

科研与开发

化学生物耦合法制备 *D*-赖氨酸

刘毅^{1,2}, 焦庆才², 印晓星¹

(1. 徐州医学院药理学系, 江苏 徐州 221004;

2. 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: *L*-赖氨酸经化学消旋反应后, 应用蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*) AS1.1009 对其进行生物转化, 可制备 *D*-赖氨酸, 理论收率为 56.6%。确定了在 100℃ 下, 以 1.0 mol/L 氢氧化钠水溶液, 用 0.10 摩尔比的水杨醛催化 *L*-赖氨酸在 4h 内消旋, 反应活化能为 62 187.86 J/mol; 对生物转化中赖氨酸脱羧酶性质研究结果表明: 该酶最适 pH 为 8.0, 最适温度为 37℃, 吐温-80 质量浓度 0.5 g/L, 菌体质量浓度 10 g/L, 底物质量浓度为 30 g/L 时, 最高比酶活为 3840U。在此优化条件下转化时间为 12h。

关键词: *D*-赖氨酸; 脱羧酶; 消旋; 生物转化

中图分类号: TQ93

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)05-0032-03

Preparation of *D*-lysine by chemical reaction and microbial asymmetric transformation

LIU Yi^{1,2}, JIAO Qing-cai², YIN Xiao-xing¹

(1. Department of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: After *L*-lysine racemized the *D*, *L*-lysine crystals was treated as substrate with *Hafnia alvei* AS1.1009 intact cells as biocatalysts for getting crystalline *D*-lysine with a yield of 56.6% from the reactant mixture after the simple purification. In the presence of 0.10 molar equivalent of Salicylaldehyde the whole process of *L*-lysine racemization can be completed within 4 h in a medium of 1.0 mol/L of NaOH under 100℃. The activation energy of the processes was 62 187.86 J/mol. The characteristics of *Hafnia alvei* AS1.1009 decarboxylase were studied. Under the conditions as follows: pH 8.0, temperature 37℃, cell concentration 10 g/L, tween-80 0.5 g/L, substrate concentration 30 g/L, the specific activity was up to 3 840 U. *L*-lysine can be completely degraded by the decarboxylase for 12 h under the optimal conditions.

Key words: *D*-lysine; decarboxylase; racemization; biotransformation

D-赖氨酸 (*D*-Lys) 是重要药物中间体, 是合成促黄体生成激素 (LH) 类似物的前体^[1], 同时也可用于合成促性腺激素释放激素 (GnRH) 高活性类似物。*D*-Lys 多聚体则是药物良好载体^[2]。目前通用 *D*-Lys 的制备方法是利用赖氨酸与手性酸生成非对映体盐, 利用非对映体盐的溶解度差异而分离之^[3], 但分离效率不高, *D*-Lys 产量不高^[4]。国内 *L*-赖氨酸 (*L*-Lys) 年生产能力已跃居世界首位, 但近年来受国内 *L*-Lys 供应充足、价格低位运行的影响, 一些赖氨酸生产企业开始限产甚至停产。截至 2005 年底, 国内正常生产的 *L*-Lys 厂家总产能已超过 40 万 t/a, 但是实际开工只有 50% 左右^[5], 因此急需寻求 *L*-Lys 进一步加工能力, 以提高产品附加值。笔者以 *L*-Lys 为反应原料, 经消旋反应获得 *D*, *L*-Lys, 通过蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*) AS 1.1009 中的赖氨酸脱羧酶 (LDC) 对 *D*, *L*-Lys 进行立体选择

性生物转化, 可制备 *D*-Lys。该方法克服了化学拆分法中拆分剂选择难、价格昂贵、产品收率不高、旋光不高等缺陷, 既能部分解决 *L*-Lys 产能过剩问题, 又能为我国氨基酸产业的发展提供新出路, 提高氨基酸产业在国际市场的竞争力。

1 实验部分

1.1 菌株、主要试剂与仪器

蜂房哈夫尼菌 AS 1.1009, 北京微生物研究所提供; *L*-赖氨酸 (*L*-Lys)、水杨醛 (SA); 其他试剂均为化学纯或分析纯。

Nexus 870 FT-IR 红外仪、Bruker DRX-500 氢核磁共振仪、LC/QTMMSn 型电喷雾质谱仪、日立 UV-3000 型分光光度计、WRS-1 型数字熔点仪 (上海物理光学仪器厂)、PHS-2C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂)、WZZ-2B 型自动旋光仪 (上海物理光学

收稿日期: 2007-01-02

基金项目: 国家技术创新基金 (02CJ-13-01-16) 资助项目

作者简介: 刘毅 (1972-), 男, 博士, 主要从事手性药物研究, 13775895636, njuliuyi2003@tom.com。

仪器厂)。

1.2 主要培养基

斜面培养基(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10,氯化钠 5,琼脂 20,pH 7.2。

液体种子培养基(g/L):葡萄糖 10,牛肉膏 3,蛋白胨 10,氯化钠 5,磷酸二氢钾 3,硫酸镁 0.5,pH 7.2。

Falkow氏发酵培养基(g/L):葡萄糖 1,酵母膏 3,蛋白胨 5,L-Lys 5 g,pH 7.2。

1.3 菌体酶活测定

在100 mL三角瓶中加入湿菌体0.5 g,经消旋反应获得的D,L-Lys 0.25 g、0.2 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0) 50 mL、吐温-80 0.01 g,于35℃、170 r/min下振荡反应1.5 h。取10 mL反应液,放入冰箱速冻,使酶反应终止,离心去除菌体。取上清液1 mL,以标准品溶液作对照,用茚三酮溶液显色,于570 nm波长用0.5 cm光程的比色杯测定吸收度,再测定反应后赖氨酸总浓度。比酶活定义为在35℃、pH 7.0,1 h由1 g湿菌体所转化消耗的L-Lys的 μmol 数,单位为U,1 U = 1.0 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

1.4 L-赖氨酸化学消旋反应

文献[6]报道L-Lys在n(SA):n(L-Lys) = 0.1:1.0时有较好反应效果。本实验中加入0.10 mol L-Lys和0.01 mol水杨醛为催化剂,同时加入1.0 mol/L NaOH水溶液200 mL,进行消旋反应。各取10 mL反应原液,用6.0 mol/L盐酸稀释至20 mL,并置于冰浴中快速冷却至20℃,测得旋光值,以作为初始旋光值。并在反应进行过程中,每间隔一定时间用相同的方法,测得不同时间的旋光值。用茚三酮显色法于570 nm处测赖氨酸含量,获得反应过程中总赖氨酸的分解率,可得反应液总赖氨酸浓度变化,方法见文献[7]。

1.5 生物转化及拆分产物分离纯化

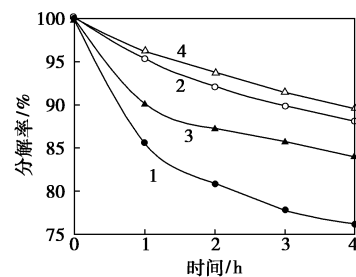
将经消旋反应得到的30 g D,L-Lys,配制成1 000 mL(pH 6.0)D,L-Lys溶液,加10 g *H. alvei* AS 1.1009湿菌体,分装于10只250 mL三角瓶中,于pH 8.0,最适温度为37℃,吐温-80质量浓度为0.5 g/L条件下反应至L-Lys转化完全。转化液离心后取出菌体。上清液用活性炭脱色过滤,滤液通过阳离子交换树脂吸附,用不同浓度稀氨水洗脱,分离收集含D-Lys洗脱液,浓缩干燥,得D-Lys 8.5 g,理论收率的56.6%, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -25.3^\circ$ ($c = 2,6 \text{ mol/L}$ 盐酸溶液),熔点211~213℃。

2 结果与讨论

2.1 L-赖氨酸消旋反应

L-Lys的消旋方法主要采用以乙酸或其水溶液为溶剂,在水杨醛(SA)的催化下共热消旋^[8],该方法虽具有消旋效率较高、反应条件温和等优点,但是产物后处理困难,生产成本低和容易造成环境污染。笔者选用碱性水溶液替代有机溶剂作为反应溶剂,以水杨醛模拟生物体内催化氨基酸消旋的重要辅酶磷酸吡哆醛为催化剂,催化L-Lys消旋反应。

考察了不同温度条件下,L-Lys的消旋率和分解率,并根据结果得到了消旋反应的活化能。L-Lys消旋速率随温度上升而增加,根据阿累尼乌斯(Arrhenius)方程,将 $\ln k_{\text{R}}$ 对 $1/T$ 作图可得到一直线(图略),求得消旋反应的活化能 $E_{\text{a}} = 62\ 187.86 \text{ J/mol}$, $k_0 = 77\ 428.48 \text{ s}^{-1}$ 。速率常数可表示为: $k_{\text{R}} = 77\ 428.48 \text{ e}^{-\frac{62\ 187.86}{RT}}$ 。



1—40℃;2—80℃;3—100℃;4—120℃

图1 不同温度下L-Lys消旋反应分解率

L-Lys在 α -和 ζ -位存在2个氨基,2个氨基与催化剂SA形成亚胺盐氮正离子有竞争作用,减少活性中间体产生,如图1所示温度较低时,如40、80℃消旋反应速率较低。在120℃时消旋速率较高,但是赖氨酸分解率也较高,造成产率下降。因此温度是影响消旋反应速度的敏感因素。温度并非越高越好,必须综合考虑。本文中得出100℃是较好的消旋反应温度,反应速率较高,同时总赖氨酸分解率较低,可达到较为理想的消旋反应效果。

2.2 赖氨酸脱羧酶活性研究

2.2.1 温度的影响

通过对不同生物转化温度下LDC酶活测定,得到菌体LDC酶活最高的温度为37℃。当温度高于37℃容易使酶中蛋白质变性,从而加剧酶的失活。

2.2.2 pH的影响

研究中发现,反应过程中随着底物L-Lys的消耗,反应液的pH逐渐升高。而反应过程中的pH变

化也影响着 *D*-Lys 的生产。比较在不同控制 pH 条件下的 LDC 的酶活,由图 2 可知,pH=8 时酶活最高。

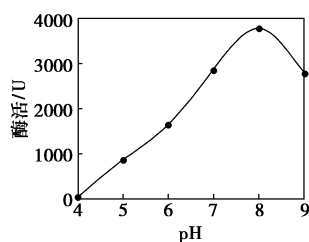
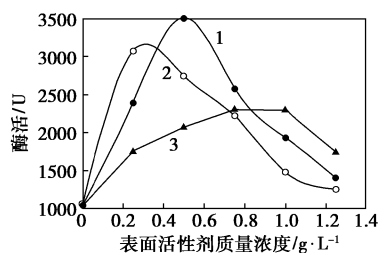


图 2 pH 对酶活的影响

2.2.3 表面活性剂的影响

在反应体系中加入表面活性剂,可加大菌体的细胞通透性,从而有利于底物转送到细胞内反应中心,同时也使产物得到及时释放,因此选用较常见且价格便宜的几种表面活性剂,对反应过程中的酶活进行测定,结果表明 Tween-80 较其他 2 种激活剂对 LDC 激活能力更强,当质量浓度为 0.5 g/L 时酶活可达 3 510 U。而 OP 和 CTAB 对酶活增加不明显(见图 3)。



1—吐温 80;2—CTAB;3—OP

图 3 表面活性剂对酶活的影响

2.2.4 菌体浓度对 LDC 活力影响

由图 4 可知,当菌体质量浓度达 10 g/L 以上时,转化率上升不明显。

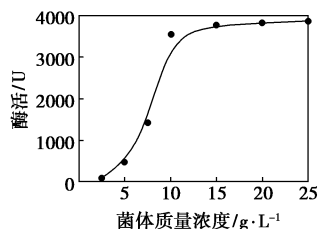


图 4 菌体浓度对酶活的影响

2.2.5 底物浓度的影响

在同体积、不同浓度的反应底物中,加入相同菌体量进行转化,在其他条件不变的情况下,底物质量浓度为 30 g/L 到 50 g/L 时酶活较高(见图 5),在底物质量浓度为 30 g/L 时,最高比酶活为 3 840 U。仅到 60 g/L 后,随着产物增加,将产生产物抑制效应。

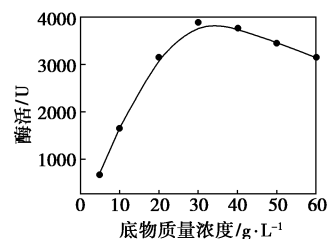


图 5 底物浓度对酶活的影响

2.2.6 菌体重复利用实验

将经生物转化用过的菌体离心收集,用于下次转化反应,并记录将 50 mL 质量浓度 30 g/L *D*, *L*-Lys 完全拆分所需的时间。实验证明菌体可连续反应 4 次或 5 次,前 3 次反应在同样条件下拆分时间略有延长,为 12~16 h,第 5 次反应仍能对 *D*, *L*-Lys 进行完全拆分,但反应时间需延长至 36 h。

3 结语

该方法既利用了化学反应的效率高、成本低的特点,又首次利用蜂房哈夫尼菌赖氨酸脱羧酶对 *D*, *L*-赖氨酸进行生物转化,充分利用生物酶所具有催化专一性的优点,使 *D*-Lys 制备路线达到高效、立体专一的特点,该方法优于国外相应报道^[9],具有工业化优势,可以提高资源的利用率,减少工业废物的产生与排放。

参考文献

- [1] Bajusz S, Janaky T, Csernus J, *et al*. Highly potent metalloproteinase analogs of luteinizing hormone-releasing hormone[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(16): 6313-6317.
- [2] Shen W C, Du X, Feener E P, *et al*. The intracellular release of methotrexate from a synthetic drug carrier system targeted to Fc receptor-bearing cells[J]. *J Controlled Release*, 1989, 10: 89-96.
- [3] 廖晓恒. *D*-赖氨酸盐酸盐的研制[J]. *氨基酸和生物资源*, 1999, 21(3): 130-131.
- [4] 中国化工产品大全[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [5] 孙志强. 2005 年赖氨酸市场回顾及 2006 年展望[J]. *饲料博览*, 2006(3): 34-36.
- [6] Yamada S, Hongo C, Yoshioka R, *et al*. Method for the racemization of optically active amino acid[J]. *J Org Chem*, 1983, 48(6): 843-846.
- [7] 刘毅, 郭丽芸, 吴晓燕, 等. 微波辐射下 *L*-氨基酸快速消旋方法[J]. *化学通报*, 2005, 68(12): 935-938.
- [8] Ebbers E J, Ariaans G J A, Houbiers J P M, *et al*. Controlled racemization of optically active organic compounds: Prospects for asymmetric transformation[J]. *Tetrahedron*, 1997, 53(28): 9417-9476.
- [9] Takahashi E, Furui M, Shibatani T. Scale-up of *D*-lysine production from *L*-lysine by successive chemical racemization and microbial asymmetric degradation[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(3): 245-249. ■