

生物转化制备 *D*-谷氨酰胺的研究

钱绍松, 吴晓燕, 刘毅, 陈然, 李加友, 焦庆才

(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:报道了制备 *D*-谷氨酰胺的一种新方法, 即利用大肠杆菌 AS1.505 的 *L*-谷氨酰胺脱羧酶立体选择性地将对映体 *D, L*-谷氨酰胺中 *L* 型对映体降解为 4-氨基-丁酰胺, 分离得到 *D*-谷氨酰胺。同时考察了转化体系温度、pH 等因素对 *L*-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响。实验结果表明最佳条件为: 温度 37℃, 转化体系 pH=4.8, 菌体质量浓度 5 g/L, 吐温-80 质量浓度 0.15 g/L, 菌龄 14 h, 底物质量浓度 40 g/L。 *L*-谷氨酰胺脱羧酶在最适转化条件下比酶活可以达到 4 200 U, *L*-谷氨酰胺在 8 h 内完全转化成 4-氨基-丁酰胺, *D*-谷氨酰胺收率达到理论收率的 92%。

关键词: *L*-谷氨酰胺脱羧酶; 酶法转化; *D*-谷氨酰胺

中图分类号: TQ93

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2005)09-0044-03

Study on preparation of *D*-glutamine by biotransformation

QIAN Shao-song, WU Xiao-yan, LIU Yi, CHEN Ran, LI Jia-you, JIAO Qing-cai

(State key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Optically pure *D*-glutamine is initially prepared by biotransformations of *D, L*-glutamine in the presence of *L*-glutamine decarboxylase in *Escherichia coli* AS1.505. Factors that affected the enzymatic activity such as converting temperature, pH value, etc., were studied. The results show that the specific enzyme's activity can come up to 4200U, and *L*-glutamine can be completely degraded by the decarboxylase for 8 h under the optical conditions as follows: 37℃, 4.8 of pH value, 5 g/L of cell concentration, 0.15 g/L of tween-80, 14 h of strain age, and 40 g/L of the substrate concentration.

Key words: *L*-glutamine decarboxylase; biotransformation; *D*-glutamine

L-氨基酸易得、廉价, 以 *L*-氨基酸为原料制备 *D*-氨基酸是工业化生产 *D*-氨基酸的主要方法, 首先用化学或生物方法使 *L*-氨基酸消旋为 *D, L*-氨基酸, 然后选用合适的拆分剂进行化学拆分获得 *D*-氨基酸。由于拆分剂选择难、价格昂贵、产品收率不高、旋光常常不能满足要求等缺陷, 制备 *D*-氨基酸比较理想的工业化方法是将 *D, L*-氨基酸进行生物拆分。生物拆分主要有 2 种方法: 一是将 *D, L*-氨基酸直接进行生物降解, 消除其中的 *L* 型对映体, 得到 *D*-氨基酸^[1-2]; 二是将 *D, L*-氨基酸进行酰化反应生成 *N*-酰化-*D, L*-氨基酸, 再用氨基酰化酶选择性地酰化反应得到的 *L*-氨基酸, 分离得到的 *N*-酰化-*D*-氨基酸经水解获得 *D*-氨基酸^[3-5]; 也有文献报道用 *D*-氨基酸酰化酶对 *N*-酰化-*D, L*-氨基酸选择性地酰化反应直接得到 *D*-氨基酸^[6-8]。目前市售谷氨酰胺主要是 *L*-谷氨酰胺, 而谷氨酰胺的 γ 位酰胺键使得其很不稳定, 在酸、碱或加热的条件下容易分解成焦谷氨酸或谷氨酸, 所以很难将 *L*-谷氨酰胺消旋成 *D, L*-谷氨酰胺,

也就无法用上述方法制备 *D*-谷氨酰胺。*L*-谷氨酰胺脱羧酶能专一地催化 *L*-谷氨酰胺脱羧生成 4-氨基-丁酰胺, 保留 *D*-谷氨酰胺。笔者以本实验室化学合成的 *D, L*-谷氨酰胺^[9] 为原料, 利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) AS1.505 谷氨酰胺脱羧酶高效降解 *L*-谷氨酰胺, 制备 *D*-谷氨酰胺。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

Escherichia coli AS1.505, 北京微生物研究所提供。所用试剂均为市售生化试剂和分析纯试剂。

Nexus 870 FT-IR 红外仪、Brucker DRX-500 氢核磁共振仪、Mariner Applied Biosystems(T) 高分辨电喷雾质谱仪、WRS-1 型数字熔点仪(上海物理光学仪器厂)、日立 UV-3000 型分光光度计、THZ-C 恒温振荡器、WZZ-2B 自动旋光仪(上海物理光学仪器厂)、日立 CR22E 型离心机。

种子培养基包含: 葡萄糖 3 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉浸膏 5 g/L, NaCl 3 g/L, 磷酸二氢钾 3 g/L, 硫酸

收稿日期: 2005-06-14

基金项目: 国家技术创新基金(02CJ-13-01-16)资助项目

作者简介: 钱绍松(1968-), 男, 博士生; 焦庆才(1959-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事手性药物的合成及生物转化方面的研究, 通讯联系人, 025-83594376, jiaoqc@tom.com。

镁 0.5 g/L, 琼脂 18 g/L。其 pH 值为 7.2。

发酵培养基包含: 蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 5 g, NaCl 3 g, 磷酸二氢钾 3 g, 硫酸镁 0.5 g, *L*-谷氨酰胺 1 g, 其 pH 值为 7.2, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的培养

菌种的斜面培养是将菌株接入种子培养基斜面培养 14 h。菌体的液体培养则是发酵培养基灭菌, 接种, 于 37℃、170 r/min 振荡培养 14 h, 离心收集菌体, 用灭菌水洗涤菌体。

1.2.2 菌体酶活的测定

在 100 mL 三角瓶中加入湿菌体 0.05 g, *D, L*-谷氨酰胺 0.4 g, 0.2 mol/L 醋酸/醋酸钠缓冲液 (pH 值 4.8) 20 mL, 吐温-80 0.0015 g 及蒸馏水 10 mL。于 37℃、170 r/min 振荡反应 30 min。取 2 mL 反应液, 添加 0.2 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 值 9.0) 2 mL, 使酶反应终止, 离心去除菌体。以茚三酮显色法测定转化液中的 4-氨基丁酰胺。比酶活定义为在 37℃、pH 值为 4.8 时 1 g 湿菌体 1 h 所转化产生的 4-氨基丁酰胺的 μmol 数, 单位为 U, $1 \text{ U} = 1.0 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

1.2.3 *D*-谷氨酰胺制备

称取 *D, L*-谷氨酰胺 40 g 溶于 1 000 mL、pH 值为 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液中, 加入 5.0 g 湿菌体, 于 37℃ 转化 8 h, 离心除去菌体, 活性炭脱色, 转化液调 pH 值至 7.5, 通过 D301 弱碱性阴离子交换树脂, 收集流出液, 减压浓缩, 析出晶体, 精制、干燥得 4-氨基丁酰胺 18.6 g; 再用 0.1 mol/L 醋酸溶液对阴离子交换树脂进行洗脱, 洗脱液经减压浓缩结晶, 过滤、收集晶体, 精制、干燥得 18.4 g *D*-谷氨酰胺, 其为理论收率的 92%。

1.2.4 *D*-谷氨酰胺的鉴定结果

$[\alpha]_D^{20} = -7.3^\circ (\text{c}1, \text{H}_2\text{O})$, 熔点 184 ~ 185℃。核磁共振氢谱 (D_2O , 500 MHz), δ : 2.16(m, 2H), 3.46(t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H), 4.02(t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H)。红外光谱 IR(KBr), ν : 3 409, 3 213, 2 987, 2 041, 1 687, 1 632, 1 585, 1 485 cm^{-1} 。高分辨质谱(HRMS): $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}_2 + \text{Na}^+]$, 计算值 169.0982, 实测值 169.0991; $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}_2 + \text{H}^+]$, 计算值 147.1046, 实测值 147.1054。

2 结果与讨论

2.1 反应体系温度对 *L*-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响

为了使 *L*-谷氨酸脱羧酶活力达到最大, 不同温度下对菌体酶活进行测定, 酶活曲线如图 1 所示。菌体 *L*-谷氨酸脱羧酶反应最适温度为 37℃, 最适

温度之前, 随温度升高, 酶活增加。温度高于 37℃ 后, 由于蛋白质的热变性, 加剧了酶的失活。

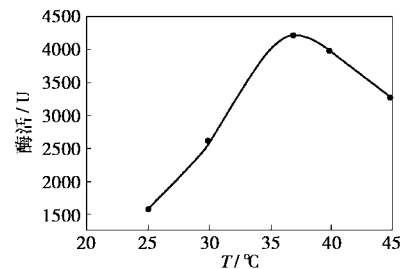


图 1 温度对酶活的影响

2.2 反应体系 pH 值对 *L*-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响

酶蛋白分子上有许多酸性、碱性的侧链基团, pH 值的改变可影响酶分子活性部位的解离状态, 从而影响酶的活性。由图 2 可知, 大肠杆菌脱羧酶在 pH 值 4.5 ~ 5.0 时活力最高。

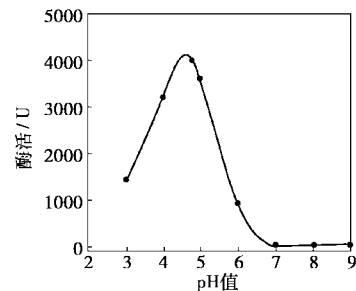


图 2 pH 值对酶活的影响

2.3 菌体浓度对 *L*-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响

酶的浓度增加时, 酶失活率将会下降。一般地, 随着菌体浓度的增加, 转化率会升高, 但浓度过高, 会增加成本, 且不利于后提取。在反应体系其他条件不变的情况下, 改变菌体用量, 观察其对转化效果的影响, 结果见图 3。随着菌体浓度的增加, 转化率增大, 当菌体质量浓度达 5 g/L 时, 转化率增加不明显, 所以选取菌体质量浓度为 5 g/L。

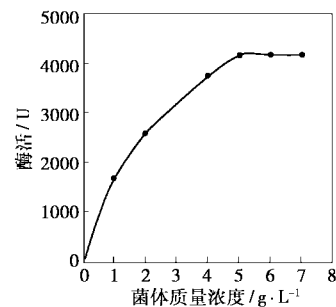


图 3 菌体浓度对酶活的影响

2.4 表面活性剂对 L-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响

表面活性剂的作用是增大菌体细胞的通透性,从而有利于底物的吸收及产物的释放。比较了吐温-80(Tween-80)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、聚乙二醇辛基苯基醚(OP)3种表面活性剂对酶活的影响,由图4可以看出,不同表面活性剂对酶活影响不同,同一表面活性剂不同浓度影响也不一样。吐温-80较其他2种活性剂对L-谷氨酰胺脱羧酶激活能力强,当质量浓度为0.15g/L时酶活达4200U。

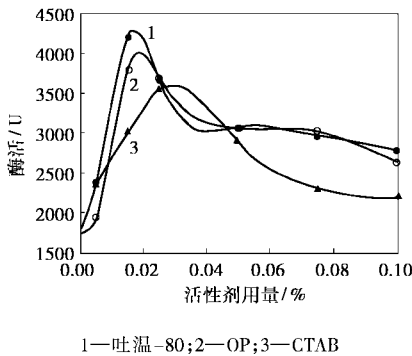


图4 不同活性剂对酶活的影响

2.5 菌龄对 L-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响

菌体在不同生长阶段的机体机能不尽相同,相应酶的表达水平差别较大。考察了不同生理阶段的L-谷氨酰胺脱羧酶活力情况(见图5),酶活力在菌龄14h时最高,随时间延长,酶活力会降低。这可能是由于在细胞内一定活动区域的胞内酶(脱羧酶)随时间延长,细胞自溶以及合成速率降低所致。

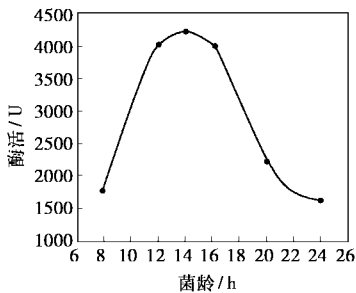


图5 菌龄对酶活的影响

2.6 底物浓度对 L-谷氨酰胺脱羧酶活力的影响

在酶促反应中,起始底物浓度对酶活有着较为明显的影响。长时间反应后反应体系中存在过量的产物,对该酶促反应产生抑制。在相同体积、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40g/L时酶活较高(见图6)。

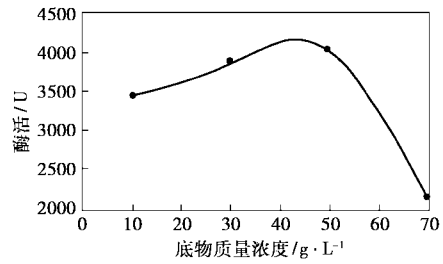


图6 底物浓度对酶活的影响

2.7 菌体的生产能力指标

菌体内L-谷氨酸脱羧酶的稳定性是其工业化应用的前提。考察了5g菌体在最佳转化条件下的重复利用情况,底物质量浓度为40g/L时,比较在不同重复使用次数条件下,转化体系中L-谷氨酰胺被完全转化为4-氨基丁酰胺所需时间。菌体重复使用2次时,完全转化等量的L-谷氨酰胺所需时间都在12h内,没有显著差异,但重复使用4次完全转化时间却长达48h。

3 结语

大肠杆菌 *E. coli* 1.505 的 L-谷氨酰胺脱羧酶最适转化条件为温度 37℃,转化体系 pH 值为 4.8,菌体质量浓度 5 g/L,吐温-80 质量浓度 0.15 g/L,菌龄 14 h,底物质量浓度 40 g/L。在最适转化条件下,比酶活可以达到 4 200 U。L-谷氨酰胺在 8 h 内完全转化成 4-氨基丁酰胺, D-谷氨酰胺收率达到理论收率的 92%。而该方法也存在理论收率只有 50% 的缺陷。

参考文献

[1] Senuma M, Otsuki O, Sakata N, et al. [J]. J Ferment Bioeng, 1989, 67(4): 233 - 237.
 [2] Makoto Y, Akio O. [J]. J Molecular Catal B: Enzymatic, 1998, 4: 1 - 11.
 [3] 王晓平, 刘一鸣, 王丽娟, 等. [J]. 吉林大学学报(自然科学版), 1998, 4: 81 - 84.
 [4] 王淑豪, 李晓峰, 吴艳玲, 等. [J]. 过程工程学报, 2001, 3: 293 - 296.
 [5] 钱绍松, 吴晓燕, 陈然, 等. [J]. 化工进展, 2005, 24(5): 537 - 540.
 [6] Sakai K, Imamura K, Sonoda Y, et al. [J]. FEBS Letters, 1991, 289(1): 44 - 46.
 [7] Wakayama M, Katsuno Y, Hayashi S, et al. [J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(11): 2115 - 2119.
 [8] Wakayama M, Tsutsumi T, Yada H, et al. [J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(4): 650 - 653.
 [9] 南京大学. L-谷氨酰胺的合成方法[P]. CN 200410014737.5, 2004 - 04 - 26. ■