文章编号:1009-038X(2003)06-0042-04

微生物发酵合成^{15}N-L-脯氨酸

侯静华， 孙建春
(上海化工研究院新型材料研究所 上海 200062)

摘 要：采用含有稳定同位素^{15}N-氯化铵为主要氮源的专用发酵培养基配方和相应的提取精制条件，采用微生物直接发酵方法研制^{15}N-L-脯氨酸高丰度产品. 结果显示，每克^{15}N-氯化铵实际可得 0.376 g ^{15}N-L-脯氨酸，提取精制得率最高达 65.76 %，产品^{15}N 丰度达 98.28%，比原料下降 1.23%.

关键词：^{15}N-L-脯氨酸；生物合成；离子交换；提取
中图分类号：TQ 922.9 **文献标识码**：A

Biosynthesis of ^{15}N-L-Proline by Fermentation

HOU Jing-hua， SUN Jian-chun
(New Material Department, Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China)

Abstract: ^{15}N-L-Proline was prepared by fermentation in a specific nutrient medium containing ^{15}N-ammonium chloride and growth stimulants, and with subsequent isolation and purification of ^{15}N-L-Proline from fermentation liquid. 0.376 gram ^{15}N-L-Proline was produced for one gram of ^{15}N-ammonium chloride. The best purification yield reached 65.76 %. The enrichment of ^{15}N-L-Proline was 98.28%, and that is 1.23% lower than ^{15}N-ammonium Chloride.

Key words: ^{15}N-L-Proline; biosynthesis; ion exchange; isolation

L-脯氨酸(Pro)，又称四氢吡咯-2-羧酸，是构成蛋白质的 20 种基本氨基酸之一. 它的分子式为 $HN(CH_2)_3CHCOOH$，相对分子质量为 115.13，分解温度 222 ℃，等电点 6.30，属于杂环族氨基酸，具有香甜味，易溶于水和乙醇，在医药、农业、化工及食品等方面有着广泛的用途，尤其是在医药上用来配制氨基酸输液，又可用于合成抗高血压药物和治疗帕金森氏症的多肽类药物[1,2]. 因此^{15}N-L-脯氨酸作为一种对人体无辐射危害、损伤的示踪剂，在医学、药物学、农业科学、生命科学等许多领域的研究中将得到极为广泛的应用. 国内有关发酵法生产 L-脯氨酸的报道也不少[3~5]，而 ^{15}N-L-脯氨酸的研制目前国内尚属空白，国外已有^{15}N-L-脯氨酸产品面市，但仅见到一篇文献[6]报道了用有机合成法制备^{13}C、^{15}N 双标记的的 L-脯氨酸，该方法步骤多，副产物也不少. 作者采用微生物直接发酵法得到发酵液，再加以提取精制研制成^{15}N-L-脯氨酸高丰度产品. 经过多次发酵试验和提取精制条件试验，获得了适合研制^{15}N-L-脯氨酸实验室规模的稳定操作的工艺条件.

收稿日期:2003-06-05； **修回日期**:2003-07-30.
作者简介：侯静华(1971-)，女，上海人，工程师，工学学士.
万方数据

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌种　脯氨酸产生菌——嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*) ZQ-3 (SG^r, Suc^g, DHP^r).

1.1.2　^{15}N 发酵培养基　组分(g/L):葡萄糖 145,玉米浆 20,K_2HPO_4 1.0,$MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5,NaCl 31,$^{15}NH_4Cl$ 30,$CaCO_3$ 40. pH 7.2.

1.1.3　树脂及试剂　阳离子树脂 1#～3#、阴离子树脂 1#～2#为上海树脂厂产品;标准脯氨酸及氨水等试剂为上海化学试剂公司产品.

1.2　实验方法

1.2.1　^{15}N-L-脯氨酸发酵工艺　ZQ-3(SG^r, Suc^g, DHP^r)菌株活化到斜面上,于 30 ℃培养后接入种子培养基,振荡培养 11 h 后,以 4%接种量接入发酵培养基,再振荡培养 96 h,得发酵液,合并.

1.2.2　^{15}N-L-脯氨酸提取工艺　发酵液调 pH,离心所得上清液上阳离子树脂柱,洗脱后真空浓缩得脯氨酸及杂酸粗品.

1.2.3　^{15}N-L-脯氨酸分离纯化工艺　脯氨酸及杂酸粗品用水溶解调 pH 后上阴离子树脂柱,洗脱所得脯氨酸单斑洗脱液,真空浓缩得干品,再脱色精制得^{15}N-L-脯氨酸.

1.2.4　分析方法

1) pH 值测定:用精密 pH 试纸和酸度计测定.

2) L-脯氨酸:定性测定用纸层析吲哚醌显色法[7]和茚三酮显色法;定量测定用 Chinard 比色法及氨基酸自动分析仪测定.

3) 产品纯度分析:凯氏定氮法.

4) 产品丰度分析:MAT-271 型质谱仪测定.

5) 熔点测定:显微熔点测试法.

2　结果与讨论

2.1　普通 L-脯氨酸摇瓶发酵最佳条件的确定

采用正交试验方法试验各种营养因素以及综合考虑装液量、种龄和接种量等对 ZQ-3 菌株 L-脯氨酸发酵的影响,所得到的摇瓶发酵最佳条件列于表 1.

从表 1 可看出,脯氨酸的发酵需添加 25 g/L 的谷氨酸钠,它作为生物合成脯氨酸的前体可较大幅度地提高脯氨酸的产量. 但若要研制^{15}N-L-脯氨酸就需添加^{15}N-L-谷氨酸钠,否则会造成产品丰度的大幅下降,不利于对^{15}N 的综合利用. 综观各种因素,采用了不添加谷氨酸钠、牺牲产酸率的方案进行低丰度试验.

表 1　L-脯氨酸摇瓶发酵最佳条件

Tab. 1　The optimal fermentation conditions of L-Proline in shaking flask

成分	种子培养基	发酵培养基
葡萄糖质量浓度/(g/L)	25	160
NH_4Cl 质量浓度/(g/L)		60
$(NH4)_2SO_4$ 质量浓度/(g/L)	5	
玉米浆质量浓度/(g/L)	40	5
KH_2PO_4 质量浓度/(g/L)	1.0	1.0
$MgSO_4$ 质量浓度/(g/L)	0.5	0.5
谷氨酸钠质量浓度/(g/L)		25
V_H 质量浓度/(μg/L)		500
$CaCO_3$ 质量浓度/(g/L)	10	40
pH	7.0	7.0
250 mL 三角瓶装液量/mL	50	12.5
接种量/%		4
温度/℃	30	30
培养时间/h	11	72

2.2　^{15}N-L-脯氨酸低丰度发酵试验

发酵培养基配方(组分,g/L):葡萄糖 160,$^{15}NH_4Cl$ 60,玉米浆 20,KH_2PO_4 1.0,$CaCO_3$ 40,$MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5. pH 7.2.

配制 200 mL 发酵培养基,经 30 ℃、96 h 发酵,实得 150 mL 低丰度发酵液,经提取分离精制,共得 2.26 g 产品,丰度为 9.9%,纯度大于 98%,结果见表 2.

表 2　^{15}N-L-脯氨酸低丰度发酵

Tab. 2　Low abundance fermentation of ^{15}N-L-Proline

$^{15}NH_4Cl$ 丰度/%	产酸率/(g/L)	产品丰度/%	产品质量/g	提取得率/%
10.39	25	9.92	2.26	60.15

高丰度$^{15}NH_4Cl$ 价格昂贵,故必须进行低丰度试验. 通过对得到的低丰度^{15}N-L-脯氨酸进行丰度测定,来证实与原料丰度之间的下降值是否在容许的范围内. 此次低丰度试验的丰度下降值为 4.52%,虽未超过 5%,但下降幅度较大,需进一步改进条件.

2.3　^{15}N-L-脯氨酸高丰度发酵试验

根据低丰度试验的情况,为了提高^{15}N 的利用率,节约氮源,$^{15}NH_4Cl$ 的配比需作 下调. 另外,试

万方数据

验中还发现发酵液粘度偏大，残糖太高，不利于提取，经试验后得出如下较佳条件：葡萄糖质量浓度为 145 g/L，NH_4Cl 质量浓度为 30 g/L，添加 NaCl 质量浓度为 31 g/L(Cl^- 的增加有助于脯氨酸的积累)．发酵培养基配方及发酵条件见 1.1.2，试验结果见表 3.

表 3 ^{15}N-L-脯氨酸高丰度发酵(1)

Tab. 3 High abundance fermentation of ^{15}N-L-Proline (1)

$^{15}NH_4Cl$ 丰度/%	产酸率/(g/L)	产品丰度/%	产品质量/g	提取得率/%
99.28	21.1	96.14	16.93	65.76

共配制 1 500 mL 高丰度发酵培养基，实得 1 220 mL发酵液，提取产品 16.93 g，纯度大于 98.5%，熔点 220～222 ℃(均与空白标准一样)，丰度为 96.14%，比原料$^{15}NH_4Cl$ 丰度 99.28%下降了 3.16%，提取精制得率为 65.76%，实际每克^{15}N-L-脯氨酸消耗 2.66 g $^{15}NH_4Cl$.

丰度下降值仍大于 3%，之后不断改进试验条件，再做高丰度发酵试验，结果见表 4.

表 4 ^{15}N-L-脯氨酸高丰度发酵(2)

Tab. 4 High abundance fermentation of ^{15}N-L-Proline (2)

$^{15}NH_4Cl$ 丰度/%	$^{15}NH_4Cl$ 质量浓度/(g/L)	产酸率/(g/L)	产品丰度/%	丰度下降值/%
99.51	35	33	98.28	1.24

至此，试验有了较完美的结果，丰度下降值小于 1.5%，但仍有望进一步提高产品的丰度值.

2.4 ^{15}N-L-脯氨酸的提取精制

2.4.1 树脂及洗脱剂的选择 由于 L-脯氨酸是最不易被树脂吸附的氨基酸之一，采用阳离子 1#、2#、3#，阴离子 4#、5#等树脂做试验，结果见表 5.

表 5 树脂及洗脱剂的选择

Tab. 5 The selection of resin and eluent

树脂型号	总交换容量/(eq/L)	去除色素能力	洗脱剂(0.1 mol/L)	分离结果
阳 1#	1.8	一般	氨水	分不开
阴 1#	1.4	差	盐酸	分不开
阳 2#	2.0	强	氨水	分不开
阳 3#	2.0	一般	氨水	分不开
阴 2#	1.1	一般	盐酸	分开

根据以上试验结果，将发酵离心清液先上 2# 阳离子树脂，以除去大量色素及杂质，然后再上 2# 阴离子树脂分离得到脯氨酸.

2.4.2 脱色问题 L-脯氨酸发酵液的颜色较深，上柱前发酵液用活性炭进行脱色，连续脱了 2～3 次未见效，后采取多上几次 1# 阳离子柱的办法有所改观. 但多上柱会使处理周期延长，工作效率降低，扩大规模更有难度，还会使产品损失过多(经测试，每上一次柱会损失 7.1%左右)．而用活性炭脱色，问题更多，损失更大 ，每脱一次就损失 8.9%左右，与文献[9]报道的 9.1%接近，且一般用活性炭脱色总要连续脱 2 次以上，足见其损失率. 而采用 2# 强酸性阳离子树脂后，脱色问题大为改观，由于 2# 阳离子树脂吸附了较多的色素，在之后的处理过程中活性炭相对用量少，可提高脯氨酸的提取得率.

2.4.3 精制问题 L-脯氨酸是所有氨基酸中溶解度最大的一种氨基酸，并且可溶解于乙醇中，正是由于脯氨酸的这一特性，使得纯化精制的难度加大. 虽然文献报道提取脯氨酸的方法[10～12]很多，但考虑到该产品可能作医用、药用试验，因此就不能采用甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇联合使用的方法，这样所能利用的条件就更有限，同时，也增加了精制的难度. 利用脯氨酸不溶于乙醚的特性，作者试过以无水乙醇和乙醚相结合来精制，但用了乙醚之后易使脯氨酸结晶氧化发黄，故不宜使用，最后还是采用乙醇精制为好.

3 结 语

发酵法合成^{15}N 氨基酸产品与一般发酵法合成氨基酸有很大区别，必须树立起节约^{15}N 氮源、控制其它天然氮源的理念，甚至应以^{15}N 的利用率或转化率而不是糖的转化率来衡量生物发酵过程. 在^{15}N-L-脯氨酸的研制过程中，由于^{15}N-氯化铵的价格比其他原料贵重得多，因此要尽量减少^{15}N-氯化铵的消耗，以提高^{15}N 的利用率，同时又要控制天然氮源的过多、过量导入，甚至不惜以降低产酸率为代价来防止产品^{15}N 丰度的下降. 在生物合成^{15}N-L-脯氨酸的过程即为控制玉米浆的加入量亦或选用替代的含氮量少的氮源. 作者在上游的氮源控制发酵及下游的提取精制工艺上均获得较好的效果.

参考文献：

[1] 郭慧珍. L-脯氨酸发酵的研究[J]. 工业微生物，1992，22(5)：33－37.

万方数据

[2] 张伟国. L-脯氨酸产生菌的选育[J]. 无锡轻工大学学报,1996,15(1):44－48.
[3] 张伟国, 顾正华. L-脯氨酸发酵条件的研究[J]. 江苏食品与发酵,2000,(4):1－4.
[4] 方佩静, 毛维颖, 陈琦. L-脯氨酸发酵研究[J]. 微生物学报,1982,22(4):353－360.
[5] 易腊英, 陈士芬, 胡章助,等. L－脯氨酸发酵的研究[J]. 工业微生物,1987,17(3):11－16.
[6] Siegfried N, Lodwig, Clifford J Unkefer. Stereoselective synthesis of stable isotope-labelled L-α-amino acids: enantioselective synthesis of ^{13}C 、^{15}N-labelled L-proline using Oppolzer's glycine template[J]. **Labelled Compd Radiopharm**, 1998, 41(11):983－991.
[7] 潘家秀. 蛋白质化学研究技术[M]. 北京: 科学出版社,1973.
[8] 郑淑贞, 崔云春, 林慧贞,等. L-脯氨酸的纯化方法[P]. 中国专利:ZL 91100370.3,1992-08-05.
[9] 杜鸣,徐建华. 8 种常见吸附剂在蛋白质水解脱色过程中对氨基酸吸附影响的研究[J]. 氨基酸杂志, 1991,(1): 13－19.
[10] 何浩明. 用离子交换树脂分离、提纯 L-脯氨酸的研究[J]. 氨基酸杂志, 1984,(3):15－19.
[11] 施强, 桑立红, 王在震. 从骨胶中提取 L-羟脯氨酸和 L-脯氨酸[J]. 食品科学, 1998,19(10):26－29.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 41 页)

2) 半流质高能食品具有不同于一般食品的流变学特性,不同温度下的半流质高能食品的流变学模型也不相同,10～30 ℃时的流变学模型为 $y=mx^{n-1}$;而温度在 40～50 ℃时,其流变学方程是 $y=A+m\ln(x)$.

3) 无论样品是否经过热处理,它们的粘度变化总趋势是一样的,即随着温度升高而下降. 但是,热处理后的样品粘度曲线呈现平滑下降走势,而热处理前的样品的粘度曲线会出现明显的波折.

参考文献:

[1] 段振华,张憋,郇延军,等. 半流质高能食品的工艺[J]. 无锡轻工大学学报,2002,22(2):148－151.
[2] 陈克复,卢晓江,金醇哲,等. 食品流变学及其测量[M]. 北京:轻工业出版社,1989.
[3] 路福绥,盛锋. 肥桃酱的流变特性研究[J]. 食品工业科技,1998,(4):4－5.
[4] 周宇英,唐伟强. 食品流变特性的研究进展[J]. 粮油加工与食品机械,2001,(8):7－9.
[5] Abdelrahim K A, Ramaswamy H S, Voort F R. Rheological properties of starch solutions under aseptic processing temperatures[J]. **Food Research International**,1995,28(5):473－480.
[6] Ibanoglu S, Ibanoglu E. Rheological properties of cooked tarhana, a cereal-based soup[J]. **Food Research International**, 1999,32(1):29－33.
[7] Al-malah K I , Azzam M O J, Abu-jdayil B. Effect of glucose concentration on the rheological properties of wheat-starch dispersions[J]. **Food Hydrocolloids**, 2000,(5):491－496.
[8] Shaker R R, Jumah R Y, Abu-jdayil B. Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk[J]. **Journal of Food Engineering**, 2000,44:175－180.
[9] Haque A. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurd[J]. **Food Hydrocolloids**, 2001, (4):593－602.
[10] Weltman R N. Breakdown of thixotropic structure as a function of time[J]. **Journal of Applied Physics**, 1943,14:343－350.
[11] Sopade P A , Kassum A L . Rheological characterisation of akamu, a semi-liquid food from maize, millet and sorghum[J]. **Journal of Cereal Science**, 1992,15:193－202.

(责任编辑:朱 明)

万方数据