

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 200433007

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生产  
L-苯丙氨酸的研究

**Studies on Extractive Fermentation for L-Phenylalanine  
Production by Recombinant *Escherichia coli* Immobilized  
with Microcapsules**

厦门大学新世纪优秀人才基金(0000-X07161)资助项目

罗 世 翊

指导教师姓名: 卢 英 华 副教授

专业名称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 0 7 年 7 月

论文答辩日期: 2 0 0 7 年 7 月

学位授予日期: 2 0 0 7 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007年7月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在          年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（  ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：     年   月   日

导师签名：

日期：     年   月   日

摘要.....	i
Abstract.....	iii
第一章 文献综述.....	1
<b>1.1 L-Phe 概况</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 L-Phe 的理化性质.....	1
1.1.2 L-Phe 的应用及国内外市场概况.....	2
1.1.3 L-Phe 的生产方法.....	3
1.1.3.1 提取法.....	3
1.1.3.2 化学合成法.....	4
1.1.3.3 发酵法.....	4
1.1.3.4 酶法.....	6
<b>1.2 细胞固定化技术</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 吸附法:.....	9
1.2.2 离子/共价交联:.....	10
1.2.3 包埋法:.....	10
1.2.4 生物微胶囊技术.....	11
1.2.4.1 生物微胶囊的制备方法.....	12
1.2.4.2 生物微胶囊的性能.....	13
1.2.4.3 常用的生物微胶囊体系.....	14
1.2.5 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊体系.....	15
1.2.5.1 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊的制备机理.....	15
1.2.5.2 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊的应用.....	17
1.2.6 NaCS-PDMDAAC 微胶囊体系.....	17
1.2.6.1 NaCS-PDMDAAC 微胶囊制备方法.....	18
1.2.6.2 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的应用.....	18
<b>1.3 L-Phe 的萃取分离</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4 本课题的研究意义及研究内容</b> .....	<b>20</b>
1.4.1 研究意义.....	20
1.4.2 研究内容.....	20
第二章 材料与方 法.....	21
<b>2.1 材料</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 菌种及其保藏.....	21
2.1.2 培养基.....	21
2.1.3 其它主要试剂及仪器.....	22
<b>2.2 实验方法</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 培养方法.....	22

2.2.2 菌体生长量测定.....	22
2.2.3 葡萄糖浓度的测定.....	23
2.2.4 L-Phe 测定.....	23
2.2.5 硫酸纤维素钠(NaCS)的制备.....	23
2.2.6 微胶囊的制备.....	23
2.2.7 微胶囊的机械性能.....	24
<b>第三章 有机溶剂萃取分离 L-Phe.....</b>	<b>25</b>
<b>引言.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 材料和方法.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 实验试剂.....	25
3.1.2 实验方法.....	25
3.1.3 分析方法.....	26
<b>3.2 实验结果与讨论.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 稀释剂对实验的影响.....	26
3.2.2 萃取前后水相溶液 pH 值的变化.....	27
3.2.3 L-Phe 浓度对分配系数的影响.....	27
3.2.4 D2EHPA 浓度对分配系数的影响及萃合物的结构.....	28
3.2.5 不同温度对 D 的影响.....	29
3.2.6 负载 L-Phe 有机相的反萃取.....	30
<b>3.3 本章小结.....</b>	<b>33</b>
<b>第四章 游离重组大肠杆菌细胞生长特性.....</b>	<b>34</b>
<b>引言.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 游离细胞生长特性.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 萃取剂的生物相容性.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊的生物相容性.....</b>	<b>35</b>
4.3.1 SA 的生物相容性.....	35
4.3.2 CMC 的生物相容性.....	36
4.3.3 CaCl <sub>2</sub> 的生物相容性.....	37
4.3.4 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊的生物相容性.....	38
<b>4.4 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的生物相容性.....</b>	<b>38</b>
4.4.1 NaCS 的生物相容性.....	38
4.4.2 PDMDAAC 的生物相容性.....	39
4.4.3 NaCS-PDMDAAC 微胶囊生物相容性.....	40
<b>4.5 本章小结.....</b>	<b>40</b>
<b>第五章 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生产</b>	
<b>L-Phe.....</b>	<b>42</b>
<b>引言.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊制备条件的确定.....</b>	<b>42</b>
5.1.1 CMC 制备浓度的确定.....	42
5.1.2 SA 制备浓度的确定.....	43

5.1.3 CaCl <sub>2</sub> 浓度的确定 .....	44
5.1.4 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊的机械性能 .....	45
<b>5.2 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊萃取发酵生产 L-Phe .....</b>	<b>46</b>
5.2.1 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊固定化细胞生长特性 .....	46
5.2.2 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> 微胶囊固定化细胞萃取发酵特性 .....	46
<b>5.3 本章小结 .....</b>	<b>48</b>
<b>第六章 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生</b>	
<b>产 L-Phe .....</b>	<b>49</b>
<b>引言 .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 NaCS-PDMDAAC 微胶囊制备条件的确定 .....</b>	<b>49</b>
6.1.1 NaCS 制备浓度的确定 .....	49
6.1.2 PDMDAAC 制备浓度的确定 .....	50
6.1.3 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的机械性能 .....	51
<b>6.2 NaCS-PDMDAAC 微胶囊萃取发酵生产 L-Phe .....</b>	<b>51</b>
6.2.1 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化细胞生长特性 .....	51
6.2.2 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化细胞萃取发酵特性 .....	52
<b>6.3 本章小结 .....</b>	<b>53</b>
<b>第七章 结论与建议 .....</b>	<b>55</b>
<b>7.1 结论 .....</b>	<b>55</b>
<b>7.2 建议 .....</b>	<b>56</b>
参考文献 .....	58
附录 .....	65
在读期间发表论文 .....	70
致谢 .....	70

## CONTENTS

<b>Abstract (Chinese)</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract (English)</b> .....	<b>iii</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 L-Phenylalanine .....	1
1.1.1 Chemical and physical characteristics of L-Phe .....	1
1.1.2 Applications of L-Phe and its market status .....	2
1.1.3 Methods for L-Phe production .....	3
1.1.3.1 Extraction .....	3
1.1.3.2 Chemical synthesis .....	4
1.1.3.3 Fermentation .....	4
1.1.3.4 Enzyme catalysis .....	6
1.2 Cell immobilization .....	8
1.2.1 Adsorption .....	9
1.2.2 Ion/covalence association .....	10
1.2.3 Embedment .....	10
1.2.4 Bioencapsule .....	11
1.2.4.1 Preparation methods .....	12
1.2.4.2 Characteristics .....	13
1.2.4.3 Commonly used systems .....	14
1.2.5 SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules .....	15
1.2.5.1 Preparation mechanisms .....	15
1.2.5.2 Applications .....	17
1.2.6 NaCS-PDMDAAC Microcapsules .....	17
1.2.6.1 Preparation mechanisms .....	18
1.2.6.2 Applications .....	18
1.3 Extraction of L-Phe .....	19
1.4 Contents and significance of this study .....	20
1.4.1 Research significance .....	20
1.4.2 Research contents .....	20
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	<b>21</b>
2.1 Materials .....	21
2.1.1 Microorganism and storage .....	21
2.1.2 Media .....	21
2.1.3 Major instruments and reagents .....	22
2.2 Experimental methods .....	22
2.2.1 Culture method .....	22

2.2.2 Assay of cell growth.....	22
2.2.3 Assay of glucose concentration.....	23
2.2.4 Assay of L-Phe.....	23
2.2.5 Preparation of NaCS.....	23
2.2.6 Preparation of microcapsules.....	23
2.2.7 Mechanic properties of microcapsules.....	24
<b>Chapter 3 Separation of L-Phe by organic solvent extraction .....</b>	<b>25</b>
Introduction.....	25
3.1 Materials and methods.....	25
3.1.1 Reagents.....	25
3.1.2 Experimental methods.....	25
3.1.3 Analytical methods.....	26
3.2 Results and discussion.....	26
3.2.1 Effect of solvent.....	26
3.2.2 Changes of pH in aqueous phase before and after extraction.....	27
3.2.3 Effect of L-Phe concentration on distribution coefficient.....	27
3.2.4 Effect of D2EHPA concentration on distribution coefficient and structure of the extraction complex.....	28
3.2.5 Effect of different temperatures on distribution coefficient.....	29
3.2.6 Back-extraction of L-Phe.....	30
3.3 Conclusions.....	33
<b>Chaper 4 Growth properties of recombinant <i>E. coli</i> .....</b>	<b>34</b>
Introduction.....	34
4.1 Growth properties of suspended cells.....	34
4.2 Biocompatibility of extractant.....	35
4.3 Biocompatibility of SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules.....	35
4.3.1 Biocompatibility of SA.....	35
4.3.2 Biocompatibility of CMC.....	36
4.3.3 Biocompatibility of CaCl <sub>2</sub> .....	37
4.3.4 Biocompatibility of SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules.....	38
4.4 Biocompatibility of NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	38
4.4.1 Biocompatibility of NaCS.....	38
4.4.2 Biocompatibility of PDMDAAC.....	39
4.4.3 Biocompatibility of NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	40
4.5 Conclusions.....	40
<b>Chapter 5 Extractive fermentation of L-Phe by recombinant <i>E. coli</i> immobilized in SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> microcapsules .....</b>	<b>42</b>
Introduction.....	42
5.1 Preparing conditions of SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules.....	42
5.1.1 Concentration of CMC.....	42



5.1.2 Concentration of SA .....	43
5.1.3 Concentration of CaCl <sub>2</sub> .....	44
5.1.4 Mechanic properties of SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules.....	45
5.2 Extractive fermentation of L-Phe by <i>E. coli</i> cells in SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules.....	46
5.2.1 Growth properties of immobilized cells .....	46
5.2.2 Extractive fermentation properties of SA-CMC/CaCl <sub>2</sub> microcapsules.....	46
5.3 Conclusions.....	48
<b>Chapter 6 Extractive fermentation of L-Phe by recombinant <i>E. coli</i> immobilized in NaCS-PDMDAAC Microcapsules .....</b>	<b>49</b>
Introduction.....	49
6.1 Preparing conditions of NaCS-PDMDAAC microcapsules .....	49
6.1.1 Concentration of NaCS .....	49
6.1.2 Concentration of PDMDAAC.....	50
6.1.3 Mechanic properties of NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	51
6.2 Extractive fermentation of L-Phe by <i>E. coli</i> cells in NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	51
6.2.1 Growth properties of immobilized cells .....	51
6.2.2 Extractive fermentation properties of NaCS-PDMDAAC microcapsules.....	52
6.3 Conclusions.....	53
<b>Chapter 7 Conclusions and proposals.....</b>	<b>55</b>
7.1 Conclusions.....	55
7.2 Proposals.....	56
<b>References .....</b>	<b>58</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>65</b>
<b>Published papers .....</b>	<b>70</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>70</b>

## 摘 要

作为人体八种必需氨基酸之一的 L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine, L-Phe), 是一种重要的合成中间体, 在食品和医药领域有广泛的应用, 可作为食品添加剂、抗癌药物中间体和合成阿斯巴甜的原料, 具有非常广阔的市场前景。

利用固定化重组大肠杆菌细胞发酵生产 L-Phe, 是当前制备 L-Phe 应用最广泛的一种方法。本文利用两种新型微胶囊——SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊体系与 NaCS-PDMDAAC 微胶囊体系对重组大肠杆菌进行固定化, 探索了它们在萃取发酵生产 L-Phe 过程中的特性, 并与游离细胞培养作了比较, 试图对实验室探索 L-Phe 的工艺以及大规模生产 L-Phe 提供理论依据。

论文先对有机溶液萃取分离 L-Phe 作了比较系统的研究: 以磷酸二(2-乙基己基)脂(D2EHPA)为萃取剂, 环己烷为稀释剂萃取 L-Phe, 研究了 L-Phe 浓度、D2EHPA 浓度、温度对萃取分配系数  $D$  的影响, 以及负载 L-Phe 有机相的反萃取特性。结果表明: 萃取分配系数  $D$  随温度的升高而降低, 而 L-Phe 浓度对分配系数的影响还与水相初始 pH 值有关; 萃合物是以一个 L-Phe 分子和二 D2EHPA 分子结合而成。在利用酸溶液对负载 L-Phe 有机相的反萃取过程中, 反萃取的效果符合  $\text{HCl} > \text{HNO}_3 \geq \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{CH}_3\text{COOH}$ , 且随 HCl 浓度和温度的升高而升高。

然后研究了游离重组大肠杆菌细胞生长特性, 结果表明: 在游离培养的情况下, 培养 12 h 时即可达稳定期, 葡萄糖也在这一时间段内被迅速消耗, 到 14 h 时葡萄糖已消耗完全, 而 L-Phe 的产量在对数期(10 h 左右)达到峰值, 但此后出现一定的下降, 这可能是在游离培养达稳定期时被细胞消耗所致。萃取剂对重组大肠杆菌具有毒害作用, 所以在后续的研究过程中, 必须避免使菌体细胞直接与萃取剂进行接触。而两种新型固定化体系——SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊体系和 NaCS-PDMDAAC 微胶囊体系具有良好的生物相容性, 可用于重组大肠杆菌的发酵生产过程。

接下来研究了 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生产 L-Phe, 先是确定了有利发酵过程的微胶囊制备浓度: 12~14 g L<sup>-1</sup> 的 CMC, 8~10 g L<sup>-1</sup> 的 SA, 12~14 g L<sup>-1</sup> 的 CMC, 80~100 g L<sup>-1</sup> 的 CaCl<sub>2</sub>。然后考察了不同

制备浓度制备的微胶囊的机械性能, 结果表明 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊在萃取剂存在的情况下稳定性非常差, 其中以 12.0 g L<sup>-1</sup> CMC、10.0 g L<sup>-1</sup> SA、100.0 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 制备得到微胶囊的稳定性相对较好。最后考察以 12.0 g L<sup>-1</sup> CMC、10.0 g L<sup>-1</sup> SA、100.0 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 制备得到的微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生产 L-Phe 的情况, 结果表明: 由于受传质的影响, SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊固定化培养的延迟期延长了 2 h 左右, 但最终的菌体浓度略为升高; 另外在生长末期, 微胶囊固定化情况下的 L-Phe 没有明显的消耗; 同时, 在 0 h 时加入萃取剂的微胶囊固定化萃取发酵过程的产量约为 1.70 g L<sup>-1</sup> L-Phe; 14 h 的产量约为 10.40 g L<sup>-1</sup> L-Phe。

最后考察了 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生产 L-Phe, 先确定了有利发酵过程的微胶囊制备浓度: 3%~4% 的 NaCS, 4%~5% 的 PDMDAAC。然后考察了不同制备浓度下制备的微胶囊的机械性能, 结果表明 NaCS-PDMDAAC 微胶囊具备非常良好稳定性, 并不受萃取剂的影响。综合考虑传质因素, 认为以 3% 的 NaCS, 4% 的 PDMDAAC 制备得到微胶囊用于固定化重组大肠杆菌培养更好。研究以 3% 的 NaCS, 4% 的 PDMDAAC 制备得到的微胶囊固定化重组大肠杆菌萃取发酵生产 L-Phe, 结果表明: 由于 NaCS-PDMDAAC 微胶囊囊膜非常致密, 受传质影响, NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化培养的延迟期比游离培养延长了 4 h 左右, 比 SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> 微胶囊固定化培养延长了 2 h 左右, 而且最终的菌体浓度相对偏低、葡萄糖并未完全消耗, 最终的残糖浓度约为 4 g L<sup>-1</sup> 左右; 另外, 在生长末期, L-Phe 不存在消耗过程; 同时, 在 0 h 时加入萃取剂的微胶囊固定化萃取发酵产量约为 12.50 g L<sup>-1</sup> L-Phe; 22 h 的产量约为 13.16 g L<sup>-1</sup> L-Phe。

**关键词:** 重组大肠杆菌; 萃取发酵; L-苯丙氨酸; 微胶囊

## Abstract

As one of the eight amino acids essential to human being, L-Phenylalanine (L-Phe) is an important organic compound intermediate, which can be widely used in food industry, medicine, and chemical engineering. It is a major food additive and anticancer medicament intermediate. What is more, it is the raw material of aspartame synthesis, which made it widely demanded in the market.

Fermentation by immobilized cells is one of the broadly used ways to produce L-Phenylalanine. In this study, two innovative immobilized systems — SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> and NaCS-PDMDAAC microcapsule systems were used to immobilize recombinant *E. coli* for the extractive fermentation of L-Phe.

The extraction of L-phenylalanine using di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid (D2EHPA) as extractant and cyclohexane as diluent was studied firstly. The factors that influence the L-Phe extraction process such as the concentration of L-Phe and D2EHP, the pH value and the temperature as well as back-extraction were investigated. The results showed that the distribution coefficient decreased with increasing temperature and depended on the concentration of L-Phe and the initial pH value of aqueous phase. The study of the mechanism of the extraction process indicated that the extraction complex might be composed of one L-Phe molecule and two D2EHPA molecules. The effect of acids on the back-extraction process of L-Phe was proved to be HCl>HNO<sub>3</sub>≥H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>>CH<sub>3</sub>COOH, and the back-extraction ratio increased with increasing HCl concentration and temperature.

Then the study on growth characteristics of free recombinant *E. coli* showed that the cells could reach the stationary phase after 12 h of cultivation and glucose was rapidly consumed during this time and completely consumed at 14 h. The yield of L-Phe reached its maximum value at 10 h but decreased afterwards maybe because of the consumption by free cells at stable time. The extractant was harmful to recombinant *E. coli*, so in later studies direct contact of cells to the extractant should be avoided. Therefore two innovative immobilized system – SA-CMC/CaCl<sub>2</sub>

and NaCS-PDMDAAC microcapsule systems were used in the extractive fermentation of L-Phe by recombinant *E. coli* for they had good biocompatibility.

The growth behavior of recombinant *E. coli* in SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> microcapsules prepared by using different concentrations of the components was examined. From the above investigations, The suitable concentrations for the preparation of SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> microcapsules was proved to be (g L<sup>-1</sup>) CMC 12-14, sodium alginate (SA) 8-10 and CaCl<sub>2</sub> 80-100. By investigation of the disruption rate of microcapsules at different concentrations of preparation, the results showed that SA-CMC/CaCl<sub>2</sub> microcapsules were very unstable under the presence of extractant solvents. The relatively preferable concentrations were (g L<sup>-1</sup>): CMC 12.0, SA 10.0, and CaCl<sub>2</sub> 100.0. The results of the extractive fermentation using recombinant *E. coli* immobilized in the microcapsules prepared at the concentrations mentioned above showed that the stationary phase of the microencapsulated cells delayed 2 h compared with the suspension cultivation due to the mass transfer problem. However, the biomass was a little higher. In the meanwhile, 1.70 and 10.40 g L<sup>-1</sup> L-Phe could be obtained by adding the extractant at 0 and 14 h of the extractive fermentation, respectively.

NaCS-PDMDAAC microcapsule system used for the extractive fermentation was also studied. The suitable concentrations for the preparation of the microcapsules were 3%-4%(v/v) NaCS and 4%-5% PDMDAAC. By investigation of the disruption rate of the microcapsules at different concentrations of preparation, the results showed that NaCS-PDMDAAC microcapsules were very stable and were not influenced by the extractant. Considering the fact of mass transfer, 3% NaCS and 4%PDMDAAC were suitable for the preparation of the microcapsules to immobilize recombinant *E. coli*. The results showed that because the membrane of the NaCS-PDMDAAC microcapsules were very compact, the stationary phase of the immobilized cells was reached 4 h later than free cell culture. The ultimate biomass was lower and glucose was not completely consumed, and the rest concentration of glucose was 4 g L<sup>-1</sup>. Moreover, at final stage, there was no consumption of L-Phe. In this situation, 12.5 and 13.16 g L<sup>-1</sup> L-Phe could be obtained by adding the extractant

at 0 and 22 h of the extractive fermentation, respectively.

**Key words :** Recombinant *Escherichia coli*; Extractive fermentation;  
L-Phenylalanine; Microcapsules

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 文献综述

### 引言

甜味作为人类四大味觉之一，一直受到人们的广泛重视。在较长一段时期以内，传统食品工业主要以糖类作为甜味剂，常用的天然糖类物质有蔗糖、葡萄糖、乳糖、果糖等，化学合成糖类物质有 D-山梨糖醇等。糖类甜味物质多呈现高营养性、高安全性、高发热值及甜度低、添加量大等特点，但如果长期大量食用，易引起心血管疾病、肥胖症、糖尿病及龋齿等严重威胁人体健康的疾病。二肽甜味剂主要是由 L-天冬氨酸与另一种氨基酸衍生物形成的具有甜味的二肽，因为其低热量的特点而受到人们的青睐，尤其受到糖尿病、高血脂和忌糖患者的欢迎。含 L-天冬氨酸的二肽甜味剂种类较多，而其中以阿斯巴甜（Aspartame）因甜度高且生产工艺相对简单而应用广泛<sup>[1-4]</sup>。

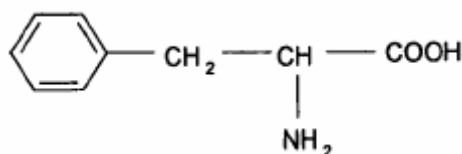
阿斯巴甜，又名天冬甜素、甜味素、蛋白糖，是  $\alpha$ -L-天门冬氨酸-L-苯丙氨酸甲酯（简称： $\alpha$ -APM）的商品名，它是由 L-天门冬氨酸(L-Aspartic acid)与 L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine, L-Phe)二种氨基酸结合而成的缩二氨基酸(Dipeptide)甲基酯。阿斯巴甜的含热量与蔗糖类似，为  $16.72 \text{ kJ g}^{-1}$ ，但在获得同等甜度的情况下其需求量只是蔗糖的 1/200，而且不带后苦涩味和后金属味，这正是人们所期待的理想化甜味剂，目前，世界上大部分国家已批准它作为食用甜味剂而生产、销售。也正是阿斯巴甜这一甜味剂的日渐风行导致了对 L-Phe 这一主要构成原料需求量的激增<sup>[5-7]</sup>。

### 1.1 L-Phe 概况

#### 1.1.1 L-Phe 的理化性质

L-Phe 化学名 L- $\alpha$ -氨基- $\beta$ -苯丙酸(L- $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Phenylpropionic Acid)，分子式  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ，分子量 165.19，比旋光度  $35.1^\circ$  (水中)，等电点 5.48，熔点  $283^\circ\text{C}$  (分解)，为白色结晶或白色结晶性粉末，稍有苦味，在水中溶解度随温度升高而增大 ( $25^\circ\text{C}$  时为  $29.7 \text{ g L}^{-1}$ ， $100^\circ\text{C}$  时为  $99.0 \text{ g L}^{-1}$ )，难溶于甲醇、乙醇、乙

醚、稀无机酸和碱性溶液。其结构式如下<sup>[8]</sup>：



L-Phe 是一种天然氨基酸，为人体必需的八种氨基酸之一，成人每天最低需要量为  $31 \text{ mg kg}^{-1}$ ，幼儿为  $16.9 \text{ mg kg}^{-1}$ 。它最初是在 1879 年由 Sgholze 和 Barbieri 发现并且从羽扁豆中分离出来的，它广泛存在于各种动植物蛋白质中，在动物体内它可以经苯丙氨酸羟化酶催化转化为 L-酪氨酸<sup>[9-10]</sup>。

### 1.1.2 L-Phe 的应用及国内外市场概况

作为人体所必须的氨基酸之一，L-Phe 主要在医药、食品领域有广泛的应用，其主要应用如下<sup>[11-13]</sup>：

(1) 食品添加剂：L-Phe 作为营养强化剂和饮料添加剂，添加于食品中，一方面满足人体的需求，另一方面还与糖类起氨基-羰基反应，改善食品风味。

(2) 生产保健甜味剂阿斯巴甜的原料：目前全球范围内用于合成阿斯巴甜的 L-Phe 年需求量约为 18,000 t，占 L-Phe 年总需求量的 60%。

(3) 抗癌药物中间体：基于癌细胞对氨基酸的特殊要求，可以氨基酸为载体，把抗癌药物分子或基因载入肿瘤区，从而可起到抑制肿瘤生长、降低抗肿瘤药物毒性的目的。而这些氨基酸载体中以 L-Phe 为最理想，其效果是其它氨基酸的 3-5 倍。

(4) 制备氨基酸输液、综合氨基酸制剂：L-Phe 可用作肠胃外营养输液，也可作特殊人员合成膳食、必需氨基酸片等营养强化剂成分。

(5) 生产肾上腺素、甲状腺素和黑色素的原料：L-Phe 是生物体内合成酪氨酸的重要原料，可影响甲状腺激素和毛发、皮肤的黑色素；还可在体内参与消除肾与膀胱的功能消耗。

在国际市场上，L-Phe 分为医药级、食品级、饲料级。2005 年，全球年需求量为 30,000 t，且以每年 10%-15% 的速度增长，实际年产量在 14,000 t，其中美国年产量约 6000-7000 t，西欧约 4200 t，日本约 2600 t。主要生产商有美国纽特、法国 Rexim SA、德国 Amino GmbH、荷兰 DSM、日本协和、日本味之素和韩国大象等公司，其中美国纽特是世界上最大的 L-Phe 生产商，年产量达



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库