

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910027192.4

[51] Int. Cl.

C12P 13/04 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月21日

[11] 公开号 CN 101560532A

[22] 申请日 2009.5.25

[21] 申请号 200910027192.4

[71] 申请人 南京大学

地址 210097 江苏省南京市汉口路22号

[72] 发明人 焦庆才 张 飞 刘均忠 熊吉滨  
刘 茜

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所  
代理人 胡锡瑜

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

L-茶氨酸酶法转化制备方法

[57] 摘要

本发明属于生物技术领域，具体涉及L-茶氨酸酶法转化制备方法。该制备方法以L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼和乙胺作为原料，将含有 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶的菌体细胞或该酶提取液与含有L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼和乙胺的水溶液混合，在25℃~60℃下进行酶促反应，利用等电点结晶或等电点结晶与离子交换树脂相结合的方法分离转化产物，得到高纯度的L-茶氨酸。该方法以L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼为主要原料，具有原料价格低廉，操作简便，转化时间短，生产成本低等优点。

1、一种 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征是由以下步骤构成：

(1) 将含有  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶的菌体细胞或该酶提取液与含有 L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或 L-谷氨酰肼和乙胺的水溶液混合，加入表面活性剂和金属离子，在 pH9~11，温度 25℃~60℃ 条件下进行酶促反应；

(2) 通过等电点结晶法或等电点结晶与离子交换树脂相结合的方法对反应生成物进行分离，得到高纯度的 L-茶氨酸。

2、根据权利要求 1 所述的 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征在于步骤 (1) 所用的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶来源于具有  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶活性的微生物菌株或基因工程菌株：枯草芽孢杆菌 NX-2 或枯草芽孢杆菌 SK11.004 或大肠杆菌 SH642 或基因工程菌 GGT。

3、根据权利要求 1 所述的 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征在于步骤 (1) 所用的底物 L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯为 L-谷氨酸- $\gamma$ -甲酯或 L-谷氨酸- $\gamma$ -乙酯或 L-谷氨酸- $\gamma$ -丙酯或 L-谷氨酸- $\gamma$ -丁酯。

4、根据权利要求 1 所述的 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征在于步骤 (1) 所用的底物是 L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或 L-谷氨酰肼和乙胺，溶液 pH 为 9~11，调溶液 pH 所用的无机酸为盐酸或硫酸或磷酸。

5、根据权利要求 1 所述的 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征在于步骤 (1) 所述的表面活性剂为吐温-80 或十六烷基三甲基溴化铵或聚乙二醇辛基苯基醚，其浓度为 0.05g/L~50g/L；所述的金属离子为钾离子或钠离子或钙离子或镁离子或锰离子，其浓度为  $5 \times 10^{-4}$  mol/L~ $5 \times 10^{-1}$  mol/L。

6、根据权利要求 1 所述的 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征在于步骤 (1) 中底物 L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或 L-谷氨酰肼与乙胺的摩尔比为 1:3~1:18，最适摩尔比为 1:6~1:10。

7、根据权利要求 1 所述的 L-茶氨酸酶法转化制备方法，其特征在于步骤 (1) 中酶促反应温度为 25℃~60℃，最适反应温度为 30℃~45℃。

## L-茶氨酸酶法转化制备方法

### 一、技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及 L-茶氨酸的酶法转化制备方法。

### 二、背景技术

L-茶氨酸 (L-Theanine) 是一种存在于茶叶中的天然氨基酸，其结构式为： $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 。它是茶叶中的主要游离氨基酸和主要呈味物质。由于 L-茶氨酸具有降低血压，松弛神经，减肥，抗疲劳，提高免疫力等多种生理功能，所以在食品、保健品及药品领域应用广泛。

根据目前文献报导，L-茶氨酸的制备方法主要有以下三种：

#### 1、从茶叶中提取

茶叶中 L-茶氨酸含量较为丰富。该法用开水浸泡茶叶，然后用有机溶剂萃取和离子交换分离来提取 L-茶氨酸。目前该法存在的主要问题是工序多，得率比较低，成本较高。

#### 2、化学合成法

1942 年，以色列人 N. Lichtenstein (J. Am. Chem.Soc., 1942, 64, 1021-1022) 首次在实验室用吡咯烷酮酸和 33% 乙胺水溶液反应得到茶氨酸，该方法收率较低。

2004 年，陈新等 (CN 1280261C, 2004) 用 L-吡咯烷酮酸与无水乙胺，在抗氧化剂存在或用干燥乙胺气体排尽空气环境下进行反应，L-茶氨酸收率达 58%。

2005 年，焦庆才等 (CN 1228314C, 2005) 用邻苯二甲酰基作为保护基，脱水生成 N-邻苯二甲酰-L-谷氨酸酐，与 2mol/L 乙胺水溶液反应生成中间产物 N-邻苯二甲酰-L-茶氨酸，以水合肼反应除保护基，L-茶氨酸收率超过 50%。

虽然化学合成法比从茶叶中直接提取步骤更简单，但化学合成过程中需要对活性基团进行保护和去保护，并且合成出来的茶氨酸常含有 D 型产物，需要经拆分才能得到 L 型茶氨酸。

#### 3、酶法合成

近年来微生物酶法合成 L-茶氨酸发展迅速，常用的酶有谷氨酰胺酶、谷氨

酰胺合成酶和  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶。

2002年,日本人 H. Suzuki 等(Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31 (6), 884-889) 首次利用从转基因大肠杆菌 SH642 (含有重组质粒 pUC18-GGT) 中得到的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶作催化剂,以 L-谷氨酰胺和乙胺混合溶液为底物生物催化合成 L-茶氨酸,底物转化率为 60%。

2005年,日本太阳化学株式会社立木隆等(CN 1688705A, 2005) 利用从土壤中分离的具有谷氨酰胺酶活性的香茅醇假单胞菌 GEA 作为 L-茶氨酸产生菌,以 L-谷氨酰胺和乙胺为底物合成 L-茶氨酸。

2007年,王贤波等(茶叶科学, 2007, 27 (1), 61~66) 利用转基因大肠杆菌(含有重组质粒 pET-GGT), 催化 L-谷氨酰胺和盐酸乙胺反应生成 L-茶氨酸, L-谷氨酰胺转化率为 48.22%。

2007年,日本人 Senba Hisao 等(JP 2007185132 A) 利用谷氨酰胺酶催化 L-谷氨酸- $\gamma$ -乙酯和乙胺反应生成 L-茶氨酸, L-谷氨酸- $\gamma$ -乙酯转化率为 71%。

2008年,贾晓鹤等(食品工业科技, 2008, 29 (2), 166~169) 利用转基因大肠杆菌(含有重组质粒 pET28a-GGT) 粗酶液作为催化剂,催化 L-谷氨酰胺和乙胺合成 L-茶氨酸, L-谷氨酰胺转化率达到 57.8%。

2008年,江波等(CN 101343618A, 2008) 利用具有  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶活性的枯草芽孢杆菌 SK11.004 (CCTCC NO: M 208083), 催化 L-谷氨酰胺和乙胺合成 L-茶氨酸,转化率达 80%以上。

2008年,姚忠等(CN 101270376A, 2008) 利用具有  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶活性的枯草芽孢杆菌 NX-2 (CGMCC No. 0833), 催化 L-谷氨酰胺和乙胺合成 L-茶氨酸,转化率达 57.5%以上。

由于酶法合成 L-茶氨酸与化学合成法相比不会产生消旋现象,而且转化率较高,所以受到了广泛重视和研究,并已经进入工业化应用领域。

到目前为止,利用微生物来源或基因工程来源的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶作为催化剂,以 L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或 L-谷氨酰肼和乙胺为底物,酶法制备 L-茶氨酸的方法还未见文献报导。

### 三、发明内容

本发明需要解决的问题是提供一种高效、低成本的制备 L-茶氨酸的方法。

目前受技术和成本的限制,我国氨基酸工业中L-茶氨酸的产量不能满足国内外市场的需求。本发明采用廉价的L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼和乙胺为起始原料,利用 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶作催化剂制备L-茶氨酸,反应条件温和,底物转化率高。

本发明可以通过以下的技术方案来达到:

L-茶氨酸酶法转化制备方法,其步骤为:

(1)将含有 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶的菌体细胞或该酶提取液与含有L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼和乙胺的水溶液混合,加入表面活性剂和金属离子,在pH9~11,温度25℃~60℃条件下进行酶促反应;

(2)通过等电点结晶法或等电点结晶与离子交换树脂相结合的方法对反应生成物进行分离,得到高纯度的L-茶氨酸。

上述步骤(1)所用的 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶来源于现已报道的微生物菌株或基因工程菌:枯草芽孢杆菌NX-2(CGMCC No. 0833)或枯草芽孢杆菌SK11.004(CCTCC NO: M 208083)或大肠杆菌SH642(含有重组质粒pUC18-GGT)或基因工程菌GGT(含有重组质粒pET28a-GGT)。所用底物为L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼和乙胺的混合水溶液,其浓度分别为0.1mol/L~0.8mol/L和0.1mol/L~14mol/L,反应液中L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼和乙胺摩尔比为1:3~1:18,最适摩尔比为1:6~1:10,溶液pH为9~11,调溶液pH所用的无机酸为盐酸或硫酸或磷酸。所述的表面活性剂为吐温-80或十六烷基三甲基溴化铵或聚乙二醇辛基苯基醚,其浓度为0.05g/L~50g/L;所述的金属离子为钾离子或钠离子或钙离子或镁离子或锰离子,其浓度为 $5\times 10^{-4}$ mol/L~ $5\times 10^{-1}$ mol/L。酶促反应中反应温度为25℃~60℃,最适反应温度为30℃~45℃。

本发明与现有技术相比其有益效果是:

本发明的主要特点在于利用廉价的L-谷氨酸- $\gamma$ -烷基酯或L-谷氨酰肼代替L-谷氨酰胺作为酶促反应的底物。本发明与现有技术相比,可以降低生产成本,解决了现有技术以L-谷氨酰胺和乙胺为制备原料成本较高的问题。

L-茶氨酸酶法转化制备方法，其具体步骤如下：

- 1、将 1000mL 发酵液离心得到的大肠杆菌 SH642（含有重组质粒 pUC18-GGT）菌体 15 g 加入到 1000mL 转化液中，转化液含 60g L-谷氨酸- $\gamma$ -丙酯，112g 乙胺，20mL 1%聚乙二醇辛基苯基醚，10mL 1mol/L 氯化钙，30%盐酸调 pH 至 10，35℃反应 26h。反应液中 L-茶氨酸浓度（g/mL）为 3.98%，底物 L-谷氨酸- $\gamma$ -丙酯的摩尔转化率达到 72%。
- 2、将反应液离心去菌体，用 30%盐酸调上清液 pH 到 3，酸化液升温到 70~80℃，加入活性炭脱色，将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱吸附。用 3%氨水洗脱 L-茶氨酸饱和吸附柱，收集含 L-茶氨酸的洗脱液 980mL，真空减压浓缩到 400mL，保温 60~70℃，加入活性炭脱色，继续将脱色液真空减压浓缩到 130mL 左右，趁热加入二倍量 95%酒精，冷却到 10℃左右结晶 6 小时，真空过滤，75%酒精洗涤，烘干得 29.1g 精品，结晶母液回收酒精后循环套用。

#### 实施例四

L-茶氨酸酶法转化制备方法，其具体步骤如下：

- 1、将 1000mL 发酵液离心得到的基因工程菌 GGT（含有重组质粒 pET28a-GGT）菌体 17 g 加入到 1000mL 转化液中，转化液含 80g L-谷氨酸- $\gamma$ -丁酯，120g 乙胺，20mL 1%聚乙二醇辛基苯基醚，10mL 1mol/L 氯化镁，30%盐酸调 pH 至 10，35℃反应 30h。反应液中 L-茶氨酸浓度（g/mL）为 4.88%，底物 L-谷氨酸- $\gamma$ -丁酯的摩尔转化率达到 71%。
- 2、将反应液离心去菌体，用 30%盐酸调上清液 pH 到 3，酸化液升温到 70~80℃，加入活性炭脱色，将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱吸附。用 3%氨水洗脱 L-茶氨酸饱和吸附柱，收集含 L-茶氨酸的洗脱液 1200mL，真空减压浓缩到 450mL，保温 60~70℃，加入活性炭脱色，继续将脱色液真空减压浓缩到 200mL 左右，趁热加入二倍量 95%酒精，冷却到 10℃左右结晶 8 小时，真空过滤，75%酒精洗涤，烘干得 35.5g 精品，结晶母液回收酒精后循环套用。

#### 实施例五

L-茶氨酸酶法转化制备方法，其具体步骤如下：

- 1、将 1000mL 发酵液离心得到的枯草芽孢杆菌 NX-2 菌体 23 g 加入到 1000mL 转化液中，转化液含 40g L-谷氨酰胺，90g 乙胺，20mL 0.5% 吐温-80，10mL 1mol/L 氯化钾，30%盐酸调 pH 至 10，45℃反应 22h。反应液中 L-茶氨酸浓度 (g/mL) 为 3.22%，底物 L-谷氨酰胺的摩尔转化率达到 74%。
- 2、将反应液离心去菌体，用 30%盐酸调上清液 pH 到 3，酸化液升温到 70~80℃，加入活性炭脱色，将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱吸附。用 3%氨水洗脱 L-茶氨酸饱和吸附柱，收集含 L-茶氨酸的洗脱液 650mL，真空减压浓缩到 310mL，保温 60~70℃，加入活性炭脱色，继续将脱色液真空减压浓缩到 100mL 左右，趁热加入二倍量 95%酒精，冷却到 10℃左右结晶 6 小时，真空过滤，75%酒精洗涤，烘干得 23.6g 精品，结晶母液回收酒精后循环套用。

#### 实施例六

L-茶氨酸酶法转化制备方法，其具体步骤如下：

- 1、将 1000mL 发酵液离心得到的枯草芽孢杆菌 SK11.004 菌体 20 g 加入到 1000mL 转化液中，转化液含 60g L-谷氨酰胺，150g 乙胺，10mL 1%十六烷基三甲基溴化铵，10mL 1mol/L 氯化钠，30%盐酸调 pH 至 10，40℃反应 28h。反应液中 L-茶氨酸浓度 (g/mL) 为 4.67%，底物 L-谷氨酰胺的摩尔转化率达到 72%。
- 2、将反应液离心去菌体，用 30%盐酸调上清液 pH 到 3，酸化液升温到 70~80℃，加入活性炭脱色，将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱吸附。用 3%氨水洗脱 L-茶氨酸饱和吸附柱，收集含 L-茶氨酸的洗脱液 950mL，真空减压浓缩到 500mL，保温 60~70℃，加入活性炭脱色，继续将脱色液真空减压浓缩到 140mL 左右，趁热加入二倍量 95%酒精，冷却到 10℃左右结晶 7 小时，真空过滤，75%酒精洗涤，烘干得 34.5g 精品，结晶母液回收酒精后循环套用。

#### 实施例七

L-茶氨酸酶法转化制备方法，其具体步骤如下：

- 1、将 1000mL 发酵液离心得到的大肠杆菌 SH642 (含有重组质粒 pUC18-GGT) 菌体 15 g 加入到 1000mL 转化液中，转化液含 80g L-谷氨酰胺，200g 乙胺，20mL

1%十六烷基三甲基溴化铵，10mL 1mol/L 氯化钙，30%盐酸调 pH 至 10，40℃ 反应 33h。反应液中 L-茶氨酸浓度 (g/mL) 为 6.48%，底物 L-谷氨酰胺的摩尔转化率达到 75%。

2、将反应液离心去菌体，用 30%盐酸调上清液 pH 到 3，酸化液升温到 70~80℃，加入活性炭脱色，将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱吸附。用 3%氨水洗脱 L-茶氨酸饱和吸附柱，收集含 L-茶氨酸的洗脱液 1100mL，真空减压浓缩到 550mL，保温 60~70℃，加入活性炭脱色，继续将脱色液真空减压浓缩到 200mL 左右，趁热加入二倍量 95%酒精，冷却到 10℃左右结晶 8 小时，真空过滤，75%酒精洗涤，烘干得 47.9g 精品，结晶母液回收酒精后循环套用。

#### 实施例八

L-茶氨酸酶法转化制备方法，其具体步骤如下：

1、将 1000mL 发酵液离心得到的基因工程菌 GGT(含有重组质粒 pET28a-GGT) 菌体 18 g 加入到 1000mL 转化液中，转化液含 100g L-谷氨酰胺，250g 乙胺，20mL 1%聚乙二醇辛基苯基醚，20mL 1mol/L 氯化镁，30%盐酸调 pH 至 10，42℃ 反应 38h。反应液中 L-茶氨酸浓度 (g/mL) 为 8.43%，底物 L-谷氨酰胺的摩尔转化率达到 78%。

2、将反应液离心去菌体，用 30%盐酸调上清液 pH 到 3，酸化液升温到 70~80℃，加入活性炭脱色，将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱吸附。用 3%氨水洗脱 L-茶氨酸饱和吸附柱，收集含 L-茶氨酸的洗脱液 1400mL，真空减压浓缩到 700mL，保温 60~70℃，加入活性炭脱色，继续将脱色液真空减压浓缩到 250mL 左右，趁热加入二倍量 95%酒精，冷却到 10℃左右结晶 10 小时，真空过滤，75%酒精洗涤，烘干得 62.4g 精品，结晶母液回收酒精后循环套用。