

中空纤维膜反应器转化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸

董学伟 张春枝 金凤燮

(大连轻工业学院生物与食品工程学院 大连 116034)

摘要 采用中空纤维膜反应器 利用假单胞菌 *P. dacunhae* DQ-p1 转化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸 最适 pH6.0 最适温度 30℃ EDTA 和 Tween-80 对细胞产酶有促进作用 游离细胞半衰期为 93 h。采用对流扩散式中空纤维膜反应器转化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸 转化率超过 90%。

关键词 中空纤维膜反应器 *L*-丙氨酸 假单胞菌 *P. dacunhae*

L-丙氨酸又名 *L*- α -氨基丙酸 常温常压下为白色粉末结晶 有特殊甜味 甜度约为蔗糖的 70% 其甜味生成机制符合 Shellenberger 学说^[1~3]。易溶于水 微溶于乙醇。其天然品存在于羊毛绢丝中。*L*-丙氨酸是组成蛋白质的氨基酸之一 为非必需氨基酸 但却是血液中含量最高的氨基酸 有着重要的生理作用。它可为转氨酶提供氨基供体 在临床上常用于输液等。

在食品工业中 *L*-丙氨酸具有较好的甜味和鲜味 可以强化调料的调味效果 改善人工调味剂的味觉 提高腌制效果 还可以与糖加热生成特殊香味物质^[4]。在一些发达国家 凡是中高档的饮料、发酵食品、调味品中都加入一定量的 *L*-丙氨酸来提高其质量和风味。而且人们发现 以 *L*-丙氨酸甲酯取代 *L*-苯丙氨酸合成的甜味剂 其成本和稳定性都优于 Aspartam^[5]。

丙氨酸的生产有化学合成法、丝蛋白水解提取法^[6]、发酵生产法和利用 *L*-天冬氨酸 β -脱羧酶的酶法。本文选用中空纤维膜反应器利用假单胞菌 *P. dacunhae* DQ-p1 所产的 *L*-天冬氨酸 β -脱羧酶转化 *L*-天冬氨酸生产 *L*-丙氨酸。

中空纤维膜以其良好的工程性能而被广泛采用^[7~9]。本文采用中空纤维膜反应器转化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸 由于膜可以截留细胞 既省去了固定化操作 又保留了固定化细胞的各项优点^[10]。

1 材料和方法

1.1 菌种

Pseudomonas dacunhae DQ-p1 自行筛选。

1.2 培养基

斜面培养基:蛋白胨 0.25% ;牛肉膏 0.25% ;酵母膏 0.25% ;NaCl 0.5% ;琼脂 2.2%。氨水调 pH 值 7.0。

种子液培养基:蛋白胨 0.25% ;牛肉膏 0.25% ;酵母膏 0.25% ;NaCl 0.5%。氨水调 pH 值 7.0。

发酵培养基:谷氨酸 1% ;反丁烯二酸 0.5% ;玉米浆 1% ;KH₂PO₄ 0.05% ;MgSO₄ · 7H₂O 0.01%。氨水调 pH 值 7.2。

1.3 主要试剂和仪器

主要试剂:2,4-二硝基氟苯 金山化工厂;吐温-80 大连旅顺化工厂;丙酮酸钠 华美生物工程公司;乙二胺四乙酸二钠 北京化工厂。

主要仪器:聚砜类中空纤维膜反应器[膜外径 1 mm;内径 0.6 mm;孔隙率 60% ~ 70%;截留分子量(5 ~ 7) × 10⁴ u;反应器体积 6.46 mL] 大连化物所制;HPLC638-50 HITACHI 公司;色谱柱 C-18 柱;记录仪 HITACHI-056;超级恒温水浴 上海实验仪器厂;恒温水浴振荡器 上海医疗器械厂;LXJ-II 离心机 上海医用分析仪器厂;LDZ4-08 自动平衡微型离心机 北

京医用离心机厂,SYB-D 精密蠕动泵,WLB-78-C 型电子微量泵 浙江新昌国康仪器厂。

1.4 *P. dacunhae* DQ 菌体的培养

P. dacunhae DQ 斜面活化采用 30℃ 静止培养 24 h,然后接种到种子培养基中,恒温摇瓶机上 30℃ 培养 8 h,再接种到发酵培养基中,采用 30℃ 摇瓶培养 22~24 h。

1.5 菌体收集

发酵液经 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,生理盐水洗涤 2 次。

1.6 菌体浓度的测定^[11]

采用比色法。将发酵液稀释适当倍数于 650 nm 波长下测 OD 值。

1.7 分析方法

采用柱前衍生生化法测定氨基酸含量。衍生化依据:在弱碱溶液中,氨基酸的氨基与 2,4-二硝基氟苯作用生成 2,4-二硝基苯氨基酸(DNP-Aa),该衍生物在 360 nm 处有最大光吸收。

1.8 衍生方法

反应液 1 mL(1 mol/L 氨基酸)→稀释 200 倍→取 1 mL→加 1 mL 0.5 mol/L pH 9.0 NaHCO₃ 缓冲液,1 mL 1% 2,4-二硝基氟苯(甲醇溶液)→60℃ 避光反应 1 h→加 7 mL pH 7.0 K₂HPO₄-NaOH 缓冲液即可。

1.9 测定方法

高效液相色谱条件:流动相,V(无水甲醇):V(0.06 mol/L 醋酸缓冲液(pH 6.45))=1:1;流速,1 mL/min 纸速,5 mm/min 柱温,室温 压力,500 kg/cm² 检测波长,360 nm。

1.10 酶催化反应速度测定

配制一定浓度底物,加入一定量菌体反应一定时间,取出灭活(80℃ 以上 5 min)。冷却、离心、取上清液,稀释 200 倍。1 mL 样品溶液加入 0.5 mol/L pH 9.0 NaHCO₃ 缓冲液 1 mL,1% 2,4-二硝基氟苯(甲醇溶液)1 mL 衍生。分析结果由标准曲线查出 L-丙氨酸的量,作出 L-丙氨酸-时间关系图,曲线的切线斜率即为酶催化反应速度。

2 结果与讨论

2.1 中空纤维膜反应器反应系统的设计

反应器结构设计如图 1。将中空纤维膜封入玻璃器内,膜将反应器分割成内外两腔。



图 1 中空纤维膜反应器的结构

A—菌悬液 B—底物天冬氨酸

中空纤维膜反应器反应系统如图 2。以对流循环模式操作,采用浓集态对流扩散控制。将转化好的菌悬液泵入膜反应器的外腔(0.53 L/h),50 mL 0.5 mol/L-天冬氨酸(0.5 mmol/L 辅酶)泵入内腔(0.48 L/h)。细胞借助膜的截留固定化在膜表面。底物与膜表面的细胞接触反应后透过膜回到底物容器,反复循环,直到 L-天冬氨酸完全转化成 L-丙氨酸。

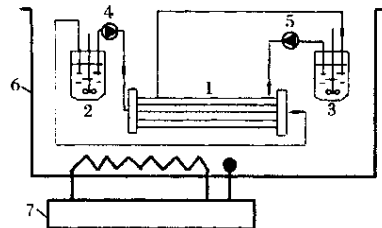


图 2 对流扩散式中空纤维膜反应系统

1—中空纤维膜反应器 2—底物容器;

3—菌悬液 4—电子蠕动泵 5—精密蠕动泵;

6—恒温水浴槽 7—加热器

2.2 pH 对 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞酶活力的影响

测定 pH 对细胞酶活力结果见图 3。图中看出 pH 值越低,酶活力越高。但在实际操作中,如果不依靠无机酸(盐酸)调 pH 值,在可溶前提下,配出的天冬氨酸溶液的 pH 很难达到 5.5。从实验控制可行性确定 pH 6.0 为最适 pH。

2.3 温度对 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞酶活力的影响

测定温度对细胞酶活力影响结果见图 4。从图 4 中看出,30℃ 为最适温度。

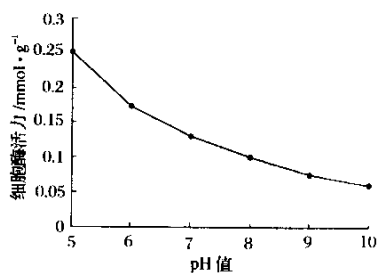


图 3 pH 值对细胞酶活力的影响

0.5 mol/L-Asp 0.1 mmol/L PLP 30℃

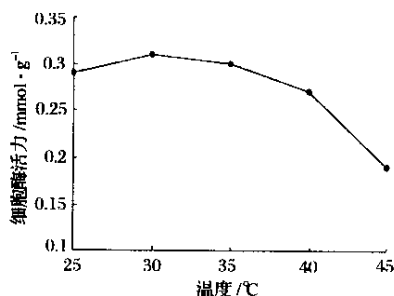


图 4 温度对细胞酶活力的影响

0.5 mol/L-Asp 0.1 mmol/L PLP pH 6.0

2.4 磷酸吡哆醛(PLP)浓度对 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞酶活力的影响

磷酸吡哆醛作为 *L*-天冬氨酸-β-脱羧酶的辅酶直接参与催化反应。其作用机理是磷酸吡哆醛与 *L*-天冬氨酸结合形成一种西佛碱,使 *L*-天冬氨酸易于脱羧。但由于其价格昂贵,因此本实验研究了磷酸吡哆醛添加浓度对酶活力的影响,旨在少用或不用辅酶进行生产。测定磷酸吡哆醛对细胞酶活力影响结果见图 5。图 5 中看出,辅酶量从 0.1 mmol/L 增至 0.5 mmol/L 酶活力明显增大,增至 1 mmol/L,酶活变化不大。确定 0.5 mmol/L 为最适辅酶量。

2.5 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)对 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞酶活力的影响

EDTA 能够使革兰氏阴性菌细胞外膜上的脂多糖释放出来,从而增加了细胞通透性,胞内酶容易释放出来,加快了反应速度。测定 EDTA 对细胞酶活力影响结果见图 6。

2.6 吐温-80(Tween-80)对 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞酶活力的影响

由于 Tween-80 是非离子型界面活性剂,反

应中加入少量 Tween-80,改变菌体壁和膜的通透性,提高了底物和产物在细胞内外的传递速度,可使低水溶性底物易于被细胞或酶所作用。测定 Tween-80 对细胞酶活力影响结果见图 7。

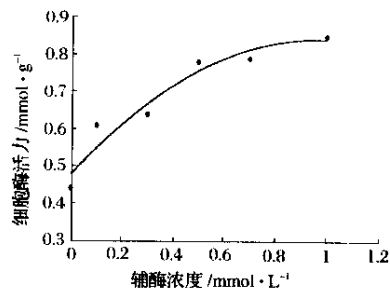


图 5 辅酶对细胞酶活力的影响

0.5 mol/L-Asp pH 6.0 30℃

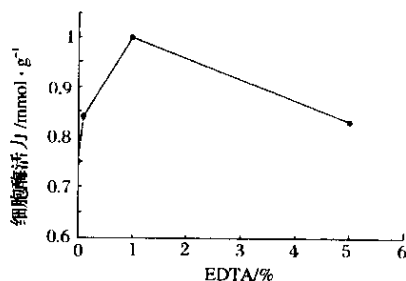


图 6 EDTA 对细胞酶活力的影响

0.5 mol/L-Asp 0.1 mmol/L PLP pH 6.0 30℃

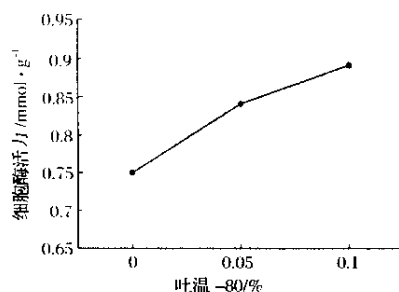


图 7 吐温-80 对自由酶活的影响

0.5 mol/L-Asp 0.25 mmol/L PLP pH 6.0 30℃

2.7 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞的半衰期

测定 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞的半衰期,结果见图 8。图 8 中显示 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞的半衰期为 93 h。

2.8 中空纤维膜反应器酶催化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸

采用反冲式操作,由于细胞自溶易堵膜孔,

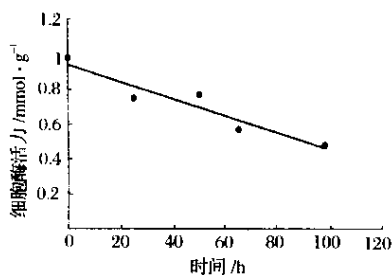


图 8 *P. dacunhae* DQ-p1 细胞半衰期
0.5 mol/L-Asp 0.5 mmol/L PLP pH6.0 30℃

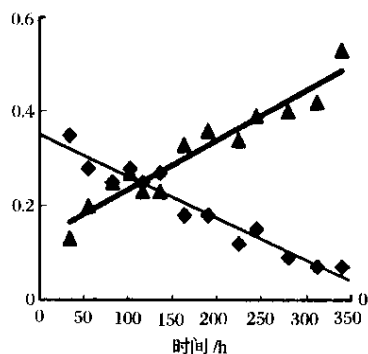


图 9 对流式中空纤维膜反应器浓度变化曲线

8g cells/50 mL 底物 0.5 mol/L Asp ,
0.5 mmol/L PLP pH6.0 30℃

使膜透量迅速下降,不适于游离细胞。所以采用对流循环式,为浓集态、对流扩散控制。转化反应曲线见图 9。0.5 mol/L Asp(0.5 mmol/L PLP)50 mL 经 5 h 基本转化为 *L*-Ala 转化率 > 90%。

3 结 语

P. dacunhae DQ-p1 细胞酶转化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸最适 pH6.0,最适温度 30℃,辅酶浓度 0.5 mmol/L,EDTA 和 Tween-80 对细胞产酶有促进作用,游离细胞半衰期为 93 h。采用对流扩散式中空纤维膜反应器转化 *L*-天冬氨酸生成 *L*-丙氨酸 转化率超过 90%。

参 考 文 献

- 1 Shellenberger R S. Nature ,1967 216 480
- 2 沈 同,王镜岩.生物化学.北京:高等教育出版社,1990.78~85
- 3 于信令,林云芬.食品添加剂检验方法.北京:轻工业出版社,1992.167
- 4 凌关庭,王亦筠,唐述潮.食品添加剂手册.北京:化学工业出版社,1989.19~20
- 5 曾广杜,魏诗泰.食品与发酵工业,1980(5):41~48
- 6 奥特金森 B,马维图纳 F.生化工程与技术手册.北京:科学出版社,1992.279
- 7 Prazeres D M, Cabral J M. Enzyme Microb. Technol. ,1994,16:738~750
- 8 Sims K A, Cheryan M. Biotechnol. Bioeng. ,1992,36:960~967
- 9 时国栋,虞星矩,袁 权.化工学报,1992,44(2):151~154
- 10 王保国,蒋维钧.化工进展,1994(2):39~42
- 11 周德庆.微生物学实验手册.上海:上海科学技术出版社,1986.85

Production of *L*-Ala from *L*-Asp by Hollow Fiber Membrane Reactor

Dong Xuewei Zhang Chunzhi Jin Fengxie

(College of Bio. & Food Technology ,Dalian Inst. of Light Ind. ,Dalian ,116034)

ABSTRACT The production of *L*-Ala by *Pseudomonas dacunhae* DQ-p1 from *L*-Asp in hollow fiber membrane reactor was studied. The optimum pH of the cell was 6.0 and the optimum temperature was 30℃. EDTA and Tween-80 increased the enzyme production in free cell. The half-life of the cell was 93h. In the production of *L*-Ala by the hollow fiber membrane reactor, the conversion rate was over 90%.

Key words hollow fiber membrane reactor, *L*-alanine, *P. dacunhae*