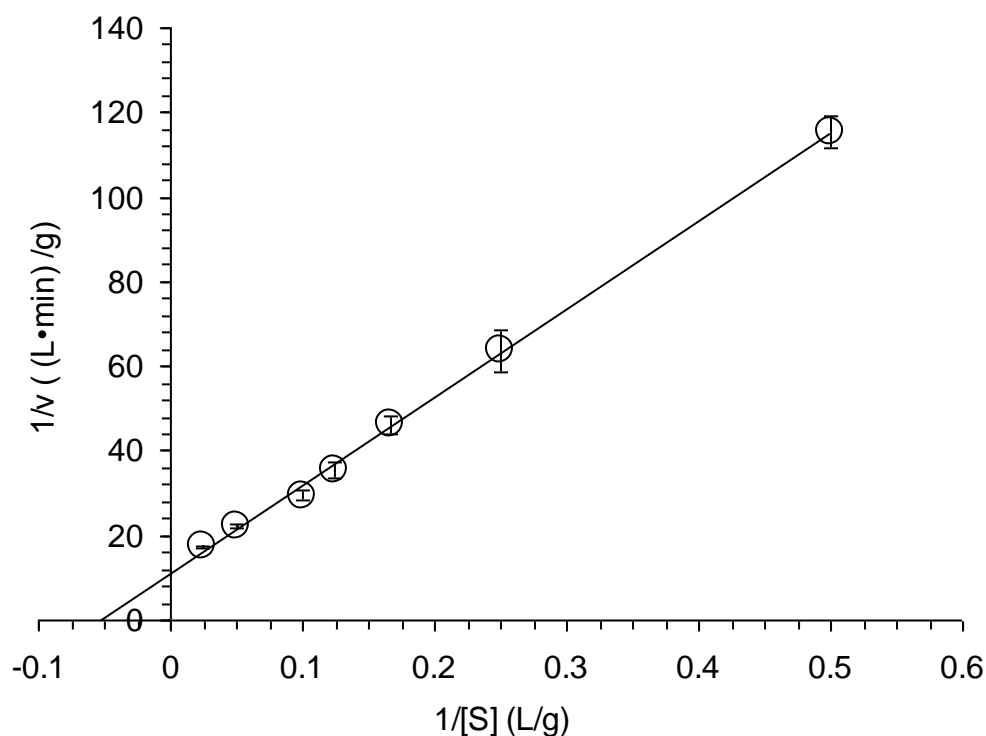


图 3.3 糖化酶 GA-L NEW 以菊粉为底物的动力学常数测定

Fig. 3.3 The Lineweaver-Burk plot for K_M and V_{max} values of enzyme in different concentrations of inulin.

3.2 菊粉和木薯淀粉的水解过程

3.2.1 木薯淀粉液化条件的确定

在不同条件下对木薯淀粉进行液化, 温度分别为 80 °C、90 °C; 液化时间分别为 1 h、2 h; 高温液化酶 HTAA 的酶量分别为 11 WU/g cassava starch、22 WU/g cassava starch。在液化结束后, 调节温度至 60 °C, pH 为 4.6。然后加入糖化酶 GA-L NEW (100 WU/g cassava starch) 水解 12 h 后测定溶液中葡萄糖的浓度。从 Table 3.2 可以看出, 在较低的固含量 (20% w/w) 条件下, 温度和液化时间以及酶量对最终葡萄糖的释放量影响不明显; 在 30% w/w 固含量下, 温度对葡萄糖释放量的影响较为明显, 可以提高葡萄糖的浓度。而在较高的固体含量 (50% w/w) 下, 80 °C 下延长液化时间从 1 h 到 2 h 或增加液化酶酶量从 11 WU/g cassava starch 到 22 WU/g cassava starch, 葡萄糖的浓度低于 500

g/L, 得率仅在 80%左右, 并没有得到明显的提高; 而提高温度至 90 °C, 在较短的液化时间 1 h 和较低的酶用量下 11 WU/g cassava starch, 葡萄糖浓度达到 520 g/L, 得率超过 90%。所以, 对于木薯淀粉的水解, 最适合的条件为 90 °C、高温液化酶 11 WU/g cassava starch、液化时间 1 h。

表 3.2 淀粉液化条件的确定

Table 3.2 Determination of conditions for liquefaction of cassava starch

Temperature (°C)	80	80	80	80	90	90	90	90	
liqufued time (h)	1	2	1	2	1	2	1	2	
Amylase dosage (WU/g)	11	11	22	22	11	11	22	22	
Concentration of glucose (g/L)	20% (w/w)	205.2	199.5	200.1	207.1	198.8	199.3	190.2	202.0
	30% (w/w)	308.2	308.5	299.3	302.0	304.3	320.9	322.4	313.6
	50% (w/w)	425.4	436.8	456.0	464.1	519.8	523.2	521.3	528.4

3.2.2 菊粉和木薯淀粉共水解过程

首先菊粉 (30% w/w、40% w/w、50% w/w) 在摇瓶中进行水解试验, 60 °C、pH 4.0、糖化酶 GA-L NEW 酶量 1 U/g inulin, 水解进行至 48 h; 木薯淀粉 (30% w/w、40% w/w、50% w/w) 在 90 °C、耐高温淀粉酶 HTAA 酶量 11 WU/g starch、pH 6.0 条件下液化 1 h, 然后降温并调整 pH 至 4.0。最后, 将液化后的淀粉溶液分别加入到菊粉溶液中, 继续水解 12 h, 获得水解液用于催化过程。从 Table 3.3 可以看出随着混合水解液固含量的增加, 菊粉的水解效率逐渐下降, 但是果糖的浓度不断增加。对于 50% w/w 固含量的混合水解液, 水解进行至 48 h, 水解效率低于 90%, 延长至 60 h, 水解效率达到 92.7%, 果糖和葡萄糖的总浓度超过 500 g/L。但是随着时间的继续延长至 72 h, 水解液中葡萄糖和果糖浓度基本没有变化 (数据未列出)。因此选择木薯淀粉和菊粉的水解时间为 60 h, 此时果糖和葡萄糖的总浓度 520 g/L 左右。

另外, 在菊粉水解过程中, 选择不同时间点 (0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 60 h, 72 h) 加入液化后的淀粉, 最终混合水解液中果糖和葡萄糖的浓度基本一致。这可能是葡萄糖对菊粉水解的抑制作用不明显, 所以整个体系中葡萄糖浓度的增加对菊粉的水解没有影响。另外, 水解液中添加的糖化酶 GA-L NEW 基于菊粉为底物时菊粉酶酶活为 20 U/mL, 但是在基于淀粉为底物时糖化酶 GA-L NEW 酶活为 10,000 WU/g cassava starch, 因此液化后的淀粉转化为葡萄糖过程非常迅速。在菊粉水解的后期时间点 (48 h) 加入液化的淀粉, 不会影响淀粉向葡萄糖的充分转化。最终水解时间延长至 60 h, 菊粉的水解效率

达到 90% 以上。综合考虑果糖的产率和水解时间，选择在菊粉水解 48 h 时加入液化的淀粉。

表 3.3 菊粉和木薯淀粉水解过程中果糖的浓度和得率

Table 3.3 Yield and concentration of Fructose in the inulin and cassavastarch hydrolysate from different solid content

Solid content of the mixed hydrolysate (w/w)	Yield (%)	Concentration (g/L)
30%	99.4	150.1
40%	98.1	196.2
50%	92.7	257.4

3.3 利用新鲜游离的细胞生产山梨醇和葡萄糖酸

3.3.1 不同固含量水解液对生物催化过程的影响

运动发酵单胞菌位于周质的葡萄糖果糖氧化还原酶将混合水解液中的果糖和葡萄糖分别转化为山梨醇和葡萄糖酸。在不同固含量的水解液中，果糖和葡萄糖的总浓度差异很大。在 3 L 反应器中加入 500 mL 不同固含量的水解液和 10 g/L 的细胞，在 pH 6.4、39 °C、150 rpm 条件下进行催化反应。从 Fig 3.4 可以看出对于 50% (w/w) 固含量的混合水解液，初始葡萄糖和果糖总糖浓度超过 500 g/L，经过 3.5 h 的催化时间果糖消耗殆尽，最终果糖向山梨醇的转化率接近 100%，山梨醇的浓度为 238 g/L。这种高转化率主要是因为两个原因，一是高糖浓度形成较高的渗透压，山梨醇的生成缓解这种高渗透压带来的影响；二是这个基因工程菌细胞的葡萄糖果糖氧化还原酶的酶活比野生型的菌株高，也有利于山梨醇转化率的提高。

而在 30% w/w 和 40% w/w 固含量的混合水解液中，催化过程中有少量乙醇生成，这说明葡萄糖转化为葡萄糖酸后进入细胞质内通过 ED 代谢途径进一步代谢为乙醇。乙醇的生成一方面降低山梨醇的产率，另一方面增加产物分离过程的成本；较高的产物浓度在后续下游分离过程中可以节省水资源的浪费；而且新鲜细胞未经任何金属离子或者试剂的处理，在葡萄糖酸和山梨醇应用于食品工业时避免了化学污染的危险。因此选择在 50% w/w 固含量的混合水解液中生产葡萄糖酸和山梨醇具有明显优势。另外在制备 60% w/w 的淀粉溶液时由于淀粉会结块导致液化过程无法顺利进行，因此超高固含量混合水解液的制备较难以实现。

Silveira 等人研究了未处理过的新鲜细胞催化葡萄糖和果糖的过程，在总糖浓度达到 650 g/L 时，两种产物的转化效率达到最大为 91%，在总糖浓度 500 g/L，山梨醇比产率达到最大 1.8 g/(g cells h)，产率仅为 79%^[29]。在我们的研究中，重组运动发酵单胞菌

的葡萄糖果糖氧化还原酶酶活相对于野生菌提高了两倍多，这减少了催化时间，增加了产物的转化率。

表 3.4 不同固含量水解液催化过程

Table 3.4 Effect of different solid content on catalysis

Solid content of the mixed hydrolysate (w/w)	30%	40%	50%
Initial Fructose Concentration (g/L)	150.1	196.2	257.4
Sorbitol produced (g/L)	138.2	191.0	238.1
Specific sorbitol productivity (g/(g cells h))	4.61	5.46	6.80
Sorbitol yield based on fructose (%)	92.0	97.4	100.6
Sorbitol yield based on inulin (%)	91.4	95.5	97.5
Ethanol produced (g/L)	2.82	2.56	0.00

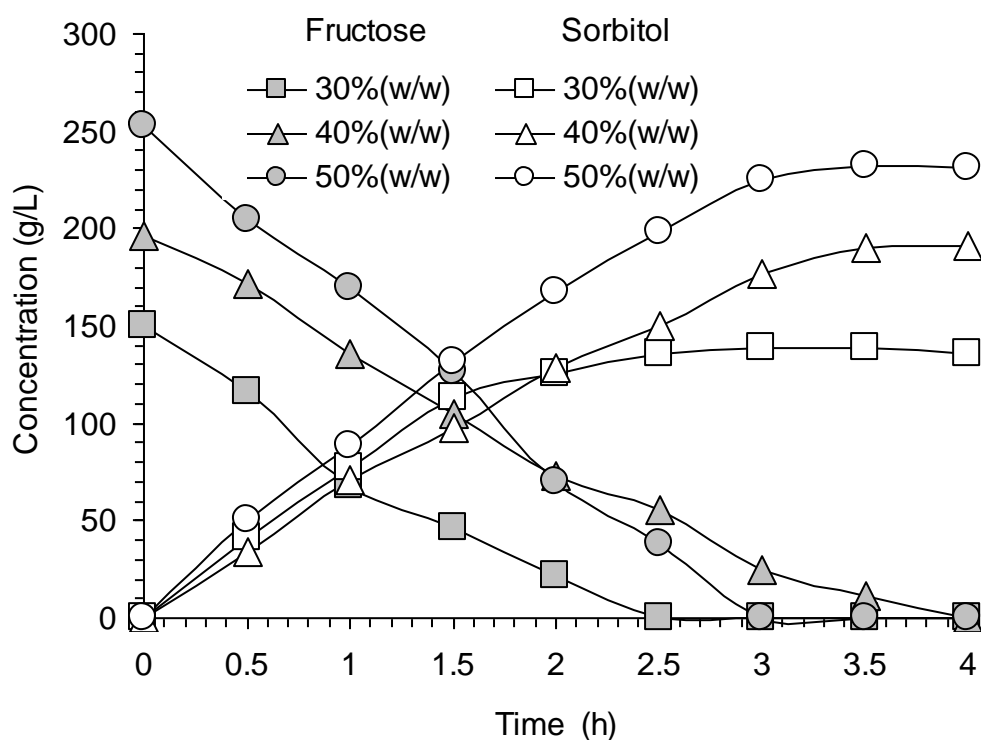


图 3.4 不同固含量水解液对催化过程的影响

Fig. 3.4 Effect of different solid content on catalysis

3.3.2 不同细胞量对生物催化过程的影响

考虑到细胞培养在整个过程中占据较大成本，研究不同细胞量对催化过程的影响。在 3 L 反应器中加入 500 mL 水解液（50% w/w）和不同浓度的细胞，在 pH 6.4、39 °C、

150 rpm 条件下进行催化反应。从 Table 3.5 可以明显看出随着细胞量的不断降低，山梨醇的浓度和得率并没有明显的降低，且产率不断的增加。虽然在细胞量为初始的四分之一时，山梨醇得率有所降低，但山梨醇的浓度和产率依然很高。从 Fig. 3.5 可以看出在 5 g/L、7.5 g/L、10 g/L（细胞干重）的细胞浓度下，催化过程可以快速彻底进行；而对于细胞浓度 2.5 g/L（细胞干重），催化后期果糖变化缓慢，6 h 后仍有 30 g/L 果糖残余。

表 3.5 不同细胞用量对催化过程的影响

Table 3.5 Effect of different cell biomass on catalysis

Fresh cell dosage (g/L)	10	7.5	5.0	2.5
Initial fructose concentration (g/L)	257.4	255.8	245.7	254.2
Sorbitol produced (g/L)	238.1	233.4	224.4	213.9
Specific sorbitol productivity (g/(g cells h))	6.80	7.78	8.98	14.26
Sorbitol yield based on fructose (%)	100.6	99.3	99.4	91.6

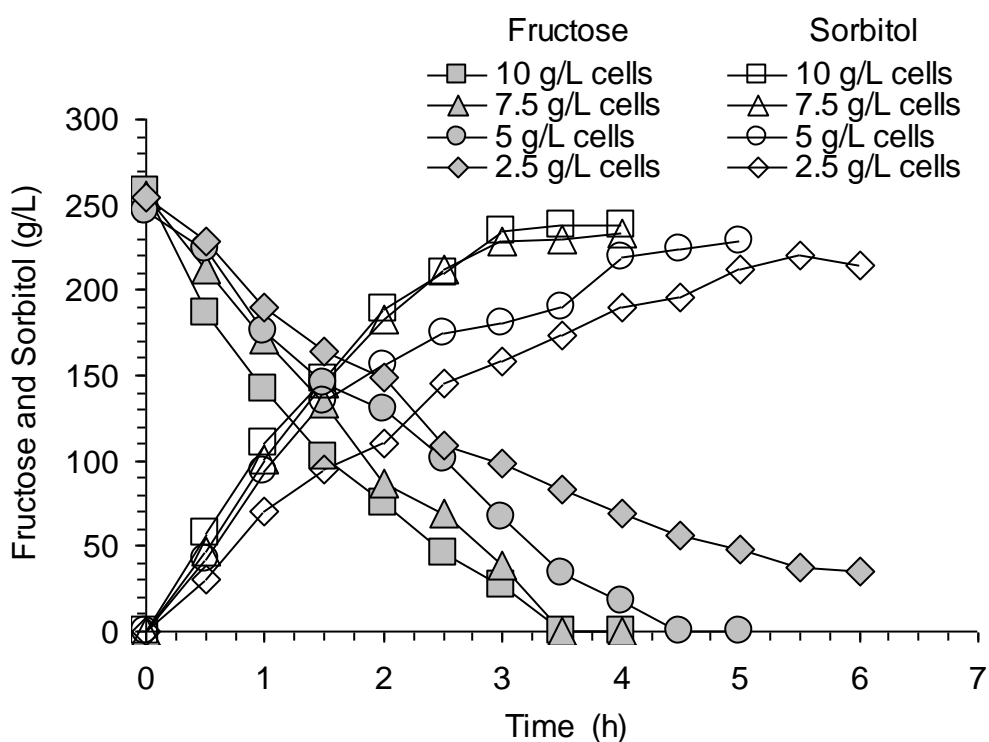


图 3.5 不同细胞用量对催化过程的影响

Fig. 3.5 Effect of cell concentrations on bioconversion using fresh cells

3.3.3 新鲜游离的细胞循环利用生产山梨醇和葡萄糖酸

选择 5 g/L、7.5 g/L、10 g/L (细胞干重) 细胞浓度进行催化循环试验, 在第一次细胞催化结束之后, 将催化液进行离心 (8000 rpm, 10 min), 然后进行第二次催化过程。

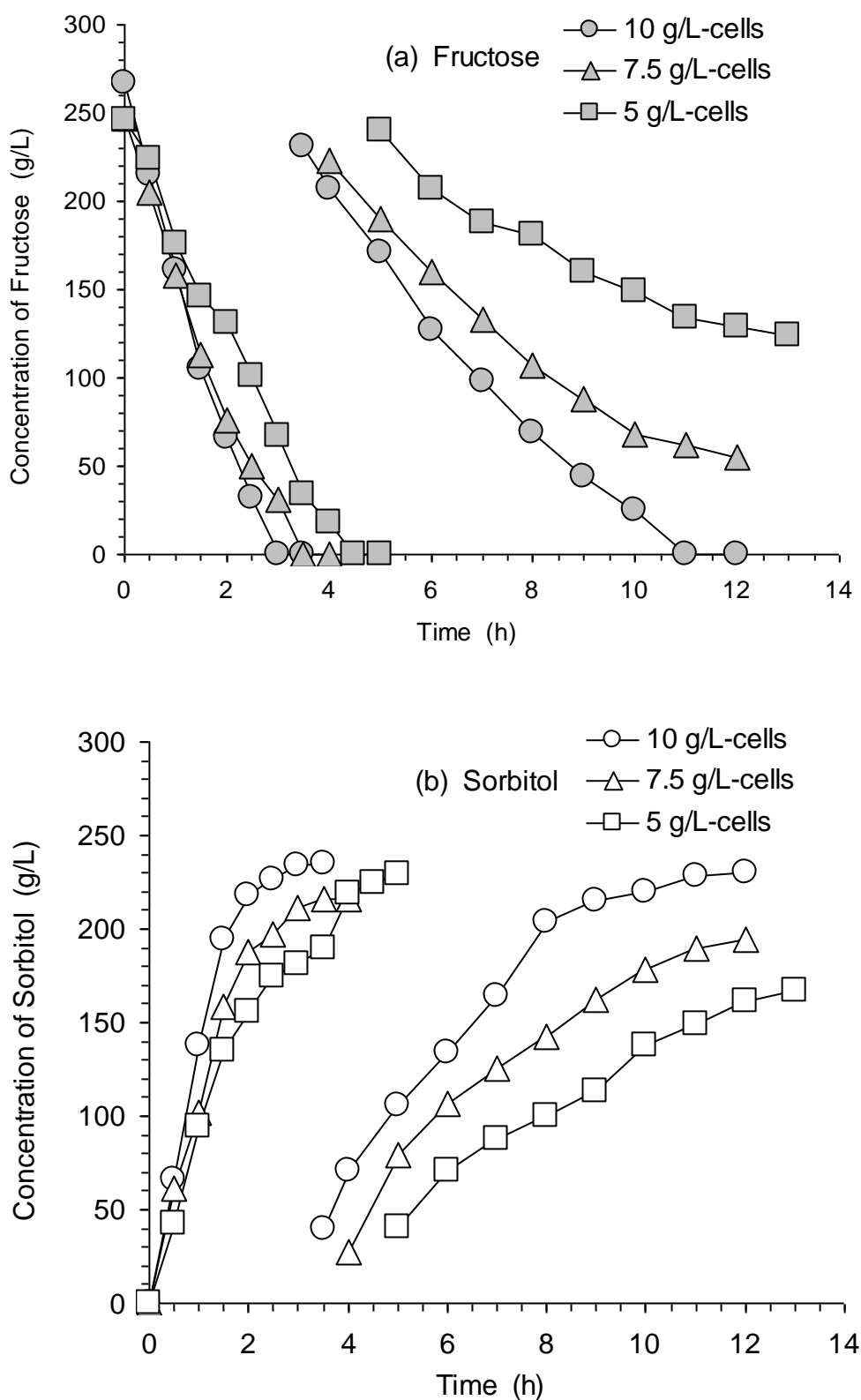


图 3.6 新鲜游离细胞循环利用的生物催化过程

Fig. 3.6 Time course of a bioconversion with cell reused

表 3.6 细胞循环利用的生物催化过程

Table3.6 Time course of the bioconversion with cell reuse

	Stage 1			Stage2		
Fresh cell biomass (g/L)	10	7.5	5.0	10	7.5	5.0
Initial fructose concentration(g/L)	257.4	255.8	245.7	231.5	222.9	239.7
Sorbitol (g/L)	238.1	233.4	224.4	230.6	194.7	166.8
Sorbitol yield based on fructose (%)	100.6	99.3	99.4	98.52	86.39	68.82

从 Fig. 3.6a 可以看出只有初始细胞浓度为 10 g/L 时第二次催化过程可以彻底进行，但是两次催化总时间为 11 h，而以 5 g/L 的新鲜细胞浓度单独进行两次催化，所需催化总时间为 10 h。很明显，以 10 g/L 细胞量进行两次催化，延长了催化的总时间，并没有优势存在。初始细胞量为 7.5 g/L 和 5 g/L 进行第二次催化，果糖消耗速率明显减慢，且后期果糖的浓度基本不变。这说明在催化过程葡萄糖果糖氧化还原酶酶活损失比较严重，已经无法实现果糖向山梨醇的转化。

为了进一步探索在游离的新鲜细胞不能顺利进行循环的原因，从两方面进行考虑，一是考察新鲜细胞循环进行催化的过程中酶活的变化情况，测定了 10 g/L 细胞浓度下两次催化过程中葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的变化情况。

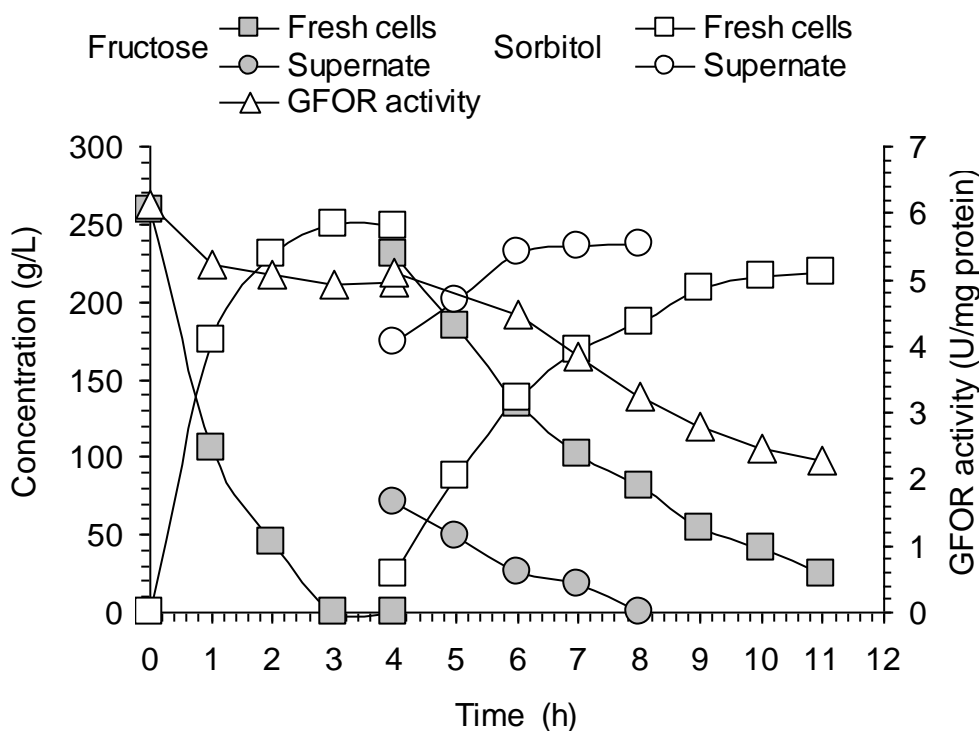


图 3.7 新鲜细胞 (10g/L) 循环利用过程中的酶活变化

Fig. 3.7 Change of GFOR activity in the bioconversion by recycling fresh cell

从 Fig. 3.7 中可以看出酶活在整个催化过程不断下降, 第一阶段初始葡萄糖果糖氧化还原酶酶活 6.14 U/mg protein, 随着催化的进行, 第一次催化结束细胞葡萄糖果糖氧化还原酶酶活降低到 4.97 U/mg protein, 过程中酶活降低较少, 但是在第二次催化过程中, 随着时间的延长, 最终葡萄糖果糖氧化还原酶酶活为 2.49 U/mg protein, 酶活急剧下降。对于 5 g/L、7.5 g/L 细胞浓度, 单位酶活的降低以及总细胞量的不足, 导致最终催化无法彻底进行。

第二个方面是考察离心的上清液中是否存在酶活。首先将第一次催化后的水解液离心, 然后取离心的上清液 350 mL 和新鲜的混合水解液 150 mL, 在 pH 6.4 和 39 °C 条件下进行反应。从 Fig. 3.7 中可以看出混合液中果糖的浓度在不断降低, 同时山梨醇在不断生成, 这说明离心液中仍然存在一定的葡萄糖果糖氧化还原酶酶活, 这可能是由于细胞在催化过程中产生自溶现象, 使得葡萄糖果糖氧化还原酶酶渗透到反应溶液中, 造成一部分酶活的丢失, 在下一次的催化实验中酶活不足造成催化无法顺利进行。

因此, 游离的新鲜细胞在催化过程不能循环利用的主要原因可能是: 一方面催化过程中以 14 M NaOH 中和葡萄糖酸的生成, 强碱的加入不能非常快速的和酸进行中和, 在一定程度上使得葡萄糖果糖氧化还原酶酶活受到破坏; 一方面底物浓度过高, 导致转化过程中细胞生存能力下降, 活细胞数目下降, 最终导致整个体系中葡萄糖果糖氧化还原酶酶活下降^[29]; 另一方面细胞在催化过程中可能产生自溶现象, 使得葡萄糖果糖氧化还原酶酶渗透到反应溶液中, 造成一部分游离的酶, 在游离状态葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的丢失; 此外, 由于催化过程自身的反应条件, 酶活降低且无法恢复到初始状态^[21]。

3.4 利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸

3.4.1 固定化细胞载体的选择及改进

海藻酸钠和聚乙烯醇这种胶状材料在作为固定化载体材料时, 会形成坚硬的类似固体一样的结构, 这种结构的形成在一定程度上会阻止溶液中物质之间的交换过程。这种物质转移的性质不仅会受到 pH 和温度的影响, 还受到固定化材料、固定化颗粒大小等因素的影响。本文中通过一系列的实验最终确定使用聚乙烯醇和海藻酸钠混合材料作为固定化载体。

在单独使用海藻酸钠作为载体材料时, 颗粒在催化反应过程中不断膨胀并溶解(制备方法如下: 将 4% 的海藻酸钠溶液加热溶解, 冷却室温后将悬浮至 150 g/L 的细胞溶液进行混合, 海藻酸钠溶液和细胞溶液体积比 4: 1, 然后将混合物在磁力搅拌作用下混合 1 h, 以达到混合均匀。接着将混合液通过蠕动泵滴加到 0.3 M 氯化钙溶液, 之后搅拌 2 h。最后在 0.5% 戊二醛溶液中进行交联。颗粒的平均直径 2 mm, 最后将颗粒用大量超纯水清洗, 以除去颗粒表面的氯化钙溶液)。

而单独使用聚乙烯醇作为载体材料进行冷冻固定化时, 在催化过程中冷冻形成的颗

粒会发生溶胀现象（制备方法如下：首先，将 20% (w/v) 的聚乙烯醇溶液加热溶解，冷却至室温后将悬浮至 150 g/L 的细胞溶液（20 mL）进行混合（聚乙烯醇溶液和细胞溶液体积比 4: 1），将混合物在磁力搅拌作用下混合 1 h，以达到混合均匀。然后，将混合液均匀的平铺在玻璃容器中，之后在 -20℃ 条件下冷冻 24 h。最后将冷冻的物体取出后切成均匀的颗粒，其中颗粒为 4mm*4mm*4mm 的正方体形状）。

而在以聚乙烯醇和硼酸为材料进行固定化时，聚乙烯醇溶液和硼酸反应速率较慢，颗粒不能很快固化，颗粒会互相碰撞从而粘结在一起逐渐成团，如果延长颗粒之间的滴定时间，制备时间会过长而影响催化细胞的酶活性。

优化后的细胞固定化方法：选择加入少量的海藻酸钠于聚乙烯醇溶液中。制备方法如下：首先，将 12.5% (w/v) 的聚乙烯醇溶液和 0.125% 的海藻酸钠溶液加热溶解，冷却室温后将悬浮至 150 g/L 的细胞溶液（20 mL）进行混合（聚乙烯醇溶液和细胞溶液体积比 4: 1），将混合物在磁力搅拌作用下混合 1 h，以达到混合均匀。然后，将混合液通过蠕动泵滴加到饱和硼酸溶液（含有 0.3 M 氯化钙），之后搅拌 3 h。加入少量的海藻酸钠于聚乙烯醇溶液中，加速固定化颗粒的形成。在一定程度上改善了以往的固定化材料。

3.4.2 利用固定化细胞生产山梨醇和葡萄糖酸

考虑到细胞在整个生产过程中占去很大的成本，将细胞循环利用进行催化实验。在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和固定化的细胞颗粒，pH 6.4(4 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。

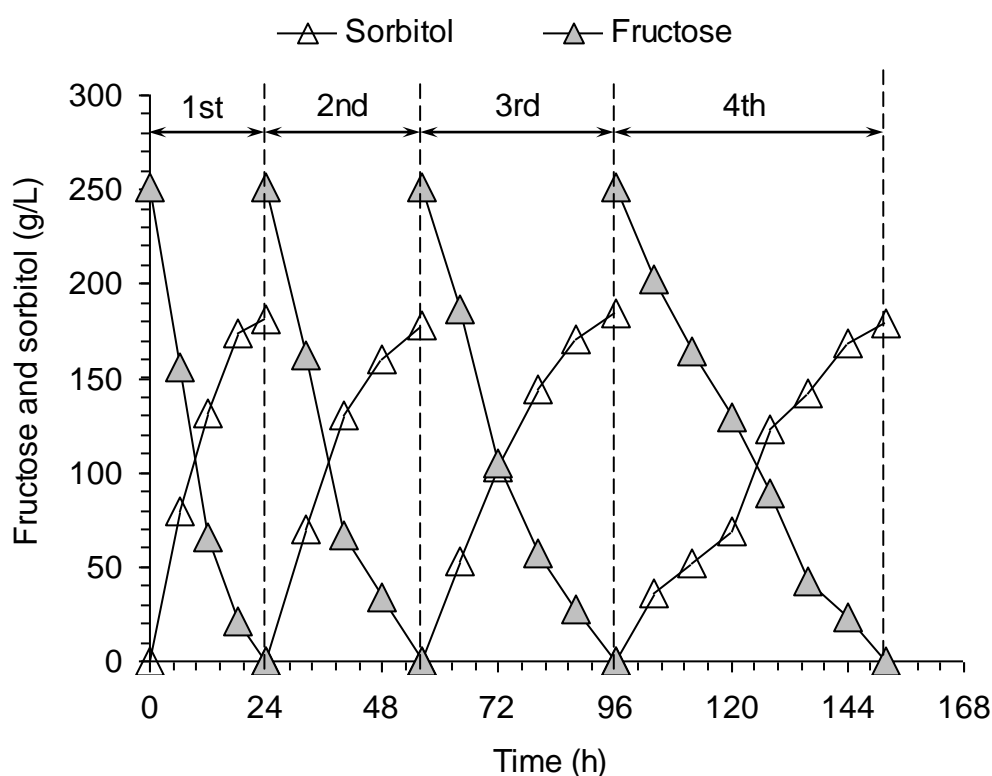


图 3.8 循环利用固定化细胞催化混合水解液的生物转化过程

Fig. 3.8 Time course of sorbitol and gluconic acid production using immobilized cells

Fig. 3.8 描述了在细胞浓度 5 g/L 下固定化细胞循环利用的过程。在每一次转化结束后，将反应器中的固定化细胞颗粒过滤取出，并且向反应器中加入新鲜的水解液，进行下一次催化过程。整个过程中可以进行四次循环催化过程，山梨醇的浓度为 180 g/L，山梨醇的转化率和比产率分别为 97.33% 和 0.98 g/(g cells h)。在已报道的文献中，在高糖浓度连续的生产过程中，只有在较长的时间内或者是混合复杂的多反应器系统中才会实现果糖和葡萄糖的高转化率。Kim 报道了一种利用菊芋和葡萄糖连续生产葡萄糖酸和山梨醇的生物技术，但是在整个过程中，水解液体系中运动发酵单胞菌的细胞量为 48.9 g/L，菊粉酶的用量为 88666 U/L，最大的产物得率仅为 44.4%。相反，本课题首先使用一种廉价的糖化酶 GA-L NEW 代替为实现工业化生产的菊粉酶实现菊粉和木薯淀粉的同时水解，其次，本课题中使用的细胞量仅为 5 g/L，整个过程中，山梨醇的转化率达到 97%，并且实现较高的转化率。

3.4.3 不同温度和 pH 条件下的生物催化过程

海藻酸钠和聚乙烯醇这种胶状材料在作为固定化载体材料时，会形成坚硬的类似固体一样的结构，这种结构的形成在一定程度上会阻止溶液中物质之间的物质的转移过程。这种物质转移的性质会受到 pH 和温度的影响。为了进一步了解固定化运动发酵单胞菌的最适的催化 pH 和温度，考察了不同 pH 和温度条件下的催化过程。在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和固定化的细胞颗粒，不同 pH 和不同温度下进行催化反应。

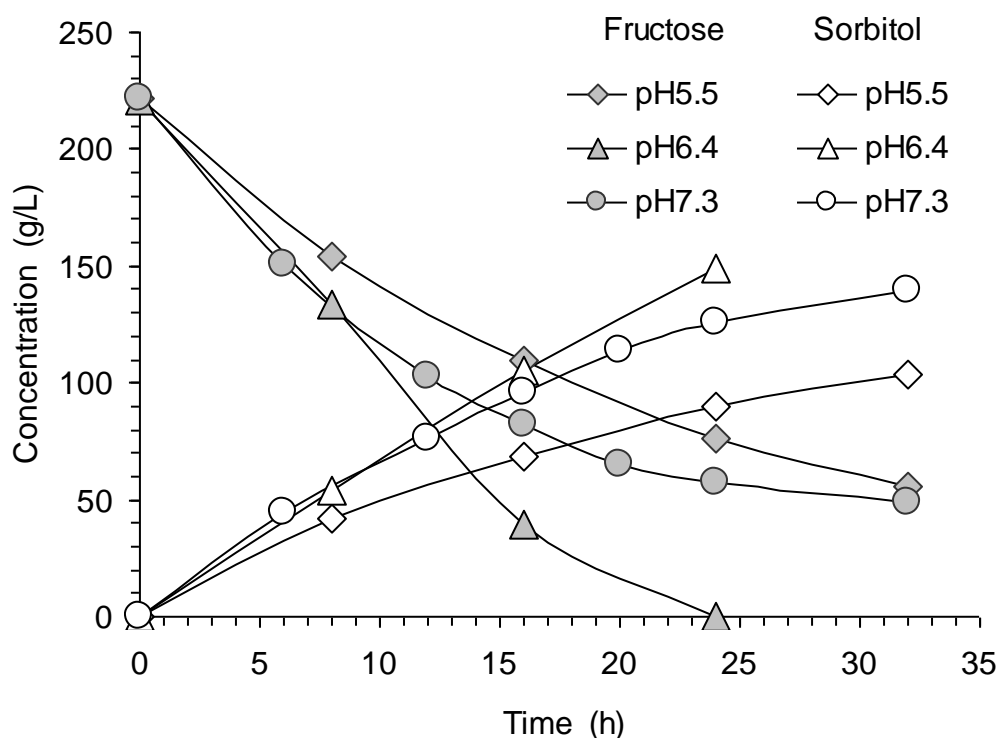


图 3.9 不同 pH 下利用固定化细胞的生物催化过程

Fig. 3.9 Time course of sorbitol and gluconic acid production from the mixed hydrolysate using immobilized cells at different pH

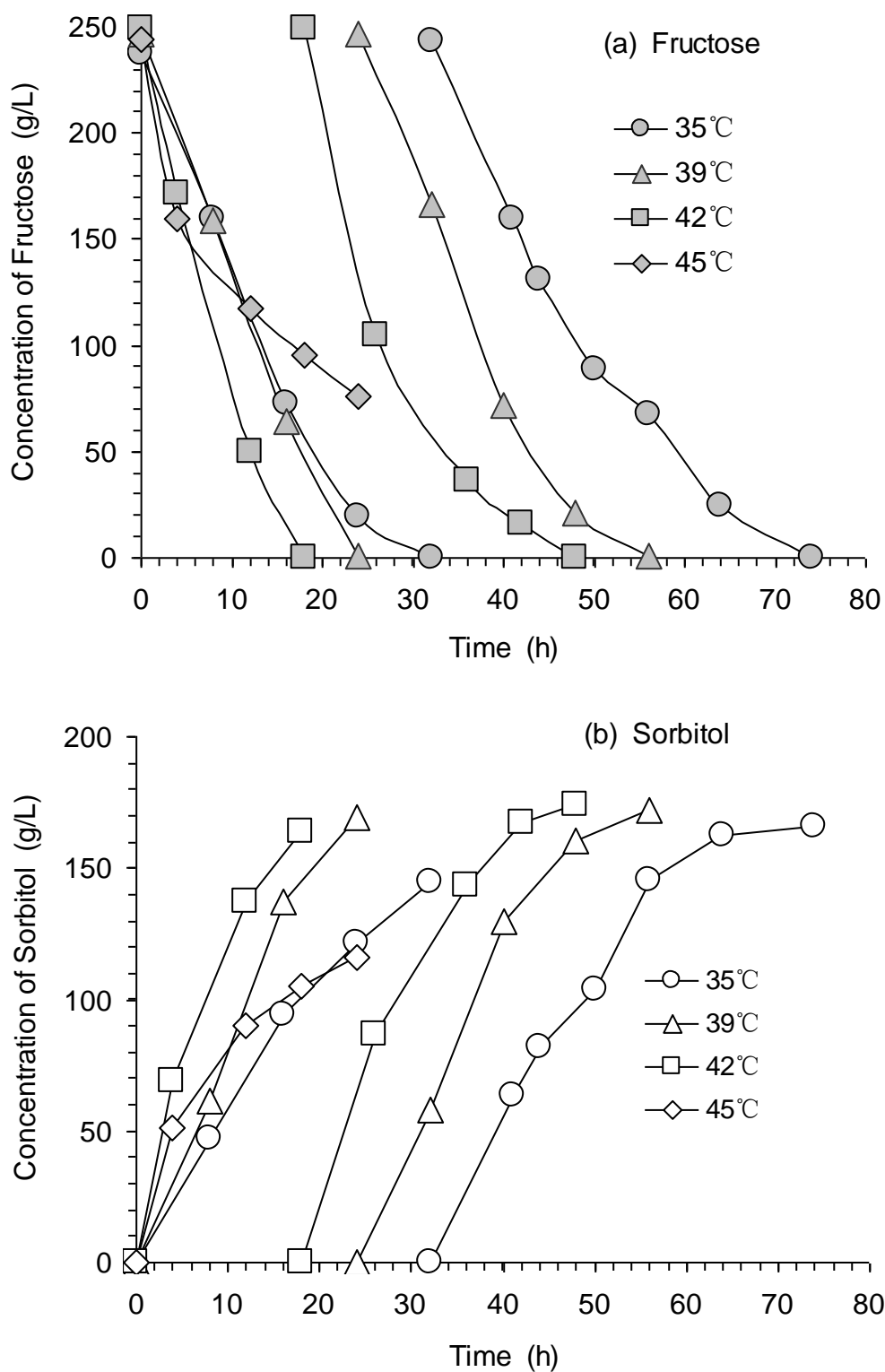


图 3.10 不同温度下利用固定化细胞的生物催化过程

Fig. 3.10 Time course of sorbitol and gluconic acid production from the mixed hydrolysate recycling immobilized cells at different temperature

从 Fig. 3.9 中可以看出在 pH 5.5 和 pH 7.3, 催化过程根本无法顺利进行。这和之前的报道比较相似, 对于固定化细胞颗粒, 在 42 °C 和 pH 6.5-7.0, 细胞表现出最好的酶活^[39]。本研究中, 由于反应体系较小, pH 的控制范围较宽泛, 因此选择较为宽泛的 pH 范围进行探索。在以固定化的细胞颗粒进行催化反应最适合的 pH 范围在 6.4 左右, 最适合的温度范围 39-42 °C。

从 Fig. 3.10 (a) 和 (b) 中可以看出在 39 °C 和 42 °C, 固定化细胞可以顺利进行第二次催化过程, 且催化时间没有明显的延长。而在 35 °C 下, 催化时间增加, 这明显降低了山梨醇的得率。而当温度增加至 45 °C, 催化过程无法顺利进行, 虽然在初始过程中催化速率有所增加。这可能是因为较高温度下固定化颗粒内部温度较高, 运动发酵单胞菌的葡萄糖果糖氧化还原酶酶活受到高温的影响造成损失。而在低温下由于葡萄糖果糖氧化还原酶不能处于较适宜的温度下, 酶活受到影响, 增加了催化的时间。

3.4.4 固定化细胞酶活损失原因的探索

在细胞浓度 5 g/L 下固定化细胞循环利用, 每次催化时间都有所延长, 第一个循环时间为 24 h, 第二个循环的时间为 30 h, 但是第四个循环的时间为 48 h。这说明在催化过程中细胞酶活有一定的损失。为了进一步考察固定化颗粒在催化过程酶活的损失, 对固定化颗粒的储存时间以及细胞颗粒在不同底物和产物中的酶活变化进行了研究。

首先将固定性细胞颗粒储存在 4 °C 中放置不同时间 (48 h、96 h、120 h), 然后取出细胞颗粒用清水冲洗并放置至室温, 在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和处理过的固定化细胞颗粒, pH 6.4 (4 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。Fig. 3.11 (a) 描述了新鲜的固定化细胞在 4 °C 放置不同时间 (48 h、96 h、120 h) 后葡萄糖果糖氧化还原酶酶活变化情况。从图中可以看出, 在不同时间内酶活都存在一定的下降, 在放置 120 h 后酶活仅为初始新鲜固定化颗粒的 90% 左右。这个现象和之前的文献报道有相似之处, Ferraz 等利用海藻酸钠固定 CTAB 渗透处理过的运动发酵单胞菌, 在 4 °C 储存过程中固定化细胞的酶活不断下降, 这主要是因为细胞不断从包埋体重泄露出来^[38]。这表明海藻酸钠在运动发酵单胞菌的固定化中并不是一种非常合适的载体材料。

为了测定基质和产物对固定化细胞颗粒的葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的影响, 在 500 mL 反应器中加入 300 mL 水解液和处理后的固定化细胞颗粒, pH 6.4 (4 M NaOH 控制 pH)、39 °C、150 rpm 进行催化反应。通过测定初始第一小时山梨醇的生成量来确定山梨醇的最大生成速率。Fig. 3.11 (b) 描述了细胞颗粒在不同溶液中放置 48 h 后酶活的变化情况。当细胞颗粒在葡萄糖、葡萄糖酸和山梨醇三种溶液中放置 48 h 后进行催化过程, 葡萄糖果糖氧化还原酶酶活变化不明显, 而在果糖溶液中放置 48 h 后进行催化过程, 单位时间内产生的山梨醇浓度明显下降, 这表明果糖引起的渗透压对细胞自身葡萄糖果糖氧化还原酶酶活造成较大影响。在不同的果糖浓度中放置 48 h 后进行催化过程, 单位时间内产生的山梨醇的量随着浓度的增加逐渐减少, 这同样说明不同果糖浓度产生的不同强度的渗透压对细胞葡萄糖果糖氧化还原酶酶活造成一定的影响。

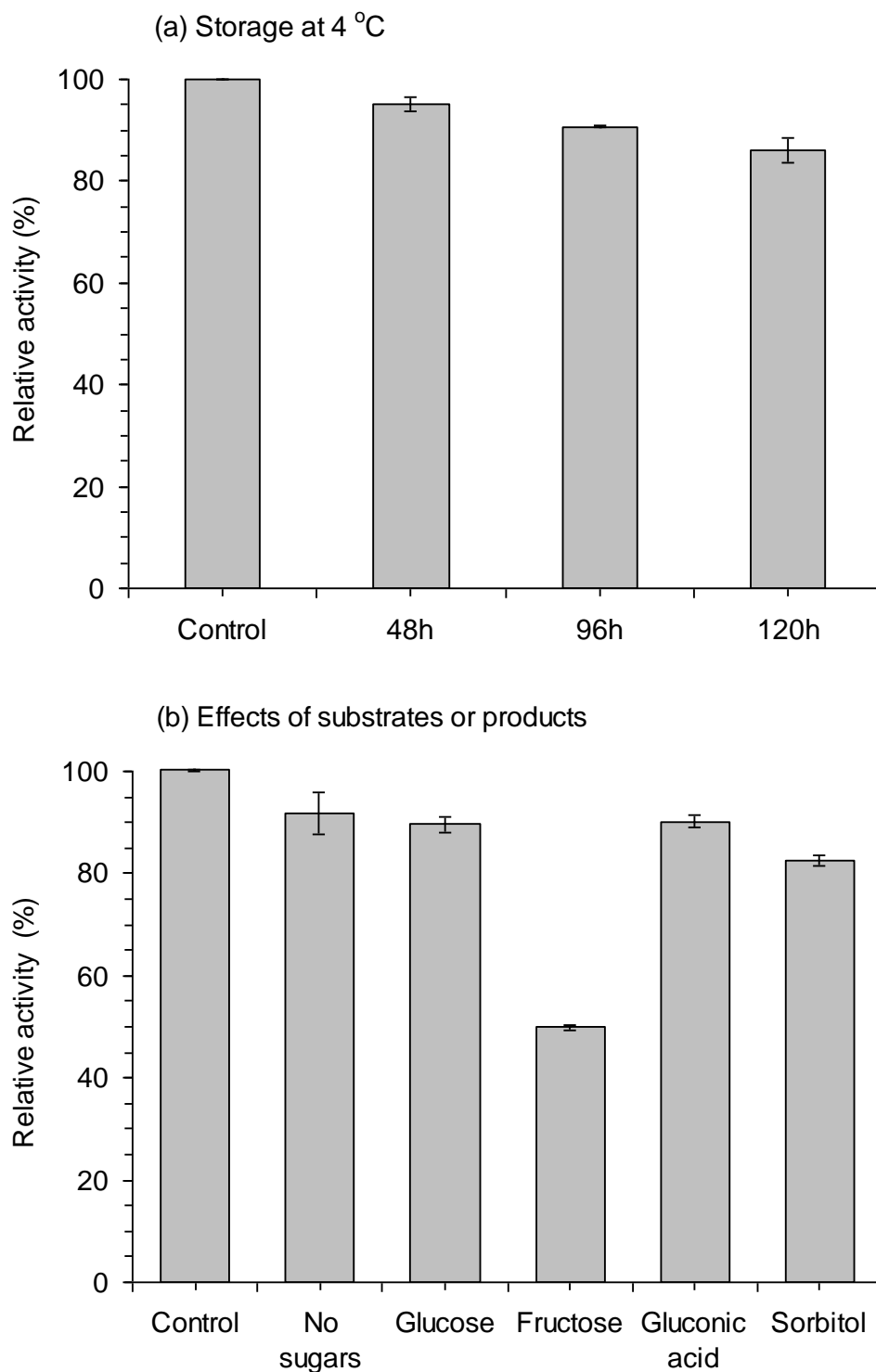


图 3.11 放置时间和基质及产物对固定化细胞 GFOR 的影响

Fig. 3.11 Effects of storage time or substrate or products to GFOR activity in the immobilized *Z. mobilis* cells

Malvessi 等人指出在催化过程中，由于固定化材料形成的坚硬的表面性质阻止了葡萄糖酸向溶液中的物质交换过程导致颗粒内部细胞葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的损失

^[39]，同时由于葡萄糖酸和 Ca^{2+} 之间的螯合作用导致固定化颗粒的结构变化^[52]。在我们的催化过程中果糖和葡萄糖的浓度很高，那么过程中会产生大量的葡萄糖酸，以 4 M 的 NaOH 溶液进行中和，由于海藻酸钙和聚乙烯醇形成的固定化结构表明坚硬从而组织了葡萄糖酸向基质中的不断交换，最终导致海藻酸钙和聚乙烯醇形成的固定化颗粒内部葡萄糖酸的浓度过高，低 pH 影响了细胞周质空间的葡萄糖果糖氧化还原酶，从而降低酶活。另外，Ferraz 等利用海藻酸钠固定 CTAB 渗透处理的运动发酵单胞菌，在催化过程中固定化颗粒不断溶解，导致细胞向基质中不断渗透。这也表明海藻酸钠并不是一种非常合适的载体材料（制备方法如下：将 8% 的海藻酸钠溶液加热溶解，冷却室温后将悬浮的渗透处理的细胞溶液进行混合，海藻酸钠溶液和细胞溶液体积比 1: 1，然后将混合物在磁力搅拌作用下混合均匀。接着将混合液通过蠕动泵滴加到 20% 氯化钙溶液。最后在 0.5% 的戊二醛溶液中进行交联）。

3.5 木薯淀粉水解液培养细胞

将木薯淀粉进行液化和糖化后获得葡萄糖溶液代替葡萄糖基质培养细胞用于催化过程。25% (w/w) 木薯淀粉液化后得到淀粉液，然后降温至 60 °C，调节 pH 至 6.0。此时加入糖化酶 GA-L NEW 在 60 °C、pH4.0 条件下糖化 24 h。将糖化后得到的水解液进行灭菌、离心和无机盐溶液混合，灭菌后在发酵罐中进行发酵。在无氧、30 °C、pH 6.0、150 rpm、接种量 10% (v/v) 条件下，培养 18 h 后，发酵培养液经过离心（8000 rpm, 5 min）获得湿细胞用于生物转化过程。如 Table 3.7，以淀粉水解液代替葡萄糖培养细胞，细胞量基本不受影响在一定程度上节省生产细胞的成本。以木薯淀粉为基质，细胞的酶活分别为 4.67 U/mg protein 和 3.98 U/mg protein。在以两种细胞进行催化，催化过程基本没有差异。因此利用木薯淀粉水解液代替葡萄糖培养运动发酵单胞菌非常可行。

表 3.7 以葡萄糖和木薯淀粉为碳源培养细胞的比较

Table 3.7 Comparison of using glucose and the hydrolysate of cassava starch as carbon to culture cells

参数	培养条件	
	葡萄糖	木薯淀粉
最大比生长速率, μ_m (h^{-1})	3.1	2.79
细胞产率, $Y_{X/S}$ (g cells /g glucose)	0.063	0.056
生物量浓度, (g cells /L medium)	0.034	0.027
比酶活 (U/mg protein)	4.67	3.98

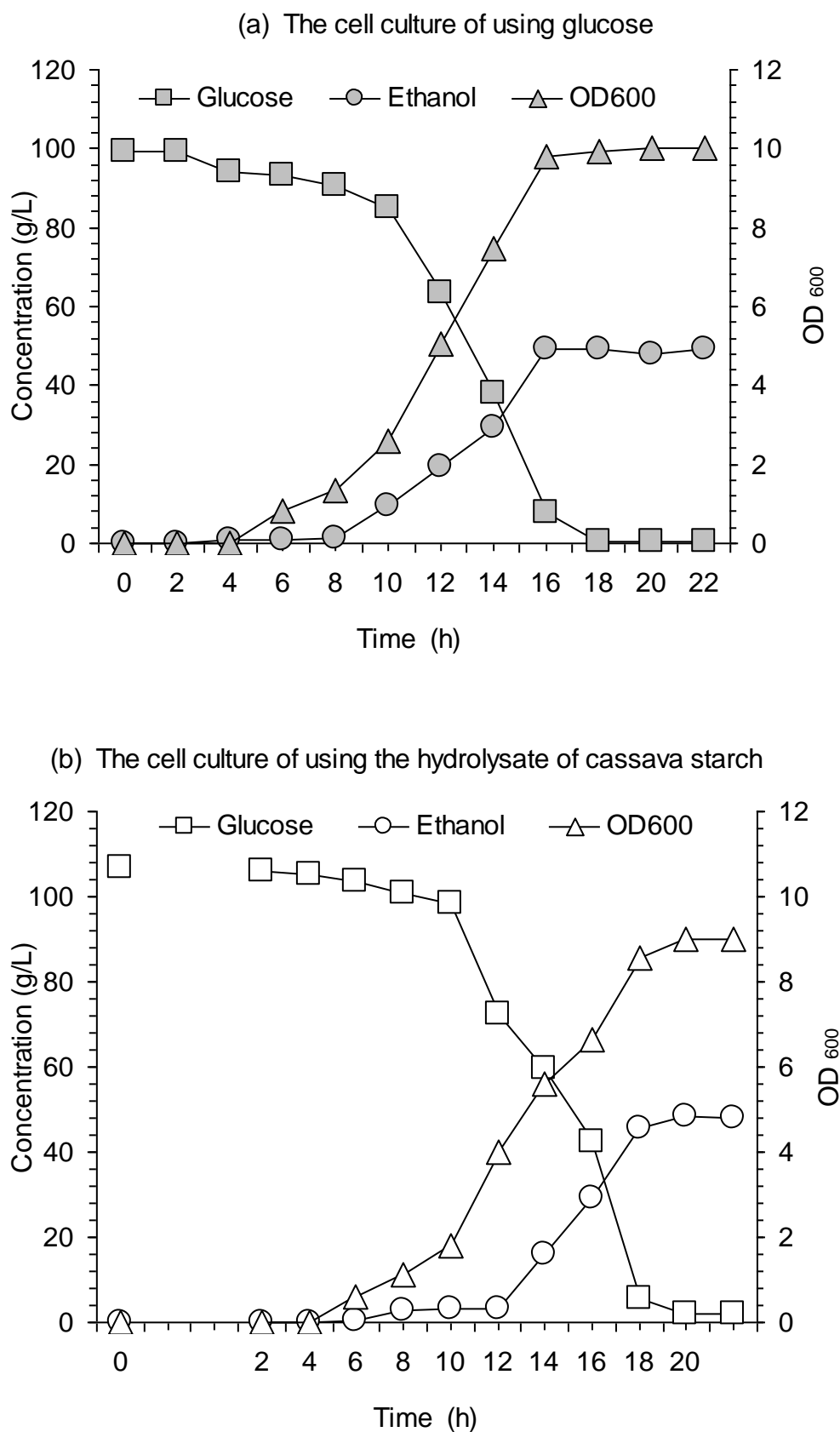


图 3.12 以葡萄糖和木薯淀粉为碳源培养细胞

Fig. 3.12 The cell culture of using glucose or the hydrolysate of cassava starch

第四章 结论与展望

4.1 以菊粉为基质，糖化酶 GA-L NEW 的表观动力学研究

本课题选用菊粉和木薯淀粉这两种廉价丰富的生物质原料做为底物得到葡萄糖和果糖，从而来生产葡萄糖酸和山梨醇。在菊粉的水解过程中，我们发现糖化酶 GA-L NEW 可以水解菊粉，并表现出 20 U/mL 的菊粉酶酶活，这可以替代菊粉酶来水解菊粉获得果糖和部分葡萄糖。糖化酶 GA-L NEW 表现出的这种性质目前尚不是很清楚，可能是因为糖化酶的蛋白结构和菊粉酶有相似之处，然后作用于菊粉；也可能是因为糖化酶 GA-L NEW 的商业化生产过程中有菊粉酶的生成，目前生产菊粉酶的霉菌菌株主要是黑曲霉，那么在利用黑曲霉生产糖化酶的过程中很可能黑曲霉产生一部分的菊粉酶。

糖化酶 GA-L NEW 与菊粉反应的最适合 pH 是 pH 4.0。在 pH 4.0-5.0，酶活比较稳定，保持 80% 以上的酶活，但是在 pH 5.6 酶活损失严重。酶的最适合反应温度是 60 °C。酶液在 60 °C 以下都可以保持较高活力，但是 65 °C、70 °C、80 °C 酶活损失严重。Co²⁺ 对糖化酶 GA-L NEW 的活力有明显的激活作用，Ca²⁺ 对酶活也有一定的促进用，而 Cu²⁺ 对酶活有抑制作用。Mg²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ 对糖化酶 GA-L NEW 酶活几乎没有影响。通过双倒数作图法得到 K_M 和 V_{max} 分别为 19.29 g/L 和 0.092 g/(L min)。

4.2 菊粉和木薯淀粉的共水解过程

本课题对菊粉和木薯淀粉的共同水解过程进行研究。在运动发酵单胞菌催化生产山梨醇和葡萄糖酸的过程中，需要添加部分的葡萄糖到菊粉水解液中，以得到等摩尔的果糖和葡萄糖基质。将木薯淀粉代替葡萄糖基质，和菊粉共同水解，获得含有等摩尔葡萄糖和果糖的混合水解液。以菊粉和木薯淀粉为原料生产山梨醇和葡萄糖酸，基质成本低廉，来源广泛丰富，充分利用了可再生资源，能够满足葡萄糖酸和山梨醇不断扩大的市场需求；将菊粉和木薯淀粉的水解结合，实现同时糖化过程，减少反应器使用，节省生产成本。

4.3 新鲜游离的细胞催化菊粉和木薯淀粉混合水解液生产山梨醇和葡萄糖酸

本课题对游离的新鲜运动发酵单胞菌催化生产山梨醇的过程进行研究。在较低的固含量水解液（30%、40%）中有少量乙醇生成，这不仅造成山梨醇产率的降低，而且增加产物分离成本。对于 50% w/w 的混合水解液，初始葡萄糖和果糖总糖浓度 500 g/L，

最终产物转化率接近 100%。在 5 g/L、7.5 g/L、10 g/L (细胞干重) 的细胞浓度下, 一次催化过程可快速彻底进行, 而对于细胞浓度 2.5 g/L (细胞干重), 催化后期果糖变化缓慢。将第一次催化后的细胞离心继续加入到新鲜水解液中进行第二次催化。只有初始细胞浓度 10 g/L 第二次催化过程可以彻底进行 (总时间 11 h)。但是这样的选择与 5 g/L 的新鲜细胞浓度单独进行两次催化相比较, 反而延长催化的总时间, 所以没有优势存在。

4.4 固定化细胞方法的应用及催化过程

本课题对运动发酵单胞菌的固定化过程以及生物转化过程进行研究。考虑到催化剂在整个生产过程中占据的成本, 在高固含量的水解液和低细胞浓度下对细胞进行固定化, 实现细胞的重复循环利用。整个过程中, 山梨醇的浓度为 180 g/L, 山梨醇的转化率和比产率分别为 97.33% 和 0.98 g/(g cells h)。

虽然选择加入少量的海藻酸钠于聚乙烯醇溶液中, 可以加速固定化颗粒的形成, 在一定程度上改善了以往的固定化材料, 但是在催化过程中细胞酶活的损失依然存在, 而这种酶活的损失主要是由于固定化材料自身的性质所引起的。一方面由于固定化材料形成的坚硬的表面性质阻止了葡萄糖酸向溶液中的物质交换过程导致颗粒内部细胞葡萄糖果糖氧化还原酶酶活的损失; 另一方面海藻酸钠在运动发酵单胞菌的固定化中并不是一种非常合适的载体材料, 葡萄糖酸和 Ca^{2+} 之间的螯合作用导致固定化颗粒的结构变化。

综上所述, 本课题利用糖化酶 GA-L NEW 同步水解菊粉和木薯淀粉生成等摩尔的果糖和葡萄糖, 原料成本低且减少了酶用量, 简化了生产工艺; 循环利用固定化细胞催化果糖和葡萄糖生产山梨醇和葡萄糖酸, 减少了催化剂的用量, 避免细胞催化剂的连续生产; 得到含有高浓度的山梨醇和葡萄糖酸的混合液, 减少了后续产品分离的成本。

4.5 展望

虽然本课题解决了原料以及工艺路线方面的一些难点, 但是仍难有很多需要进一步研究的内容。第一, 以菊粉为基质糖化酶 GA-L NEW 表现出一定的菊粉酶酶活, 但是该现象的原因并没有得到进一步的研究; 第二, 虽然选择加入少量的海藻酸钠于聚乙烯醇溶液中, 可以加速固定化颗粒的形成, 在一定程度上改善了以往的固定化材料, 但是在催化过程中细胞酶活的损失依然存在, 因此选择一种非常合适的载体材料依然是值得研究的方向; 第三, 本文虽然得到了含有高浓度的山梨醇和葡萄糖酸溶液, 但是产物的分离过程没有得到进一步研究, 因此在今后的工作中产物的纯化分离依然是一个值得研究的课题。

参考文献

- [1] Werpy, T., Petersen, G. Top Value Added Chemicals from Biomass. 2004. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. National Renewable Energy laboratory (NREL), Pacific Northwest National laboratory (PNNL) Press, USA.
- [2] Silveira, M.M. and Jonas, R. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 118: 321-336.
- [3] Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., Scarmino, I.S., da Silva, R.S.F. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochem.* 2005, 40: 747-751.
- [4] Aziz, M.G., Michlmayr, H., Kulbe, K.D., del Hierro, A.M.. Biotransformation of pineapple juice sugars into dietetic derivatives by using a cell free oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* together with commercial invertase. *Enzyme Microb. Technol.* 2011, 48: 85-91.
- [5] Kim, D.M., Kim, H.S.. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and inulinase. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 39: 336-342.
- [6] Zhang, T., Chi, Z., Chi, Z., Parrou, J.L., Gong, F. Expression of inulinase gene from the marine-derived *Pichia guilliermondii* in *Saccharomyces* sp.W0 and ethanol production from inulin. *Microb. Biotechnol.* 2010, 3: 576-582.
- [7] Zhao, C.H., Zhang, T., Li, M., Chi, Z.M.. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochem.* 2010, 45: 1121-1126.
- [8] Ge, X.Y., Qian, H., Zhang, W.G. Improvement of L-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and lactobacillus sp.. *Bioresour. Technol.* 2009, 100: 1872-1874.
- [9] Chun, U.H., Rogers, P.L.. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, 29: 19-24.
- [10] Rehr, B., Wilhelm, C., Sahm, H.. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 35: 144-148.
- [11] Ro, H.S., Kim, H.S.. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Enzyme Microb. Technol.*

1991,13: 920-924.

[12] Jang, K.H., Jung, S.J., Chang, H.S., Chun, U.H.. Improvement of the process for sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilized in κ -carrageenan. *Process Biochem.* 1996, 31: 485-492.

[13] Vogel, R. Sorbitol In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2003, 34: 492-498.

[14] Swings, J. and De ley, J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 1977, 41: 1-46.

[15] Sprenger, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes. *FEMS Microbiol. lett.* 1996, 145: 301-307.

[16] Barrow, K.D., Collins, J.G., Leigh, D.A., Rogers, P.I., Warr, R.G. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 20: 225-232.

[17] Leigh, D., Scopes, R. K. and Rogers, P. L. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 20: 413-415.

[18] Zachariou, M. and Scopes, R.K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.* 1986, 167: 863-869.

[19] Hardman, M. J. and Scopes, R. K. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* 1988, 173: 203-209.

[20] Loos, H., Voller, M., Rehr, B., Stierhof, Y.D., Sahm, H. and Sprenger, G.A. Localization of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. lett.* 1991, 84: 211-216.

[21] Gollhofer, D., Nidetzky, B., Fuerlinger, M. and Klaus D.K. Efficient protection of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* against irreversible inactivation during its catalytic action. *Enzyme Microb. Technol.* 1995, 17: 235-240.

[22] Zhang, X., Chen, G., Liu, W., 2009. Reduction of xylose to xylitol catalyzed by glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *FEMS. Microbiol.Lett.* 293, 214-219.

[23] Viikari, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 20: 118-123.

[24] Bringer-Meyer, S., Scollar, M., Sahm., H.. *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985, 23: 134-139.

[25] Ichikawa, Y., Kitamoto, Y., Kato, N. and Mori, N. 1989. Preparation of gluconic acid and sorbitol. European patent application. EP322, 723.

[26] Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. Process for obtaining sorbitol and gluconic acid by fermentation, and cell material suitable for this purpose. 1991, U.S. patent. 5,017,485.

[27] Jang, K. H., Park, C. and Chun, U. H. Improvement of oxidoreductase stability of

- cetyltrimethyl-ammonium bromide permeabilized cells of *Zymomonas mobilis* through glutaraldehyde crosslinking. *Biotechnol. Lett.* 1992, 14: 311-316.
- [28] Liu, C., Dong, H., Zhong, J., Ryu, D.D.Y., Bao, J.. Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. *J. Biotechnol.* 2010, 148: 105-112.
- [29] Silveira, M.M., Wisbeck, E., Lemmel, C., Erzinger, G., Lopes da Costa, J.P., Bertasso, M. and Jonas, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 1999, 75: 99-103.
- [30] Loos, H., Krämer, R., Sahm, H. and Sprenger, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J. Bacteriol.* 1994, 176: 7688-7693.
- [31] de Barros, M., Celligoi, M.A.P.C., Vignoli, J.A., Vargas, I.H.M.. Influence of ultrasound on sorbitol release by *Zymomonas mobilis* grown on high sucrose concentration. *Brazilian archives of biology and technology.* 2006, 49: 371-374.
- [32] de Barros, M., Celligoi, M.A.P.C.. Synthesis of sorbitol by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure. *Brazilian J. Microbiol.* 2006, 37: 324-328.
- [33] Boeck, R.D., Sarmiento-Rubiano, I.A.S., Nadal, I., Monedero, V., Perez-Martinez, G., Yebra, M.J.. Sorbitol production from lactose by engineered *Lactobacillus casei* deficient in sorbitol transport system and mannitol-1-phosphate dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85: 1915-1922.
- [34] Duvnjak, Z., Turcotte, G. and Duan, Z. D. Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1991, 35: 711-715.
- [35] Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. Characterization of D-sorbitol dehydrogenase involved in D-sorbitol production of a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52: 419-426.
- [36] Znad, H., Markos, J., Bales, V.. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger* growth and non-growth conditions. *Process Biochem.* 2004, 39: 1341-1345.
- [37] Roukas, T.. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *J. Industrial. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 25: 298-304.
- [38] Ferraz, H.C., Borges, C.P., Alves, J.M.. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000, 89: 43-53.
- [39] Malvessi, E., Carra, S., da Silveira, M.M., Ayub, M.A.Z.. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono- δ -lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas*

mobilis cells. *Biochem. Eng. J.* 2010, 51: 1-6.

- [40] Ohta, K., Hamada, T.. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 729-733.
- [41] Ferraz H.C., Alves .I.M. and Borges C.P. Coupling of an electro dialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells. *J. Membrane Sci.* 2001, 191: 43-51.
- [42] Gao, J., Xu, H., li, Q., Feng, X., li, S.. Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R,R-2,3-butanediol. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 7076-7082.
- [43] Thang, V.H., Kanda, K., Kobayashi, G.. Production of Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009, 161: 157-170.
- [44] Dong, H.W., Bao, J., Ryu, D.D.Y., Zhong, J.J.. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108: 1616-1627.
- [45] Kango, N.. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *J. Food Eng.* 2008, 85: 473-478.
- [46] Viswanathan, P., Kulkarni, P.R.. Full factorial design to study fermentative production of inulinase using inulin from kuth (*Saussurea lappa*) root powder by *Aspergillus niger* van Teighem UV11 mutant. *Bioresour. Technol.* 1995, 54: 117-121.
- [47] Derycke, D.G., Vandamme, E.J.. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1984, 34: 45-51.
- [48] Sheng, J., Chi, Z., Gong, F., Li, J.. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008, 144: 111-121.
- [49] Gong, F., Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., Li, J., Wang, X.. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2008, 13: 533-539.
- [50] Rouwenhorst, R.J., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W.A., van Duken, J.P.. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 11: 3337-3345.
- [51] Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Yue, L.. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 82: 211-220.
- [52] Milsom, P.E., Meers, J.L.. Gluconic and itaconic acids, in: Moo-Young, M. (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon, New York, 1985, 598-600.

致谢

本论文是在鲍杰导师的认真指导下完成的。鲍老师在我的研究思路和方法上给予了重要的引导，在我的研究实验上给予多方面的支持，在论文的撰写和修改方面同样给予了非常精心的指导。鲍老师严肃的科学态度、严谨的治学精神、精益求精的工作态度深深感染和激励着我。衷心感谢鲍老师在这三年来给予的帮助和指导。

感谢辛秀娟副教授、胡凤仙副教授、张建老师的指导和帮助，以及他们对我的关心和教育。同时感谢其他老师和同学给予的帮助。

特别感谢我的父母，感谢他们对我的支持以及对我无微不至的关心和爱。

最后还要向所有关心我的老师、同学、亲戚、朋友表示衷心的感谢！

硕士期间发表论文

1. Kehong An, Fengxian Hu, Jie Bao*. Simultaneous saccharification of inulin and cassava starch using commercial glucoamylase and the consequent bioconversion to high titer sorbitol and gluconic acid. Under review.
2. 鲍杰, 安克红, 胡凤仙. 一种利用固定化重组运动发酵单胞菌同时催化菊粉果糖和木薯葡萄糖生产山梨醇和葡萄糖酸的方法. 专利, 申请号: 201210039707.4.