

L- 苯丙氨酸解氨酶产生菌分离及酶促反应研究

李楠, 熊彬, 张云开, 郑孝贤, 梁智群*
(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘 要: 从土壤中分离出具有较高活力的苯丙氨酸解氨酶产生菌株——酵母菌 SA1。对其酶的诱导合成以及转化肉桂酸生产 L- 苯丙氨酸条件进行了优化。结果表明, L- 苯丙氨酸、L- 酪氨酸、L- 异亮氨酸作为诱导物及联合使用均能提高 L- 苯丙氨酸解氨酶的酶活力单位, 其中 L- 酪氨酸的诱导性最好; 最佳酶促反应条件为: 2.0% 反式肉桂酸, 碳酸氢铵:氨水(W:V)=4:4, pH10.6, 34℃, 反应时间 8h; 在转化体系中添加甘油对酶活力有较好的保护作用。

关键词: L- 苯丙氨酸; L- 苯丙氨酸解氨酶; 反式肉桂酸

Isolation of Phenylalanine Ammonia-lyase Producing Strains and Properties of Its Enzyme

LI Nan, XIONG Bin, ZHANG Yun-kai, ZHENG Xiao-xian, LIANG Zhi-qun*
(Institute of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The yeast strain with high activity of producing phenylalanine ammonia-lyase, SA1, was screened from soil. The optimum enzyme productivity and conditions for the conversion of trans-cinnamic acid into L-phenylalanine were determined. The results showed that the production of enzyme was kept high by addition of L-phenylalanine, L-tyrosine and isoleucine, where L-tyrosine was optimum. The optimal parameters of the conversion reaction were: 2.0% trans-cinnamic acid, $\text{NH}_4\text{HCO}_3:\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (W:V)=4:4, pH10.6, 34℃, and the time of reaction 8h. The enzyme activity was kept stable by the addition of glycerol.

Key words: L-phenylalanine; phenylalanine ammonia-lyase; trans-cinnamic acid

中图分类号: Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0074-04

L-苯丙氨酸(L-phenylalanine)是具有生理活性的芳香族氨基酸, 是人体和动物必需氨基酸之一。在食品加工行业中, 可添加于焙烤食品中, 除可强化 L- 苯丙氨酸的寄养作用外, 还与糖类发生氨基-羧化反应以改善食品香味。在医药行业中, L- 苯丙氨酸是氨基酸类药物, 用于制备氨基酸输液、综合氨基酸制剂及营养强化剂。其还是某些氨基酸类抗癌药物的中间体, 也是生产肾上腺素、甲状腺素和黑色素的原料。目前, L- 苯丙氨酸的最具潜力的应用领域是作为合成新型甜味剂阿斯巴甜的原料。

L- 苯丙氨酸的生产方法主要有四种: 提取法、化学合成法、微生物直接发酵法、酶法。酶法生产 L- 苯丙氨酸主要有: 通过转氨酶由 L- 苯丙酮酸生成 L- 苯丙氨酸; 用氨基酰化酶由 N- 乙酰-DL- 苯丙氨酸生产 L- 苯丙氨酸; 利用 L- 苯丙氨酸脱氢酶由苯丙酮酸生产 L- 苯

丙氨酸; 由海因生产 L- 苯丙氨酸; 由 L- 苯丙氨酸解氨酶(PAL)转化肉桂酸生产 L- 苯丙氨酸。其中 PAL 酶法生产 L- 苯丙氨酸最具研究价值。

本文从土壤中分离出具有 L- 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的菌株 SA1, 研究了该菌株的 L- 苯丙氨酸解氨酶诱导合成和转化条件。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

用于菌株的分离筛选, 从广西的肉桂种植园、果园等地采集。

1.2 主要试剂

L- 苯丙氨酸、L- 酪氨酸、反式肉桂酸(Sigma 公司产品), NaCl、 K_2HPO_4 、L- 异亮氨酸、戊二醛、甘油、D- 山梨酸等均为分析纯。

收稿日期 2004-12-07

*通讯作者

作者简介: 李楠(1969-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为微生物学。

1.3 培养基

1.3.1 基础培养基(%)

葡萄糖 2, (NH₄)₂SO₄ 1, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄ • 7H₂O 0.02, FeSO₄ • 7H₂O 0.006, CaCl₂ 0.002。

1.3.2 产酶培养基(%)

酵母膏 1, 蛋白胨 1, MgSO₄ • 7H₂O 0.02, FeSO₄ • 7H₂O 0.006, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.1, 酪氨酸 0.04, pH6.0。

1.4 菌体收集

液体培养完毕将发酵液于-4℃下, 5000r/min离心10min, 弃上清液, 用生理盐水冲洗菌体, 在-4℃、5000r/min下离心10min, 最后再收集菌体。

1.5 酶底物溶液

参照Yamada实验方法^[1]: 704mg反式肉桂酸溶于45ml的28%氨水中, 用硫酸调pH10.0, 定容至80ml。

1.5 方法

1.5.1 L-苯丙氨酸解氨酶酶活力检测^[2]

将待测样品洗涤离心后, 悬浮于25mmol Tris-盐酸缓冲液(pH8.8)中。取0.25ml该细胞悬液与4.75ml的25mmol L-苯丙氨酸, 25mmol Tris-盐酸缓冲液(pH8.8), 0.005%十六烷基氯化吡啶液体混合, 30℃转化10min在271nm下检测反式肉桂酸的生成量。

2 结果与分析

2.1 L-苯丙氨酸解氨酶产生菌的筛选

2.1.1 初筛

在基础培养基中分别加入L-苯丙氨酸, L-酪氨酸(L-Tyr)作为选择培养基。然后将采集的土样做成悬浮液涂布于平板上, 30℃培养。将在各平板上生长的菌株转接到产酶培养基中培养, 最后进行酶活力检测。根据酶活力的大小, 挑选出11株活力较高的菌株进行复筛。

2.1.2 复筛

将初筛中具有较高L-苯丙氨酸解氨酶酶活力的菌株在32℃下液体培养3d, 然后离心收集菌体, 把菌体置于酶底物溶液中转化, 最后用纸层析方法^[3]检测L-苯丙氨酸的产生量。结果如表1。从比较实验中可以看出, 酵母SA1具有较高的转化能力, 故选择其为出发菌株。

2.2 诱导物对产酶的影响

由Yamada报道^[1]可知, L-苯丙氨酸解氨酶为诱导酶, 只有在加入诱导物时才能从无到有地合成。在产酶培养基中加入不同诱导物, 32℃培养3d, 然后进行酶活检测, 实验结果见表2。结果表明, L-苯丙氨酸解氨酶为诱导酶, L-苯丙氨酸(L-Phe)、L-酪氨酸(L-Tyr)、L-异亮氨酸(L-Ile)作为诱导物及联合使用均能提高

表1 不同菌株的转化能力比较

Table 1 Comparison of the conversion produce L-phe by various microorganisms

菌株	种属	L-苯丙氨酸生成量
FA1	霉菌	+
FR3	酵母菌	++
FS1	细菌	+
MC2	霉菌	+
MG1	霉菌	+
NA3	霉菌	++
NB3	霉菌	++
PA1	霉菌	+
SA1	酵母菌	++++
SB2	细菌	+
YC2	酵母菌	+

注: ++++表示L-苯丙氨酸斑点大, 产生量大; +表示L-苯丙氨酸斑点小, 产生量小。

PAL的酶活力单位。其中L-酪氨酸与其它诱导物相比较有着价格低而诱导性好的特点, 因此选用L-酪氨酸作为最佳诱导物。

表2 不同诱导物对产酶的影响

Table 2 Effect of different inducers on enzyme activity

诱导物	用量(%)	相对酶活(U)
L-Phe	0.10	161
L-Tyr	0.04	189
Ile	0.10	126
L-Phe+L-Tyr	0.05+0.02	166
L-Phe+Ile	0.05+0.05	152
L-Tyr+Ile	0.02+0.05	145
空白	—	100

注: 酶活力单位(U)定义为: 在本实验条件下, 每分钟转化L-Phe生成1μmol的反式肉桂酸所需要的酶量。

2.3 酶促反应条件的优化

2.3.1 最适反应温度

温度对酶活力影响较大, 本实验分别在30、32、34、36、38℃水浴中进行转化反应, 然后检测肉桂酸的转化率。结果见图1。结果表明, 在34℃时酶有最适应温度, 转化率28.6%。

2.3.2 最适pH的确定

由于肉桂酸在中性环境下不溶于水(冷水中溶解度仅为0.05%), 易溶于碱性溶液, 所以反应体系中的pH为碱性。用硫酸将酶底物溶液pH分别调成9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0, 然后将菌体洗入进行转化实验, 最后检测肉桂酸转化率。结果见图1。结果表明, 在pH10~11转化率保持较高值, 过高的pH值会加速酵母菌的自溶及PAL的失活, 使转化率下降, 所以在转化体系pH保持在10到11之间比较适宜。

2.3.3 底物最佳浓度的确定

分别在肉桂酸浓度为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、

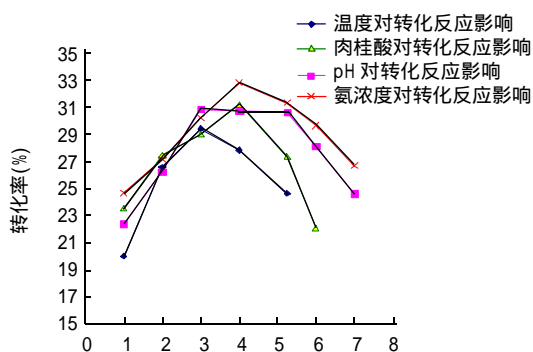


图1 温度、pH、底物浓度及氨浓度对转化反应的影响

Fig 1 Effect of temperature, pH, consistency of substrate and $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ on transformation

2.5%、3.0% 的酶底物溶液中进行转化实验, 然后检测肉桂酸的转化率。结果见图 1。结果表明, 当反式肉桂酸浓度为 2.0% 时, 有最大的转化率为 31.2%。当反式肉桂酸浓度过大时转化率急剧下降, 表明过量反式肉桂酸对 PAL 有强烈的抑制作用。

2.3.4 氨浓度对转化的影响

由于 PAL 转化肉桂酸生成 L- 苯丙氨酸的反应体系倾向于逆反应^[4]。根据热力学理论可知提高 NH_4^+ 浓度反应有利于 L- 苯丙氨酸合成。在转化体系中加入不同量氨水, 使氨浓度分别为: 2、3、4、5、6、7、8 mol/L, 然后用硫酸调 pH 10.5, 进行转化实验。结果见图 1。结果表明, 氨浓度由 2 mol/L 增加到 5 mol/L 时, 转化率有所提高, 但再增加氨水转化率就趋于下降, 说明氨浓度过高会致使酶失活。所以在转化体系中, 氨浓度采用 5 mol/L 较为适宜。

2.3.5 碳酸氢铵与氨水的不同配比对转化反应的影响

根据李清彪^[5]等人的报道, 高氨水浓度对 PAL 有强烈的抑制作用, 而用铵盐替代氨水作为 NH_4^+ 供体有很好的效果, 其中碳酸氢铵的替代效果最好。在 pH 10.0~11.0、氨浓度为 5.0 mol/L 下, 用不同的碳酸氢铵与氨水配比, 进行转化实验, 结果见表 3。结果表明: 当碳酸氢铵与氨水配比为 4:4 时, PAL 有较好的稳定性, 出现了最大的转化率。

表3 碳酸氢铵与氨水的配比对转化反应的影响
Table 3 Effect of $\text{NH}_4\text{HCO}_3:\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ on transformation

碳酸氢铵:氨水(W:V)	pH	转化率(%)
4:1	10.1	26.8
4:2	10.3	30.2
4:3	10.4	34.1
4:4	10.6	36.2
4:5	10.8	35.9

2.3.6 酶促反应时间的确定

按上述最佳酶促反应条件进行转化实验, 其过程曲

线见图 2。实验结果表明, 在反应过程中, 初始反应速度最快, 到 3 h 后速度减慢, 到第 7 h 反应基本达到平衡, 转化率为 36.3%, 第 8 h L- 苯丙氨酸积累量达最大值 7.30 g/L, 这时转化达到平衡。酶促反应时间定为 8 h。

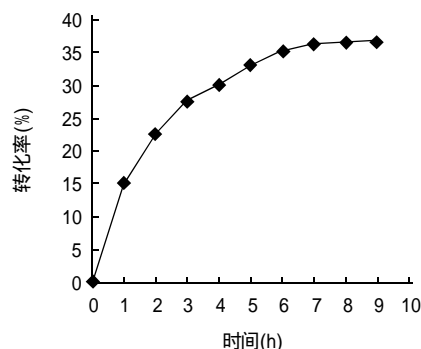


图2 时间与转化率的关系

Fig.2 Relation of time and transformation

2.3.7 几种有机溶剂对酶活力的稳定性影响

将一些常规的有机稳定剂添加到转化体系中, 检测 PAL 的酶活性。实验表明: 戊二醛、甘油、D- 山梨酸对胞内 PAL 都起稳定作用, 其中甘油对改善和保护酶活有很好的效果, 见表 4。

表4 稳定剂对酶活力的稳定性影响
Table 4 Stabilizing agents influence enzyme activity

添加物	相对酶活(%)
戊二醛	112.5
甘油	191.6
聚乙二醇	99.8
D- 山梨酸	121.3
空白	100

3 结 论

在 L- 苯丙氨酸选择培养基上菌株经过一系列转氨或脱氨方式利用 L- 苯丙氨酸, 所以筛选出的菌株 PAL 活性阳性检出率较低。而 L- 酪氨酸作为 L- 苯丙氨酸的结构类似物是 PAL 不良底物, 微生物能在 L- 酪氨酸培养基上生长良好必然是其提高了 PAL 酶活以弥补对 L- 酪氨酸的高 K_m 值的结果。实验结果也证实了在 L- 酪氨酸培养基上筛选出的菌株有较高的 PAL 活性阳性检出率。

转化底物肉桂酸对 PAL 有强烈的抑制作用, 肉桂酸的加入量不宜过多, 这使转化液中产物的积累浓度有限, 今后的研究应该考虑通过流加肉桂酸和提高 L- 苯丙氨酸解氨酶稳定性等方法来延长酶的作用时间从而增大 L- 苯丙氨酸积累量。

本实验以 L- 酪氨酸作为选择性培养基进行 L- 苯丙氨酸解氨酶产生菌筛选, 具有快速、高效的特点, 所分

天然桑椹红色素体外清除自由基活性的研究

徐建国^{1,2}, 田呈瑞¹, 胡青平¹

(1. 山西师范大学食品工程系, 山西 临汾 041004;

2. 陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘要: 采用超氧阴离子自由基体系、羟基自由基体系、过氧化氢自由基体系、烷基自由基引发的亚油酸氧化体系及DPPH(二苯代苦味酰肼自由基)自由基体系对桑椹红色素的清除自由基活性进行了研究, 并同VC进行了比较。结果表明, 桑椹红色素对这几种自由基均有不同程度的清除作用, 其对超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢自由基的清除能力较好, 且高于VC。清除DPPH自由基的能力低于VC。在所选浓度范围内, 清除烷基自由基的能力不明显, 和VC相当, 清除率均低于50%。桑椹红色素是一种很好的天然自由基清除剂。

关键词: 桑椹红色素; 清除; 自由基

Study on Scavenging Capacity of Free Radical by Natural Mulberry Red Pigment in vitro

XU Jian-guo^{1,2}, TIAN Cheng-rui¹, HU Qing-ping¹

(1. Department of Food Engineering, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

2. Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: By using the superoxide radical system, hydroxyl radical system, H₂O₂ radical system, oxidation system of linolic acid induced by alkane radical and system of DPPH, the antioxidant activities of mulberry red pigment were studied and compared with VC. The results showed: the mulberry red pigment had different scavenging effects in these radical systems, and the scavenging capacity of mulberry red pigment in the superoxide radical system, hydroxyl radical system and H₂O₂ radical system showed good performance and its scavenging capacity was stronger than VC. The scavenging capacity to DPPH was lower than VC. In the selected concentration range, its capacity to alkane radical was not obvious, and almost equal to VC, with scavenging rate lower than 50%. Mulberry red pigment hence was a good kind of natural radical scavenger.

Key words: mulberry red pigment; scavenging; free radical

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0077-05

收稿日期: 2004-12-27

作者简介: 徐建国(1971-), 男, 讲师, 硕士研究生, 主要从事果蔬加工及植物资源开发利用研究。

离出的酵母SA1菌株有着良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Yamada S, Nabe K, Izeo N, et al. Production of L-phe from trans-cinnamic acid with Rhodotorula glutinis containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity[J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 42(5): 773-778.
- [2] James F Kane, Michael J Fiske. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase in rhodotorula glutinis[J]. J Bacteriol,

1985, 161(3): 963-966.

- [3] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1998. 48-50.
- [4] Evans CT, Conard D, Hanna K. Stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 25(5): 399-405.
- [5] 李清彪, 等. 反应条件下苯丙氨酸解氨酶的活力稳定性[J]. 生物工程学报, 1996, 12(3): 340-344.