

微生物酶法合成 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸

刘 忠 杨文博 白 钢 田 旺 金永杰

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要: 从土壤中分离到一株假单胞菌 *Pseudomonas* sp. TS1138 菌株, 其胞内含有 DL-2-氨基- Δ^2 -噻唑啉-4-羧酸 (DL-2-Amino- Δ^2 -Thiazoline-4-Carboxylic Acid, 缩写为 DL-ATC) 水解酶, 以培养 16h 的细胞为酶源, 可转化 DL-ATC 合成 L-半胱氨酸。该菌株生长及产酶的最佳碳、氮源为葡萄糖和尿素, DL-ATC 对酶的产生具有诱导作用。酶促反应后的产物经薄层层析、旋光度法和高效液相色谱鉴定为 L-半胱氨酸。

关键词: L-半胱氨酸, L-胱氨酸, 酶法转化, 假单胞菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0016-06

MICROBIAL ENZYME CONVERSION OF L-CYSTEINE AND L-CYSTINE

LIU Zhong YANG Wen-Bo BAI Gang TIAN Wang JIN Yong-Jie

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: *Pseudomonas* sp. TS1138 isolated from soil samples was able to form L-cysteine from DL-2-Amino- Δ^2 -Thiazoline-4-Carboxylic Acid (DL-ATC) after cultured 16 hours. The optimum carbon and nitrogen sources of strain growth and enzyme formation are glucose and urea. This enzyme was induced by DL-ATC. The product was identified to be L-Cysteine based on thin layer chromatography, optical rotation and HPLC studies.

Key words: L-Cysteine, L-Cystine, Enzyme Conversion, *Pseudomonas* sp.

收稿日期: 2002-10-21, 修回日期: 2002-12-02

L-半胱氨酸是一种重要的含硫氨基酸,为谷胱甘肽的组成成分之一。由于其分子中含有活性的巯基,具有许多重要的生理功能:如可以增强肝功能、解除苯中毒、化痰、促进毛发生长和防止食品氧化等,广泛应用于医药、食品、化妆品以及饲料工业^[1]。

目前,工业上主要通过毛发酸水解成L-胱氨酸,再经电解而生成L-半胱氨酸。该工艺生产率低,且酸水解过程产生大量刺激性气体和废酸造成环境污染^[2]。有鉴于此,利用微生物法生产胱氨酸和半胱氨酸已成为人们研究和关注的方向。1977年,日本Sano^[3,4]等从土壤中分离出一株嗜硫氮杂环戊烯假单胞菌(*Pseudomonas thiazolinophilum*)可以转化DL-2-氨基- Δ^2 -噻唑啉-4-羧酸(DL-ATC)合成L-半胱氨酸,并实现了工业化生产^[5]。该法具有生产耗能低,产率高等优点,具有广泛的应用前景。国内同类研究报道甚少。

本研究室从生产DL-ATC环境采取土样,从中分离获得一株假单胞菌,经检测具有转化DL-ATC成L-半胱氨酸活力,本实验从菌株筛选、产酶条件及产物鉴定3方面进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:假单胞菌 *Pseudomonas* sp. TS1138 菌株,本实验室筛选获得。

1.1.2 富集培养基:葡萄糖 10g, DL-ATC 5g, NaCl 3g, K_2HPO_4 3g, $MnSO_4$ 0.007g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, 定容至 1L, pH7.5。

1.1.3 筛选和斜面培养基:成分同上,固体加 20g 琼脂,定容至 1L, pH7.5。

1.1.4 产酶培养基:葡萄糖 20g, DL-ATC 5g, 玉米浆 4g, 尿素 3g, NaCl 3g, K_2HPO_4 3g, $MnSO_4$ 0.007g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, 定容至 1L, pH7.5。

以上培养基中葡萄糖和尿素 0.8×10^5 Pa、15min 单独灭菌,其它均在 1×10^5 Pa 20min 灭菌。

1.2 分析方法

1.2.1 菌体生长量测定:取菌液 0.5mL,用无菌水稀释 10 倍后在 600nm 测定吸光度。

1.2.2 酶活力测定:(1)酶源细胞的获得:从斜面接种一环菌于产酶培养基中,120r/min, 28℃(下同)振荡培养 16h 后,以 10% 接种量转接于相同的培养基中,再培养 16h。菌液于 4℃ 下 $5,000 \times g$ 离心 10min,弃上清。菌体再以无菌的磷酸缓冲液(pH7.0, 0.02mol/L)悬浮洗涤, $5,000 \times g$ 离心 10min,重复洗涤 3 次。最后将菌体悬浮于相同体积的磷酸缓冲液中,以该细胞悬液为酶源。(2)酶促反应:取 2mL 底物溶液(内含 1.5% K_2HPO_4 、1.5% DL-ATC、0.01% 羟胺)加入 1mL 酶源细胞悬液,混匀后置于 42℃ 反应 3h 后于 $5,000 \times g$ 离心 10min,取上清测定 L-半胱氨酸含量。(3)酶活力定义:在上述条件下,1h 内转化底物生成 $1\mu g$ L-半胱氨酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。酶活力以每毫升酶液所含有的酶活力单位数表示(U/mL)。

1.2.3 L-半胱氨酸的定量测定:磷钨酸法,测定方法按参考文献[5]进行。

1.2.4 产物的纯化及鉴定:(1)产物纯化:取底物溶液 400mL 加入酶源细胞悬液 200mL,于 42℃ 反应 4h 后, $8,000 \times g$ 离心 10min,取上清加入 1/2 体积 10% 的三氯乙酸溶液,混匀后于室温下放置 2~3h,待蛋白沉淀之后于 $10,000 \times g$ 离心 10min,弃沉淀。

上清注入 732 型阳离子交换树脂柱 (柱长 15cm, 直径 3cm), 流速 1mL/min, 待完全吸附后, 以 0.5mol/L 氨水进行洗脱, 洗脱速度 1mL/min。以部分收集器收集洗脱液, 每管收集 5mL, 随时监测 L-半胱氨酸含量。洗脱完毕后收集峰值附近洗脱液, 混合后抽真空浓缩至原体积的 1/2, 室温下加入少量 FeCl₃ 振荡 24h, 使半胱氨酸全部氧化为胱氨酸, 活性炭脱色后用盐酸调 pH 值至 L-胱氨酸的等电点 5.03, 析出的结晶在 5,000 × g 常温下离心 10min, 弃上清。沉淀用少量 90% 乙醇迅速洗涤两次后烘干, 收集产物后作进一步鉴定。(2) 产物鉴定: 取酶促反应后的反应液及纯化后产物分别用薄层层析、旋光仪及高效液相色谱进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

取土样 1g 左右接入液体富集培养基, 于 28℃, 120r/min 振荡培养 24h 后稀释涂平板, 置 28℃ 培养 48h, 平板上长出淡黄色菌落, 挑取直径 2mm 以上的菌落共 38 个接入斜面培养基, 于 28℃ 培养 48h 后, 分别挑取一环菌接种产酶培养基, 振荡培养 16h, 取菌液按 1.2.2 法测酶活力。

从中筛选出一株酶活力较高的菌株, 经形态及生理生化检测, 初步印象为假单胞菌, 编号为: TS1138, 以该菌株作为本研究的目的菌株。

2.2 生长与产酶条件的确定

表 1 不同碳源对菌株生长及产酶的影响

碳源 (20g/L)	OD _{600nm}	酶活力 (U/mL)
葡萄糖	0.509	507.931
乳糖	0.268	108.963
麦芽糖	0.323	118.874
果糖	0.349	245.425
淀粉水解糖	0.523	336.146
甘油	0.341	158.262
可溶性淀粉	0.102	60.680
蔗糖	0.207	115.062
木糖	0.201	67.796
半乳糖	0.238	59.664
山梨醇	0.123	61.951
山梨糖	0.170	66.763
鼠李糖	0.191	45.433
棉子糖	0.171	68.558
纤维二糖	0.134	39.589
D-甘露糖	0.177	41.367
甘露醇	0.151	69.574
糊精	0.168	68.304

2.2.1 不同碳源对 TS1138 菌株生长及产酶条件的影响: 选择 18 种碳源, 测定了不同碳源对细胞生长及产酶的影响, 结果如表 1 所示。由表 1 可以看出, TS1138 菌株仅在葡萄糖、果糖、淀粉水解糖和甘油等 4 种碳源的培养基中生长较好、细胞酶活力较高, 其中以葡萄糖为碳源时, 酶活力达到最高。

2.2.2 不同氮源对 TS1138 菌株生长及产酶的影响: 在产酶培养基中分别添加常用的 7 种有机氮和 6 种无机氮, 同时以不添加其它氮源为对照, 测定了 TS1138 菌株的生长及细胞酶活力。结果如表 2 所示。各种氮源对该菌的生长及酶活力均有一定程度的促进作用, 其中以尿素为最佳, 故选取尿素作为培养基的适宜氮源。

2.2.3 ATC 对酶的诱导作用: 接种 TS1138 菌株于不同 ATC 浓度的产酶培养基中培养 16h, 收集菌体后测定其生长情况和酶活力, 测定结果如图 1 所示。

表 2 不同氮源对菌株生长及产酶的影响

氮源 (3g/L)	OD _{600nm}	酶活力 (U/mL)
蛋白胨	0.516	653.59
酵母膏	0.589	722.20
鱼肝	0.543	710.76
牛肉膏	0.591	753.33
酪素水解物	0.496	661.21
杂胨	0.508	679.63
豆饼水解液	0.520	666.29
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.537	656.76
尿素	0.629	769.85
(NH ₄) ₂ HPO ₃	0.549	706.95
NH ₄ Cl	0.500	645.33
NH ₄ HCO ₃	0.509	674.55
NH ₄ NO ₃	0.549	724.11
对照 (无其它氮源)	0.509	507.93

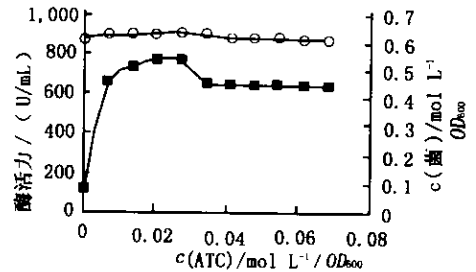


图 1 不同 ATC 浓度对细胞生长和酶活力的影响

—■— 酶活力, —○— 菌浓

力提高将近 6 倍,添加量为 0.03mol/L 时酶活力达到最高。如果继续增加 ATC 添加量至 0.041mol/L,酶活力反而下降,从 0.041mol/L ~ 0.07mol/L 酶活力基本平稳。可以初步认为,培养基中 ATC 的存在对产酶有诱导作用,但高浓度的 ATC 对菌体产酶有一定程度的抑制作用,因此在培养基中保持 ATC 适当的添加量是必要的。

2.2.4 培养温度和 pH 值对酶活力的影响:在微生物的培养过程中,温度和培养基的 pH 值一直是影响其生长和细胞酶活力的重要因素。在本试验中,将 TS1138 菌株分别在不同温度 and 不同初始 pH 下进行培养,测定了不同条件下的细胞转化 DL-ATC 成 L-半胱氨酸的酶活力情况。由图 2 可知,菌株培养的温度适应范围较广,在 20℃ ~ 40℃ 范围内生长良好,酶活力变化不大,其最适产酶温度约在 30℃ 左右。该菌对培养基的 pH 值变化比较敏感,其最适 pH 值大约在 7.0 ~ 7.5 之间,高于 8 和低于 7 的 pH 值均抑制产酶 (图 3)。

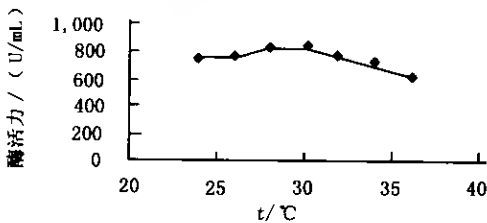


图 2 不同温度对酶活的影响

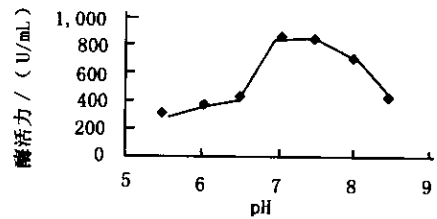


图 3 不同初始 pH 对酶活的影响

2.3 产物鉴定

2.3.1 薄层层析鉴定:酶促反应后的反应液去除细胞,取 0.5μL 点样于硅胶 G 薄板,以标准的 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸为对照。展层剂为:正丁醇:甲酸:水 (4:2:1)。层析结果表明,产物与标准物有基本相同的 R_f 值 (见图 4)。其中 L-半胱氨酸标准品 R_f = 0.561,反应产物 R_f = 0.557; L-胱氨酸标准品 R_f = 0.224,反应产物 R_f = 0.229。在反应液中出现 L-胱氨酸的斑点是因为在反应过程中已有部分 L-半胱氨酸自氧化为 L-胱氨酸之故。

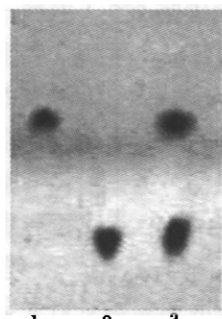


图4 产物薄层层析图

- 1 L-半胱氨酸标准品,
- 2 L-半胱氨酸标准品,
- 3 处理后的反应液

2.3.2 旋光性鉴定:称取适量纯化后的反应产物结晶溶于5mol/L的盐酸中,在旋光仪中测定其比旋光度。纯化后结晶比旋光度 $[\alpha]_D$ 为-224。该值与标准品L-半胱氨酸的比旋光度-232接近,证明所得结晶为L型产物。

2.3.3 高效液相色谱鉴定:用二巯硝基苯甲酸(Dithionitrobenzoic acid, 缩写为DTNB)衍生法对L-半胱氨酸进行衍生,衍生产物在330nm具有特征性紫外吸收^[6]。将酶促反应之后上清液进行衍生,衍生产物在岛津LC-10AT高效液相色谱仪上分析,C-18柱,流速1mL/min;流动相A:0.05mol/L KH_2PO_4 , pH4.03;流动相B为甲醇:水(60:40),线性梯度洗脱;柱温室温;检测波长330nm。图谱见图5、图6。

将酶反应后产物的图谱与标准的L-半胱氨酸、2-巯基乙醇衍生产物及DTNB标准品进行对比,可认定产物为L-半胱氨酸。

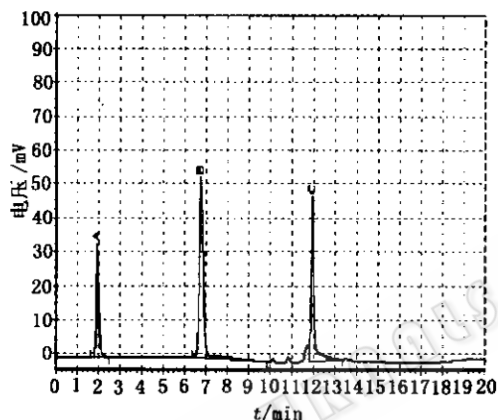


图5 L-半胱氨酸标准品衍生色谱图

色谱峰分别为: A 巯硝基苯甲酸(保留时间1.93min), B L-半胱氨酸(保留时间6.77min), C DTNB(保留时间11.96min)

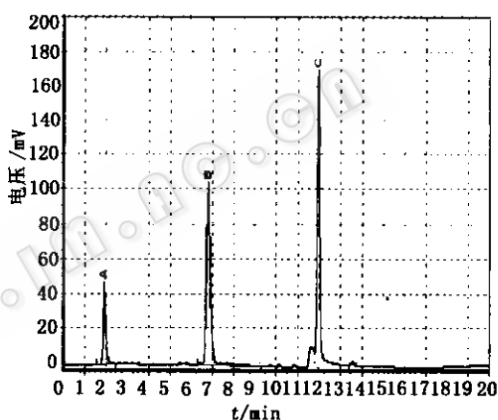


图6 处理后反应液衍生色谱图

3 讨论

能利用ATC的微生物源于含有一定浓度ATC的环境,以ATC为唯一氮源,添加适量无机盐,可作为筛选产ATC水解酶转化合成L-半胱氨酸菌株的筛选模型。本实验所获得的TS1138菌株能在ATC琼脂平板上快速生长(24h培养出现菌落),并具有酶活力。在以葡萄糖、果糖、淀粉水解糖(DE值为55)和甘油为速效碳源时,菌体生长旺盛,酶活力高。而其它糖作碳源时,菌体基本不能利用,菌浓和酶活力明显低下(见表1)。这表明ATC具有双重功能,既可以维持菌体生长,又能促进产酶。可以认为,ATC水解酶为诱导酶,ATC是菌体产酶的诱导物。本研究发现,以TS1138细胞为酶源加入ATC进行酶促反应时,产生出 NH_3 (奈氏试剂检测)和 H_2S (醋酸铅试纸检测),这与Yoshihara等^[7]以恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)AJ3865在转化一分子ATC成一分子L-半胱氨酸时,产生 NH_3 和 H_2S 的报道相一致。

另外,由于L-半胱氨酸在碱性条件下很不稳定,两分子的半胱氨酸极易氧化成一

分子的胱氨酸, 尤其在有 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 存在时, 反应更为迅速^[8]。因此在纯化过程中加入少许 FeCl_3 进行振荡, 使 L-半胱氨酸氧化成 L-胱氨酸, 由于胱氨酸微溶于水, 在分离纯化时利于其结晶析出。

有关微生物酶法转化生产 L-半胱氨酸在国内鲜见报道, 目前, 我国已有生产 ATC 的厂家, 对该菌株的深入研究, 提高从 ATC 微生物酶法合成 L-半胱氨酸的转化率和收率, 有望能为我国的 L-半胱氨酸生产开辟一条新的途径。

参考文献

- [1] 横关键三, 川岛伸树. 氨基酸杂志, 1989, 3: 56~60.
- [2] 杨金奎, 何璧梅. 国外医药抗生素分册, 2001, 22 (4): 179~183.
- [3] Sano K, Yokozeki K, Tamura F, *et al.* Appl & Environ Micro, 1977, 34 (6): 806~810.
- [4] Sano K, Eguchi C, Yasuda N, *et al.* Agric Biol Chem, 1979, 43 (11): 2373~2377.
- [5] 张志贤. 有机官能团定量分析. 北京: 化学工业出版社, 1990.
- [6] Arin E, Phyllis G, Paterson H, *et al.* J of Chromatography B, 2001, 758 (3): 207~212.
- [7] Tantra Y, Nishino M, Ohmachi T, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62 (11): 2226~2229.
- [8] 沈 同, 王镜言. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1990. 101