

反应条件下苯丙氨酸解氨酶的活力稳定性

李清彪 李 薇 卢英华

(厦门大学化工系 厦门 361005)

在苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的作用下由肉桂酸和氨合成 L-苯丙氨酸 (L-Phe) 是酶法合成该氨基酸的重要途径^[1~4], 国外已利用该途径进行 L-苯丙氨酸的工业生产^[5], 但是该过程仍存在着转化率低和酶活力稳定性差的问题^[6]。为解决这些问题, 有必要在现有基础上开展提高酶活力稳定性的研究。

在反应过程中 PAL 易失活的明显原因是化学热力学上所要求的苛刻反应条件, 如高 NH₃ 浓度、高 pH 和相对高的肉桂酸浓度。降低底物 NH₃ 和肉桂酸的浓度及减少溶液的 pH 都可明显增加酶活的稳定性, 但此时酶活的绝对值很小, 使得酶反应所产生的 L-Phe 很少有实际应用的价值。因此, 通过其它的手段来提高酶在较高活力水平上的稳定性更有意义。本工作的目的就是考察外加组分、更换氨基供体、细胞的固定化以及不同组合条件对提高酶活稳定性的作用。

1 材料与方 法

1.1 试剂与菌种

粘红酵母 NC06 是由南开大学生物系的粘红酵母 1001-20-6R 经紫外诱变所得的^[7], 细胞中含有诱导产生的 PAL。氨水 (AR)、肉桂酸 (CP)、D-山梨醇 (CP)、甘油 (AR)、碳酸钠 (AR) 和醋酸铵 (AR) 为化学试剂, 卡拉胶 (κ -角叉菜胶) 由青岛海洋化工厂研究所提供。SHZ-82 型水浴恒温振荡器和 752 紫外分光光度计分别由江苏太仓医疗器械厂和上海第三分析仪器厂生产。

1.2 实验方法

细胞的培养与酶的诱导产生: 详见文献 [7]。

细胞的固定化: (a) 热固定化: 取出一定量的湿细胞, 加入到 pH6 的磷酸盐缓冲液中, 60℃ 保温 15min, 离心后用于活性测定。(b) 卡拉胶固定化: 卡拉胶-1: 0.18g 卡拉胶, 加 5.5ml pH7 磷酸盐缓冲液加热溶解后, 50℃ 保温, 一定量的湿细胞加 1.5ml pH7 的缓冲液搅匀后倒入培养皿中成形, 再用 2% KCl 溶液浸泡强化, 最终固定化细胞浓度为 0.279g 湿细胞/g 固定化细胞。卡拉胶-2: 与上述不同的是在成形前的溶液中含有 1.366g 的 D-山梨醇, 最终的细胞浓度为 0.248g 湿细胞/g 固定化细胞。(c) 海藻酸钠固定化 (CaCl₂ 固化)、明胶固定化 (戊二醛交联)、聚丙烯酰胺凝胶固定化 (N, N'-亚甲基双丙烯酰胺交联) 和琼脂固定化方法主要参照文献 [8] 的做法, 所得的相应固定化细胞浓度分别为 0.437、0.290、0.200 和 0.366g 湿细胞/g 固定化细胞。

细胞中酶活力的测定: 取一定量的湿细胞 (约 0.5g), 加入 5ml 反应液后, 迅速搅匀, 并放入一定温度下的振荡器中振荡反应 4h 后, 取出反应管, 在冰浴中冷却后, 3000r/min 离心 15min, 收集上清液, 剩下的细胞加入 pH6~7 的磷酸盐缓冲液洗涤离心后, 再加入反应液进行下一次的反应, 如此下去。测上清液的组成就可知每一次酶的反应情况, 计算出酶活力并由此来比较含 PAL 细胞的反应稳定性, 酶活力定义为每小时每克湿细胞所能转化的肉桂酸的毫克数。

分析方法: 肉桂酸浓度通过测定波长 278nm 处的吸光度而得到。苯丙氨酸的检测用纸层析色谱法。

2 结果与讨论

2.1 多羟醇对 PAL 活力的稳定作用

甘油、聚乙二醇和 D-山梨醇等多羟醇的存在对酶活的稳定性有一定的保护作用^[9]。当反应液组成为 4mol/L NH₃, pH10, 1%肉桂酸, 反应温度为 30℃时, 表 1 结果表明了 1.5mol/L D-山梨醇对 PAL 的酶活力有较好的稳定作用, 并提高了酶活力。增加添加物的浓度可以使 PAL 的间歇反应批数增多, 但是溶液粘度增大对传质是不利的, 且添加物的加入也增加成本。

表 1 多羟醇的存在, 无 Cl⁻和通 N₂ 条件下酶的反应批数 (4h/批)

Run	PAL activity/mg · (h · g) ⁻¹					
	No alcohol	0.5% Polyethylene glycol	20% Glycerol	1.5 mol/L D-sorbitol	N ₂ -sparging	Without Cl ⁻
1	14.12	14.86	15.26	13.11	12.04	9.85
2	18.54	14.46	19.07	23.41	24.36	12.11
3	7.50	8.32	13.86	23.41	20.77	12.26
4	3.89	5.50	8.70	20.30	22.56	11.42
5	2.83	4.21	5.67	17.08	20.79	9.84
6			3.26	13.43	18.30	9.66
7				7.00	13.87	7.70
8				4.18	8.20	6.40
9					7.91	5.22
10					2.02	2.69

2.2 反应液中去 Cl⁻或通 N₂ 对 PAL 活力的稳定作用

反应溶液中的 Cl⁻和 O₂ 对 PAL 的失活起重要的作用^[10], 因此在配制溶液时用 H₂SO₄ 取代 HCl 来调整溶液的 pH 使溶液中无 Cl⁻; 在反应之前用 N₂ 置换溶液中的溶氧使溶液中的含氧量尽可能低, 这两个措施都应能改善 PAL 易失活的情况, 表 1 中的结果也说明了这一点。无 Cl⁻ 列的酶活与其它列有差别的原因是所使用的酶来自不同的细胞培养批数。

2.3 不同氨基供体对 PAL 活力的稳定作用

高浓度的 NH₃ 是使 PAL 快速失活的因素之一^[11], 实验选择了中性铵盐碳酸铵和醋酸铵取代氨水进行反应溶液的配制。反应液含 1%肉桂酸, pH 值为 10, 反应温度 30℃。由表 2 可以看出无论用醋酸铵或碳酸铵来供给氨基, PAL 的活力稳定性都明显地提高了, 而且对于具有相同氨基浓度的反应液来讲, 初始活性也较高。对于 2mol/L 醋酸铵溶液来说, 虽然酶的初始活力比 2mol/L (NH₄)₂CO₃ 的溶液低, 但在反应的后期, 其活力绝对值反而更大, 说明了低氨基浓度的稳定作用。用这两个氨基供体对酶活力有稳定作用一是由于在配制溶液时无需加酸调 pH 也自然使溶液中无 Cl⁻了, 二是溶液中的阴离子如 CO₃²⁻、Ac⁻ 可能对酶有一定的作用, 因为溶液中的 NH₄⁺ 和 NH₃ 的浓度对于两种供体来讲分别与 4mol/L NH₃ 和 2mol/L NH₃ 时相同 (pH 相同)。2mol/L NH₃ 列的数据来自于不同批数培养的小区。

2.4 固定化细胞对 PAL 活力的稳定作用

细胞被固定化后常可使细胞的反应稳定性得到提高^[9]。反应溶液为 4mol/L NH₃, pH10, 1%肉桂酸, 反应温度 30℃时, 部分固定化细胞的反应结果在表 3 中给出。从表中可以看出, 在 60℃的缓冲液中保温 15min 不增加酶活的稳定性, 也不引起酶的失活。其它固定化细胞中酶活力保持顺序由大到小依次为聚丙烯酰胺、卡拉胶、海藻酸钙、琼脂、明胶。从活力的稳定性来讲, 卡拉胶明显优于其它各种载体, 其它的固定化细胞在第二批反应后即完全失活, 而卡拉胶-1 和卡拉胶-2 没有看出明显的区别, 表明 D-山梨醇在非反应体系中的作用不明显。而且, 尽管使用了 KCl 为强化剂, 但结果稳定性还是提高了, 这可能由于 Cl⁻ 在非反应过程中并不失活酶, 或者酶经固定化后对 Cl⁻ 不敏感, 另外, 固定化细胞中的 Cl⁻ 也大多在随后的浸泡及冲洗中流失了, 因此影响顶多在第一批操作。

表 2 不同氨基供体的反应液中, 酶的反应批数 (4h/批)

Run	PAL activity/mg · (h · g) ⁻¹			
	4mol/L NH ₃	2mol/L (NH ₄) ₂ CO ₃	2mol/L NH ₄ Ac	2mol/L NH ₃
1	15.82	16.33	10.19	8.67
2	11.03	19.71	13.65	7.17
3	4.36	15.21	12.64	6.89
4	2.11	13.73	12.57	5.91
5	0.81	12.21	12.21	5.57
6		11.55	11.95	3.99
7		10.25	10.84	3.42
8		8.63	10.21	2.33
9		8.11	9.43	1.92
10		7.49	8.84	1.67
11		5.78	6.92	
12		4.24	6.10	

表 3 不同的固定化细胞中 PAL 的反应批数

Run	PAL activity/mg · (h · g) ⁻¹			
	Free cells	Heating at 60°C	κ-carrageenin-1	κ-carrageenin-2
1	14.11	14.90	5.16	6.00
2	11.7	11.76	6.74	6.72
3	5.66	5.74	6.08	6.34
4	3.10	3.07	5.13	5.65
5	1.53	1.32	4.70	5.59
6			3.68	3.56
7			2.23	2.81
8			1.87	1.85
9			0.89	0.79

2.5 不同组合条件下 PAL 活力的稳定作用

用 N₂ 排 O₂、溶液中无 Cl⁻ 和加 D-山梨醇都能增加 NC06 酵母中的 PAL 在反应过程中的稳定性, 但是单独的一个稳定措施的稳定效果还有限, 特别是不能达到在较高活力水平上的长期稳定, 各种稳定方法起作用的原因还不很清楚, 但有可能是从不同的方面起稳定作用。把其中的两个或三个稳定方法结合在一起的实验结果在表 4 中给出, 除了添加剂外, 反应液组成为 4mol/L NH₃, pH10, 1% 肉桂酸, 温度为 30°C, 加 D-山梨醇的浓度为 1.5mol/L。由表中数据可见对 PAL 的稳定效果是“加 D-山梨醇, 无 Cl⁻ 和通 N₂” > “无 Cl⁻、通 N₂” > “加 D-山梨醇、通 N₂”, 以三种方法结合的效果最好, 它不仅增加了活力绝对值, 而且使细胞间歇反应 90h 后酶活力仍在 10mg/h · g 以上, 也使酶活力保持在 20mg/h · g 以上的时间达近 70h, 和没有任何稳定措施相比, 三种方法的组合条件下细胞的反应批数后者是前者的 10 倍以上 (酶活力不低于 10mg/h · g)。它表明 PAL 的活力稳定性差虽是一个严重的问题, 但不是

无法解决的问题。如果在细胞批次反应间隔时间内的贮存过程中也进行稳定化处理,那么稳定效果会更好。在这里的三种组合条件中还没考虑到像温度的降低,氨基供体的更换、pH 的适当调整、 NH_3 浓度的减小,以及细胞的固定化等措施,如果把这些可能的提高酶活稳定性的方法都结合起来,并选择具有高活力水平的综合稳定方法,那么 PAL 容易失活的问题就可能得到更好的解决。

表 4 几种组合条件下酶的反应批数 (4h/批)

Run	PAL activity/mg · (h · g) ⁻¹			
	Without stabilizing method	Inclusion of D-sorbitol and N ₂ -sparging	Exclusion of Cl ⁻ and N ₂ -sparging	Exclusion of Cl ⁻ and inclusion of D-sorbitol and N ₂ -sparging
1	14.12	6.43	16.57	15.44
2	18.54	20.35	19.68	23.13
3	7.50	18.35	20.70	19.85
4	3.89	21.03	15.76	22.96
5	2.83	20.06	20.93	24.45
6		19.29	19.76	27.06
7		12.32	24.06	26.83
8		19.25	21.08	23.42
9		14.32	19.87	23.97
10		13.12	18.74	24.09
11		13.09	12.48	20.60
12		8.07	9.40	20.79
13		7.16	6.30	19.77
14		3.19	5.17	14.58
15			3.73	10.28
16				6.35
17				2.40

3 结 论

NC06 酵母细胞中的苯丙氨酸解氨酶在反应条件下酶活力的稳定性可以通过下列方法得到提高:反应液中添加 D-山梨醇;去除反应液中的 Cl⁻;反应液中通 N₂ 排 O₂;用醋酸铵或碳酸铵取代氨水作为氨基供体;用卡拉胶包埋细胞。结合反应液中添加 D-山梨醇、无 Cl⁻ 和除 O₂, 苯丙氨酸解氨酶可以在高的活力水平上反应近 80h, 在较高活力水平上反应 90h, 这两个时间都是无任何稳定措施的酶在相应活力水平上的反应时间的 10 倍以上, 表明了酶活稳定性得到了很大程度的提高, 为该酶的进一步开发应用解决了一大问题。如果进一步考虑其它的稳定方法的使用, 酶活稳定性还将获得更大的提高。

参 考 文 献

- [1] Havar E A, Hanson K R. *Biochemistry*, 1968, 7: 1904.
- [2] Pfizer Inc. *British Patent*, No1, 489, 463.
- [3] Ogata K, Uchiyama K, Yamada H. *Agr Biol Chem*, 1967, 31: 200.
- [4] Yamada S, Nabe K, Izuo N. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42: 773.
- [5] Hamilton B K, Hsiao H Y, Swann W E. *Trends in Biotechnol*, 1985, 3: 64.
- [6] Evans C T, Choma C, Perterson W. *Ind Microbiol*, 1987, 2: 53.

- [7] 邢文革, 南开大学硕士研究生毕业论文, 1991.
- [8] 陈驹声, 居乃琥, 陈石根, 固定化酶理论与应用, 北京: 轻工业出版社, 1987, p150.
- [9] Yasumatsu K, Ohno M, Matsumura C. *Agri Biol Chem*, 1954, **29**: 665.
- [10] 李清彪, 由英才, 陶 雪. 科学通报, 1994, **39** (12): 1088.
- [11] 李清彪, 陶 雪, 由英才. 中国博士后首届学术大会论文集 (下册), 北京: 国防工业出版社, 1993, p1504.

Stabilization of Enzymic Activity of PAL in the Yeast Cells During Bioconversion Process

Li Qingbiao Li Wei Lu Yinghua

(Department of Chemical Engineering Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract By comparing the numbers of the consecutive reaction runs with a relative high PAL (phenylalanine ammonia-lyase) activity the stability of enzymic activity of PAL in the cells (*R. glutinis* NC06) was determined. Various methods except reducing the physical severity of the reaction conditions, such as high pH, high ammonia and trans-cinnamic acid concentrations, have been developed for stabilizing the PAL under the bioconversion condition. The stability of the PAL in the cells can markedly be improved by omitting chloride ions (Cl^-) from the reaction mixture and using anaerobic condition created by N_2 -sparging during the reaction process. The inclusion of glycerol, especially sorbitol in the reaction mixture appeared to significantly increase the stability of PAL in the cells. The substitution of $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ or NH_4Ac for NH_3 in the reaction mixture and the immobilization of the PAL-containing cells by κ -carrageenin also greatly contributed to the stability of the PAL activity. A combination of N_2 -sparging during the reaction process with inclusion of sorbitol and exclusion of Cl^- in the reaction mixture increased the number of the consecutive reaction runs with a high PAL activity (more than 19.5 mg trans-cinnamic acid per g cell wet weight per hour) to 10-fold that of the control which was carried out without any stabilizing means.

Key words Phenylalanine ammonia-lyase, stabilization, enzymic activity, L-phenylalanine, trans-cinnamic acid