

具有天门冬氨酸酶的大肠杆菌细胞固定化及其性质的研究

王连阳 方裕山*

(化工与生化工程系)

摘 要

本文研究用海藻酸钙凝胶固定大肠杆菌细胞催化反丁烯二酸铵制备L-天门冬氨酸的方法及其性质,并且测定了该催化反应的活化能。

一、前 言

固定化酶系指在一定空间内闭锁状态的酶,能连续地进行反应,反应后的酶可以回收并反复使用。工业上所用的酶源,以微生物酶最为适宜,微生物产生的酶有胞内酶和胞外酶。对于胞内酶,采用适当的方法,直接将微生物整体细胞固定化作为固体催化剂,这是酶制剂工业应用的一条捷径。因而,这一领域的研究越来越引起人们的重视^[1]。

L-天门冬氨酸在化工、医药和食品工业等方面有多种用途。特别是近年来,国际上掀起了生产天冬甜精**的热潮,其主要原料——天门冬氨酸的生产和研究更加重视^[2]。

1973年,日本曾经采用聚丙烯酰胺凝胶包埋法,制备了固定化大肠杆菌细胞,首次实现了柱式连续生产L-天门冬氨酸^[3]。我国在这方面也进行了不少研究:孟广震等曾采用琼脂凝胶包埋法制备固定化大肠杆菌细胞^[4];居乃琥等曾采用明胶-戊二醛包埋法制备了固定化大肠杆菌细胞^[5]。两种包埋法都先后进行过扩大试验,并小批量生产L-天门冬氨酸。

本文介绍用海藻酸钙凝胶包埋法固定大肠杆菌细胞催化反丁烯二酸铵转化为L-天门冬氨酸及其性质的研究。

二、材 料 与 方 法

(一) 主要材料 (1)海藻酸钠:上海化学试剂分装厂(化学纯);(2)无水氯化钙:江苏朱林化工厂(分析纯);(3)戊二醛:上海化学试剂采购供应站试剂厂(E·Merck进口分

本文1987年2月24日收到。

•参加本工作的还有王泓和郭振辉两同志。

••即天门冬酰胺-苯丙氨酸甲酯二肽,是一种低能量、甜度高的新型甜味剂。

装); (4)明胶: 上海化学试剂厂(化学纯); (5)反丁烯二酸: 上海试剂一厂(化学纯);

(二)菌种 大肠杆菌AS1.881突变株.

(三)培养基

1. 斜面培养基成分(%): 反丁烯二酸 1, 琼脂 2.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 用氨水调节pH至7.2.

2. 摇瓶培养基成分(%): 反丁烯二酸 1, 玉米浆 7.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 用氨水调节pH至6.0, 培养基煮沸过滤后, 于500ml锥形瓶中, 装入75ml滤液.

灭菌和培养按常规方法进行.

(四)固定化细胞的制备

培养液经4000r/min离心机离心20min, 弃去上清液, 滤渣用生理盐水洗涤并打散均匀, 重复离心15min, 弃去上清液即得大肠杆菌湿细胞, 放入生理盐水, 搅匀成悬浮液, 保存在冰箱备用.

按1g湿菌体: 2ml生理盐水: 6ml 5%海藻酸钠: 3ml 30%明胶: 15ml戊二醛的比例, 分别称取一定量的大肠杆菌湿菌体, 悬浮于生理盐水中, 加入海藻酸钠和明胶溶液, 调成均匀的浆糊状, 用5ml的针筒注入0.1% CaCl_2 溶液中进行钙化, 浆糊状物即成直径为2—3mm的微球状固定化细胞. 然后用生理盐水和少量的1%戊二醛溶液依次洗涤, 并用一定比例的1%戊二醛溶液, 在室温下浸泡1h, 过滤后, 再用生理盐水洗涤并浸泡于适量的生理盐水中, 放入冰箱备用.

(五)分析方法

采用高锰酸钾反滴定法测定反丁烯二酸的摩尔数.

(六)天门冬氨酸酶活力的测定

1. 自然细胞酶活力的测定: 分别吸取含0.05g湿菌体的大肠杆菌细胞悬浮液于两支反应管中. 其中之一先放入37℃水浴中平衡5min, 然后加入5ml平衡过的底物溶液, 搅拌反应5min, 另一支反应管同样放入37℃水浴中平衡5min, 如上加5ml底物溶液, 搅拌反应5min, 于是两支反应管同时取出. 用橡皮塞塞紧管口, 置于同一沸水浴中5min, 终止反应. 冷却后, 反应液在4000r/min离心机中, 离心20min, 上清液分别倒入两支试管中, 混匀后, 各吸取0.5ml, 按高锰酸钾反滴定法, 分析反丁烯二酸摩尔数. 由二者滴定结果计算可得, 反丁烯二酸在一定时间内的消耗量, 从而计算出天门冬氨酸酶的活力. 每小时催化1mM反丁烯二酸反应的酶量定为一个酶活力的单位.

2. 固定化细胞酶活力的测定: 称取含0.10g湿菌体的固定化细胞, 放在反应瓶中, 置于37℃水浴中平衡, 然后加入25ml预先在同一条件下平衡过的底物溶液, 搅拌2—3min之后, 立即吸取0.5ml反应液作为空白样, 继续反应, 每隔5min取样(0.5ml)一次(共取4个样), 空白和样品按上述方法测定反丁烯二酸的摩尔数, 从而计算固定化细胞的酶活力.

酶催化反应动力学表明, 反应速度随着时间的延长会越来越慢, 如果以产物的浓度对反应时间作图, 只有在反应初期, 曲线才近似于直线, 因此, 在底物大大过量的情况下, 测定反应的初速度来表示酶活力. 为了减小误差, 这里, 以反应时间为自变量, 底物的消耗为应变量, 从几个数据组进行一元线性回归, 所得直线的斜率, 除以湿细胞重量, 即为酶的表现比活力(mM/g湿细胞·h).

三、实验结果

(一) 固定化细胞制备的最适条件

1. 细胞浓度对活性的影响:

称取几份不同重量的湿菌体, 分别悬浮于 1 ml 生理盐水中, 制成不同浓度的细胞悬浮液, 尔后, 按比例加入 5% 的海藻酸钠和 3% 的明胶溶液, 按上述方法, 制成固定化细胞, 其活力测定结果见表 1.

表 1 细胞浓度对表观比活力的影响

湿细胞 浓度(g/g)	海藻酸钠 (ml)	明胶 (ml)	湿细 胞(g)	固定化细胞比活力 (单位/g湿细胞)
0.133	3	1.5	0.750	4.077×10^4
0.112	3	1.5	0.625	4.719×10^4
0.0906	3	1.5	0.500	5.465×10^4
0.0704	3	1.5	0.375	5.315×10^4

从表 1 所得结果, 选用湿细胞浓度为 0.0906g (湿细胞) / g (固定化细胞).

2. 海藻酸钠浓度对活性的影响:

称取几份同样重量的菌体, 分别加入不同浓度的海藻酸钠溶液, 其它步骤同上, 制得固定化细胞, 测定其活性并观察其机械强度, 实验结果见表 2.

表 2 海藻酸钠浓度时表观比活力的影响

海藻酸钠浓度 (%)	4	5	6	7
固定化细胞表观比活力(单位/g湿细胞)	53450	49190	47590	46980

由表 2 可见, 随着海藻酸钠浓度的减小, 固定化细胞表观活力有升高的趋势. 但是, 实验过程曾多次发现, 随着海藻酸钠浓度减小, 固定化细胞容易破碎, 机械强度降低. 为此综合考虑, 初步选用 5% 的海藻酸钠溶液, 其最佳值有待进一步的实验确定.

(二) 固定化细胞的性质

1. pH 对反应速度的影响:

配制不同 pH 的 1M 反丁烯二酸溶液, 在 37℃ 下, 分别按上述方法测定自然细胞和固定化细胞的比活力, 其结果描绘于表 3. 表 3 表明: 自然细胞酶催化反应的最适 pH 为 9.0, 而固定化细胞最适 pH 为 9.5.

2. 温度对反应速度的影响:

以 1M 反丁烯二酸 (pH 8.5, 含 1 mM Ca^{2+}) 为底物, 按上述相同方法, 测定不同的反应温度对酶催化反应速度的影响. 其结果描绘于图 1.

表3 PH对反应速度的影响

PH值	自然细胞相对活力*(%)	固定化细胞相对活力(%)
7.50	25.7	
8.00	57.8	63.8
8.50	92.7	76.3
9.00	100	85.6
9.50	71.8	100
10.00	39.3	87.5
10.85	25.7	52.9

• 相对活力指实验中最大活力的相对值(下同)。

实验结果表明,自然细胞最适温度为41—45℃,而固定化细胞最适反应温度约40℃左右。

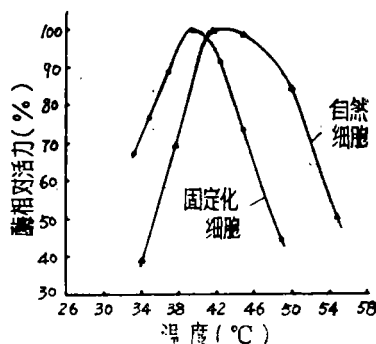


图1 温度对反应速度的影响

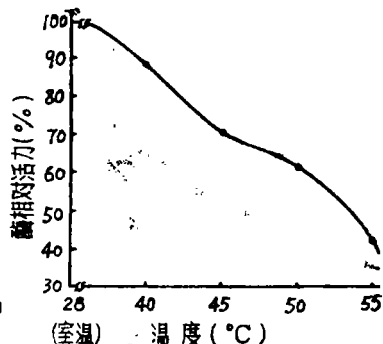


图2 固定化细胞的热稳定性

3. 固定化细胞的热稳定性:

称取相当于0.10 g湿细胞的固定化细胞几份,放入5ml生理盐水,搅成均匀的悬浮液,分别在不同温度下处理30 min(保持一定的搅拌转速)之后,过滤并吸干。以1 M反丁烯二酸(pH8.5含1 mM Mg²⁺)为底物,在37℃下,测定其表现比活力。以未经加热的固定化细胞在同一反应条件下的酶活力为100%。图2表示所得结果。

4. 固定化细胞催化反应的活化能:

为了探讨固定化细胞酶催化反应过程中,温度对反应速度影响的程度,测定了反应活化能。以1 M反丁烯二酸(pH8.5含1 mM Mg²⁺)为底物在不同温度(以精密温度计测定)下进行反应,按上述相同方法,分别测定其表现比活力,实验结果列于表4。

表4 固定化细胞酶反应活化能的测定值

温度, °C	酶表现比活力, 单位/g湿细胞	$\ln K'$	$\frac{1}{T} \times 10^3 (\frac{1}{K})$
37.7	33500	10.52	3.280
34.9	39540	10.59	2.246
37.0	45020	10.71	3.224
37.4	50960	10.84	3.199
42.3	46750	10.75	3.170

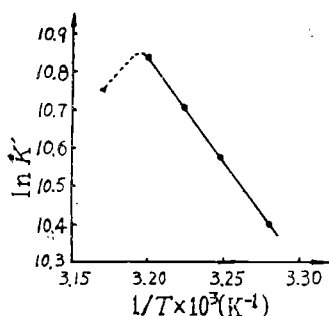


图3. 从 $\ln K' - \frac{1}{T}$ 作图求活化能。

根据Arrhenius方程 $K' = Ae^{-E/RT}$ 即 $\ln K' = -\frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A$, 作 $\ln K' - \frac{1}{T}$ 图 (图3), 在动力学区可得一直线。在本实验中, 取酶失活前的四组数据, 利用最小二乘法, 进行线性回归, 可得直线的斜率为 -5236.8 , 由此计算, 即可求得活化能为 43.571 J/M 。

四、讨 论

1. 固定化细胞的催化活性和稳定性, 在很大程度上受到所用的载体和固定化方法的影响。在前言中所提及的几种载体及其固定化方法都各自存在一些问题而未能大规模地应用。多糖类载体——海藻酸盐凝胶, 能在温和条件下迅速形成微球状颗粒, 其结构具有微小栅格, 通透性好, 小分子底物——反丁烯二酸和产物——天门冬氨酸容易通过凝胶层, 内扩散阻力较小, 并且所用试剂均无毒性, 制备操作也较简便。本省已正式生产海藻酸钠, 原料易得。

2. 天门冬氨酸酶 (胞内酶) 能专一性地催化反丁烯二酸转化为L-天门冬氨酸。实验证明, 在天门冬氨酸酶的催化下, 反丁烯二酸的消耗和L-天门冬氨酸的形成几乎是化学计量关系^[6, 7]。因此以底物——反丁烯二酸的消耗来计算酶的活力是可行的。本实验采用的高锰酸钾反滴定法测定反丁烯二酸, 较文献中介绍的高锰酸钾直接滴定法终点明显, 重复性较好, 值得推荐。

3. 海藻酸钙凝胶包埋法制备的固定化细胞, 在催化反应过程中, 溶液主体相的最适 pH 有向碱侧移动的趋势, 这可能同载体的化学性质和微环境的静电作用有关系, 这种方法制备的固定化细胞, 热稳定性较好, 例如固定化细胞经 50°C 热处理 30 min 后, 其相对活性高达 62% 。这种情况比报导过的明胶-戊二醛和琼脂包埋法的结果还要好。制备好的固定化大肠杆菌细胞浸泡于生理盐水中, 置冰箱内冷藏, 稳定性良好, 二个月内, 其活力基本上不变。本实验还测定了固定化细胞催化反丁烯二酸转化为L-天门冬氨酸的活化能, 对于工业应用的工程分析有参考价值。日本用聚丙烯酰胺凝胶包埋法制固定化细胞反应的活化能为 51733 J/M ^[8]。本实验测得的活化能为 43571 J/M , 国内至今未见报导。活化能降低, 在一定程度上反映催化反应较易进行, 最适温度较易控制。

在实验中发现海藻酸钙凝胶包埋法还存在一些问题, 如凝胶微粒容易破碎或脱皮而影响了机械强度; 微球状颗粒有利于传质, 但颗粒的大小和内部微孔结构同凝胶浓度及操作工艺关系很大, 不易重复。

参 考 文 献

- 〔1〕 孟广震等, 固定化微生物细胞的研究和应用, 微生物学通报, 4, 1 (6177), 41—45.
- 〔2〕 佐藤忠司等, L-アミノパライン酸发酵, 发酵と工业, 40, 7 (1982), 620—630.
- 〔3〕 Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Chibata, J., Basic Studies for Continuous Production of L-Aspartic Acid by Immobilized *Escherichia coli* Cells, *Applied Microbiology*, 27, 5 (1974), 886—889.
- 〔4〕 孟广震等, 具有高活力天门冬氨酸酶的大肠杆菌 AS1.881 固定化细胞, 微生物学学报, 18, 1 (1978), 39—44.
- 〔5〕 居乃琥等, 用明胶—戊二醛法固定大肠杆菌细胞生产 L-天门冬氨酸, 微生物学通报, 10, 1 (1983), 8—11.
- 〔6〕 Chibata, J., Tosa, T. and Sato, T., Immobilized Aspartase-Containing Microbial Cells" Preparation and Enzymatic Properties, *Applied Microbiology*, 27, 5 (1974), 878—885.
- 〔7〕 张元兴等, AS1.881 细胞的催化反应动力学, 工业微生物, 1 (1985), 14.
- 〔8〕 Sato, T., Mori, T., Tosa, T. and Chibata, J., Engineering Analysis of Continuous Production of L-Aspartic Acid by Immobilized *Escherichia coli* Cells in Fixed Beds, *Biotech. Bioeng.*, 17, (1975), 1990—1804.

A Study on Immobilization and Properties of Aspartase-containing Cells of *Escherichia coli*

wang Lianyang Fang Baishan

Abstract

Immobilized aspartase-cells of *Escherichia coli* become known for their catalytic action in the production of L-aspartic acid from ammonium fumarate.

This paper presents a method of using Ca-alginate gel to immobilize the cells. It also measures the activation energy of this catalytic reaction.