

利用酵母菌细胞转化肉桂酸生成 L-苯丙氨酸

唐 敏 陈 琦

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 对利用酵母菌转化肉桂酸生成 L-苯丙氨酸的方法进行了菌株筛选、菌体细胞培养、转化反应条件以及产物提取等方面的探索。从 13 个属的 71 株酵母菌中选出转化生成 L-苯丙氨酸较高的粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) AS 2.102 菌株。经实验得出该菌株的最佳培养条件为:在含有 1.5% 酵母膏、1% 葡萄糖、1.5% 蛋白胨、0.05% L-苯丙氨酸、0.05% KH_2PO_4 、0.5% NaCl 、pH5.0 的培养基中,30℃ 振荡培养 20 小时;最佳转化条件为:1.5% 肉桂酸、8mol/L 氨、0.1% FeSO_4 、pH10.0 30℃ 振荡转化反应 24 小时。每升转化液可生成 10.78 克 L-苯丙氨酸,肉桂酸重量转化率为 71.8%。产物用阳离子交换树脂法进行提取,所得结晶经纸层析单斑试验、生物测定、熔点、旋光、元素分析、红外光谱等项鉴定结果证实是 L-苯丙氨酸,纯度超过 99%。

关键词 粘红酵母; L-苯丙氨酸;肉桂酸;苯丙氨酸解氨酶

L-苯丙氨酸(L-phe)是人体八种必需氨基酸之一,是氨基酸注射液的原料,也是天冬甜精(Aspartame)的主要成份。因此,它的实用价值日益提高。国内尚未见到细胞转化法生产 L-苯丙氨酸的报道。

微生物细胞法转化生产 L-苯丙氨酸 现有三种方法:一是以苯丙酮酸为底物,利用转氨酶转化法^[1];二是先以酰基转移酶将乙酰氨基肉桂酸转化成苯丙酮酸^[2],再用上述方法,生成 L-苯丙氨酸;三是利用苯丙氨酸解氨酶^[3,4]将反式肉桂酸转化成 L-苯丙氨酸。

本文是以第三种方法为基础,报道菌种筛选,及其转化肉桂酸生成 L-苯丙氨酸的实验结果。

材料与 方法

(一) 菌种

供试验用的酵母菌 84 株:

1. 中国科学院微生物研究所八室提供了 13 个属 22 个种共 53 株。为假丝酵母,固囊酵

母、罗伦隐球酵母、克洛德巴利酵母、汉逊酵母、斯达油脂酵母、毕赤酵母、圆红冬孢酵母、红酵母、类酵母、裂殖酵母、掷孢酵母和平常球拟酵母等属。

2. 南开大学生物系提供了 28 株红酵母。

3. 野外采集、分离得到 3 株红酵母。

(二) 培养基

1. 麦芽汁培养基,麦芽汁为 12°Be。

2. 酶诱导斜面培养基(%): 酵母膏 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.5 L-phe 0.5, 琼脂 2, pH6.0, 1 kg/cm² 灭菌 30 分钟。

3. 筛选产酶培养基,见文献 [3]。

(三) 培养方法

培养方法和转化方法均见文献 [3], 所不同的是用橡皮塞使反应体系密闭。

(四) L-苯丙氨酸的测定方法

定性、定量均见文献 [5]。

结 果

(一) 转化生成 L-phe 的菌株筛选

为选到由肉桂酸生成 L-phe 转化率高的菌株,设计了下述实验:转化反应结束后,定性观察各个菌株转化肉桂酸的能力,按显色不同分为三个等级。结果见表 1(基本不产的没有列入)。根据表 1 结果,将那些产酸较多的样

表 1 菌株转化生成 L-phe 的能力

酵母菌名	菌株号	生成 L-phe 能力
<i>Candida parapsilosis</i>	AS 2.590	++
<i>C. pulcherrima</i>	AS 2.492	++
<i>Cryptococcus laurentii</i>	AS 2.114	+
<i>Pichia farinosa</i>	AS 2.803	+
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	AS 2.1389	+++
<i>Rhodotorula</i> sp.	C2A	+++
<i>Rhodotorula</i> sp.	C2B	++
<i>Rhodotorula</i> sp.	C7	+++
<i>R. glutinis</i>	AS 2.102	+++
<i>R. glutinis</i>	AS 2.278	+++
<i>R. glutinis</i>	AS 2.1146	+++
<i>R. glutinis</i>	N3	++
<i>R. glutinis</i>	N7	+
<i>R. glutinis</i>	N11	+
<i>R. glutinis</i>	N13	++
<i>R. glutinis</i>	N15	++
<i>R. minuta</i>	AS 2.277	++
<i>R. rubra</i>	AS 2.21	+
<i>R. rubra</i>	AS 2.22	+
<i>R. rubra</i>	AS 2.103	++
<i>R. rubra</i>	AS 2.140	++
<i>R. rubra</i>	AS 2.166	+++
<i>R. rubra</i>	AS 2.167	+++
<i>R. rubra</i>	AS 2.272	+++
<i>R. rubra</i>	AS 2.279	+++
<i>R. rubra</i>	AS 2.670	+++
<i>R. rubra</i>	AS 2.1034	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AS 2.379	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AS 2.501	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AS 2.620	++
<i>Sporobolomyces roseus</i>	AS 2.619	+
<i>S. salmonicolor</i>	AS 2.262	+

AS: 中科院微生物所

N: 南开大学生物系赠送

C: 野外采集、分离得到

+ 有少量 L-phe, ++ 较多, +++ 相对最多

品,再用前面所述的方法进行纸上层析,比色定量测出 L-phe 含量。结果见表 2。实验用的 13 个属 71 株菌中转化生成 L-phe 能力较强的菌株,多属于红酵母属,其中以 *R. glutinis*

表 2 13 株酵母菌产 L-phe 结果*

菌名	NO.	L-phe%	转化率%
<i>Rhodotorula</i>	C2A	0.306	42.8
	C7	0.295	41.5
<i>R. glutinis</i>	AS 2.102	0.587	82.1
	AS 2.499	0.445	62.2
	AS 2.107	0.194	27.1
<i>R. rubra</i>	AS 2.279	0.359	50.2
<i>R. rubra</i>	AS 2.670	0.274	38.3
<i>R. rubra</i>	AS 2.140	0.274	38.3
<i>R. rubra</i>	AS 2.103	0.274	38.3
<i>R. rubra</i>	AS 2.272	0.184	25.7
<i>R. rubra</i>	AS 2.116	0.131	18.3
<i>R. rubra</i>	AS 2.530	0.084	11.8
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	AS 2.1389	0.150	21.0

* 0.715% 肉桂酸, 9 mol/LNH₄OH, pH 10.0, 30℃, 24h

AS 2.102 菌株转化能力最强,可生成 0.587% L-phe。因此,选择该菌株作为下一步条件实验用菌株。

(二) 培养基组成

为了找到最佳培养基配方,同时从经济性考虑,做了不加 L-异亮氨酸正交实验(表 3)。

经两次连续正交实验得出最高转化率为 71.8%,培养基配比是(%): 酵母膏 1.5,葡萄糖 1,蛋白胨 1.5, L-phe 0.025, KH₂PO₄ 0.05, NaCl 0.5, pH 5.0。后面的试验均采用此配方。

(三) 肉桂酸转化生成 L-苯丙氨酸的条件

采用 AS 2.102 菌株进行下面一系列转化条件试验,30℃ 振荡培养 20 小时。

1. 底物浓度: 据 Yamada 等人报道^[3],适合转化的肉桂酸浓度在 0.444—0.888 g/100 ml 范围内,因此,本实验选择了 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5% 肉桂酸,结果见表 4。

表 4 结果表明,肉桂酸浓度低时,随着肉桂酸浓度增加,转化生成的 L-苯丙氨酸也随之增加。当肉桂酸浓度升至 1.5% 时,生成的 L-苯丙氨酸最多。以后, L-苯丙氨酸的生成量随肉桂酸浓度增加而减少。从转化率看,转化率是随着肉桂酸浓度增加而降低,说明肉桂酸对转化反应是有抑制作用的。当肉桂酸浓度超过 1.5% 时,这种抑制作用更明显。考虑到 1.5%

表3 正交实验 III

试 验 设 计								结 果
因素 列号 试验号	酵母膏	葡萄糖	蛋白胨	phe	KH ₂ PO ₄	pH	NaCl	转化率(%)
	1	2	3	4	5	6	7	
1	1(1%)	1(1.5%)	1(1.5%)	2(0.025%)	2(0.1%)	16.0	2(0.5%)	38.7
2	2(1.5%)	1	2	2	1(0.05%)	1	1(0.3%)	45.3
3	1	2(1%)	2(1%)	2	2	2(5.0)	1	57.5
4	2	2	1	2	1	2	2	71.8
5	1	1	2	1(0.05%)	1	2	2	32.1
6	2	1	1	1	2	2	1	0
7	1	2	1	1	1	1	1	68.6
8	2	2	2	1	2	1	2	51.8
I = 位级 1 产率之和	196.9	116.1	140.4	152.5	217.8	204.4	171.4	I + II = 365.8
II = 位级 2 产率之和	168.9	249.7	225.4	213.3	148	161.4	194.4	
极差 R=I,II 之差的绝对值	28	133.6	85	60.8	69.8	43	23	

因素作用大小: 葡萄糖>蛋白胨>KH₂PO₄>phe>pH 值>酵母膏>NaCl

表4 不同肉桂酸浓度对转化的影响

肉桂酸(%)	生成 L-phe(%)	转化率(%)
0.5	0.421	92.5
1.0	0.543	59.7
1.5	0.572	41.9
2.0	0.499	27.4
2.5	0.326	14.3

pH 10.0, 氨水 9 mol/L, 反应 24 小时

时生成的 L-苯丙氨酸最多, 以及当其他条件适当时, 转化率还有潜力提高, 因此, 选用这个浓度作为后面实验的肉桂酸浓度。

2. 表面活性剂对转化的影响: 转化反应中加入表面活性剂, 可增加细胞通透性, 提高酶的效率。但实验结果并非预想的那样可以提高转化率。相反, 不加表面活性剂的对照转化率最高(表 5)。因此, 在后面的实验中均不添加表面活性剂。

3. 氨浓度对转化的影响: 由于反应平衡有利于由 L-苯丙氨酸生成肉桂酸, 所以只有提高氨浓度才有利于向 L-苯丙氨酸的转化。当氨水中氨浓度由 3 mol/L 增加到 8 mol/L, 转化率提高, 再增加氨浓度未见转化率提高(表 6)。故以下的试验均采用 8 mol/L 氨浓度的氨水为进一步试验的基础。

表5 表面活性剂对转化的影响

表面活性剂及浓度(%)		生成 L-phe(%)	转化率(%)
氯代十六烷	0.005	0.695	46.4
基吡啶	0.01	0.479	32.0
	大于 0.01	0.547	36.5
溴代十六烷	0.005	0.666	44.4
基三甲铵	0.01	0.503	33.5
曲拉通 X-100	1	0.533	35.5
吐温 80	1	0.577	38.5
对照	0	0.710	47.1

表6 氨浓度与生成 L-phe 的关系

氨 (mol/L)	3	4	5	6	7	8	9
L-phe(%)	0.54	0.62	0.67	0.69	0.75	0.83	0.83

转化液: 肉桂酸 1.5%; pH 10.0

4. pH 值对转化的影响: 试验表明, 适宜的 pH 值对于转化反应十分重要, 从表 7 中可看出转化反应的最适 pH 为 10.0。但由于 pH 值过高, 反应结束后酶活性只有反应前的 20%, 而 pH 值为 9.0 时, 反应后仍有 82% 的活性。如果考虑多次利用菌体细胞, 所采用的 pH 值就很重要。本实验范围暂采用 pH 10.0 作为最适条件。

5. 温度对转化的影响: 试验了 25、30、35℃

表7 pH 值对转化反应的影响

pH	8	9	10	11	12	13	14
L-phe(%)	0.52	0.63	0.75	0.56	0.42	0.18	0

转化液: 1.5% 肉桂酸, 8 mol/L 氨水反应 24 小时

三个不同温度对转化的影响(试验条件: 转化液为 1.5% 肉桂酸, 8 mol/L 氨浓度, pH 10.0, 反应 24 小时)。结果表明 30℃ 时, 转化生成的 L-苯丙氨酸最多。

(四) 产物提取

1. 提取方法: 产物提取采用 732 阳离子交换树脂法, 操作步骤见文献 [1, 5]。

2. 产物鉴定

a. 纸层析单斑试验: 取样品 40 μg 层析后得到 1 个氨基酸斑点。

b. 生物鉴定: 将 L-phe 缺陷型菌体涂布于基本培养基之上, 加入样品结晶后, 以样品为中心长出生长圈。

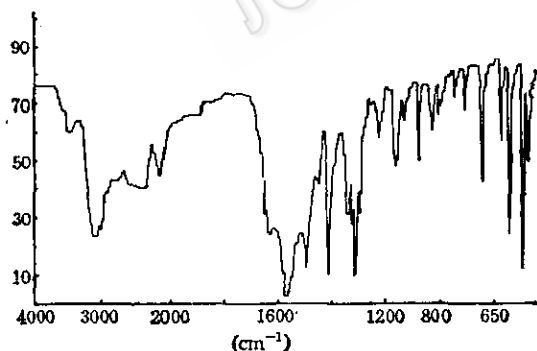


图1 转化样品的红外吸收光谱

c. 熔点试验: 测得样品熔点为 273℃, 文献数据为 270—275℃。

d. 旋光: 测得样品比旋为 34.2°, 文献数据为 33.5—35.5°。

e. 元素分析: 元素比为 C 65.54%; N 8.745%; H 6.53%; O 19.185%。计算得分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$, 与理论值相符。

f. 红外吸收光谱: 经测定表明, 样品吸收峰与标准品相吻合(图 1)。

讨 论

Yamada 认为 L-Ile 可稳定苯丙氨酸解氨酶, 使其在转化反应中, 缓解肉桂酸对苯丙氨酸解氨酶的死活作用^[3]。但从本实验看, 这种稳定作用并不大, 而去掉 L-Ile 可大大降低培养基的成本。

以肉桂酸为底物转化生成 L-苯丙氨酸的方法在实际应用中遇到的主要问题是菌株的苯丙氨酸解氨酶的稳定性, 此问题还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 张震元: 食品与发酵工业, 32—47, 1985 年。
- [2] Katsuhiko Nokamichi et al.: *Appl. Biochem. & Biotechnol.*, 11: 367—376, 1985.
- [3] Yamada, S. et al: *Applied and Environmental Microbiology*, 42, (5): 773—778, 1981.
- [4] Pfizer Inc: British Patent, No. 1 489 468. 1979.
- [5] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, 北京, 第 16—29 页, 第 71—80 页, 1962 年。