

具有高活力天门冬氨酸酶的大肠杆菌 AS1.881 固定化细胞

孟广震 杨康婉 寇秀芬 张渝英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1. 大肠杆菌 AS1.881 是一株天门冬氨酸酶的高产菌株, 每毫升培养物为 2000 单位左右, 约相当于每克湿细胞 10 万单位。

2. 比较了琼脂凝胶包埋法和聚丙烯酰胺凝胶包埋法两种制备固定化细胞的方法, 前者较后者有较大的优越性: 收率高, 无毒, 成本低, 方法简便。

3. 比较了固定化细胞和自然细胞天门冬氨酸酶的一些生物化学性质: pH、温度和二价金属离子对两者酶促反应速度的影响相似; 固定化细胞热稳定性较差, 但 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} 等二价金属离子对热钝化有保护作用; 在底物和 pH 6.5 柠檬酸缓冲液中于 37°C 保温, 两种细胞的酶活力均有显著提高。

4. 固定化细胞柱可被用于连续生产 L-天门冬氨酸, 包埋 80 克湿细胞的固定化细胞柱在 37°C 连续工作 20 天, 可催化约 1000 升 1 M 反丁烯二酸铵完全转化为 L-天门冬氨酸, 并保存其大部分酶活力。

有关固定化微生物细胞的研究是从固定化酶的研究中派生出来的一个新兴领域, 它免去了酶的抽提、制备之繁, 直接用各种方法把微生物细胞加以固定化, 从而大幅度地提高了酶的收率, 降低了生产成本, 为工业化生产创造了良好的条件, 因而这一研究领域越来越引起人们的注意^[1]。

天门冬氨酸在化工、医药和食品工业等方面有多种用途^[2]。天门冬氨酸酶 (EC 4.3.1.1) 能专一地催化反丁烯二酸和氨转化为 L-天门冬氨酸。

本文报道一株天门冬氨酸酶高产菌株的培养方法, 固定化细胞的制备方法及其生物化学性质。

材料和方法

(一) 材料

丙烯酰胺和 N, N, N', N'-四甲基乙二胺为英国 BDH 厂出品; N, N'-甲撑双丙烯酰胺和过硫酸钾为北京化工厂出品; 反丁烯二酸 (含量为 97.8% 之工业品) 为无锡溶剂厂出品; 琼脂 (碎片状) 为青岛海洋渔业公司水产加工厂出品。

(二) 菌株

共试验 11 株大肠杆菌, 其中 5F3 菌株为上海味精厂提供; 其他菌株均系本所菌种保藏组提供, 经北京化工厂粗筛后确定, 都是酶产量较高的菌株。以上菌株通常都在普通牛肉汁培养基中保存。

(三) 摇瓶培养基

成份 (%): 玉米浆 7.5, 反丁烯二酸 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02。用氨水调 pH 至 6.0, 煮沸后过滤。于 500 毫升锥形瓶中装 50 毫升滤液。菌体的培养方法在实验结果中叙述。

(四) 固定化细胞的制备方法

发酵液于 10,000 转/分离心 10 分钟, 得湿细胞, 一般用以下两种方法制备固定化细胞。

1. 琼脂凝胶包埋法。取 0.25 克湿细胞悬浮于 2 毫升生理盐水中, 加 4 毫升 9% 琼脂溶液 (50°C), 搅拌均匀后置冰箱迅速冷凝, 得最终浓度为 6% 的凝胶, 切成 3—4 毫米立方的小块, 然后用 40 毫升生理盐水和 160 毫升蒸馏水依次淋洗, 滤干即得固定化细胞。

2. 聚丙烯酰胺凝胶包埋法, 参照 Chibata 等^[3]

本文于 1977 年 9 月 15 日收到。

* 部分工作与无锡溶剂厂协作完成。

报告的方法进行。取 0.5 克湿细胞悬浮于 2 毫升底物溶液(1M 反丁烯二酸溶液用氨水调至 pH8.5, 内含 1mM Mn^{2+} ,) 中, 依次加入丙烯酰胺 375 毫克, N,N'-甲撑双丙烯酰胺 20 毫克, 5% 四甲基乙二胺 0.25 毫升, 2.5% 的过硫酸钾 0.25 毫升, 抽真空后 10 分钟内完全聚合, 得到最终浓度为 15% 的聚丙烯酰胺凝胶, 切成 3—4 毫米立方小块, 洗涤方法与处理琼脂凝胶相同。

(五) 天门冬氨酸酶活力测定

1. 自然细胞的酶活力: 取 2 毫升底物溶液加入试管中, 于 37℃ 平衡后, 加入 0.5 毫升细胞生理盐水悬浮液, 反应 30 分钟后, 置沸水浴中 5 分钟以终止反应。空白用预先煮沸的细胞悬浮液代替活细胞悬浮液, 其他操作相同。离心后分别取 0.2 毫升上清液用 0.1N 高锰酸钾滴定反丁烯二酸, 空白和样品滴定值的差为反丁烯二酸的消耗量。在上述条件下, 每小时催化消耗 1 微克分子底物的酶量定义为一个酶活力单位^[3,4]。

2. 固定化细胞酶活力: 取一份固定化细胞(通常含有 0.25 克至 0.5 克湿细胞) 于 100 毫升锥形瓶中, 加 20 毫升底物溶液, 于 37℃ 搅拌平衡 5 分钟, 立即吸滤 0.2 毫升反应液作为空白对照, 继续搅拌反应 15 分钟, 再吸滤 0.2 毫升反应液, 两个样品依同法用 0.1N 高锰酸钾滴定。

(六) 纸层析法

采用 30 厘米 Whatman No.1 滤纸, 用正丁醇:冰乙酸:水(4:1:2)溶剂系统^[5]上行展开 10—11 小时, 有机酸的显色液为 pH 7.5 的溴酚蓝乙醇溶液, 氨基酸的显色液为 0.5% 茚三酮丙酮溶液。

实验结果

(一) 大肠杆菌 AS1.881 的培养

11 株大肠杆菌经比较确定, AS 1.881 菌株产酶量最高, 其培养方法如下: 将培养 24 小时的新鲜斜面种子或 4% 的液体种子接种于摇瓶培养基中, 于 37℃ 旋转振荡培养 22—24 小时(偏心距 7 公分, 200 次/分), 培养基的 pH 值由 6 上升到 8.5 左右时, 细胞酶活力达最大值, 每毫升培养物的酶活力一般可达 2000 单位左右, 约相当于每

克湿细胞 10 万单位(图 1)。

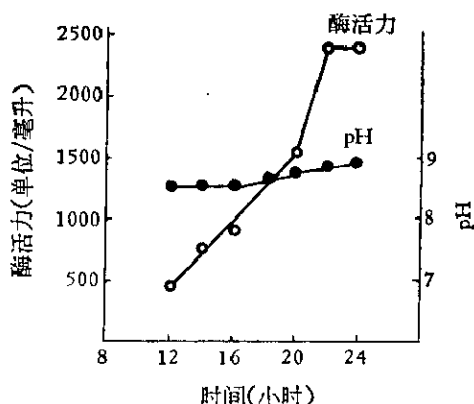


图 1 大肠杆菌 AS1.881 在培养过程中 pH 和酶活力的变化

(二) 制备固定化细胞方法的比较

各取 0.5 克湿细胞(酶活力 43404.5 单位)分别用 4% 琼脂凝胶和 15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋, 制成固定化细胞, 测定生理盐水洗涤液的酶活力, 计算包埋菌量均在 98% 左右。测定固定化细胞酶活力(表现活力), 计算所得琼脂凝胶包埋法酶活力的回收率略高(表 1)。

表 1 两种包埋方法的比较

包埋方法	包埋菌量(%)	固定化细胞 天门冬氨酸酶	
		表现活力(单位)	回收率(%)
琼脂凝胶包埋	97.5	30877.1	71.1
聚丙烯酰胺凝胶包埋	98.1	29223.0	67.5

(三) 琼脂凝胶包埋大肠杆菌 AS 1.881 的最适条件

1. 细胞浓度的影响: 用 4% 琼脂凝胶包埋不同浓度的细胞生理盐水悬浮液, 表 2 结果说明随细胞浓度增加酶活力的收率逐步下降, 包埋 0.25 克湿细胞收率可达 67.7%。

2. 琼脂凝胶浓度的影响: 将 0.25 克湿细胞(29646.8 单位)用不同浓度的琼脂凝

表 2 细胞浓度对表现活力的影响

湿细胞重量(克)	酶活力(单位)	固定化细胞	
		表现活力(单位)	酶活力回收率(%)
0.25	26869.5	18195.5	67.7
0.50	53738.9	24260.3	45.1
0.75	80608.4	28849.2	35.7

胶包埋。多次试验结果说明随凝胶浓度增大酶活力的回收率呈提高趋势，至 6% 浓度时收率最高(表 3)，同时具有较好的机械性能。

表 3 琼脂凝胶浓度对表现活力的影响

琼脂凝胶浓度(%)	包埋菌量(%)	固定化细胞酶活力	
		表现活力(单位)	回收率(%)
3	97.2	14645.9	49.4
4	98.2	18453.8	62.2
5	98.5	19332.6	65.2
6	98.7	23433.4	79.0
7	99.7	22847.6	77.0

(四) 琼脂凝胶包埋的大肠杆菌 AS1.881 固定化细胞的性质

1. pH、温度和二价金属离子对反应速度的影响：实验分别在不同 pH,不同温度和不同金属离子的条件下测定自然细胞和固定化细胞的酶活力。图 2 说明固定化细

胞的 pH 在 9—9.5 之间，自然细胞为 9.0；图 3 说明两种细胞的最适温度均为 40℃。表 4 说明四种金属离子对反应速度无明显影响。

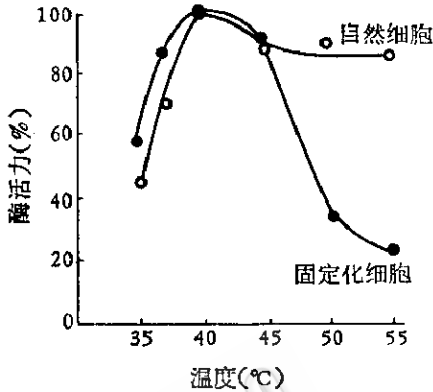


图 3 温度对酶反应速度的影响

表 4 二价金属离子对酶反应速度的影响

金属离子*	天门冬氨酸酶活力(%)	
	固定化细胞	自然细胞
Mn ²⁺	100	106.5
Mg ²⁺	97.1	94.7
Ca ²⁺	103	94.7
Fe ²⁺	103	107.9
无	100	100

* 金属离子浓度为 1mM。

2. 热稳定性和二价金属离子的保护作用：用生理盐水分别悬浮固定化细胞和自然细胞，在不同温度下处理 30 分钟，然后测定酶活力，图 4 结果表明固定化细胞热稳定性较差。表 5 是在 40℃ 热处理时，于生理盐水中分别加入四种不同的二价金属离子，结果表明二价金属离子对热钝化均有明显保护作用。

3. 细胞酶活力的活化：分别将固定化细胞和自然细胞悬浮于底物溶液，于 37℃ 保温，间隔不同时间测定酶活力，表 6 结果说明，酶活力明显上升，两种细胞均被活化。

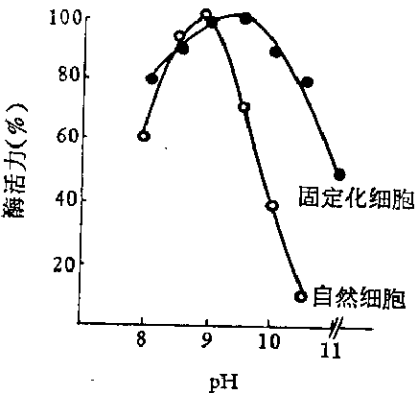


图 2 pH 对酶反应速度的影响
底物浓度 0.8M，用 NaOH 和 HCl 调各指定 pH

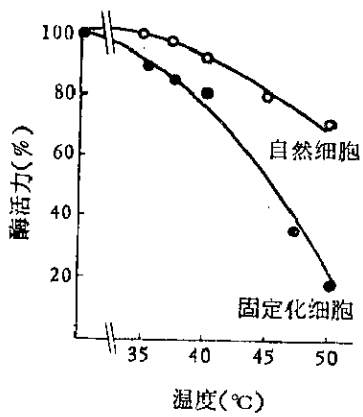


图4 细胞天门冬氨酸酶的热稳定性
未经热处理的酶活力为100%

表5 二价金属离子对热钝化的保护作用

金属离子*	天门冬氨酸酶活力(%)**	
	固定化细胞	自然细胞
Mn ²⁺	105.3	100
Mg ²⁺	94.8	100
Ca ²⁺	94.8	100
Fe ²⁺	94.8	100
无	81.6	85.3

* 金属离子浓度为1mM。
** 未经热处理的酶活力为100%。

表6 细胞酶活力的活化*

活化时间 (天)	天门冬氨酸酶活力(%)	
	固定化细胞	自然细胞
0	100	100
1	177.7	168.0
2	218.3	176.0
3	214.9	135.2

* 于37℃底物溶液中保温。

4. pH 稳定性: 将固定化细胞和自然细胞分别悬浮于0.1M不同pH的缓冲液中,于37℃保温21小时后,测定酶活力。图5结果说明在pH6—7范围内酶活力稳定,在pH6.5柠檬酸缓冲液中于37℃保温处理后,两种细胞的酶活力超出100%,也即被活化。

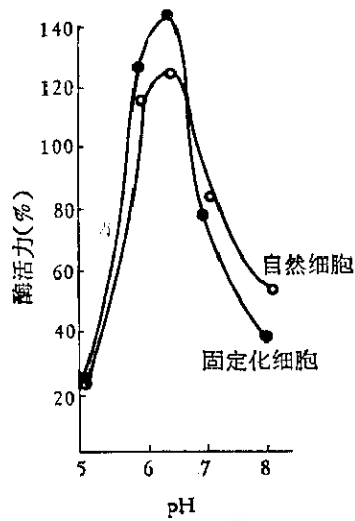


图5 pH稳定性
未经缓冲液处理的酶活力为100%,pH5.0—6.5为柠檬酸缓冲液,pH7.0—8.0为巴比妥缓冲液

5. 保藏试验: 将固定化细胞和自然细胞分别悬浮于底物溶液和生理盐水中,于冰箱中保藏,间隔不同时间测定酶活力。图6结果说明,在生理盐水中自然细胞酶

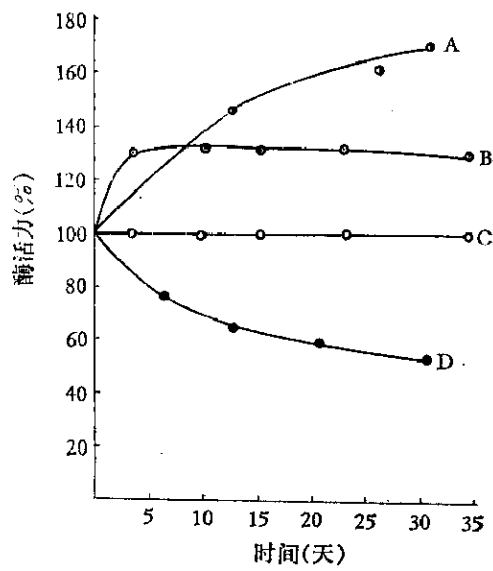


图6 保藏过程中酶活力的变化
A. 固定化细胞/底物 B. 自然细胞/底物
C. 自然细胞/生理盐水 D. 固定化细胞/生理盐水

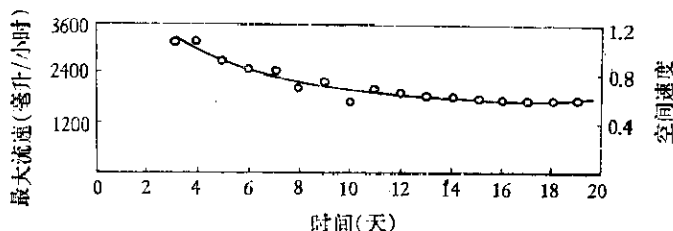


图7 柱反应器工作期间最大流速的变化

柱床 20×10 厘米, 湿细胞 80 克。最大流速指底物完全转化的最大允许速度, 为空间速度指每小时通过底物溶液相当于柱床体积的倍数。

活力稳定, 固定化细胞酶活力递减, 而在底物溶液中, 两种细胞的酶活力都有提高。

(五) 天门冬氨酸的连续生产

用琼脂凝胶包埋的固定化细胞连续生产天门冬氨酸。将包埋 80 克湿细胞的新鲜固定化细胞装成 20×10 厘米的柱反应器, 于 37°C 通过 1M 反丁烯二酸(用氨水调至 $\text{pH}8.5$, 内含 1mM Mg^{2+})随酶活力的衰减最大允许流速逐渐下降(图7)连续工作 20 天, 平均

流速 2100 毫升/小时, 累计总流量约 1000 升(内含 116 公斤反丁烯二酸), 测定残余活力为 82.4%。将流出物加热至 90°C , 用 60% 硫酸调 pH 至 2.8, 冷却后析出结晶, 用水充分淋洗后烘

干, 可得结晶 L-天门冬氨酸计 110 公斤。该结晶成品于 10% 盐酸中测定比旋光 $[\alpha]_D^{25} = +25.10$ 至 26.68 , 纸层析仅见 $R_f = 0.29$ 的斑点, 与 L-天门冬氨酸标准品一致(图8)。

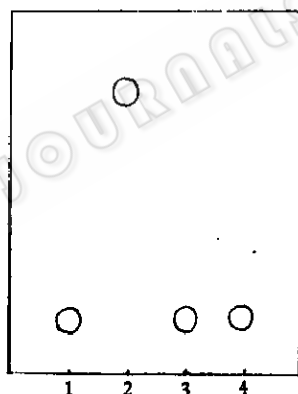


图8 酶促反应产物
纸层析图谱

1. 标准天门冬氨酸
2. 标准反丁烯二酸
3. 柱反应器流出物
4. 结晶

讨 论

1. 聚丙烯酰胺凝胶包埋法是目前制备各种固定化细胞最基本、最常见的方法^[1,6]。至于琼脂凝胶包埋法曾见 Toda 等^[7]报道, 该作者将酵母-琼脂溶液混合物滴入甲苯-四氯化碳混合物中, 形成琼脂球, 用于酵母

细胞蔗糖酶动力学的研究, 尚未见到将琼脂凝胶包埋的细胞用于工业生产的任何报道。本工作对两种包埋法进行了比较, 发现琼脂凝胶除酶活力回收率较高外, 尚有以下优点: 无毒; 成本低; 经简化的包埋法十分方便。因此, 可以认为琼脂凝胶在工业生产中是一个制备固定化细胞颇有价值的载体。

经适当处理后, 固定化细胞酶活力可以提高, 这一现象称之为“活化作用”, 处理方法有多种, 如在底物^[1]、十二烷基硫酸钠^[8]、溶菌酶^[9]、培养基^[10]存在的条件下保温处理固定化细胞, 均能收到活化效果, 据 Chibata 等^[3]用扫描电镜观察, 发现活化后的细胞已经自溶, 产物和底物更易通透, 致使固定化细胞表现更高的催化功能。本试验用底物溶液和固定化细胞一起保温后, 观察到类似现象, 同时还发现在 $\text{pH}6.5$ 的柠檬酸缓冲液中于 37°C 保温也有良好的活化作用。

2. 许多细菌有将反丁烯二酸转成天门冬氨酸的能力^[11]。Chibata 等^[3]报道, 大肠杆菌 ATCC11303 菌株每克湿细胞的酶活力为 1700—1800 单位, 而大肠杆菌 AS1.881 菌株每克湿细胞的酶活力为 10 万单位。但固定化细胞经活化处理后, 前者酶活力提高到原水平的 10 倍, 后者提高到原水平的两倍。从固定化细胞柱反应器的实际转化效率分析, 虽然工作条件不尽一致,

以 1 克湿细胞之固定化细胞完全转化 1 克分子反丁烯二酸铵的最大流量计, 用大肠杆菌 ATCC 11303 时, 每小时通过 6 毫升底物溶液^[12], 而用 AS1.881 菌株为 40 毫升。

参 考 资 料

- [1] 孟广震: 微生物学通报, 4(1): 41—45, 1977.
- [2] 金子武夫ら: アミノ酸工業(合成と利用), p. 251—313, 东京, 讲谈社, 1973.
- [3] Chibata, I. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27(5): 878—885, 1974.
- [4] 福井作藏: 實驗化学講座, 卷 25, p. 57, (赤堀四郎ら编), 丸善株式会社, 1958.
- [5] Matsushima, H. & Y. Mase: *J. Ferm. Technol.*, 51(7): 443—451, 1973.

- [6] Chibata, I. et al.: *Immobilized Enzyme Technology*, 111—127, (Weetall, H. H. & S. Suzuki eds.) Plenum Press, 1975.
- [7] Toda, K. & M. Shoda: *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 481—497, 1975.
- [8] Shimizu, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 53(2): 77—83, 1975.
- [9] Franks, N. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 252(2): 246—254, 1971.
- [10] Masbach, K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 12(1): 19—27, 1970.
- [11] Virtanen, A. I. & N. Ellfolk: *Methods in Enzymology*, 2, 386—390, (Colowick, S. P. & N. O. Kaplan eds.) Academic Press inc., 1955.
- [12] Toda, T. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27(5): 886—889, 1974.

THE IMMOBILIZED CELLS OF *ESCHERICHIA COLI* AS 1.881 POSSESSING HIGH ASPARTASE ACTIVITY

Meng Guang-zhen, Yang Lian-wan, Kou Xiu-fen and Zhang Yu-ying

(Institute of Microbiology, Academic Sinica, Beijing)

Escherichia coli AS 1.881 is a high yielding strain for producing aspartase. The yield of aspartase is about 2,000 units/ml of the fermentation broth, corresponding to ca. 100,000 units/g (packed weight) of the native cells.

Two different methods of immobilizing *E. coli* AS 1.881 cells were investigated. There are several advantages of the cells entrapped in an agar gel lattice over those entrapped in a polyacrylamide gel lattice, such as higher yield, non toxic, simpler operation and lower cost of production.

The enzymatic properties of immobilized *E. coli* cells were studied and compared with those of native cells. The effects of pH, temperature and bivalent

metal ions on the reaction rate of both immobilized and native cells are similar. The aspartase of the immobilized cells was more unstable towards heat treatment, but can be protected by bivalent metal ions such as Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} against thermal inactivation. The aspartase activity of these two kinds of cells considerably increased during incubation in a solution of 1 M ammonium fumarate or in pH 6.5 citrate buffer.

The immobilized cells column can be used for continuous production of L-aspartic acid from 1 M substrate at 37°C, in the presence of Mg^{2+} . Most of aspartase activity remained after 20 days of operation.