

# 海因酶/N-氨甲酰水解酶催化 DL-苄基海因 制备 D-苯丙氨酸的过程分析及强化

姚 忠 朱 姝 李家璜 屠春燕 李苏平 韦 萍  
(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

**摘要:**利用自行筛选的 *Pseudomonas* sp.js-01 菌发酵产酶, 得到兼有海因酶、N-氨甲酰水解酶活性的菌株, 通过酶动力学参数分析以及转化试验表明, N-氨甲酰水解酶活性偏低是制约整体转化过程的瓶颈。以疏水层析的方法将海因酶、N-氨甲酰水解酶进行初步分离, 并调节双酶比例进行了转化试验。结果表明, 转化过程得到显著改善, 当海因酶与 N-氨甲酰水解酶比例达到 1:4 时, 中间产物的积累基本消失, 6 h 产物转化率提高 1 倍以上。

**关键词:** D-海因酶; N-氨甲酰水解酶; 苄基海因; D-苯丙氨酸

中图分类号: TQ464.7; TQ922

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)05-0044-03

## Analysis and enhancement of bioconversion of D-phenylalanine catalyzed by hydantoinase and N-carbamoylase

YAO Zhong, ZHU Shu, LI Jia-huang, TU Chun-yan, LI Su-ping, WEI Ping

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

**Abstract:** The free cells containing D-HEn and N-CAEn activity were obtained by fermentation using *Pseudomonas* sp.js-01 screened. It is demonstrated that the low activity of N-CAEn was the limiting factor of the whole conversion process by the dynamic parameters determination and conversion experiment. D-HEn and N-CAEn were separated using HIC, and the ratio of the two enzymes was adjusted and the experiment results show that the conversion process is promoted sharply. The conversion ratio of D-Phe with D-HEn \ N-CAEn as 1:4 within 6 h is two times more than that as 1:1.

**Key words:** D-hydantoinase; N-carbamoylase; 5-benzylhydantoin; D-phenylalanine

具有光学活性的 D-氨基酸的用途广泛, 是合成、半合成抗生素、激素、活性多肽等诸多生物产品的重要原料<sup>[1-5]</sup>, 而 5-单取代海因是合成 D-氨基酸重要的前体物质。海因酶类似于二氢嘧啶酶, 可催化 5-取代海因水解开环, 生成 D-N-氨甲酰氨基酸, 进而在 N-氨甲酰水解酶的作用下, 脱去酰胺基团, 生成 D-氨基酸<sup>[1]</sup>。D-海因酶和 D-N-氨甲酰水解酶是酶法制备 D-氨基酸的关键酶, 其催化性能高低直接影响 D-氨基酸的产率及转化效率<sup>[2-12]</sup>。目前国内外有关利用上述双酶法制备手性氨基酸的工艺研究十分活跃, 由于反应过程涉及的 2 种酶的最适作用 pH 值差异很大, 因此在酶法转化过程中通常采用一种“折中”的 pH 值以保证催化过程中双酶的酶活, 这样势必造成转化效率的降低<sup>[3,5-7]</sup>。要实现手性氨基酸的酶法制备, 协调好海因酶和 N-氨甲酰氨基酸水解酶的催化过程是解决问题的关键。笔者将在 D-海因酶、N-氨甲酰水

解酶初步纯化的基础上, 就其酶学特性及双酶催化体系的催化动力学过程进行分析, 重点探讨双酶催化过程协调的手段, 提高转化效率, 希望能为双酶法催化 DL-海因类衍生物水解, 制备相应的手性氨基酸的工业化生产提供有益的借鉴。

## 1 实验部分

### 1.1 实验设备和材料

ÄKTA Explorer 100 纯化系统, 瑞典 Pharmacia 公司, 毛细管电泳, Beckman P/ACE system 5000。DL-苄基海因(DL-BH), 自制, 纯度 > 99.5%; N-氨甲酰苯丙氨酸(N-Cphe), 自制, 纯度 > 98%。其他化学试剂均为国产分析纯。

双酶的获取: D-HEn(D-海因酶)和 N-CAEn(D-N-氨甲酰氨基酸水解酶)均来自于 *Burkholderia cepacia* 1003(一菌双酶)。

发酵条件为: *Burkholderia cepacia* 1003 菌种子液

按照 2% (质量分数,下同) 接种量接种,于 32.5℃, pH 值 7.5, 摇瓶发酵 18 h, 摇床转速 180 r/min; 发酵培养基为每升水中包括 2% 葡萄糖, 0.1% 酵母膏, 0.5% 蛋白胨, 0.3% NaCl, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 诱导剂 I 0.15%, 诱导剂 II 0.02% (诱导剂 I、II 均为底物类似物) 以及 10% MgSO<sub>4</sub> 2.5 mL。发酵结束后, 于 10 000 r/min 离心 25 min, 所得菌泥于 -20℃ 贮藏备用。

酶的初步分离纯化: 将冷冻后的菌泥以 pH 值 7.5 的 Tris (三羟甲基氨基甲烷)-HCl 缓冲液, 按 1:2 (g/mL) 配置成菌悬液, 于超声细胞破碎仪上进行细胞破碎, 破碎时间 15 s, 间隔 20 s, 全程 20 min, 经破碎后的菌悬液, 于冷冻离心机上以 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清待用; 60% 饱和度的硫酸铵水溶液沉淀, 经离心分离获取包括 D-HEn 和 N-CAEn 在内的蛋白质沉淀; 全部沉淀以含 1 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的 pH 值 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液溶解, 并以相同的缓冲透析过夜后, 经离心、过滤后得到样品溶液。

以填料 Sepharose phenyl Fast Flow 为分离介质, 以 1 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的 pH 值 7.5 的 Tris-HCl 溶液为上样缓冲, 将样品溶液以 2 mL/min 的流速流经柱床; 以 pH 值 7.5 的 Tris-HCl 缓冲为洗脱液, 按照 60%、85%、100% 进行阶段洗脱, 以自动收集器收集洗脱峰并进行活性分析, 确定 D-HEn 和 N-CAEn 的活性峰。

所得 D-HEn 和 N-CAEn 收集液以 pH 值 8.5 Tris-HCl 缓冲液分别定容至 25 mL 备用。

### 1.2 测试部分

海因酶及 N-氨甲酰氨基酸水解酶动力学参数的测定。实验方法参照文献。底物分别为 D-苄基海因 (D-BH) 和 D-N-氨甲酰苯丙氨酸, 反应体系采用 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲。蛋白总量测定使用 Bradford 检测法<sup>[10]</sup>, 标准蛋白为牛血清蛋白 (BSA)。

### 1.3 双酶转化实验

转化体系: 0.2% 的 DL-苄基海因标准溶液, 分别加入一定量的酶液, 于 pH 值 8.5、温度 37℃ 下进行转化。定时取样 10 mL, 并加入 5 mL 三氯乙酸终止反应, 摇匀, 10 000 r/min 离心 25 min, 取清液放冰箱内待测。

转化液中苯丙氨酸、苄基海因以及 N-氨甲酰苯丙氨酸以毛细管电泳测定。

## 2 结果与分析

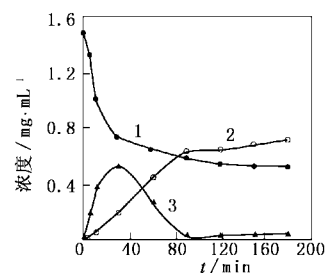
### 2.1 D-HEn 和 N-CAEn 的分离

用以上方法分离结果表明, 在该分离条件下, D-HEn 和 N-CAEn 可以得到有效的分离, 活性回收率分别达到 96% 和 94%, 这为下一步的工作提供了很好的实验准备。

### 2.2 D-HEn 和 N-CAEn 催化动力学性质

#### 2.2.1 D-HEn 的米氏常数 K<sub>m</sub> 和最大反应速率 r<sub>m</sub>

文献[5]和实验结果 (图 1) 均表明 D-型海因酶 (D-HEn) 的酶催化反应动力学符合米氏方程。由双倒数法可求得最大反应速率 r<sub>m</sub> 为 0.6127 mmol/(L·min), 米氏常数 K<sub>m</sub> 为 16.7894 mmol/L。



1—BH; 2—Dphe; 3—Nphe

图 1 双酶催化 DL-BH 转化过程

#### 2.2.2 N-CAEn 的 K<sub>m</sub> 和 r<sub>m</sub>

以 N-氨甲酰-D-苯丙氨酸 (N-CPhe) 为底物, 测定 N-氨甲酰-氨基酸水解酶 (N-CAEn) 的酶催化反应速率 (r)。实验发现该反应有底物抑制酶催化反应的典型特征, 故其动力学方程为:

$$r = \frac{r_{m2} C_{p1}}{K_{m2} + C_{p1} + C_{p1}^2 / K_{p1}}$$

式中 p1 代表 N-氨甲酰-D-苯丙氨酸, 由实验数据拟合得该动力学方程参数为:

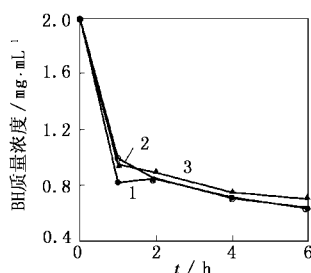
N-CAEn 最大反应速率 r<sub>m2</sub> = 4.828 × 10<sup>-4</sup> mmol/(L·min), N-CAEn 的动力学常数 K<sub>m2</sub> = 0.82688 mmol/L, D-苯丙氨酸生成过程的底物抑制常数 K<sub>p1</sub> = -12.3839 mmol/L。

实验结果表明, 虽然 K<sub>m2</sub> 比 K<sub>m</sub> 小一个数量级, 但 r<sub>m2</sub> 仅为 r<sub>m</sub> 的 1/1000。显然就这 2 个反应而言, N-CAEn 转化反应是慢速反应, 而 D-HEn 催化的水解反应是快速反应。制约整体转化效果的限制性步骤是 N-氨甲酰氨基酸的水解脱酰氨。

### 2.3 双酶催化过程分析

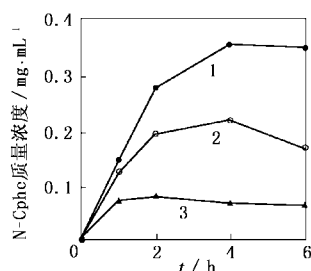
根据以上分析, 采用游离细胞进行了外消旋 BH 的转化实验, 结果如图 2 所示。实验结果证实了, 在双酶转化过程中的确存在中间产物 (N-CPhe) 积累的现象, 表明该反应过程中 N-CAEn 的活性与 D-HEn 是不匹配的。排除 DL-BH 溶解以及 L-BH 消旋等因素, 要提高整体的转化效率, 提高 N-CAEn 的

催化能力,尽可能地协调 *D*-HEn 和 *N*-CAEn 的催化能力是关键。



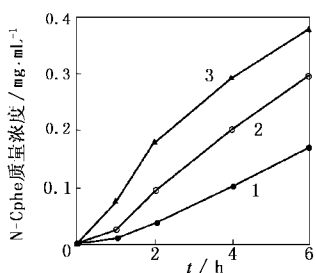
*D*-HEn 与 *N*-CAEn 的质量比:1—1:1;2—1:2;3—1:4

(a) *DL*-BH 转化率



*D*-HEn 与 *N*-CAEn 的质量比:1—1:1;2—1:2;3—1:4

(b) *N*-Cphe 积累



*D*-HEn 与 *N*-CAEn 的质量比:1—1:1;2—1:2;3—1:4

(c) *D*-Phe 生成量的变化

图 2 不同 *D*-HEn 和 *N*-CAEn 配比下, *DL*-BH 转化率、*N*-Cphe 积累、*D*-Phe 生成量的变化

#### 2.4 双酶催化反应过程的协调

根据以上实验结果,在较高的 pH 值下, *D*-HEn 的活性要明显高于 *N*-CAEn,那么实际转化过程中势必出现中间产物(*N*-氨甲酰苯丙氨酸)的积累。如果要提高 *D*-苯丙氨酸的转化效率,提高 *N*-CAEn 的量,人为改变天然菌种中双酶的比例将是一种可能的手段,为此笔者进行了以下的实验:

将前述已经分离的 *D*-HEn 和 *N*-CAEn 按照不同的比例混合,在相同的 pH 值条件下进行反应,可以得到图 2 的结果。

结果表明,提高体系中 *N*-CAEn 的量对于底物(*DL*-BH)的消耗速率几乎没有影响,见图 2(a),这

主要是由于该过程是由 *D*-HEn 催化,增加 *N*-CAEn 对 BH 的水解过程无影响;但这一措施对于中间产物(*N*-Cphe)积累及产物 *D*-苯丙氨酸(*D*-Phe)的生成有明显的效果,见图 2(b)、(c),中间产物积累大幅度降低,产物生成速率明显加快,这与前面的分析是一致的。

### 3 结论

由 *D*-HEn 和 *N*-CAEn 催化的 *DL*-BH 水解制备 *D*-Phe 的过程中,由于涉及到双酶的级联反应,因此存在双酶的协同催化问题,这是“一菌双酶”法制备手性氨基酸过程中的普遍问题。*N*-CAEn 活性低,由其催化的 *N*-Cphe 水解反应速率慢是制约整体转化过程的“瓶颈”。笔者采用疏水层析方法对 *D*-HEn 和 *N*-CAEn 进行了初步纯化,通过调整双酶的比例进行了转化实验,转化效率得到了很大的改善。利用本方法,再结合固定化技术,将为工业化酶法制备手性氨基酸工艺改进提供有益的借鉴。同时,通过基因工程方法,改变原始出发菌中 *D*-HEn 和 *N*-CAEn 的表达量,构建新的基因工程菌,也是解决上述问题的有效手段。

### 参考文献

- [1] 姚忠,郭峰,李家璜,等.[J]. 高校化学工程学报,2002,16(6): 675-679.
- [2] Lee C K, Lee Z S, Yang P F. [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28(9-10): 806-814.
- [3] Giuliano G, Renata G, Guido G. Stable mutants of *D*-*N*- $\alpha$ -carbamoylase and process for preparing *D*- $\alpha$ -amino acids[P]. US 5869298, 1999.
- [4] Silverman R B. The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions [M]. San Diego: Academic Press, 2000. 59.
- [5] Deepa S, Sivasankar B, Jayaraman K. [J]. Process Biochemistry, 1993, 28(7): 447-452.
- [6] Syltatk C, May O, Altenbuchner J, et al. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51(3): 293-309.
- [7] Andreas S, Bommarius M S, Karlheinz D. [J]. J Mol Catal B: Enzym, 1998, 5: 1-11.
- [8] Jahnke K, Podschun B, Schnackerz K D, et al. [J]. Biochemistry, 1993, 32(19): 5160-5166.
- [9] Jabri E, Carr M B, Harsinger R P, et al. [J]. Science, 1995, 268(5213): 998-1004.
- [10] 袁勤生. 现代酶学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001. 9.
- [11] Morin A, Hummel W, Schutte H, et al. [J]. Biotechnol Appl Biochem, 1986, 8: 564-574.
- [12] Yamada H, Takahashi S, Kii Y, et al. [J]. Journal of Ferment Technol, 1978, 56: 484-491. ■