

氨基酰化酶的固定化和苯丙氨酸消旋体的拆分

韩际宏* 姜 坪 何炳林

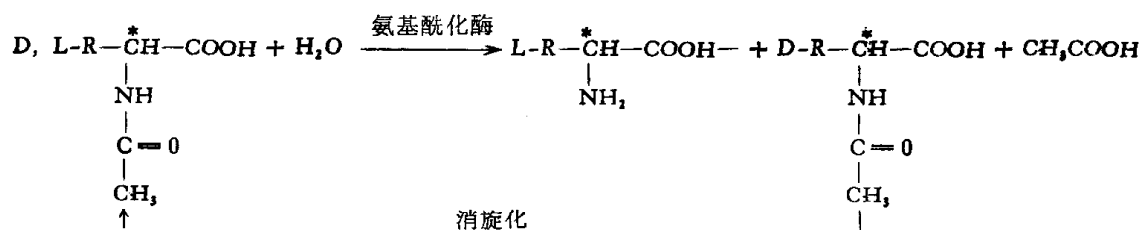
(南开大学高分子化学研究所, 天津 300071)

摘 要

本文合成了一种功能高分子材料, 利用其适宜的物理性质和匹配的功能基来固定氨基酰化酶, 并进行苯丙氨酸消旋体的拆分。研究表明: 这种载体对氨基酰化酶蛋白固定容量大, 固定化酶比活力高, 活力损失小。本文系统地研究了氨基酰化酶拆分苯丙氨酸消旋体的理化性质, 包括温度、pH、离子浓度、热稳定性、激活离子、底物浓度以及蛋白变性剂等, 并进行苯丙氨酸消旋体的连续拆分, 对拆分产物采用离子交换法进行分离精制, 真空浓缩得到 L-苯丙氨酸的盐酸盐, 产率高, 对产品进行旋光检验, 纯度高。

关键词: 氨基酰化酶, 固定化, 苯丙氨酸消旋体, 拆分

氨基酰化酶专一地催化以下水解反应^[1]:



利用这一反应, 可以将 L-氨基酸从其外消旋混合物中分离出来。

L-苯丙氨酸为必须氨基酸, 动物体内本身不能合成, 因而 L-苯丙氨酸在医疗、保健、食品以及科研工作等方面具有重要应用价值。用合成法制得的 D, L-苯丙氨酸消旋体可以采用固定化酶法进行拆分, 方法简单, 成本低, 易于工业化。

一、实 验

1. 试剂

N-乙酰 D, L-苯丙氨酸 (N-Ac-D, L-Phe), 工业品, 津北生化制药厂生产, 使用前重结

本文 1989 年 8 月 14 日收到, 1990 年 5 月 4 日收到修改稿。

* 联系人: 通讯地址: Dept. of Biochem., Cornell Univ., Graduate School of Medical Sciences, NY, NY 10021, USA.

晶; D370 弱碱阴离子交换树脂和 001 × 7 强酸阳离子交换树脂是南开大学化工厂产品。其它试剂皆为分析纯。

2. 氨基酰化酶的提取

1kg 米柚霉 3042 菌种培养的种曲, 加入 6000ml, pH7.0, 0.05mol/L 的磷酸钠缓冲溶液, 室温下搅拌 1.5h, 抽提菌体中的蛋白质抽提液冷冻离心, 上层清液加入硫酸铵搅拌进行分级沉淀, 收集 40—60% 饱和度的沉淀分级. 用 0.1mol/L, pH7.0 的磷酸钠缓冲溶液复溶, 再冷冻离心, 收集上层清液, 用 Sephadex-G25 柱脱去上层清液中的硫酸铵, 得到氨基酰化酶溶液(自由酶)。

3. 氨基酰化酶活力的测定

0.2ml 自由酶稀释液和 0.2ml, 0.1mol/L, pH7.0 的磷酸钠缓冲溶液混合, 然后加入 0.2ml, 0.1mol/L N-Ac-D,L-Phe 溶液, 于 37℃ 下进行水解反应 30min 后, 加入 1ml 2mol/L, pH 5.4 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中止水解反应, 再加入 0.5ml, 5% 茚三酮乙醇溶液, 100℃ 沸水浴中显色 15min, 以流水冷却, 加入 10ml 60% 乙醇水溶液, 摇匀后于 570nm 处测其消光值, 由标准曲线获得水解释放出的 L-苯丙氨酸(L-Phe)量, 计算出自由酶的活力为 416.4 units/ml。

活力单位定义为: 1h 水解反应释放出 1 μ mol L-Phe 为 1 活力单位 (unit), 即 1unit = 1 μ mol/h。

4. 酶蛋白的定量分析

采用 Folin-酚试剂法 (Lowry 法)^[2], 测得酶蛋白浓度为 25.16mg/ml, 计算出自由酶的比活力为 16555 units/g protein。

5. 固定化酶的制备

高分子载体 (Polymeric Support, 缩写为 PS) 经过处理后, 装入玻璃柱中, 按给酶量 12000units/g PS 加入适量的自由酶, 由蠕动泵注入循环吸附 10 h, 然后用 0.1mol/L, pH 7.0 的磷酸钠缓冲溶液洗至无蛋白流出, 得到固定化酶. 分别测定吸附前后自由酶的活力与蛋白质浓度, 计算出载体的蛋白固定容量为 294mg protein/g PS, 吸附活力为 4603 units/g PS。

6. 固定化酶活力的测定

0.1g 左右的固定化酶加入已在 37℃ 下恒温的 20ml 0.1mol/L, pH 7.0 的磷酸钠缓冲溶液和 10ml 0.1mol/L N-Ac-D, L-Phe 溶液, 37℃ 下振荡水解 30min 吸取上层清液, 稀释至一定倍数, 用茚三酮显色法测定水解释放的 L-Phe 量, 按照酶活力定义, 计算出固定化酶的比活力为 2524units/gPS, 活力回收率(=比活力/吸附活力)为 54.8%。

7. 拆分产物的分离精制^[3]

在拆分水解液中存在多种化合物, 采用离子交换树脂的方法分离出 L-Phe, 并用真空浓缩办法制得 L-苯丙氨酸盐酸盐固体。

二、结果与讨论

1. 氨基酰化酶的理化性质

(1) 温度、pH 值、离子浓度对酶活力的影响 固定其他条件, 在不同温度下分别进行固定化酶和自由酶催化 N-Ac-D, L-Phe 的水解反应, 测量释放的 L-Phe 量, 计算出不同

温度下固定化酶和自由酶的比活力,以最高比活力为 100%,计算出不同温度下的相对比活力。从表 1 中可知,自由酶和固定化酶的最适温度分别为 65℃和 60℃,在最适温度前,随温度的升高,底物的内能增加,加快了水解反应速度。高于最适温度后,由于蛋白的热变性使活力下降,但固定化酶下降慢,表明其酶蛋白构象稳定性增强。

同样在不同 pH 值下,固定化酶和自由酶的相对比活力也有很大变化。pH 值影响酶或底物的离解和底物的极性基团,固定化酶和自由酶的最适 pH 分别为 7.0 和 8.5,固定化酶的 pH 范围变宽。在 pH = 11.5 时,由于蛋白变性使自由酶彻底失活,但固定化酶仍保持 50% 的活力,表明酶固定化后, pH 对其构象的影响减小。

反应介质中的离子浓度影响到介质同酶蛋白分子之间的作用力,对维持酶的某一构象起重要作用。自由酶在磷酸缓冲溶液浓度为 0.025mol/L 时活力最高,而固定化酶为 0.050mol/L,表明维持酶蛋白最适宜构象的离子作用力在酶固定后增强。

(2) 酶的热稳定性 温度会改变酶蛋白分子内部的高度规则性的空间排列,因而会影响酶的活力。

自由酶和固定化酶中加入在一定温度下恒温的 0.1 mol/L, pH7.0 的磷酸钠缓冲溶液,并在该温度下保持 10min 后迅速冷却,再于 37℃ 下测经热处理后自由酶和固定化酶残留活力,得到自由酶和固定化酶的热稳定性曲线(图 1)。从图中看出,固定化酶的热稳定性较好,因此可以在较高温度下进行 N-Ac-D, L-Phe 的水解反应。

(3) Co^{2+} 对酶活力的影响^[4] Co^{2+} 是氨基酰化酶的激活离子。以外加 Co^{2+} 为零的酶比活力为 100%,测量不同 $[\text{Co}^{2+}]$ 存在下自由酶和固定化酶的相对比活力(图 2)。二者的差别很明显, Co^{2+} 对固定化酶的激活作用要远大于自由酶。由于 Co^{2+} 离子同酶非活性基团的络合作用,稳定了酶的活性构象,从而起到了激活。但当 $[\text{Co}^{2+}]$ 高出一定值后,由于过多的 Co^{2+} 离子可能与活性部位形成络合作用而封闭了酶活性点同底物的结合,在这种情况下,酶的活力开始下降,因此在 $[\text{Co}^{2+}]$ 值较大时, Co^{2+} 离子对自由酶几乎无激活作用,对固定化酶的激活作用也明显下降。

(4) 底物浓度的影响 所加底物大大过量,水解反应时间也被缩短成 10min,这样,在中止反应时,反应前后底物浓度不发生明显的变化。测得了氨基酰化酶催化反应的初始速度。从图 3 可以看出:自由酶存在明显的底物抑制现象,而固定化酶却与之相反,存在底物激活作

表 1 温度、pH 值、离子

条件 相对比活力 (%)	温 度 (°C)*							6.0	7.0
	37	45	53	60	65	70	75		
自由酶	27.6	43.1	68.7	89.6	100	47.5	23.4	63.2	82.0
固定化酶	64.8	81.7	91.5	100	95.4	85.3	65.5	59.6	100

* 底物混合液: 0.033 mol/L N-Ac-D, L-Phe + 0.067mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 + 5×10^{-4} mol/L,

** 底物混合液: 0.033 mol/L N-Ac-D, L-Phe + 0.067mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 + 5×10^{-4} mol/L Co^{2+} ,

*** 底物混合液: 0.033 mol/L N-Ac-D, L-Phe + pH7.0 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 + 5×10^{-4} mol/L Co^{2+} , 温度:

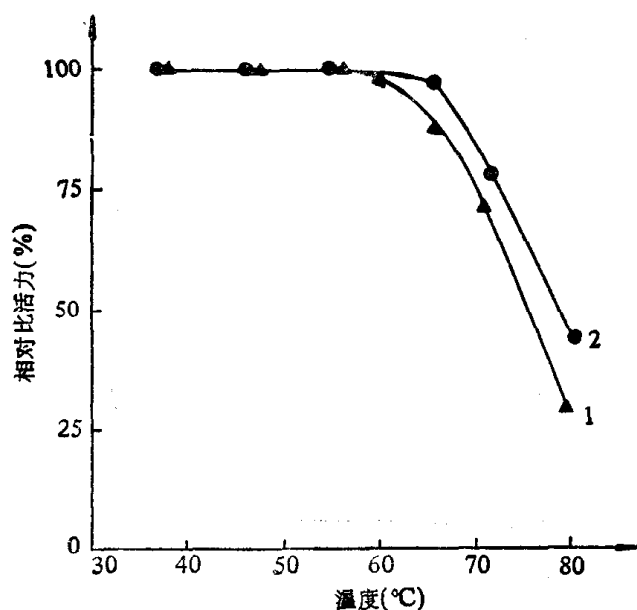
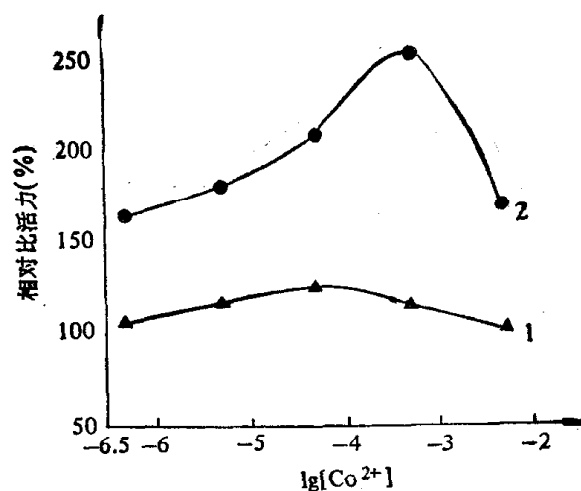


图 1 氨基酰化酶的热稳定性

(1——自由酶, 2——固定化酶;

底物混合液: 0.033 mol/L N-Ac-D, L-Phe + 0.067 mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 + 5×10^{-4} mol/L Co^{2+})

图 2 Co^{2+} 对氨基酰化酶拆分 D,L-Phe 活力的影响

(1,2 说明同图 1;

底物混合液: 0.033 mol/L N-Ac-D, L-Phe + 0.067 mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 + Co^{2+} , 温度: 37°C)

用。这说明,一方面,由米糙霉种曲得到的氨基酰化酶催化动力学过程不符合米氏方程¹⁾;另一方面,氨基酰化酶在固定化前后,反应机理有很大的变化。

(5) 变性试剂的作用 盐酸胍、尿素和十二烷基磺酸钠能同酶蛋白分子争夺氢键,引起蛋白质分子中的氢键破坏,SH 基露出,使蛋白分子构象发生变化产生变性作用,导致酶活力改变。

在固定化酶中加入不同浓度的变性试剂,置于 37°C 下保持 40min,然后洗净变性试剂,再测量经过变性后固定化酶残留的活力(表 2)。从表中看出,三种变性试剂的作用不完全一致,固定化酶经盐酸胍和尿素变性后,其活力明显下降,表明盐酸胍和尿素的存在破坏了酶蛋白拆

浓度对氨基酰化酶

pH**					离子浓度(mol/L)***						
7.5	8.5	9.5	10.5	11.5	0	0.025	0.050	0.100	0.200	0.500	1.000
90.7	100	91.6	76.2	0.0	93.1	100	63.3	40.7	33.2	20.0	11.5
91.5	79.9	70.7	58.5	49.4	82.4	84.9	100	88.1	81.1	77.3	54.8

Co^{2+} .

温度: 37°C.

37°C.

1) 姜坪, 博士毕业论文, 南开大学, 天津, 1987.

表 2 变性试剂对固定化酶拆分 D, L-Phe 活力的影响

试剂	盐酸胍 (mol/L)						尿素 (mol/L)						十二烷基磷酸钠(%)					
浓度	0	0.25	0.50	1.00	2.00	3.00	0	0.25	0.50	1.00	3.00	6.00	0	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00
相对比活力*(%)	100	86.9	83.5	73.3	69.7	23.1	100	67.0	61.9	58.9	44.2	41.9	100	113.0	119.7	130.8	108.6	105.2

* 底物混合液: 0.033mol/L N-Ac-D, L-Phe + 0.067mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 — Na_2HPO_4 + 5×10^{-4} mol/L Co^{2+} . 温度: 37°C.

分 D,L-Phe 的最适宜构象, 产生失活作用; 相反地, 十二烷基磷酸钠则促使固定化酶蛋白向高活性构象转变, 在 0.25% 时呈最高活性。

2. 连续拆分与产物分离精制

(1) 连续拆分 用制备的固定化酶装柱进行 N-Ac-D, L-Phe 的连续拆分, 经过 50 天的连续运行, 酶柱仍保持很高的活性(图 4)。表明固定化酶蛋白固定牢固, 稳定性好, 使用周期长。

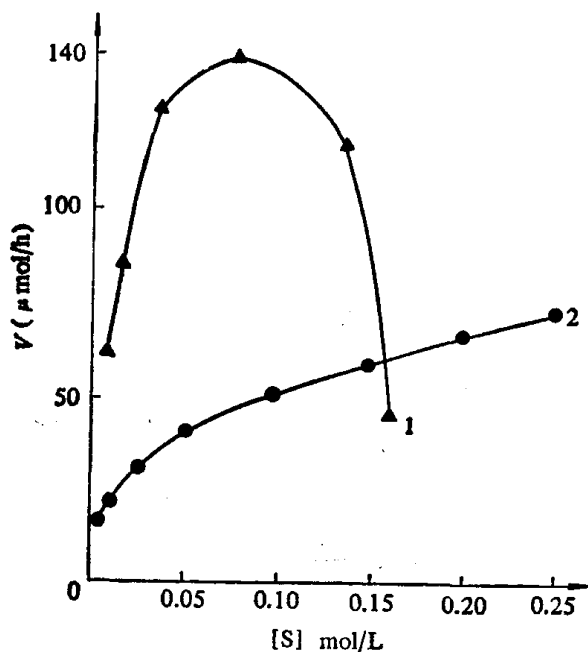


图 3 底物浓度对氨基酸化酶拆分 D, L-Phe 活力的影响

(1,2 说明同图 1;

底物浓度: 0.067mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 — Na_2HPO_4 + 5×10^{-4} mol/L Co^{2+} + N-AC-D, L-Phe, 温度: 37°C)

(2) 产品的分离精制 拆分后的产物混合液, 存在 L-Phe, N-Ac-D-Phe, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 及少量的氯化钴 (CoCl_2), 采用离子交换法分离出 L-Phe。

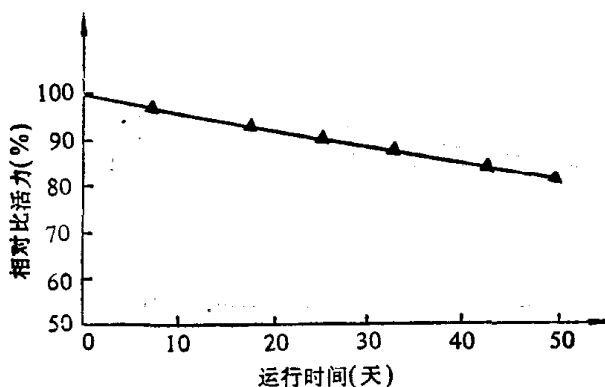


图 4 连续拆分稳定性

(底物混合液: 0.033 mol/L N-Ac-D, L-Phe + 0.067 mol/L, pH7.0 Na_2HPO_4 — Na_2HPO_4 + 5×10^{-4} mol/L Co^{2+} , 拆分柱: $\phi 1.0 \times 13.5$ (cm); 固定化酶: 1.5g, 流速: 20ml/h; 温度: 37°C)

调拆分液的 pH 至 L-Phe 的 pK_{a1} (1.83), 这样, L-Phe 呈等量的两性离子和阳离子存在, 但 N-Ac-D-Phe 为中性分子, 拆分液通过 001 $\times$ 7 强酸阳离子交换柱, L-Phe 以及 Na^+ 等阳离子被交换到树脂上, 再用适当浓度的盐酸将 L-Phe 洗脱下来。

图 5 为拆分液同 001 $\times$ 7 树脂的饱和交换曲线, L-Phe 同树脂的亲核能力较强, 交换母液中, $[\text{L-Phe}]:[\text{Na}^+] = 1:12$, 对曲线与虚线围成部分积分计算出交换到树脂上的 $[\text{L-Phe}]:[\text{Na}^+] = 1:1.9$, L-Phe 在树脂上得到富集, L-Phe 的交换量可达到理论交换值的 34.26%。

用盐酸将 L-Phe 从 001 $\times$ 7 树脂上洗脱下来, 图 6 为不同浓度盐酸的洗脱曲线。随盐

酸浓度的提高, 洗脱峰高移, 峰值增大。由于 L-Phe 同树脂的亲核能力较强, 导致峰的拖尾现象较严重。

洗脱液由 L-Phe, NaCl 及 HCl 组成, 对洗脱液真空浓缩除去大部分 HCl。复溶后, 再用氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 L-Phe 的 $pK_{c2}(9.13)$, 使 L-Phe 以等量的两性离子与

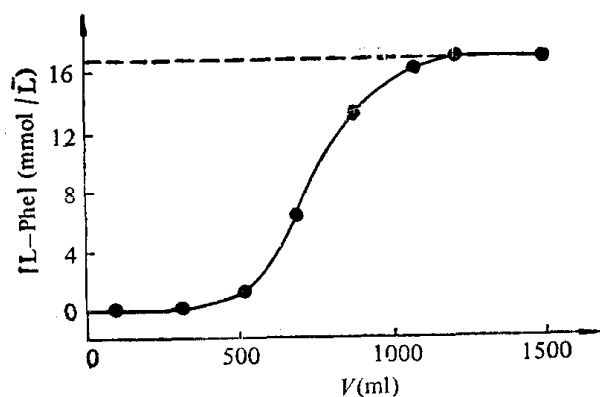


图 5 L-Phe 同 001×7 树脂的饱和交换曲线
(交换柱体积: 25ml, 交换容量: 1.65 mg 当量/ml 树脂,
V: 流出液体积, 流速: 100ml/h, 交换母液中:
[L-phe] = 16.66mmol/L)

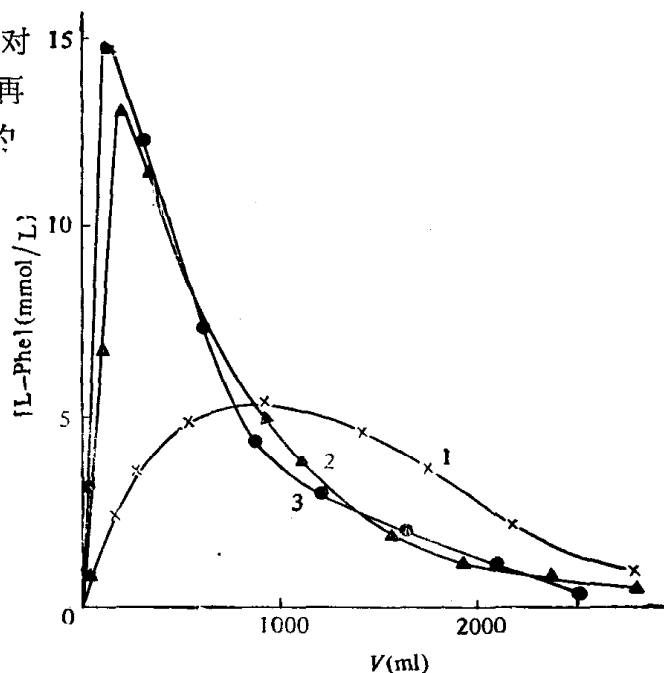


图 6 L-Phe 从 001×7 树脂上洗脱曲线
(1—1N HCl, 2—2N HCl, 3—3N HCl,
洗脱剂: 盐酸, V: 洗脱液体积, 洗脱速度: 320ml/h,
[L-phe]: 洗脱液中 L-phe 浓度, 交换柱: 80ml)

阴离子存在, 再同 D370 弱碱阴离子树脂交换, L-Phe 被交换到树脂上, NaCl 则流出被除去。最后用 0.5N HCl 将 L-Phe 从 D370 树脂上洗脱下来, 并真空浓缩得到 L-Phe 盐酸盐。

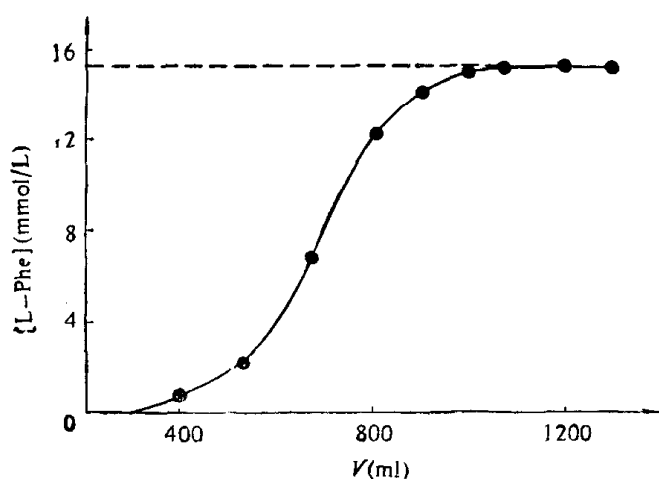


图 7 L-Phe 同 D370 树脂的饱和交换曲线
(交换柱体积: 100ml, 交换容量: 1.35 mg 当量/ml 树脂,
V: 流出液体积, 流速: 300ml/h, 交换母液中:
[L-Phe] = 15mmol/L)

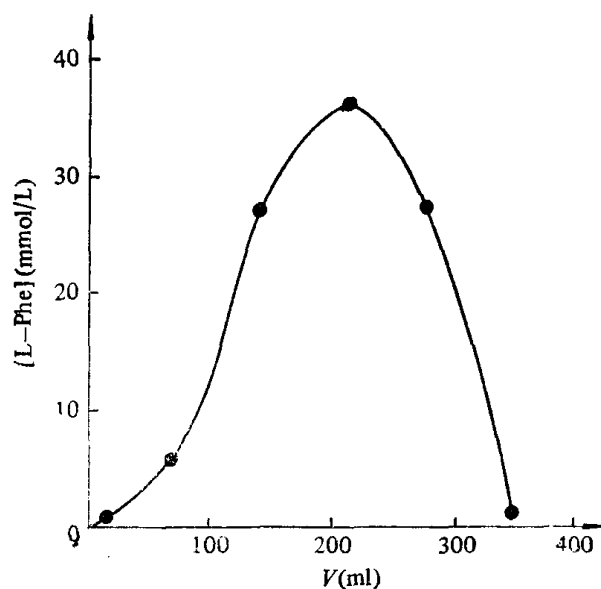


图 8 L-Phe 从 D370 树脂洗脱曲线
(洗脱剂: 0.5NHCl 溶液, V: 洗脱液体积, 洗脱速度:
300ml/h, 交换柱: 100ml. [L-Phe]: 洗脱液中
L-Phe 浓度)

图 7 为 L-Phe 同 D370 弱碱阴离子树脂的饱和交换曲线,对曲线与虚线部分积分,计算出 L-Phe 同树脂的交换量只达到树脂理论交换量的 5.76%,表明 L-Phe 同 D370 树脂的亲核能力较弱,因而很容易被盐酸从树脂上洗脱下来,图 8 为 L-Phe 从 D370 树脂上用 0.5N 盐酸洗脱的曲线。从曲线上看出没有拖尾现象。

经过两次树脂交换的 L-Phe 溶液真空浓缩制得 L-Phe 盐酸,进行旋光检验,其比旋光度为 -35 ± 1 ($C = 1.9$, H_2O , $25^\circ C$ 钠光)。产率为 71.6%,展示了良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Birnbaum, S. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **19**(1952), 445.
- [2] 张龙翔等,生化实验方法与技术,高等教育出版社,1981,164.
- [3] Plummer, D. T., 吴翠译,实用生物化学导论,科学出版社,1985,74.
- [4] Rao, K. R. et al., *J. Biol. Chem.*, **19**(1952), 507.
- [5] Tosa, T. et al., *Enzymologia*, **40** (1971), 49.