

# 细胞转化法生产 *L*-苹果酸的研究<sup>\*</sup>

胡 纯 铿

(华侨大学化工学院, 泉州 362011)

**摘要** 报道普通变形杆菌细胞转化法生产 *L*-苹果酸的研究, 探讨菌体培养时间和转化反应条件等因素对菌体延胡索酸酶活性的影响、菌体酶的热稳定性和 pH 稳定性. 确定最佳工艺条件和酶的稳定性条件分别为: 菌体培养时间 72 h, 转化反应温度 35℃, 底物转化液 pH 7.0, 转化反应时间 3 h; 温度 35℃, pH 6.0~7.8. 菌体经过 10 批次转化反应后, 其延胡索酸酶活性仍很稳定, 酶活保存率达 87.0%.

**关键词** 细胞转化法, 普通变形杆菌, *L*-苹果酸, 延胡索酸酶

**分类号** TQ 921

*L*-苹果酸主要应用于食品工业, 它是一种优良的酸味剂和保鲜剂. 此外, *L*-苹果酸在临床医药、日化保健、化学工业和建筑业上也有重要的应用<sup>[1~3]</sup>. 目前所开发的用于 *L*-苹果酸生产及生产研究的生物技术主要有: (1) 一步发酵法. 利用霉菌或酵母菌体内复杂的多酶反应体系将糖质原料转化为 *L*-苹果酸<sup>[1,2,4]</sup>; (2) 混合发酵法. 利用根霉将糖质原料转化为延胡索酸, 再接入细菌或青霉将延胡索酸转化为 *L*-苹果酸<sup>[5]</sup>; (3) 转化法. 利用微生物体内的延胡索酸酶直接催化延胡索酸进行水合反应生成 *L*-苹果酸<sup>[6~8]</sup>. 与前两种方法相比, 转化法具有工艺相对简单和转化率高的优势, 可分为固定化酶、固定化细胞和游离细胞三种转化工艺. 由于游离细胞转化工艺(简称细胞转化法)无需固定化酶工艺涉及的复杂的酶提纯过程, 也省去了固定化细胞转化工艺所需的繁琐的固定化程序. 因此, 它在转化工艺中具有重要的地位. 1986 年, Yukawa 等人<sup>[8]</sup>报道采用黄色短杆菌游离细胞转化延胡索酸为 *L*-苹果酸, 底物转化率为 78%; 1996 年, 王普等人<sup>[9]</sup>报道采用 G<sub>04</sub>株转化延胡索酸为 *L*-苹果酸, 底物转化率为 76.78%. 本研究采用普通变形杆菌游离细胞转化延胡索酸为 *L*-苹果酸, 底物转化率为 85.1%, 菌体经过 10 批次转化反应, 延胡索酸酶活性仍很稳定, 酶活保存率达 87.0%.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* V-81.

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面保藏培养基 牛肉膏蛋白胨培养基.

1.2.2 摇瓶培养基(g·L<sup>-1</sup>) 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 酵母膏 3.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

<sup>\*</sup> 本文 1999-04-22 收到; 福建省自然科学基金资助项目

1.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.8, pH 7.0~7.2.

### 1.3 培养方法

斜面菌种于 30℃ 培养 3 d, 摇瓶于 31℃ 在旋转式摇床(转速  $160 r \cdot min^{-1}$ )上培养一定时间, 后离心收集菌体备用.

### 1.4 底物转化液及转化反应条件

1.4.1 底物转化液  $0.86 mol \cdot L^{-1}$  (pH 7.0) 延胡索酸钠溶液 25 mL.

1.4.2 转化反应条件 取经离心后的湿菌体置于  $0.86 mol \cdot L^{-1}$  (pH 7.0) 延胡索酸钠溶液(含  $2.0 g \cdot L^{-1}$  胆酸)中在 37℃ 保温 20 h. 然后, 将经过此预处理的菌体 1 g, 加入底物转化液中, 在 37℃、转速  $140 r \cdot min^{-1}$  的条件下进行转化反应 3 h.

### 1.5 细胞转化法流程

斜面菌种培养 摇瓶菌体培养 离心收集菌体 菌体预处理 转化反应.

### 1.6 分析方法

1.6.1 有机酸定性测定 采用纸层析法<sup>[1,2]</sup>.

1.6.2  $L$ -苹果酸定量测定 采用 2, 7-萘二酚法<sup>[10]</sup>.

1.6.3 延胡索酸定量测定 采用高锰酸钾滴定法<sup>[11]</sup>.

1.6.4 延胡索酸酶活力测定 通过测定单位时间每克酶制剂(即湿菌体)所转化底物的微摩尔数表示酶活力高低, 并规定每小时每克酶制剂转化 1 微摩尔底物定为一个酶活力单位.

## 2 结果与讨论

转化法生产  $L$ -苹果酸常伴有副产物琥珀酸的生成, 此在文献中早有报道<sup>[8]</sup>. 为了提高延胡索酸酶活性和抑制副产物的形成<sup>[7]</sup>, 采用  $2.0 g \cdot L^{-1}$  胆酸对菌体进行预处理(见 1.4.2), 以期抑制副反应. 试验表明, 采用经过预处理的菌体进行转化反应, 其转化液经有机酸纸层析分析  $L$ -苹果酸斑点清晰, 而无琥珀酸斑点; 对照组(菌体未经预处理而直接用于转化反应)有琥珀酸斑点. 这说明  $2.0 g \cdot L^{-1}$  胆酸对菌体进行预处理, 能有效抑制副产物的形成. 在此基础上, 开展了菌体转化工艺条件和酶的稳定性研究.

### 2.1 菌体培养时间对酶活力的影响

为了确定摇瓶菌体适宜的培养时间, 考察了不同培养时间( $t_c$ )与菌体延胡索酸酶活力的关系(表 1). 结果, 表明培养时间达 72 h, 酶活力( $A$ ),  $L$ -苹果酸产率( $CLMA$ )和转化率( $R_F$ )均达最高水平; 另外, 培养 48 h 与培养 72 h 的水平很接近. 因此, 摇瓶菌体培养时间以 48~72 h 为宜.

### 2.2 转化反应温度对酶活力的影响

细胞转化法生产  $L$ -苹果酸是用菌体的延胡索酸酶催化延胡索酸, 进行水合反应而生成  $L$ -苹果酸. 由于温度是影响酶促反应速度的重要因素, 故试验中选择培养 72 h 的摇瓶菌体分别

表 1 菌体培养时间对延胡索酸酶活力的影响

$t_c/d$	$A / u \cdot g^{-1}$	$CLMA / mmol \cdot L^{-1}$	$R_F / (\%)$
24	5 468	647.0	76.3
48	5 769	682.6	80.5
72	5 920	700.4	82.6
84	5 375	636.0	75.0
96	4 400	520.6	61.4

转化反应结束时, 被消耗的底物/底物转化液中原有的底物  $\times 100\%$

在一系列不同温度( $\theta$ )下进行转化反应,其他条件不变,以探讨转化反应温度对菌体酶活力的影响,结果见表2。表中显示,在较低温度下,酶活力随温度的升高而递增;当温度超过40 $^{\circ}\text{C}$ ,酶活力急剧下降;在35 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活力最高,转化率达85.0%,L-苹果酸产率为720.7 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此,选择35 $^{\circ}\text{C}$ 作为转化反应温度。

### 2.3 底物转化液pH对酶活力的影响

由于pH是影响酶促反应速度的一个重要因素,所以底物转化液pH将直接影响延胡索酸酶活力。因此,试验中选择培养72h的摇瓶菌体,控制转化反应温度为35 $^{\circ}\text{C}$ ,分别在一系列不同pH条件下进行转化反应,其他条件不变,以考察底物转化液pH与酶活力关系,结果见表3。表中表明,酶的适宜pH范围为6.5~7.5,最适pH为7.0。

### 2.4 转化反应时间对酶活力的影响

为了确定适宜的转化反应时间,试验中选择培养72h的摇瓶菌体,在转化反应温度为35 $^{\circ}\text{C}$ 和底物转化液pH为7.0的条件下进行转化反应,定时测定不同转化反应时间( $t_{\text{R}}$ )的酶活力、L-苹果酸产率和转化率,结果见表4。从表中可以看出:(1)L-苹果酸产率和转化率随转化反应时间的延长而递增,至3.0h以后,二者均趋于稳定;(2)酶活力在1.0~1.5h内最高,随后开始下降,并在2.0~3.0h内趋于稳定,3.0h后则随转化反应时间的延长快速下降。

在1.0~1.5h内,虽然酶活力很高,但由于时间短,底物仅少部分被转化,L-苹果酸产率低;转化反应时间超过3.0h,一方面酶活力迅速下降,另一方面可被转化的底物不再增加,L-苹果酸产率不再上升;在2.0~3.0h内,转化率和L-苹果酸产率几乎随时间线性上升,而且具有较高和较稳定的酶活力,至3.0h,转化率和L-苹果酸产率均达最大值。根据以上情况,确定3.0h作为转化反应时间。

### 2.5 酶的热稳定性

分别将菌龄为72h的摇瓶菌体于各个不同温度下保温30min,然后在pH7.0和35 $^{\circ}\text{C}$ 条

表2 转化反应温度对延胡索酸酶活力的影响

$\theta/ (^{\circ}\text{C})$	$A_{\text{R}}/(\%)$	$CLMA/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$R_{\text{F}}/(\%)$
30	61.5	443.2	52.3
32	89.6	646.3	76.2
35	100.0	720.7	85.0
37	96.5	695.1	82.0
40	84.8	611.0	72.1
45	40.1	288.4	34.1
50	12.0	86.2	10.2

$A_{\text{R}}$  即相对酶活力,以不同温度下测得的最高酶活力为100%作为参照标准。

表3 底物转化液pH对延胡索酸酶活力的影响

pH	$A_{\text{R}}/(\%)$	$CLMA/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$R_{\text{F}}/(\%)$
5.0	25.1	180.4	21.4
5.5	56.0	402.3	47.7
6.0	77.0	552.5	65.5
6.5	90.8	652.8	77.3
7.0	100.0	721.5	85.1
7.5	95.3	686.5	81.1
8.0	75.3	542.4	64.1
8.5	50.2	361.2	42.7
9.0	35.1	252.0	29.9
10.0	13.8	98.6	11.7

$A_{\text{R}}$  即相对酶活力,以不同pH下测得的最高酶活力为100%作为参照标准。

表4 转化反应时间对延胡索酸酶活力的影响

$t_{\text{R}}/(\text{h})$	$A/(\text{u}\cdot\text{g}^{-1})$	$CLMA/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$R_{\text{F}}/(\%)$
1.0	6 622	259.8	30.8
1.5	6 823	402.0	47.6
2.0	5 945	467.5	55.3
2.5	5 986	588.7	69.6
3.0	6 113	723.2	85.3
3.5	5 258	725.1	85.6
4.0	4 590	723.5	85.4
4.5	4 080	722.7	85.4
5.0	3 655	719.7	85.0

件下进行转化反应 3 h, 测定其残留相对活力  $A_R^R$  (以对照组测得的酶活力定为 100% 作为参照标准, 各个不同温度处理后测得的残留酶活力与之相比较即为残留相对活力. 这里, 对照组为培养 72 h 的摇瓶菌体在转化反应温度 35 和底物转化液 pH 7.0 的条件下, 转化反应 3.0 h 测得的酶活力). 用以考察菌体酶的热稳定性, 结果如图 1 所示. 当温度 35, 酶有很好的热稳定性, 当温度  $> 40$ , 酶的热稳定性迅速下降.

## 2.6 酶的 pH 稳定性

分别将菌龄为 72 h 的摇瓶菌体和各种不同 pH 缓冲液于冰箱(4)中保持 24 h, 然后在 35 和 pH 7.0 条件下转化反应 3.0 h, 测定残留相对活力  $A_R^R$  (以对照组测得的酶活力定为 100% 作为参照标准, 各种不同 pH 处理后测得的残留酶活力与之相比较即为残留相对活力. 对照组的定义与节 2.5 残留相对活力中的说明一致). 用以考察菌体酶的 pH 稳定性, 结果如图 2 所示. 这说明在 pH 6.0~7.8 范围内, 酶的 pH 稳定性好.

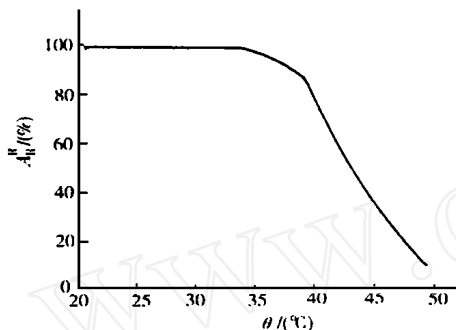


图1 V-81 菌株延胡索酸酶的热稳定性

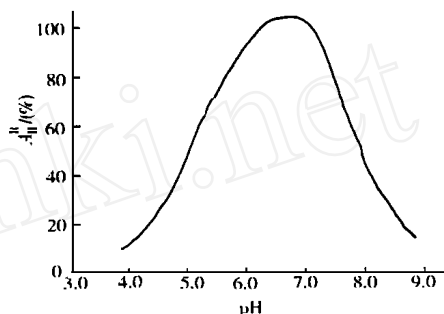


图2 V-81 菌株延胡索酸酶的 pH 稳定性

## 2.7 菌体多批次转化反应

根据前面确定的最佳工艺条件(菌龄 72 h、转化反应温度 35、底物转化液 pH = 7.0 和转化反应时间 3.0 h), 进行游离细胞多批次转化反应, 以考察菌体延胡索酸酶活性的稳定性, 结果见表 5. 表 5 表明, 经过 10 批次转化反应, 菌体酶活力仍很稳定, 酶活保存率达 87.0% (第 10 次转化反应的酶活力/第 1 次转化反应的酶活力 =  $5\ 325/6\ 120 = 87.0\%$ ).

表 5 菌体多批次转化反应结果

N	$A / \text{u} \cdot \text{g}^{-1}$	$C_{\text{LMA}} / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$R_F / (\%)$
1	6 120	727.1	85.4
2	6 120	725.6	85.4
3	6 092	722.2	85.0
4	5 740	680.0	80.1
5	5 733	679.0	80.0
6	5 748	680.7	80.2
7	5 482	648.7	76.5
8	5 533	654.6	77.2
9	5 353	632.8	74.7
10	5 325	629.3	74.3

## 3 结论

研究采用普通变形杆菌游离细胞转化延胡索酸为 L-苹果酸. 所确定的最佳工艺条件为: 摇瓶菌体培养时间 72 h, 转化反应温

度 35, 底物转化液 pH 7.0, 转化反应时间 3.0 h. 在此条件下, 菌体具有高的酶活力, 底物转化率高 85.1%. 另外, 当温度 35, 菌体酶具有很高的热稳定性; 在 pH 6.0~7.8 范围内, 菌体酶的 pH 稳定性好; 菌体经过 10 批次转化反应, 其延胡索酸酶活力仍很稳定, 酶活保存率达 87.0%.

## 参 考 文 献

- 1 胡纯铿, 陈哲超, 施巧琴等. L-苹果酸产生菌 *Aspergillus flavus* HLD-12 产酸条件的研究. 福建师范大学学报(自然科学版), 1994, 10(2): 75~ 80
- 2 胡纯铿. L-苹果酸产生菌黄曲霉 *Aspergillus flavus* H-98 发酵特性的研究. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 19~ 22
- 3 胡纯铿. 固定化黄曲霉生产L-苹果酸的研究. 华侨大学学报(自然科学版), 1999, 20(3): 240~ 245
- 4 金其荣. L-苹果酸产生菌的选育. 无锡轻工学院学报, 1982, 创刊号: 89~ 97
- 5 Takao S, Yokota A, Tanida M. L Malic acid fermentation by a mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Paecilomyces varioti* J. Fement Technol, 1983, 61(6): 643~ 645
- 6 Yamamoto K, Tosa T, Yamashita K et al The production of L malic acid by *Brevibacterium anm oniaenes* immobilized with polyacrylamide gel Eur. J. Appl Microbiol, 1976, (3): 169~ 175
- 7 Takata I, Kayashima K, Tosa T, et al Improvement of stability of fumarase activity of *Brevibacterium flavum* by immobilization with Kcarrageenan and polyethyleneimine J. Fement Technol, 1982, 60(5): 431~ 437
- 8 Yakawa H, Yamagata H, Terasawa M. Production of L malic acid by the cell reusing process Process Biochemistry. 1986, 21: 164~ 166
- 9 王 普, 虞炳灼, 张福明等. 富马酸酶产生菌株的筛选. 食品与发酵工业, 1996, (1): 18~ 23
- 10 Goodban A E, Stark J B. A method for rapid detem ination of L malic acid Anal Chem. , 1957, 29: 283~ 287

## Producing L-Malic Acid by Cell Conversion Process

Hu Chunkeng

(College of Chem. Eng, Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

**Abstract** The production of L malic acid by cell conversion process of *Proteus vulgaris* is reported with emphasis on its characteristics. The studies include the effects of cell culture time and conversion reaction condition on the activity of cell fumarase; and also heat and pH stability of cell fumarase. The optimal technological conditions and the conditions of enzymatic stability are determined respectively as follows: a time of 72 hours for cell culture, a temperature of 35 for conversion reaction, an acidity of pH 7.0 for substrate conversion solution, and a time of 3 hours for conversion reaction; a temperature lower than or equal to 35 and an acidity of pH 6.0~ 7.8. After the tenth batch conversion reaction, the cell fumarase has a fairly stable activity showing a preservation rate up to 87.0%.

**Keywords** cell conversion process, *Proteus vulgaris*, L malic acid, fumarase