

用明胶-戊二醛法固定大肠杆菌细胞生产L-天门冬氨酸

居乃琥 仇昌明 黄国英 马雯 金蕾

(上海市工业微生物研究所,上海)

我们选用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) AS 1.881 菌株,制备固定化大肠杆菌细胞,用于连续生产 L-天门冬氨酸,现报道如下。

材料和方法

一、材料

明胶为瑞士 Fluka AG 公司产品和上海明胶厂照相用明胶。二者无差别。戊二醛为 E. Merck 公司产品。反丁烯二酸为上海染料化工七厂产品。

二、菌种与培养

比较过 8 株大肠杆菌。其中 5F3 株,由上海味精厂提供,AS 1.881 菌由中国科学院微生物研究所菌种保藏室提供,其他菌株由本所菌种保藏组提供。

斜面培养基为普通牛肉汁培养基。摇瓶培养基(%) : 玉米浆 7.5,反丁烯二酸 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02。氨水调 pH6.0。煮沸后过滤,500ml

三角瓶装培养基 50ml。从新鲜斜面或液体种子接种于摇瓶培养基中。37℃ 振荡培养 24 小时。发酵液 4000 转/分离心 20 分钟,得湿细胞用生理盐水洗涤,离心备用。

三、天门冬氨酸酶活力的测定

(一) 天然游离细胞酶活力

取底物溶液 2ml (pH8.5 的 1M 反丁烯二酸铵溶液,含 1mM 的 Mg^{2+}) 加入试管内,37℃ 水浴中平衡,加入 0.5ml 大肠杆菌细胞悬液,反应 30 分钟后,置于沸水浴中 5 分钟以终止反应,用煮沸过的大肠杆菌细胞悬液代替活细胞悬液作为空白。取 0.2ml,4000 转/分离心后的反应液,参考 Straub 的方法^[1],用 0.1N 高锰酸钾滴定剩余的反丁烯二酸。空白和样品滴定值之差为反丁烯二酸的消耗量。按上述条件,每小时催化消耗 1 微克分子反丁烯二酸的酶量定义为一个酶活力单位^[2]。

(二) 固定化细胞酶活力

取含 0.25 克湿细胞的固定化大肠杆菌细胞

放入 50ml 三角瓶内, 37°C 水浴中平衡, 然后加入平衡过的底物溶液 20ml。混匀后立即吸取 0.2 ml 混合液作为空白对照。继续反应 20 分钟再吸取 0.2ml 反应液。空白与样品按上法用 0.1N 高锰酸钾滴定。滴定值的差值为反丁烯二酸的消耗量, 从而计算出固定化细胞的酶活力。

四、纸层析法

产品 L-天门冬氨酸的纯度用纸层析法鉴定。溶剂系统为正丁醇:冰乙酸:水 = 4:1:2^[3]。上行展开 10—11 小时。用 pH7.5 的 0.05% 溴酚蓝乙醇溶液显色。L-天门冬氨酸用 0.5% 的茚三酮溶液显色。

实验结果

一、各菌株天门冬氨酸酶活力的比较

在 8 株大肠杆菌中, 以 AS 1.881 菌产酶活力最高。一般水平为 94000—120000 单位/克。故用 AS 1.881 菌株作试验菌株。

二、大肠杆菌细胞的固定化方法

1. 明胶-戊二醛固定大肠杆菌细胞: 取 1 克湿菌体, 悬浮于 9ml 生理盐水中, 加入 10% 明胶溶液 10ml, 再加 1% 戊二醛溶液 1ml, 搅拌均匀放置后凝固, 再加入 0.25% 戊二醛溶液, 置于冰箱过夜。用刀切成边长 3mm 左右的小块, 再浸泡于原来的戊二醛溶液中, 冰箱中过夜。用蒸馏水充分洗涤, 滤干即得固定化细胞。

三、固定化条件的选定

1. 细胞浓度的影响: 取 1 克湿菌体分五份, 分别悬浮于不同体积的生理盐水中, 再按比例添加明胶溶液和戊二醛溶液。然后分别测定固定化细胞的酶活力。结果见表 1。

2. 明胶浓度的影响: 按前述方法, 取 1 克湿菌体分 3 份, 用不同浓度的明胶溶液(其浓度分别为 4%、5%、6%) 制备固定化细胞。然后测定其酶活力。结果说明, 随明胶浓度的增加酶活力回收率稍稍下降。但固定化细胞的机械

强度却逐渐增加。我们综合考虑, 将明胶溶液的终浓度控制在 5%。

表 1 细胞浓度对固定化细胞酶活力的影响

细胞浓度(湿菌体克/毫升固定化细胞)	项目	固定化细胞	
		酶表现活力(单位/克湿菌体)	酶活力回收率*(%)
0.066		54200	57.5
0.050		57440	60.9
0.033		61970	65.7
0.025		63670	67.5
0.016		66210	70.2
0.0125		63100	66.9

* 原细胞酶活力为 94320 单位/克。

3. 戊二醛浓度的影响: 取 1 克湿菌体分 3 份, 按同样条件制备固定化细胞, 但用不同浓度的戊二醛溶液, 其浓度依次为 0.5%、1.0%、1.5%。分别测定固定化细胞的酶活力。发现戊二醛浓度为 1.0% 时, 酶活力回收率最好。

四、固定化大肠杆菌细胞的性质

1. pH 对酶反应速度的影响: 我们比较了 pH 对大肠杆菌天然细胞和固定化细胞酶反应速度的影响。结果见图 1。

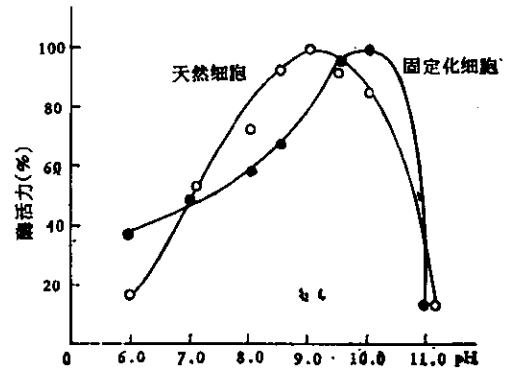


图 1 pH 对酶反应速度的影响*

*底物浓度为 1.0M, 用 NaOH 和 HCl 调节 pH。

结果表明, 其天然细胞的最适反应 pH 9.0, 固定化细胞的最适反应 pH 为 10.0。

2. 温度对反应速度的影响: 结果见图 2。

结果表明天然细胞的最适温度在 45—55°C, 固定化细胞的最适温度为 40°C。

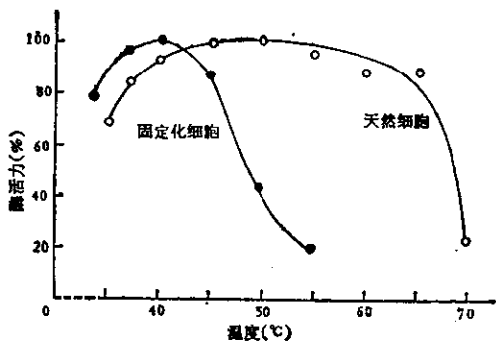


图2 温度对酶反应速度的影响

3. 二价金属离子对酶反应速度的影响: 利用含有 1mM 二价金属离子的底物溶液, 分别测定大肠杆菌天然细胞和固定化细胞的酶活力, 结果见表 2。

表 2 二价金属离子对酶反应速度的影响

名称	天门冬氨酸酶活力 (%) [*]	
	天然细胞	固定化细胞
Mg ²⁺	100	146
Ca ²⁺	98	139
Mn ²⁺	100	111
Zn ²⁺	100	96
Fe ²⁺	100	57
Co ²⁺	98	54
无离子	100	100

* 以无金属离子时的酶活力为 100%

结果表明 Mg²⁺、Ca²⁺ 和 Mn²⁺ 能提高固定化细胞的酶反应速度, Fe²⁺、Co²⁺ 则降低酶反应速度。

4. 底物对酶活力的活化作用: 将大肠杆菌天然细胞和固定化细胞分别悬浮于底物溶液中, 37°C 保温, 活化 1、2 天分别测定酶活力, 结果说明, 以保温前酶活力为 100%, 活化 1 天后天然细胞为 119%, 固定化细胞为 169%。活化 2 天后天然细胞为 136%, 固定化细胞为 187%。

5. 热稳定性: 将天然细胞和固定化细胞分别悬浮于生理盐水中。在不同温度下处理 30 分钟, 测定剩余的酶活力, 结果见图 3。

结果说明固定化细胞的热稳定性比天然细

胞差。

6. 保藏的稳定性试验: 结果发现, 天然细胞在 4°C 无论以何种方式保存, 酶活力均不下降。固定化细胞保存于 4°C 的底物溶液中, 或在生理盐水中酶活力变化不大。但在 20°C 或 30°C 保存酶活力有所下降。

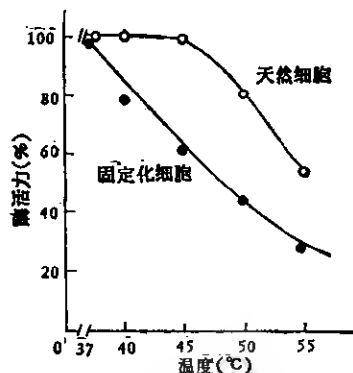


图 3 酶的热稳定性

五、利用固定化大肠杆菌细胞连续生产 L-天门冬氨酸

小型固定化细胞柱连续生产 L-天门冬氨酸, 结果表明每克湿菌体制得的固定化细胞产 L-天门冬氨酸 906 克。在中型固定化细胞柱连续生产 L-天门冬氨酸试验中, 每克湿菌体制得的固定化细胞产 L-天门冬氨酸 650 克。所得产品经纸层析法证明不含反丁烯二酸, 其 R_f 值与 L-天门冬氨酸标准品一致。结晶产品比旋光 $[\alpha]_D^{25} = +24.9-25.8$, 与文献报道一致^[3]。

讨 论

在制备固定化细胞时, 我们用的菌体细胞, 都采用转速为 4000 转/分的离心机分离。我们曾试用 10000 转/分冷冻高速离心机, 原 1 克菌体只有 0.9 克。如此计算, 小试验 (5 克湿细胞) 每克湿细胞的 L-天门冬氨酸的产量最高可达 1007 克 (30 天)。中型试验 (20 克湿细胞) 每克湿细胞的 L-天门冬氨酸产量为 722 克 (25 天)。

本法所用的戊二醛的浓度和添加量, 比一

般方法为低^[4,5]。由于戊二醛用量少, 交联不充分, 所以固定化细胞酶活力的回收率高, 成本低, 但稳定性较差, 使用寿命短。所以要适当增加戊二醛的用量。

明胶-戊二醛固定法操作简便, 所需试剂数量少, 固定化成本低。由于固定化细胞的机械性能良好, 有利于装柱连续操作, 但目前的生产能力稍低于琼脂凝胶包埋法。

参 考 文 献

- [1] Straub, F. B., *Hoppe-Seyler's E. Physiol. Chem.*, **236**: 42, 1935.
- [2] Chibata. I., et al.: *Appl. Microbiol.*, **27**: 878, 1974.
- [3] 孟广震、杨廉婉等: *微生物学报*, **18**: 39, 1978.
- [4] 王庆诚等: *生物化学与生物物理学报*, **12**: 305, 1980.
- [5] 中国科学院上海生物化学研究所固相酶组等: *生物化学与生物物理进展* (2): 65—67, 1980.