

固定化 D-氨基酸氧化酶催化 DL-氨基酸去消旋化 制备非天然 L-氨基酸

徐红梅, 夏仕文¹⁾, 何从林

(重庆邮电大学 生物信息学院, 重庆 400065)

摘 要: 在过氧化氢酶和氧气存在下, 固定化 D-氨基酸氧化酶(D-AAO)对映选择性催化 DL-氨基酸中的 D-对映体氧化脱氨为相应酮酸, L-对映体保留. 研究了 D-AAO 的底物特异性并对反应条件进行了优化. 结果表明: D-AAO 具有较宽的底物谱, 能够催化疏水性 α -氨基酸的 D-对映体氧化脱氨. 在最优反应条件下, D-AAO 催化 DL-2-氨基丁酸、DL-2-氨基戊酸去消旋化, L-2-氨基丁酸、L-2-氨基戊酸的收率分别为 48% 和 47%, ee 分别为 99.5% 和 99.8%. 进一步地利用 Pd-C/HCOONH₄ 催化氧化脱氨过程中产生的亚氨基酸原位还原, 有效提高了 L-2-氨基丁酸、L-2-氨基戊酸的收率并保持高的光学纯度.

关 键 词: 固定化 D-氨基酸氧化酶; 过氧化氢酶; 氧化脱氨; DL-氨基酸; 非天然 L-氨基酸

中图分类号: Q814.1; O643.3

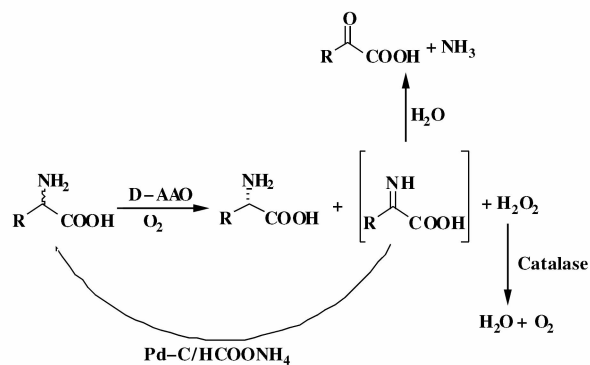
文献标识码: A

非天然 L-氨基酸是手性药物、农业化学品和材料的重要中间体, 不能通过发酵获得. 酶催化具有立体选择性高、反应条件温和、环境友好等特征, 是合成对映纯非天然 L-氨基酸极为有用的方法. 目前大量具有商业价值的非天然 L-氨基酸是用酶法制备的^[1]. 其中, 外消旋体的酶催化动力学拆分是合成非天然 L-氨基酸的一个最成功的策略, 涉及的酶主要有酰化酶、水解酶等, 通过 DL-氨基酸酰胺或酯的对映选择性水解, 获得非天然 L-氨基酸^[2].

D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, D-AAO)在分子氧作用下, 特异地催化 D- α -氨基酸氧化为 α -亚氨基酸(过渡态), α -亚氨基酸随后自动水解为 α -酮酸和氨, 同时释放出过氧化氢. 基于 D-AAO 的催化特性, 已成功用于半合成头孢菌素关键母核 7-氨基头孢霉烷酸(7-ACA)的工业生产以及酮酸的制备和氨基酸的拆分. D-AAO 和化学还原剂的组合体系能够将氧化脱氨过程中形成的过渡态 α -亚氨基酸原位转化为 DL-氨基酸, 从而实现 DL-氨基酸的去消旋化, 提高非天然 L-氨基酸的收率. 在这些工作中, 猪肾 D-AAO 和 NaBH₄、NaCNBH₃、Pd-C/HCOONH₄ 等化学还原剂的组合得到了较多的

研究^[3-6], 对源于变异三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)的固定化 D-AAO 在制备非天然 L-氨基酸方面的研究相对较少.

我们在研究固定化 D-AAO(*Trigonopsis variabilis*)底物特异性的基础上, 通过反应条件的优化, 利用固定化 D-AAO 体系和固定化 D-AAO/Pd-C/HCOONH₄ 体系催化 DL-氨基酸去消旋化, 高收率制备对映纯 L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸(示图 1).



图示 1 D-氨基酸氧化酶(D-AAO)催化 DL-氨基酸去消旋化
Scheme 1 Deracemization of DL-amino acids using
D-amino acid oxidase(D-AAO)

收稿日期: 2012-01-30; 修回日期: 2012-02-25.

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC, 2008BB5082) .

作者简介: 徐红梅, 女, 生于 1977, 硕士, 讲师.

1) 通讯联系人, E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn.

1 实验部分

1.1 实验材料

固定化 D-氨基酸氧化酶(50 u/g, 湖南福来格生物技术有限公司), 过氧化氢酶(50 000 u/mL, 枣庄市杰诺生物酶有限公司), D-氨基酸(D-2-氨基丁酸、D-2-氨基戊酸、D-2-氨基己酸、D-2-氯苯丙氨酸、D-4-氯苯丙氨酸、D-2-氯苯甘氨酸、D-4-氟苯甘氨酸、D -2-氨基戊二酸)、DL-氨基酸(DL-2-氨基丁酸、DL-2-氨基戊酸)均为实验室自制, 2-丁酮酸、丙酸、钨碳(5%)、甲酸铵等为市售化学纯或分析纯试剂.

1.2 实验方法

1.2.1 分析方法 2-丁酮酸、丙酸采用 HPLC 测定, 外标法定量. 色谱柱: C18 柱(4.6 × 150 mm, 5 μ), 流动相: 10 mmol/L 乙酸钠(pH 3.5)/甲醇(80:20, v/v), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 214 nm, 温度: 25 ℃. 底物转化率和产物对映体过量(ee)采用手性 HPLC 测定. 手性柱: Crownpak CR (+)(4 × 150 mm, 5 μ), 流动相: 高氯酸溶液(pH 1.3), 流速: 0.5 mL/min, 检测波长: 200 nm, 温度: 25 ℃. $ee = (L-D)/(L+D) \times 100\%$, 转化率 = $(L-D)/(2 \times L) \times 100\%$, 式中 L, D 均以峰面积计量.

1.2.2 底物特异性和活性测定 采用文献[7]的改进方法测定底物特异性和活性. 20 mmol D-氨基酸, 0.08 mmol 邻联茴香胺和 1 000 u 过氧化氢酶溶于 100 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH 8.0), 加入 2 g D-AAO, 通入氧气(0.1 vvm), 30 ℃下反应 2 h. 采用分光光度法测定反应液 540 nm 下的吸光度, 利用过氧化氢校正曲线计算反应液中过氧化氢浓度和酶活性.

1.2.3 D-AAO 催化 DL-氨基酸去消旋化 0.1 mol DL-氨基酸(10.3 g DL-2-氨基丁酸, 11.7 g DL-2-氨基戊酸)溶于 100 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH 8.0), 加入 20 g(1 000 u)固定化 D-AAO 和 0.2 mL(10 000 u)过氧化氢酶, 通入 O₂(0.1 vvm), 30 ℃下搅拌反应, 手性 HPLC 监测反应过程直至 D-氨基酸完全消失. 过滤, 滤液用浓盐酸酸化至 pH 2~3, 减压浓缩至干, 残余物中加入 25 mL 无水乙醇, 过滤除去无机盐, 滤液中加入 3.5 mL 环氧丙烷, 室温下搅拌 30 min, 过滤, 固体用无水乙醇洗涤, 烘干, 手性 HPLC 测定 ee.

1.2.4 D-AAO/Pd-C/HCOONH₄ 催化 DL-氨基酸去消旋化 0.1 mol DL-氨基酸(10.3 g DL-2-氨基丁酸, 11.7 g DL-2-氨基戊酸)溶于 100 mL 甲酸铵溶液中(pH 6.5), 加入 20 g(1 000 u)固定化 D-AAO, 10 g Pd/C(5%)和 0.2 mL(10 000u)过氧化氢酶, 通入 O₂(0.1 vvm), 30 ℃下搅拌反应. 手性 HPLC 监测反应过程直至 D-氨基酸完全消失. 过滤, 滤液用浓盐酸酸化至 pH 2~3, 减压浓缩至干, 残余物中加入 50 mL 无水乙醇, 过滤除去无机盐, 滤液中加入 7 mL 环氧丙烷, 室温下搅拌 30 min, 过滤, 固体用无水乙醇洗涤, 烘干, 手性 HPLC 测定 ee.

2 结果与讨论

2.1 固定化 D-氨基酸氧化酶底物特异性

D-氨基酸氧化酶具有高度的底物特异性, 只接受 D-α-氨基酸, 不接受 L-α-氨基酸作为反应底物. 对源于变异三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)的固定化 D-AAO 的底物特异性进行研究, 发现该酶具有较宽的底物谱, 能够催化疏水性 α-氨基酸的 D-对映体氧化脱氨, 尤其是对直链 D-α-氨基酸如 D-2-氨基丁酸、D-2-氨基戊酸、D-2-氨基己酸以及 D-苯丙氨酸衍生物表现出较高活性, 对 D-苯甘氨酸衍生物如 D-邻氯苯甘氨酸和 D-对氟苯甘氨酸的活性较小, 对亲水性的 D-α-氨基酸如 D-2-氨基己二酸无活性(表1). 在所测试的底物中, 固定化 D-AAO 对 D-L-氨基丁酸表现出最高的催化活性(0.56 nkat/g D-AAO).

表 1 固定化 D-氨基酸氧化酶的底物特异性和活性
Table 1 Substrate specificity and activity of immobilized D-AAO

Amino acid	Relative activity(%) ^a
D-2-aminobutyric acid	100
D-2-aminovaleric acid	85
D -2-amniohexanoic acid	72
D-2-chlorophenylalanine	68
D-4-chlorophenylalanine	75
D-2-chlorophenylglycine	5
D-4-fluorophenylglycine	8
D-2-aminoadipic acid	0

a. Activity is expressed as percentage (%) of the specific activity of the immobilized D-AAO. 100% corresponded to 0.56 nkat/g_{D-AAO}.

2.2 反应条件优化

反应条件不影响 D-AAO 的对映选择性, 但影响 D-氨基酸氧化脱氨的反应速度以及副产物的产生. 为最大程度地得到非天然 L-氨基酸和相应的酮酸, 我们对以 DL-2-氨基丁酸为底物制备 L-2-氨基丁酸和丁酮酸的反应条件进行了优化, 考察了 D-氨基酸氧化酶/底物质量比、过氧化氢酶/D-AAO 活性比以及反应时间对 DL-2-氨基丁酸氧化脱氨的影响.

固定 DL-2-氨基丁酸的浓度为 1 mol/L, 过氧化氢酶与 D-AAO 的活性比为 10: 1, 考察 D-AAO/底物质量比对 DL-2-氨基丁酸氧化脱氨转化率的影响. 当 D-AAO/底物质量比从 1: 1 增大至 2: 1 时, 转化率成倍增大. 进一步增大固定化 D-AAO 用量, 因为扩散阻力影响, D-2-氨基丁酸的转化率缓慢增大(表 2). 考虑到实际应用, 选择 D-AAO/底物质量比为 2: 1.

表 2 D-AAO/底物质量比对 DL-2-氨基丁酸氧化脱氨的影响

Table 2 Effect of D-AAO/substrate mass ratio on the oxidative deamination of DL-aminobutyric acid

D-AAO/DL-aminobutyric acid (g/g)	Conversion (%) ^a
1.0	6
2.0	12
3.0	14
4.0	15
5.0	16

Reaction conditions: 2 ~ 10 g DAAO, 2.06 g(20 mmol) DL-2-aminobutyric acid, 20 mL KPB buffer(pH 8.0), O₂: 0.1 vvm, catalyst: 1 000 ~ 10 000 u, 30 ℃, 2 h.

a. Conversion is determined by chiral HPLC.

过氧化氢是 D-AAO 催化 D-氨基酸氧化脱氨过程中的产物之一. 过氧化氢不仅氧化酮酸脱羧形成少一个碳的羧酸, 而且氧化 D-AAO 的半胱氨酸残基和丝氨酸残基使酶失活^[8]. 因此, 有必要通过在反应体系中添加外源过氧化氢酶, 原位分解反应过程中产生的过氧化氢. D-AAO 催化 DL-2-氨基丁酸

氧化脱氨的副产物为丙酸. D-对映体完全转化后, 当反应体系中无过氧化氢酶存在时, 78% 的丁酮酸转化为丙酸. 过氧化氢酶的加入减少 2-丁酮酸脱羧, 当过氧化氢酶/D-氨基酸氧化酶活性比为 10: 1 时, 20% 的丁酮酸转化为丙酸. 进一步增大过氧化氢酶活性, 丙酸的形成也不能完全抑制(表 3).

表 3 过氧化氢酶/D-AAO 活性比对 DL-2 氨基丁酸氧化脱氨的影响

Table 3 Effect of catalase/D-AAO activity ratio on the oxidative deamination of DL-2-aminobutyric acid

Relative activity of catalase/D-AAO	2-Oxobutyric acid (mol/L)	Propanoic acid (mol/L)
0	0.11	0.39
1.0	0.26	0.24
5	0.35	0.15
10	0.40	0.10
20	0.40	0.10

图 1 是固定化 D-AAO 在过氧化氢酶和氧气存在下催化 DL-2-氨基丁酸氧化脱氨的反应进程. 当固定化 D-AAO 与 DL-2-氨基丁酸的质量比为 2:1, 过氧化氢酶与固定化 D-AAO 活性比为 10:1 时, 1 mol/L DL -2-氨基丁酸中的 D-对映体 36 h 后完全转化为 2-丁酮酸和丙酸, 收率分别为转化产物的 80% 和 20% .

2.3 D-AAO 制备 L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸

在最优反应条件下, 固定化 D-AAO 体系催化 DL-2-氨基丁酸和 DL-2-氨基戊酸氧化脱氨, 以几乎定量的收率得到对映纯 L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸. 固定化 D-AAO/Pd-C/HCOONH₄ 组合催化体系中, 反应过程中产生的 2-亚氨基丁酸和 2-亚氨基戊酸原位催化氢化为相应的 DL-2-氨基丁酸和 DL-正缬氨酸, 进入酶催化氧化脱氨循环, 理论上所有的 DL-2-氨基丁酸和 DL-2-氨基戊酸完全转化, L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸的收率为 100%, 但由于反应过程中 2-亚氨基丁酸和 2-亚氨基戊酸水解为相

应的 2-丁酮酸和 2-戊酮酸并进一步脱羧为丙酸和丁酸的过程不可避免, 最后得到的 L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸收率为 85% 和 83% , ee 值保持不变 (表 4).

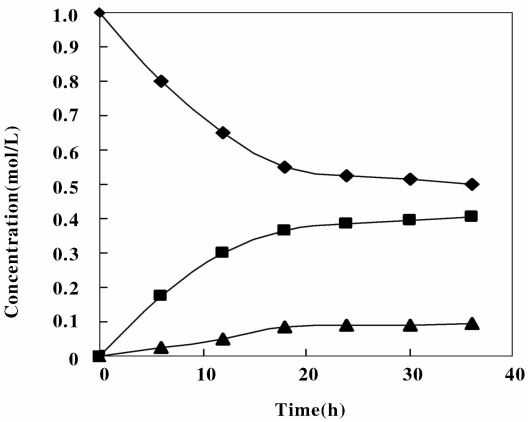


图 1 固定化 D-AAO 催化 DL-2 氨基氧化脱氨的时间进程
Fig.1 Time course of DL-2-aminobutyric acid oxidative deamination by D-AAO

表 4 L-2-氨基丁酸和 L-2-氨基戊酸的制备
Table 4 Preparation of L-2-aminobutyric acid and L-2-aminovaleric acid

Amino acid	D-AAO		D-AAO + Pd-C/HCOONH ₄	
	Yield(%)	ee(%)	Yield(%)	ee(%)
L-2-aminobutyric acid	48	99.5	85	99.3
L-norvaline	47	99.8	83	99.6

3 结 论

固定化 D-氨基酸具有宽的底物谱, 能够接受疏水性 D-α-氨基酸作为反应底物. 固定化 D-氨基酸氧化酶催化 DL-氨基酸中 D-对映体的完全转化, 可以获得对映纯的非天然 L-氨基酸. 固定化 D-AAO 与 Pd-C/HCOONH₄ 催化氢化体系组合去消旋化 DL-氨基酸, 可进一步提高对映纯非天然 L-氨基酸的收率. 我们的方法为对映纯非天然 L-氨基酸的制备提供了一条绿色途径.

参考文献:

[1] Breuer M, Ditrich K, Habicher T, *et al.* Industrial methods for the production of optically active intermediates [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.* , 2004, **43**: 788 – 824

[2] Miyazawa T. Enzymatic resolution of amino acids [J]. *Amino. Acid.* , 1999, **16**: 191 – 213

[3] Huh J W, Yokoigawa K, Esaki, *et al.* Synthesis of L-proline from the racemate by coupling of enzymatic enantiospecific oxidation and chemical non-enantiospecific reduction [J]. *L. Fermet. Bioeng.* , 1992, **74**: 189 – 190

[4] Soda K, Oikawa T, Yokoigawa K. One-pot chemo-enzymatic enantiomerization of racemates [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, **11**: 149 – 153

[5] Beard T M, Turner N J. Deracemisation and stereoinversion of alpha-amino acids using D-amino acid oxidase and hydride reducing agents [J]. *Chem. Commun.* , 2002, 246 – 247

[6] Fotheringham I G, Archer R, Carr R, *et al.* Preparation deracemization of unnatural amino acids [J]. *Biochem. Soc. Trans.* , 2006, **34**: 287 – 290

- [7] Gabler M, Hensel M, Fischer L. Detection and substrate selectivity of new microbial D amino acid oxidases[J]. *Enzyme and Microb Technol*, 2000, **27**: 605 – 611
- [8] Trost E M, Fischer. Minimization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of D/L-amino acids[J]. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, **19-20**: 189 – 195

Preparation of Non-natural L Amino Acids via Deracemization of DL-Amino Acids Catalyzed by Immobilized D-amino Acid Oxidase

XU Hong-mei, XIA Shi-wen¹⁾, HE Cong-lin

(*School of Bioinformatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China*)

Abstract: The D-enantiomer of DL-amino acid is oxidative deaminated enantioselectively into the corresponding oxo acid by immobilized D-amino acid oxidase (D-AAO) in the presence of catalase and oxygen, and the L-enantiomer is retained. The substrate specificity of D-AAO was studied and the reaction conditions were optimized. The results showed that D-AAO has a broader substrate spectrum and is capable of catalyzing the oxidative deamination of hydrophobic D- α -amino acids. Under the optimal conditions, L-2-aminobutyric acid and L-2-aminovaleric acid were obtained in 48% and 47% yield, 99.5% and 99.8% ee respectively. Furthermore, the yields of L-2-aminobutyric acid and L-2-aminovaleric acid were improved and their optical purity were retained through *in-situ* reduction of imine acids produced during the oxidative deamination by Pd-C/HCOONH₄.

Key words: immobilized D-amino acid oxidase; catalase; oxidative deamination; DL-amino acids; non-natural L-amino acids