



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108531525 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201810436743.1

(22)申请日 2018.05.09

(71)申请人 宿州学院

地址 234000 安徽省宿州市教育园区宿州
学院东区

(72)发明人 徐礼生

(74)专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务
所(普通合伙) 34124

代理人 王志兴

(51) Int. Cl.

C12P 13/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,步骤如下:将具有天冬氨酸酶活性的菌株于培养基中发酵培养,得含天冬氨酸酶的湿菌体;将湿菌体加入固定化混合物中,混合后滴加到氯化钙溶液中,形成固定化细胞;其中,固定化混合物包括纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛;将固定化细胞加入转化液中进行酶促反应,再通过等电点结晶法分离得L-天冬氨酸。本发明采用L-天冬氨酸的特定菌株,在发酵培养基中培养以高效表达L-天冬氨酸酶,并利用纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛作为固定化混合物来固定化天冬氨酸酶,使酶法合成L-天冬氨酸具有较高的催化速率和转化率;此外,酶法合成反应还具有条件温和、酶立体选择性强的优点。

1. 一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将具有天冬氨酸酶活性的菌株于培养基中发酵培养,发酵液离心后,得含天冬氨酸酶的湿菌体;

(2) 将上述含天冬氨酸酶的湿菌体加入到固定化混合物中混合;混合后,滴加到氯化钙溶液中,形成固定化细胞;其中,固定化混合物包括:纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛;

(3) 将上述固定化细胞加入转化液中,在35-50℃,pH 6-11的条件下进行酶促反应,再通过等电点结晶法分离得到L-天冬氨酸;其中,转化液包括富马酸和氨,以及乙酸乙酯、乙酸丁酯、辛醇、正己醇中的一种。

2. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中具有天冬氨酸酶活性的菌株选自大肠杆菌ATCC15489、枯草芽孢杆菌CGMCC NO:1.1628、施氏假单胞菌CGMCC NO:1.202、铜绿假单胞菌CGMCC NO:1.1129中的一种。

3. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中培养基成分包括:10-45g/L碳源物质、5-45g/L氮源物质、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$ 。

4. 根据权利要求3所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述碳源物质采用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖中的一种或多种。

5. 根据权利要求3所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述氮源物质采用牛肉膏、酵母膏、玉米浆、蛋白胨、豆饼水解液、花生饼粉、黄豆饼粉中的一种或多种。

6. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛的具体浓度为:纳米二氧化硅0.05-0.1g/L、海藻酸钠10-30g/L、戊二醛5-10g/L。

7. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中富马酸的浓度为50-350g/L。

8. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中氨的浓度为5-60g/L。

9. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中乙酸乙酯、乙酸丁酯、辛醇、正己醇的浓度为0.001g/L-5.0g/L。

10. 根据权利要求1所述的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中通过等电点结晶法分离得到L-天冬氨酸的具体步骤为:将酶促反应后的转化液于4000-6000r/min转速下离心15-20min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 2-4,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品。

一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及L-天冬氨酸的制备领域,尤其涉及一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法。

背景技术

[0002] L-天冬氨酸是一种重要的酸性氨基酸,具有改善心肌功能的生理功能。L-天冬氨酸可用于医药领域,具有非常广泛的应用前景。

[0003] 天冬氨酸酶(E.C.4.3.1.1)是一种重要的工业用酶,大肠杆菌的天冬氨酸酶由四个相同亚基构成,每个亚基由477个氨基酸残基组成。目前为止,以富马酸和氨为原料,并通过固定化L-天冬氨酸酶催化生产L-天冬氨酸的报道很多,但却尚未有利用纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛固定化天冬氨酸酶以进一步制备得到L-天冬氨酸的报道。

[0004] 据此,目前急需一种利用纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛作为固定化混合物以固定化天冬氨酸酶,从而进一步制备L-天冬氨酸的方法。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种利用纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛作为固定化混合物的L-天冬氨酸的酶法转化制备方法。

[0006] 本发明采用以下技术方案解决上述技术问题:

[0007] 一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 将具有天冬氨酸酶活性的菌株于培养基中发酵培养,发酵液离心后,得含天冬氨酸酶的湿菌体;

[0009] (2) 将上述含天冬氨酸酶的湿菌体加入到固定化混合物中混合;混合后,滴加到氯化钙溶液中,形成固定化细胞;其中,固定化混合物包括:纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛;

[0010] (3) 将上述固定化细胞加入转化液中,在35-50℃,pH 6-11的条件下进行酶促反应,再通过等电点结晶法分离得到L-天冬氨酸;其中,转化液包括富马酸和氨,以及乙酸乙酯、乙酸丁酯、辛醇、正己醇中的一种。

[0011] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(1)中具有天冬氨酸酶活性的菌株选自大肠杆菌ATCC15489、枯草芽孢杆菌CGMCC NO:1.1628、施氏假单胞菌CGMCC NO:1.202、铜绿假单胞菌CGMCC NO:1.1129中的一种。

[0012] 作为本发明的优选方式之一,所述大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、施氏假单胞菌、铜绿假单胞菌均直接购自国内外市场。

[0013] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(1)中培养基成分包括:10-45g/L碳源物质、5-45g/L氮源物质、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$ 。

[0014] 作为本发明的优选方式之一,所述碳源物质采用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖中的

一种或多种。

[0015] 作为本发明的优选方式之一,所述氮源物质采用牛肉膏、酵母膏、玉米浆、蛋白胨、豆饼水解液、花生饼粉、黄豆饼粉中的一种或多种。

[0016] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(2)中纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛的具体浓度为:纳米二氧化硅0.05-0.1g/L、海藻酸钠10-30g/L、戊二醛5-10g/L。

[0017] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中富马酸的浓度为50-350g/L。

[0018] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中氨的浓度为5-60g/L。

[0019] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中乙酸乙酯、乙酸丁酯、辛醇、正己醇的浓度为0.001g/L-5.0g/L。

[0020] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中通过等电点结晶法分离得到L-天冬氨酸的具体步骤为:将酶促反应后的转化液于4000-6000r/min转速下离心15-20min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 2-4,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品。

[0021] 本发明相比现有技术的优点在于:本发明采用L-天冬氨酸的特定菌株在发酵培养基中培养,高效表达L-天冬氨酸酶;接着,利用纳米二氧化硅、海藻酸钠和戊二醛作为固定化混合物以固定化天冬氨酸酶,并进一步酶法合成L-天冬氨酸,具有较高的催化速率和转化率,其中的富马酸摩尔转化率更是达到99%以上;另外,酶法合成L-天冬氨酸还具有反应条件温和,酶立体选择性强,催化效率高,成本低,工艺流程简单等优点,适合工业化生产。

具体实施方式

[0022] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0023] 实施例1

[0024] 本实施例的一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0025] (1) 将1000mL大肠杆菌ATCC15489在培养基(10g/L葡萄糖、5g/L牛肉膏、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$)中培养发酵,发酵液离心得到15g湿菌体;

[0026] (2) 将上述湿菌体加入到固定化混合物(含0.05g/L纳米二氧化硅、10g/L海藻酸钠、5g/L戊二醛)中混合,混合后,滴加到氯化钙溶液中形成固定化细胞;

[0027] (3) 将上述固定化细胞加入到500mL转化液(含50g/L富马酸、5g/L氨和0.001g/L乙酸乙酯)中,在pH 6, 35℃的条件下酶促反应12h,反应结束后,L-天冬氨酸摩尔转化率为99%;

[0028] (4) 将酶促反应后的转化液于4000r/min转速下离心15min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 2,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品,纯度为99.9%。

[0029] 实施例2

[0030] 本实施例的一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0031] (1) 将1000mL大肠杆菌ATCC15489在培养基(45g/L麦芽糖、45g/L酵母膏、1.2g/L柠

柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$) 中培养发酵,发酵液离心得到14g湿菌体;

[0032] (2) 将上述湿菌体加入到固定化混合物(含0.1g/L纳米二氧化硅、30g/L海藻酸钠、10g/L戊二醛)中混合,混合后,滴加到氯化钙溶液中形成固定化细胞;

[0033] (3) 将上述固定化细胞加入到500mL转化液(含350g/L富马酸、60g/L氨和5.0g/L乙酸乙酯)中,在pH 11,50℃的条件下酶促反应12h,反应结束后,L-天冬氨酸摩尔转化率为99%;

[0034] (4) 将酶促反应后的转化液于6000r/min转速下离心20min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 4,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品,纯度为99.9%。

[0035] 实施例3

[0036] 本实施例的一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0037] (1) 将1000mL大肠杆菌ATCC15489在培养基(30g/L蔗糖、30g/L玉米浆、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$) 中培养发酵,发酵液离心得到14g湿菌体;

[0038] (2) 将上述湿菌体加入到固定化混合物(含0.1g/L纳米二氧化硅、30g/L海藻酸钠、10g/L戊二醛)中混合,混合后,滴加到氯化钙溶液中形成固定化细胞;

[0039] (3) 将上述固定化细胞加入到500mL转化液(含350g/L富马酸、60g/L氨和0.005g/L乙酸乙酯)中,在pH 7.5,45℃的条件下酶促反应12h,反应结束后,L-天冬氨酸摩尔转化率为99%;

[0040] (4) 将酶促反应后的转化液于6000r/min转速下离心20min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 2.8,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品198.6g;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品192.5g,纯度为99.9%。

[0041] 实施例4

[0042] 本实施例的一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0043] (1) 将1000mL铜绿假单胞菌CGMCC NO:1.1129在培养基(20g/L果糖、20g/L蛋白胨、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$) 中培养发酵,发酵液离心得到15g湿菌体;

[0044] (2) 将上述湿菌体加入到固定化混合物(含0.05g/L纳米二氧化硅、10g/L海藻酸钠、5g/L戊二醛)中混合,混合后滴加到氯化钙溶液中形成固定化细胞;

[0045] (3) 将上述固定化细胞加入到500mL转化液(含175g/L富马酸、30g/L氨和0.0025g/L的乙酸丁酯)中,在pH 7.5,45℃酶促反应12h,反应结束后,L-天冬氨酸摩尔转化率为98%;

[0046] (4) 将酶促反应后的转化液于5000r/min转速下离心18min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 3.0,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品98.3g;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品94.7g,纯度为99.9%。

[0047] 实施例5

[0048] 本实施例的一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0049] (1) 将1000mL施氏假单胞菌CGMCC NO:1.202在培养基(25g/L葡萄糖、25g/L豆饼水解液、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$)中培养发酵,发酵液离心得到湿菌体20g;

[0050] (2) 将上述湿菌体加入到固定化混合物(含0.1g/L纳米二氧化硅、20g/L海藻酸钠、5g/L戊二醛)中混合,混合后滴加到氯化钙溶液中形成固定化细胞;

[0051] (3) 将上述固定化细胞加入到500mL转化液(含350g/L富马酸、60g/L氨和0.005g/L的辛醇)中,在pH 7.5,45℃酶促反应12h,反应结束后,L-天冬氨酸摩尔转化率为97%;

[0052] (4) 将酶促反应后的转化液于4000r/min转速下离心15min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 2.7,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品196.4g;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品189.5g,纯度为99.9%。

[0053] 实施例6

[0054] 本实施例的一种L-天冬氨酸的酶法转化制备方法,包括如下步骤:

[0055] (1) 将1000mL枯草芽孢杆菌CGMCC NO:1.1628在培养基(40g/L麦芽糖、40g/L花生饼粉、1.2g/L柠檬酸、1.0g/L硫酸铵、3.0g/L K_2HPO_4 、1.0g/L $MgSO_4$ 、0.06g/L $CaCl_2$ 、0.002g/L $CoCl_2$ 、0.0001g/L $MnC_4H_6O_4 \cdot 4H_2O$)中培养发酵,发酵液离心得到15g湿菌体;

[0056] (2) 将上述湿菌体中加入到固定化混合物(含0.05g/L纳米二氧化硅、15g/L海藻酸钠、10g/L戊二醛)中混合,混合后滴加到氯化钙溶液中形成固定化细胞;

[0057] (3) 将上述固定化细胞加入到500mL转化液(含175g/L富马酸、30g/L氨和0.005g/L的正己醇)中,在pH 7.5,45℃酶促反应12h,反应结束后,L-天冬氨酸摩尔转化率为99%;

[0058] (4) 将酶促反应后的转化液于6000r/min转速下离心20min,去除菌体细胞;加热转化液,采用活性炭脱色,树脂吸附,滤膜抽滤,调至pH 2.7,静置析出沉淀,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸粗品99.7g;采用水喷洒洗涤,真空抽滤,烘干得L-天冬氨酸精品95.8g,纯度为99.9%。

[0059] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。