

科研与开发

酶法转化 *D, L*-苄基海因制备*N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸

贾红华 韦 萍 周 华 欧阳平凯

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:研究了间歇酶转化和间歇补料酶转化制备 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸的过程,发现在 *D, L*-苄基海因(*D, L*-BH)的投入量为 20 g/L、菌泥与 *D, L*-BH 的质量比为 1:1 的间歇酶转化过程中,产物的得率接近 100%,而在初始 *D, L*-BH 的投入量为 20 g/L 和菌泥与 *D, L*-BH 之比为 1:1 的间歇补料酶转化过程中,则发现在补料的过程中其转化率一直维持在 60%~70%,直到底物质量浓度达 50 g/L。最终菌泥与 *D, L*-BH 的实际质量比达到了 1:2.5,提高了酶的利用率。

关键词: *D, L*-苄基海因; *D*-苯丙氨酸; *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸; *D*-海因酶

中图分类号: TQ463

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2003)06-0024-04

Enzymatic conversion of *D, L*-benzylhydantoin to *N*-carbamoyl-*D*-phenylalanine

JIA Hong-hua, WEI Ping, ZHOU Hua, OUYANG Ping-kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The processes of batch and fed-batch enzymatic conversion to produce *N*-carbamoyl-*D*-phenylalanine were studied. It was found that the yield of *N*-carbamoyl-*D*-phenylalanine was near 100% in the batch enzymatic conversion process when the concentration of substrate was 20 g/L and the ratio of cell to substrate was 1:1. The yield was 60%~70% in the fed-batch enzymatic conversion process until the concentration of substrate was from 20 g/L to 50 g/L. Finally, the ratio of cell to substrate was 1:2.5, so the cells was used adequately.

Key words: *D, L*-benzylhydantoin; *D*-phenylalanine; *N*-carbamoyl-*D*-phenylalanine; *D*-hydantoinase

D-苯丙氨酸(*D*-Phe)具有很重要的生理作用,也是一种重要的医药中间体,可以用于合成多种药物^[1-5]具有较好的应用前景。目前关于其制备技术的研究报道较多^[6-9],在众多方法中,酶法被认为是较好的方法,特别是以 *D, L*-苄基海因(*D, L*-BH)为前体的海因酶法,由于具有原料成本低廉、产物光学纯度高等优点而备受关注。其一般可分为“一菌双酶法”和“一酶一酸法”。“一菌双酶法”是利用一种菌产生的 *D*-海因酶(*D*-Hydantoinase, EC 3.5.2.2)和 *N*-氨甲酰氨基酸水解酶(*N*-Carbamoylase, EC 3.5.1.6)来水解 *D, L*-BH 制备

D-Phe 的方法,但是从自然界筛选的微生物往往很难获得两酶酶活均较高的菌种。目前在采用了基因工程方法的基础上,仍然无法获得理想的菌株,以至于双酶偶联转化效率仍不高;“一酶一酸法”则是通过微生物产生的 *D*-海因酶水解 *D, L*-BH 得到 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸(*Nc-D*-Phe),然后通过化学水解代替“一菌双酶法”中的 *N*-氨甲酰氨基酸水解酶水解 *Nc-D*-Phe,其反应迅速,且 *D*-Phe 得率在 95%以上,但此时酶转化制备中间体 *Nc-D*-Phe 的过程却因无法与其相媲美而又成了整个工艺的瓶颈,而无法付诸实践。笔者通过利用本实验室现有

收稿日期:2003-03-14

基金项目:国家“十五”攻关资助项目(2001BA708B02-06)

作者简介:贾红华(1979-),男,博士生;欧阳平凯(1945-),男,教授,博导,中国工程院院士,主要从事生物化学工程及化学生物学新技术方面的研究,通讯联系人,025-3587001,ouyang@njut.edu.cn。

的洋葱伯克霍尔德氏菌 JS-02 (*Burkholderia cepacia* JS-02) 所产生的 *D*-海因酶(有关该酶的酶学性质见文献[10]),以 *D,L*-BH 为前体,发酵获得酶源,进行了酶法制备 *Nc-D-Phe* 的研究。

1 实验部分

1.1 药品与仪器

D,L-苯基海因,纯度 99.5%,自制;*N*-氨甲酰-*D,L*-苯丙氨酸标准品,毛细管电泳测得其纯度为 100.2%,元素分析合格,自制;其他试剂均为分析纯。高速冷冻离心机, J2-HS 型, Beckmann 公司;高效液相色谱, HP1100 型, HP 公司;傅立叶变换红外光谱仪, AVATAR 360 型, Nicolet 公司;液质联用仪, API 2000 型, P.E. 公司。

1.2 实验方法

菌种为洋葱伯克霍尔德氏菌 JS-02 (*Burkholderia cepacia* JS-02), 由南京工业大学制药与生命科学学院微生物筛选中心提供;培养基组成(质量分数):葡萄糖 2%, 蛋白胨 0.5%, 玉米浆 2.5%, NaCl 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.025%, CoCl_2 0.005%, 诱导剂 0.15%; pH 值为 7.5。

洋葱伯克霍尔德氏菌 JS-02 的发酵产酶方法:配置发酵培养基 3 L, 装入一容积为 5 L 的机械搅拌罐中, 121℃、0.1 MPa 下灭菌 20 min。待冷却后接入种子, 然后在 32.5℃、550 r/min 下通风培养。待发酵完成后, 培养基离心, 获得菌泥, 保存于冰箱中。

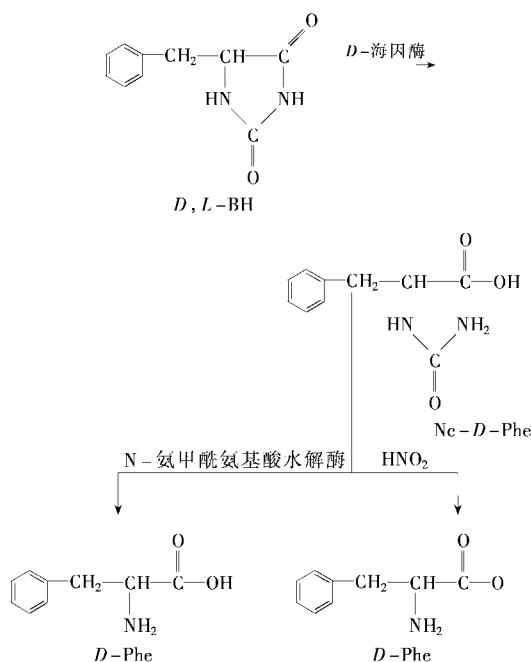


图 1 海因酶法制备 *D*-Phe 的反应过程

酶转化方法:取上述 *D,L*-BH 及发酵所得菌泥,以菌泥与 *D,L*-BH 比 1:1(质量比,下同)配料,于 38℃, pH 值 9.5、200 r/min 下开始酶转化,并连续跟踪记录其 pH 值变化规律,同时定时测定其 *Nc-D-Phe* 浓度。“一酶一酸法”的反应过程如图 1 所示。

酶转化过程中的 *D,L*-BH 和 *Nc-D-Phe* 的分析按文献[11]。

取上述所得产品,测定 *Nc-D-Phe* 熔点、比旋光度、红外光谱和质谱,鉴定结构。

2 结果与讨论

2.1 一般体系下的间歇酶转化过程

初始 *D,L*-BH 投料量为 20 g/L, 菌泥与 *D,L*-BH 质量比 1:1, NaOH 调节 pH 值至 9.5 进行酶转化反应, 定时取样, 测定体系 pH 值及 *Nc-D-Phe* 浓度, 绘制图 2 和图 3。

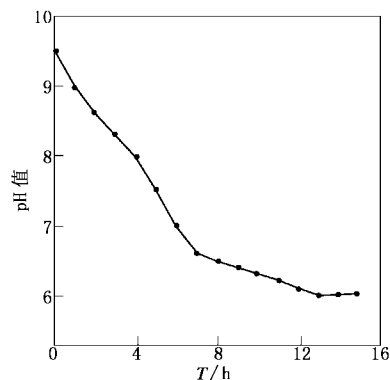
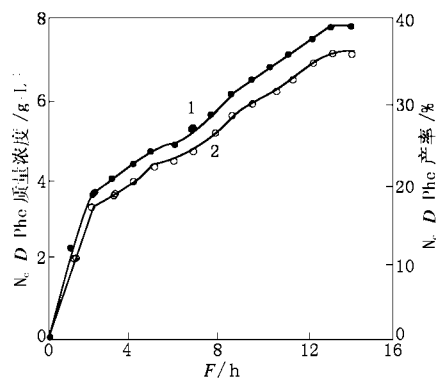


图 2 酶反应过程中的 pH 值变化曲线



1—*Nc-D-Phe* 浓度; 2—*Nc-D-Phe* 产量

图 3 一般体系下的酶反应动力学曲线

从图 2 可以看出, 由于酶反应的产物 *Nc-D-Phe* 表现为弱酸性, 反应初期整个体系的 pH 值一直是下降的趋势。由于它只是一个弱酸, 而体系的 pH

值下降很快,可知开始时酶反应的效率很高,产生了大量产物。当 pH 值下降到一定程度后,逐渐趋于稳定,表明酶对 pH 值环境已不再适应,几乎不再催化反应,这从图 3 中的 Nc-D-Phe 随时间的变化曲线得到了证实。最终 pH 值基本维持在 6.0 左右,Nc-D-Phe 得率维持在 35% 左右。因此通过 pH 值变化规律还可以判断其酶反应的情况。

2.2 缓冲体系下的间歇酶转化过程

鉴于 2.1 中的情况,考虑采用 pH 值 9.5 的 $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 缓冲液进行上述酶转化,其他条件均保持不变,绘制图 4,可看出酶反应速率很快,约 20 h, *D, L*-BH 已经被转化了 80%,到最后 *D, L*-BH 基本完全转化。

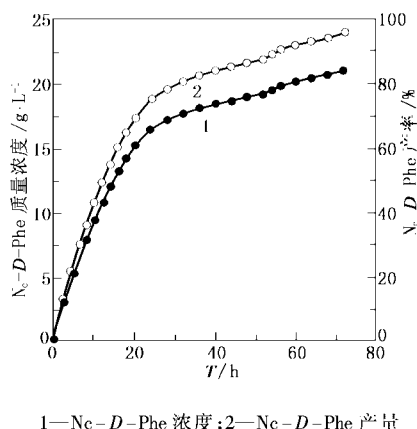


图 4 缓冲体系下的酶反应动力学曲线

增加 *D, L*-BH 的投入量至 40 g/L,其他反应条件不变,所得结果如表 1 所示。从表中结果可以看出, Nc-D-Phe 得率为 70% 左右。

表 1 缓冲体系下高底物投入量时的酶反应结果

时间/h	Nc-D-Phe 投入量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	转化率/%
24	18.61	42.50
40	29.12	66.50
70	33.54	76.59

2.3 缓冲体系下间歇补料酶转化过程

在本体系中,由于 *D, L*-BH 的溶解度相对很小(约为 3 g/L),当投入大量的 *D, L*-BH 时,体系中存在大量的固形物。因此考虑到通过逐次添加 *D, L*-BH 以改变体系的状态来提高酶转化的效率。

仍然采用 pH 值 9.5 的 $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 缓冲液,进行上述酶转化反应,初始菌泥和 *D, L*-BH 的投料量均为 20 g/L,然后进行转化反应,定时取样测定 Nc-D-Phe 的浓度,并添加 *D, L*-BH。考虑到缓

冲溶液的缓冲能力,在反应过程中流加氨水自动控制体系 pH 值。通过表 2 和表 3(二者添加底物时间间隔与添加量不同)的结果可以看出,逐次添加 *D, L*-BH 的量越少,对反应越有利,反应更迅速。但是到了一定时间后,反应的速度逐渐开始减慢。这主要是可能由于随着反应时间的延长,大量的细胞溶解,酶被释放,导致其部分失活。还有体系中可能存在产物抑制的情况及高的产物浓度使得酶的可逆反应不断进行,从而影响整个过程,但尚需进一步加以实验证实。尽管如此,通过补料反应在一定程度上使酶在很长时间内都具有很高的酶活,添加的 *D, L*-BH 基本上补充了酶消耗的 *D, L*-BH,故其转化率一直比较稳定,维持在 60%~70%。在反应结束时,菌泥与 *D, L*-BH 的实际质量比达到 1:2.5,最大限度发挥了酶的作用,提高了利用率。同表 1 所显示的结果相比,具有明显的优势。

表 2 缓冲体系下补料酶反应结果(1)

时间/h	添加量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			产物得率/%
	<i>D, L</i> -BH	菌泥	Nc-D-Phe	
0	20.00	20.00	0	0
19	10.00	0	13.40	61.20
44	10.00	0	24.97	76.03
70	10.00	0	27.20	62.12
90	0	0	33.05	60.38
110	0	0	36.60	66.87

表 3 缓冲体系下补料酶反应结果(2)

时间/h	添加量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			产物得率/%
	<i>D, L</i> -BH	菌泥	Nc-D-Phe	
0	20.00	20.00	0	0
22	5.00	0	19.15	87.46
28	5.00	0	20.80	76
34	5.00	0	23.45	71.4
46	5.00	0	27.85	72.69
53	5.00	0	29.20	66.68
59	5.00	0	31.05	63.03
69	0	0	33.05	67.09

2.4 Nc-D-Phe 的鉴定

由于所得产品的标准品无法获得,迄今为止尚未有人报道其谱图,因此笔者将反应所得的物质提取精制后,通过测定产品的有关性质来对其进行鉴定。显微熔点仪测定其熔点为 194~195℃(文献值

192 ~ 193℃), 比旋光度为 $[\alpha]_D^{20} = 39.5^\circ$ (文献值 40°)^[12-13]。通过质谱图测得其相对分子质量为 208, 由其红外谱图得表 4 数据。

表 4 红外谱图的数据解析

波数/cm ⁻¹	可能归属
3455.48	—CONH ₂
3303.24	—CONH
2500 ~ 3000	—COOH 的—OH
1694.71, 1636.96	—CONH ₂ 和 —COOH 中的一C=O
1558.69	C ₆ H ₆
697.03, 712.27	C ₆ H ₅ —

3 结语

进行了 *D*-海因酶转化 *D,L*-BH 制备 *Nc-D*-Phe 的研究, 结果发现 *D*-海因酶对 *D,L*-BH 具有很高的催化活力, 在菌泥与 *D,L*-BH 质量比为 1:1、pH 值 9.5 和 38℃ 下, 20 h 后 *Nc-D*-Phe 的收率达到 70% ~ 80%。但 *D,L*-BH 的一次性投入量越大, 同样时间内的收率越低。通过进行间歇补料反应的研究, 发现少量多次补料酶转化更迅速, *Nc-D*-Phe 的得率达到 60% ~ 70%, 最终菌泥与 *D,L*-BH 的实际比达到了 1:2.5, 提高了酶的利用率。尽管如此, 补料也不可能持续很长时间, 同时还有可能当 *Nc-D*-

Phe 浓度过高, 存在底物抑制和逆反应的情况, 这些还需进一步实验加以证实。

参考文献

- [1] Heller B. Pharmacological and clinical effects of *D*-phenylalanine in depression and Parkinson's disease [A]. In: Mosnaim A D, Wolf M F, eds. Noncatecholic Phenylethylamines (Part 1) [M]. New York: Marcel Dekker, 1978. 397 - 417.
- [2] Heller B, Fischer E, Martin R. [J]. *Arzneimittel-forschung*, 1976, 26: 577 - 579.
- [3] Mary Beth Schloss. [J]. *New Drug Update*, 2001, 7(4): 1 - 5.
- [4] Lambert S W J, Lely A J, Herder W W, et al. [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(5): 246 - 254.
- [5] Warner R R, O'dorisio T M. [J]. *Semin Nucl Med*, 2002, 32(2): 79 - 83.
- [6] Hiroshi Kajiro, Shu-ichi Mitamura, Atumori Mori, et al. [J]. *Synlett*, 1998, (1): 51 - 52.
- [7] Moller A, Syldatk C, Schulze M, et al. [J]. *Enzyme Microbial Technology*, 1998, 10(10): 613 - 625.
- [8] Keil O, Schneider M P, Rasor J P. [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6(6): 1257 - 1260.
- [9] Grifantini R, Galli G, Carpani G, et al. [J]. *Microbiology*, 1998, (144): 947 - 954.
- [10] 韦萍. *D*-氨基酸的制备研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2002.
- [11] 宋慧敏. 酶转化液中苯丙氨酸及其共存组分的分离分析方法研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2002.
- [12] Stella V, Higuchi T. [J]. *J Org Chem*, 1973, 38(8): 1527 - 1534.
- [13] Lazarus R A. [J]. *J Org Chem*, 1990, 55(15): 4755 - 4757. ■
- [14] Salem A S H, Hamid H S. [J]. *Chem Eng Technol*, 1997, 20(5): 342 - 347.
- [15] Salem A S H. [J]. *Ind Eng Chem Res*, 1994, 33(2): 336 - 340.
- [16] Marathon Oil Co. Removal of sulfur from a hydrocarbon stream by low severity adsorption [P]. WO 98/51762, 1999 - 07 - 06.
- [17] Davis M. [J]. *Ind Eng Chem Res*, 1991, 30(8): 1675 - 1683.
- [18] Union Oil Company of California. Desulfurization of hydrocarbons [P]. US 4419224, 1983 - 12 - 06.
- [19] Exxon Research and Engineering Company. Nickel adsorbent for sulfur removal from hydrocarbon feeds [P]. US 4634515, 1987 - 01 - 06.
- [20] 居沈贵, 管国锋, 姚虎卿. [J]. *现代化工*, 2002, 22(7): 27 - 29.
- [21] The Pritchard Corporation. Processes for desulfurization gasoline and hydrocarbon feedstocks [P]. US 5730860, 1998 - 03 - 24.
- [22] Chevron Research and Technology Company. Sulfur removal system for protection of reforming catalysts [P]. US 5259946, 1993 - 11 - 09.
- [23] UOP I.L.C. Removal of sulfur compounds from liquid organic feedstreams [P]. US 5360536, 1994 - 11 - 01.
- [24] Board of Trustees Operating Michigan State University. Layered double hydroxide sorbents for the removal of SO_x from flue gas and other gas streams [P]. US 5114898, 1992 - 05 - 19.
- [25] Exxon Research and Engineering Company. Sulfur removal from hydrocarbon fluids by mixing with organo mercaptan and contacting with hydrotalcite-like materials, alumina, bayerite or brucite [P]. US 6027636, 2000 - 02 - 22.
- [26] Iarrubia M A, Ramirez J, Busca G A. [J]. *Applied Catalysis A: General*, 2002, 224(1): 167 - 178.
- [27] Exxon Research and Engineering Company. Deep desulfurization of distillate fuels [P]. US 5454933, 1999 - 10 - 03.
- [28] Mikhail S, Zaki T, Khalil I. [J]. *Applied Catalysis A: General*, 2002, 227(3): 265 - 278.
- [29] UOP LLC. Process for removing sulfur compounds from hydrocarbon streams [P]. US 5807475, 1998 - 09 - 15.
- [30] Vivic D A, Jones W D. [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119(44): 10855 - 10856.
- [31] Garcia J J, Mann B E, Adams H, et al. [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(8): 2179 - 2186.
- [32] Singh A P, Singh P C, Pandey K K, et al. [J]. *Ind Eng Chem Res*, 1988, 27(9): 2101 - 2104.
- [33] King C J. Separation processes based on reversible chemical complexation [A]. In: Rousseau R W, Handbook of Separation Process Technology [M]. New York: Wiley, 1987. ■

(上接第 20 页)