

离子交换法提取酶促转化液中的 L-茶氨酸

张 飞, 王丽娟, 刘 寅, 何培新*

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450002)

摘要:用 717 阴离子交换树脂提取酶促转化液中的 L-茶氨酸, 用静态和动态的方法考察了不同操作条件对固定床离子交换效果的影响。静态吸附实验表明, 717 阴离子交换树脂对酶促转化液中 L-茶氨酸的最佳吸附条件为 pH8.5, 平衡吸附时间 16min, 吸附量为 0.083mmol/g。L-茶氨酸转化液上样的最佳流速为 0.5BV/h。按照以上条件, 转化液稀释 3 倍上样, 经 0.5mol/L 盐酸洗脱, 旋转蒸发仪浓缩, 醇沉结晶后, 可得 L-茶氨酸纯品。

关键词:离子交换, 提取, 酶促转化液, L-茶氨酸

Purification of L-theanine from enzymatic catalyzed reaction solution by ion-exchange resins

ZHANG Fei, WANG Li-juan, LIU Yin, HE Pei-xin*

(School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:L-theanine was isolation and purification from enzymatic catalyzed reaction solution by 717 anion-exchange resins. Through static and dynamic experiments, different operating conditions in the fixed bed to separate L-theanine were investigated. The results showed that the optimal conditions were pH8.5, adsorption balance time was 16min and exchange capacity was 0.083mmol/g in static experiment. The optimal flow rate was 0.5BV/h in dynamic experiment. Under these conditions, the reaction solution was diluted with water, added into the ion exchange column and eluted by 0.5mol/L hydrochloric acids. White crystal of L-theanine was obtained after concentrated, crystallized and dried.

Key words: ion-exchange resins; purification; enzymatic catalyzed reaction solution; L-theanine

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)15-0251-03

茶氨酸, 化学名为 N-乙基- γ -L-谷氨酰胺, 是茶树 (*Camellia sinensis*) 特征性成分, 迄今仅在簕和某些山茶科(属)植物中有见报道^[1]。茶氨酸是茶叶的主要呈味物质, 其含量直接决定了茶叶的品质。现代医学研究表明, 茶氨酸具有放松镇静, 增强记忆, 降低血压, 提高抗肿瘤药物疗效, 保护神经, 增强免疫力和减肥等多种生理和药理作用^[2-3]。现在茶氨酸已成为茶叶功能性成分开发利用的研究热点之一。目前, 茶氨酸获取主要途径有: 从茶叶中直接提取制备, 愈伤组织培养, 化学合成和酶法合成^[4-8]。近些年, 酶法合成茶氨酸成为新热点被大量研究和报导, 用于茶氨酸合成的酶有谷氨酰胺酶(GA, EC 3.5.1.2), 谷氨酰胺合成酶(GS, EC 6.3.1.2)和 γ -谷氨酰转肽酶(GGT, EC 2.3.2.2)^[9-12]。现在, 国内外利用 GGT 酶法合成茶氨酸所用的底物都是 L-谷氨酰胺和乙胺。2010 年, 作者所在实验室采用 L-谷氨酰胺代替 L-谷氨酰胺为底物成功合成茶氨酸, 并且对该酶促反应的条件进行了初步的优化^[13]。离子交换法是工业上氨基酸分离的常用方法。然而如何利用离

子交换树脂从酶促转化液中分离 L-茶氨酸, 还没有相关报道。由于 GGT 催化合成 L-茶氨酸需要提高乙胺的相对浓度来促进另一底物的转化, 高浓度乙胺使在调节 pH 过程中要加入大量的盐酸, 从而引入了大量的 Cl⁻, 对后续分离造成干扰。实验中采用 717 阴离子交换树脂, 用静态和动态的方法考察了不同操作条件对固定床离子交换效果的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

717 阴离子交换树脂 由安徽三星树脂科技有限公司生产; 离子交换柱 有效容积 400mL, 购于郑州宏丰化玻仪器有限公司; L-茶氨酸对照品、L-谷氨酰胺 本实验室制备, 纯度 > 99%; L-谷氨酰胺、乙胺水溶液 (65% ~ 70%)、蛋白胨、酵母浸膏、吐温 80 国药集团上海化学试剂公司; 其它试剂 均为国产分析纯。

A300 自动氨基酸分析仪 德国曼默博尔公司; WZZ-3 自动旋光仪 天津天光光学仪器有限公司; WRX-4 显微熔点仪 上海易测仪器设备有限公司; 日立 CR22E 型离心机 日本 Hitachi 公司; 高压灭菌锅 GI54DW 南京庚辰科学仪器有限公司; 恒温振荡器 THZ-C 太仓博莱特实验仪器厂; P2S 电子天平

收稿日期: 2012-02-22 * 通讯联系人

作者简介: 张飞 (1976-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物技术。

基金项目: 郑州轻工业学院博士基金资助项目。

上海恒平科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酶促转化液制备 菌种及培养条件参考文献[13]。称取6g湿菌体,投入到300mL含L-谷氨酰胺3.2% (0.2mol/L),乙胺1.5mol/L, pH10的溶液中。该溶液pH由浓盐酸调节,消耗37.5%浓盐酸30.2mL,因此溶液中Cl⁻浓度约为1.2mol/L。控制温度40℃,恒温搅拌反应24h。反应结束后离心除去菌体,活性炭脱色,过滤得澄清反应液,密封保存备用。

1.2.2 阴离子树脂预处理 717阴离子树脂装柱量400mL,用1mol/L NaOH溶液800mL对树脂进行复性,后用800mL蒸馏水将交换柱洗至弱碱性。

1.2.3 静态实验 量取预处理好的树脂放置于100mL具塞三角瓶中,加入稀释6倍的反应液,在摇床上以120r/min振荡到吸附平衡为止。静态实验主要考察树脂交换容量、树脂吸附平衡时间和上样液pH对树脂吸附的影响,实验重复3次。

平衡吸附量和吸附率计算方法是:

$$Q = \frac{(C_0 - C_{液})V}{M_{树脂}M} \quad \text{式(1)}$$

$$A(\%) = \frac{(C_0 - C_{液})}{C_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中:Q-树脂吸附量(mmol/g),A-吸附率(%),C₀-吸附前溶液中L-茶氨酸的质量浓度(g/L),C_液-吸附后溶液中L-茶氨酸的质量浓度(g/L),V-溶液的体积(L),M_{树脂}-树脂的湿重(g),M-茶氨酸的分子量(170)。茶氨酸含量检测参考文献[9]。

1.2.4 动态实验 717阴离子树脂装柱量400mL,以一定流速的转化液上柱,收集过柱液并测定其中L-茶氨酸含量,绘制穿透曲线。洗脱时,洗脱液以一定的速度过柱,收集过柱液测定L-茶氨酸含量,绘制穿透曲线。

2 结果与分析

2.1 树脂交换容量的确定

转化液稀释6倍,取5mL加入50mL三角瓶,分别加入树脂0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9g,搅拌吸附30min后检测溶液中L-茶氨酸的浓度。

结果如图1,由于转化液中含有大量的Cl⁻,在树脂加入量较少的情况下,主要发生Cl⁻与OH⁻的交换,而几乎没有L-茶氨酸被吸附;当树脂用量增加到0.8g时,可以明显地看到L-茶氨酸被吸附,原因是此时转化液中Cl⁻被吸附完,而开始吸附L-茶氨酸。将吸附前后L-茶氨酸浓度代入式(1),得树脂交换容量为0.083mmol/g,该交换容量是相对于L-茶氨酸的交换容量,如果考虑到氯离子,树脂的总交换容量约为0.58mmol/g。

2.2 树脂静态动力学曲线

转化液稀释6倍,取5mL加入到50mL三角瓶中,加入树脂0.8g,测定不同吸附时间时的L-茶氨酸含量,以吸附率对时间作图,得到静态吸附动力学曲线。结果如图2所示,717树脂吸附L-茶氨酸的平衡时间为16min。

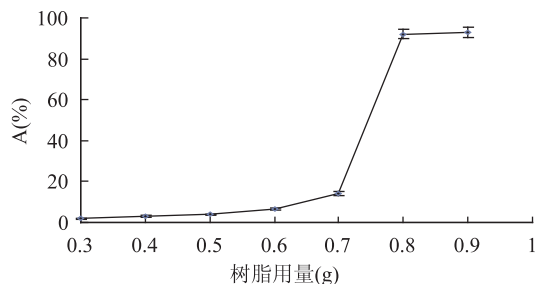


图1 树脂用量与L-茶氨酸吸附率的关系

Fig.1 Relation of resin dosage and absorption rate of L-theanine

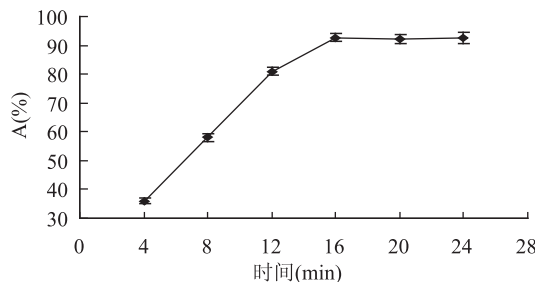


图2 树脂的吸附平衡时间

Fig.2 Absorption time of the adsorption rate

2.3 pH对树脂吸附的影响

氨基酸属于两性电解质,分子上的净电荷取决于氨基酸等电点和溶液pH,在溶液pH高于其等电点时,氨基酸带负电荷,与阴离子交换树脂上的交换基团结合而被吸附,随着洗脱液pH降低,氨基酸失去负电荷,离子键力减弱而被洗脱下来。由于不同的氨基酸等电点不同,这些氨基酸被依次洗脱。

实验结果如图3所示,当上样液pH=7时,树脂对L-茶氨酸几乎没有吸附作用;当pH>8时,吸附力明显增加,在pH7.5~8之间有一突变点,所以上样液的pH应不小于8。pH8.5时吸附最大,之后,随着pH的进一步增加,交换容量有所降低。该结果同时可以看出,pH7时L-茶氨酸吸附率已经很低,因此pH≤7是洗脱时需要的pH。

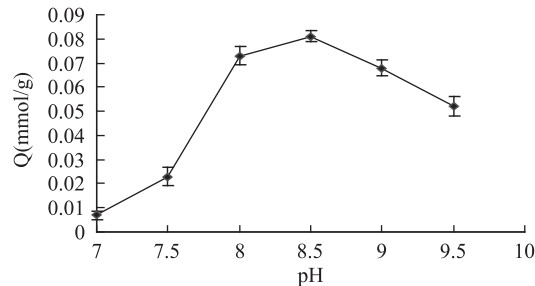


图3 pH对静态交换容量的影响

Fig.3 Effect of pH on the absorption capacity

2.4 上样流速对吸附的影响

离子交换的一个重要参数是固液两相的接触时间,可以用BV/h表示,即每小时流经柱子的上样液为床体积BV (bed volume)的倍数。有效的离子交换必须使固液两相有充分的接触时间,如果上样液流速过快,来不及与树脂交换,就会导致交换区高度拉长,发

生渗漏现象。实验中流速控制为 0.25、0.5、0.75BV/h，每 50mL 收集流出液，测定其中 L-茶氨酸含量。

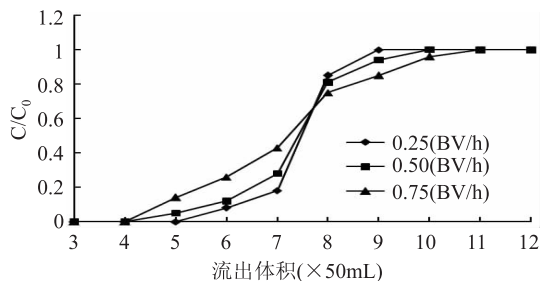


图 4 不同流速下的穿透曲线

Fig.4 Effluent curves under different flow rate

结果如图 4 所示，当流速控制在 0.25~0.5BV/h 时，曲线较陡，表明该流速下 L-茶氨酸被充分交换，树脂利用率高；当流速为 0.75BV/h 时，曲线明显放缓，表明该流速下 L-茶氨酸交换不充分，发生了渗漏现象。因此，实际操作中流速控制为 0.5BV/h 比较适宜。

2.5 L-茶氨酸洗脱曲线

综合以上条件，取转化液 100mL，用盐酸调节至 pH8.5，蒸馏水稀释至 300mL 上柱，控制流速不超过 0.5BV/h，然后用 0.5mol/L 盐酸洗脱，每 50mL 收集一瓶流出液，测定其中 L-茶氨酸含量。结果如图 5 所示，可以看到一个明显的洗脱峰。

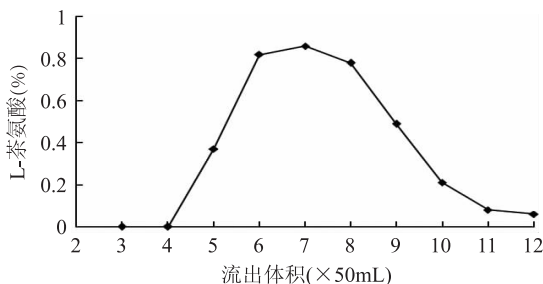


图 5 L-茶氨酸洗脱曲线

Fig.5 Elute curve of L-theanine

2.6 样品分离与鉴定

另取转化液 200mL，重复 2.5 中实验步骤两次，收集洗脱液总计 600mL（包括 2.5 中收集的洗脱液 200mL）。上述液体真空减压浓缩到约 10mL，趁热加入 95% 乙醇 20mL，室温结晶 6h，真空过滤，75% 酒精漂洗，烘干得 L-茶氨酸纯品 1.3g，经检测 m.p.218~220℃， $[\alpha]_D^{20} = +7.6^\circ (c = 5, H_2O)$ ， $^1H NMR (D_2O, 400MHz)$ ， δ : 3.75 (t, J = 6.1 Hz, 1H)，3.20 (q, J = 7.3Hz, 2H)，2.35-2.42 (m, 2H)，2.09-2.14 (m, 2H)，1.09 (t, J = 7.3Hz, 3H)，以上测定值与文献报道相符^[14]。

3 结论

实验中采用 717 阴离子交换树脂，用静态和动态的方法考察了不同操作条件对固定床离子交换效果的影响。静态吸附实验表明，717 阴离子交换树脂对酶促转化液中 L-茶氨酸的最佳吸附条件为 pH8.5，平衡吸附时间 16min，吸附量为 0.083mmol/g。L-茶氨酸转化液上样的最佳流速为 0.5BV/h。按照以上条

件，转化液稀释 3 倍上样，经 0.5mol/L 盐酸洗脱，旋转蒸发仪浓缩、醇沉结晶后，可得 L-茶氨酸纯品。经检测样品特征与文献报道相符。

参考文献

[1] Eschenauer G, Sweet BV. Pharmacology and therapeutic uses of theanine [J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 2006, 63(1): 26-30.

[2] Graham HN. Green tea composition and polyphenol chemistry [J]. Preventive Medicine, 1992, 21(3): 334-350.

[3] Juneja LR, Chu DC, Okubo T, et al. L-theanine - a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans [J]. Trends in Food Science & Technology, 1999, 10(6-7): 199-204.

[4] Matsuura T, Sakane I, Kakuda T, et al. Effects of plant growth regulators and carbon sources on theanine formation in callus cultures of tea (*Camellia sinensis*) [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(6): 1519-1521.

[5] Orihara Y, Furuya T. Production of theanine and other γ -glutamyl derivatives by *Camellia sinensis* cultured cells [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 65-68.

[6] Gu Haining, Jiang Yongxiang, Wang Jiong. A practical synthesis of ethyl L-glutamine (L-theanine) [J]. Organic Preparations and Procedures International, 2004, 36(2): 182-185.

[7] Lichtenstein N. Preparation of γ -alkylamides of glutamic acid [J]. Journal of the American Chemical Society, 1942, 64(5): 1021-1022.

[8] He Yanshou, Dufour JP, Meurens M. 高纯度茶氨酸的合成与特性 [J]. 茶叶科学, 2003, 23(2): 99-104.

[9] Suzuki H, Izuka S, Miyakawa N, et al. Enzymatic production of theanine, an "umami" component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial γ -glutamyltranspeptidase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(6): 884-889.

[10] Tachiki T, Yamada T, Mizuno K, et al. γ -Glutamyl transfer reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -glutamylmethylamide [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(7): 1279-1283.

[11] Yamamoto S, Wakayama M, Tachiki T. Theanine production by coupled fermentation with energy transfer employing *Pseudomonas taetrolens* Y-30 glutamine synthetase and baker's yeast cells [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(4): 784-789.

[12] Hung CP, Lo HF, Hsu WH, et al. Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 150(2): 157-170.

[13] 张飞, 熊吉滨, 刘均忠, 等. L-谷氨酰胺为底物酶法制备茶氨酸 [J]. 精细化工, 2010, 27(2): 130-132.

[14] Gu Haining, Jiang Yongxiang, Wang Jiong. A practical synthesis of ethyl L-glutamine (L-theanine) [J]. Organic Preparations and Procedures International, 2004, 36(2): 182-185.