

# 利用固定化酵母细胞转化反式肉桂酸生产 L-苯丙氨酸

储瑞葛 钱悦 李士云 陈佩颖 袁中一

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

**摘要** 研究了深红酵母(*Rhodotorula rubra*)的培养基成分、培养固定化及转化条件。实验表明最佳培养基成分(%):葡萄糖 0.5, 胰蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, 磷酸二氢钾 0.05, L-Phe 0.05, pH7.0, 30℃, 20L 发酵罐中培养 15~17h。最佳固定化条件为:用 2.5% 卡拉胶包裹 18% 的湿菌体。最佳转化条件为:1.0% 反式肉桂酸, 4mol/L 铵离子, pH10.5, 30℃。用卡拉胶固定化的深红酵母(*Rhodotorula rubra*)可以将 77.7% 的反式肉桂酸转化为 L-苯丙氨酸。

**关键词** 固定化深红酵母, L-苯丙氨酸, 反式肉桂酸,  $\kappa$ -卡拉胶

L-苯丙氨酸(L-Phe)是人体必需的 8 种氨基酸之一,是多种抗癌药物(如苯丙氨酸氮芥、对氟苯丙氨酸等)的重要原料和中间体,同时也是低热甜味剂(Aspartame)的主要原料之一。正是后者极大地刺激了 L-苯丙氨酸的生产及市场,世界市场从 1981 年的 50t, 提到 1990 年的 8000t 左右,十年间市场扩大了 160 倍<sup>[1]</sup>。据估计, L-苯丙氨酸潜在的世界市场每年在 4~5 万吨<sup>[1]</sup>。为了增加 L-Phe 的产量,已经研究了生物转化的方法,其中由 L-苯丙氨酸氨解酶(PAL)转化反式肉桂酸为 L-Phe 的反应被广泛利用。Bruce K. Hamilton<sup>[2]</sup>和 Christopher Thomas Evans<sup>[3]</sup>研究了深红酵母细胞(*Rhodotorula rubra*)中的 PAL,并用于生产。我国的 L-Phe 主要依赖于进口,为了达到自行生产的目的,国内有许多研究单位致力于生产 L-Phe 的研究,并已有采用细胞转化由反式肉桂酸(又称反式苯丙烯酸)或苯丙酮酸制备 L-苯丙氨酸的报道<sup>[4,5]</sup>。

本文选用了含有 L-苯丙氨酸氨解酶较高活性的深红酵母菌(*Rhodotorula rubra*)作为对象,研究了其发酵条件、固定化条件和转化条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器:美国 NBS, BioFlo IV 20L 发酵罐;752 紫外分光光度计,上海第三分析仪器厂。

1.1.2 试剂:反式肉桂酸(化学纯,北京化学试剂二厂);L-苯丙氨酸(生化试剂,上海东风生化试剂厂);钠型  $\kappa$ -卡拉胶(上海希伟生化制品有限公司);脱乙酰壳多糖(江苏农业大学);聚乙烯醇(PVA-124,上海化学试剂采购供应站试剂厂,进口分装);胰蛋白胨,酵母提取物,麦芽膏(Basingstoke, Hampshire, England);其余试剂均为分析纯。

发酵液中葡萄糖含量由蒋太文帮助测定。

本文于 1996 年 1 月 12 日收到。

**1.1.3 培养基:** 固体培养基(%): 麦芽膏 0.2, 胰蛋白胨 0.1, 葡萄糖 0.2, 琼脂 2, 0.1MPa 灭菌 20min。液体培养基(%): 葡萄糖 0.5, 胰蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, 磷酸二氢钾 0.05, L-苯丙氨酸 0.05, pH7.0, 0.1MPa 灭菌 20min。

## 1.2 方法

**1.2.1 反式肉桂酸的测定:** 在 278nm 处测定吸收值<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 转化能力的测定:** 游离细胞转化能力的测定: 将培养 18~20h 的酵母发酵液经 8000r/min 离心 10min 后得到的菌体用 0.02mol/L pH8.8 硼酸缓冲溶液悬浮洗涤 1 次, 离心后, 得湿菌体。称 0.2g 湿菌体至 10ml 锥形瓶中, 加 1ml 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 制成悬液, 加 2ml pH11.0, 4mol/L 铵离子和 1.5% 反式肉桂酸, 用 Parafilm 密封瓶口, 30℃ 振荡反应 2h, 4000r/min 离心 5min, 取上清测定反式肉桂酸的减少量。

固定化细胞转化能力的测定: 称 1g 固定化细胞于 10ml 锥形瓶中, 加 1ml 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2ml pH10.5 4mol/L 铵离子 1.5% 底物溶液, 密封瓶口, 30℃ 振荡反应 5h, 过滤, 取上清测定反式苯丙氨酸的减少量。

**1.2.3 固定化方法:** 卡拉胶固定化细胞: 称 2.5g 钠型 K-卡拉胶加 75ml H<sub>2</sub>O, 40℃ 搅拌溶解, 30℃ 保温; 取 18g 湿菌体加 7ml H<sub>2</sub>O 制成悬液, 30℃ 保温, 与预保温的卡拉胶混合均匀, 通过 8# 注射针头滴入 0.15mol/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中, 制成直径约 2mm 的颗粒, 4℃ 放置过夜; 用 0.1% 戊二醛溶液处理颗粒 30min, 使颗粒硬化。

脱乙酰壳多糖固定化细胞: 1.33g (或 2.5g) 脱乙酰壳多糖加 75ml 1% 冰醋酸溶液, 搅拌溶解; 取 18g 湿菌体加 7ml H<sub>2</sub>O 制成悬液, 与脱乙酰壳多糖溶液混合均匀, 通过 6# 注射针头滴入 2% pH9.2 焦磷酸钠溶液中, 放置 1h。

聚乙烯醇固定化细胞: 6g 聚乙烯醇加 75ml H<sub>2</sub>O, 80℃ 搅拌溶解; 18g 湿菌体加 7ml H<sub>2</sub>O 制成悬液, 与聚乙烯醇溶液混合均匀, 通过 8# 注射针头滴入 5% 硼酸溶液中, 制成直径约 2mm 的颗粒。

**1.2.4 培养基中葡萄糖含量的测定:** 用葡萄糖传感器测定, 参考文献[7]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基中有机营养成分对深红酵母的转化能力的影响

用正交实验对葡萄糖、胰蛋白胨和酵母提取物的 3 个水平(0.5, 1.0, 1.5%)进行了考察, 结果见表 1, 葡萄糖对转化的影响最大, 其次是酵母提取物, 最小是胰蛋白胨, 而且都是含量小较好。另外做了一组实验, 不加葡萄糖, 或不加胰蛋白胨, 或不加酵母膏, 其余两种含量为 0.5%, 结果是这 3 种成分缺任何一种, 所得菌量明显下降, 其中以葡萄糖对得菌量的影响最大, 不加葡萄糖所得菌量只有加 0.5% 葡萄糖的 50%。因此培养基的组成确定为(%): 葡萄糖 0.5, 胰蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, 磷酸二氢钾 0.05, L-苯丙氨酸 0.05, pH7.0。

### 2.2 发酵时间对菌的转化能力的影响

在 20L 的发酵罐中加入 14L 培养基, 以 3% 的接种量接入对数期的深红酵母, 30℃ 培养, 22h 终止发酵。从图 1 中可见, 19h 时菌体生长进入稳定期, 转化能力在生长到 15h 时

达以最大,17h 以后迅速下降;同时还观察了葡萄糖的变化,发现发酵到 15h 时,葡萄糖已被全部消耗。这也进一步说明葡萄糖的存在影响 PAL 的形成。

表 1 培养基中有机营养对酶活性影响的正交实验

Table 1 Orthogonal layout of effect of organic nutrients on enzyme activity

No.	Glucose/ %	Tryptone/ %	Yeast extract/ %	Conversion yield/ %
1	0.5	0.5	0.5	60.0
2	0.5	1.0	1.0	56.9
3	0.5	1.5	1.5	55.6
4	1.0	0.5	1.0	39.9
5	1.0	1.0	1.5	32.5
6	1.0	1.5	0.5	39.1
7	1.5	0.5	1.5	32.3
8	1.5	1.0	0.5	36.2
9	1.5	1.5	1.0	33.1
	$K_{0.5} = 172.5$	$K_{0.5} = 132.2$	$K_{0.5} = 135.0$	
	$K_{1.0} = 111.5$	$K_{1.0} = 125.6$	$K_{1.0} = 129.9$	
	$K_{1.5} = 101.6$	$K_{1.5} = 127.8$	$K_{1.5} = 120.4$	
Range	70.9	6.6	14.6	

Fermentations were carried out as 14L fed-batch fermentation in medium (%): glucose 0.5, tryptone 0.5, yeast extract 0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05, L-Phe 0.05, pH7.0, T 30°C

### 2.3 固定化方法的选择

选择了 3 种包埋材料,用 4 种方法进行固定化,以 1.5% 的反式苯丙烯酸为底物,分别进行了 5 批转化,结果(表 2)表明,用 2.5% 卡拉胶固定化的深红酵母细胞,转化率最高,稳定性最好。

### 2.4 反应时间对转化率的影响

从图 2 可以看出,游离细胞和固定化细胞的转化率随着转化时间的延长,达到最高转化率后就是开始下降。游离细胞在反应 5h 时转化基本上达到最高水平,40h 以后开始下降;固定化细胞在反应进行到 15h 时转化达到最高水平,之后就开始逐渐下降。

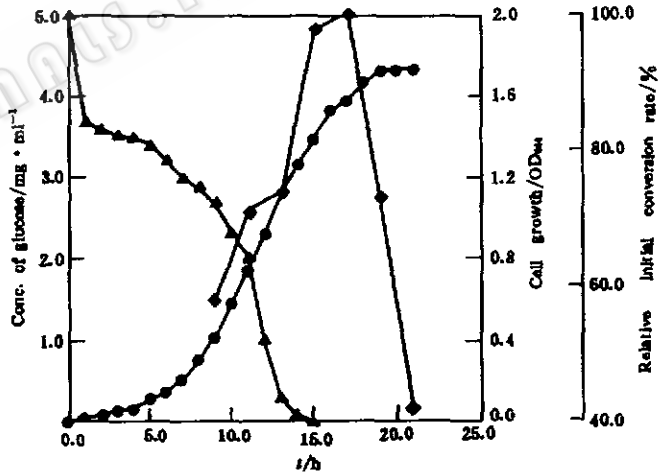


图 1 发酵时间对菌转化能力的影响

Fig.1 Effect of ferment time on conversion

- △- Concentration of glucose,
- Cell density,
- ◆- Relative initial conversion rate

[1] The conditions of culture were the same as Table 1.

[2] Reaction contained in 3ml:0.2g wet cells, 4mol/L  $\text{NH}_4^+$ , 1.0% trans-cinnamic acid, pH11.

Reactions were run at 30°C 2h.

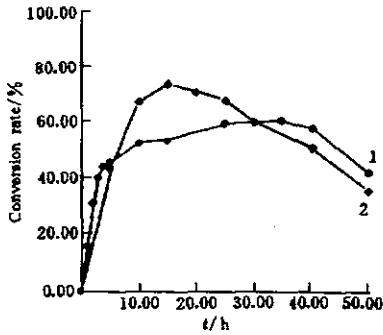


图2 反应时间对转化率的影响

Fig.2 Conversion of trans-cinnamic acid to L-Phe by *R. rubra* cells

[1]The reaction for free cells contained in 3ml; 0.2g wet cells, 4mol/L  $\text{NH}_4^+$ , 1.0% trans-cinnamic acid, pH11. Reactions were run at 30°C.

(●)

[2]The reaction for immobilized cells contained in 10ml; 0.2ml immobilized cells/ml, 4mol/L  $\text{NH}_4^+$ , 1.0% trans-cinnamic acid, pH10.5. Reactions were run at 30°C (■)

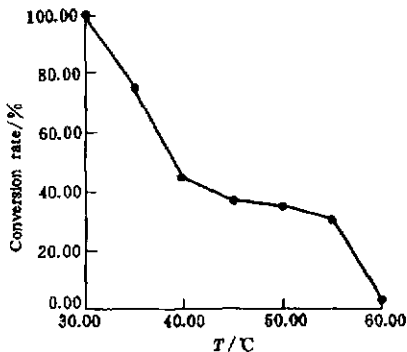


图3 热处理对 PAL 活性的影响

Fig.3 Effect of heat treatment on PAL activation

表2 固定化材料对转化率和酶的稳定性的影响

Table 2 Effect of immobilization material on conversion and stability

Rate/% No.	Material			
	PAV-124	Chitosan /1.33%	Chitosan /2.5%	Carrageenan /2.5%
1st. batch	59.0	31.0	63.3	74.0
2nd. batch	54.9	36.4	60.0	74.2
3rd. batch	52.8	38.8	57.8	77.7
4th. batch	65.1	40.0	49.6	77.7
5th. batch	62.3	36.8	48.3	70.3

Reaction contained in 10ml; 0.2ml immobilized cells/ml, 4.0ml/L  $\text{NH}_4^+$ , 1.0% trans-cinnamic acid, pH10.5. Reactions were run at 30°C 15.

## 2.5 温度对酶的稳定性的影响

将酵母细胞分别放在 30°C 至 60°C 6 种温度下保温 1h, 然后测定酶的转化能力, 发现温度对酶的稳定性的影响很大, 随着保温温度的提高, 酶的转化能力越来越低, 60°C 保温 1h, 转化能力几乎为零(图 3)。

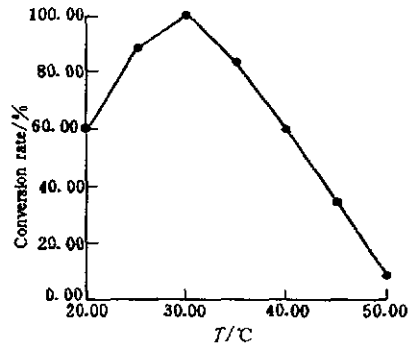


图4 温度对转化的影响

Fig.4 Effect of temperature on immobilized PAL conversion of trans-cinnamic acid into L-Phe

The reaction contained in 10ml; 0.2ml immobilized cells/ml, 4mol/L  $\text{NH}_4^+$ , 1.0% trans-cinnamic acid, pH10.5. Reactions were run at 30°C 5h.

## 2.6 影响转化的因素

2.6.1 温度对转化的影响:考察了固定化细胞在 20℃ 至 50℃ 不同温度下的转化速度,从图 4 可见最适温度为 30℃。

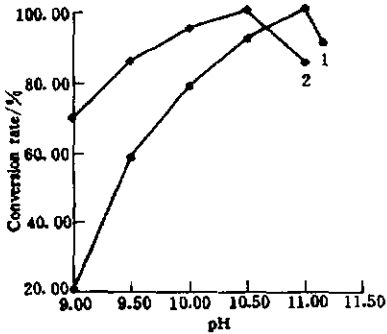


图 5 pH 对转化的影响

Fig. 5 Effect of pH on trans-cinnamic acid conversion to L-Phe

[1] The reaction for free cells were the same as Fig. 1

[2] The reaction for immobilized cells were the same as Fig. 4

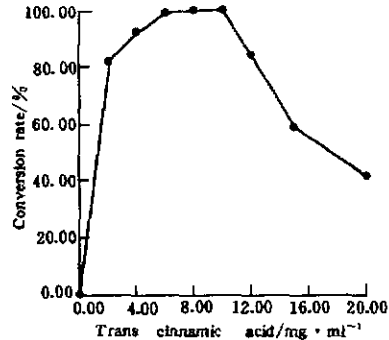


图 6 反式肉桂酸浓度对固定化深红酵母转化产生 L-苯丙氨酸的影响

Fig. 6 Effect of trans-cinnamic acid concentration on conversion to L-Phe by immobilized *R. rubra* cells

2.6.2 pH 对转化的影响:实验结果(图 5)表明, pH 对固定化细胞和游离细胞的影响是不同的,固定化细胞的最适 pH 在 10.5,游离细胞的最适 pH 为 11.0。

2.6.3 底物浓度对转化的影响:用固定化细胞对不同浓度的底物进行转化实验,结果(图 6)表明,当浓度大于 10mg/ml 时,过多底物对酶转化产生抑制效应。

2.6.4 铵浓度对转化的影响:铵离子作为反应的底物之一,增加其浓度应该有利于 L-Phe 的生成。用固定化细胞对不同铵离子浓度的底物进行转化,结果由图 7 可见,随着铵浓度的提高转化率也提高,但当铵浓度大于 4mol/L 后,转化率明显下降。显然,与红酵母 *Rhodotorula glutinis* 不同<sup>[4]</sup>。

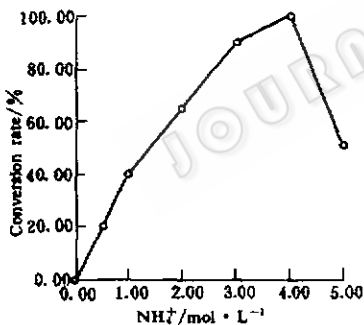


图 7 铵离子浓度对转化的影响

Fig. 7 Effect of  $\text{NH}_4^+$  concentration on trans-cinnamic acid conversion to L-Phe

深红酵母 (*Rhodotorula rubra*) 细胞中含有 PAL, PAL 的形成受培养基中葡萄糖的影响,但如果培养基中没有葡萄糖,菌体的生长则受到严重影响。在 pH9.0~11.5 的条件下, PAL 能催化反式肉桂酸转化为 L-Phe,但底物浓度大于 10mg/ml 时,过多的底物对酶转化产生抑制效应。PAL 对热敏感,热处理对酶活性产生不可逆的抑制。PAL 应用于生产的主要问题是细胞酶活性和稳定性的提高,我们准备用基因克隆和基因突变的手段来解决这两个问题。

## 参 考 文 献

- [1]姚振威. 食品与发酵工业, 1991, 1:87~90.
- [2]Bruce K H, Hung-Yu Hsiao, Wayne E S *et al.* Trends in Biotechnology, 1985, 3(3):64~68.
- [3]Christopher T E, Christin C, Peterson W *et al.* Journal of Industrial Microbiology, 1987, 2:53~58.
- [4]唐 铖, 陈 琦. 微生物学通报, 1989, 16(3):328~331.
- [5]杨顺楷, 李国川, 赵健身. 华西药学杂志, 1991, 1:44~47.
- [6]杨顺楷, 李果龙, 赵健身. 天然产物研究与开发, 1990, 2(1):59~62.
- [7]袁中一, 朱天民, 李士云等. 生物工程学报, 1989, 5(2):165~168.

### Biotransformation of Trans-cinnamic Acid to L-phenylalanine Using Immobilized Whole *Rhodotorula rubra* Cells

Chu Runai Qian Yue Li Siyun Cheng Peiying Yuan Zhongyi  
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academic Sinica, Shanghai 200031)

**Abstract** The biotransformation of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine has been studied using phenylalanine ammonia-lyase(PAL)-containing *Rhodotorula rubra*. The strains were grown and fully induced for PAL in medium containing: 0.5% glucose, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% L-Phe, pH7.0. Cultures were grown at 30°C in 20L fermenter and harvested after 15~17h growth. For immobilized *Rhodotorula rubra* cells, maximum conversion degrees were observed using in the trans-cinnamic acid concentration of 1.0%, 4mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$ . The optimum pH and temperature for conversion are 10.5 and 30°C. The best immobilized material and method was that 18% wet cell was immobilized in 2.5%  $\kappa$ -carrageenin solution. The  $\kappa$ -carrageenin immobilized *Rhodotorula rubra* cells could convert 77.7% trans-cinnamic acid to L-phenylalanine.

**Key words** *Rhodotorula rubra*, immobilized, L-phenylalanine, trans-cinnamic acid  $\kappa$ -carrageenin