

产碱菌(*Alcaligenes* sp.) 119转化 苯丙酮酸形成 L-苯丙氨酸的研究

方佩静 闫章才

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

从土壤中分离到一株产碱菌(*Alcaligenes* sp.) 119,能将苯丙酮酸一步转化成 L-苯丙氨酸。酶反应的最适 pH 为 8.5,该酶在 pH8-9 之间稳定,最适反应温度为 37-45°C,金属离子 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等对酶有不同程度的抑制作用。该菌株培养在由葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏等组成的培养基中,可获得最高转化率。L-天冬氨酸为酶反应的最佳氨基供体。当苯丙酮酸浓度为 0.2 mol/L 时,细胞在 37°C 下反应 16 小时,可产 L-苯丙氨酸 30.1g/L,其克分子转化率为 92.7%。

采用离子交换树脂分离提纯产物,总收率在 69% 以上。产物经熔点、比旋光度、元素分析、红外光谱及纸上层析鉴定,证实是 L-苯丙氨酸。

关键词 酶法转化;氨基转移酶;苯丙酮酸;产碱菌

L-苯丙氨酸是人体八种必需氨基酸之一,可用于制备输液和综合氨基酸制剂的原料,全世界年需要量不过 100-200 吨。近年来由于发现它可作为二肽甜味剂天冬甜精(Aspartame)的关键性合成原料,故已日益显示其重要性。现在欧美等国对它的年需求量已增加到 6000-7000 吨^[1],这就促使人们对它的各种合成途径进行大量研究。发酵法^[2,3]和化学合成法^[4,5]传统地用于 L-苯丙氨酸的生产。为了建立 L-苯丙氨酸更有效的生产方法,国外许多关于酶法生产 L-苯丙氨酸的研究已经发表^[6],其中有的已投入工业化生产,而我国这方面的研究刚刚开始。本文采用苯丙酮酸和一种转氨酶系统通过生物转化合成 L-苯丙氨酸,以期将该法用于生产。

材料和方法

(一) 菌种

产碱菌(*Alcaligenes* sp.) 119,从土壤中分离得到。

(二) 苯丙酮酸

实验室内以甘氨酸、苯甲醛、和醋酸酐等原料合成^[7],熔点:150-154°C,乳白色结晶。

(三) 培养基和培养条件

培养基主要成分:葡萄糖、蛋白胨和牛肉膏。装液量:20ml/250ml 三角瓶,50ml/500ml 三角瓶,1L/2.6L 自控罐,0.55kg/cm² 灭菌 20 分钟。培养温度:30°C,转速:

本文于 1991 年 12 月 24 日收到。

· 本文为“七五”攻关项目。

200r/min (摇床), 400r/min (2.6L 罐)。

(四) 反应液组成

0.2mol/L 苯丙酮酸, 0.2mol/L L-天冬氨酸。

0.03mmol/L 磷酸吡哆醛, 1.4m mol/L 溴代十六烷基三甲胺, pH8.5。

(五) 苯丙酮酸的转化

培养液和反应液体积比为 1:2, 离心收集培养液中的菌体, 加入 0.2mol/L 的反应液, 在 37℃ 振荡或搅拌下进行转化, 检测反应体系中产物的浓度。

(六) 分析方法

1. pH 测定: 采用上海试剂三厂精密试纸。

2. 菌体生长测定: 取 1ml 细菌培养液, 用蒸馏水稀释至 10ml, 用 721 型分光光度计在波长 620nm 测其吸光度。

3. 酶活力测定: 将菌种接入装有 2ml 培养基的试管内, 在 30℃ 旋转摇床培养 24 小时, 离心弃上清液, 用等体积的生理盐水洗涤菌体, 加底物反应液 2ml, 在 30℃ 下振荡反应 1 小时, 加热至 80℃ 终止反应。检测反应混合物中 L-苯丙氨酸的形成。

一个酶活力单位“U”定义为每分钟产生 1 μ mol 的产物所需的酶量^[8]。

4. L-苯丙氨酸含量测定^[9]: 采用纸层析分离, 比色定量。

结 果

(一) 菌种的筛选

为了得到高酶活的菌种, 试验了 1000 多株从土壤中分离得到的细菌, 有较高酶活的两株, No. 119 和 No. 129。No. 119 经鉴定为产碱菌(*Alcaligenes* sp.), 用于以下试验中。

(二) 酶的性质

1. 温度、pH 和金属离子对酶反应速度的影响: 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细胞的酶活力, 结果见图 1 和表 1。

表 1 金属离子对酶反应速度的影响*

Table 1 Effect of metallic ion on enzyme reaction velocity

| 金属离子 Metallic ion | Fe ²⁺ | Mn ²⁺ | K ⁺ | Co ²⁺ | Zn ²⁺ | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ | 无 None |
|-----------------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| 酶活力(%) Relative activity | 61.8 | 65.1 | 70.9 | 73.1 | 78.8 | 85.7 | 92.5 | 100 |

* 金属离子浓度: 0.1m mol/L.

Concentration of metallic ion: 0.1m mol/L.

图 1 表明, 随着温度升高, 细胞酶活力呈直线上升, 50℃ 时酶活力达到最高, 超过 55℃, 酶活力急剧下降。酶反应的最适 pH 在 8.5。表 1 表明, 金属离子对酶有不同程度的抑制作用。

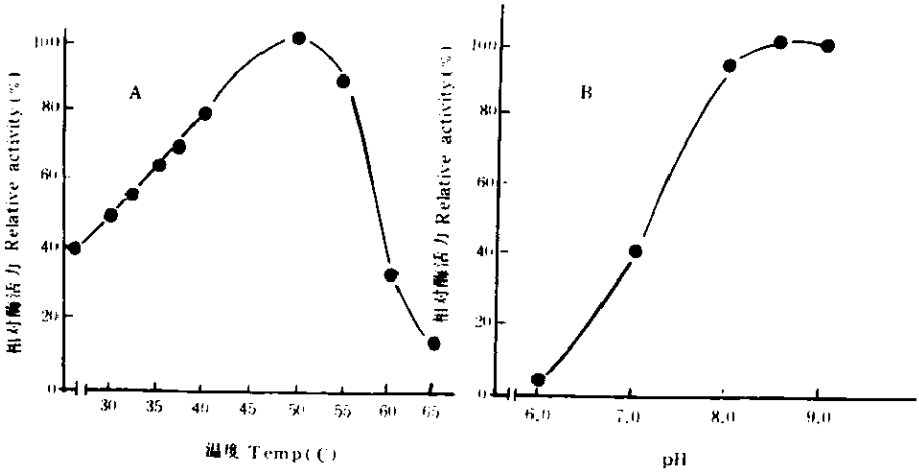


图1 温度(A)和 pH(B)对酶反应速度的影响

Fig. 1 Effect of temperature (A) and pH (B) on enzyme reaction velocity

2. 酶的热稳定性: 将培养好的细菌离心, 弃去上清液, 然后悬浮在生理盐水中, 在不同温度下处理 1 小时后测定酶活力, 未经处理的酶活力为 100%, 结果见图 2。若温度超过 40°C, 则酶的稳定性较差。

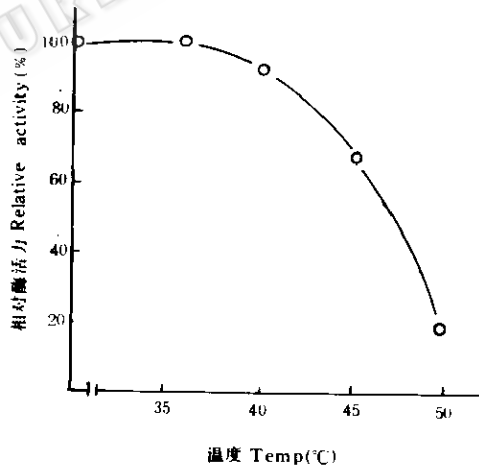


图2 酶的热稳定性

Fig. 2 Thermal stability of enzyme

3. 酶的 pH 稳定性: 将培养好的细菌分别悬浮于 0.1mol/L 的不同 pH 缓冲液中, 于 30°C 保温 1 小时后测定酶活力, 未经缓冲液处理的酶活力定为 100% (表 2)。

表 2 酶的 pH 稳定性*
Table 2 pH stability of enzyme

| pH | 4.0 | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 9.0 | 9.6 | CK |
|-----------------------------|-----|-----|-----|------|-------|-------|------|-----|
| 酶活力(%) Relative activity | — | — | — | 98.1 | 100.6 | 109.4 | 90.6 | 100 |

* CK: 未经处理的细胞 Untreated cell

* pH4、5、6 为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH7、8、9、和 9.6 为巴比妥缓冲液

Buffer: pH4-6 0.1mol/L Citric acid-Sodium citrate buffer

pH7-9.6 0.04mol/L Barbital Sodium buffer

(三) 产酶条件和转化条件

1. 产碱菌 No. 119 的营养要求: 在以葡萄糖为碳源条件下, 试验了不同的有机氮源和无机氮源, 发现该菌在有机氮源中生长良好, 而在无机氮源中生长极差。试验表明, 该菌株培养在由葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏等组成的培养基中, 可获得最高转化率。

2. 产碱菌 No. 119 培养时间与菌体生长、pH 和转化率的关系; 结果见图 3。

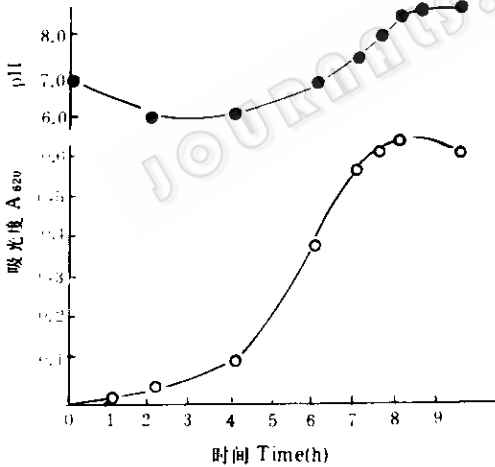


图 3 产碱菌 119 菌株的培养过程(2.6L 罐)

Fig. 3 Time course of incubation by (*Alcaligenes* sp.) 119 in 2.6 L fermentor

● ● pH; ● ● 吸光度 A₆₂₀

培养温度 30 C, 转速 400r/min, 空气流量 1 : 0.5(v/v/min)

Temp. 30 C, agitation 400r/min, aeration 1 : 0.5(v/v/min)

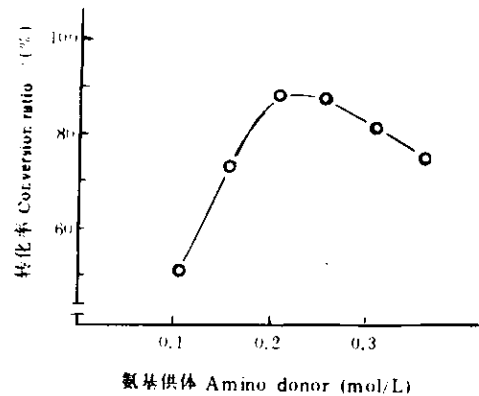


图 4 氨基供体浓度对转化率的影响

Fig. 4 Effect of concentration of amino donor on conversion ratio

从图 3 看出,细菌培养 8 小时,菌体生长达到最大值,此时培养液的 $\text{pH} > 8.0$,将此菌体进行转化,可达到最高转化率。继续培养,菌体衰老, pH 上升,酶活力降低,转化率也随之降低。

3. 不同氨基供体对转化率的影响:表 3 表明,L-天冬氨酸为最佳氨基供体,因为反应生成的草酰乙酸不稳定,易脱羧生成丙酮酸,使本来可逆的反应向着生成 L-苯丙氨酸的方向进行。

表 3 氨基供体对转化率的影响

Table 3 Effect of amino donor on conversion ratio

| 氨基供体 Amino donor | 缬氨酸 Valine | 甲硫氨酸 Methionine | 甘氨酸 Glycine | 赖氨酸 Lysine | 丙氨酸 Alanine | 天冬氨酸 Aspartic acid | 谷氨酸 Glutamic acid |
|----------------------------|---------------|--------------------|----------------|---------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| 转化率(%) conversion ratio | 8.38 | 16.39 | — | — | — | 89.2 | 44.7 |

氨基供体的浓度:0.2mol/L.

Concentration of amino donors: 0.2mol/L.

4. L-天冬氨酸的浓度对转化率的影响:酶反应中,苯丙酮酸和 L-天冬氨酸的摩尔比为 1:1。图 4 表明,增加氨基供体的浓度,转化率不再增加,超过 1:1.25 时,对酶有抑制作用。

5. 底物苯丙酮酸浓度对转化率的影响:试验中,随底物苯丙酮酸浓度的变化,氨基供体浓度按摩尔比 1:1 作相应变动,结果见表 4。

表 4 苯丙酮酸浓度对转化率的影响

Table 4 Effect of concentration of phenylpyruvic acid on conversion ratio

| 苯丙酮酸浓度 Concentration of phenylpyruvic acid | (mol/L) | 0.10 | 0.15 | 0.20 | 0.25 | 0.30 | 0.35 | 0.40 |
|---|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| | (g/L) | 16.4 | 24.6 | 32.8 | 41.0 | 49.2 | 57.4 | 65.6 |
| 转化率 Conversion ratio | (%) | 98.0 | 95.1 | 90.8 | 87.8 | 86.7 | 84.1 | 82.6 |
| L-苯丙氨酸浓度 Concentration of L-phenylalanine | (g/L) | 16.1 | 23.4 | 29.8 | 36.0 | 39.1 | 48.3 | 54.2 |

随着底物浓度的增加,L-苯丙氨酸浓度虽然增加,但转化率却下降了。考虑到苯丙酮酸在反应结束后不能回收,故不宜用过高浓度。

6. 温度和 pH 对转化率的影响:结果见图 5。

转化的适宜温度为 37—45 C,最适 pH 为 8.5。

7. 酶量对转化率的影响:酶反应需要的最少菌体量按培养液和反应液的体积比为 1:2,若菌体量继续增加,则转化率不再增加。

8. 反应时间对转化率的影响:结果见图 6。

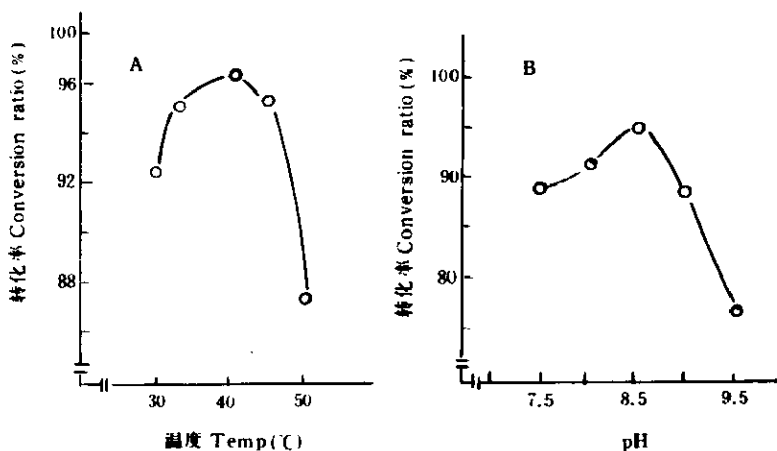


图5 温度(A)和 pH(B)对转化率的影响
Fig. 5 Effect of temperature(A) and pH(B) on conversion ratio

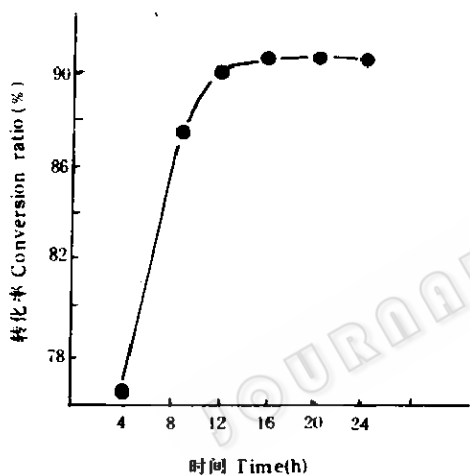


图6 反应时间对转化率的影响(2.6 L 罐)
Fig. 6 Effect of reaction time on conversion ratio
(2.6L fermentor)

在4—8小时中,转化率直线上升,至12小时反应基本完成,到16小时转化率达最大值,再延长时,转化率不再增加。

(三) 产物的提纯和鉴定

1. 产物的提纯:转化液经酸化、离心、除菌体和沉淀后,离心清液通过强酸型阳离子交换树脂层析,氨水洗脱,收集L-苯丙氨酸单斑部分,经减压赶氨、活性炭脱色、水中结晶,得白色小片状晶体,提取总收率达69%以上。离子交换过程的层析图谱见图7。

2. 产物鉴定:产物经熔点测定、比旋光度、元素分析、红外光谱及纸层析鉴定,证实是L-苯丙氨酸。结果分别见表5,图8和图9。

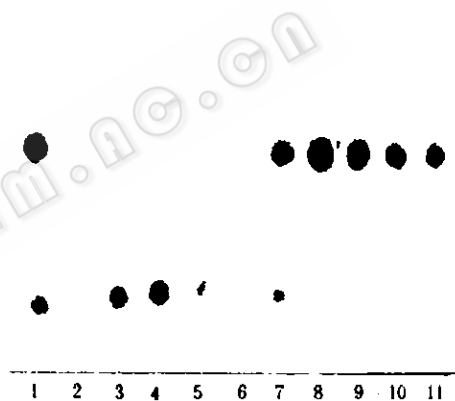


图7 离子交换过程层析图谱
Fig. 7 Paper chromatogram of ion-exchang course
1. 转化液 Conversion liquid;
2. 流出液 Effluent liquid;
3-6. 水洗后流出液 Effluent liquid after washing with water;
7. 氨水洗脱液 Eluate with $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$;
8-10. 含单斑洗脱液 Eluate containing single spot of L-phe;
11. 1% L-苯丙氨酸(日本“味之素”公司产品)
1% L-phe (Ajinomoto Co., Inc.)

表 5 产物的理化性质

Table 5 Physics and chemistry characters of the product

| 性质 Character | 理论值 Theory | 测定值 Found |
|---|---------------|--------------|
| 熔点 mp. (C d.) | 283-284 | 284.4-284.9 |
| 比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ Specific rotation | -34.5 | -33.5 -35.0 |
| 元素组成 Element composition (%) | C | 65.44 |
| | H | 6.71 |
| | N | 8.48 |

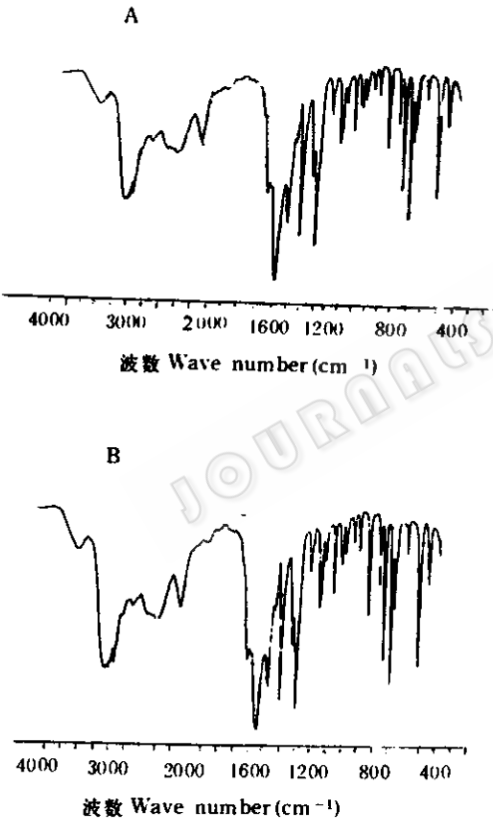


图 8 L-苯丙氨酸红外光谱

Fig. 8 IR spectrum of L-phenylalanine

- A. 日本“味之素”公司产品 Ajinomoto Co., Inc.
B. 提纯产物 Purified product

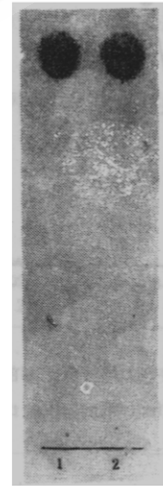


图 9 L-苯丙氨酸纸层析图谱

Fig. 9 Paper chromatogram of L-phenylalanine

1. 日本“味之素”公司产品 Ajinomoto Co., Inc.
2. 提纯产物 Purified product

讨 论

近几年,酶法制造 L-苯丙氨酸的技术在国外已取得显著进展。其中用转氨基反应由苯丙酮酸生产 L-苯丙氨酸已获得成功,并已投入工业化生产^[10]。该法的优越性在于底物苯丙酮酸可用廉价的化工原料氯苄和一氧化碳进行双羰化反应制得^[11],或通过廉价的海因(hydantoin)制得。反应中的氨基供体天冬氨酸也可用廉价的延胡索酸和氨通过酶促合成来代替。酶反应中草酰乙酸脱羧生成的丙酮酸易与 L-苯丙氨酸分开,且丙酮酸还可作为 L-色氨酸、L-酪氨酸或 L-3,4-二羟基苯丙氨酸的合成原料。如果用聚吡啶固定细胞作酶源进行连续反应时,则能长期稳定地生产 L-苯丙氨酸^[12]。由于该法是利用 L-苯丙氨酸在生物体内代谢的直接途径,可以得到高浓度的产物和有效的转化率,因此是一种优越的生产 L-苯丙氨酸的方法。

参 考 文 献

- [1] *Bio Industry*, 7(6):47-48, 1990.
- [2] 俊麻膜ニラ:公开特许公报,昭 56-64793, 1981.
- [3] Shio, I. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 52(9):2247-2253, 1988.
- [4] Yoshiharu, I. et al.: *Angew. Chem.*, 17(3):176-183, 1978.
- [5] 坂下啓一:公开特许公报,昭 62-55097, 1987.
- [6] 荒木和美子:有机合成化学, 46(2):66-74, 1988.
- [7] Blatt, A. H.: *Organic syntheses, Collective*, 2:354, 1955.
- [8] Nakamichi, K. et al.: *Appl. Biochem. Biotech.*, 11:367-376, 1985.
- [9] 潘家秀等:蛋白质化学研究技术,科学出版社,北京,第 27 页,1962 年.
- [10] Klausner, A.: *Biotechnology*, 3(4):301-307, 1985.
- [11] Perron, R. et al.: *Ger Offen.*, 2600541, 1976.
- [12] Calton, G. J. et al.: *Biotechnology*, 4:317-320, 1986.

STUDIES ON CONVERSION OF PHENYLPYRUVIC ACID TO L-PHENYLALANINE BY *ALCALIGENES* SP.

Fang Peijing Yan Zhangcai

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

A strain of *Alcaligenes* sp. 119 isolated from soil was selected as an aminotransferase source for the conversion of the phenylpyruvic acid to L-phenylalanine. The optimal pH and temperature for the enzyme reaction were 8.5 and 37—45 C, respectively. The enzyme was stable at pH 8—9. It was inhibited by metallic ion Fe^{2+} , Mn^{2+} etc, in certain degree. The highest conversion ratio was obtained while the strain was cultivated in a medium containing of glucose, peptone, meat-extract ect. L-aspartic acid was used as the optimal amino donor for enzyme reaction. 30.4g/L L-phenylalanine was produced in a molar yield of 92.7% from 0.2 mol/L phenylpyruvic acid at 37 C for 16 hours.

The product was purified by ion-exchange. The yield of pure crystalline L-phenylalanine was over 69%. It was identified as L-phenylalanine by melting point, specific rotation, element composition, infrared absorption spectrum and paper chromatography.

Key words Enzymatic conversion; Aminotranferase; Phenylpyruvic acid; *Alcaligenes*