

# 乙酰鸟氨酸脱乙酰酶固定化细胞 拆分 *D,L*-缬氨酸

张 飞<sup>1,2</sup>, 熊吉滨<sup>1</sup>, 刘均忠<sup>1</sup>, 刘鹏刚<sup>1</sup>, 焦庆才<sup>1</sup>

(1. 南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093;  
2. 包头轻工职业技术学院生物工程系, 包头 014043)

**摘要** 报道了一种利用具有乙酰鸟氨酸脱乙酰酶活性的固定化细胞拆分 *D,L*-缬氨酸的新方法. 该酶促反应最适条件: pH=6, 反应温度 50 °C, 底物 *N*-乙酰-*D,L*-缬氨酸浓度 200 mmol/L, 固定化细胞用量 0.2 g/mL (或 100 U/mL). 0.1 mmol/L CoCl<sub>2</sub> 条件对该酶促反应有显著的激活作用. 在以上条件下反应 2~3 h, 测得产物 *L*-缬氨酸浓度 95 mmol/L. 该固定化细胞连续 10 次使用, 平均转化率为 90.8% (以 *N*-乙酰-*L*-缬氨酸计), 显示出了良好的工业化应用前景.

**关键词** 乙酰鸟氨酸脱乙酰酶; 拆分; 固定化细胞; *D,L*-缬氨酸

**中图分类号** O629.71

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2009)08-1577-04

*D*-氨基酸作为重要的制药中间体, 被广泛用于抗生素及农药等药物的合成<sup>[1~3]</sup>. *D*-氨基酸可以通过拆分 *D,L*-氨基酸外消旋混合物制备, 常用的拆分方法有化学法和酶法<sup>[4~7]</sup>. 利用酰胺水解酶立体特异性水解 *N*-乙酰-*D,L*-氨基酸是 *D,L*-氨基酸酶法拆分最常用的方法之一. 目前有两类酰胺水解酶用于 *D,L*-氨基酸的拆分, 一类是 *L* 型酰胺水解酶 (*L*-Amidohydrolase, EC 3.5.1.14), 此类酶可以特异性水解 *N*-乙酰-*L*-氨基酸, 具有这种活性的酶包括 *N*-琥珀酰-二氨基庚二酸脱琥珀酸酶、*N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰酶、羧肽酶 G2 和酰基转移酶 I 等, 分别为大肠杆菌 *dapE* 和 *argE*、假单胞菌属 *cpg2* 以及猪 *aacI* 基因编码<sup>[8~12]</sup>; 另一类是 *D* 型酰胺水解酶 (*D*-Amidohydrolase, EC 3.5.1.81), 此类酶可以特异性水解 *N*-乙酰-*D*-氨基酸. *D* 型酰胺水解酶主要存在于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 等三类微生物中<sup>[13~15]</sup>. 在这些酶中, *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰酶 (Acetylmornithine deacetylase, EC 3.5.1.16) 显示了较高的活性和较广的底物特异性<sup>[12,16]</sup>. 固定化细胞由于具有良好的机械强度和可多次重复使用的优点, 成为微生物酶法生产 *D*-氨基酸的理想方法.

本文利用藻酸钠固定化细胞技术成功拆分 *D,L*-缬氨酸, 该结果对于酶法制备 *D*-缬氨酸的工业化推广有重要意义.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

化学纯 *N*-乙酰-*D,L*-缬氨酸购自张家港华昌制药有限公司; 化学纯海藻酸钠、蛋白胨和酵母浸膏均购自国药集团上海化学试剂公司; 异丙基- $\beta$ -*D*-硫代半乳糖苷 (IPTG), 纯度  $\geq 98\%$ , 购自南京基天生物科技有限公司; 其它试剂均为分析纯. LB 液体培养基配方参见文献<sup>[17]</sup>.

THZ-C 恒温振荡器 (太仓博莱特实验仪器厂); 日立 CR22E 型离心机 (日本 Hitachi 公司); P2S 电子天平 (上海恒平科学仪器有限公司); Waters 600 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); RE2002 旋转蒸发器 (上海予华仪器有限公司).

收稿日期: 2008-12-30.

基金项目: 国家技术创新基金 (批准号: 02CJ-13-01-16) 资助.

联系人简介: 焦庆才, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事氨基酸及其衍生物的化学生物合成研究. E-mail: jiaoqc@yahoo.com.cn

## 1.2 菌种及培养条件

编码乙酰鸟氨酸脱乙酰酶的基因(*argE*),克隆自大肠杆菌(*Escherichia coli*) k-12 菌株 MG1655. 携带有重组质粒 pET32a-*argE* 的大肠杆菌菌株 BL21(DE3)由本实验室构建和保存. 将上述菌株平板挑单克隆接种于 10 mL 含氨苄青霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB 液体培养基上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡培养过夜. 次日,将培养物接种于 2 L 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基上,于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡(180 r/min)培养 6 h,使菌液在 600 nm 下的光密度大约为 0.5. 冷却至 30  $^{\circ}\text{C}$ ,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,在 30  $^{\circ}\text{C}$  诱导 8~10 h. 最后离心收集细胞(5000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min).

## 1.3 细胞固定化

称取 5 g(湿重)细胞重悬于 5 mL 质量分数为 0.85% 的 NaCl 溶液中,然后与 20 mL 藻酸钠水溶液混匀,使藻酸钠终含量为 3%. 将上述乳状液用医用 6# 针头从距液面约 10 cm 高度滴入 500 mL 质量分数为 2% 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中,同时缓慢搅拌,形成平均直径约 3 mm 的小珠. 静置 2~3 h,使固定化细胞进一步硬化. 然后将其滤出,用 0.85% 的 NaCl 溶液洗去多余  $\text{CaCl}_2$ ,待用.

## 1.4 酶活性分析

固定化细胞使用前用相应预冷的底物溶液浸润 5 min,以避免固定化细胞对反应体系的稀释作用. 反应体系为 50 mL *N*-乙酰-*D,L*-缬氨酸底物,加入 10 g 固定化细胞,恒温搅拌. 通过测定产物 *L*-缬氨酸的含量得出 *N*-乙酰-*L*-缬氨酸的去乙酰率. 将固定化细胞酶活定义为每 1 min 生成 1  $\mu\text{mol}$  的 *L*-缬氨酸所用的固定化细胞量.

## 1.5 固定化细胞的稳定性实验

在 200 mL 烧杯中分别加入 100 mL 浓度为 200 mmol/L 的 *N*-乙酰-*D,L*-缬氨酸、1 mL 浓度为 10 mmol/L 的  $\text{CoCl}_2$  和 20 g 固定化细胞,调节 pH 值至 6,于 50  $^{\circ}\text{C}$  恒温缓慢搅拌. 反应 3 h 后,滤出细胞再次使用,重复 10 次. *L*-缬氨酸含量通过 HPLC 定量测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶促反应的最适 pH 和最适温度

pH 和温度条件对酶促反应的影响如图 1 和图 2 所示. 固定化细胞催化的最适 pH 值为 6,以 *N*-乙酰-鸟氨酸为底物时的最适 pH 值有所不同,后者的最 pH 值为 7<sup>[12]</sup>. 固定化细胞的相对酶活随着反应体系酸度的降低而迅速降低. 固定化细胞催化的最适温度为 50  $^{\circ}\text{C}$ . 当温度在 45~55  $^{\circ}\text{C}$  时,相对酶活变化不明显.

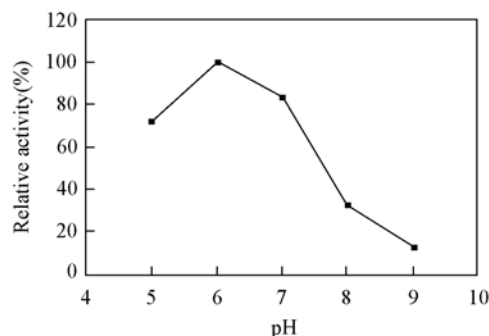


Fig. 1 Effect of pH on enzyme activity

[Immobilized cells] = 0.2 g/mL. Substrate: 200 mmol/L *N*-acetyl-*D,L*-valine. The following reaction conditions are same unless otherwise stated.

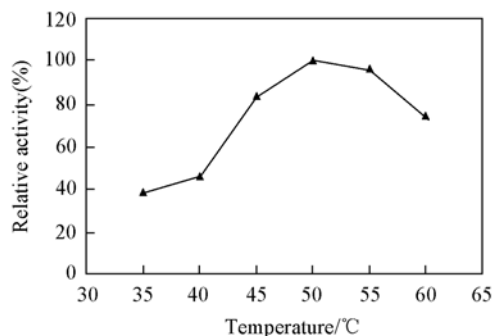


Fig. 2 Effect of temperature on enzyme activity

[Immobilized cells] = 0.2 g/mL. Substrate: 200 mmol/L *N*-acetyl-*D,L*-valine. The following reaction conditions are same unless otherwise stated.

### 2.2 金属离子对酶活的影响

金属离子的存在常会影响酶活性. 在 0.1 mmol/L  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  存在下,分别测定酶活,结果表明,当  $\text{Co}^{2+}$  或  $\text{Zn}^{2+}$  存在时,酶活与对照相比分别提高 0.8 倍和 0.25 倍;当  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  存在时,对酶活有一定的抑制作用(表 1). 因此可以通过添加  $\text{Co}^{2+}$  或  $\text{Zn}^{2+}$  来提高固定化细胞

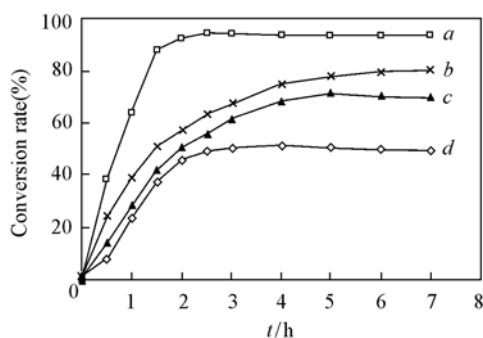
的酶活性, 进而减少固定化细胞的用量.

**Table 1** Effect of divalent cations on enzyme activity

Cation	None	Co <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
Enzyme activity/(U · g <sup>-1</sup> )	500	903	625	330	443	458
Relative activity(%)	100	180	125	66	89	92

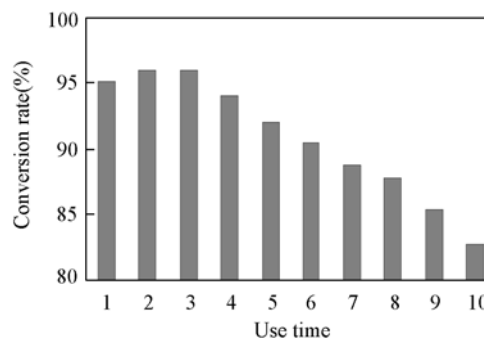
### 2.3 底物浓度和反应时间对酶促反应的影响

不同底物浓度的反应进程见图 3. 随着底物浓度的增加, *N*-乙酰-*D,L*-缬氨酸的转化率不断降低, 表明高底物浓度对该酶促反应有抑制作用. 因此要获得较高的底物转化率, 应保持底物浓度在 200 mmol/L 左右. 最佳反应时间随着底物浓度增加而有所延长, 如底物浓度为 200 mmol/L, 最佳反应时间应为 2~3 h.



**Fig. 3** Conversion rate curve of substrate

[Immobilized cells] = 0.2 g/mL; [N-acetyl-*D,L*-valine] / (mmol · L<sup>-1</sup>): a. 200, b. 400, c. 600, d. 800.



**Fig. 4** Operational stability of immobilized cells

### 2.4 固定化细胞的稳定性

在以上反应优化条件下, 连续 10 次重复利用固定化细胞对底物进行拆分, 底物的平均转化率为 90.8% (转化率以 *N*-乙酰-*L*-缬氨酸为 100% 进行计算, 图 4). 固定化细胞显示了良好的操作稳定性和工业化应用潜力.

*D,L*-氨基酸常用拆分方法有化学法和酶法. 相对于化学法, 酶法可以大大简化工艺流程, 降低生产成本. 近年来, 各种酰胺水解酶的发现与利用是氨基酸拆分领域的研究热点. 本实验室利用自主构建的具有乙酰鸟氨酸脱乙酰酶活性的大肠杆菌, 对多种 *N*-乙酰化氨基酸底物 (包括 *N*-乙酰化的甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸和天冬氨酸) 进行试验. 研究表明, 该酶除对 *N*-乙酰-*L*-谷氨酸和 *N*-乙酰-*L*-天冬氨酸没有作用外, 对其它 *N*-乙酰化脂肪族氨基酸显示了不同程度的活性, 乙酰鸟氨酸脱乙酰酶可以用于 *D,L*-缬氨酸的拆分. 该结果是对前人研究结果<sup>[12]</sup> 的有益补充. 关于固定化细胞拆分 *D,L*-缬氨酸的实验结果对于工业化生产 *D*-缬氨酸有一定实际意义.

## 参 考 文 献

- [1] Jensen S. E., Westlake D. W. S., Wolfe S.. FEMS Microbiol. Lett. [J], 1988, **49**(2): 213—218
- [2] TANG Jia-Fang(汤家芳), LIU Zhi-Lan(刘芝兰), XIAO Yu-Xiu(肖玉秀), et al.. Amino Acids & Biotic Resources(氨基酸和生物资源)[J], 1998, **20**(1): 45—50
- [3] Tripathi C. K. M., Bihari V., Tyagi R. D.. Process Biochem. [J], 2000, **35**(10): 1247—1251
- [4] HU Ai-Guo(胡爱国), WANG Shan-Wei(王善韦), HAN Jun(韩军), et al.. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, **22**(3): 421—430
- [5] Ikeda M.. Adv. Biochem. Eng. Biot. [J], 2003, **79**: 1—35
- [6] WEN Jian(文健), HU Xian-Ming(胡先明). Amino Acids & Biotic Resources(氨基酸和生物资源)[J], 2000, **22**(2): 22—26
- [7] LI Xiao-Hui(李晓辉), WANG Guan(王贯), LI Jian-Xun(李建勋), et al.. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(7): 1363—1366
- [8] Glansdorff N.. *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology[M], Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987: 321—344

- [ 9 ] Meinnel T. , Schmitt E. , Mechulam Y. , *et al.* . J. Bacteriol. [J], 1992, **174**(7) : 2323—2331
- [10] Boyen A. , Charlier D. , Charlier J. , *et al.* . Gene[J], 1992, **116**(1) : 1—6
- [11] Sakanyan V. , Desmarez L. , Legrain C. , *et al.* . Appl. Environ. Microbiol. [J], 1993, **59**(11) : 3878—3888
- [12] Javid-Majd F. , Blanchard J. S. . Biochemistry[J], 2000, **39**(6) : 1285—1293
- [13] Tsai Y. , Lin C. , Tseng T. , *et al.* . Enzyme Microb. Technol. [J], 1992, **14**(5) : 384—389
- [14] Moriguchi M. , Sakai K. , Miyamoto Y. , *et al.* . Biosci. Biotech. Biochem. [J], 1993, **57**(5) : 1149—1152
- [15] Kumagai S. , Kobayashi M. , Yamaguchi S. , *et al.* . J. Mol. Catal. B: Enzym. [J], 2004, **30**(4) : 159—165
- [16] McGregor W. C. , Swierczek S. I. , Bennett B. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2005, **127**(40) : 14100—14107
- [17] Sambrook J. , Russell D. W. . Trans. by Huang Pei-Tang(黄培堂译). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (分子克隆实验指南, 第三版)[M], Beijing: Science Press, 2005

## Chiral Resolution of *D,L*-Valine by Immobilized Cells with Acetylornithine Deacetylase Activity

ZHANG Fei<sup>1,2</sup>, XIONG Ji-Bing<sup>1</sup>, LIU Jun-Zhong<sup>1</sup>, LIU Peng-Gang<sup>1</sup>, JIAO Qing-Cai<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. Baotou Light Industry Vocational Technical College, Baotou 014043, China)

**Abstract** *D*-Amino acids are widely used intermediates in pharmacy. *D*-Amino acids can be produced by chiral separation of *D,L*-amino acids racemate. The stereospecific hydrolysis of *N*-acetyl-*D,L*-amino acids by microbial enzymes is one of the most extensively used procedures in optical resolution of *D,L*-amino acids. In this report, a new method of chiral resolution of *D,L*-valine by immobilized cells with acetylornithine deacetylase activity was developed. The optimum reaction conditions were 200 mmol/L *N*-acetyl-*D,L*-valine and 0.2 g/mL (or 100 U/mL) of immobilized cells with 0.1 mmol/L CoCl<sub>2</sub> as activator at pH = 6. After 2—3 h incubation at 50 °C, 95 mmol/L *L*-valine was obtained. In continuous use of immobilized cells for 10 times, the average conversion rate against *N*-acetyl-*L*-valine was 90.8%. The results display great potential in industrialization. This is the first report of chiral resolution of *D,L*-valine by acetylornithine deacetylase (*ArgE*).

**Keywords** Acetylornithine deacetylase; Chiral resolution; Immobilized cell; *D,L*-Amino

(Ed. : H, J, Z)