

## 固定化米曲霉菌体细胞光学拆分 DL-丙氨酸

宋正孝 李晓敏 王 诤 彭 英

(天津大学化工系 天津 300072)

**摘 要** 将米曲霉经液体培养生长成直径 1~2mm 的浅黄色菌球, 用明胶-甲醛固定, 得到拆分 N-乙酰-DL-丙氨酸酶活力较高和反应性能较好的固定化细胞。考察了各种因素对固定化细胞酶活力的影响。当底物浓度小于 0.15mol/L, 底物抑制现象不明显, 此时拆分反应速率符合 Michaelis-Menten 方程。

**关键词** 光学拆分, 固定化, 米曲霉菌, 氨基酰化酶

大量研究表明, 用米曲霉菌的氨基酰化酶 (EC 3.5.1.14) 拆分 DL-氨基酸是当前生产某些 L-氨基酸最经济有效的方法<sup>[1]</sup>。自 60 年代末日本用 DEAE-Sephadex 作载体将该酶固定化实现了工业生产 L-氨基酸以来, 不断推出固定化氨基酰化酶新的研究成果<sup>[2~8]</sup>。但它们都是采用载体固定酶法。这样由酶的提取、精制到固定化, 工艺很长, 使酶的有效利用率很低, 且载体大都价格昂贵。为此, 我们将原来米曲霉菌的固相培养改为液体培养, 使之生长成含氨基酰化酶浓度较高, 直径约 1~2mm 的菌球, 用明胶-甲醛为交联剂交联固定。用此固定化菌体细胞对 DL-丙氨酸进行了光学拆分研究, 考察了影响固定化菌体细胞拆分反应的各种因素。

### 1 材料和方法

#### 1.1 DL-丙氨酸 (Ala) 的乙酰化

DL-丙氨酸由北京制药二厂提供。为化学合成法生产, 纯度大于 98%。用乙酸作溶剂以乙酸酐为酰化剂按文献 [9] 方法制备出粗 N-乙酰-DL-丙氨酸 (N-Ac-DL-Ala), 此产品用无水乙醇重结晶两次得到 N-Ac-DL-Ala 纯产品, 用 1% 茚三酮乙二醇甲醚溶液作显色检验, 证实无残余 DL-Ala 后作为拆分底物。

#### 1.2 米曲霉菌球的制备

**1.2.1 菌种的斜面培养:** 米曲霉 3042 菌株由中科院微生物研究所提供。每 100ml 斜面培养基含黄豆汁 10g, 葡萄糖 3g,  $K_2HPO_4$  0.036g,  $MgSO_4$  0.05g, 琼脂 2g。pH 值为 6.5~7.0。于 0.1MPa 蒸汽压下灭菌 1h。接入米曲霉 3042 菌后, 在 30~31℃ 下静止培养 3d, 得绿色孢子。

**1.2.2 菌体的液体培养:** 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 葡萄糖 20, 牛肉膏 10, 酵母膏

天津市自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 7 月 25 日收到。

1.5,  $K_2HPO_4$  2,  $MgSO_4$  1, D-生物素 0.2mg/L。pH 6.5~7.0。在 1000 ml 三角瓶中装入 100~200ml 培养液, 于 0.1MPa 蒸汽压下灭菌 30min。接入一定量菌悬液后于 30℃ 下在旋转半径 1.5cm 的摇床上以 130r/min 的转速振荡培养 35~40h, 得到直径为 1~2mm 的浅黄色菌球, 下摇床后用去离子水洗净备用。

**1.2.3 酶活的测定:** 取菌体 0.5g 放在 100ml 三角瓶中, 加入 0.2mol/L N-Ac-DL-Ala 溶液 (含  $CoCl_2 \times 10^{-4} mol/L$ ) 5ml, 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 40ml 及 4ml 水。在 37℃ 下在摇床上恒温振荡 30min, 过滤后溶液迅速煮沸灭酶活, 冷却后用茚三酮显色法<sup>[10]</sup>测定拆分出的 L-Ala 的  $\mu mol$  数。

菌体细胞酶活定义为在 37℃ 下 1h 内由菌体细胞催化拆分产生的 L-Ala 的  $\mu mol$  数。单位为 u。其中  $1u = 1\mu mol/g \cdot h$ 。

### 1.3 固定化方法

菌体细胞固定化实验按  $L_{16} (4^5)$  正交表在室温下进行, 选固定液中明胶浓度 0.5%~2% (W/V), 甲醛浓度 0.5%~2% (W/V), 固定液用量 4~10ml/g 菌体, 以及固定化时间 0.5~2h 进行 4 因素 4 水平的实验, 以固定化后酶活保留率为实验指标。测定固定化细胞酶活的方法与天然菌体细胞相同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化条件的选择

菌体细胞固定化条件、结果及实验结果的方差分析如表 1。方差分析表明在实验范围内对酶活保留率影响显著的顺序为明胶浓度、固定液用量、固定化时间和甲醛浓度。其中前二因素的影响较显著而后二因素影响不大。

方差分析还表明, 固定液用量和固定化时间的最佳值均在所选的范围内, 即分别为 8ml/g 菌体和 1.5h, 而明胶浓度和甲醛浓度的最佳位置却处于适宜范围的边界上。这里甲醛作为交联剂加入越少酶活保留率越高, 补充实验表明, 当甲醛浓度减至 0.3% 时酶活保留率可达 78%, 但放置 20d 后其酶的脱落率达到 23%, 因此 0.5% 的甲醛浓度不宜再减。明胶为酶活性的保护剂, 若浓度由 2% 再增加至 2.5% 后, 酶活保留率由 72.4% 变为 72.6%, 已无明显作用, 因此优选的固定化条件为: 每克湿菌体所用 8ml 固定液用量中, 含 2% 明胶, 0.5% 甲醛, 固定化时间 1.5h。这样固定化细胞的酶活一般为 700u/g, 酶活保留率约 71%。

### 2.2 固定化细胞的性质

**2.2.1 pH 的影响:** 在不同 pH 值的缓冲液中固定化前后菌体细胞的相对反应活性 (以各体系最高酶活力为 100%) 如图 1, 固定前菌体细胞最适 pH 为 7.0, 固定化以后由于菌体内部微环境的静电性质发生了变化<sup>[11]</sup>, 使最适 pH 向碱性偏移至 8.0。

**2.2.2 温度的影响:** 不同温度下固定化前后细胞的相对活性如图 2。固定前菌体细胞的最适反应温度为 55℃, 固定化以后变为 65℃, 且适应范围明显变宽, 表明固定化菌体细胞的热稳定性增强。

**2.2.3 最适缓冲液浓度:** 图 3 给出 pH7.0 时不同浓度的磷酸缓冲对固定化菌体细胞反应活性的影响。可见浓度为 0.1mol/L 时反应效果最好。说明溶液的离子浓度也影响着

酶与底物的相互作用。

表 1 正交实验条件、结果及方差分析

Table 1 Conditions, results & varliance analysis of orthogonal method

Factors No.	Gelatin conc. A/%	Formaldehyde conc. B/%	Immobilizing time C/h	Immob. solution volume D/ml. g <sup>-1</sup>	Activity yield X/%
1	0.5	0.5	0.5	4	26.5
2	0.5	1.0	1.0	6	11.7
3	0.5	1.5	1.5	8	69.0
4	0.5	2.0	2.0	10	40.3
5	1.0	0.5	1.0	8	39.4
6	1.0	1.0	0.5	10	25.1
7	1.0	1.5	2.0	4	16.5
8	1.0	2.0	1.5	6	11.6
9	1.5	0.5	1.5	10	32.8
10	1.5	1.0	2.0	8	42.7
11	1.5	1.5	0.5	6	15.4
12	1.5	2.0	1.0	4	30.0
13	2.0	0.5	2.0	6	59.1
14	2.0	1.0	1.5	4	55.3
15	2.0	1.5	1.0	10	36.5
16	2.0	2.0	0.5	8	66.6
I/4	0.369	0.395	0.335	0.321	I ~ IV: Sum of
II/4	0.232	0.337	0.294	0.245	the same factor
III/4	0.302	0.344	0.422	0.544	level
IV/4	0.544	0.371	0.397	0.337	
Fj	3.37	0.131	0.643	3.052	
Notability	(0.25)*	Unnotable	Unnotable	(0.25)*	

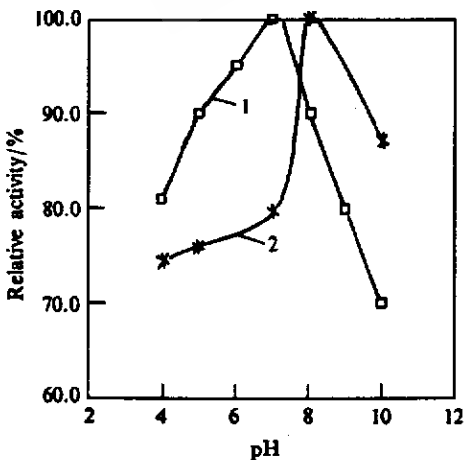


图 1 菌体细胞在不同 pH 时的反应活性

Fig. 1 Effects of pH on reactive activity

1. Native cells, 2. Immobilized cells

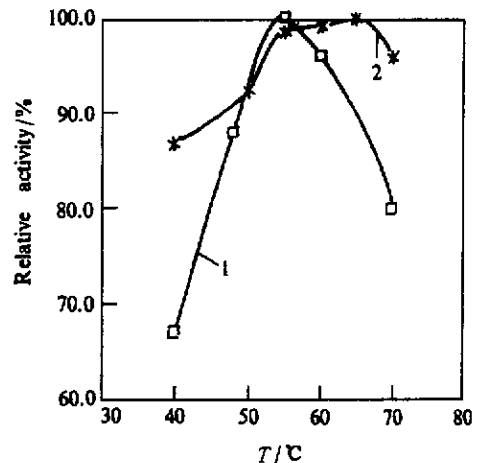


图 2 温度对细胞反应活性的影响

Fig. 2 Effects of temperature on reactive activity

1. Native cells, 2. Immobilized cells

2.2.4 无机金属离子的影响：不同无机金属离子（浓度均为  $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ）对酶促反应的影响如表 2，可见多数金属离子对菌体细胞的酶活力都有抑制作用，固定化使抑制作用减弱。而  $\text{Co}^{2+}$  对氨基酰化酶的酶活有激活作用，因此在以后进行拆分实验的底物中均加入  $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  的  $\text{CoCl}_2$ 。

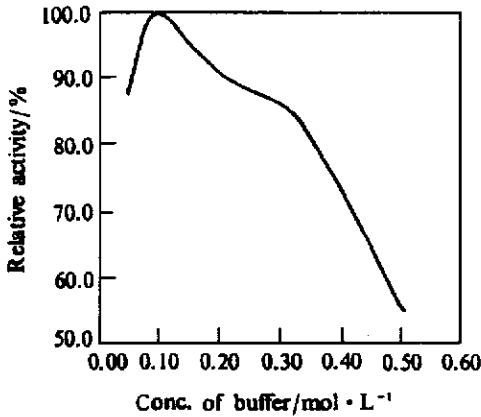


图 3 缓冲液浓度对活性的影响

Fig.3 Effects of buffer conc. on activity

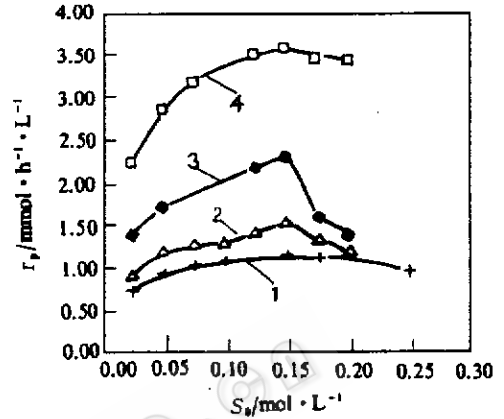


图 4 反应初速率与底物浓度的关系

Fig.4 Initial rate-substrate conc. profiles

1-37°C, 2-45°C, 3-55°C, 4-65°C

表 2 金属离子对菌体细胞反应活性的影响

Table 2 Effects of mental ions on reactive activity

Mental ions	Relative activity/%	
	Native cells	Immob. cells
-	100	100
$\text{Fe}^{2+}$	80	87
$\text{Fe}^{3+}$	70	95
$\text{Co}^{2+}$	115	110
$\text{Zn}^{2+}$	83	85
$\text{Cu}^{2+}$	82	90
$\text{Mn}^{2+}$	80	85

2.2.5 底物浓度的影响：在  $0.1 \text{ mol/L}$ 、 $\text{pH}7.0$  的磷酸缓冲液中，加入等量的固定化细胞，改变底物浓度，以  $125 \text{ r/min}$  的转速在恒温水浴中振荡，用反应开始  $0.5 \text{ h}$  内反应产生的 L-Ala 量计算拆分反应的初速率，得到不同底物浓度在不同温度下的反应初速率变化规律，如图 4。结果表明在相同温度下，随着初始底物浓度的增加，反应初速率也随之加大，但在底物浓度高于  $0.15 \text{ mol/L}$  后，反应初速度出现不同程度的下降，说明该酶促拆分反应体系存在着高浓度底物抑制现象。

2.2.6 固定化菌体细胞连续操作稳定性：在  $\phi 10 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$  柱内装入总酶活为  $4600 \text{ u}$  的固定化菌体细胞，在  $37^\circ \text{C}$  下将  $0.1 \text{ mol/L}$  的 N-Ac-DL-Ala 溶液以  $20 \text{ ml/h}$  的流速

通入酶柱, 定期测定流出液的拆分率, 结果如图 5。连续拆分 20d 后酶活存留率为 78%。一般工业生产要求酶的半衰期在 20d 以上, 因此该固定化菌体细胞的操作稳定性已能满足生产要求。观察酶活衰减的主要原因是染菌造成, 如果将底物溶液过滤除菌后再通入酶柱, 估计使用周期还可延长。

收集流出产物进行浓缩和精制, 测得其产品旋光度为  $[\alpha]_D^{20} = +14.06^\circ$ , 符合美国药典 XX1 版<sup>[12]</sup>对 L-丙氨酸比旋度  $[\alpha]_D^{20} = 13.7^\circ \sim 15.1^\circ$  的要求。

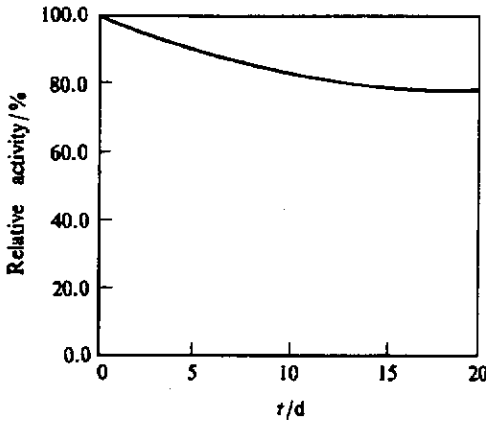


图 5 固定化细胞连续操作稳定性曲线

Fig. 5 Continuous resolution stability of immobilized cells

度下的直线规律表明固定化菌体细胞拆分 DL-Ala 反应符合米氏方程。并求出不同温度下的相应表观动力学参数, 如表 3 可以看出, 随着温度升高,  $V_m$  增大,  $K_m$  也增大, 说明温度升高对 E·S 解离速率的影响程度大于对其生产速率的影响。

#### 4 结 论

米曲霉菌体 3042 采用液体培养, 可制备出菌壁上含较高氨基酰化酶浓度, 直径为 1~2mm 的菌球; 适宜的菌体细胞的固定化条件为: 每克湿菌体所用的 8ml 固定液中, 含 2% 明胶, 0.5% 甲醛, 固定化时间 1.5h。制备出的固定化菌体细胞酶活约为 700u/g, 酶活保留率约为 71%; 底物浓度大于 0.15mol/L 时, 拆分反应有底物抑制现象, 小于 0.15mol/L 浓度时底物抑制现象不明显, 此时拆分反应可用

### 3 拆分反应动力学方程

通常酶促反应多采用 Michaelis-Menten 方程表达<sup>[13]</sup>

$$r_p = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S}$$

式中  $r_p$  为反应速率/mmol. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>; S 为底物浓度/mmol. L<sup>-1</sup>;  $V_m$  为拆分反应所能达到的最大反应速率/mmol. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>;  $K_m$  称为米氏常数/mmol. L<sup>-1</sup>。

将该方程变形得到

$$\frac{1}{r_p} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S} \quad (2)$$

将上述测定的无底物抑制时的动力学数据代入方程 (2), 结果如图 6。不同温

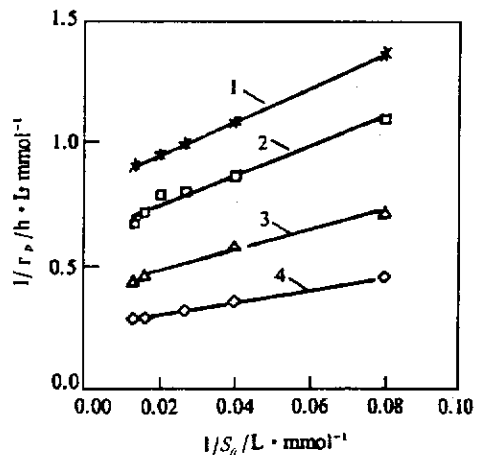


图 6  $1/r_p - 1/S_0$  关系曲线

Fig. 6 The curve for  $1/r_p - 1/S_0$   
(1-37°C; 2-45°C; 3-55°C; 4-65°C)

Michaelis-Menten 方程表达。在 37℃ 下低底物浓度时, 该拆分反应动力学方程为:

$$r_p = \frac{1.24S}{8.51 + S}$$

表 3 不同温度下表现动力学参数

Table 3 Parameters of apparent kinetics at different temperature

$t/^\circ\text{C}$	37	45	55	65
$K_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	8.51	9.56	10.5	10.3
$V_m/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	1.24	1.60	2.53	4.03

## 参 考 文 献

- [1] Tosa T, Mori T, Fuse N *et al.* Enzymologia, 1966, 31 (4): 214~224.
- [2] Tosa T, Mori T, Fuse N *et al.* Enzymologia, 1967, 32 (3): 153~158.
- [3] Tosa T *et al.* Agr Biol Chem, 1969, 33 (7): 1047~1059.
- [4] Watanabe T. Biotech Bioeng, 1979, 21: 477~486.
- [5] Synowiecki J, Sikorski Z E, Aczk M N, Bitoch Bioeng, 1982, 24: 1871~1876.
- [6] Wang D B, Li M Q, He H L. Biotech Appl Biochem. 1992, 16: 115~124.
- [7] 韩际宏, 姜 坪, 王道宾等. 离子交换与吸附, 1993, 9 (2): 107~113.
- [8] 李民勤, 王道宾, 周菊岩等. 离子交换与吸附, 1993, 9 (3): 199~203.
- [9] Amirkhanyan M M, Elanyan M F, Matevosyan R O. SU 1293173, 1987
- [10] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术, 北京: 高等教育出版社, 1982
- [11] 千畑一郎. 固定化酶, 石家庄: 河北人民出版社, 1981
- [12] 周俊山. 实用氨基酸手册, 无锡市氨基酸研究情报室, 1989: 327.
- [13] 山根恒夫. 生化反应工程, 西安: 西北工业大学出版社, 1992.

## Optical Resolution of DL-alanine by Using Immobilized *Aspergillus oryzae* Cells

Song Zhengxiao Li Xiaomin Wang Zheng Peng Ying

(Department of Chemical Engineering Tianjin University, Tianjin 300072)

**Abstract** The mycelium pellets with diameter of 1~2mm containing abundant aminoacylase were obtained by liquid fermentation of *Aspergillus oryzae* 3042. By cross linking method with reagents of gelatin and formaldehyde, the immobilized *Aspergillus oryzae* cells (IAC) were prepared with much high activity and reactive properties. The effects of factors on enzymatic activity of IAC were investigated. When substrate concentration was less than 0.15mol/L, Michaelis-Menten Mechanism was suitable for this reaction.

**Key words** Optical resolution, immobilization, *Aspergillus oryzae*, aminoacylase