

粘红酵母产 L-苯丙氨酸解氨酶的条件和 酶法合成苯丙氨酸的研究

丁新华 吴绵斌* 岑沛霖

(浙江大学化工系 杭州 310027)

摘要 研究了粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)中 L-苯丙氨酸解氨酶(PAL)(EC4.3.1.5)的产酶条件及用此酶把反式肉桂酸转化成苯丙氨酸的条件。结果表明,在下列培养基(g/L)及培养条件下 PAL 的活力较高:酵母膏 10.0,蛋白胨 10.0,NaCl5.0,KH₂PO₄ 0.5,苯丙氨酸 0.5,(NH₄)₂SO₄ 1.0,葡萄糖 5.0,pH6.0-6.5,培养温度为 30℃。转化过程中,[NH₄⁺]对初速度的影响符合米氏方程,其 K_m 和 V_{max} 分别为 16.85mol/L 和 5.96 g · L⁻¹ · h⁻¹,最适 pH 为 10.0。底物肉桂酸对反应初速度的影响,在低浓度时有激活作用,在高浓度下则有抑制作用。肉桂酸转化为苯丙氨酸的转化率在 60.0%以上。

关键词 粘红酵母,L-苯丙氨酸解氨酶,苯丙氨酸

L-苯丙氨酸解氨酶(PAL)(EC 4.3.1.5)广泛存在于植物及微生物细胞中,它催化 L-苯丙氨酸脱氨形成反式肉桂酸。Ogata 等^[1]首先报道了酵母细胞中存在 PAL,此后很多学者相继研究了其酶学性质^[2,3],结果认为 PAL 为具有四个亚基的调节酶。

PAL 最主要用途是利用其逆反应在适当条件下把反式肉桂酸转化成 L-苯丙氨酸。以这种方法生产苯丙氨酸在国外已投入工业化生产^[4],国内唐钺等初步报道了这方面的研究情况^[5]。

在酵母菌中,红酵母属的一些种具有较高的 PAL 活性。我们以粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)为菌种,对其 PAL 产生条件及用转化法生产 L-苯丙氨酸进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养方法

1.1.1 本实验所用菌种为粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)2.91,由浙江省微生物研究所赠送。

1.1.2 斜面培养:培养基为 5Be' 麦芽汁或下列合成培养基(g/L):酵母膏 10.0,蛋白胨 10.0,苯丙氨酸 0.5,NaCl5.0,琼脂 20.0,pH6.0。30℃培养 24 小时。

1.1.3 种子培养:培养基(g/L):酵母膏 10.0,蛋白胨 10.0,苯丙氨酸 0.5,NaCl 5.0,KH₂PO₄0.5,pH5.5。30℃培养 20-24 小时。

1.1.4 产酶培养基(g/L):酵母膏 10.0,蛋白胨 10.0,苯丙氨酸 0.5,NaCl5.0,

* 本校化工系生物化工专业 91 届毕业生。

本文于 1992 年 5 月 29 日收到。

KH_2PO_4 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, pH 6.0。30℃培养 20—24 小时。

1.2 细胞悬浮液制备

取培养一定时间的培养液 200ml, 离心后用 0.9% NaCl 洗涤, 再次离心, 然后用 0.9% NaCl 定容至 5ml, 即为细胞悬液, 供测 PAL 活力用。

1.3 PAL 活力测定及其反式肉桂酸的转化

PAL 活力测定类似于 Evan 的方法^[5]。将 1 份细胞悬液与 4 份含 1% 反式肉桂酸与 8mol/L 氨水 (pH 10.0) 的底物溶液混合, 在 30℃ 下反应 1 小时。离心终止反应。1 个酶活力单位 (U) 表示为每小时生成 $1\mu\text{mol}$ L-苯丙氨酸或消耗 $1\mu\text{mol}$ 反式肉桂酸。比活力为每毫克干细胞所表现的活力单位。肉桂酸转化生成苯丙氨酸的方法同上述, 只是改变反应条件并测定不同时间的肉桂酸浓度及其生成的苯丙氨酸浓度。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞生长用直接计数法或干重表示。

1.4.2 反式肉桂酸用分光光度法测定。把样品稀释一定倍数后测定 278nm 的光密度, 再根据标准曲线求出其浓度。

1.4.3 L-苯丙氨酸用纸层析法测定^[6]。

2 结果和讨论

2.1 PAL 产酶条件

2.1.1 用正交试验确定最适产酶培养基: 由于 PAL 是诱导酶, 故培养基中除必需的碳源及盐类外, 还必须加入诱导物 L-苯丙氨酸。很多文献都报道^[1,2]产酶培养基中含有 1.0% 酵母膏、1.0% 蛋白胨和 0.05% KH_2PO_4 , 因此把它们视为不变因素。其他因素如 L-苯丙氨酸、pH、葡萄糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 PAL 形成影响较大, 因此选用上述四因素作四水平正交试验, 得到下列最佳培养基 (g/L): 酵母膏 10.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, KH_2PO_4 0.5, 苯丙氨酸 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, 葡萄糖 5.0, pH 6.0—6.5。

据文献报道, 葡萄糖对 PAL 合成有分解阻遏作用^[7]。从正交实验结果看, 随葡萄糖浓度升高, 比活力下降, 但如果小心地控制其浓度, 可使 PAL 活力达到最高峰以前葡萄糖便消耗完毕。但如果葡萄糖浓度太低, 碳源不足, 则细胞生长量减小。所以, 加入少量葡萄糖是必要的。

L-苯丙氨酸虽是诱导物, 但从结果看, 即使不加 L-苯丙氨酸, PAL 活力也较高。这是因为酵母膏及蛋白胨本身含有少量 L-苯丙氨酸, 所以仅加入少量即可使活力达到最大, 过量的 L-苯丙氨酸反而会使 PAL 活力下降。

NH_4^+ 浓度对 PAL 合成也很有影响。随 $[\text{NH}_4^+]$ 增加, PAL 活力也随之增加, 但到一定程度后, PAL 活性反而下降。PAL 活力随 $[\text{NH}_4^+]$ 增高而增高表明 PAL 合成量的增加, 但高 $[\text{NH}_4^+]$ 会影响细胞对苯丙氨酸的吸收, 从而使得 PAL 合成量的下降^[6]。

关于 pH 对 PAL 活性的影响, 文献报道很不一致^[5,6,8], 本文的结果是在 6.0—6.5 之间。

2.1.2 碳源对 PAL 活力的影响: 按上面得到的培养基成份, 配制含 1.0% 的各种糖类的

培养基,接种后在 30℃下培养 24 小时,测定 PAL 活力,结果如表 1。

表 1 碳源对 PAL 活力的影响

Table 1 Effect of carbon sources on the induction of PAL

碳源 Carbon sources	果糖 Fructose	山梨醇 Sorbitol	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose
相对活力(%) Relative activity	100.0	54.5	24.1	15.4

可知以果糖作碳源者 PAL 活性最高,山梨醇次之。原因是由于这两种碳源对 PAL 合成的分解阻遏作用较小。但由于果糖和山梨醇价格昂贵,在合成培养基中,可用果葡糖浆代替。

2.1.3 PAL 诱导的时间过程:在培养过程中对不同时间作活力测定,结果如图 1。可发现

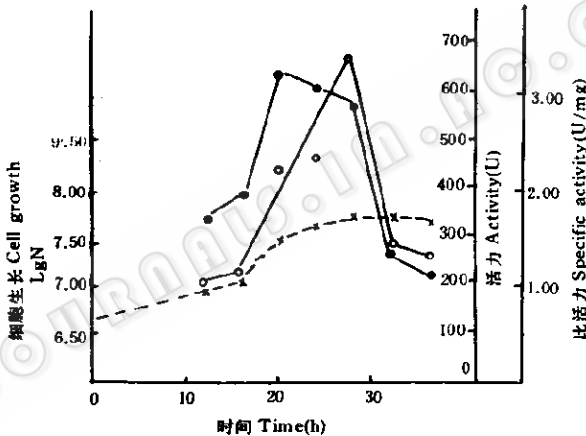


图 1 培养时间与 PAL 活性的关系

Fig. 1 Time course of induction of PAL

- 比活力 Specific activity;
- X—X细胞生长 Cell growth;
- 活力 Activity.

PAL 活力在粘红酵母生长的对数期末期达到高峰,而比活力则在 20 小时左右达到最高。从文献报道看^[2,6,8],产酶高峰的时间除培养因素有影响外,还因不同菌株而异,到达时间短则只有几小时,长则三十几小时。此后 PAL 活力迅速下降,其原因可能由于对 PAL 专一性的蛋白酶使其分解,也可能由于各种代谢产物对 PAL 造成失活作用,其真正原因尚须进一步研究。

2.1.4 异亮氨酸对 PAL 产生的影响:从前面的结果知道,PAL 在高峰期后迅速失活。Yamada^[9]报道异亮氨酸能大大提高 PAL 的稳定性,我们的研究结果也表明(图 2),在培

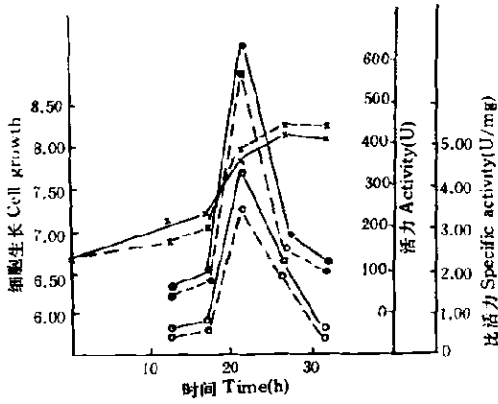


图2 异亮氨酸对 PAL 活力的影响

Fig. 2 Effect of isoleucine on the induction of PAL

- 比活力 Specific activity
- 细胞生长 Cell growth(LgN);
- ×-× 活力 Activity
- 不加 Ile; — 加 Ile

培养基中加入 2g/L 的异亮氨酸确能使酶的活性提高,且能起到一定的稳定作用。

对于 PAL 产酶条件,本文只属于初步研究,如何延长产酶高峰期是今后的研究方向。

2.2 反式肉桂酸转化成苯丙氨酸的条件

2.2.1 NH_4^+ 浓度对转化初速度的影响: NH_4^+ 是其中的一种底物,要使转化反应向生成苯丙氨酸的方向进行,必须有过量的 NH_4^+ 。根据不同 $[\text{NH}_4^+]$ 对转化反应初速度影响的实验结果,作 $1/s-1/v$ 图后,发现两者具有良好的线性关系,并求出 K_m 为 16.85mol/L , V_{max} 为 $5.96\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。由此可见,对于底物 NH_4^+ 来说,此酶反应符合经典的米氏方程。

2.2.2 pH 值对转化初速度的影响: pH 值对转化反应初速度有明显的影响,表 2 即为不同 pH 值对转化反应初速度的影响,在 pH 为 10.0 时,初速度为最大。

2.2.3 不同酶量(细胞量)对转化反应初速度的影响:不同酶量(细胞量)即不同 $\alpha(\alpha = E_0/S_0)$ 情况下对转化反应初速度的影响如表 3 所示。在低 α 的情况下,初速度与 α 基本呈线性关系,即初速度与 α 成正比,而在高 α 时,显然不符合米氏方程。这是因为在高 α 时,酶的活性部位不能被底物完全饱和,当 α 达到 0.5 时,初速度已无明显变化。

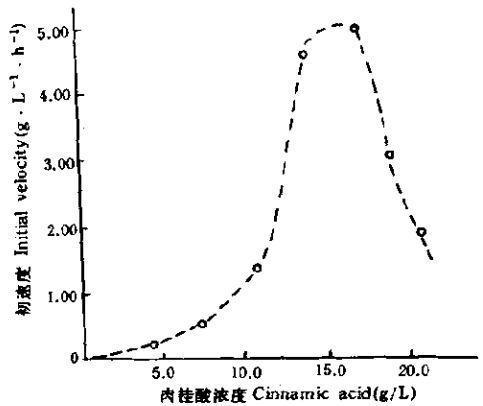


图3 肉桂酸浓度对初速度的影响

Fig. 3 Effect of concentration of cinnamic acid on initial velocity

表 2 pH 对转化反应初速度的影响
Table 2 Effect of pH on the initial velocity

pH	9.0	10.0	10.5	11.0
初速度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) Initial velocity	1.34	2.52	3.36	5.56

表 3 酶量对转化反应初速度的影响
Table 3 Effect of the amount of enzyme on the initial velocities

酶量(α) Enzyme	0.14	0.26	0.38	0.53	0.80	1.65
初速度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) Initial velocity	0.98	1.61	1.78	2.49	2.64	2.72

* $S_0 = 13.18 \text{g/L}$

2.2.4 肉桂酸浓度对转化反应初速度的影响: 图 3 为不同肉桂酸浓度对转化初速度影响的结果。可以看到在低底物浓度时, 肉桂酸具有激活作用, 呈 S 型曲线形式。但是, 随着浓度的提高, 肉桂酸的抑制作用迅速增强。因此, 肉桂酸对 PAL 具有双重的作用, 即高浓度时的抑制作用和低浓度时的激活作用。这种双重作用尚未有过报道。

2.2.5 反式肉桂酸转化为 L-苯丙氨酸的时间过程: 把培养了 24 小时的粘红酵母, 按上述确定的最优条件对肉桂酸进行转化, 其过程如图 4。结果发现, 转化 2 小时后, 苯丙氨酸的浓度基本不再提高, 说明已接近平衡, 最终转化率达 60% 以上。

上述转化反应中仍存在下列问题, 即高底物浓度时的抑制作用, 重复使用细胞(未列出结果)失活严重。因此如能有效地消除底物的抑制作用, 提高细胞的重复使用稳定性, 可望由此方法实现苯丙氨酸生产的工业化。

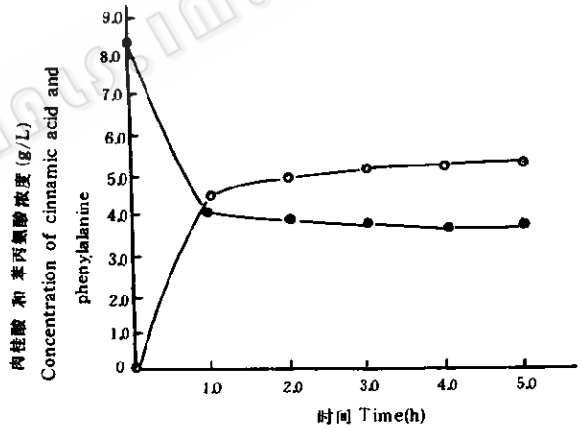


图 4 肉桂酸转化为苯丙氨酸的时间过程

Fig. 4 Time course of transformation from cinnamic acid to phenylalanine

●—● 肉桂酸 Cinnamic acid;
○—○ 苯丙氨酸 Phenylalanine.

参 考 文 献

- [1] Ogata K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1966, **31**: 200-206.
[2] Fritz R R *et al.* *J Biol Chem*, 1976, **251**: 4646-4650.
[3] Havar E A *et al.* *Biochem*, 1975, **14**: 1620-1626.
[4] Vollmer P J *et al.* United States Patent, 4, 574, 117. 1984.
[5] 唐敏, 陈琦. *微生物学通报*, 1989, **16**: 328-331.
[6] Evans C T *et al.* *Appl Microbiol Biotech*, 1987, **25**: 406-414.
[7] Joffery C. United States Patent, 4, 681, 850. 1984.
[8] Nakunichi K *et al.* *Eur J Appl Microbiol Biotech*, 1983, **18**: 158-164.
[9] Yamada S *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1981, **42**: 773-778.

STUDIES ON THE INDUCTION OF L-PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL) IN *RHODOTORULA GLUTINIS* AND TRANSFORMATION OF PHENYLALANINE FROM *TRANS*-CINNAMIC ACID

Ding Xinhua Wu Mianbin Cen Peilin

(Department of Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The induction of PAL in *Rhodotorula glutinis* and transformation of L-phenylalanine from *trans*-cinnamic acid were studied. The optimum medium for PAL induction was composed of (g/L) 10.0 yeast extract, 10.0 peptone, 5.0 NaCl, 0.5 KH_2PO_4 , 0.5 phenylalanine 1.0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 5.0 glucose, pH 6.0-6.5. The cultivation temperature was 30.0 °C. In the process of transformation, the effect of $[\text{NH}_4]^+$ on initial velocity was in accordance with Michaelis-Menten rate expression in which K_m and v_{max} were 16.85 mol/L and 5.96 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for ammonia and the optimum pH was 10.0. Substrate activation and inhibition were observed at low and high concentration of cinnamic acid. The yield of phenylalanine from cinnamic acid reached more than 60.0%.

Key words *Rhodotorula glutinis*, L-phenylalanine ammonia lyase (PAL), Phenylalanine