

研究论文

# 海因酶法制备 D-苯丙氨酸的酶催化过程动力学

韦 萍 姚 忠 李家瓊 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** 采用自行筛选的兼有海因酶和 *N*-氨甲酰氨基酸水解酶活性的 *Burkholderia cepacia* 1003 菌种, 利用海因酶法大规模制备 D-苯丙氨酸, 对其中涉及各过程的动力学参数进行了测定. 结果表明: L-苯基海因的消旋速率常数为  $3.975 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ; 海因酶的米氏常数为  $16.7894 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最大反应速率为  $0.6127 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; *N*-氨甲酰氨基酸水解酶的米氏常数为  $0.82688 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最大反应速率为  $4.828 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . 对 DL-5-苯基海因的溶解、L-苯基海因的消旋、D-海因的水解开环及其中间产物 (*N*-氨甲酰苯丙氨酸) 的水解脱酰过程建立了动力学模型, 并在此基础上进行了动力学参数显著性分析和优化. 结果表明: 对于这一级联酶转化反应, D-海因酶的水解反应是快速反应, 而 *N*-氨甲酰氨基酸脱氨甲酰的反应速率极小, 是该过程的控制步骤. 提高氨甲酰水解酶的活力将有助于提高总体的转化速率, 而 L-海因的消旋速率则是影响外消旋苯基海因转化率的主要因素.

**关键词** 海因酶 D-苯丙氨酸 酶催化 动力学

中图分类号 TQ 033

文献标识码 A

文章编号 0438-1157 (2004) 05-0764-06

## ENZYMATIC CATALYSIS DYNAMICS OF PREPARATION OF D-PHENYLALANINE

WEI Ping, YAO Zhong, LI Jiahuang and OUYANG Pingkai

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

**Abstract** The *Burkholderia cepacia* 1003 screened by the authors' laboratory, which contains hydantoinase and *N*-carbamoylase activities, was used to prepare D-phenylalanine on a large scale. The dynamic parameters of the whole bioconversion process were measured, and the results showed that  $k_r$  was  $3.975 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m$  and  $r_m$  of hydantoinase and *N*-carbamoylase were  $16.7894 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.82688 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.6127 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $4.828 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectively. Simulation was made including processes of dissolution, racemization, hydrolysis of D-BH and hydrolysis of *N*-carbamyl phenylalanine. The significance of parameters in this model was investigated and these parameters were optimized. The result showed that the reaction rate of D-BH hydrolysis was higher than that of *N*-carbamyl phenylalanine hydrolysis, the latter was the limiting step of the whole process. Promotion of *N*-carbamoylase activity was helpful to D-phenylalanine production. Another result was that the rate of L-BH racemization was the main factor, which influenced the conversion of racemic BH.

**Keywords** hydantoinase, D-phenylalanine, enzymatic catalysis, dynamics

### 引 言

随着 D-苯丙氨酸 (D-Phe) 的用途不断被发现

和发掘, 医药与食品领域对 D-苯丙氨酸的需求迅速增长, 该氨基酸制备方法的研究正受到广泛的关注<sup>[1~12]</sup>.

2002-12-17 收到初稿, 2003-08-01 收到修改稿.

联系人: 姚忠. 第一作者: 韦萍, 女, 42 岁, 博士, 教授.

基金项目: 国家 973 项目 (No. 2003CB7160004) 和国家“十五”科技攻关计划 (No. 2001BA708B02-06) 共同资助.

Received date: 2002-12-17.

Corresponding author: Dr. Yao Zhong. E-mail: yaozh09@263.net

作者采用新方法大规模制备 5-苄基海因 (5-BH) 的同时选育了一株 *Burkholderia cepacia* 1003 菌种, 用发酵所得菌体含有高活力的 D-海因酶 (D-HEn) 和 *N*-氨甲酰氨基酸水解酶 (*N*-CAEn) 可将 5-BH 直接转化为 D-Phe.

在酶转化反应过程中发现, 该海因酶反应体系实际上是一个级联的反应传递的复杂过程, 定量分析并优化该过程可以提高产物的收率. 因此, 对其催化动力学过程进行了研究. 采用菌体细胞转化 5-取代海因制备 D-氨基酸的反应过程如图 1 所示. 这是一个包含固 (底物、细胞)、液质量传递及酶催化反应的复杂的级联过程, 在进行模型分析之前应该予以适当简化.

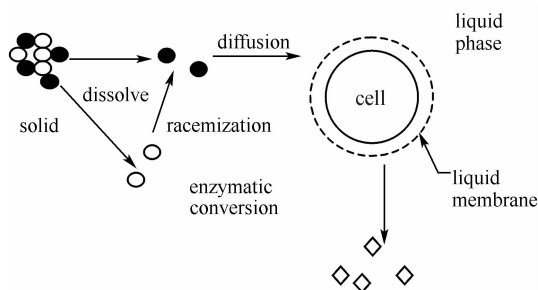


Fig. 1 Diagram of substrate dissolve, diffusion and enzymatic conversion  
● D-BH; ○ L-BH; ◇ D-Phe

前人有将细胞内的反应与胞外隔离, 而将细胞视为一个微球, 形成胞内与胞外的传质与反应, 并建立偏微分方程模型, 大多数情况下并未对模型做进一步的分析与模拟<sup>[1~6]</sup>. 本文假定: ①由于酶转化的周期很长 (约 40 h), 相对而言细胞的体积很小, 胞内的传质阻力可以忽略不计, 同时底物在浓度梯度的作用下从细胞表面进入胞内转化部位的时间很短, 透膜阻力也可以忽略不计; ②由于反应器中较强的湍流场, 细胞表面的液膜很薄, 底物在液膜中的传递时间很短, 外扩散阻力也可以忽略不计, 故细胞与液相可认为是 (拟) 均相, 对细胞而言其控制步骤应为催化反应动力学; ③与细胞类似, 呈细粉状的固形底物悬浮在反应液中, 在反应器搅拌桨良好搅拌下其与液相主体间的质量传递阻力 (液膜) 亦可忽略不计.

故由图 1 表示的这一复杂酶转化过程可简化为下述 4 个步骤: ①固形底物溶解成 D-及 L-海因并进入液相主体; ②L-海因在液相主体中消旋; ③D-海因在 D-HEn 催化下开环生成 *N*-氨甲酰-D-氨

基酸; ④*N*-氨甲酰-D-氨基酸在 *N*-CAEn 的作用下生成 D-氨基酸.

因此, 5-BH 经酶水解制备 D-氨基酸过程的数学模型由 DL-BH 的溶解、L-BH 消旋为 D-BH、D-BH 经 D-HEn 水解为 *N*-CPhe 和 *N*-CPhe 经 *N*-CAEn 催化转化为 D-Phe 的动力学方程组成.

在此基础上, 可建立该过程的动力学模型.

## 1 实验部分

### 1.1 材料与方法

1.1.1 菌种 *Burkholderia cepacia* 1003.

1.1.2 试剂 苄基海因, 自制; 盐酸, C. P., 南京化学试剂厂; 氢氧化钠, C. P., 金坛第二化学试剂厂; 氮气, 普通级, 南京特种气体厂.

1.1.3 实验仪器 紫外分光光度计, 756MC, 上海第三分析仪器厂; 高速冷冻离心机, HS-2 Beckman; 双层落地恒温振荡器, 2D-88-3, 江苏太仓实验仪器厂; 酶转化反应器, 江苏绿环生化设备公司; 毛细管电泳, Beckman P/ACE system 5000.

1.1.4 底物 D,L-苄基海因的溶解实验 将 5 g D,L-BH 加入 500 ml 38 °C 的蒸馏水中并搅拌, 每隔 1 min 取样, 毛细管电泳测定样品中 BH 的含量.

1.1.5 L-苄基海因的消旋实验

(1) 精确称量 2.000 g L-BH 溶于蒸馏水中, 定容至 250 ml, 于不同温度下测定其旋光度, 并以此值作为未消旋化的起始旋光度  $\alpha_0$ .

(2) 用  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液调节 L-BH 溶液的 pH 值为 7.0、8.0 和 9.0, 水浴温度分别为 50、38、25 °C (室温), 恒温 2 h, 分别测定上述条件下的旋光度  $\alpha_t$ .

1.1.6 酶的催化反应实验 以 pH 值 9.0 的 Tris-HCl 液缓冲配制 5-BH ( $10 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 或 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸 (*N*-CPhe) 的底物混悬液 150 ml, 加入质量为 5-BH 质量 2 倍的菌体, 用氮气置换出反应器中气体, 迅速塞好瓶塞, 并置于摇床中, 于 38 °C 下转化 40~72 h, 测定其中的 D-Phe 含量.

### 1.2 检测方法

BH, *N*-CPhe, D-Phe 均采用毛细管电泳测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 D,L-苄基海因溶解动力学

大多数 5-取代海因在水中的溶解度都很低.

Deepa 等<sup>[4,5]</sup>认为底物溶解度低是限制反应过程的主要因素,也有人认为底物溶解速度是影响该过程的重要因素.本文在 38 °C 下测定的 DL-BH 的溶解动力学曲线见图 2.图 2 表明,5-BH 的溶解度较小(3.31 g · L<sup>-1</sup>).随着溶解的进行,其溶解速度不断降低,在溶解实验条件下在 10 min 内达饱和浓度.

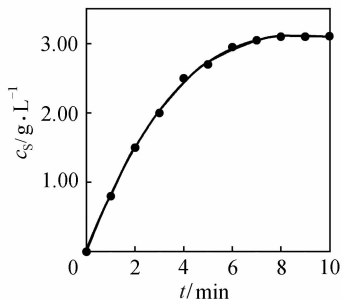


Fig. 2 Kinetic curve of DL-BH dissolving

假定溶液总体积在溶解过程中保持不变,则溶解模型为

$$\frac{dc_s}{dt} = K(c_s^* - c_s) \quad (1)$$

令  $t=0$  时  $c_s=0$ , 积分式 (1) 得

$$c_s = S^* (1 - e^{-Kt}) \quad (2)$$

式中  $S^* = 3.305559 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $K = 5.462 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

### 2.2 L-苯基海因消旋动力学

实验表明 D-HEEn 是严格的 D-型选择性酶.它只能水解 D-海因,而不能水解 L-海因.L-海因必须先消旋成 D-型的海因才能够进行酶转化<sup>[12]</sup>.

图 3 为实验测定的在 38 °C、pH 值 9.0 时 L-BH 的旋光比  $\ln(\alpha_t/\alpha_0)$  对时间  $t$  的变化曲线.可以看出  $\ln(\alpha_t/\alpha_0)$  随着时间的增加而呈线性下降

$$\ln(\alpha_t/\alpha_0) = -k_r t \quad (3)$$

由图中直线回归得  $k_r = 3.975 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .

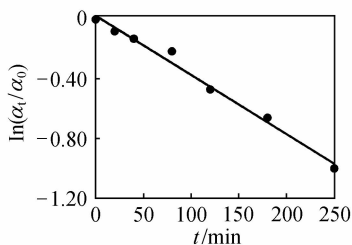


Fig. 3 Kinetic curve of racemization of L-BH

实验表明 L-BH 的消旋过程遵循一级反应动力学,其动力学方程如下

$$-\frac{dc_{SL}}{dt} = k_r c_{SL}; \quad -\frac{dc_{SL}}{dt} = \frac{dc_{SD}}{dt} \quad (4)$$

由式 (3) 可得 L-BH 的消旋半衰期为

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_r \quad (5)$$

对于外消旋体则有

$$-\frac{dc_{SL}}{dt} = k_r (c_{SL} - c_{SD}) \quad (6)$$

### 2.3 D-海因酶的酶催化反应动力学

实验结果表明, D-HEEn 的酶催化反应动力学符合米氏方程

$$-r_{SD} = -\frac{dc_{SD}}{dt} = \frac{r_m c_{SD}}{K_m + c_{SD}} \quad (7)$$

由双倒数法可求得米氏常数及最大反应速率为:  $r_m = 0.6127 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_m = 16.7894 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 2.4 N-氨甲酰-D-氨基酸水解酶的酶催化反应动力学

以 N-CPhe (P1) 为底物,测定 N-CAEn 的酶催化反应速率 ( $r$ ).实验发现,该反应随着底物浓度 ( $c_{P1}$ ) 的升高,其反应速率也随之增至一最大值后,  $r$  即与  $c_{P1}$  成反变规律(见图 4).这是典型的有底物抑制的酶催化反应,其动力学方程为

$$r = \frac{r_{m2} c_{P1}}{K_{m2} + c_{P1} + c_{P1}^2 / K_{P1}} \quad (8)$$

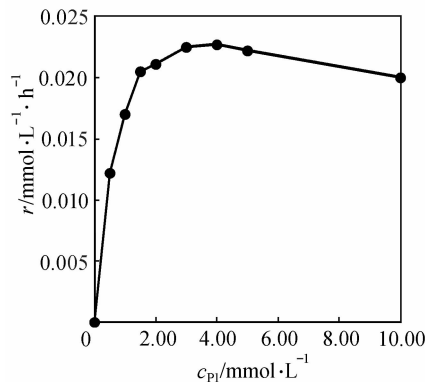


Fig. 4 Menten's curve of N-CAEn

由实验数据拟合得该动力学方程参数为:  $r_{m2} = 4.828 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_{m2} = 0.82688 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_{P1} = -12.3839 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

实验结果表明,当  $c_{P1} = (c_{P1})_{opt} = 3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, N-CAEn 转化速率最大.比较式 (6) 与式 (8) 可以看出,式 (8) 是个底物抑制的酶反应,其抑制项与底物浓度的平方成正比;虽然  $K_{m2}$  比  $K_m$  小 1 个数量级,但  $r_{m2}$  仅为  $r_m$  的 1/1000.显然,就这两个反应而言, N-CAEn 转化反应是慢速反应,而 D-HEEn 水解反应是快速反应.

### 3 海因酶法制备 D-Phe 过程的模拟、分析和优化

#### 3.1 过程数学模型

由图 1 及各个过程的动力学方程式 (2)~式 (8), 可建立如下的从 BH 制备 D-Phe 全过程的数学模型。

(1) 由于 BH 的浓度 ( $c_S$ ) 为两对映体浓度之和, 故 BH 的溶解动力学方程为

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = K(c_S^* - c_{SL} - c_{SD}) \quad (9)$$

(2) 反应体系中 L-BH 浓度变化速率为 L-BH 溶解与消旋速率之差

$$r_{SL} = \frac{dc_{SL}}{dt} = \frac{1}{2}K(c_S^* - c_{SL} - c_{SD}) - k_r(c_{SL} - c_{SD}) \quad (10)$$

(3) 类似地, 体系中 D-BH 浓度变化速率为

$$r_{SD} = \frac{dc_{SD}}{dt} = \frac{1}{2}K(c_S^* - c_{SL} - c_{SD}) + k_r(c_{SL} - c_{SD}) - \frac{r_m c_{SD}}{K_m + c_{SD}} \quad (11)$$

(4) 中间产物 (P1) 浓度变化速率为

$$r_{P1} = \frac{dc_{P1}}{dt} = \frac{r_m c_{SD}}{K_m + c_{SD}} - \frac{r_{m2} c_{P1}}{K_{m2} + c_{P1} + \frac{c_{P1}^2}{K_{P1}}} \quad (12)$$

(5) 产物 D-Phe (P2) 生成的动力学方程为

$$r_{P2} = \frac{dc_{P2}}{dt} = \frac{r_{m2} c_{P1}}{K_{m2} + c_{P1} + \frac{c_{P1}^2}{K_{P1}}} \quad (13)$$

由实验值拟合的模型参数列于表 1。

Table 1 Parameters used in simulation

Parameters	Values
$k_r$	$3.975 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
$K_m$	$16.7894 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
$K_{m2}$	$0.82688 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
$r_m$	$0.6127 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
$r_{m2}$	$4.828 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
$K$	$5.462 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
$c_S^*$	$17.39 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
$K_{P1}$	$-12.3839 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

#### 3.2 过程数学模拟

联立式 (9)~式 (13), 以四阶 Runge-Kutta 法进行数值求解, 可模拟得该酶转化过程底物、中间产物及产物随时间变化的曲线规律, 如图 5 所示 (图中以  $S_T$  表示该反应液体积中含有包括液、固相的 BH 的总的底物含量, 下同)。

该模拟结果与实验结果基本吻合 (见图 6), 表明本文建立的过程数学模型真实地反映了实际体系这个复杂的酶转化反应过程。

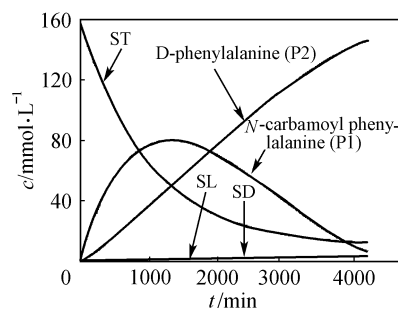


Fig. 5 Process simulating of D,L-BH converting to D-Phe

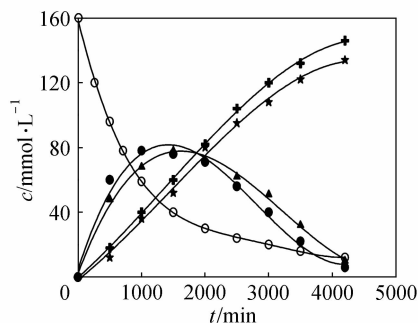


Fig. 6 Result comparison of simulation and experiment

● N-Cphe (sim.); + D-Phe (sim.); ▲ N-Cphe (exp.);  
★ D-Phe (exp.); ○ total Sub (sim.)

#### 3.3 酶催化过程动力学参数的显著性分析及优化

3.3.1 正交试验的影响因子 综合考虑转化过程中的影响因子应该有 6 个, 包括温度、pH 值、底物溶解速率、L-型底物消旋速率  $k_r$ 、D-HEEn 和 N-CAEn 两个酶的最大反应速率  $r_m$  和  $r_{m2}$ 。如前所述, 对此可做如下简化: 假设温度和 pH 值在过程中都为一定值; 底物溶解速率虽然是影响转化过程的一个因素, 但对具体的某个 5-取代海因与反应体系底物其溶解速率也是一个定值。由此余下的 3 个因子就作为正交试验的影响因子。

3.3.2 确定因子水平 以 D,L-BH 转化为 D-Phe 过程数学模型中参数  $k_r$ 、 $r_m$  和  $r_{m2}$  的实际值以及该实际值的 2 倍值与 4 倍值作为各因子的 3 个水平, 结果见表 2。

Table 2 Levels of  $k_r$ ,  $r_m$  and  $r_{m2}$

Factor	Type	Level 1	Level 2	Level 3
$k_r$	A	0.003975	0.00795	0.0159
$r_m$	B	0.6127	1.2254	2.45
$r_{m2}$	C	$4.828 \times 10^{-4}$	$9.656 \times 10^{-4}$	$19.312 \times 10^{-4}$

3.3.3 正交模拟试验结果及讨论 选择转化时间为 500 min 时的模拟数据, 以底物转化率及中间产

物、产物的浓度为指标进行分析，模拟结果如表 3 所示。

**Table 3 Concentration of N-CPhe and D-Phe and conversion yield of BH in 500 min**

Simulation	$k_r$ (A)	$r_m$ (B)	$r_{m2}$ (C)	Conversion of BH/%	[N-CPhe] /mmol · L <sup>-1</sup>	[D-Phe] /mmol · L <sup>-1</sup>
I	1	1	1	87.05	8.8613	6.8085
II	1	2	2	90.74	4.4833	11.85
III	1	3	3	92.03	1.3634	15.203
IV	2	1	2	95.01	5.0264	12.076
V	2	2	3	94.78	1.2481	16.331
VI	2	3	1	98.47	9.6467	8.075
VII	3	1	3	97.88	1.5608	16.058
VIII	3	2	1	99.68	9.8382	8.1044
IX	3	3	2	99.91	4.2711	13.713

由表 3 中正交模拟 500 min 时各组分的含量，利用标准的统计分析软件 STATISTIC 中的 Pareto 作图法分析各因子对 D-Phe 和 N-CPhe 的浓度及对 D, L-BH 转化率的影响，结果如图 7~图 9 所示，其中 VAR1(L)、VAR2(L)、VAR3(L)分别指  $k_r$ 、 $r_m$  和  $r_{m2}$  影响转化的线性模型，VAR1(Q)、VAR2(Q)、VAR3(Q) 分别指二次模型(无交互作用项)。可以看出，对产物 D-Phe 和中间产物 N-CPhe 浓度最显著影响因子是 N-CAEn 的最大水解反应速率  $r_{m2}$ ，其次为消旋常数  $k_r$ 。特别是  $r_{m2}$  对 D-Phe 浓度的影响因素值为 22.553，对 N-CPhe 的影响因素值为 17.987。只要改变  $r_{m2}$ ，体系的转化过程会有非常明显的变化。对于 D, L-BH 的转化率来说，最显著的影响因子是 L-BH 的消旋速率常数  $k_r$  值，其影响因素值为 6.545991。

Pareto Chart of Standardized Effects; Variable:VAR4  
3 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=0.1818781  
DV:VAR4

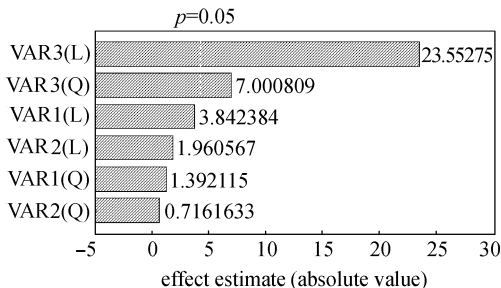


Fig. 7 Effect and its degree of factors on yield of D-Phe

Pareto Chart of Standardized Effects; Variable:VAR4  
3 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=0.3010403  
DV:VAR4

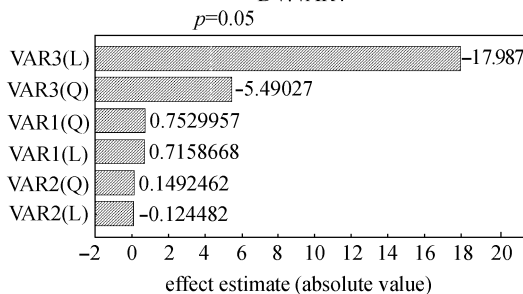


Fig. 8 Effect and its degree of factors on yield of N-CPhe

Pareto Chart of Standardized Effects; Variable:VAR4  
3 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=2.973639  
DV:VAR4

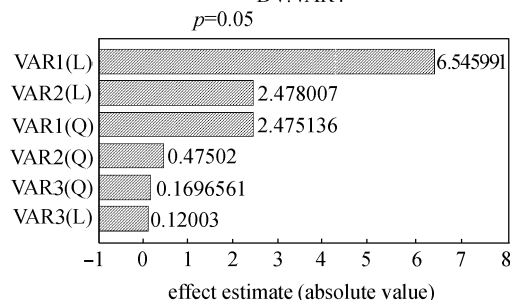


Fig. 9 Effect and its degree of factors on conversion of D, L-BH

的实际转化体系是一个包括固型底物溶解、溶质分子在液相中的扩散、L-底物的消旋、D-底物透膜进入细胞以及 D-底物在胞内进行生物转化等一系列传质、反应的级联过程。本文设定底物在液相中的扩散、底物透膜等的传质阻力可以忽略，将整个转化过程简化为底物溶解、L-海因消旋动力学以及双酶催化反应动力学的模型，通过试验确定了 D-HEEn、N-CAEn 的米氏常数与最大反应速率以及外消旋苄基海因的溶解动力学常数，并在此基础上对反应全过程进行了动力学分析。结果表明，本文模型可以较好地反映实际体系的转化过程，说明了模型假设的合理性。

进一步的模型分析表明，在本文实验条件下，双酶体系对外消旋苄基海因进行生物转化制备 D-Phe 的反应过程中，D-HEEn 催化的海因水解反应是快速反应，符合米氏方程；而 N-CAEn 催化的氨甲酰氨基酸的脱酰胺反应速率最慢，应是整个反应过程的控制步骤，该步反应的 N-CAEn 酶活性极低 ( $r_{m2}$  极小)，符合底物抑制型的酶催化反应。

## 4 结 论

利用游离细胞以海因酶法大规模制备 D-Phe

正交模拟试验各参数显著性的结果表明,  $r_{m2}$  对 D-Phe 收率的影响最大, 而 L-BH 消旋速率对外消旋 BH 转化率的影响最为显著. 因此, 采用基因工程方法提高菌体 *N*-CAEn 表达量是解决一菌双酶法大规模制备 D-氨基酸的关键; 或者可以采用初步的分离方法将 D-HEn 和 *N*-CAEn 分别提取, 按需要进行重新配比 (增加 *N*-CAEn 量), 再结合固定化酶技术, 也是解决现阶段工业菌株中 *N*-CAEn 活力低的有效途径.

### 符号说明

- $c_{PI}$ ——*N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸浓度,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $c_S$ ——苄基海因浓度,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $c_{SD}$ ——D-苄基海因浓度,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $c_{SL}$ ——L-苄基海因浓度,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $c_S^*$ ——苄基海因饱和浓度,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $K$ ——D, L-苄基海因溶解动力学常数,  $\text{min}^{-1}$   
 $K_m$ ——D-海因酶的米氏常数,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $K_{m2}$ ——*N*-氨甲酰-D-氨基酸水解酶的米氏常数,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $K_{PI}$ ——D-苯丙氨酸生成过程的底物抑制常数,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $k_r$ ——L-海因酶消旋动力学常数,  $\text{min}^{-1}$   
 $p$ ——显著性的检验参数  
 $r$ ——反应速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $r_m$ ——D-海因酶最大反应速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $r_{m2}$ ——*N*-氨甲酰-D-氨基酸水解酶最大反应速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $r_{PI}$ ——*N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸生成速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $r_{P2}$ ——D-苯丙氨酸生成速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $r_{SD}$ ——D-苄基海因反应速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $r_{SL}$ ——L-苄基海因反应速率,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$   
 $S_T$ ——液、固相苄基海因总含量,  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $S^*$ ——D, L-苄基海因饱和溶解度,  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   
 $t$ ——反应时间,  $\text{min}$

$\alpha_t$ —— $t$  时间溶液的旋光度, ( $^\circ$ )

$\alpha_0$ ——溶液初始旋光度, ( $^\circ$ )

### References

- Lee C K, Lee Z S, Yang P F. Effect of Cell Membrane of *Agrobacterium Radiobacter* on Enhancing D-Amino Acids Production from Racemic Hydantoins. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28** (9—10): 806—814
- Giuliano G, Renata G, Guido G. Stable Mutants of D-*N*- $\alpha$ -Carbamoylase and Process for Preparing D- $\alpha$ -Amino Acids. US 5869298. 1999
- Richard B Silverman. The Organic Chemistry of Enzyme-catalyzed Reactions. San Diego; Academic Press, 2000. 59
- Deepa S, Sivasankar B, Jayaraman K. Enzymic Production and Isolation of D-amino Acids from the Corresponding 5-Substituted Hydantoins. *Process Biochemistry*, 1993, **28** (7): 447—452
- Syldatk C, May O, Altenbuchner J, Mattes R, Siemann M. Microbiol Hydantoinase-industrial Enzymes from the Origin of Life. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51** (3): 293—309
- Andreas S, Bommarius M S, Karlheinz D. Biocatalysis to Amino Acid-based Chiral Pharmaceuticals-enamples and Perspectives. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1998, **5**: 1—11
- Jahnke K, Podschun B, Schnackerz K D, Kautz J, Cook P F. Acid-base Catalytic Mechanism of Dihydropyrimidinase from pH Studies. *Biochemistry*, 1993, **32** (19): 5160—5166
- Gu Lianquan (古练权), Ma Lin (马林). Bioorganic Chemistry (生物有机化学). trans. Beijing: Higher Education Press, 1998
- Jabri E, Carr M B, Harsinger R P, Karplus P A. The Crystal Structure of Urease from *Klebsiella Aerogenes*. *Science*, 1995, **268** (5213): 998—1004
- Jiang Min (姜岷). Research on the New Preparation Method of *p*-Hydroxy-D-phenylglycine: [dissertation] (学位论文). Nanjing: Nanjing University of Technology, 2000
- Thomas Waniek. Untersuchungen zur Substratspezifitat und Tnantioselektivitat mikrobieller Hydantoin: [thesis]. Stuttgart, Ger; Universitat Stuttgart, 2000
- Guo Feng (郭峰). Research on the Dynamic Characters in Production of D-Alanine Using Enzymatic Method: [thesis] (学位论文). Nanjing: Nanjing University of Technology, 2002