

透膜法生产L-天冬氨酸的工艺研究

缪静,冯志彬*,张 建,程仕伟,陈国忠,葛宜和
(鲁东大学生命科学学院,山东烟台264025)

摘要:为提高天冬氨酸的转化效率,对大肠杆菌发酵产酶条件和发酵转化液的酶促反应条件进行了优化,结果表明,在大肠杆菌在10 L发酵罐上溶氧维持在25%,发酵周期为8 h,发酵3 h时添加0.2%的吐温-60的条件下,天冬氨酸酶产率最高。大肠杆菌所产天冬氨酸酶为胞内酶,因此,采用表面活性剂、有机溶剂及超声波破碎法对大肠杆菌的细胞膜透性进行处理,结果表明:反应结束后发酵转化液用0.5%的甲苯处理1 h后进行底物转化,转化效果最好。在此条件下优化了酶促反应温度和pH,结果表明:温度为45℃,pH为8.5时,发酵转化液对底物的转化效果最佳。在上述条件下,10 mL发酵转化液转化90 mL质量浓度为200 g/L的富马酸底物时,转化周期在6 h以内,底物转化效率大于99%。

关键词:L-天冬氨酸;富马酸;大肠杆菌;细胞透性

中图分类号:TQ93

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)04-0105-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.04.025

Study on the enzymatic synthesis process of aspartic acid by increasing cell membrane permeability of *Escherichia coli*

MIAO Jing, FENG Zhi-bin*, ZHANG Jian, CHENG Shi-wei, CHEN Guo-zhong, GE Yi-he
(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: In order to increase the productivity of aspartic acid, the optimization of the fermentation conditions with *Escherichia coli* and the conditions of enzymatic reaction are investigated. The optimal fermentation condition is 25% dissolved oxygen in 10 L fermenter for 8 h, with the addition of 0.2% Tween-60 after 3 h fermentation. As the aspartase produced by *Escherichia coli* is intracellular, the addition of surfactant, organic solvent and ultrasonic to increase the cell membrane permeability are tested. The result suggests that the cell treated with 0.5% toluene for 1 h, keeping at 45℃ and pH 8.5, is the most favorable for substrate transformation. Using 10 mL fermentation broth to transform 90 mL substrate (200 g/L fumaric acid) under the optimal condition, the conversion rate could reach 99.6% within 6 h.

Key words: L-aspartic acid; fumaric acid; *Escherichia coli*; cell permeability

L-天冬氨酸是生物蛋白质的重要组成氨基酸,具有调节脑神经代谢、强化肝功能及缓解疲劳等功能,同时还是合成强力甜味剂阿斯巴甜、纽甜及高分子材料聚天冬氨酸的中间体,在医药、食品及化工领域具有广泛用途^[1-2]。天冬氨酸的工业化生产始于20世纪70年代,主要采用大肠杆菌的天冬氨酸酶转化富马酸合成,按照转化时细胞固定化与否分为游离细胞转化法和固定化细胞转化法,由于游离细胞转化法操作简单,酶源易得,在工业生产中较为常用^[3-6]。优化发酵条件提高了天冬氨酸酶的催化活力,可以有效提高富马酸向天冬氨酸的转化效率,缩短生产周期,提高设备利用率,从而降低生产成本,增加经济效益,是未来天冬氨酸生产的发展方向之一^[7]。而天冬氨酸酶属于胞内酶,转化时底物需透过细胞膜才能够被酶转化,微生物细胞膜对细胞与环境物质的透性传递有调节作用,胞外物质进入胞

内需要活性载体传递,单纯的渗透会受到细胞膜的限制^[8-14],无法发挥酶的最大催化效率,采用物理或化学方法破坏大肠杆菌的细胞膜,酶由胞内透出和底物富马酸充分接触必可大大提升转化效率。笔者以大肠杆菌为供试菌株,通过优化发酵条件提高酶的合成量,结合破膜技术促使天冬氨酸酶由胞内向胞外释放,最大程度发挥天冬氨酸酶的催化效率,为游离细胞法转化生产天冬氨酸提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) y103 (鲁东大学生命科学学院应用微生物实验室保藏)。

1.2 培养基

斜面培养基:牛肉膏 2 g/L,蛋白胨 6 g/L, NaCl

收稿日期:2016-10-29

基金项目:山东省农业重大应用技术创新课题(鲁财指2014-38);城新创新基金(excj-06)

作者简介:缪静(1972-),工学硕士,副教授,研究方向为微生物生理与代谢,mj426@qq.com;冯志彬(1977-),男,工学硕士,讲师,研究方向为发酵工程,主要致力于氨基酸及核苷酸的代谢调控研究,通讯联系人,zhibinfeng@126.com。

10 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.0 ~ 7.2, 121℃ 灭菌 20 min。

种子培养基:富马酸 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,玉米浆 20 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄ 5 g/L, NaCl 3.5 g/L,pH 7.0 ~ 7.5,121℃ 灭菌 20 min。

发酵培养基:富马酸 15 g/L,蛋白胨 5 g/L,玉米浆 20 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄ 5 g/L, NaCl 3.5 g/L,pH 7.0 ~ 7.5,121℃ 灭菌 20 min。

转化培养基:富马酸 200 g/L, MgSO₄ 2.5 g/L, pH 8.0 ~ 8.5。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养

将一环生长良好的斜面菌种接入装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,于冲程为 8 cm 的往复式摇瓶柜上培养,转速为 100 r/min,温度为 37℃,培养 18 h。

1.3.2 发酵培养

10 L 发酵罐装料系数为 0.6,采用火焰接种法按发酵液体积比为 10% 接入培养成熟的大肠杆菌种子液,控制转速为 400 r/min,通气量为 0.4 vvm,温度为 37℃。

1.4 酶转化反应

取培养好的大肠杆菌发酵液 10 mL 与 90 mL 底物溶液(即转化培养基见 1.2)混合摇匀,37℃ 下进行酶转化反应,反应过程中定时取样检测反应液中的富马酸浓度。

1.5 细胞通透性处理方法

1.5.1 有机溶剂法

向发酵液中加入不同体积比的有机溶剂,于 37℃、50 r/min 转速下振荡处理一段时间,保存备用。

1.5.2 超声波破碎法

将一定体积的发酵液置于冰水浴中,用超声波间隙短时间处理(工作 9 s,间歇 3 s,功率为 200 W,20 min),保存备用。

1.6 测定方法

1.6.1 菌体浓度

吸取样品菌液,用蒸馏水稀释一定倍数,以蒸馏水作空白对照,采用 7200 分光光度计于 1 cm 光程测定 OD_{600 nm}。

1.6.2 富马酸

利用 Elite - AAA 氨基酸分析仪系统进行测定^[8]。

1.6.3 L-天冬氨酸

利用 HPLC 法进行测定^[8]。

2 结果与分析

2.1 培养条件对天冬氨酸酶发酵的影响

2.1.1 溶氧对天冬氨酸酶发酵的影响

发酵过程中通过调节转速和通气量控制溶氧在 5%、15%、25%、35% 及 45%,发酵结束后测定发酵液中天冬氨酸酶活力,考察溶氧对天冬氨酸酶发酵的影响,结果如表 1 所示。

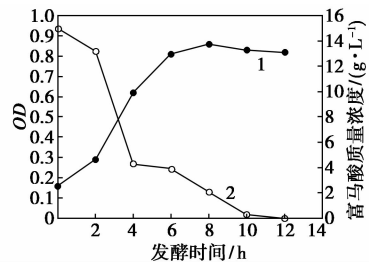
表 1 溶氧对天冬氨酸酶发酵的影响

溶氧/%	5	15	25	35	45
OD	0.92	0.93	0.90	0.87	0.85
酶活/[U·(mL·h) ⁻¹]	134	234	322	315	278

由表 1 可知,溶氧由 5% 升高到 15% 时,菌体生长量略有上升;当溶氧高于 15% 时,菌体生长量逐渐下降,总体来看大肠杆菌的菌体光密度均在 0.9 左右,说明溶氧对菌体生长量影响不大。但较低的溶氧(<15%)不利于天冬氨酸酶的产生,随着溶氧的提升,天冬氨酸酶活力增加,在溶氧 25% 时,天冬氨酸酶活力最高,比溶氧在 5% 时提高了 140%,继续增加溶氧,酶活力开始衰减,这是由于过高的氧浓度会产生氧自由基、过氧化物等物质,不利于菌体生长和发酵产酶,考虑到生产过程中能耗问题和天冬氨酸酶活力,选择发酵的最佳溶氧值为 25%。

2.1.2 发酵周期对转化效率的影响

发酵过程中维持 25% 的溶氧,每隔 2 h 取样测定菌体 OD 和富马酸质量浓度,结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,大肠杆菌接种后很快进入对数生长期,底物富马酸消耗,发酵 8 h 基本进入稳定生长期,富马酸残留质量浓度为 2.1 g/L,继续培养菌体 OD 开始缓慢下降,此时,富马酸也基本消耗殆尽,菌体生长进入衰亡期。



1—OD;2—富马酸质量浓度

图 1 发酵过程曲线

为确定大肠杆菌的产酶高峰期达到最佳转化效率,分别在发酵6、8、10 h及12 h取出部分发酵液测定酶活,并按10%比例接入20%富马酸溶液进行转化实验,考察发酵周期对转化效率的影响,结果如表2所示。

表2 发酵周期对转化效率的影响

发酵周期/h	6	8	10	12
酶活力/[U·(mL·h) ⁻¹]	267	331	325	302
转化时间/h	12.0	10.0	10.0	10.5

由表2可知,发酵周期为8 h的天冬氨酸酶发酵液酶活力最高,转化底物只需10 h,结合图1,此时大肠杆菌菌体生长量最高,继续培养菌体生长量和酶活力均有一定程度的衰减,由此可以看出,酶活力和菌体生长成正相关,因此可以通过测定菌体生长量确定天冬氨酸的最佳发酵周期。

2.1.3 吐温-60添加量及添加时机对转化效率的影响

吐温-60是酶制剂生产中常用的产酶促进剂,可以增加产酶微生物细胞膜的透性并刺激酶的合成。分别在发酵1、3、5、7 h时添加0.1%的吐温-60,发酵结束后取部分发酵液离心处理(8 000 r/min、5 min),取上清,分别测定发酵液及离心清液中天冬氨酸酶活性并利用发酵液进行富马酸的转化实验,设立实验对照组,结果如表3所示。

表3 吐温-60对转化效率的影响

添加时间/h	OD	细胞悬液酶活力/ [U·(mL·h) ⁻¹]	离心清液酶活力/ [U·(mL·h) ⁻¹]	转化 时间/h
对照(不添加)	0.95	335	6	10.0
1	0.56	267	45	12.0
3	0.88	378	86	9.0
5	0.90	330	54	9.5
7	0.92	336	17	10.0

由表3可知,发酵3 h时添加吐温-60细胞悬液酶活力最高,说明吐温-60对天冬氨酸酶的合成有促进作用,且离心液中酶活力高达86 U/mL·h,远高于实验对照组的6 U/mL·h,这也证实了天冬氨酸酶为胞内酶。细胞膜是阻止胞内酶向胞外释放的主要屏障,吐温-60可以干扰细胞膜合成的完整性,使膜的通透性增加,有利于酶的释放。但过早或过晚加入均不利于提高酶活力,加入太早,虽然酶分子可以向胞外渗透,但菌体生长受到抑制,酶合成量不足;

加入太晚,菌体已大量生长,剩余生长不足,细胞膜透性无法得到有效改善,转化效率没有明显改善。发酵3 h加入细胞处于对数生长中期,菌体生长有一定的基础,且有充分的剩余生长时间,发酵结束时细胞浓度不受明显的干扰,细胞膜的透性得到有效的改善,所以转化效率最高,转化时间也较对照组缩短了1 h。

为保证酶的充分透出,进一步提高转化效率,设计实验确定吐温-60的最佳质量分数,结果如表4所示。由表4可以看出,质量分数为0.2%时,转化效果最好,继续增加吐温-60的质量分数,转化效率无明显提升,且会增加生产成本,故确定吐温-60的最佳质量分数为0.2%。

表4 吐温-60质量分数对转化效率的影响

质量分数/%	0	0.1	0.2	0.3	0.4
转化周期/h	10	9	8	8	8

2.2 酶促反应条件的优化

2.2.1 细胞膜处理方式对转化效率的影响

发酵过程中添加吐温-60是一种温和的细胞膜处理方式,天冬氨酸酶无法充分由胞内透出,发酵结束后采用有机溶剂和物理方法进一步处理大肠杆菌细胞,确保酶的充分释放,结果如表5所示。

表5 细胞膜透性处理对转化效率的影响

处理方式	质量 分数/%	处理 时间/h	酶活力/ [U·(mL·h) ⁻¹]	转化 时间/h
对照			370	8.0
甲苯	0.5	0.5	420	7.0
	0.5	1.0	468	6.0
	1.0	0.5	434	7.0
	1.0	1.0	473	6.0
二甲苯	0.5	0.5	400	7.5
	0.5	1.0	432	7.0
	1.0	0.5	410	7.5
	1.0	1.0	437	7.0
丙酮	5.0	0.5	380	8.0
	20.0	0.5	414	7.5
	50.0	0.5	123	16.0
超声波			464	6.0

有机溶剂的作用机制是透过细胞壁与细胞膜的脂质体进行反应,破坏细胞膜结构和脂质体的流动性,使细胞膜失去原有的对胞外物质传递的调控能

力,达到提高细胞膜通透性的目的。超声波破碎对细胞膜和细胞壁的结构进行破坏,使细胞因结构性损伤而提高通透性。由表 5 可以看出,采用甲苯、二甲苯等有机溶剂处理细胞通透性较好,转化效率和转化率较对照实验组均有一定程度的提高,其中尤以甲苯处理效果最好。丙酮作为有机溶剂也可以和细胞膜的脂质体发生反应,但低浓度的丙酮处理效果不明显,高浓度丙酮会造成酶分子变性失活,故不宜采用。另外超声波破碎作用虽然最强烈,但超声波处理会产生局部过热和气化作用而导致酶的部分失活,且难以放大生产,故也不宜采用。

本实验中暂时确定以甲苯为最佳破壁试剂,从实验结果看,2 个质量分数对酶促反应的影响不是很大,因此取低质量分数即 0.5% 的甲苯处理 1 h 为最佳破壁透膜条件。

2.2.2 温度对转化效率的影响

酶促反应会受到很多条件的影响,如温度、pH、时间等,这里主要探究温度和 pH 对转化效率的影响。首先以温度为唯一变量进行单因素实验,结果如表 6 所示。

表 6 温度对转化效率的影响

温度/°C	37	40	45	50
酶活力/[U·(mL·h) ⁻¹]	112	186	202	90
转化周期/h	12	10	8	14

由表 6 可以看出,温度为 45°C 时,酶活力最高,转化效率最大,转化周期最短。在实验过程中曾发现,在 50°C 时会出现酶活高达 293 U/mL·h 的现象,但是这样高的酶活力只在第 1 h 出现,之后的时间里酶活力只在 90 U/mL·h 左右,从而使得转化时间延长,由此可见,过高温度会破坏酶的活力。综合考虑,确定 45°C 为最佳转化温度。

2.2.3 pH 对转化效率的影响

以转化体系的 pH 作为单一变量进行单因素实验,确定最佳 pH,实验结果表 7 所示。由表 7 可以看出,在 pH 为 8.5 时酶活力最高,转化时间最短。

表 7 pH 对转化效率的影响

pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
酶活力/[U·(mL·h) ⁻¹]	75	107	189	262	202
转化周期/h	12.0	10.0	9.5	8.0	9.0

因此,确定最佳的转化条件为:温度为 45°C, pH 为 8.5。

2.3 验证实验

在上述优化条件进行了 3 批次转化实验,结果转化周期均在 6 h 以内,底物转化率都大于 99%。

3 结论

天冬氨酸酶活性、酶促反应条件及大肠杆菌细胞膜的通透性是影响游离细胞法转化生产天冬氨酸转化效率的主要因素。通过一系列实验,最终确定最佳发酵及酶转化条件为:溶氧维持在 25%;发酵 3 h 后加入 0.2% 的吐温-60;发酵周期为 8 h;反应结束后发酵液用 0.5% 的甲苯处理 1 h;最佳酶促反应温度为 45°C,最佳 pH 为 8.5。在上述优化条件下,用 10 mL 发酵转化液转化 90 mL 质量浓度为 200 g/L 的富马酸底物时,转化周期在 6 h 以内,底物转化效率大于 99%。

参考文献

- [1] 张今,张红缨,王小平. 天冬氨酸酶的研究与应用[J]. 自然科学进展,1997(3):266-270.
- [2] 李冰,李永祥. 天冬氨酸制备技术的研究进展[J]. 河北化工,2008,31(3):25-27.
- [3] 唐芳,谭天伟,王芳. L-天冬氨酸转化菌发酵条件的优化[J]. 北京化工大学学报,2003,30(5):21-24.
- [4] 王雪根,徐虹,朱建良,等. 游离整体细胞法工业生产 L-天冬氨酸[J]. 工业微生物,2000,30(1):32-35.
- [5] 徐虹,朱建良,侯钧,等. 游离酶法生产 L-天冬氨酸的工艺研究[J]. 南京化工大学学报,1996,18(1):70-73.
- [6] Masaharu Mukouyama, Satomi Komatsuzaki. Process for production of L-Aspartic acid; US,6150142[P]. 2000-11-21.
- [7] Masaharu Mukouyama, Shinzo Yasuda, Satomi Komatsuzaki. Methods for producing L-Aspartic acid; US,6821760[P]. 2004-11-23.
- [8] 章燕,徐虹,李莎. L-天冬氨酸的清洁提取工艺[J]. 生物加工过程,2007,5(4):65-69.
- [9] Zhang H Y, Zhang J, Lin I, et al. Enhancement of aspartase stability and activity by random and site-directed mutagenesis[J]. BBRC, 1993,192(1):15-21.
- [10] 朱建良,徐虹,侯钧. 酶法合成 L-天冬氨酸的动力学初探[J]. 南京化工大学学报,1995,17(12):135-139.
- [11] Chibata I Tosa T Sato T. Production of L-aspartic acid by microbial cells entrapped in polyacrylamide gels [J]. Methods Enzymol, 1976,44:739-746.
- [12] 张波. 天冬氨酸(L-ASP)的酶法合成的研究[J]. 丹东化工,1996,(6):19-20.
- [13] 冯志彬,殷日彩,米阳,等. 天冬氨酸生产工艺的研究进展[J]. 发酵科技通讯,2012,41(2):38-41.
- [14] 廖锋,孙小梅,李步海. 破壁方法对大肠杆菌 AS1.881 中天冬氨酸酶的影响研究[J]. 氨基酸和生物资源,2004,26(1):29-31. ■