

利用基因工程菌 HC01 固定化细胞转化生产 D-对羟基苯甘氨酸

钮利喜* 南晶 石亚伟

(山西大学生物技术研究所 教育部化学生物学与分子工程重点实验室 山西 太原 030006)

摘要: 对一菌两酶工程菌 HC01 转化底物 DL-对羟基苯海因(DL-HPH)的最适条件及其细胞固定化进行了研究, HC01 游离细胞转化 DL-HPH 的最适条件为 40°C、pH 7.5。通过对固定化细胞酶活力测定, 确定细胞固定化的最优条件为海藻酸钠浓度 2.5%、细胞浓度 0.029 g/mL、钙离子浓度 3%。固定化 HC01 的热稳定性比游离细胞高 5°C, 二价金属离子 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 在浓度为 0.1 mmol/L 时对固定化细胞中 D-海因酶(HYD)和 N-氨甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶(CAB)两酶的活力无显著影响, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 可分别使游离细胞中 CAB 活力提高至原来的 2.1 和 2.7 倍。在氮气保护下, 当初始 pH 为 9.0、转化温度为 40°C、转速为 80 r/min, 利用固定化 HC01 转化 30 g/L 的 DL-HPH 时, 36 h 后转化率可达 97%左右, 产物 D-HPG 经纯化后光学纯度达到 99.7%, 得率可达 85%。

关键词: D-氨基酸, 基因工程菌, 固定化, 海藻酸钠

Bioconversion of D-HPG Using Immobilized Genetic Engineered Strain HC01

NIU Li-Xi* NAN Jing SHI Ya-Wei

(Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering,
Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

Abstract: The cells of engineered strain HC01 were immobilized in the form of Ca^{2+} -alginate beads. The conditions for immobilization were investigated. The optimal gel concentration and cell concentration were found to be 2.5% and 0.029 g/mL in the presence of 3% $CaCl_2$. The thermo-stability of immobilized cells was 5°C higher than that of free cells in the same condition. Divalent metal ions, such as Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} did not affect significantly the enzymatic activity of D-hydantoinase (HYD) and N-carbamoylase (CAB) in immobilized cells. By contrast, Mn^{2+} and Ni^{2+} could independently enhance the activity of CAB up to 210% and 270% in free cells. The present data showed that the optimal reaction condition of immobilized cells was at pH 7.5 and 40°C as same as that of free cells. The immobilized cells were applied to produce D-*p*-Hydroxyphenylglycine (D-HPG) directly from the

substrate DL-Hydroxyphenyl Hydantoin (DL-HPH) in a batch reactor. Conversion of about 97% was reached after 36-h reaction when the substrate concentration was 30 g/L with the initial pH of 9.0 under the protection of nitrogen gas. The overall yield of D-HPG was 85% with the optical purity of 99.7% after purification.

Keywords: D-Amino acid, Engineering strain, Immobilization, Calcium alginate

D-氨基酸归属于非天然氨基酸类。存在于细胞或组织中的 D-氨基酸或其衍生物约有 400 多种, 但它们的含量甚微, 难于从细胞或组织中直接提取, 一般都是化学合成或生物转化而得^[1]。D-氨基酸不但是生命组成或代谢途径中必不可少的一类氨基酸, 又是制药、食品、日化、农药等领域的重要原材料之一, 需求量呈逐年递增趋势^[2]。然而, 通过化学生产的氨基酸是 DL-混旋产物, 不但需要进行构型拆分, 才能获得单一产物, 而且加上工艺复杂、成本昂贵、环境污染等因素, 产量有一定限制。目前主要采用生物转化或生物转化与化学结合等方法制备 D-氨基酸。它是利用 2-3 个专一性的酶进行顺序转化 5'-单替代海因而获得 D-氨基酸, 主要包括 D-海因酶(HYD)和 N-氨甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶(CAB), 两酶连续转化。为提高产率, 有时还加一个消旋酶, 使 DL-型底物消旋而获得更高产量的 D-氨基酸。在我们前期研究的基础上^[3-5], 本室通过基因工程方法构建了一株工程菌 HC01, 可以同时表达 D-氨基酸生物转化过程中所需的两种酶 HYD 和 CAB。该工程菌在底物转化过程中可在一个细胞中完成两个连续的酶催化反应, 避免了中间产物因二次穿膜而被氧化, 提高了底物转化效率, 降低了生产成本。

海藻酸钙包埋法是一种使用最广、研究最多的包埋微生物细胞固定化方法, 它具有固化形成方便、对微生物毒性小、固定化细胞密度高等优点^[6]。而且海藻酸钠作为一种固定化材料已经应用于脂肪酶、葡糖氧化酶、酪氨酸酶和过氧化氢酶等的固定化酶的制作材料^[7-8]。本文用海藻酸钙固定化的方法对工程菌 HC01 细胞进行了固定化, 并对固定化细胞的性质进行了初步研究, 为利用酶法生产 D-氨基酸的工业化应用奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

可同时表达 D-海因酶和 N-氨甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶的大肠杆菌基因工程菌 HC01 为本室构

建, 保存于-80℃ 低温冰箱。

海因、N-carbamyl-DL-alanine、IPTG 为美国 Sigma-Aldrich 公司产品; 氨苄青霉素、卡那霉素为华美生物工程公司产品; 胰化蛋白胨、酵母提取物为英国 Oxid 公司产品; DL-对羟基苯海因为本室根据文献[9]化学合成。LB 液体培养基: 1.0% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1.0% NaCl (pH 7.2-7.4)。LB 固体培养基为在上述 LB 液体培养基中添加 1.5% 琼脂粉。海藻酸钠(青岛明月海藻工业有限公司), 实验用水为蒸馏水经 Millipore 公司超纯水装置再处理后的超纯水, 其他药品均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 工程菌 HC01 的培养: 将-80℃ 保存的大肠杆菌基因工程菌 HC01 于固体 LB (含 50 mg/L Amp 和 40 mg/L Kan) 平板划线, 37℃ 培养过夜。次日挑取单菌落接种于 5 mL LB 培养液(含 50 mg/L Amp 和 40 mg/L Kan)中, 37℃ 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6-0.8 时, 再以 2% 接种量接种到三角瓶中, 37℃ 扩大培养至 OD_{600} 约为 1.2 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 再在 20℃ 继续培养 8-12 h, 即可离心收集菌体细胞。

1.2.2 固定化细胞的制备: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对海藻酸钠浓度、菌体包埋量、 Ca^{2+} 浓度进行优化, 将海藻酸钠加热溶于灭菌的蒸馏水配成 2%-3% 的海藻酸钠溶液。取 20-50 mL 菌液离心收集菌体, 用 pH 7.0 的灭菌蒸馏水洗 1 次后, 将菌体细胞与 10 mL 海藻酸钠溶液均匀混合, 形成细胞/海藻酸钠悬浮液, 用注射器缓慢滴入 3%-5% 的 $CaCl_2$ 溶液中, 使成直径约 2 mm 的凝胶小球。置 4℃ 冰箱过夜硬化。

1.2.3 酶活性测定: 海因酶活的测定: 取适量菌液, 9000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 然后用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液洗菌体, 9000 r/min 离心后弃上清, 加入 1.5 mL 底物(1%海因, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 于 37℃ 水浴中反应 30 min 后加入 10% 三氯乙酸 0.25 mL 终止反应, 然后加入 10% 对二甲氨基苯甲醛 0.25 mL 显色, 用蒸馏水补足体

积至 3 mL, 12000 r/min 离心 10 min 取上清, 用分光光度计于 430 nm 处测定吸光值的变化。在上述条件下, 1 min 内生成 1 μ mol N-氨甲酰基甘氨酸所需酶量为 1 个酶活单位(U)。

水解酶活的测定: 取适量菌液 9000 r/min 离心后弃上清, 然后用 Hepes-NaOH (50 mmol/L, pH 7.5) 缓冲液洗菌体, 9000 r/min 离心后所得菌体用 1 mL 底物(1%对羟基苯海因, 50 mmol/L Hepes-NaOH, pH 7.5)重新悬浮, 对照只用 50 mmol/L Hepes-NaOH 悬浮, 37°C 振荡反应 1 h, 12000 r/min 离心 10 min, 取 400 μ L 反应液加入等体积的 2 mol/L NaAc 缓冲液, pH 5.5, 60°C 温浴 5 min, 再加入 400 μ L 茚三酮(58 mg 还原茚三酮, 58 mg 水合茚三酮溶于 5 mL 乙二醇独甲醚) 60°C 振荡反应 25 min, 加入 2.4 mL 65%乙醇振荡后室温放置 5 min 后于 OD_{570} 读数。在上述条件下, 1 min 内生成 1 μ mol D-对羟基苯甘氨酸所需酶量为 1 个酶活单位(U)。

1.2.4 利用固定化细胞转化生产 D-HPG: 配制 30 g/L 的 DL-HPH 水溶液 1 L, 用 NaOH 调 pH 至 9.0, 加入 1 L 菌体或者相当于 1 L 菌体活力的固定化细胞, 用氮气置换瓶中气体, 然后迅速塞好瓶塞, 将其置于摇床中, 37°C 下, 80 r/min 转速反应 36 h, 在反应间隙取适量反应液进行 HPLC 分析, 反应完毕后将反应液离心去除菌体, 上清在 55°C–60°C 经减压蒸馏至近干, 用 300 mL 1 mol/L HCl 酒精洗出, 过滤, 调 pH 至 7.0 收集结晶过滤即得产物 D-对羟基苯甘氨酸。

1.2.5 高效液相分析: 在固定化细胞的生物转化过程中, 底物 DL-HPH 以及产物 D-HPG 的浓度利用 Waters 公司产 1525 型高效液相色谱仪(包括两台 1525 型高压泵、2487 型双波长检测器)进行检测。色谱条件: 色谱柱为 μ -BONDAPAKTM C₁₈; 流动相为 0.05 mol/L 的醋酸 / 醋酸钠缓冲液(pH 4.2)-甲醇(体积比为 90:10); 检测波长为 254 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30°C。

2 结果与分析

2.1 工程菌 HC01 最适 pH 的测定

以 DL-HPH 为底物, 利用工程菌细胞分别在不同的缓冲液体系中反应。其中, Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 6.0–7.0), Hepes-NaOH (pH 7.0–8.0), Na₂B₄O₇-H₃BO₄ (pH 8.0–9.0)。在标准反应条件下检测 CAB

活性, 结果见图 1, 可知当 pH 为 7.5 时酶活力达到最大。

2.2 工程菌 HC01 最适温度的测定

以 DL-HPH 为底物, 利用工程菌细胞在 Hepes-NaOH pH 7.5 的缓冲液反应体系中, 分别在 20°C–60°C 不同温度下反应, 在标准条件下测定 CAB 活性, 结果如图 2 所示, 当温度为 40°C 时酶活力达到最大, 高于 40°C 后, 酶活性下降较快。由于参与反应的两种酶中 CAB 的热稳定性较差, 而且该酶是整个过程中的限速酶, 因而对整个过程的影响较大, 所以我们在 37°C 进行转化。

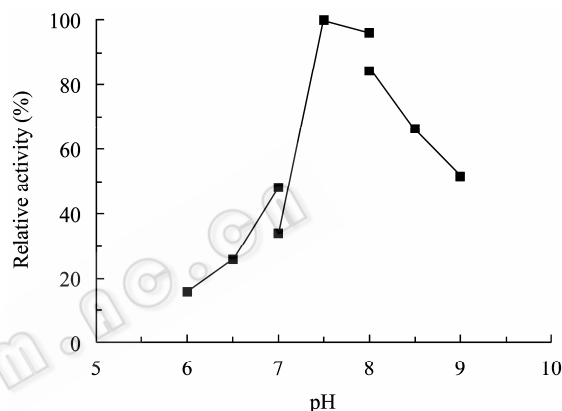


图 1 pH 对工程菌 HC01 活力的影响
Fig. 1 Effect of pH on the activity of HC01 cells

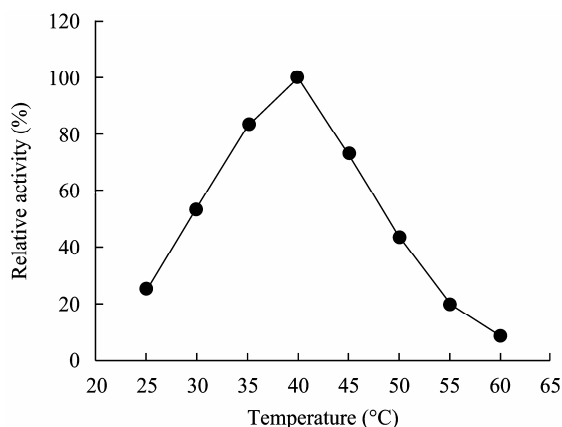


图 2 温度对工程菌 HC01 活力的影响
Fig. 2 Effect of temperature on the activity of HC01 cells

2.3 菌体与载体量的优化

对影响固定化细胞的几个影响因子海藻酸钠浓度、菌体包埋量、钙离子浓度, 采用正交表 L₉(3⁴) 进行实验, 考查这几个影响因子对固定化细胞活力的影响。筛选出最佳固定化细胞制作方法, 结果(数

据未列出)显示最优组合为海藻酸钠浓度 2.5%, 菌体包埋量为 0.029 g/mL, 钙离子浓度为 3%。

2.4 固定化细胞与游离细胞的基本生化性质的比较

2.4.1 固定化细胞与游离细胞的热稳定性: 由图 3 可知, 当 pH 为 7.5 时, 将游离细胞与固定化细胞分别在 35°C–60°C 水浴保温 1 h, 以 35°C 时游离细胞和固定化细胞的酶活力为 100%。结果显示游离细胞随温度的升高酶活力迅速下降, 固定化细胞热稳定性可平均提高 5°C。因此, 固定化细胞的热稳定性增强, 可加速产物的转化, 增加得率。

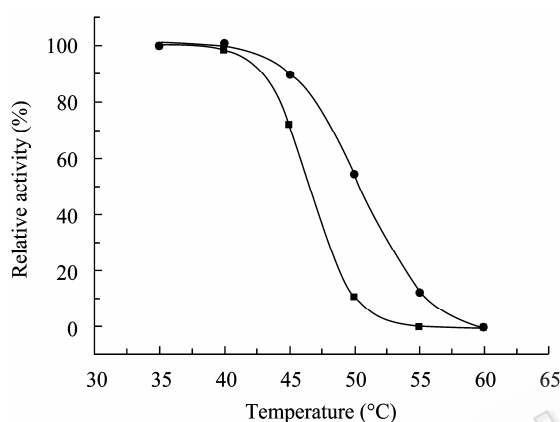


图 3 固定化细胞(●)和游离细胞(■)的热稳定性

Fig. 3 Effect of temperature on the activity of HYD and CAB in free cells (■) and immobilized cells (●)

Note: Assays were carried out in a standard conditions and the optimal activity was defined as 100%.

2.4.2 金属离子对 HYD 活性的影响: 当温度为 37°C、pH 为 7.5、除金属离子外其他条件保持不变, 以 1%海因为底物, 在酶活测定前, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的二价金属离子: Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 。在 25°C 温浴 30 min 后, 在标准条件下测活。结果表明(图 4A), Cu^{2+} 使酶活力下降, Co^{2+} 可以使酶活力略有提高。其他二价金属离子基本无影响。

2.4.3 金属离子对 CAB 活性的影响: 当温度为 37°C、pH 为 7.5、除金属离子外其他条件保持不变, 以 50 mmol/L N-carbamyl-DL-alanine 为底物, 在酶活测定前, 分别添加终浓度为 0.1 mmol/L 的二价金属离子: Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 。在 25°C 温浴 30 min 后, 在标准条件下测活。结果表明(图 4B), Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 可以使游离细胞酶活明显升高, 但是对固定化细胞基本没有影响。 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+}

均使酶活力下降。金属离子对固定化细胞影响不大, 说明其具有更高的稳定性。

2.4.4 固定化细胞的重复使用: 取一定量的固定化细胞, 在标准条件下测活, 反应完后, 用 0.5%的 $CaCl_2$ 和蒸馏水冲洗数次后, 重新进行下一次反应, 如此重复做 10 次。结果见图 5, 随着重复次数的增多, 固定化细胞的活性逐渐下降。如图 5 所示, 在重复使用 6 次时, 固定化细胞的活力仍然能够保留 80%以上。重复使用 10 次后, 固定化小球没有破裂。

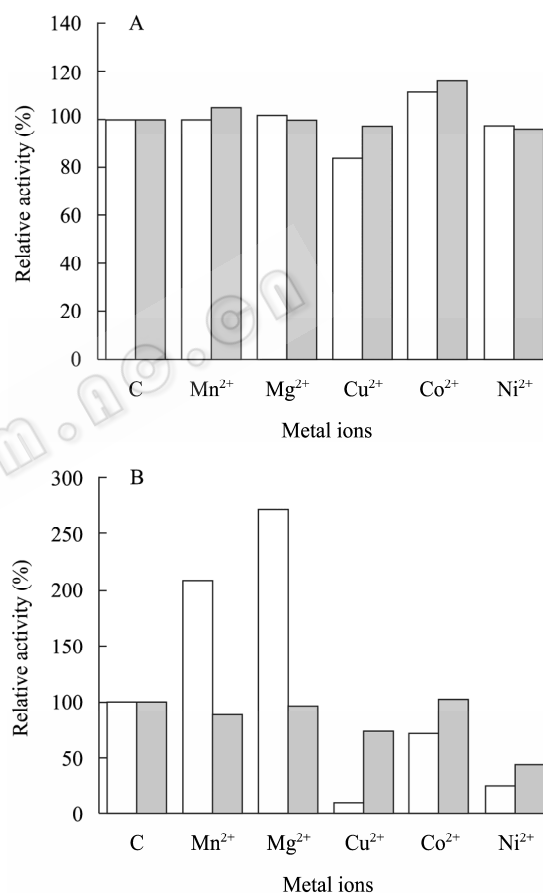


图 4 不同金属离子对海因酶和水解酶活性的影响

Fig. 4 Effect of different metallic ions on the activities of HYD (A) and CAB (B)

Note: □: In free cells; ■: In immobilized cells. Assays were carried out in a standard condition. C denotes the control assays corresponding to the activities measured in the absence of metallic ions.

2.4.5 固定化细胞的保存: 将固定化细胞在 4°C 保存于含 0.5%的 $CaCl_2$ 、稀释 10 倍的 LB 溶液中, 每隔一定的时间取出进行活性测定, 结果见图 6, 经计算得固定化细胞的贮存半衰期为 12 d。

2.4.6 D-对羟基苯甘氨酸(D-HPG)的生物转化: 利用 HPLC 对工程菌 HC01 及其固定化细胞转化

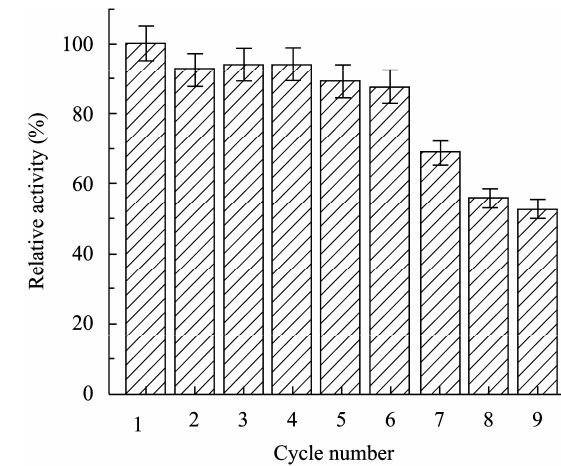


图 5 固定化细胞的稳定性

Fig. 5 Stability of immobilized cells in alginate beads

Note: Initial activity was defined as 100%.

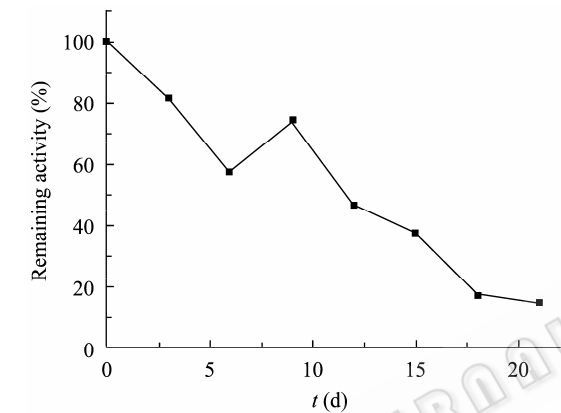


图 6 固定化细胞保存

Fig. 6 Storage stability of immobilized cells

Note: Initial activity was defined as 100%.

DL-HPH 制备 D-HPG 进行分析, 当利用 1 L 发酵液所得菌体约 1.6 g 或者相当于 1 L 菌体活力单位的固定化细胞, 分别对上述底物浓度的溶液 1 L 转化 36 h 后, 转化率分别为 90%和 97%, 所得产物 D-HPG 经上述方法纯化后得率达 85%, 且产物的光学纯度达到 99.7%。到目前为止, 已有许多利用可以同时产 HYD 和 CAB 的微生物转化生产 D-HPG 的报道(表 1), 其中最高的比产率为 1.32 g/(g·h), 但是该报道中的发酵液菌体浓度只能达到 0.41 g/L, 而我们构建的工程菌可达到 1.6 g/L, 生产成本是该报道的 4/5。

3 讨论

目前, 国内利用可表达 HYD 和 CAB 的工程菌及其表达酶用于 D-氨基酸的生物转化还不成熟, 大多是利用筛选到的天然菌株在生产。天然菌株如农杆菌易被噬菌体污染并且需在诱导剂, 诸如带来环境污染的甲硫乙基海因存在情况下, 才表达海因酶^[13]。而且更多的天然菌株中只有 HYD 或 CAB 活性, 那么在生物转化中需要将两种天然菌置于同一酶反应体系中, 然后进行生物转化。由于 5'-单替代海因的水溶性较差, 而 N-氨甲酰-D-氨基酸中间产物又易氧化^[10], 这样 D-氨基酸的转化过程中底物和中间产物需进行 2 次乃至多次的穿越细菌细胞膜的过程, 增大了氧化的可能, 同样降低了生物转化的效率。另外, HPLC 检测表明游离细胞在转化时会有部分细胞内物质渗入到反应体系中, 从而

表 1 利用不同微生物进行一步转化生产 D-HPG 的比较						
Table 1 Summary of one-step production of D-HPG by various microorganisms						
Organism	底物浓度 Concentration of DL-HPH (g/L)	反应液细胞浓度 Concentration of cells DCW (g/L)	转化率 Yield (%)	比产率 Specific productivity [× 10 ⁻² g/(g·h)]	产率 Productivity [g/(L·h)]	参考文献 References
<i>Agrobacterium</i> sp.	30	30	96	4.16	1.25	[1]
<i>Pseudomonas</i> sp. AJ-11220	10	50 ^a	94	1.13	0.17	[2]
Recombinant <i>E. coli</i> XL1 Blue/Phcar101	30	1.24	96	132	1.65	[10]
Recombinant <i>E. coli</i> DH5α/pAH71/pSHDT4	19.2	19.2	97	10.5	2.02	[11]
Recombinant <i>E. coli</i> DH5α/pAH71/PkthDT4	19.2	19.2	97	16.8	3.24	[11]
<i>Burkholderia cepacia</i> JS-02	25	6.5 (25 ^a)	94	10.5	1.68	[12]
Free cell of HC01	30	1.6	90	46.8	0.75	This work
Immobilized HC01 cells	30	1.9	97	42.5	0.81	This work

Note: ^a: Wet cell weight.

加大产物纯化时的难度, 而用固定化细胞无此缺陷(数据未列出)。因此, 本文将一菌两酶工程菌 HC01 进行固定化研究, 试图克服上述的一些缺陷, 以适应工业化生产的需要。

固定化细胞的热稳定性比游离细胞高 5°C , 二价金属离子对固定化细胞的酶活力基本无影响, 这时的难度, 而用固定化细胞无此缺陷(数据未列出)。因此, 本文将一菌两酶工程菌 HC01 进行固定化后表明固定化细胞比游离细胞有更高的稳定性。由于在实际的生产过程中为了降低成本, 转化过程多数在自来水溶液中进行, 因此固定化细胞的这种特性更有利于在实际的生产中应用。初步试验表明, 固定化细胞在重复使用 6 次后, 活力仍能保留 80%, 贮存半衰期达到 12 d。该工程菌对 5'-单替代海因具有很广的底物谱, 因此, 本文所研究的内容可以推广生产多种 D-氨基酸。目前我们也对其他一些固定化载体进行研究, 也对工程菌的高密度发酵进行研究, 相信通过高密度发酵, 可以进一步降低生产成本, 促进酶法生产 D-氨基酸的工业化应用。

参 考 文 献

- [1] Serge R, Nicolas C, Eric O. D-*p*-Hydroxyphenylglycine production from DI-5-*p*-hydroxyphenylhydantoin by *Agrobacterium* sp.. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993(33): 382–388.
- [2] Kenzo Y, Shigeru N. Optimal conditions for the enzymatic production of D-amino acids from the corresponding 5-substituted hydantoin. *Agric Biol Chem*, 1987(54): 715–719.
- [3] 钮利喜, 石亚伟, 袁静明. N-氨甲酰-D-氨基酸酰胺水解酶的融合表达、纯化和酶活性. 中国抗生素杂志, 2004, 29(1): 11–14.
- [4] Niu LX, Zhang XY, Shi YW, *et al.* Subunit dissociation and stability alteration of D-hydantoinase deleted at the terminal amino acid residue. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(2): 303–308.
- [5] Zhang XY, Niu LX, Shi YW, *et al.* The flexibility of the non-conservative region at the C terminus of D-hydantoinase from *Pseudomonas putida* YZ-26 is extremely limited. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008(144): 237–247.
- [6] Ehab taqieddin, Mansoor Amiji. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 2004(25): 1937–1945.
- [7] Betigeri SS, Neau SH. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogels beads. *Biomaterials*, 2002(23): 3627–3636.
- [8] Blandino A, Macias M, Cantero D. Calcium alginate gel as encapsulation matrix for coimmobilized enzyme systems. *Appl Biochem Biotechnol*, 2003(110): 53–60.
- [9] Ohashi T, Takahashi S, Nagamachi T, *et al.* A new method for 5-(4-hydroxyphenyl) hydantoin synthesis. *Agric Bio Chem*, 1981(45): 831–838.
- [10] Park JH, Kim GJ, Kim HS. Production of D-amino acid using whole cells of recombinant *Escherichia coli* with separately and coexpressed D-hydantoinase and N-carbamoylase. *Biotechnol Prog*, 2000(16): 564–570.
- [11] Chao YP, Fu HY, Lo TE, *et al.* One-step production of D-*p*-Hydroxyphenylglycine by recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Prog*, 1999(15): 1039–1045.
- [12] Jiang M, Shang LG, Wei P, *et al.* Pilot-scale production of D-*p*-Hydroxyphenylglycine from DI-5-*p*-hydroxyphenylhydantoin by *Burkholderia cepacia* JS-02. *Enzyme Microb Technol*, 2007(41): 407–412.
- [13] Grifantini R, Galli G, Carpani G, *et al.* Efficient conversion of 5-substituted hydantoins to D- α -amino acids using recombinant *Escherichia coli* strains. *Microbiology*, 1998(144): 947–954.