



## DL-ATC 对 TS1138 菌株酶法生产 L-半胱氨酸的影响

李梅, 黄磊, 怀利华, 陈宁

(天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 以假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) TS1138 菌株为供试菌株, 研究了在转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸过程中, DL-ATC 对产酶和转化的影响. 结果表明: DL-ATC 对 TS1138 菌株产酶具有诱导作用, 产酶培养中必须适量添加. 从 L-半胱氨酸的产量和 DL-ATC 转化率两个方面综合考虑, 酶法生产 L-半胱氨酸的最适 DL-ATC 为  $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 采用间歇流加 DL-ATC 方式可使 L-半胱氨酸的产量提高 56.25%.

**关键词:** DL-ATC; 酶活力; L-半胱氨酸

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 02-0027-03

## Effect of DL-ATC on the Production of L-Cysteine with Enzymatic Method by *Pseudomonas sp.* TS1138

LI Mei, HUANG Lei, HUAI Li-hua, CHEN Ning

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** L-cysteine is an elementary S-containing amino acid, which has been widely used in medicines, food additives, and cosmetics. Effect of DL-ATC on the conditions of enzyme production process by *Pseudomonas sp.* TS1138 and enzymatic transformation of L-cysteine was discussed. The results show that DL-ATC add in the medium has an inducible impact on enzyme production. On account of the interaction of the L-cysteine yield and conversion ratio of DL-ATC, the optimal concentration of DL-ATC is confirmed at about  $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The L-cysteine yield is increased by 56.25% with the DL-ATC interval feeding method.

**Keywords:** DL-ATC; enzymatic activity; L-cysteine

L-半胱氨酸是一种重要的含硫氨基酸, 它的存在可以保持蛋白质的稳定性, 同一条或不同条多肽链两个 L-半胱氨酸残基间以二硫键 (S—S) 连接, 使蛋白质具有稳定的空间立体结构<sup>[1]</sup>, 在医药、化妆品和食品添加剂等行业具有广泛的用途<sup>[2]</sup>. 目前国内该产品的生产主要采用人或动物毛发原料先经酸水解或碱水解法提取 L-胱氨酸后, 再经过电解还原制得 L-半胱氨酸<sup>[3]</sup>, 但该方法收率低, 水解过程产生大量刺激性气体, 废液处理困难. 利用微生物法生产胱氨酸和半胱氨酸已成为人们研究和关注的方向, 一些细菌特别是假单胞菌有不对称水解 DL-ATC (DL-2-氨基-

$\Delta^2$  噻唑啉-4-羧酸) 合成 L-半胱氨酸的能力<sup>[4]</sup>. 以 DL-ATC 为原料采用转化法生产 L-半胱氨酸具有工艺简单、周期短、产率高、消耗低等特点<sup>[5]</sup>. 我国已有生产 DL-ATC 的厂家, 因此对微生物酶法转化 DL-ATC 合成 L-半胱氨酸进行研究具有重要意义. 本文主要研究 DL-ATC 在产酶和转化两个过程中的作用.

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) TS1138, 由南开大

收稿日期: 2007-09-27; 修回日期: 2007-12-11

基金项目: 天津市科委应用基础研究重点基金资助项目(05YFJZJC00901)

作者简介: 李梅 (1981—), 男, 河南新乡人, 硕士研究生.

学生命科学学院微生物研究室提供。

### 1.2 培养基 (g·L<sup>-1</sup>)

完全培养基: 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 5, NaCl 5, pH 7.2 ~ 7.5, 0.1MPa 灭菌 20 min.

产酶培养基: 葡萄糖 30, 蛋白胨 10, 酵母粉 15, DL-ATC·3H<sub>2</sub>O 5.0, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, NaCl 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.0, pH 8.0, 0.1 MPa 灭菌 15 min. 尿素 3, 0.075 MPa 单独灭菌。

### 1.3 培养方法

种子培养: 接一环生长良好的斜面菌苔至装有 30 mL 完全培养基的 500 mL 摇瓶中, 于旋转式摇床 190 r·min<sup>-1</sup>, 29 °C 振荡培养 12 h.

产酶培养: 以 10% 接种量将上述活化培养液接入装有 30 mL 产酶培养基的 500 mL 摇瓶中, 于旋转式摇床 190 r·min<sup>-1</sup>, 29 °C 振荡培养。

酶促反应: 底物溶液 (DL-ATC·3H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 与细胞酶液按 2 : 1 体积比在 42 °C 水浴中反应。

### 1.4 分析方法

酶活力测定: 见参考文献[6].

菌体浓度测定: 用蒸馏水稀释 20 倍, 用 752 分光光度计在 620 nm 波长下测定吸光度。

L-半胱氨酸的测定: 采用酸式茚三酮法<sup>[7]</sup>。

DL-ATC 含量的测定: 采用高效液相色谱定量测定。色谱条件: 色谱柱 C<sub>18</sub>, 5μL, 250 mm×4.6 mm; 流动相 V (乙腈) : V (水) = 50 : 50; 检测波长 217 nm; 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 20 μL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶活力与菌体浓度的关系

摇瓶产酶培养, 每隔 2 h 取样, 测菌体 A<sub>620</sub> 值和细胞的酶活力, 酶活力和菌体浓度的关系见图 1。

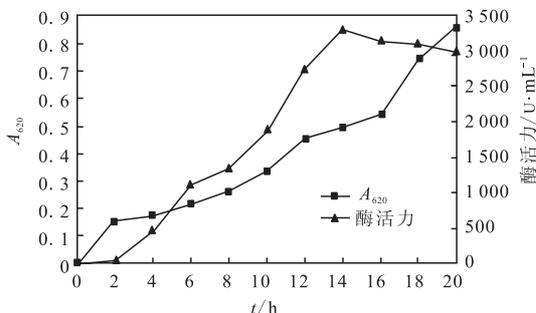


图 1 产酶培养中菌体浓度和酶活力关系

Fig. 1 Relation of cell concentration and enzyme activity

从图 1 可以看出: 随着菌体生长, 菌体酶活力逐渐变大, 但 14 h 后菌体虽然继续生长, 而酶活力不再

变大. 因此, 产酶培养时间应在 14 h 左右。

### 2.2 DL-ATC 含量对细胞产酶的影响

TS1138 菌株来源于富含 DL-ATC 的环境, 能以 DL-ATC 作为唯一的碳氮源进行生长, 本研究考察了产酶培养基中 DL-ATC 含量对细胞产酶的影响, 培养时间为 14 h, 结果如图 2 所示。

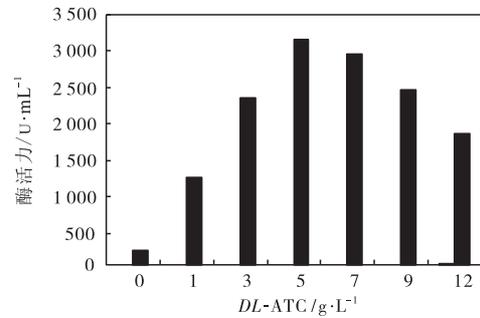


图 2 DL-ATC 含量对产酶的影响

Fig. 2 Impact of DL-ATC concentration on enzyme production

从图 2 可以看出: 产酶培养基中不添加 DL-ATC, 菌体的酶活力较小; 而添加 DL-ATC 后菌体酶活力较高. 因此, DL-ATC 对 TS1138 菌株产酶具有诱导作用. 随着 DL-ATC 含量的增加, 酶活力呈现上升趋势, 但当 DL-ATC 含量超过 7 g·L<sup>-1</sup> 时, 酶活力明显下降. 为了获得酶活力较高的酶源细胞, 产酶培养基中 DL-ATC 的最适含量为 5 g·L<sup>-1</sup>。

### 2.3 DL-ATC 含量与 TS1138 菌株酶活力的关系

在 5 L 罐上进行培养, 每隔 1 h 取样, 测定 DL-ATC 的含量和菌株的酶活力, 实验结果如图 3 所示。

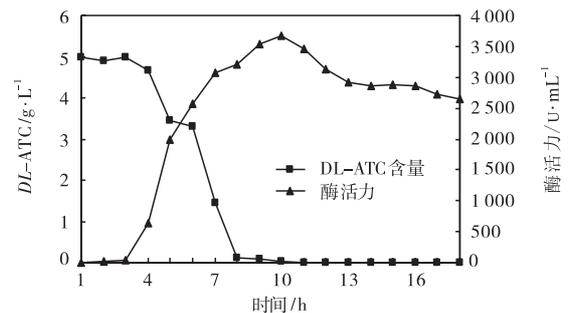


图 3 酶活力与 DL-ATC 含量的关系

Fig. 3 Relation of enzyme activity and DL-ATC concentration

由图 3 可知: TS1138 菌株酶活力在 5 L 发酵罐上培养 10 h 最高. 培养 8 h 后发酵液中基本测不出 DL-ATC, 而菌株酶活力 10 h 时不再上升, 并有下降的趋势. 由此可知, 当 DL-ATC 被利用完后, TS1138 菌株不再合成转化 DL-ATC 为 L-半胱氨酸所需的相关酶。

## 2.4 DL-ATC含量对目的产物L-半胱氨酸产量和转化率的影响

不同的底物含量对目的产物L-半胱氨酸产量和转化率的影响如图4所示。

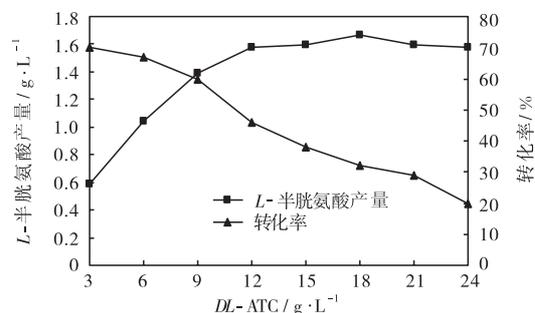


图4 DL-ATC含量对目的产物L-半胱氨酸产量和转化率的影响

Fig. 4 Impact of DL-ATC concentration on L-cysteine concentration and transformation ratio

由图4可知:在底物含量较低(3~9 g·L<sup>-1</sup>)时,目的产物L-半胱氨酸随着底物含量的增加而迅速增加;随着底物含量继续增大,L-半胱氨酸增加量变小.转化率随着底物含量的增加呈逐步下降趋势,在底物含量>9 g·L<sup>-1</sup>后,转化率越来越低.从产物产量和转化率两个方面综合考虑,酶法生产L-半胱氨酸的最适DL-ATC为9 g·L<sup>-1</sup>.

## 2.5 流加DL-ATC对合成L-半胱氨酸的影响

DL-ATC含量9 g·L<sup>-1</sup>的溶液800 mL与400 mL细胞酶液进行酶促反应.根据DL-ATC消耗情况在酶促反应10、20、35、50 min分别加入240 g·L<sup>-1</sup>的DL-ATC 6 mL、12 mL、6 mL、6 mL(加入DL-ATC的量相当于初始浓度为18 g·L<sup>-1</sup>).在不同的反应时间测定L-半胱氨酸的产量,结果见图5.

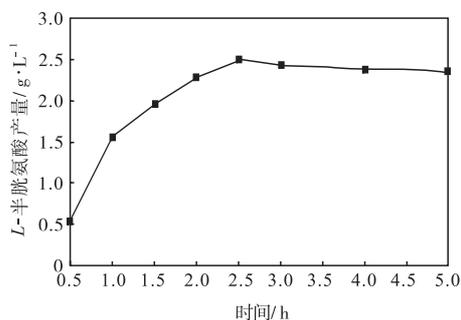


图5 间歇流加合成L-半胱氨酸曲线

Fig. 5 Time course of the L-cysteine Production by interval feeding method

由图5可以看出,酶促反应2.5 h后得到的L-半胱氨酸产量最高,为2.5 g·L<sup>-1</sup>.由图4可知,当底物初始浓度为18 g·L<sup>-1</sup>时,L-半胱氨酸的产量仅为1.6 g·L<sup>-1</sup>.这可能是由于DL-ATC初始浓度过高抑制了酶的活性,而间歇流加DL-ATC使其浓度维持在较低水平,降低了对酶活性的抑制作用,从而使目的产物L-半胱氨酸的产量提高。

## 3 结论

DL-ATC对TS1138菌株产酶具有诱导作用,产酶培养中须适量添加.产酶培养基最适的DL-ATC添加量为5 g·L<sup>-1</sup>.随着DL-ATC被菌株利用完,菌株不再合成转化DL-ATC为L-半胱氨酸所需的相关酶.从L-半胱氨酸的产量和转化率两个方面考虑酶法生产L-半胱氨酸的最适DL-ATC为9 g·L<sup>-1</sup>,采用间歇流加DL-ATC方式可以使目的产物L-半胱氨酸的产量提高56.25%。

## 参考文献:

- [1] 陈新谦. 新编药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982:483.
- [2] 金永杰,杨文博,刘忠,等. 假单胞菌TS1138 L-半胱氨酸脱巯基酶的纯化和性质研究[J]. 南开大学学报:自然科学版, 2004, 37(4): 100—104.
- [3] 王普,吕国英,梅建凤. 微生物转化DL-ATC生产L-半胱氨酸菌种筛选及产酶条件研究[J]. 药物生物技术, 2005, 12(5): 303—307.
- [4] Sano K, Mitsugi. Enzymatic production of L-cysteine from DL-2-amino- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic acid by *Pseudomonas thiazolinophilum*: optimal conditions for the enzyme formation and enzymatic reaction[J]. Agric Biol Chem, 1978, 42: 2315—2321.
- [5] 何璧梅,杨金奎. 微生物方法生产L-半胱氨酸的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(4): 179—182.
- [6] 怀丽华,寇广会,周昌平,等. 碳氮源对酶法合成L-半胱氨酸的影响[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 85—87.
- [7] 张承圭. 生物化学仪器分析及技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1990: 119.