

固定化大肠杆菌细胞生产 γ -氨基丁酸的研究

赵景联

(西安交通大学, 西安)

用海藻酸钙包埋法将大肠杆菌细胞制成固定化细胞, 与 1% 谷氨酸溶液进行间歇反应、连续搅拌式反应及连续柱式反应生产 γ -氨基丁酸。谷氨酸溶液用 0.2mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液调至 pH4.4, 温度 37℃。间歇反应在微生物多用培养箱旋转摇床上 120r/min 振荡反应, 每批反应 6h, 100% 的谷氨酸可转化为 γ -氨基丁酸。连续搅拌式反应在三角瓶反应器中进行, 以 6ml/h 的流速输入底物溶液, 输出反应液, 转化率达 85%。连续柱式反应在上部膨大、顶端开口的特殊柱反应器中进行, 控制流速 12ml/h, 95% 以上的谷氨酸可被转化成 γ -氨基丁酸。

关键词 固定化细胞; 大肠杆菌; γ -氨基丁酸

γ -氨基丁酸 (γ -氨基酪酸) 是一种临床上常用的药物。它可以降低人体的血氨, 可用来治疗各种类型的肝昏迷, 同时又被广泛地用于治疗各种脑疾病, 例如脑震荡, 脑血管障碍引起的记忆障碍, 语言障碍, 小儿智力发育不全等^[1]。目前国内采用化学合成法和酶法生产^[2]。根据谷氨酸脱羧酶能专一地催化 L-谷氨酸转化为 γ -氨基丁酸这一事实, 将含该酶的大肠杆菌细胞制成固定化细胞用于生产 γ -氨基丁酸。前文^[3,4]报道了固定化大肠杆菌细胞的制备方法, 生物化学性质及其固定化大肠杆菌细胞的稳定性等方面的工作。本文报道固定化大肠杆菌细胞催化 L-谷氨酸脱羧生产 γ -氨基丁酸的研究结果。

材料和方法

(一) 材料

大肠杆菌 (*E. coli*) 为西安味精厂提供。海藻酸钠 (国产分装, 上海化学试剂采购供应站 c.p)。戊二醛 E. Merck 公司产品, 上海试剂厂分装 25% 水溶液。玉米浆

为西安淀粉厂提供。其他试剂均为市售分析纯商品。

(二) 大肠杆菌细胞的培养和收集

培养基成分 (%): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 3.0, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.02, $FeSO_4$ 5ppm, 玉米浆 0.3, 6mol/L NaOH 调至 pH7.0, 37℃ 通气培养 20h。培养好的菌液置冷冻高速离心机 15000rpm, 0℃ 离心 10min, 倾去上清液, 用生理盐水 (无菌) 洗涤, 按上法重复处理, 即得湿的大肠杆菌细胞。

(三) 固定化大肠杆菌细胞的制备

称取海藻酸钠 4g 加入 100ml 热水, 混匀, 置高压灭菌锅, 1.0kg/cm² 灭菌 10min, 室温静置 2h, 至气泡消失。取大肠杆菌湿菌体 10g, 悬浮于 10ml 无菌生理盐水中、制成菌悬液。缓慢加入上述海藻酸钠溶液, 搅拌制成悬浮液。

将上述悬浮液用注射器以 9 号针头逐渐滴入 1000ml 0.2mol/L $CaCl_2$ 溶液中, 边注入边置电磁搅拌器搅拌, 即成珠状颗粒 (直径 3mm)。用 $CaCl_2$ 溶液浸泡 2h, 再

本文于 1988 年 4 月 8 日收到。

本文承蒙兰天鹤教授、王子浩教授审阅, 谨致谢意。

在 0.05mol/L , CaCl_2 配制的 200ml 0.05% 戊二醛溶液中搅拌浸泡 2h , 用蒸馏水多次洗涤抽干, 得湿重固定化细胞 60g , 浸入 $\text{pH}4.4$ 醋酸-醋酸钠缓冲液中放入冰箱备用。

(四) 谷氨酸脱羧酶催化反应的测定

1. 测压法: 采用瓦氏呼吸仪测定。

在反应瓶主室中加入 1.8ml 0.2mol/L , $\text{pH}4.4$ 的醋酸-醋酸钠缓冲液, 0.2ml 待测液; 侧室中加入 2% 谷氨酸脱羧酶丙酮粉液 0.5ml , 固定于检压计上, 放入 37°C 恒温水浴中振荡反应, 经平衡、读数 h_2 等过程, 即得出计算所需数值。

$$\text{转化率}(\%) = \frac{\gamma\text{-氨基丁酸}}{\text{反应前谷氨酸总量}} \times 100\%$$

2. 纸层析法: 用来定性鉴定反应产物和 γ -氨基丁酸的纯度。展层剂: 正丁醇: 95% 乙醇: 乙酸: 水 = $4:1:1:2$; 显色剂: 0.5% 茚三酮溶液。

(五) 影响间歇式反应生产 γ -氨基丁酸因素的测定

在 0.2mol/L , $\text{pH}4.4$ 醋酸-醋酸钠缓冲液配制的 1.0% 50ml 谷氨酸溶液中加入 0.6g 固定化细胞(或相当于 0.6g 固定化细胞的自然细胞), 37°C , 120r/min 反应条件下, 测定 γ -氨基丁酸的产率。

实 验 结 果

(一) 间歇式反应生产 γ -氨基丁酸

1. 温度对 γ -氨基丁酸生产的影响: 研究了温度对固定化细胞生产 γ -氨基丁酸的影响, 将其与自然细胞作了比较。结果表明, 固定化细胞生产 γ -氨基丁酸的最适温度为 37°C , 自然细胞的最适温度为 35°C (表1)。

2. pH 对 γ -氨基丁酸生产的影响: 研究了 pH 对固定化细胞生产 γ -氨基丁酸

的影响, 将其与自然细胞作了比较。结果表明, 固定化细胞生产 γ -氨基丁酸的最适 pH 为 4.4 , 自然细胞的最适 pH 为 4.8 (表1)。

3. 底物浓度对 γ -氨基丁酸生产的影响: 在固定化细胞生产 γ -氨基丁酸的反应中, 一方面要使底物反应完全, 提高转化率; 另一方面又要尽量增大底物浓度, 提高产率。因此需要寻找最适底物浓度。结果表明, 自然细胞转化率达 100% 时的底物浓度为 1.5% , 固定化细胞转化率达 100% 时的底物浓度为 1.0% (表1)。

4. 固定化细胞量对 γ -氨基丁酸生产的影响: 用 $\text{pH}4.4$ 的醋酸-醋酸钠缓冲液配成 1% 谷氨酸溶液 50ml , 分别加入不同量的固定化细胞, 在 37°C 振荡反应 6h , 结果表明, 该反应体系中, 固定化细胞的最适量为 0.6g (酶活力单位为 4600u/g)(表1)。

5. 搅拌条件对 γ -氨基丁酸生产的影响: 间歇分批式反应在旋转摇床上进行, 这样可同时进行多个样品条件的试验, 同时也易控制搅拌速度。实验中发现, 在相同条件下, 随着转速的加快, 完成反应所需的时间就越短, 但由于转速加大对固定化细胞机械强度的影响也增大, 使反应次数相应地减少。因此, 在保证固定化细胞的稳定性前提下, 结果表明, 120r/min 转速较为理想(表1)。

6. 固定化细胞制备 γ -氨基丁酸: 取 3g 固定化细胞, 置于 250ml 三角瓶内, 加入 100ml 底物溶液($\text{pH}4.4$, 含 1.0% 谷氨酸)于 37°C , 120r/min 旋转振荡反应。待反应完全后, 即将反应液倒出, 再加入新的底物溶液, 继续反应。如此反复使用, 每次结束后测定剩余谷氨酸, 计算转化率。图1结果表明, 随着反应次数的增加, 转化率也随之下降, 这主要是由于辅

表 1 影响间歇式反应生产γ-氨基丁酸的因素
Table 1 Effect of different factors on batch production of γ-aminobutyric acid

影响因素 Factors	温 度 (℃)	pH	底物浓度 Substrate conc. (%)	固定化细胞量 Weight of imm- obilized cell (g)	搅拌条件 Stir spec (r/min)
细胞类型 Cell types					
自然细胞 Native cell	35	4.8	1.5		
固定化细胞 Immobilized cell	37	4.4	1.0	0.6	120

酶的漏失所造成的。实验以微量辅酶-底物保温进行再生处理^[5]。具体方法是：用pH6.0, 0.05mol/L CaCl₂ 溶液配成0.05mmol/L 磷酸吡哆醛或盐酸吡哆辛和2.5mmol/L 谷氨酸的再生溶液。处理时，先将辅酶与谷氨酸溶液混合37℃保温15min，加入固定化细胞于37℃再保温2h，过滤固定化细胞并用蒸馏水反复洗涤抽干，滤出的再生溶液可反复回收多次使用。图1结果表明，经过辅酶再生处理后，转化率即可恢复到100%。每经催化反应5批后进行辅酶再生，连续8次γ-氨基丁酸生产率维持不变。因此，只要载体机械强度能承受反复处理，则催化反应后的固定化细胞通过辅酶的再生可长期使用。

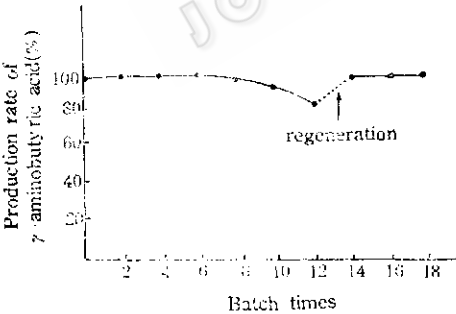


图1 固定化细胞间歇生产γ-氨基丁酸的稳定性
Fig. 1 Stability of immobilized cells for batch production of γ-aminobutyric acid

(二) 连续搅拌式反应制备γ-氨基丁酸

1. 装置和方法：采用图2所示的装置，进行了用固定化细胞连续搅拌反应制备γ-氨基丁酸的研究。预先在500ml 三角

瓶中装入反应溶液和固定化细胞。将三角瓶置于电磁搅拌器上，恒温搅拌反应，反应贮备液于37℃恒温水浴中保温。通过电子微量泵分别控制输入及输出溶液的流速。反应流出液收集于一瓶中，测定反应流出液的γ-氨基丁酸的转化率，通过电子微量泵调节流速。

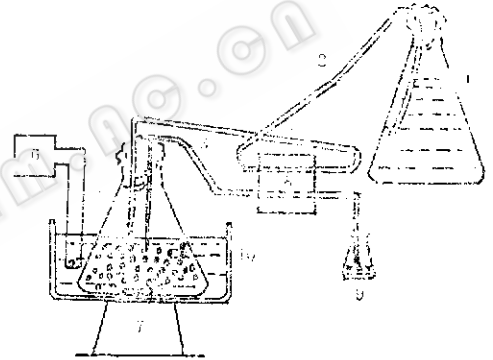


图2 连续搅拌式反应装置

Fig. 2 Flask continuous reaction device

1. 反应贮液 Reaction store solution 2. 传递管 Transport pipe 3. 输出管 Output pipe 4. 输入管 Input pipe 5. 反应器 Reaction flask 6. 温度调节器 Temperature regulator 7. 电磁搅拌器 Electromagnetic stirrer 8. 电子微量泵 Micropump 9. 输出液 Output solution 10. 恒温水浴 Constant temperature bath

2. 底物溶液的流速与γ-氨基丁酸生成的关系：按照上述装置及方法，底物溶液以不同的流速输入及输出，进行连续反应制备γ-氨基丁酸。底物溶液的输入流速与流出液中γ-氨基丁酸含量的关系如图3所示。由图看出，当含有0.05mmol/L 磷酸吡哆醛，0.1%CaCl₂，1% 谷氨酸的底物反应液，以流速6ml/h 输入反应瓶时，可将底物中的谷氨酸100%的转化成 γ-氮

基丁酸。

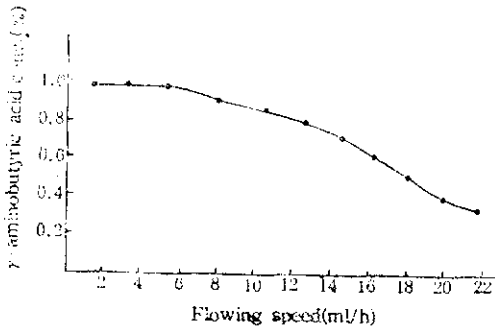


图3 底物溶液流速与 γ -氨基丁酸生成的关系
Fig. 3 Effect of substrate solution flow rate on the production of γ -aminobutyric acid

3. 利用固定化细胞连续搅拌式反应生产 γ -氨基丁酸: 取20g 固定化细胞(相当于3g自然细胞)置三角瓶反应器中, 加入100ml反应底物溶液, 于37℃搅拌反应。待反应瓶中的溶液反应至6h, 开动电子微量泵, 以6ml/h 流速输入底物溶液, 同时输出反应液, 进行连续转化反应。定时取样, 测定反应液中 γ -氨基丁酸的含量, 计算转化率。图4 结果表明, 在实验连续反应792h, 收集反应液4752ml, 其转化率恒定在85%以上。

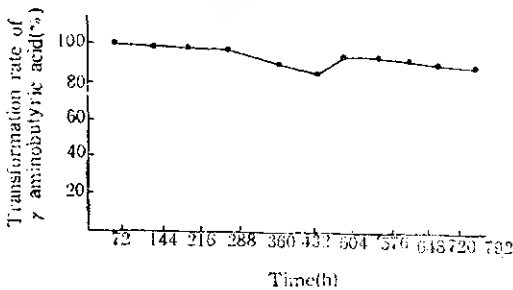


图4 固定化细胞连续反应的稳定性
Fig. 4 Stability of immobilized cells continuous reaction

(三) 利用柱式反应器连续生产 γ -氨基丁酸

1. 反应器的选择和装置: γ -氨基丁酸是由L-谷氨酸脱羧而得, 在反应过程中产生大量的 CO_2 气体, 因而在反应器中

经常产生塞流现象, 使流速很难控制^[6], 为了克服上述缺点, 我们比较了几种形式的反应器, 最后采用柱上端膨大, 并开有出气孔的柱反应器(图5), 使 CO_2 有了出路, 流速可通过微量泵控制, 将底物溶液上行流经反应柱。采用柱夹套恒温水保温。

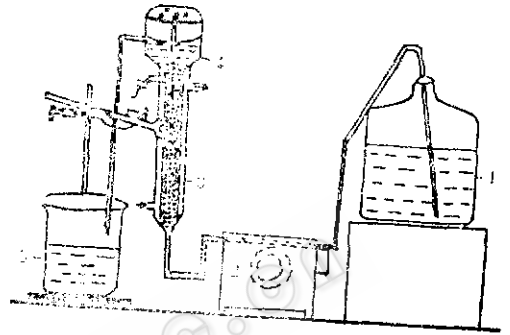


图5 连续柱式反应装置
Fig. 5 Column continuous reaction device
1. 反应贮备液 Reaction store solution 2. 电子微量泵 Micropump 3. 固定化细胞 Immobilized cells 4. 反应柱 Column 5. 反应产物溶液 Product solution

2. 底物溶液流速与 γ -氨基丁酸生产的关系: 按照上述装置和方法, 底物溶液以不同的流速通过反应柱, 进行连续反应制备 γ -氨基丁酸。底物溶液的流速与 γ -氨基丁酸含量的关系如图6所示。由图看出, 底物混合物以12ml/h 的流速通过反应柱时, 可将底物谷氨酸100%的转化为 γ -氨基丁酸。

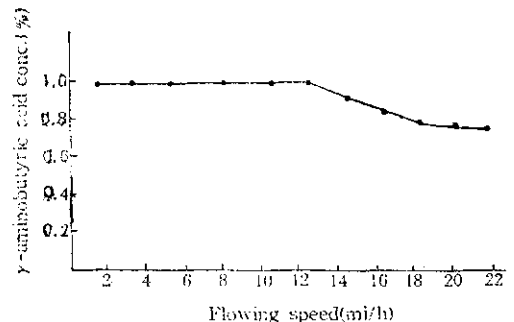


图6 底物溶液流速与 γ -氨基丁酸生产的关系
Fig. 6 Effect of substrate solution flow rate on the production of γ -aminobutyric acid

3. 利用柱式反应器连续生产 γ -氨基丁酸; 取由10g 湿细胞新制备的固定化细胞(150g), 经37℃活化后, 装入3×25cm的反应柱内(柱内固定化细胞体积 325ml), 用微量泵使底物溶液自下而上打入反应柱内。37℃循环恒温水浴通水柱夹套保温。定时取样测定反应液中 γ -氨基丁酸含量。根据转化率调节底物溶液的流速, 将转化

率控制在95%以上。底物溶液以12ml/h流速运转720h, 收集流出液8640ml。

将上述三种方法生产的 γ -氨基丁酸反应液经提取制备成 γ -氨基丁酸结晶, 经纸层析法证明产品不含有L-谷氨酸, 仅见 $R_f = 0.51$ 的斑点, 其 R_f 值与标准 γ -氨基丁酸一致。

参 考 文 献

- [1] 华东化工学院等; 生化药物, 上海科技出版社, P.43, 1984.
- [2] 广东省微生物研究所; 微生物学通讯, 3:1—6, 1978.
- [3] 王子浩、赵景联; 生物化学杂志, 4(4), 370—376, 1988.
- [4] 王子浩、赵景联; 陕西师大学报(自然科学版), 16(1):54—59, 1988.
- [5] 李永丰; 生物化学与生物物理进展, 33(3):55—58, 1980.
- [6] 居乃琥; 食品与发酵工业, PP.4, 11, 1984.

STUDIES ON PRODUCTION OF γ -AMINOBUTYRIC ACID BY IMMOBILIZED *ESCHERICHIA COLI* CELLS

Zhao Jinglian

(Xian Jiaotong University, Xian)

Whole cells of *E. coli* were immobilized by entrapping in a calcium alginate gel lattice followed by cross-linking with glutaric dialdehyde. Conditions for the production of γ -aminobutyric acid (GABA) were investigated comparing three methods: batch process, stir-continuous, and column-continuous.

The optimal pH and temperature for the production of GABA was 4.4 and 37℃, respectively. The batch process was operated on a rocker at 120r/min; stir-continuous reaction in a flask reactor at 6ml/h; column-continuous production in special column reactor at 12ml/h. About 85%—100% of L-glutamate was converted to GABA under suitable conditions. It was found that the column-continuous production has an advantage over others.

Key words

Immobilized cells; *Escherichia coli*; γ -aminobuty acid