

研究论文

海因酶法生产 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸的 动力学及温度的影响

李家璜 韦 萍 姚 忠 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 利用从 *Burkholderia cepacia* njut1 中纯化得到的纯海因酶建立了利用苄基海因生产 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸的酶转化过程的动力学模型. 研究表明, 底物的消旋对转化有重要影响. 探讨了温度对转化过程的影响, 测定了不同温度下苄基海因的溶解常数、消旋常数及米氏常数. 结果表明, 温度对苄基海因转化过程有重要影响, 提高海因酶的热稳定性对 *D*-氨基酸的生产有重要意义.

关键词 *D*-海因酶 苄基海因 动力学 温度

中图分类号 TQ 033

文献标识码 A

文章编号 0438-1157 (2004) 04-0629-06

KINETICS FOR PRODUCTION OF *D*-*N*-CARBAMOYL PHENYLALANINE AND INFLUENCE OF TEMPERATURE ON CONVERSION PROCESS

LI Jiahuang, WEI Ping, YAO Zhong, ZHOU Hua and OUYANG Pingkai

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

Abstract Kinetic model of conversion process for the production of *D*-*N*-carbamoyl phenylalanine from benzylhydantoin by hydantoinase purified from *Burkholderia cepacia* njut1 was developed. The study indicated important impact of substrate racemization on enzymatic conversion. The influence of temperature on bioconversion was discussed. The values of solubility and solution constant, racemization constant and Michaelis constant were determined at different temperatures. Temperature was important in conversion of benzylhydantoin and increasing thermostability of hydantoinase was significant for production of *D*-amino acids.

Keywords *D*-hydantoinase, benzylhydantoin, kinetics, temperature

引 言

根据 EC 命名法, 海因酶是环酰胺酶中二氢嘧啶酶 (EC 3. 5. 2. 2) 的替代名. 这种酶催化 5, 6-二氢尿嘧啶到 3-脲基丙酸的水解反应. 另外, 它还可以催化 5'-取代海因衍生物不对称水解反应, 生成相应的光学纯 *N*-氨甲酰氨基酸.

海因酶根据它们的底物特异性和立体旋光异构

性经常被分类为 *L*-海因酶和 *D*-海因酶, 可分别应用于光学纯 *D*-和 *L*-氨基酸的生产. 海因酶高度的对映体异构性和海因衍生物易发生消旋作用的现象, 使人们对海因酶生产光学纯氨基酸的生物技术产生了极大的兴趣^[1~3].

海因酶法制备 *D*-氨基酸的反应历程见图 1. *D*-海因酶不对称水解 5'-取代海因衍生物, 生成光学活性 *D*-氨基甲酰氨基酸, 后者在 *N*-氨甲酰水解酶

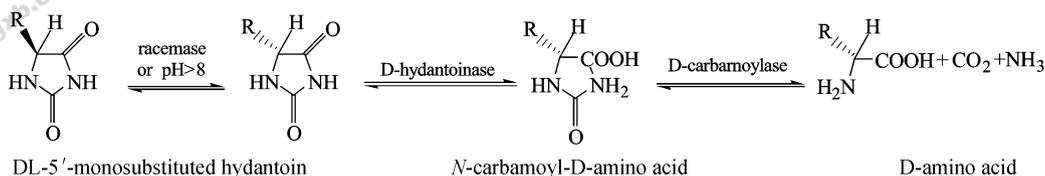


Fig. 1 Hydantoinase conversion process for D-amino acid

或 NaNO_2 作用下脱氨甲酰基生成 D-氨基酸^[4,5]。由于许多 D-氨基酸是合成抗生素、多肽类激素及多种农药的原料和中间体，因此它在药学领域有广泛的应用。例如 D-对羟基苯甘氨酸就是制备羟氨苄青霉素、头孢羟氨苄等 β -内酰胺类半合成抗生素的主要原料，D-苯丙氨酸也可作为制备凝血酶抑制剂的原料及二型糖尿病药物。因此海因酶法在制备 D-氨基酸上具有极大的工业价值。

海因酶法合成氨基酸一直是人们研究的热点^[6~9]。目前对海因酶反应动力学研究较少，有关动力学的模型大都建立在细胞水平上。张衍坤等^[10]对 D-海因酶产酶菌 sp. 2262 制备 D-对羟基苯甘氨酸的反应动力学进行了研究，建立了细胞转化全过程的动力学，并对反应副产物 NH_3 以及 pH 值对酶解反应的影响作了考察。韦萍等^[11]也对海因酶法生产 D-氨基酸动力学作了研究。但是他们对两种酶的底物催化反应均采用细胞进行，未用纯酶，动力学中涉及细胞内外扩散问题，缺乏对酶催化特性的认识。

迄今为止温度对海因酶生产 N-氨甲酰-D-苯丙氨酸的转化过程的影响还未见详细报道。

洋葱博克霍尔德里氏菌 (*Burkholderia cepacia* njut1) 是本实验室自行筛选诱变得到的产 D-海因酶的菌株。为了研究海因酶结构与其催化功能的关系，利用从 *Burkholderia cepacia* njut1 中纯化得到的 D-海因酶，在实验基础上建立了利用苄基海因生产 N-氨甲酰-D-苯丙氨酸的酶转化过程的动力学模型，并着重探讨了温度对酶反应过程的影响，测定了不同温度下苄基海因的溶解常数、消旋常数及米氏常数，探讨温度对海因酶转化过程的影响。这对 D-氨基酸的生产制备具有广泛的借鉴作用，也为进一步开展蛋白质改造及定点突变工作奠定了基础。

1 材料与实验方法

1.1 菌种

利用本实验室自行筛选得到的 *Burkholderia*

cepacia njut1 菌发酵产酶。

1.2 试剂

DL-苄基海因 (DL-BH)、D-苄基海因 (D-BH)、L-苄基海因 (L-BH)，实验室自制。

1.3 分析方法

苄基海因 (BH) 及 N-氨甲酰-D-苯丙氨酸 (NPhc) 的浓度由毛细管电泳检测。

1.4 海因酶的提纯

Burkholderia cepacia njut1 菌体发酵液离心后配成 20% 菌悬液，经过超声细胞破碎、55℃ 热变性处理、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀。粗酶经过 HiPrep™ Phenyl FF 16/10 (high sub) 柱 (Pharmacia)、DEAE Sepharose CL-6B 柱 (Pharmacia) 及 G200 凝胶柱 (Pharmacia) 3 步纯化，得到电泳纯的海因酶。

1.5 酶活测定

采用改进的 Cecere 法^[12]。

酶活定义：每分钟转化 1 μmol N-氨甲酰氨基酸所需的酶量为一个酶单位 (U)。比活力为 1 mg 酶的活力 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

1.6 蛋白总量测定

采用 Bradford 检测法^[13]，标准蛋白为牛血清白蛋白。

1.7 转化反应

在 250 ml 锥形瓶中加入 100 ml 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 和苄基海因，加入酶液进行转化。

2 结果与讨论

2.1 海因酶转化全过程动力学模型建立

海因酶转化过程有以下几步：(1) 苄基海因溶解；(2) DL-对羟基苯海因的消旋；(3) D-海因酶的酶解反应。

2.1.1 苄基海因溶解动力学 首先建立苄基海因溶解动力学模型。根据文献报道^[10,14]，底物的溶解对反应进程有重要影响，溶解模型为^[10]

$$\frac{dS_s}{dt} = k_1 A(m_s)(S^* - S_s) \quad (1)$$

式中 $A(m_s)$ 表示固液接触表面积与海因初始投料量的函数关系, 即为体积表面常数; k_1 表示固液相传质系数. 以统一参数——苜基海因溶解速率常数 K 代替 $k_1 A(m_s)$, 并积分简化得

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

实验测得 38 °C 时, $S^* = 18.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $K = (0.07648 \pm 0.00073) \text{ min}^{-1}$.

2.1.2 苜基海因消旋动力学 研究表明苜基海因的消旋是化学消旋, 并且符合一级反应^[14]

$$\ln \frac{\alpha_t}{\alpha_0} = -k_r t \quad (3)$$

式中 k_r 为消旋的反应速率常数, min^{-1} ; α_t 为 t 时间溶液的旋光度; α_0 为溶液初始旋光度. 实验测得 pH 值 9.0、38 °C 时, L-苜基海因的消旋一级反应速率常数 $k_r = (0.00446 \pm 0.00005) \text{ min}^{-1}$.

2.1.3 海因酶的酶解动力学过程 根据文献报道^[10,14], 海因酶转化过程动力学符合米氏方程, 用 Lineweaver-Burk 法——酶促反应的初速度和底物初浓度的双倒数法, 可求得 D-苜基海因酶解的米氏常数: $K_m = (8.82 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $r_m = 0.6306 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (pH=9.0、38 °C).

2.1.4 建立海因酶转化全过程模型 根据所得动力学实验结果可以建立全过程动力学模型.

底物的溶解

$$\frac{dS_s}{dt} = K(S^* - S_s) \quad (4)$$

对 L-型底物

$$\frac{dS_L}{dt} = \frac{1}{2} K(S^* - S_s) - k_r(S_L - S_D) \quad (5)$$

对 D-型底物

$$\frac{dS_D}{dt} = \frac{1}{2} K(S^* - S_s) + k_r(S_L - S_D) - \frac{r_m S_D}{K_m + S_D} \quad (6)$$

对产物 D-NPhe

$$\frac{dP}{dt} = \frac{r_m S_D}{K_m + S_D} \quad (7)$$

约束方程

$$\frac{dS_L}{dt} + \frac{dS_D}{dt} + \frac{dP}{dt} = k(S^* - S) \quad (8)$$

其中的动力学参数由前面实验获得, 见表 1.

Table 1 Parameters used in model simulation

K / min^{-1}	k_r / min^{-1}	K_m / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	r_m / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
0.07648	0.00446	8.82	0.6306

Note: The parameters were determined at 38 °C, pH 9.0.

式 (5)~式 (8) 用四阶 Runge-Kutta 方法求解, 其数学模拟结果见图 2. 在 38 °C, pH=9.0 条件下, 用 10 mmol 底物进行酶转化实验, 将实验值与理论值作比较 (图 2), 结果吻合较好.

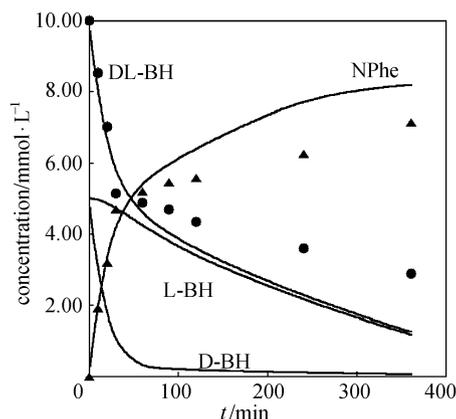


Fig. 2 Mathematics simulation of kinetic curve and comparison between predicted value and observed values
— predicted value; ● observed value of DL-BH;
▲ observed value of NPhe

该海因酶具有严格的 D-型光学特异性, D-型苜基海因的酶转化较快, 可以在较短的时间转化完全, L-型苜基海因必须自发消旋, 生成 D-型海因后才能进行酶转化生成 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸. 从动力学方程拟合 (图 2) 可以看出, DL-BH 的消耗基本与 L-BH 的消旋保持一致, 海因的消旋是 DL-BH 酶转化的限速步骤. 因此海因的消旋是海因酶促反应不可忽略的因素, 提高 L-型底物的消旋速率将促进 DL-BH 向 NPhe 的转化.

2.2 温度对动力学过程的影响

温度对海因酶法生产 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸有重要影响. 本文测定了 *Burkholderia cepacia* 海因酶的酶活、米氏常数、苜基海因溶解速率常数以及海因消旋常数随温度的变化, 探讨温度对 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸的重要意义.

2.2.1 温度对酶活影响 实验采用浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 DL-苜基海因作为底物, 在 pH=9.0 条件下, 在 4~70 °C 内不同温度下进行酶转化实验, 结果 (图 3) 表明随着温度的升高酶活力提高, 在 60 °C 时可达到最高, 超过这个温度, 酶活力迅速下降.

在不同温度下测得反应速度, 按 Arrhenius^[15] 法作图, 得图 4.

4~50 °C 间温度与酶活力的关系按 Arrhenius

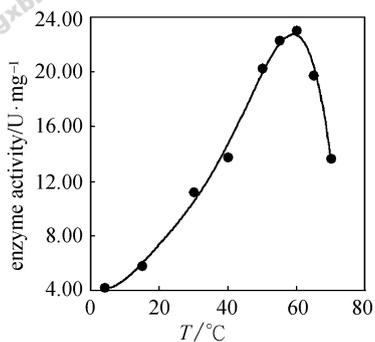


Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity

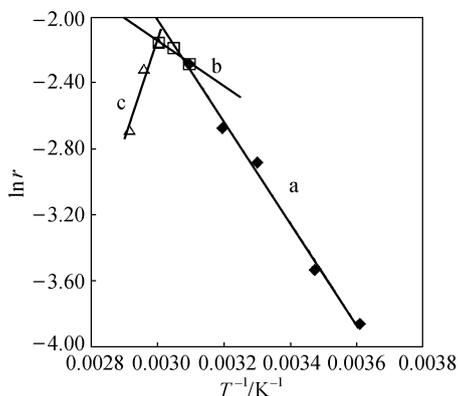


Fig. 4 Relationship between $\ln r \cdot T^{-1}$

法作图可得一直线 (图 4 中 a), 但是当温度升至 50 °C 以上时, 反应速率偏离此直线, 酶活力已受影响, 但仍为直线关系 (图 4 中 b), 表明自然态的酶构象已经发生微妙的变化, 可能伴随有某些次级键的断裂. 运用实验所得的数据, 根据 Arrhenius 公式计算活化能. 在 4~50 °C 这一温程下, 海因酶催化反应的 E_a 绝对值为 25.5 kJ · mol⁻¹. 在 50~60 °C 的 E_a 绝对值为 11.5 kJ · mol⁻¹.

由于温度高于 60 °C 时海因酶活急速下降, 本文下述关于温度对转化影响的研究均在 60 °C 以内探讨.

海因酶的热稳定性: 将酶液分别在 38 °C、转折温度 50 °C 及 60 °C 下保温一段时间, 在标准条件下测酶活 (图 5). 结果表明, 在 60 °C 下酶液保温 10 h, 酶活已经是原来的一半以下, 19 h 以后, 酶活完全丧失; 在 50 °C 下酶液保温 40 h, 酶活丧失为

原来的一半; 在 38 °C 下酶液保温 48 h 后仍保持较高的酶活; 而在 4 °C 冰箱中, 酶液可以保存 1 周以上. 实验表明 *Burkholderia cepacia* 的海因酶的热稳定性较差, 在较高温度下酶的构象易发生变化而失活.

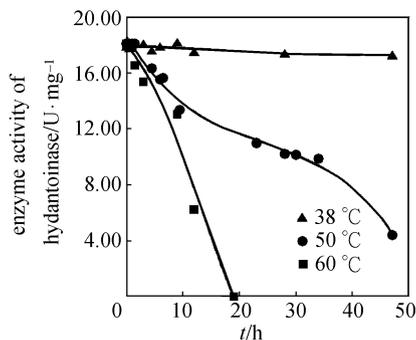


Fig. 5 Effect of temperature on enzyme thermostability

2.2.2 温度对苄基消旋的影响 在 pH=9.0 条件下, 分别在 30、40、50、60 °C 下测定 L-苄基海因的消旋速率 (图 6). 温度升高对 5'-苄基海因的消旋有利, 在 60 °C 下, L-苄基海因可在 400 min 以内完全消旋成为 DL-苄基海因, 而温度下降, 消旋速率也随之减慢.

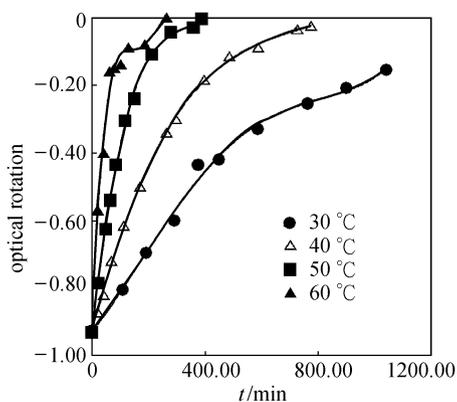


Fig. 6 Influence of temperature on racemization of L-benzyl hydantoin

2.2.3 温度对动力学模型中各参数的影响 本文测定了 pH=9.0, 38~60 °C 时各动力学参数 (表 2), 考察温度对动力学各参数的影响.

Table 2 Parameters used in model simulation

$T/^\circ\text{C}$	$S^*/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	K/min^{-1}	k_r/min^{-1}	$K_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$r_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
38	18.4	0.0765	0.00446	8.82	0.63
45	21.5	0.155	0.00850	15.5	1.41
50	22.9	0.187	0.0108	19.9	1.88
55	23.5	0.200	0.0140	24.5	2.25
60	23.6	0.201	0.0176	28.6	2.56

实验表明, 苄基海因的溶解度、溶解常数、消旋速率常数以及酶转化的米氏常数和最大反应速率都随着温度的升高而增加。50 °C 以上时, S^* 、 K 增加缓慢, 而消旋速率常数 k_r 随温度的上升显著提高。

为了验证温度对酶转化过程的影响, 实验采用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 L-和 DL-型苄基海因, 在 $\text{pH} = 9.0$ 条件下, 分别在 38、50、60 °C 下进行转化。

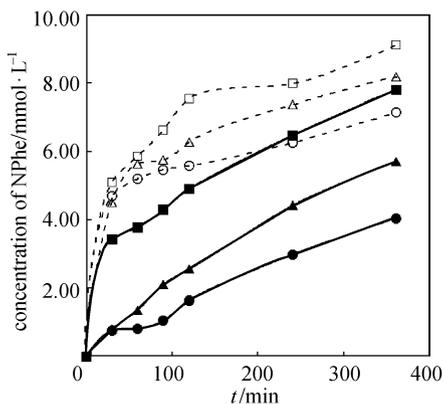


Fig. 7 Comparison between conversion of L-BH and DL-BH

(The reaction mixture contained $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ benzylhydantoin in Tris-HCl buffer, $\text{pH} 9.0$, and units of the enzyme in a total volume of 100 ml. The reactions were carried out at 38 °C, 50 °C, 60 °C)
 ●○ 38 °C; ▲△ 50 °C; ■□ 60 °C;
 ---- conversion of DL-BH; —— conversion of L-BH

随着转化温度的上升, BH 的转化率增加 (图 7), DL-BH 在 60 °C 下 360 min 生成的 NPhe 比 38 °C 时高 30%。温度对转化的影响极大, 对 L-BH 的转化尤为明显, L-BH 在 60 °C 下 360 min 生成的 NPhe 约是 38 °C 转化时的 2 倍。由此可见, 温度升高不仅提高 D-海因酶转化速率, 更明显地提高 L-海因的自发消旋速率, 从而促进了 DL-5'-取代海因的整个酶转化过程。

浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ DL-BH, 在 $\text{pH} = 9.0$ 条件下, 分别在 38 °C 和 60 °C 进行转化实验 (表 3)。

Table 3 Conversion of DL-BH

$T/^\circ\text{C}$	t/h	Conversion ratio of BH/%
38	10	41
38	20	68.8
60	10	81.8
60	20	89.5

结果表明, 60 °C 下 10 h 后 BH 可转化 82%, 而 38 °C 下只转化了 41%。但是高温下酶不稳定, 易失活。从表 3 中可以看出, 在 60 °C 下, 10 h 以内 DL-苄基海因已经转化了 80% 以上, 但是在 10~20 h 酶已经基本失活, 此时苄基海因基本不转化。而在 38 °C 下, 10 h 以后酶仍然保持较高的活力, 有较高的转化效率。

实验表明, 温度对海因酶法制备 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸有重要的影响, 高温有利反应的进行。因此有必要对海因酶进行筛选或对该酶结构修饰, 从而获得热稳定性高的海因酶, 这对 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸的工业生产有重要的意义。

3 结 论

(1) 建立了纯海因酶转化生产 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸过程动力学模型, 实验及动力学研究表明, 底物的消旋对转化有重要影响, 加快底物的消旋可以提高转化效率。

(2) *Burkholderia cepacia* njut1 海因酶对温度较为敏感, 60 °C 时酶活力较高, 但酶的热稳定性较差, 反应的活化能 $E_a = 25.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

(3) 测定了不同温度下的苄基海因的溶解常数、消旋速率常数及米氏常数。实验表明, 提高温度能够不同程度地提高苄基海因的溶解常数、消旋常数以及米氏常数和酶反应最大反应速度, 对苄基海因消旋的影响尤为明显。升高温度可以促进 DL-苄基海因的酶转化制备 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸的过程。通过对酶热稳定性的筛选或修饰该酶的结构获得热稳定性高的海因酶, 对增加海因酶的催化效率以及 *N*-氨甲酰-D-氨基酸的生产有着重要的意义。

符 号 说 明

E_a ——活化能, $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

K ——苄基海因溶解速率常数, min^{-1}

K_m ——米氏常数, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

k ——速率常数, min^{-1}

k_r ——苄基海因消旋速率常数, min^{-1}

P ——产物 D-NPhe 浓度, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

r ——反应速率, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

r_m ——最大反应速率, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

S ——底物浓度, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

S^* ——底物 DL-BH 饱和和溶解度, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

T ——温度, K 或 °C

t ——时间, min

α ——旋光度

下角标

D——底物 D-BH

L——底物 L-BH

r——底物消旋

s——溶解的底物

References

- 1 Tsugawa R, Okumura S, Ito T, Katsuga N. Production of L-Glutamic Acid from DL-5-Hydantoin Propionic Acid by Microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, 1966, **30**: 27—34
- 2 Takahiro I, Ken W, Yukuo M, Shinobu K, Hiroaki N. Microbial Conversion of DL-5-Substituted Hydantoinase to the Corresponding L-Amino Acids By *Pseudomonas* sp. Strain NS671. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, **57** (6): 982—986
- 3 Takahashi Satomi, Ohashi Takehisa, Kii Yoshiaki, Kumagai Hidehiko, Yamada Hideaki. Microbial Transformation of Hydantoins to Amino Acids. III. Microbial Transformation of Hydantoins to N-Carbamyl-D-amino Acids. *J. Ferment. Technol.*, 1979, **57** (4): 328—332
- 4 Syldatk C, May O, Altenbuchner J, Mattes R, Siemann M. Microbial Hydantoinase—Industrial Enzymes from the Origin of Life. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**: 293—309
- 5 Syldatk Christoph, Dombach Giselher, Gross Christiane, Mueller Ralf, Wagner Fritz. Production of D-and L-Amino Acids from D, L-5-Monosubstituted Hydantoins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988, **542** (Enzyme Eng. 9): 323—329
- 6 Yin Bang-Ding, Chen Yi-Chuan, Lin Sung-Chyr, Hsu Wen-Hwei. Production of D-Amino Acid Precursors with Permeabilized Recombinant *Escherichia coli* with D-Hydantoinase Activity. *Process Biochem*, 2000, **35** (9): 915—921
- 7 Chao Yun-Peng, Fu Hongyong, Lo Tsuey-Er, Chen Po Ting, Wang Jenn-Jye. One-step Production of D-*p*-Hydroxyphenylglycine by Recombinant *Escherichia coli* Strains. *Biotechnol. Prog.*, 1999, **15** (6): 1039—1045
- 8 Siemann Martin, Syldatk Christoph, Wagner Fritz. Enhanced Stability of an L-Hydantoinase Mediated by Its Corresponding Polyclonal Antibody. *Biotechnol. Lett.*, 1994, **16** (4): 349—354
- 9 Siemann Martin, Syldatk Christoph, Wagner Fritz. Characterization of Serological Properties of Polyclonal Antibodies Produced Against Enzymes Involved in the L-Selective Cleavage of Hydantoin Derivatives. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **15** (1): 1—6
- 10 Zhang Yankun (张衍坤), Zhang Mingjun (张铭俊), Li Jinghua (李京华), Li Shuguang (李曙光), Yu Xingju (虞星炬). Kinetics of Enzymic Production of D-*p*-Hydroxyphenylglycine by *Pseudomonas putida* sp. 2262 Cell. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2000, **51** (1): 57—62
- 11 Wei Ping (韦萍). Study on Preparation of D-Amino Acids: [dissertation] (学位论文). Nanjing: Nanjing University of Technology, 2002. 117—141
- 12 Cecere F. Substrate and Steric Specificity of Hydroxypyrimidine Hydrolase. *FEBS Letters*, 1975, **57**: 192
- 13 Wang Jiazheng (汪家政), Fan Ming (范明). Protein Methods (蛋白质技术手册). Beijing: Science Press, 2001. 42—47
- 14 Lee Cheng-Kang, Fan Chia-His, Yang Pei-Fen. Modeling and Simulation of a Pressureswing Reactor for the Conversion of Poorly Soluble by Immobilized Enzyme: the Case of D-Hydantoinase. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, **7**: 233—239
- 15 Yan Sixu (颜思旭). The Principles and Methods of Enzymic Kinetics (酶催化动力学原理与方法). Xiamen: Xiamen University Press, 1987