

# 恶臭假单胞菌 TS1138 转化生产 L-胱氨酸的工艺研究

刘春琴<sup>1</sup> 余养盛<sup>1</sup> 白 钢<sup>1\*</sup> 杨文博<sup>1</sup> 陈 宁<sup>2</sup> 怀立华<sup>2</sup>

(1. 南开大学生命科学学院 天津 300071)

(2. 天津科技大学生物工程学院 天津 300222)

**摘 要:** 对以 DL-2-氨基- $\Delta^2$ -噻唑啉-4-羧酸(DL-2-amino- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic acid, DL-ATC)为底物原料, 经微生物酶法催化合成 L-半胱氨酸, 并进一步氧化和分离纯化产物 L-胱氨酸的生产工艺和条件进行了研究。建立了以恶臭假单胞菌 TS1138 (*Pseudomonas putida* TS1138) 全细胞为酶源, 反复多次催化底物合成 L-半胱氨酸, 并以 2.0% 二甲基亚砷(DMSO)为氧化剂氧化生成 L-胱氨酸, 进而通过 001×7 型阳离子交换树脂纯化胱氨酸的新工艺。采用高效液相色谱法考察该方法 L-胱氨酸的总收率可以达到 78.55%, 纯度为 99.12%。该方法简单高效, 解决了酶稳定性差不能重复使用, 而固定化酶方法繁琐成本高的问题, 为我国 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸的生产开辟一条新途径。

**关键词:** 恶臭假单胞菌, DL-ATC, L-半胱氨酸, L-胱氨酸, 生产工艺

## Study on L-cystine Conversion Technology by *Pseudomonas putida* TS1138

LIU Chun-Qin<sup>1</sup> YU Yang-Sheng<sup>1</sup> BAI Gang<sup>1\*</sup> YANG Wen-Bo<sup>1</sup>

CHEN Ning<sup>2</sup> HUAI Li-Hua<sup>2</sup>

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

(2. Bioengineering College, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

**Abstract:** A technology of L-cystine production was studied in this paper, which included microbial enzymatic conversion of DL-2-amino- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic acid (DL-ATC) to L-cysteine, subsequent oxidation of L-cysteine to L-cystine and its purification. The cells of *Pseudomonas putida* TS1138 could be repetitively used as the enzyme sources to convert the substrate DL-ATC to L-cysteine. After being oxidated by 2% dimethyl-sulfoxide (DMSO), L-cystine could be harvested and further purified by the positive ion-exchange resin 001×7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) identified the purified L-cystine as having a total recovery of 78.55% and purity of 99.12%. This study demonstrated an efficient and convenient method for L-cystine production, which overcame the instability of enzymes, troublesome procedures and high cost of enzyme immobilization as contrasted to the traditional method. All in all, it pro-

vides a new approach for industrial production of L-cystine as well as L-cysteine.

**Keywords:** *Pseudomonas putida*, DL-ATC, L-cysteine, L-cystine, Production process

L-半胱氨酸是一种重要的含硫氨基酸,广泛应用于医药、食品、化妆品以及饲料工业<sup>[1]</sup>。目前,工业上主要通过毛发酸水解生产L-半胱氨酸。该工艺生产率低,且产生大量刺激性气体和废酸造成环境污染<sup>[2]</sup>。另外,由毛发水解法或其它方法获得的含半胱氨酸反应液,由于其组成复杂<sup>[3]</sup>,并且半胱氨酸在水中的溶解度较高<sup>[4]</sup>,所以要从复杂的反应液中分离出高纯度的半胱氨酸是困难的。但半胱氨酸易被氧化成胱氨酸,而胱氨酸在水中的溶解度极低<sup>[4]</sup>,通常利用这一特性可将反应液中的半胱氨酸首先转化成胱氨酸,沉淀析出,然后再将分离出的胱氨酸电解还原成半胱氨酸<sup>[5]</sup>,从而可获得半胱氨酸纯品。自 Sano<sup>[1,6]</sup>等发现嗜硫氮杂环戊烯假单胞菌(*Pseudomonas thiozolinophilum*)能够把DL-2-氨基- $\Delta^2$ -噻唑啉-4-羧酸(DL-2-Amino- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic Acid, DL-ATC)转化为L-半胱氨酸,利用微生物酶法生产半胱氨酸已成为人们研究和关注的方向<sup>[7]</sup>。本实验室自行分离获得一株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)TS1138,并发现其具有转化DL-ATC合成L-半胱氨酸的能力<sup>[8]</sup>。本研究对TS1138菌株转化生成的半胱氨酸后的氧化条件、分离纯化、产物鉴定以及酶源细胞的重复利用等方面进行了初步研究,为微生物酶法制取L-胱氨酸和L-半胱氨酸的生产工艺奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)TS1138, 本实验室筛选获得<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 培养基<sup>[9]</sup>:** 种子培养基: 葡萄糖 20 g, ATC 3 g, 玉米浆 5 g, 尿素 3 g, NaCl 1.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 定容至 1 L, pH 7.5; 产酶培养基: 葡萄糖 30 g, ATC 4 g, 玉米浆 1 g, 尿素 3 g, NaCl 1.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 定容至 1 L, pH 7.5。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** L-半胱氨酸和 L-胱氨酸标准品为美国 Amresco 公司产品; DL-ATC 购自天津试剂二厂; 高效液相所用试剂为色谱纯, 其他试剂为国产分析纯。发酵使用上海保兴的 BIOTECH-10BGZ 型发酵罐; DL-ATC 和 L-胱氨酸的含量检测

采用岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪和 Model 200S ELSD 蒸发激光散射检测器; 旋光度检测使用上海物理光学仪器厂 WZZ-2A 型自动旋光仪。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 酶源细胞的获得:** 从平板上挑取一环恶臭假单胞菌 TS1138 接入种子培养基中, 28℃ 200 r/min 培养 16 h 后, 以 1%接种量转接到 7 L 产酶培养基中, 在 10 L 发酵罐中进行发酵培养, 发酵条件如下: 温度: 29℃; pH: 6.4~6.7; 转速: 400 r/min; 通气量: 200 L/h。发酵 16 h, 发酵液于 4℃ 下  $6\,000 \times g$  离心 10 min, 弃去上清液, 菌体用 PBS 缓冲液(0.02 mol/L 磷酸缓冲液, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4)悬浮洗涤, 4℃,  $8\,000 \times g$  离心 10 min, 重复洗涤 2 次, 收集菌体称取湿重, 并加入 PBS 制得终浓度为 25%(W/V)的酶源细胞菌悬液。

**1.2.2 DL-ATC转化反应:** 150 mL酶源细胞悬液中加入 300 mL底物溶液(0.6% DL-ATC, 0.6%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01%羟胺, pH 7.5~8.0), 混匀后置于 42℃ 恒温水浴中反应 2.5 h。转化后离心分离酶源细胞及反应液, 酶源细胞经 PBS 重悬后用于下一次转化反应, L-半胱氨酸的转化液可用于进一步的氧化实验。

**1.2.3 L-半胱氨酸和L-胱氨酸的含量测定:** 采用 Gaitonde法直接测定溶液中L-半胱氨酸的含量<sup>[10]</sup>。再将溶液适当稀释后与等体积的 2 mmol/L 1,4-二硫苏糖醇(DTT)溶液混合, 经NaOH调节pH值8.0至8.5, 室温下静置 1h, 使溶液中的L-胱氨酸完全还原成L-半胱氨酸后再采用Gaitonde法测定其中L-半胱氨酸的含量, 两者之差即为L-胱氨酸的含量。

**1.2.4 DL-ATC 和 L-胱氨酸的高效液相色谱法检测:** 色谱柱: Nucleosil SA(250×4.6 mm), 进样体积: 20  $\mu\text{L}$ 。流动相: 冰乙酸-三乙胺-水(0.1: 0.1: 99.8); 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 25℃。ELSD 检测器参数: 漂移管温度 40℃; 氮气压力: 2.8 Bar。

**1.2.5 L-胱氨酸的分离纯化:** 取经 DMSO 氧化后的 L-胱氨酸反应液, 上样于 001×7 型阳离子树脂柱(40 cm × 2.6 cm), 流速 1.5 mL/min。充分洗涤后以 1.0 mol/L 氨水洗脱, 洗脱速度 0.7 mL/min。收集洗脱液, 并以上述 1.2.3 方法检测洗脱液中 L-胱氨酸的含量。合并活性洗脱峰, 以 HCl 调 pH 值至 5.0, 析出胱氨酸白色粉末。过滤收集上述粉末, 经少量无水乙醇洗涤, 烘干后进行纯度鉴定。

**1.2.6 胱氨酸的旋光性鉴定:** 分别称取分离纯化后

的粉末和标准品各 0.121 g, 溶解于 5 mol/L、12 mL 的盐酸中, 将溶液装入旋光仪的盛液管中, 进行旋光性测定, 计算其比旋光度。

2 结果与分析

2.1 微生物酶法转化 DL-ATC 生成 L-半胱氨酸的转化效率

采用微生物酶法单次转化 DL-ATC 后, 离心取上清液, 以 Gaitonde 法测得溶液中 L-半胱氨酸浓度为 3.21 g/L (摩尔浓度 0.027 mol/L), 经计算从底物 DL-ATC 到产物 L-半胱氨酸的摩尔转化率达到了 96.83%。

2.2 L-半胱氨酸氧化条件的考察

2.2.1 氧化剂的考察: 取一定量的上述转化液, 分别加入不同剂量的 DMSO 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 用 HCl 调节 pH 为 1.0, 室温氧化 8 h 后, 再分别测定 L-半胱氨酸氧化率及 L-胱氨酸生成率。如图 1 所示, 当 DMSO 的浓度在 2%, L-半胱氨酸的氧化率均可以达到 97.4%, 而 L-胱氨酸的生成率可以达到 91.6%。而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为强氧化剂, 当浓度在 1% 以上时 L-半胱氨酸的氧化率均可以接近 99%, 但所得到的胱氨酸会被进一步氧化为磺基丙氨酸<sup>[11]</sup>, 从而导致胱氨酸生成率几乎为零。

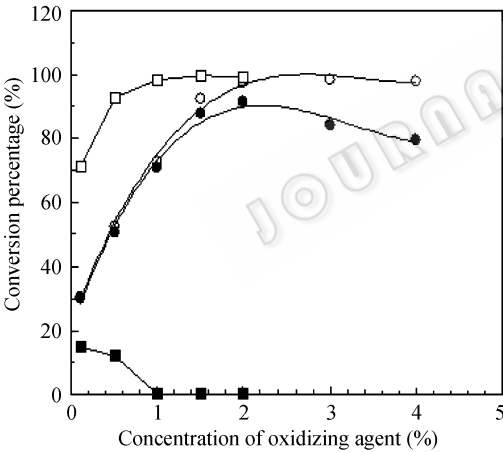


图 1 L-半胱氨酸氧化剂的考察  
Fig. 1 Test of oxidizing agents for L-cysteine  
以 DMSO 为氧化剂时 L-半胱氨酸的氧化率(○)和 L-胱氨酸的生成率(●); 以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为氧化剂时 L-半胱氨酸的氧化率(□)和 L-胱氨酸的生成率(■)  
Oxidization rate of L-cysteine (○) and generation rate of L-cystine (●) using DMSO as the oxidizing agent; Oxidization rate of L-cysteine (□) and generation rate of L-cystine (■) using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the oxidizing agent.

2.2.2 DMSO 氧化时间及氧化剂量的考察: 取一定量转化反应上清液, 分别加入终浓度为 1%、2% 和 3% 的 DMSO, 调节 pH 为 1.0, 室温氧化 2~12 h 后, 分别测定 L-半胱氨酸氧化率及 L-胱氨酸得率。结果如表 1 所示, 氧化时间超过 8 h 以后, L-半胱氨酸的氧

化率及 L-胱氨酸生成率均没有明显提高。而在 2~6 h 内, 3.0% DMSO 的氧化率明显高于 2.0% DMSO, 但随着时间延长, 高浓度的氧化优势逐渐失去, 原因可能与过量的 DMSO 也可将 L-胱氨酸进一步氧化有关<sup>[11]</sup>。

表 1 DMSO 氧化时间及氧化剂量的考察							
Table 1 Test of oxidizing time and concentration of DMSO							
CD (V/V)	OR/GR (%)	Time					
		2h	4h	6h	8h	10h	12h
1.0%	OR	64.7	72.1	78.3	81.2	82.4	83.5
	GR	58.6	69.3	74.5	76.7	77.6	78.2
2.0%	OR	69.4	79.7	87.1	96.7	97.8	97.5
	GR	64.5	74.3	80.6	90.9	91.4	90.2
3.0%	OR	76.5	87.2	94.2	96.8	97.7	96.4
	GR	73.2	78.9	83.4	85.9	87.1	86.3

CD: Concentration of DMSO; OR: Oxidization rate of L-cysteine; GR: Generation rate of L-cystine

2.3 酶源细胞的重复利用次数的考察

由于假单胞菌 TS1138 中存在 L-半胱氨酸脱羧基酶可分解 L-半胱氨酸为丙酮酸<sup>[12]</sup>, 直接影响其产率, 所以在转化反应结束后需要尽快分离酶源细胞和产物的 L-半胱氨酸, 所回收的酶源细胞又可以重复用于下一次的转化和氧化实验。酶源细胞的重复实验结果如图 2 所示, 前 6 次 L-半胱氨酸的转化率与 L-胱氨酸的生成率均可以在 95% 和 80% 以上, 第 7 次后则迅速下降, 证明同一批酶源细胞至少可以重复利用 5 次。

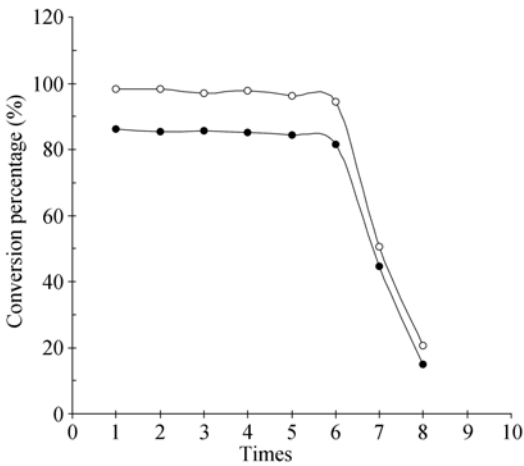


图 2 酶源细胞重复利用次数的考察  
Fig. 2 Test of the repetitive use times of enzyme source cells  
L-半胱氨酸的生成率(○); L-胱氨酸的生成率(●)  
Generation rate of L-cysteine(○); generation rate of L-cystine(●).

2.4 氧化产物的分离纯化

收集上述含有 L-胱氨酸的转化液(约 2.7L), 经

001×7 型阳离子树脂柱吸附, 氨水洗脱, 收集 No. 6-10 洗脱峰, 经 HCl 沉淀、洗涤、烘干后最终得到 7.031g L-胱氨酸白色粉末, 收率为 DL-ATC 转化为 L-胱氨酸最大理论收率的 78.55% (图 3)。

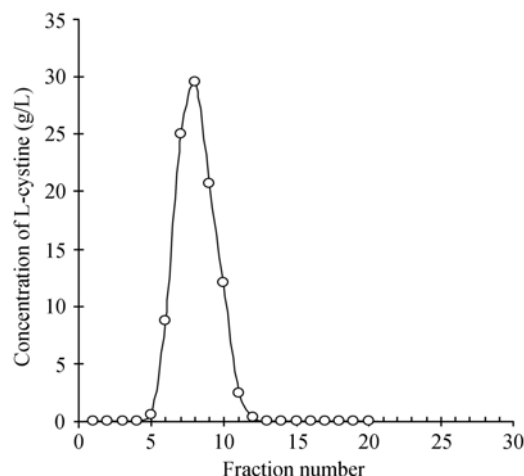


图 3 001×7 型阳离子树脂分离 L-胱氨酸的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of L-cystine isolated by 001×7 ion exchange resin

取一定量上述条件所制备的 L-胱氨酸粉末溶于 HCl 后, 采用高效液相色谱进行检测, 与标准品比对其纯度达到 99.12%(图 4)。

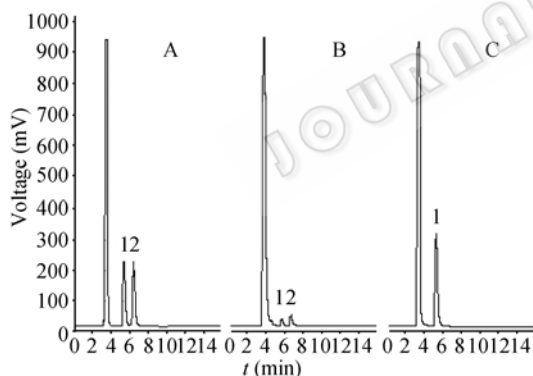


图 4 HPLC 法检测转化液及纯化后的 L-胱氨酸含量

Fig. 4 Concentration of L-cystine by HPLC test in the conversion solution and after purification

A: DL-ATC 和 L-胱氨酸标准; B: TS1138 转化液; C: 纯化后 L-胱氨酸。色谱峰分别为, 1: L-胱氨酸(保留时间 5.371 min), 2: DL-ATC(保留时间 6.285 min)

A: DL-ATC and L-cystine standards; B: conversion solution of TS1138; C: purified L-cystine. chromatographic peaks: 1: L-cystine (retention time: 5.371 min); 2: DL-ATC (retention time: 6.285 min)

## 2.5 胱氨酸的旋光性鉴定

纯化后的产物与标准的 L-胱氨酸的比旋光度 $[\alpha]_D$ 分别为 -226.4、-229.7, 且与文献报道基本一致<sup>[13]</sup>, 因此可以确证得到的为 L 型胱氨酸。

## 3 讨论

2002 年 Shiba 等报道了假单胞菌 BS 菌株由 DL-ATC 经酶法转化生成 L-半胱氨酸是通过 L-ATC 水解酶水解 ATC 噻唑环中 C<sub>2</sub>-S 单键, 以 N-氨甲酰-L-半胱氨酸(L-NCC)为转化的中间产物, 再经 N-氨甲酰-L-半胱氨酸氨甲酰水解酶催化生成 L-半胱氨酸的 N-代途径(L-NCC 途径)<sup>[14]</sup>。利用自行分离的恶臭假单胞菌 TS1138, 我们已经进行了较为系统的酶学性质和功能基因研究<sup>[9]</sup>, 并证明其能通过 L-ATC 水解酶水解 ATC 噻唑环中的 C=N 双键, 生成 S-氨甲酰-L-半胱氨酸(L-SCC)中间产物, 再经 S-氨甲酰-L-半胱氨酸酰胺水解酶(L-SCC 酰胺水解酶)催化生成最终产物 L-半胱氨酸, 为不同于 N-代途径的 S-代途径, 在转化机理的研究上取得了一定的进展<sup>[15]</sup>。在此基础上, 本研究对以 DL-ATC 为出发原料最终制备 L-胱氨酸的工艺条件进行了研究, 建立了以假单胞菌 TS1138 全细胞为酶源, 微生物酶法多次催化 DL-ATC 合成 L-半胱氨酸, 并采用 DMSO 氧化水溶液中的半胱氨酸成胱氨酸, 进一步通过阳离子交换树脂分离纯化 L-胱氨酸的生产工艺, 其收率达到 78.55%, 纯度达到 99.12%。通常在由酶催化法进行的反应中, 酶稳定性差、易失活, 一般不能重复使用, 而固定化的方法又或多或少对酶活力有一定影响。本方法简单高效, 有望为我国 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸的生产开辟一条新途径。

## 参考文献

- [1] Sano K, Yokozeki K, Tamura F, *et al.* Microbial conversion of DL-ATC to L-cystine and L-cystine: screening of microorganisms and identification of products. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **34** (6): 806-810.
- [2] 杨金奎, 何璧梅. 微生物方法生产 L-半胱氨酸的研究进展. 国外医药抗生素分册, 2001, **22** (4): 179-183.
- [3] 刘 勋, 陈时洪. 用氧化亚铜从人发水解液中沉淀胱氨酸的研究. 氨基酸和生物资源, 2003, **25**(1): 55-57.
- [4] 沈 同, 王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1990, p. 79.
- [5] 杨 林. L-半胱氨酸生产存在的问题及解决办法. 化工矿山技术, 1998, **27**(1): 37-39.
- [6] Sano K, Eguchi C, Yasuda N, *et al.* Metabolic pathway of L-cystine formation from DL-2-Amino-Δ<sup>2</sup>-thiazoline-4-Carboxylic Acid by *Pseudomonas*. *Agric Biol Chem*, 1979, **43**(11): 2373-2377.
- [7] Ryu OH, Ju JY, Shin CS. Continuous L-cystine production using immobilized cell reactors and product extractors. *Process Biochemistry*, 1997, **32** (3): 201-209.
- [8] 刘 忠, 杨文博, 白 钢, 等. 微生物酶法合成 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸. 微生物学通报, 2003, **30** (6): 16-21.

- [9] 金永杰, 杨文博, 刘 忠, 等. 假单胞菌 L-半胱氨酸合成酶的纯化和性质研究. 微生物学通报, 2004, **31**(6): 68–72.
- [10] Gaitonde MK. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem*, 1967, **104**: 627–633.
- [11] Marcella C, Claudia E, Pier GR, *et al.* Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1991, **12** (5): 376–377.
- [12] 白 钢, 李 洋, 余养盛, 等. 假单胞菌 TS1138 L-半胱氨酸脱巯基酶基因的克隆与表达. 南开大学学报, 2006, **39** (3): 12–15.
- [13] 沈 同, 王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1990, p. 87.
- [14] Shiba T, Takeda K, Yajima M, *et al.* Genes from *Pseudomonas* sp. strain BS involved in the conversion of L-2-amino- $\Delta^2$ -thiazolin-4-carboxylic acid to L-cysteine. *Appl Envir Microbiol*, 2002, **68**: 2179–2187.
- [15] Yu YS, Liu Z, Liu CQ, *et al.* Cloning, expression, and identification of genes involved in the conversion of DL-2-amino- $\Delta^2$ -thiazolin-4-carboxylic acid to L-cysteine via S-carbamyl-L-cysteine pathway in *Pseudomonas* sp. TS1138. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, **70** (9): 2262–2267.

主编点评

## 微生物酶法转化生产 L-半胱氨酸的工艺研究

赫荣乔

(《微生物学通报》编委会 北京 100101)

L-半胱氨酸(Cys)侧链巯基是构成蛋白质活性基团的重要氨基酸, 在生物化学、医药、食品、饲料、化妆品等行业具有广泛的用途, 国内外的需求量逐年增长。然而, Cys 难以通过单纯的微生物发酵来进行生产; 由于化学合成的步骤繁多, 也很难进行化学合成。传统生产方法沿用毛发酸解制取 L-半胱氨酸, 收率低, 能耗高, 水解过程产生难闻气体及大量废酸, 环境污染严重。目前, 微生物酶法转化合成 L-半胱氨酸是国际上相关领域的先进技术, 但该项技术被国外公司垄断, 我国一直为其提供转化底物, 其生产的 L-半胱氨酸产品又返销国内。

本期发表的“恶臭假单胞菌 TS1138 转化生产 L-胱氨酸的工艺研究”一文, 介绍了刘春琴、白钢等人开展的工作, 他们建立了以假单胞菌 TS1138 全细胞为酶源, 酶法多次催化 DL-ATC 合成 L-半胱氨酸以及分离纯化 L-半胱氨酸的工艺。采用其实验室分离的假单胞菌 TS1138 菌株, 并且合成了 ATC 作为底物原料, 经酶法催化水解 ATC 生产 L-半胱氨酸。他们对 L-半胱氨酸的代谢途径中的关键酶基因(L-ATC 水解酶, L-SCC 甲酰水解酶以及 L-半胱氨酸脱巯基酶)进行了系统研究, 证明了 L-半胱氨酸合成新的 S-代途径, 实现了酶源细胞的连续化生成。该研究成果对于国内 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸生产工艺的自主创新, 在理论和应用方面都具有参考价值。

关键词: 恶臭假单胞菌, DL-ATC, L-半胱氨酸, L-胱氨酸, 生产工艺

### 参 考 文 献

- [1] 刘春琴, 余养盛, 白 钢, 等. 恶臭假单胞菌 TS1138 转化生产 L-胱氨酸的工艺研究. 微生物学通报, 2008, **35**(1): 45–49

## On the Technique for L-cystine Conversion by *Pseudomonas putida* TS1138

HE Rong-Qiao

(The Editorial Board of Microbiology, Beijing 100101)

**Keywords:** *Pseudomonas putida*, DL-ATC, L-cysteine, L-cystine, Production process