

固定化米曲霉氨基酰化酶反应动力学 及其连续拆分 DL-蛋氨酸实验

王淑豪, 李晓峰, 吴艳玲, 宋正孝, 马忠海, 元英进

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要: 探讨了用明胶-戊二醛固定化米曲霉菌球氨基酰化酶反应动力学, 对固定化菌体连续光学拆分 DL-蛋氨酸进行了研究. 当底物浓度小于 200 mmol/L 时, 没有底物抑制现象, 此时拆分反应速率符合 Michaelis-Menten 方程. 在 37°C 时, 米氏常数和最大反应速率分别为 11.9 mmol/L 和 1.3 mmol/L. 在连续拆分反应中反应物体积流量为 7.5 ml/h, 底物浓度为 200 和 400 mmol/L 时, L-蛋氨酸的转化率分别为 93%和 78%. 随体积流量的增加, L-蛋氨酸转化率降低. 固定化菌体的操作半衰期为 82 d.

关键词: 固定化米曲霉; 氨基酰化酶; 动力学; 拆分; 蛋氨酸

中图分类号: TQ464.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2001)03-0293-04

1 前言

氨基酰化酶(EC3.5.1.14)的立体特异性是 L-型, 可将化学合成的 N-乙酰-DL-氨基酸拆分(水解), 从而获得 L-氨基酸. Chibata 等^[1]首先发现米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的氨基酰化酶具有良好的专一性, 从而代替了由动物肾脏提取的酰化酶. 自 60 年代末日本用 DEAE-Sephadex 作载体将此酶固定化实现了工业化生产 L-氨基酸以来, 不断推出固定化氨基酰化酶新的研究成果^[2,3], 它们都采用载体固定酶法. 从酶的提取、精制到固定化, 工艺复杂, 要求低温条件, 而且有时不稳定, 价格昂贵. 直接用固定化米曲霉菌体光学拆分 DL-氨基酸的研究较少^[4], 工业应用还是一个空白.

本文对固定化米曲霉菌体氨基酰化酶反应动力学以及在固定床反应器中采用固定化米曲霉菌体光学拆分 DL-蛋氨酸(DL-Met)进行了研究.

2 材料与方法

2.1 实验材料

菌种: 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)3042, 天津第三调料厂提供.

原料: N-乙酰-DL-蛋氨酸(N-Ac-DL-Met), 河北冀荣氨基酸有限公司提供.

豆汁培养基: 10 g 黄豆加水 100 ml 浸泡过夜, 煮沸 2 h, 用纱布过滤, 蔗糖 3 g, 自然 pH.

2.2 实验方法

菌体的液体培养: 250 ml 三角瓶中装入 50 ml 液体培养基, 灭菌, 接入一定量孢子悬液, 于 28~30°C 下 130 r/min 振荡培养, 抽滤, 用蒸馏水洗净, 收集米曲霉菌体小球, 直径为 2.0~3.0 mm.

固定化菌体的制备: 选用固定液中明胶浓度 0.5%~2%、戊二醛浓度 0.5%~2%、固定液用量 4~10 ml、固定化时间 0.5~2 h 进行 4 因素 4 水平正交实验, 以固定化后酶活性保留率为实验指标. 最佳固定化条件为: 固定液中含明胶 1%, 戊二醛 0.5%, 1 g 菌体用固定液量 8 ml, 固定化时间 2 h, 固定化后菌体比酶活性为 620 U/g, 酶活性保留率为 90%.

收稿日期: 2000-07-12, 修回日期: 2000-10-19

作者简介: 王淑豪 (1968-), 男, 河北唐县人, 博士研究生, 生物化工专业.

连续拆分：实验装置为固定床反应器，床层高 230 mm，直径 20 mm，柱内填充固定化米曲霉菌体，床层空隙率 $\varepsilon=0.5$ 。水浴温度 37°C，原料液为 N-Ac-DL-Met 溶液(含 $\text{CoCl}_2 \ 5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)，pH 为 7.8，体积流量为 7.5~150 ml/h，每隔一定时间取样 1 次，样品液迅速煮沸灭酶活性后用茚三酮显色法^[5]测定蛋氨酸浓度。变化流量和原料液浓度，测定出口产物浓度随时间的变化。

酶活性分析方法：湿菌体 0.1 g，加入 250 ml 三角瓶中，加 200 mmol/L N-Ac-DL-Met 溶液 5 ml，pH 为 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 40 ml 和水 5 ml，于 37°C 下在摇床上振荡 30 min，过滤后溶液迅速煮沸 5~10 min 灭酶活性，冷却，取 1 ml 用茚三酮显色法于 570 nm 处测吸光值，由标准曲线得反应液蛋氨酸浓度。比酶活性定义为在 37°C 下，pH 7.0 时 1 g 湿菌体拆分 1 h 产生的 L-Met 微摩尔数(μmol)。计算得菌体比酶活性为 690 U/g。

3 结果与讨论

3.1 菌球形态

图 1 为液体培养 42 h 的米曲霉湿菌球，直径 2~3 mm。

3.2 固定化菌体酶反应动力学

3.2.1 不同温度下反应初速率 V_0 与初始底物(N-Ac-DL-Met)浓度 S_0 的关系

图 2 显示了不同温度下不同初始底物浓度时的反应初速率变化规律。结果表明，随反应温度升高，反应初速率加快，固定化菌体酶反应受高浓度底物的抑制，在底物浓度为 200 mmol/L 时，反应初速率最大，高于此值，反应速率下降，即出现底物抑制。底物浓度在 200~400 mmol/L 的范围内，反应速率随底物浓度增加而缓慢降低。

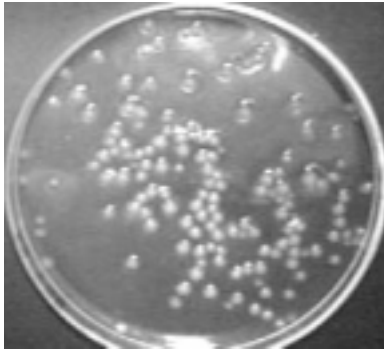


图 1 米曲霉菌球
Fig.1 Pellets of *Aspergillus oryzae*

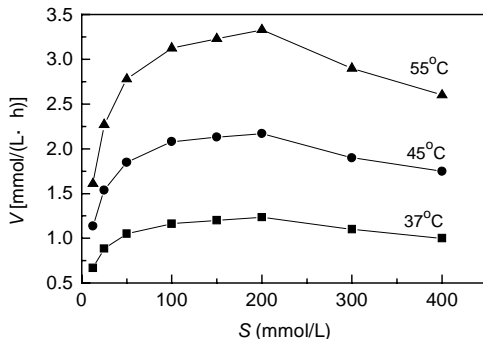


图 2 不同温度下反应初速率与初始底物浓度的关系
Fig.2 Effect of initial substrate conc. on the reaction rate

3.2.2 动力学常数的确定

无底物抑制时酶促反应通常采用 Michaelis-Menten 方程表达： $V=V_m S/(K_m+S)$ ，变形得到 $V^{-1}=V_m^{-1}+K_m/(V_m S)$ ，式中 V 为反应速率， S 为初始底物浓度， V_m 为最大反应速率， K_m 为米氏常数。

将初始底物浓度小于 200 mmol/L(即无底物抑制)的动力学数据代入上式，可得出 V^{-1} 与 S^{-1} 的关系，如图 3 所示。由图可看出，二者基本呈

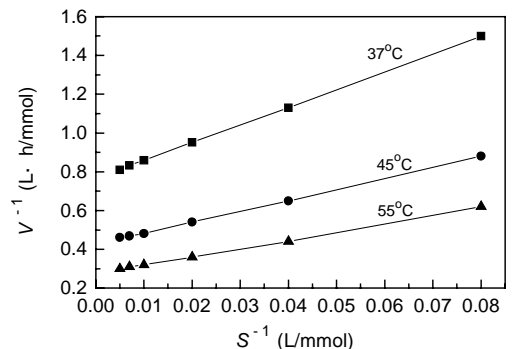


图 3 不同温度下的 V^{-1} 与 S^{-1} 的关系
Fig.3 V^{-1} as a function of S^{-1} at different temperatures

直线关系,说明反应符合 Michaelis-Menten 方程。

由图中直线的斜率和截距计算出不同温度下相应的表观动力学参数列于表 1。由表 1 可以看出,随着温度升高, V_m 增大, K_m 也增大,而且固定化菌体上氨基酰化酶的 K_m 值大于文献^[6]报道的自由酶的 $K_m(5.7 \text{ mmol/L})$,表明在固定化菌体上氨基酰化酶与底物结合变弱。

表 1 不同温度下的表观动力学参数
Table 1 Parameters of apparent kinetics at different temperatures

Temperature (°C)	37	45	55
K_m (mmol/L)	1.3	2.33	3.61
V_m [mmol/(L·h)]	11.91	13.11	15.73

3.3 固定化菌体连续拆分 DL-Met

在 37°C、底物浓度为 200 和 400 mmol/L 时不同体积流量下 L-Met 的转化率如图 4 所示。图 4 表明,随物料流量的增加,转化率随之下降。因为底物浓度小于 200 mmol/L 时不存在底物抑制,当底物浓度为 200 mmol/L 时的拆分效果比 400 mmol/L 时好。但当底物浓度为 400 mmol/L 时,仍有较高的转化率,这是因为底物抑制现象不明显(见图 2),这一特征有利于工业生产。

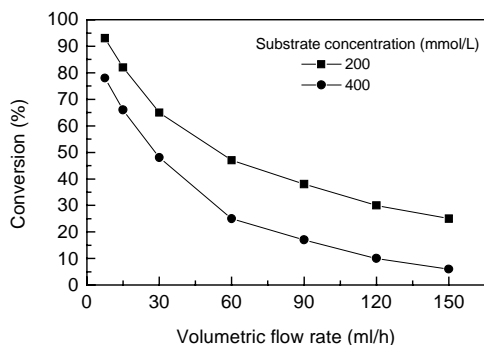


图 4 物料体积流量对 L-Met 转化率的影响
Fig.4 Effects of volumetric flow rate on L-Met conversion

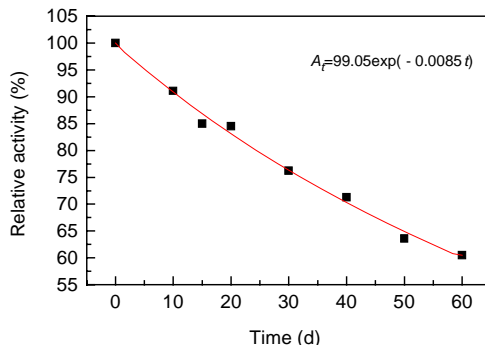


图 5 固定化菌体的操作稳定性
Fig.5 Operational stability of L-aminoacylase immobilized in pellets

图 5 为菌体酶的相对酶活性随操作时间变化的情况。由图可以看出,连续操作 60 d 酶活性保留率为 60%。固定化菌体酶失活性动力学符合一级动力学方程^[7]: $A_t = A_0 \exp(-k_d t)$, 由曲线拟合得方程 $A_t = 99.05 \exp(-0.0085t)$, 则 $k_d = 0.0085 \text{ d}^{-1}$, $t = \ln 2 / k_d = 82 \text{ d}$, 即半衰期为 82 d。

4 结论

(1) 温度和初始底物浓度对固定化米曲霉菌酶反应速率有较大的影响。温度低于 55°C 时,随温度的升高,反应初速率加快;当初始底物浓度高于 200 mmol/L 时则发生底物抑制。

(2) 用固定化米曲霉菌体对高浓度底物连续拆分时,在相同的体积流量下,由于底物浓度大于 200 mmol/L 时会对酶产生抑制,底物浓度为 400 mmol/L 时的转化率比 200 mmol/L 时的转化率低。固定化菌体连续拆分 DL-Met 具有较高的操作稳定性,其半衰期为 82 d。

参考文献:

- [1] Chibata I, Tosa T, Sato T. Production of L-amino Acids by Aminoacylase Adsorbed on DEAE-Sephadex [A]. Mosbach K. Method of Enzymology, Vol. 44 [C]. New York: Academic Press, 1976. 746-759.
- [2] Lee P M, Lee K H, Siaw Y S. Covalent Immobilization of Aminoacylase to Alginate for L-phenylalanine Production [J]. J.

- Chem. Technol. Biotechnol., 1992, 54: 375–382.
- [3] 韩际宏, 姜坪, 王道宾, 等. 氨基酰化酶的固定及其对 DL-蛋氨酸的光学拆分[J]. 离子交换与吸附, 1993, 9: 107–113.
- [4] 宋正孝, 李晓敏, 王诤, 等. 固定化米曲霉菌体细胞光学拆分 DL-丙氨酸 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(1): 168–173.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1982. 160–162.
- [6] 陈陶生, 居乃虎, 陈石根. 固定化酶理论与应用 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1987. 183.
- [7] David F O. Diffusion Influences in Denaturable in Solubilized Enzyme Catalysts [J]. Biotechnol. Bioeng., 1972, 14: 871–884.

Enzymatic Kinetics of Immobilized L-aminoacylase and Its Continuous Resolution of DL-methionine

WANG Shu-hao, LI Xiao-feng, WU Yan-ling, SONG Zheng-xiao, MA Zhong-hai, YUAN Ying-jin

(Dept. Pharm. Eng., School of Chem. Eng. & Technol., Tianjin Univ., Tianjin 300072, China)

Abstract: L-aminoacylase of *Aspergillus oryzae* pellets was immobilized by gelatin and glutaraldehyde. Kinetic constants of L-aminoacylase in immobilized pellets were determined and the optical resolution of DL-methionine by using immobilized *Aspergillus oryzae* pellets was investigated. When substrate concentration was less than 200 mmol/L, there was no substrate inhibition, and the reaction adhered to Michaelis–Menten equation. At 37°C, kinetic constants K_m and V_m were 11.9 and 1.3 mmol/L respectively. L-methionine conversion at volumetric flow rate of 7.5 ml/h with substrate concentration of 200 and 400 mmol/L was 93% and 78% respectively. L-methionine conversion decreased with increasing volumetric flow rate. Half-life of operation of immobilized L-aminoacylase was 82 d.

Key words: immobilized; *Aspergillus oryzae*; L-aminoacylase; kinetics; resolution; L-methionine