

# 大肠杆菌 EP8-10 转化苯丙酮酸生成 L-苯丙氨酸的研究\*

徐 虹 欧阳平凯 周卫斌

(南京化工大学生物工程系 南京 210009)

**关键词** L-苯丙氨酸, 苯丙酮酸, 转氨酶, 大肠杆菌

**分类号** Q517 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)03-0272-74

L-苯丙氨酸(L-Phe)是一种重要的氨基酸,用于氨基酸输液和二肽甜味剂的生产。近十年来有关 L-Phe 生产的研究非常活跃,其中之一是利用转氨酶由苯丙酮酸(PPA)生产 L-Phe,该途径是生物体正常生物合成 L-Phe 途径中的最后一步,当以 Asp 作氨基供体时,反应生成的草酰乙酸脱羧为丙酮酸和  $\text{CO}_2$ ,故该反应趋向于 L-Phe 合成。随着化学合成 PPA 的突破,该路线被认为是生产 L-Phe 的有利途径。

Anzawa 等<sup>[1]</sup>利用弗氏柠檬酸菌转化 PPA 生成 Phe,当以 Asp 作氨基供体时,反应 4h,生成 30g/L L-Phe,我国方佩静等<sup>[2]</sup>也分离到一株产碱菌,以 0.2mol/L PPA 为底物,反应 16h,可产 L-Phe 30.4g/L。本文报道以大肠杆菌作为转氨酶酶源,由苯丙酮酸转氨生成 L-Phe 的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

大肠杆菌 EP8-10 从土壤中分离得到。

### 1.2 试剂

PPA 由本校化学合成实验室合成。

### 1.3 培养基和培养条件

#### 1.3.1 斜面培养基:肉膏培养基。

#### 1.3.2 摇瓶培养基(%):葡萄糖 2,蛋白胨 1.5,牛肉膏 1.0, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH7.0。装液量:200mL/1000mL 三角瓶,接种后于 37℃ 摇瓶培养 24h。

### 1.4 酶转化

将培养 24h 培养液离心收集菌体,按 1g 湿菌体加 20mL 底物比例于 37℃ 进行转化,底物组成为:PPA 0.3~0.5mol/L, L-Asp 0.3~0.5mol/L, 5'-磷酸吡哆醛 0.1mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  1mmol/L, pH8.5。

### 1.5 分析方法

#### 1.5.1 PPA 测定:采用三价铁离子显色法<sup>[3]</sup>。

#### 1.5.2 Phe 测定:采用纸层析和自动氨基酸分析仪法<sup>[4]</sup>。

#### 1.5.3 pH 测定:采用精密 pH 试纸或酸度计。

#### 1.5.4 菌体生长测定:取 1mL 菌体培养液,用蒸馏水稀释至 25mL。用 721 型分光光度计在 660nm 波长测定吸光度。

#### 1.5.5 酶活力测定:将 10mL 培养液于 8000r/min 离心 15min,得湿菌体,加到 5mL 底物溶液中,于 37℃ 反应 1h,然后取样测定 PPA 浓度,一个酶活单位“u”定义为每分钟消耗 1 $\mu\text{mol}$ 底物所需的酶量。

\* 国家科委“九五”重点攻关项目(No.96-A12-07-02)

收稿日期:1997-08-25;修回日期:1998-01-19

2 结果和讨论

2.1 菌体培养-酶形成的过程曲线。

接种一环斜面培养物到摇瓶培养基中于 37℃ 培养, 间隔不同时间测定菌体生长, pH 和转氨酶活力。结果如图 1。菌体生长在 18h 后趋于平稳, 而酶形成高峰在 24h, 此时菌体生长处于平衡期。

2.2 不同温度对酶活影响

对离心得到的菌体测定不同温度下的酶活, 结果表明酶活最适温度为 37℃ 左右。

2.3 不同 pH 值下的酶活

配制不同 pH 值的底物, 测定不同 pH 值下的酶活, 得到酶最适 pH 为 8.5~9.0。

2.4 不同氨基供体对转氨反应的影响

不同氨基供体对转氨反应的影响(表 1)。

表 1 氨基供体对转氨反应的影响

氨基供体	L-Asp	L-Glu	L-Ala	Gly	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	NH <sub>4</sub> Cl
相对酶活力/%	100	23.0	22.0	20.6	19.0	19.4	18.0

表 1 表明 L-Asp 为最佳氨基供体, 当用 Asp 作氨基供体时, 转氨后生成草酰乙酸进而脱羧生成丙酮酸和 CO<sub>2</sub>, 使该转氨反应朝着生成 L-Phe 方向进行。因而 L-Asp 是最理想的氨基供体。和许多报道不同的是谷氨酸作氨基供体时, 该菌株的转氨酶活力不高。

2.5 底物 PPA 浓度对转氨反应的影响

分别配制 PPA 浓度为 0.1~0.6mol/L 的底物溶液, 加入菌体于 37℃ 转化, 测定底物 PPA 消耗情况, 当 PPA 浓度为 0.1~0.5mol/L 时, 转化 9h PPA 基本转化完全, 而 PPA 高达 0.6mol/L 时, 转化不彻底。另一方面, 在高底物浓度下酶反应初速度比低底物浓度下的高, 在 PPA 为 0.5mol/L 和 0.6mol/L 时, 反应初速度为 0.1mol/L·h(16.5mg/mL·h), 在 PPA 为 0.4mol/L 时, 初速度为 0.04mol/L·h(6.5mg/mL·h), 在 PPA 为 0.1mol/L 时则非常低。这些结果说明, 过高底物浓度时生成高浓度产物, 对酶反应存在一定的抑制作用。该体系中当 PPA 浓度为 0.1~0.5mol/L 时, 菌体把 PPA 转化完全都用了 9h, 因此从经济角度考虑选择 0.5mol/L 最适宜。

2.6 静息细胞转化 PPA 生成 L-Phe 过程曲线

培养 24h 得到的湿菌体中取 1g 加入 20mL 0.3mol/L PPA 底物溶液中(加入适量破壁剂), 于 37℃ 转化, 间隔一定时间测定 PPA 和 L-Phe 浓度, 结果如图 2 发现 6h 后, PPA 基本转化完全, 生成 48g/L L-Phe, 摩尔转化率为 97%。

3 结论

利用转氨反应生产 L-苯丙氨酸, 在国外已有许多报道, 有的已投入工业化生产<sup>[5]</sup>。而我国这方面研究则很少, 该途径要在技术上和经济上可行, 必须要获得具有高转氨酶活力的菌株, 对 PPA 有高转化率。

本论文获得的 E.coli EP8-10 在 PPA 浓度 0.3mol/L 时, 转化 6h 可生成 48g/L L-Phe, 摩尔转化率 97%, 是一优良的转氨酶菌株。有关该菌株的固定化等工作将在以后陆续报道。

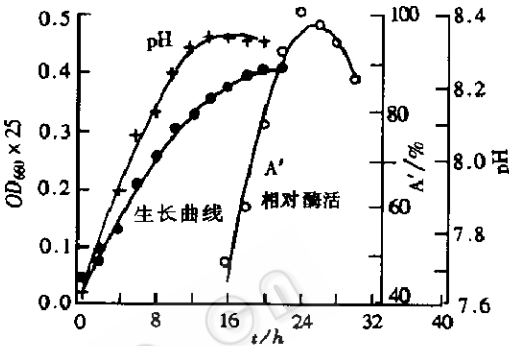


图 1 菌体培养-酶形成的过程曲线

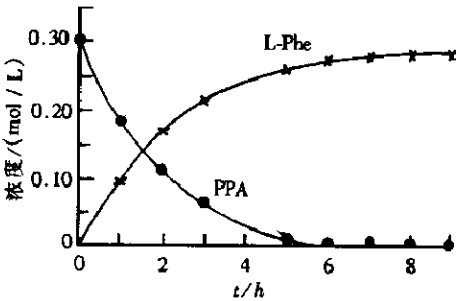


图 2 静息细胞转化苯丙酮酸生成 L-Phe 曲线

## 参 考 文 献

- [1] Anazwa H, Araki K, Ito Y. *J Gen Appl Microbiol*, 1991, 37: 71~83.  
[2] 方佩静, 闫章才. 微生物学报. 1993, 33(6): 418~426.  
[3] ツニームズ, フレデソック, ウォルター, 公开特许公报. 昭 60-160891.  
[4] 潘家秀等. 蛋白质化学研究技术. 北京: 科学出版社, 1962. 67.  
[5] Galton G J, Wood L L, Updike M H. *Bio/ Technology*. 1986, 4: 317~320.

## STUDIES ON PREPARATION OF L-PHENYLALANINE FROM PHENYLPYRUVIC ACID BY *E. COLI* EP8-10

Xu Hong Ouyang Pingkai Zhou Weibin

(Department of Biotechnology and Bioengineering, Nanjing Institute of chemical Technology, Nanjing 210009)

**Abstract** *E. coli* EP8-10 was selected from the soil. It was able to produce the transaminase with high activity when it was cultivated on the medium containing peptone and beef extract. Optimum conditions of enzyme reaction was: phenylpyruvic acid's concentration of 0.3~0.5mol/L, L-Aspartic acid used as amino donor, pH8.5 37°C. When phenylpyruvic acid was 0.3mol/L, 48g/L L-phenylalanine was produced after 6h with 97% conversion rate.

**Key words** L-phenylalanine, Phenylpyruvic acid, Transaminase, *E. coli*.

\* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 96 - A12 - 07 -