

固定化粪链球菌酶法连续生产 L-瓜氨酸

赵艳杰 曾 倡 张淑荣 张 鹏*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 对复合诱变菌株粪链球菌 *Streptococcus faecalis* BT001 进行了固定化, 利用固定化细胞中精氨酸脱亚胺酶转化 L-精氨酸制备 L-瓜氨酸。研究了固定化载体和菌体的配比、反应温度、反应液 pH 等条件对 L-瓜氨酸产量的影响; 通过简易颗粒强度测定仪, 评估了添加不同质量分数的海藻酸钠和改性剂对颗粒强度的影响。结果表明: 当包埋载体海藻酸钠质量分数为 5%, 菌体量为 10%, 改性剂硅藻土为 5%, 聚二甲基硅氧烷为 3%, 反应液 pH 值为 6.5, 反应温度为 35℃ 时, 在改进后的填充床中进行连续反应, 得到的 L-瓜氨酸产量可达 95.6 g/(L·d), 摩尔产率为 95.1%, 且连续反应时间可达 73 d 以上。

关键词: L-瓜氨酸; 固定化细胞; 改性; 强度测定仪; 粪链球菌

中图分类号: Q815

引 言

L-瓜氨酸是一种非蛋白质氨基酸, 在人体中具有多种生理功能, 同时它也是一种天然的抗氧化剂, 因此被广泛用于医药、化妆品、保健食品和食品添加剂行业。

丁威等^[1]以 L-鸟氨酸盐酸盐为原料, 采用化学法制备了 L-瓜氨酸和 L-高瓜氨酸。但是化学法过程控制比较困难, 产品中含有旋光对映体 D-瓜氨酸, 影响产品质量。酶法生产的优点是生产条件温和、不产生有毒物质、转化体系中杂质较少且提取工艺简单。Kakimoto 等^[2]用恶臭假单胞杆菌固定化菌体生产 L-瓜氨酸, 在 37℃ 下, 连续反应 62 h, 能够得到产率为 90.5% 的瓜氨酸。曹瑜等^[3]研究了粪链球菌 *Streptococcus faecalis* NJ 402 的游离细胞转化制备 L-瓜氨酸的工艺条件。郑璞等^[4]采用卡拉胶对假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 进行了固定化, 在填充床反应器中连续运转 54 d, 对底物的摩尔转化率能达到 95% 以上。张鹏等^[5]将粪链球菌 *Streptococcus faecalis* CGMCC1866 细胞采用海藻酸钠包埋法进行固定化生产 L-瓜氨酸, 每 L 反应液产 112 ~ 165 g/L L-瓜氨酸, 固定化细胞使用寿命 960 h。但是添加不同质量分数的固定化载体不仅影响 L-瓜氨酸的产

率而且影响颗粒的强度, 从而影响到细胞能够进行连续反应的时间, 上述文献没有对此进行详细的考察。

本文采用复合诱变菌株粪链球菌 *Streptococcus faecalis* BT001 进行了细胞固定化方法及条件的研究。通过采用实验室自行设计的简易强度测定仪测定固定化颗粒的强度, 更全面的评估了不同固定化材料和条件的结果, 从而有利于确定最终的固定化方法, 并进行连续反应。同时通过对传统的柱式填充床反应器进行改进, 提高了反应效率, 延长了连续化反应的时间。

1 实验部分

1.1 实验菌种、原料和仪器

粪链球菌 *Streptococcus faecalis* BT001 为本实验室保藏的复合诱变菌株; L-精氨酸、二乙酰一肟、十六烷三甲基溴化铵 (CTAB)、磷酸、硫酸、盐酸, 分析纯, 北京市红星化工厂; 乙腈, 色谱纯; 海藻酸钠, 生化试剂, 北京欣经科生物技术有限公司; 聚二甲基硅氧烷 MB50-002, 道康宁公司。

斜面培养基^[6-7] (质量分数): 牛肉粉 3%, 蛋白胨 10%, NaCl 5%, 琼脂 1%, pH 7.0; 发酵培养基: 葡萄糖 2%, 鱼蛋白胨 1%, 酵母膏 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01%, K_2HPO_4 0.5%, 精氨酸 0.5%。

HPS-250 生化培养箱, 哈尔滨市东明医疗仪器厂; HZQ-F 恒温振荡培养箱, 哈尔滨市东联电子技

收稿日期: 2009-11-30

第一作者: 女, 1982 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: zhangpeng@mail.buct.edu.cn

术开发有限公司;722S 可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;填充床反应器,北京市安昌兴达有机玻璃有限公司。

1.2 粪链球菌发酵培养

将斜面菌种用无菌生理盐水冲洗菌苔,摇匀,制成菌悬液。准确吸取 0.5 mL 接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 ℃,170 r/min 振荡培养 20 h。

1.3 细胞固定化及改性方法

将一定质量分数的海藻酸钠加蒸馏水煮沸溶解,冷却后与等体积一定细胞密度的菌悬液混匀,在搅拌条件下用注射器将混合液逐滴滴入 7.5 g/L 硼酸和 20 g/L CaCl₂ 混合溶液中,形成大小均匀的直径为 4~4.5 mm 的固定化凝胶珠,静置 10 h 后取出,过滤。向海藻酸钠溶液中加入不同的添加剂,然后按照上述方法制得固定化细胞颗粒。

1.4 固定化细胞颗粒强度的测定

在吴思方等^[8]的颗粒强度测定方法基础上进行了改进,未将固定化颗粒直径在受力方向上的变化作为测量值,而将第 1 颗小球破裂时的受力之和作为测量值,设计出简易强度测定仪。取 3 颗较圆润的大小均匀的固定化细胞颗粒置于强度测定仪的测定台上,呈正三角形排列,将可滑动的有机玻璃施压板轻轻放下压在小球上。施压台上面放 1 只纸杯(或较轻的烧杯),用滴管向杯中逐滴滴入水,边滴边观察小球变化,当有第 1 颗小球破裂时,停止滴加水,称量纸杯和水的质量,作为小球强度的测量值。每批次称量 10 次,取平均值。实验结果中将强度最大的小球的强度测量值记为 100%,其余均以分数表示。

1.5 L-瓜氨酸含量的测定

根据 L-瓜氨酸在强酸性溶液中与二乙酰一肟的专一显色反应及其反应复合物在 490 nm 处吸光度与 L-瓜氨酸质量浓度呈线性关系的特点,用显色法^[9]对瓜氨酸进行定量测定。

2 结果与讨论

2.1 载体和包埋菌体量的正交试验

为了选择合适的菌体包埋量和海藻酸钠质量分数,使固定化颗粒的体积一定时,L-瓜氨酸的产量达到最大,本文设计了正交实验。在 30 ℃,100 r/min 的摇床中进行反应 2 h,测定不同菌体包埋量和海藻酸钠质量分数下 L-瓜氨酸的产量。正交实验及结

果见表 1。

表 1 L₁₆(4²) 正交实验设计及结果

Table 1 Design and results of the L₁₆(4²) orthogonal test

序号	w(海藻酸钠)/ %	w(菌体细胞)/ %	ρ(L-瓜氨酸)/ g·L ⁻¹
1	3	5	9.203
2	3	10	30.04
3	3	12	21.42
4	3	15	28.01
5	4	5	13.48
6	4	10	29.57
7	4	12	8.594
8	4	15	19.10
9	5	5	9.05
10	5	10	30.30
11	5	12	25.19
12	5	15	27.72
13	6	5	11.85
14	6	10	21.09
15	6	12	26.34
16	6	15	22.40
K ₁	22.168	10.896	
K ₂	17.686	27.75	
K ₃	23.065	20.386	
K ₄	20.42	24.308	
最大值	23.065	27.75	
极差	5.379	16.854	

实验发现,随着海藻酸钠质量分数的增大,固定化颗粒的机械强度也相应增加,但当海藻酸钠质量分数过大时,包埋载体过多,包埋过于紧密,影响底物与产物的扩散,导致瓜氨酸产量下降。同时海藻酸钠质量分数越大,液体黏度越大,不容易与菌悬液混匀,固定化操作困难。当细胞量过大时,固定化细胞的活力也很低,这可能主要是由细胞量过多,载体强度不够,细胞严重泄漏造成的。从瓜氨酸产量和操作性出发,确定包埋条件为海藻酸钠 5%,菌体 10%。

2.2 pH 对 L-瓜氨酸产量的影响

配制不同 pH 条件下的醋酸缓冲液(含 L-精氨酸 10%),使在 35 ℃下反应 5 h,考察 pH 值对游离细胞和含有相同细胞量的固定化细胞的影响,结果

见图 1。细胞经固定化后,其最佳 pH 范围与游离细胞相比基本没有变化,pH 为 6.5 时产物质量浓度最高即相对酶活最高,这说明细胞经包埋固定化后,细胞抗酸、碱的能力没有发生明显的改变。故而采用的固定化细胞转化反应最适 pH 为 6.5。

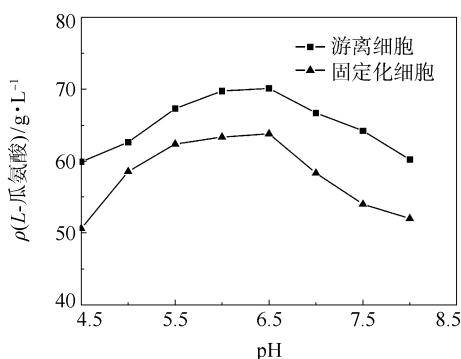


图 1 反应溶液的 pH 值对 *L*-瓜氨酸产量的影响

Fig. 1 The effect of reaction solution pH on the yield of *L*-citrulline

2.3 温度对 *L*-瓜氨酸产量的影响

考察温度对精氨酸脱亚胺酶催化作用的影响。分别测定其在 25 ~ 42 °C 范围内不同温度下,固定化细胞和游离细胞转化反应 5 h 后的情况,结果见图 2。

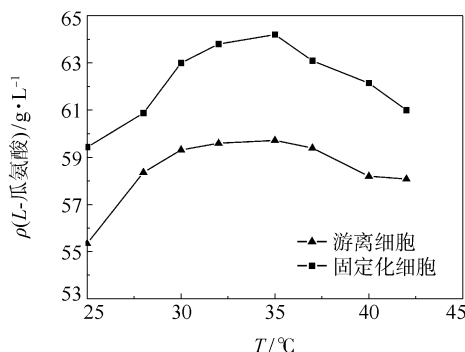


图 2 反应温度对 *L*-瓜氨酸产量的影响

Fig. 2 The effect of reaction temperature on the yield of *L*-citrulline

固定化细胞的温度适应范围与游离细胞十分相似,细胞经包埋固定化后,精氨酸脱亚胺酶的最佳作用温度范围没有发生改变。由图 2 可以看出,温度对酶的催化作用是有一定影响的。在同一反应条件下,一定时间内,在 25 ~ 35 °C 之间,随着温度的升高,相对酶活逐渐增加;在 35 ~ 42 °C 之间,随着温度的增加,酶的催化能力下降,特别是对于固定化细胞,在 41 °C 时,凝胶变软,导致菌体泄漏,从而使酶活下降。因此选择 35 °C 作为固定化细胞的最适转

化温度。

2.4 增强固定化颗粒硬度的改性试验

分别向 5% 海藻酸钠与 10% 菌体的混合液中添加 5% 的 Al_2O_3 , CaCO_3 , MgO 和硅藻土^[10],测定小球的强度,同时各取出菌含量为 1.5 g 的一定体积的小球加入到 50 mL 反应液中置于 35 °C、100 r/min 摇床上进行反应 5 h,测定瓜氨酸质量浓度,与未改性的固定化颗粒比较,结果如图 3 所示。

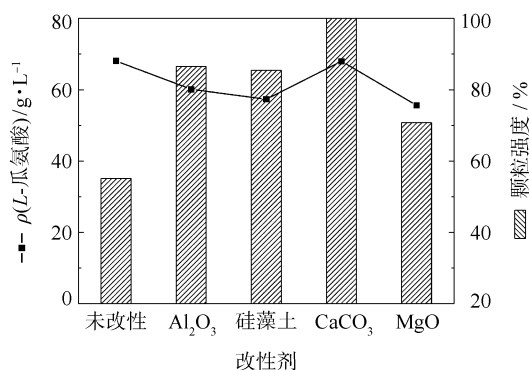


图 3 不同改性剂对 *L*-瓜氨酸产量和固定化颗粒硬度的影响

Fig. 3 The influences of different modifiers on the yield of *L*-citrulline and the strength of the beads

由图 3 可以看出,添加了不同改性剂之后,固定化颗粒的强度较未改性的颗粒有显著的提高。而 *L*-瓜氨酸的产量除添加硅藻土的固定化颗粒之外,其余都有所下降。原因可能是硅藻土相对于其他的改性剂孔隙度更大,吸收性更好。试验之所以将添加剂的质量分数定为 5%,是因为当添加量低于 5% 时,对颗粒硬度的提高效果不够明显,而高于 5% 时,*L*-瓜氨酸的产量较低,且颗粒弹性不够好,所测的硬度同样不够大。

为进一步提高颗粒强度,向添加了硅藻土的固定化颗粒中加入一定质量分数的硅油^[11],试验结果见图 4。随着硅氧烷聚合物质量分数的增大,发现 *L*-瓜氨酸的产量降低,有可能是该聚合物使固定化颗粒的通透性降低,从而影响了酶的活性的发挥。而颗粒的强度在添加量为 5% 时达到最大,之后则逐渐降低。综合试验结果,确定质量分数为 3% 的添加量为最佳。

2.5 固定化粪链球菌细胞颗粒的转化

连续转化实验在改进的反应器内进行。将传统的柱式反应器平放,反应液从柱体上侧小孔加入,从下侧小孔流出,并在轴向切面添加多个可抽离的网状隔层,网格略小于颗粒粒径。反应器规格为 100

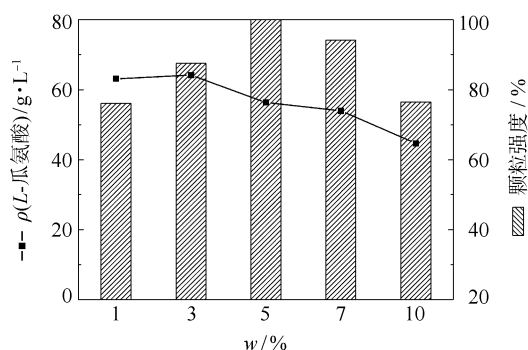


图4 添加不同质量分数的聚二甲基硅氧烷对 *L*-瓜氨酸产量和固定化颗粒硬度的影响

Fig.4 The influences of adding different concentrations of silicone polymer on the yield of *L*-citrulline and the rigidity of beads

mm × 260 mm, 装填体积为 1/2, 即 1020.5 mL, 有效体积为 1020.5 mL。装填含 10% 菌体细胞的固定化颗粒 500 g, 颗粒分层铺开。在反应温度为 35 °C 时, 使用蠕动泵流加含 *L*-精氨酸 100 g/L, pH 值为 6.5 的反应液, 流速为 50 mL/h。每天测定 *L*-瓜氨酸产量, 反应结果如图 5 所示。

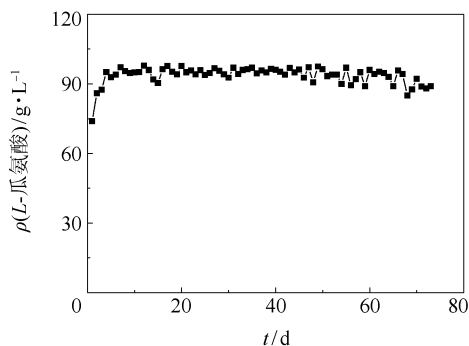


图5 改进型填充床反应器中连续生产 *L*-瓜氨酸

Fig.5 Plot of the production of *L*-citrulline in the modified packed bed reactor

反应 73 d 之后, 固定化细胞颗粒明显变软, 产量下降。在此过程中平均每天产 *L*-瓜氨酸质量浓度 95.6 g/L, 摩尔产率为 95.1%。

3 结论

固定化细胞颗粒的组成为 5% 的载体海藻酸钠, 10% 的菌体量, 5% 的改性剂硅藻土, 3% 的聚二甲基硅氧烷。固定化细胞颗粒填充在改进型的填充床中, 35 °C、pH 6.5 的条件下, 将含 *L*-精氨酸 100 g/L 的反应液以流速 50 mL/h 通过反应器连续反应, *L*-瓜氨酸产量可达 95.6 g/(L · d), 摩尔产率为

95.1%, 且连续反应时间可达 73 d 以上。

参考文献:

- [1] 丁威, 李爱平, 张征林, 等. *L*-瓜氨酸和 *L*-高瓜氨酸的制备[J]. 化工时刊, 2006, 20(2): 16-17.
Ding W, Li A P, Zhang Z L, et al. Synthesis of *L*-Citrulline and *L*-Homocitrulline [J]. Chemical Industry Times, 2006, 20(2): 16-17. (in Chinese)
- [2] Kakimoto T, Shibatani T, Nishimura N, et al. Enzymatic Production of *L*-Citrulline by *Pseudomonas putida* [J]. Applied Microbiology, 1971, 22: 992-999.
- [3] 曹瑜, 李加友, 焦庆才. 酶法转化制备 *L*-瓜氨酸[J]. 精细化工, 2005, 22(10): 759-761.
Cao Y, Li J Y, Jiao Q C. Enzymatic Conversion of *L*-Citrulline [J]. Fine Chemicals, 2005, 22(10): 759-761. (in Chinese)
- [4] 郑璞, 倪晔, 张文, 等. 填充床反应器中固定化假单胞菌细胞连续制备 *L*-瓜氨酸[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 33-38.
Zheng P, Ni Y, Zhang W, et al. Continuous Production of *L*-Citrulline by Immobilized *Pseudomonas* sp. Cells in Packed Bed Reactor [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(5): 33-38. (in Chinese)
- [5] 张鹏, 张淑荣, 刘春巧, 等. 固定化细胞连续生产 *L*-瓜氨酸的方法: 中国, 1948464A [P]. 2006-11-24.
Zhang P, Zhang S R, Liu C Q, et al. The Method to Product *L*-Citrulline by Immobilized Cell: CN, 1948464A [P]. 2006-11-24. (in Chinese)
- [6] 马杰, 行曙光, 何蔚荭, 等. 粪链球菌培养条件的研究[J]. 河南科学, 1998, 16(1): 82-85.
Ma J, Xing S G, He W H, et al. Study on Culture Conditions of *Streptococcus faecalis* [J]. Henan Science, 1998, 16(1): 82-85. (in Chinese)
- [7] 姚海峰, 张淑荣, 欧成武, 等. 粪链球菌转化合成 *L*-瓜氨酸的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 256-258.
Yao H F, Zhang S R, Ou C W, et al. Study on the conversion of *L*-citrulline by *Streptococcus faecalis* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(6): 256-258. (in Chinese)
- [8] 吴思方, 陈九武, 程婉祯. 固定化酵母生物合成酯类的研究[J]. 食品科学, 1997, 18(4): 11-19
Wu S F, Chen J W, Cheng W N. Study of Biosynthesis of Esters by Immobilized Yeast Cells [J]. Food Science, 1997, 18(4): 11-19. (in Chinese)
- [9] 钱嘉南, 孙志浩, 刘宇鹏, 等. 二乙酰-肟-氨基硫脲比色法测定酶转化液中的 *L*-瓜氨酸[J]. 中国医药工

- 业杂志, 2007, 38(7): 519 - 521.
- Qian J N, Sun Z H, Liu Y P, et al. Determination of *L*-Citrulline in Enzymatic Conversion Solution by Diacetylmonoxime-Thiosemicarbazide Colorimetry [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2007, 38(7): 519 - 521. (in Chinese)
- [10] 吕晓猛, 纪树兰, 刘秀荣, 等. 固定化细胞珠体的改性研究[J]. 北京工业大学学报, 1997, 23(1): 87 - 92.
- Ly X M, Ji S L, Liu X R, et al. Study on the Modification of Immobilized Cells[J]. Journal of Beijing Polytechnic University, 1997, 23(1): 87 - 92. (in Chinese)
- [11] Kawakami K, Tsuruda S, Miyagi K. Immobilization of Microbial Cells in a Mixed Matrix of Silicone Polymer and Calcium Alginate Gel: Epoxidation of 1-Octene by *Nocardia corallina* B-276 in Organic Media[J]. Biotechnology Progress, 1990, 6: 357 - 361.

Enzymatic and continuous production of *L*-citrulline by immobilized *Streptococcus faecalis* cells

ZHAO YanJie ZENG Chang ZHANG ShuRong ZHANG Peng

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The optimal conditions for immobilization of *Streptococcus faecalis* BT001, an induced composite strain which is conserved by our lab, have been studied. The optimum conditions were found to be 5% sodium alginate, 10% cells, 5% diatomite and 3% methyl silicone. The arginine de-imine enzyme which was contained in the cells of *Streptococcus faecalis* can act as a catalyst for the conversion of *L*-arginine into *L*-citrulline. The optimum conditions for production of *L*-citrulline in a modified packed bed reactor were also studied: at 35 °C, with a reaction solution containing 100 g/L *L*-arginine added at a speed of 50 mL/h, the daily output of *L*-citrulline reached 95.6 g/L, with a molar yield of 95.1%. The yield remained stable for as long as 73 days.

Key words: *L*-citrulline; immobilized cells; modification; bead strength analyzer; *Streptococcus faecalis*