

研究简报

海因酶法耦合原位分离技术制备 N-氨甲酰-D-苯丙氨酸

徐晓滢, 姚 忠, 马 哲, 刘 辉, 周 华, 韦 萍
(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

关键词: 固定化 D-海因酶; 固定床反应器; 原位分离; N-氨甲酰-D-苯丙氨酸

中图分类号: TQ 936.2

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 04-0980-07

Production of N-carbamoyl-D-phenylalanine by hydantoinase method coupled with *in situ* product removal

XU Xiaoying, YAO Zhong, MA Zhe, LIU Hui, ZHOU Hua, WEI Ping

(School of Pharmaceutical and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

Abstract: The purified D-hydantoinase was immobilized on EAH sepharose 4B *via* the carbodiimide method with a yield of enzyme activity up to 79.44%. The immobilized hydantoinase showed remarkable stability at 4°C. An integrated process of N-carbamoyl-D-phenylalanine (N-D-Phe) synthesis from D,L-5-benzylhydantoin (D, L-BH) catalyzed by immobilized D-hydantoinase coupled with an ion-exchange unit for *in situ* product removal (ISPR) was established. The variation of pH and conversion in the fixed-bed reactor with or without ISPR was compared at different temperatures, initial substrate concentrations and volumes of adsorbent. Within 24 h, the pH value in the reactor with ISPR could be kept at the alkaline range, which was beneficial to the enzymatic conversion and racemization of L-5-benzyl hydantoinase. This led to a higher overall conversion of 62.725% under optimal operation conditions, an increase of 89.3% compared with the fixed-bed reactor without ISPR.

Key words: immobilized D-hydantoinase; packed-bed reactor; *in situ* product removal (ISPR); N-carbamoyl-D-phenylalanine

引 言

D-氨基酸及其衍生物是化工、医药及食品领域的重要原材料^[1-2]。D-海因酶 (EC3.5.2.2, D-hydantoinase) 是海因酶法制备 D-氨基酸的关键酶, 可催化 5'-单取代海因或二氢尿嘧啶的开环,

形成氨甲酰类氨基酸产物, 进而经化学或酶促降解生成 D-氨基酸^[3] (见图 1)。在该联级反应中, D-海因是真正有效的底物, 而 D,L-海因的消旋则是一个重要的限速步骤^[3-4]。研究表明, L-海因的自发消旋需在较高的 pH 值和较高的温度下方能快速进行^[4-5], 而在实际转化体系中, 随着 N-氨甲酰氨

2006-06-28 收到初稿, 2006-08-29 收到修改稿。

联系人: 姚忠。第一作者: 徐晓滢 (1982-), 女, 硕士研究生。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2003CB7160004)。

Received date: 2006-06-28.

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

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2003CB7160004).

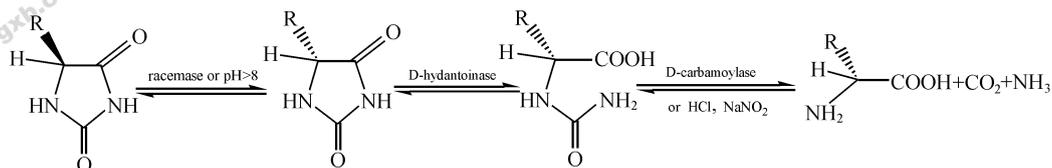


图1 海因酶法制备 D-氨基酸的工艺路线

Fig. 1 Conversion process for D-amino acid by hydantoinase method

基酸的不不断生成,体系 pH 值呈下降的趋势,这样不仅不利于海因酶的催化(海因酶的最适作用 pH 是 8~9^[4,6-8]),而且也不利于 L-海因的消旋^[4]。

因此,本研究采用 EAH sepharose 4B 为固定化载体,制备得到了性能稳定的固定化 D-海因酶,并在此基础上构建了填充床固定化酶反应器,同时串联了阴离子交换分离单元,形成了一个基于原位分离的固定化酶反应体系,以实现产物与底物的在线分离(又称“原位分离”, *in situ* product removal, 缩写为 ISPR^[9-10]),达到稳定转化系统的 pH 值,促进 L-海因的消旋,保持酶最适反应条件的目的,同时,也将推动反应平衡向产物生成的方向移动。

1 材料、仪器及方法

1.1 材料

D-海因酶,南京工业大学制药与生命科学学院自行发酵,经提取、纯化后得电泳纯。D,L-5-苄基海因(D,L-5-benzylhydantoin, D,L-BH, 纯度 $\geq 99\%$), *N*-氨基酰-D-苯丙氨酸(*N*-carbamoyl-D-Phenylalanine, *N*-D-Phe, 纯度 $\geq 99\%$),南京工业大学制药与生命科学学院自制。EAH sepharose 4B, DEAE sepharose FF (OH⁻), Phenyl Sepharose CL-4B, Amersham Pharmacia 公司。*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), Fluka 公司。三羟甲基氨基甲烷(Tris), 中国惠兴生化试剂有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

752N 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。ÄKTA™ prime 层析系统、ÄKTA™ FPLC 层析系统, Amersham Pharmacia 公司。125 型高效液相色谱恒流泵、166 型双管阵列检测器,美国 Beckman 公司。Shim-pack CLC ODS 色谱柱,日本岛津公司。SHZ88-1 往复式恒温水浴振荡器,太仓光明实验分析仪器厂。BT00-300M 恒流泵,

保定兰格恒流泵有限公司。HH-S 恒温水浴锅,江苏省金坛市正基仪器有限公司。

1.3 方法

- (1) D-海因酶的制备: 见文献 [6]。
- (2) 酶活性的分析方法: 见文献 [7]。
- (3) 酶活定义及酶活回收率计算^[11]

酶活(U)定义: 40℃、pH8.5 条件下, 30 min 内催化生成 1 μmol 产物时所需要的酶量称为一个酶活单位。

$$\text{酶活回收率} = \frac{\text{实际测定的固定化酶的总活力}}{\text{固定化时所用的全部游离酶的总活力}} \times 100\%$$

- (4) 蛋白浓度检测: Bradford 法^[12]。
- (5) 底物及产物 HPLC 分析方法: 见文献 [13]。保留时间分别为: *N*-D-Phe 4.05 min; D, L-BH 11.0 min。
- (6) 氨基载体 EAH sepharose 4B 上 D-海因酶的固定化: 经纯化的酶液用 0.1 mol · L⁻¹ pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至一定浓度, 取 50 ml 酶稀释液, 按固液比 1 : 8 (g : ml) 加入 EAH sepharose 4B 中, 缓慢滴加 2 ml 1.7 mol · L⁻¹ pH 5.0 的 EDC 溶液。4℃ 下 120 r · min⁻¹ 振荡 72 h 后, 用 2.5 倍于反应液体积的含 0.5 mol · L⁻¹ NaCl 的 0.1 mol · L⁻¹ pH8.5 Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 遍, 然后以 5 倍于反应液体积的 0.1 mol · L⁻¹ pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液冲洗, 4℃ 下保存^[8]。
- (7) 固定床酶反应器: 取 30U 的固定化酶填充至反应柱(1.6 cm × 25 cm XK column)中, 将 100 ml 一定浓度的 D, L-BH 溶液置于恒温水浴锅保温, 以恒流泵控制系统流速, 循环反应 24h, 酶柱用水浴夹套保温。如图 2 (a) 所示。
- (8) 固定床酶反应器耦合离子交换原位分离: 在固定床酶反应器后串联 DEAE sepharose FF (OH⁻) 阴离子交换柱, 如前法控制反应条件, 循环反应 24 h。如图 2 (b) 所示。
- (9) 转化率计算方法

$$\text{转化率} = \frac{\text{反应结束后的 } N\text{-D-Phe 生成量}}{\text{反应初始时的 BH 的量}} \times 100\%$$

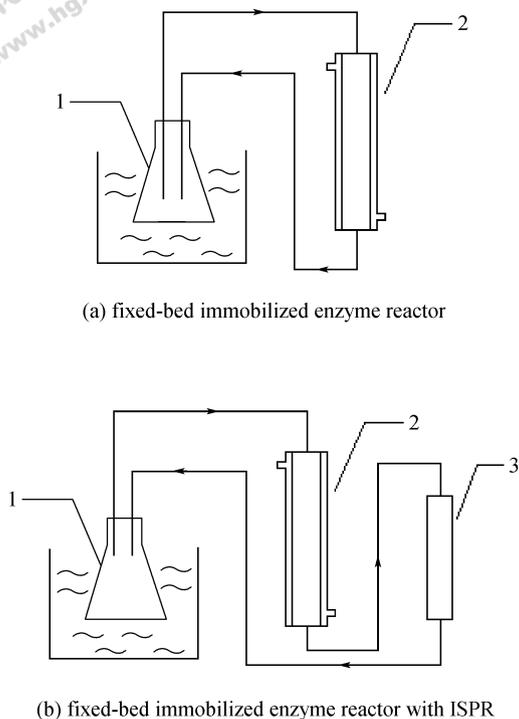


图 2 两种反应体系示意图

Fig.2 Schematic representation of two kinds of reaction system

- 1—substrate solution in thermostatic water bath;
- 2—immobilized enzyme column with jacket;
- 3—DEAE sepharose FF (OH⁻) anion-exchange column

注：反应结束后的 *N*-D-phe 生成量是指储液罐内、系统死体积中和 DEAE sepharose FF (OH⁻) 离子交换树脂洗脱所得的 *N*-D-phe 的量之和。

(10) 离子交换树脂对 *D,L*-BH 和 *N*-D-Phe 的选择性吸附与洗脱：配制 1 L 含 250 mg · L⁻¹ 的 *D,L*-BH、*N*-D-Phe 混合溶液，取 100 ml 置于 250 ml 的具塞三角瓶，分别以 2.0 mol · L⁻¹ 的 NaOH 调节 pH 至 6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10；称取经 0.5 mol · L⁻¹ NaOH 转型的 DEAE sepharose FF (OH⁻) 湿树脂 0.5 g，分别加入三角瓶中，置于摇床 120 r · min⁻¹、温度 25℃ 吸附，2 h 后取样用 HPLC 测定溶液中 *N*-D-Phe 和 *D,L*-BH 的含量，吸附量以差减法计算。

(11) DEAE sepharose FF (OH⁻) 阴离子交换柱上 *N*-D-Phe 的洗脱条件：使用 ÄKTA™ FPLC 层析系统，A 相为水，B 相为 1 mol · L⁻¹ NaCl，流速 2 ml · min⁻¹，洗脱梯度为 0~30%B，30 min，检测波长 214 nm。

2 结果与讨论

2.1 固定化 D-海因酶储存稳定性

本研究所用载体为 EAH sepharose 4B，固定化方法见 1.3 (6)，固定化酶活回收率为 79.44%，接近国外文献报道^[8]。固定化酶的储存稳定性测试结果见图 3，储存约 100 d，经 25 个批次转化后，固定化酶的活力仍可保持在初始酶活的 60% 以上，可以满足后续研究的需要。

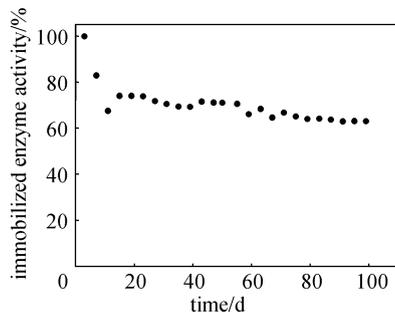


图 3 固定化 D-海因酶的储存稳定性

Fig.3 Storage stability of immobilized D-hydantoinase

2.2 离子交换树脂对 *D,L*-BH 和 *N*-Phe 的选择性吸附与洗脱

吸附的选择性是实现产物原位分离的关键。由图 4 可知，DEAE sepharose FF (OH⁻) 阴离子交换树脂在一个较宽的 pH 范围内对 *N*-D-Phe 和 *D,L*-BH 具有很好的选择性吸附特性，*N*-D-Phe 的吸附量远大于 *D,L*-BH 的吸附量。体系平衡后，对树脂进行梯度洗脱，在洗脱过程中仅得到一个洗脱峰（图 5），经 HPLC 检测，该洗脱峰仅含 *N*-D-Phe，不含 *D,L*-BH（图 6），表明该树脂在反应过程中仍具有很好的选择性。

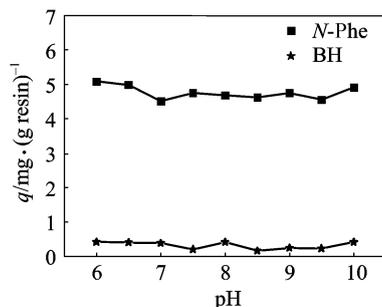


图 4 树脂对 *N*-D-Phe 和 *D,L*-BH 的吸附
Fig.4 Adsorption of *N*-D-Phe and *D,L*-BH

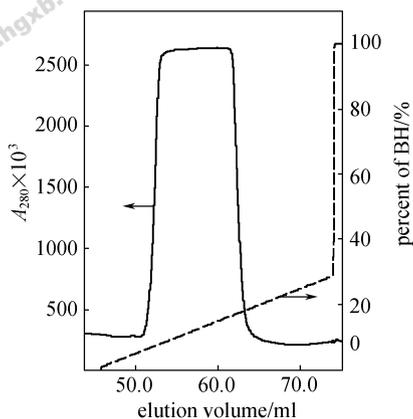


图 5 *N*-D-Phe 的洗脱

Fig. 5 Elution of *N*-D-Phe

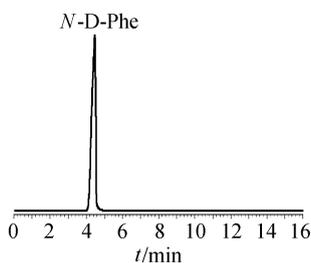


图 6 *N*-D-Phe 液相色谱图

Fig. 6 HPLC analysis of elution fraction

2.3 固定床与固定床耦合原位分离反应体系的性能比较

2.3.1 温度对不同反应体系性能的影响 在初始底物浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、底物溶液体积 100 ml 、流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 、离子交换柱柱床体积为 5 ml 时，考察水浴温度 30 、 35 、 40°C 条件下，不同反应体系中溶液 pH、底物质量分数的变化以及最终转化率，结果如图 7、图 8 和表 1 所示。

由以上结果可知，无论何种温度下，串联离子交换原位分离单元均可有效地提高底物转化率（表 1）。在反应初始阶段，底物浓度的降低速率较快，在接近初始浓度的 60% 左右时，降低速率减缓（图 8），这表明在转化初期 D-BH 被迅速转化生成 *N*-D-Phe，体系 pH 值也相应降低，当 D 型底物被大量消耗后，L 型底物的消旋速率缓慢成为限制反应速率的主要因素。当耦合 ISPR 单元后，由于酸性的产物被不断吸附于离子交换树脂，交换下来的 OH^- 可以保持体系 pH 在碱性范围内波动，有利于反应的进行^[14]；随着体系 pH 值的降低趋缓（图 7），碱性条件下 D,L-BH 的 5-位碳原子上的活泼氢容易解离形成碳负离子^[4]，L 型底物的消旋

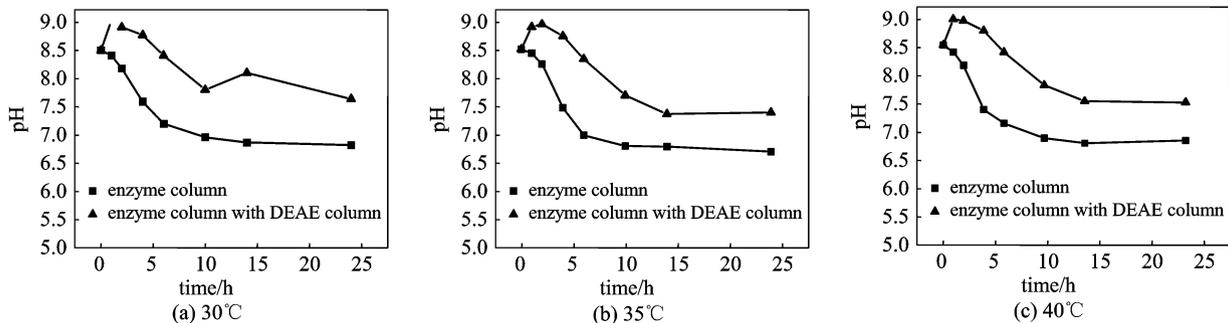


图 7 温度对 pH 的影响

Fig. 7 Effect of temperature on pH value

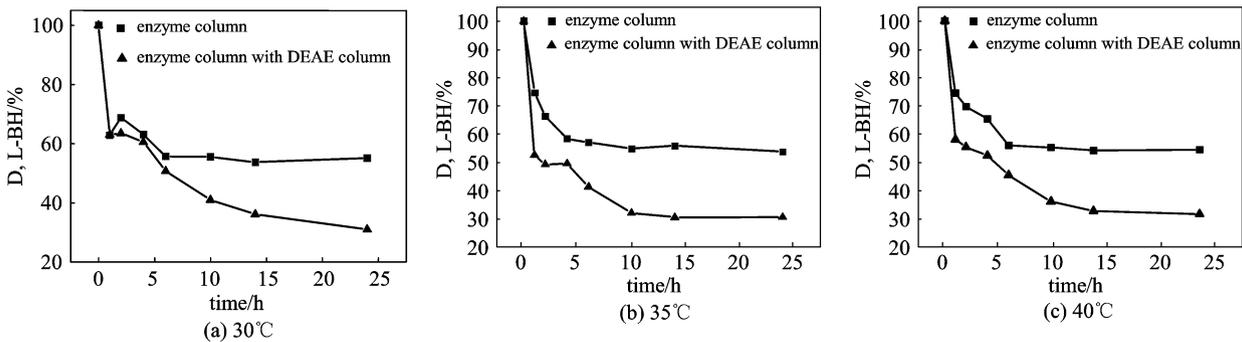


图 8 温度对 D,L-BH 转化率的影响

Fig. 8 Effect of temperature on conversion of D,L-BH

表 1 温度对转化率的影响

Table 1 Effect of temperature on conversion/%

30 °C packed-bed reactor	30 °C packed-bed reactor with ISPR	35 °C packed-bed reactor	35 °C packed-bed reactor with ISPR	40 °C packed-bed reactor	40 °C packed-bed reactor with ISPR
30.176	47.514	32.167	53.323	33.141	57.326

速率相应加快，使得反应平衡向产物生成方向移动，整体的转化效率得以提高。

在实验范围内，反应温度的变化对固定床酶反应体系的影响较小，但对于耦合 ISPR 体系而言，提高温度对转化率的促进作用明显，这可能是由于较高的温度对 L 型底物消旋的促进^[4]。

2.3.2 初始底物浓度对不同反应体系性能的影响

在水浴温度 40 °C、底物溶液体积 100 ml、流速 1 ml · min⁻¹、离子交换柱柱床体积为 5 ml 时，考察初始底物浓度 0.5、1 g · L⁻¹ 条件下，不同反应体系溶液中 pH、底物质量分数的变化以及最终转化率，结果如图 9、图 10 和表 2 所示。

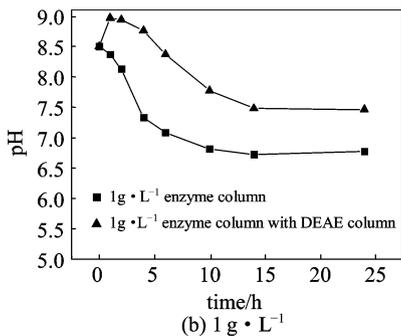
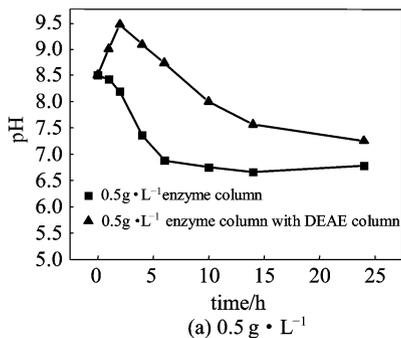


图 9 初始底物浓度对 pH 的影响
Fig. 9 Effect of original substrate concentration on pH value

由以上结果可知，在酶柱体积、离子交换柱体积、温度一定的情况下，在两种反应体系中，较低的初始底物浓度可获得较高的转化率。而固定床耦合 ISPR 同样可以显著提高底物转化率（表 2）。

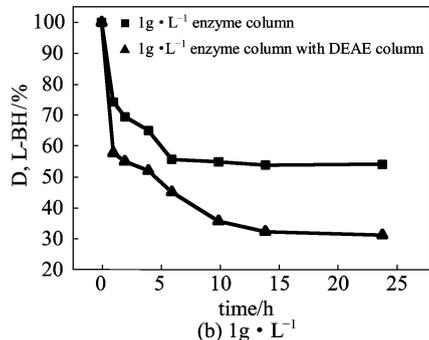
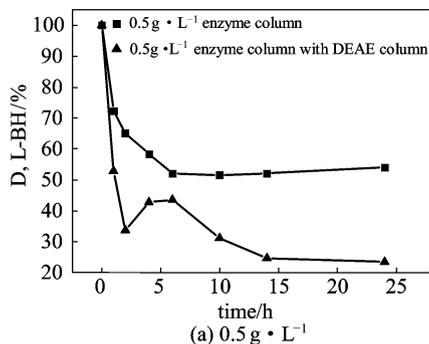


图 10 初始底物浓度对 D,L-BH 转化率的影响
Fig. 10 Effect of original substrate concentration on conversion of D,L-BH

表 2 初始底物浓度对转化率的影响

Table 2 Effect of original substrate concentration on conversion/%

0.5 g · L ⁻¹ packed-bed reactor	0.5 g · L ⁻¹ packed-bed reactor with ISPR	1 g · L ⁻¹ packed-bed reactor	1 g · L ⁻¹ packed-bed reactor with ISPR
34.520	60.567	33.141	57.326

2.3.3 离子交换柱柱床体积对不同反应体系性能的影响 离子交换单元在 ISPR 系统中起着至关重要的作用。本研究在 2.2 节中对在树脂选择性吸附性能评价的基础上，进一步考察了离子交换柱床体积对转化过程的影响。在水浴温度 40 °C、底物溶液体积 100 ml、流速 1 ml · min⁻¹、初始底物浓度 1 g · L⁻¹ 时，考察离子交换柱柱床体积分别为 2.5、5、7.5、10、15 ml 条件下，两种反应体系经 24 h 转化结束时溶液的 pH 和最终转化率。分

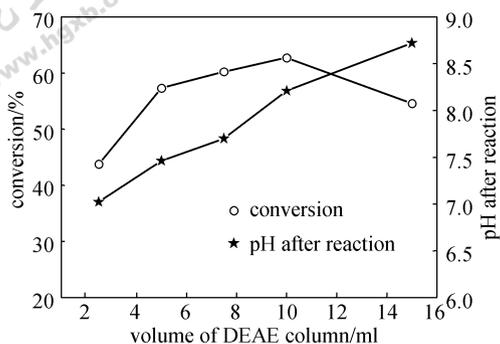


图 11 DEAE sepharose FF (OH^-) 柱床体积对转化率和反应结束后 pH 的影响

Fig. 11 Effect of volume of DEAE sepharose FF (OH^-) resin on conversion and pH after reaction

析结果见图 11。

由以上结果可知,在酶柱体积、底物浓度、温度一定的情况下,离子交换柱柱床体积对固定床耦合原位分离体系的转化率有很大的影响。随柱床体积的增大,转化率呈先上升后降低的趋势,而溶液的 pH 则表现为持续的升高。这是因为在柱床体积较小时,总交换容量低,其交换位点上几乎全部被 *N*-D-Phe 所饱和 (*N*-D-Phe 的交换吸附能力大于 D,L-BH),但柱床体积过小会造成体系中游离的 *N*-D-Phe 浓度较大,对 pH 值的控制不理想,这无论对消旋还是酶催化性能都是不利的,同时产物浓度过大也不利于反应平衡的移动^[15]。随着柱床体积的增大,体系中游离的产物浓度降低,其结果表现为反应终点时 pH 值的稳定增加和转化率的持续增加,当离交柱床体积为 10 ml 时,24 h 转化率可达 62.725%,较不串联 ISPR 体系的转化率提高了 89.3%。但柱床体积过大时,由于交换位点过量,一部分 D,L-BH 亦可吸附于树脂表面,造成体系中底物浓度的降低,反而不利于转化效率的提高。因此,针对特定酶转化体系的离子交换柱柱床体积优化将是十分重要的。

3 结 论

目前,海因酶法已经广泛应用于 D-对羟基苯甘氨酸、D-苯丙氨酸等重要医药、化工中间体的生产,但就其反应分离耦合方面的研究在国内外还是空白。本研究在实现高效 D-海因酶固定化的基础上,提出了利用耦合原位分离技术制备 *N*-氨甲酰-D-苯丙氨酸的方法,通过对反应条件的摸索,证实了该方法能有效提高混旋底物的生物转化,在

底物溶液浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,24 h 转化率可达 62.725%,较采用单一固定床酶转化体系的转化率提高了 89.3%。可以预见随着这一耦合系统催化模型的建立和优化,将为促进手性氨基酸制备技术的进步提供有益的借鉴。

References

- [1] Runser S M, Meyer P C. Purification and biochemical characterization of the hydantoin hydrolyzing enzyme from *Agrobacterium* species. A hydantoinase with no 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase activity. *European Journal of Biochemistry*, 1993, **213** (3): 1315
- [2] Syltatk C, Laufer A, Muller R, Hoke H. Production of optically pure D- and L- α -amino acids by bioconversion of D, L-5-monosubstituted hydantoin derivatives. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 1990, **41**: 31
- [3] Li Jiahuang (李家璜), Wei Ping (韦萍), Yao Zhong (姚忠), Zhou Hua (周华), Ouyang Pingkai (欧阳平凯). Kinetics for production of D-*N*-carbamoylphenylalanine on conversion process. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2004, **55** (4): 629
- [4] Yao Zhong (姚忠), Guo Feng (郭峰), Li Jiahuang (李家璜), Tu Chunyan (屠春燕), Wei Ping (韦萍), Ouyang Pingkai (欧阳平凯). Study on the racemization of 5-substituted hydantoin in the bioconversion of hydantoin catalyzed by hydantoinase. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* (高校化学工程学报), 2002, **16** (6): 675
- [5] Wei Ping (韦萍), Yao Zhong (姚忠), Li Jiahuang (李家璜), Ouyang Pingkai (欧阳平凯). Enzymatic catalysis dynamics of preparation of D-phenylalanine. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2004, **55** (5): 764
- [6] Yao Zhong (姚忠), Zhu Kai (竺凯), Zhou Hua (周华), Wei Ping (韦萍). Ratio of hydantoinase and *N*-carbamoylase: key to preparation of D-amino acid from 5-monosubstituted hydantoin. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2005, **56**: 148
- [7] Ma Zhe (马哲), Yao Zhong (姚忠), Zhu Kai (竺凯), Xu Xiaoying (徐晓滢), Wei Ping (韦萍). Immobilization of hydantoinase from *Burkholderia cepacia* 1003. *Journal of Nanjing University of Technology* (南京工业大学学报), 2005, **27** (6): 21
- [8] Kerstin Ragnitz, Markus Pietzsch, Christoph Syltatk. Immobilization of the hydantoin cleaving enzymes from *Arthrobacter aureus* DSM 3747. *Journal of Biotechnology*, 2001, **97**: 179
- [9] Freeman A, Woodley J M, Lilly M D. *In situ* product removal as a tool for bioprocessing. *BioTechnology*, 1993, **11** (9): 1007
- [10] Lye G J, Woodley J M. Application of *in-situ* product

- removal techniques to biocatalytic processes. *Trends Biotechnol.*, 1999, **17** (10): 395
- [11] Qi Yizheng (戚以政), Wang Shuxiong (汪叔雄). *Biochemical Reaction Kinetics and Reactor* (生化反应动力学与反应器). Beijing: Chemical Industry Press, 1999: 11
- [12] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248
- [13] Song Huimin (宋慧敏), Tu Chunyan (屠春燕), Ouyang Pingkai (欧阳平凯). Determination of D-phenylalanine in enzymatic reactants with HPLC. *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), 2005, **24** (2): 95
- [14] Hong Li, Roberta Mustacchi, Christopher J Knoeles, Wolfgang Skibar, Garry Sunderland, Ian Dalrymple, Simon A Jackman. An electrokinetic bioreactor: using direct electric current for enhanced lactic acid fermentation and product recovery. *Tetrahedron*, 2004, **60**: 655
- [15] Pik Leng Wong, Amber J Royce, Carolyn W T Lee-Parsons. Improved ajmalicine production and recovery from *Catharanthus roseus* suspensions with increased product removal rates. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **21**: 253