Vol. 29, No. 4 Aug. 2015

文章编号: 1001-3555(2015)04-0307-08

珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4. 1037 全细胞催化(RS)-4- 氟苯甘氨酸去消旋化为(S)-4-氟苯甘氨酸

JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS (CHINA)

夏仕文,熊文娟,韦燕婵,何从林,徐红梅(重庆邮电大学生物信息学院,重庆400065)

摘要: 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 全细胞能够催化 4-氟苯甘氨酸的 (R)-对映体立体反转为 (S)-对映体,相反方向的反应不能发生。研究了反应条件对 (R)-4-氟苯甘氨酸立体反转的影响。在最优反应条件下,5 mmol/L (R)-4-氟苯甘氨酸和 10 mmol/L (RS)-4-氟苯甘氨酸分别立体反转和去消旋化为 (S)-4-氟苯甘氨酸,产率为 52%和 63%,ee 为 99.5%和 99.2%。(RS)-4-氟苯甘氨酸的去消旋化过程是通过珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 全细胞中的两个酶催化反应实现的。(R)-氨基酸氧化酶催化 (R)-4-氟苯甘氨酸氧化脱氨形成 4-氟苯甲酰甲酸,(S)-氨基酸转移酶催化 4-氟苯甲酰甲酸转氨化为 (S)-4-氟苯甘氨酸。讨论了 4-氟苯甘氨酸两个对映体的代谢途径。

关键词: 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037; 立体反转; 去消旋化; (RS)-4-氟苯甘氨酸; (S)-4-氟苯甘氨酸

中图分类号: Q814.1; O643.3 文献标志码: A

非天然(S)-氨基酸是已经上市的和正在研发 的许多手性药物的关键中间体[1]. 在众多的酶催化 制备方法中,(R)-氨基酸氧化酶与化学还原剂或其 他酶如(S)-氨基酸脱氢酶或(S)-氨基酸转移酶的 组合体系, 能够将反应过程中消旋氨基酸的(R)-对 映体氧化脱氢为 α-亚氨基酸中间体或 α-亚氨基酸 水解产生的 α-酮酸原位转化为消旋氨基酸或直接 转化为(S)-对映体,通过循环拆分或立体反转实现 消旋氨基酸的去消旋化,从而实现非天然(S)-氨基 酸的高收率和高对映选择性制备^[2-5]. Fotheringham 等 $^{[6]}$ 以产重组(R)-氨基酸氧化酶全细胞/钯碳-甲 酸铵组合体系催化 100 mmol/L 消旋 2-氨基丁酸去 消旋化制备抗癫痫药左乙拉西坦手性中间体(S)-2-氨基丁酸, 收率 95%, ee 99%. 我们小组[7]采用固 定化变异三角酵母(R)-氨基酸氧化酶/过氧化氢 酶/钯碳-甲酸铵组合体系实现了消旋 2-氨基丁酸和 2-氨基戊酸去消旋化, (S)-2-氨基丁酸和(S)-2-氨 基戊酸收率分别为 85% 和 83%, ee 分别为 99.3% 和99.6%. Hanson 等[8] 采用(R)-氨基酸氧化酶/ (S)-谷氨酸脱氢酶组合体系用于合成抗高血压药 物奥马曲拉(Omapatrilat) 手性砌块 L-6-羟基正亮氨 酸,产物浓度达 100 g/L,收率 97%, ee>98%. Seo 等[9]构建了由纤细红酵母(R)-氨基酸氧化酶-透明 颤菌血红蛋白(VHb)组成的融合蛋白. 利用融合蛋白和重组河流弧菌 ω-转氨酶体系,以苯乙胺为氨授体,在异辛烷/磷酸盐缓冲液(1:1, v/v)两相体系中,500 mmol/L 底物转化为 485 mmol/L L-氨基丁酸,收率 97%,ee>99%. Chen 等^[10]采用重组变异三角酵母(R)-氨基酸氧化酶/伯克霍尔德氏菌(S)-氨基酸转移酶体系,实现了(RS)-氨基-3-[3-{6-(2-甲基苯基)}吡啶基]-丙酸的去消旋化. (S)-氨基-3-[3-{6-(2-甲基苯基)}吡啶基]-丙酸的肉率和 ee 分别为 85% 和 99.5%. Caligiuri 等^[11]组合通过单点突变产生的纤细红酵母(R)-氨基酸氧化酶的突变酶 M213G 和大肠杆菌 L-天冬氨酸转移酶催化 DL-2-萘丙氨酸去消旋化,L-2-萘丙氨酸产率为 98%,ee 99.5%.

利用微生物细胞中的多酶体系催化消旋氨基酸去消旋化制备非天然(S)-氨基酸,不仅革除了细胞破碎、酶分离纯化等步骤,而且细胞中的酶稳定性更好。Chibata 等^[12] 对 Pseudomonas fluorescens 和 Pseudomonas miyamizu 细胞催化(RS)-苯丙氨酸去消旋化为(S)-苯丙氨酸进行了研究。Kato 等^[13]报道了 Nocardia diaphanozonaria JCM 3208 细胞催化(RS)-苯甘氨酸、(RS)-4-氯苯丙氨酸和(RS)-2-氨基戊酸的去消旋化。

收稿日期: 2015-07-09; 修回日期: 2015-08-10.

基金项目: 重庆市科技攻关计划项目(CSTC2009AC5088), 重庆市"企业科技特派员-百人计划行动"项目(CSTC2009DA-B21).

作者简介: 夏仕文(1964-), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向: 生物催化与生物转化、手性合成. E-mail: xiasw@cqupt. edu. cn.

(S)-4-氟苯甘氨酸是广泛用于治疗急性或延迟性化疗和术后引起的恶性、呕吐药物阿瑞吡坦的关键手性中间体^[14]. Evans 等^[15]采用不对称合成法合成(S)-4-氟苯甘氨酸,不仅使用昂贵的手性助剂,而且涉及多个反应步骤. Moseley 等^[16]采用诱导结晶拆分法,以(R)-二苯甲酰酒石酸为拆分剂拆分(RS)-4-氟苯甘氨酸甲酯,苯甲醛为(R)-4-氟苯甘氨酸甲酯

消旋催化剂,以65%总收率和99.0% ee 制备了(S)-4-氟苯甘氨酸,但拆分过程繁琐.

利用珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 全细胞催化(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转和(RS)-4-氟苯甘氨酸立体反转和(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化为(S)-4-氟苯甘氨酸(Scheme 1),初步解析了(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化机理和 4-氟苯甘氨酸两个对映体的代谢途径.

图示 1 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 全细胞催化(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化 Scheme 1 Deracemization of (RS)-4-FPG by whole cells of Nocardia corallina CGMCC 4.1037

1 实验部分

1.1 实验材料

(R)-、(S)-和(RS)-4-氟苯甘氨酸(4-FPG)、4-氟苯甲酰甲酸(4-FBFA)、4-氟苯甲醛(4-FBA)购自 TCI 公司,珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4. 1037 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心.

1.2 实验方法

1.2.1 培养基 培养基组成为: 甘油 10 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 牛肉膏 3 g/L, 酵母膏 3 g/L, 磷酸氢二钾 1 g/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 七水硫酸镁 0.3 g/L, pH 7.0.

1.2.2 细胞培养 取珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 斜面菌种接种于5 mL培养基中, 28 $^{\circ}$ 、100 rpm 下恒温摇床振荡预培养72 h. 1 mL 预培养液接种于装有100 mL 灭菌培养基的500 mL 摇瓶中, 28 $^{\circ}$ 、100 rpm 下继续培养48 h, 离心(4 $^{\circ}$ 、8 000 g, 20 min) 收获细胞. 细胞用100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.0) 洗涤2次,重新悬浮在相同缓冲液中,给出浓度约为38 g (干重)/L 的细胞悬浮液. 细胞生物量采用浊度法测定,每个 OD₆₁₀ 相当于0.585 g 干重细胞/L.

1.2.3 立体反转条件优化 2 mL 反应混合物中含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液,确定浓度的(R)-4-氟苯甘氨酸和珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞,在一定温度下振荡反应 8 h. 反应液离心,收集上清液,分别采用柱前手性衍生-HPLC 和反相

HPLC 测定上清液中 4-氟苯甘氨酸两个对映体浓度和代谢物浓度. 立体反转活性定义为每克干重细胞每小时产生的(S)- 4-氟苯甘氨酸物质量(mmol). 立体反转速率定义为每小时产生的(S)- 4-氟苯甘氨酸物质量浓度(mmol/L).

1.2.4 (R)-4-氟苯甘氨酸立体反转和(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化 反应液(10 mL)含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0),5 mmol/L(R)-4-氟苯甘氨酸或 10 mmol/L(RS)-4-氟苯甘氨酸,29 mg(干重) 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞.30 $^{\circ}C$ 、150 rpm 下恒温摇床振荡反应.每隔一定时间取样,离心去除细胞收集上清液,分别采用柱前手性衍生-HPLC 和反相 HPLC 测定上清液中4-氟苯甘氨酸两个对映体浓度和代谢物浓度.(S)-4-氟苯甘氨酸对映体过量(ee)=(A_S - A_R)/(A_S + A_R)×100%,其中 A_S 和 A_R 分别为(S)-4-氟苯甘氨酸和(R)-4-氟苯甘氨酸的峰面积.

1.2.5 HPLC 分析 (R)- 和 (S)- 4-氟苯甘氨酸对映体采用柱前手性衍生-HPLC 分析. 50 μL 反应上清液中,加入 50 μL 4g/L 三乙胺的乙腈溶液和 100 μL 2g/L 2,3,4,6-四- σ -乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯 (GITC) 的乙腈溶液,30 ∞ 下衍生 15 min. 离心 5 min,取 5 μL 上清液进样. HPLC 条件为: C18 反相柱 $(4.6 \times 150 \text{ mm})$,柱温 30 ∞ ;流动相1: 20 mmol/L 磷酸二氢钾 (pH 3.8)/乙腈 (7/3, v/v),流速 1 mL/min,20 min;流动相2: 20 mmol/L 磷酸二氢钾 (pH 3.8)/乙腈 (1/1, v/v),流速

1 mL/min, 10 min. 检测波长 254 nm. (R)-和(S)-4-氟苯甘氨酸非对映异构体的保留时间分别为 13.5、15.1 min. 反应上清液中的 4-氟苯甘氨酸和代谢物 4-氟苯甲酰甲酸、4-氟苯甲醛直接采用反相 HPLC 分析. HPLC 条件为: C18 反相柱(4.6×150 mm),柱温 30 ℃;流动相: 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)/甲醇(9/1, v/v),流速 1 mL/min,检测波长 212 nm. 4-氟苯甘氨酸、4-氟苯甲醛、4-氟苯甲酰甲酸的保留时间分别为 2.4、4.8 和 6.4 min.

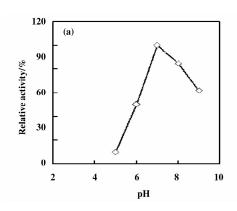
2 结果与讨论

2.1 (R)-4-氟苯甘氨酸立体反转条件优化

对无底物的珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞和手性衍生剂 2,3,4,6-四-o-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯 (GITC)混合液以及不含细胞的 (R)-4-氟苯甘氨酸和 GITC 混合液的分析表明,细胞内容物和衍生剂无分析干扰,(R)-4-氟苯甘氨

酸与 GITC 形成的非对映异构体在实验条件下是稳定的,无回收率和对映体过量变化. 立体反转过程中形成的(S)-4-氟苯甘氨酸以及代谢物源于珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞参与的催化反应.通过改变一个参数,固定其他参数考察反应条件对(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转的影响,立体反转过程中的两个对映体采用柱前手性衍生-HPLC 分析.

pH 和温度. 考察了 pH 和温度对珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(*R*)-4-氟苯甘氨酸立体反转活性的影响. 当磷酸盐缓冲液 pH 由 5.0 逐渐升至 7.0 时,细胞立体反转活性显著增加. 超过pH 7.0 时,立体反转活性随 pH 增加逐渐下降,表明 pH 7.0 时细胞表现出最大立体反转活性(图1a). 温度在 20 ℃以下,细胞表现出非常低的立体反转活性. 当温度由 20 ℃升至 30 ℃时,立体反转活性急剧增加并在 30 ℃时达到最高. 温度超过30 ℃时,立体反转活性随温度升高迅速降低,50 ℃时细胞几乎完全丧失立体反转活性(图1b).



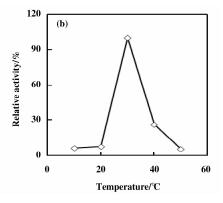


图 1 pH(a)和温度(b)对(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转的影响

Fig. 1 Effect of pH (a) and temperature (b) on the stereo-inversion of (R)-4-FPG Reaction mixture (2 mL) contained; (a)100 mmol/L KPB buffer (pH 5-9), 5 mmol/L (R)-4-FPG, 2.9 g dwc/L, 30 °C, 150 rpm, 8 h; (b) 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 5 mmol/L (R)-4-FPG, 2.9 g dwc/L, 10 ~ 50 °C, 150 rpm, 8 h. 100% activity corresponded to 0.042 mmol/g dwc · h.

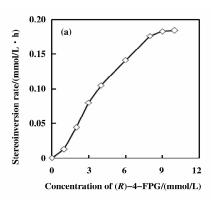
底物浓度和细胞浓度. 考察了底物浓度和细胞浓度对珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转速率的影响. (R)-4-氟苯甘氨酸的立体反转遵循底物饱和动力学. 立体反转速率随底物浓度增大而增加,8.0 mmol/L 时达到最大(图 2a). 立体反转速率随细胞浓度增大而增加,2.9 g干重细胞/L 时达到最大(图 2b). 随着细胞浓度的进一步增大,由于通气量限制,立体反转速率逐渐降低.

振荡速度. 振荡速度的大小直接影响空气的通

气量和分子氧的利用. 图 3 的结果表明, 当振荡速度低于 150 rpm, (*R*)-4-氟苯甘氨酸的立体反转速率随振荡速度的增大逐渐增加, 150 rpm 时达到最大. 低振荡速度下立体反转速率较低, 可能是由于底物的质量传递阻力和/或通气量限制.

2.2 (R)-4-氟苯甘氨酸立体反转

在最优反应条件下,对珊瑚色诺卡氏菌 CGM-CC 4.1037 细胞催化(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转进行了研究,采用柱前手性衍生-HPLC 分析(R)-4-氟苯甘氨酸手性反转过程中两个对映体的变化. 从图



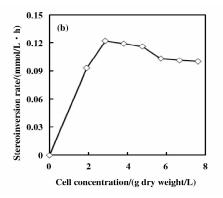


图 2 底物浓度(a)和细胞浓度(b)对(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration (a) and cell concentration (b) on the stereo-inversion of (R) - 4-FPG Reaction mixture(2 mL) contained; (a) 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 1 ~ 10 mmol/L (R) -4-FPG, 2.9 g dwc/L, 30 °C, 150 rpm, 8 h; (b) 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 5 mmol/L (R) -4-FPG, 1.95 ~ 7.6 g dwc/L, 30 °C, 150 rpm, 8 h

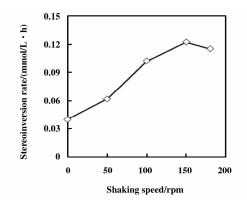
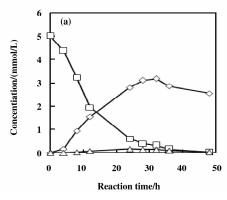


图 3 振荡速度对(R)- 4-氟苯甘氨酸立体反转的影响 Fig. 3 Effect of shaking speed on the stereo-inversion of (R)-4-FPG

Reaction mixture (2 mL) contained 100 mmol KPB/L buffer (pH 7.0), 5 mmol/L (R)-4-FPG, 2.9 g dwc/L, 30 °C, 0 ~ 180 rpm, 8 h



4a 可知,(S)-4-氟苯甘氨酸浓度随着(R)-对映体浓度的降低逐渐增大,32 h 时达到最大,但此时(R)-对映体未反转完全. 反应时间延长至 48 h,(R)-对映体反转完全,同时伴随(S)-对映体的进一步降解. 立体反转完成后,(S)-4-氟苯甘氨酸产率 52%,ee 99.5%. 以5 mmol/L(S)-4-氟苯甘氨酸代替(R)-对映体与珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037细胞保温反应(图 4b),只观察到(S)-4-氟苯甘氨酸代谢,未检测到(R)-对映体产生. 这些结果表明(R)-对映体能立体反转为(S)-对映体,但(S)-对映体不能立体反转为(R)-对映体,从而排除了细胞中消旋酶存在的可能.

2.3 (RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化

以 10 mmol/L(RS)-4-氟苯甘氨酸代替(R)-4-氟苯甘氨酸作为底物,采用柱前手性衍生-HPLC 分

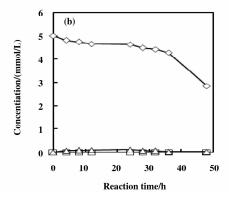


图 4 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(R) - 4-氟苯甘氨酸立体反转和(S) - 4-氟苯甘氨酸代谢的时间进程 Fig. 4 Time course of (R) -4-FPG stereo-inversion and (S) -4-FPG metabolism by whole cells of *Nocardia corallina* CGMCC 4.1037 (R) -4-FPG (\square), (S) -4-FPG (\diamondsuit) and 4-FBFA (\triangle)

Reaction mixture (10 mL) contained 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 5 mmol/L (R)-4-FPG (a) or 5 mmol/L (S)-4-FPG (b), 2.9 g dwc/L, 30 °C, 150 rpm

析(*RS*)-4-氟苯甘氨酸去消旋化过程中两个对映体的变化(图 5). 从图 5 观察到在反应最初的 4 h 内,尽管(*R*)-对映体发生立体反转,但由于进一步的代谢导致(*S*)-对映体浓度降低.(*S*)-对映体浓度在反

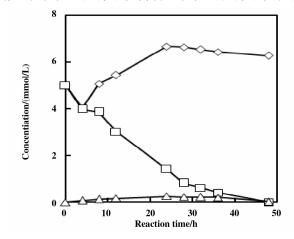


图 5 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化时间进程

Fig. 5 Time course of (RS)-4-FPG deracemization by whole cells of Nocardia corallina CGMCC 4.1037 (R)-4-FPG (\square), (S)-4-FPG(\diamondsuit) and 4-FBFA(\triangle) Reaction mixture (10 mL) contained 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 10 mmol/L (RS)-4-FPG, 2.9 g dwc/L, 30 $^{\circ}$ C, 150 rpm

应 24 h 后达到最大,此时去消旋化未完全,随后 (S)-对映体浓度缓慢降低. 与(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转类似,(RS)-4-氟苯甘氨酸在 48 h 后去消旋化完全,(S)-对映体产率 63%,ee 99. 2%.

2.4 (RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化机理和代谢途径

微生物全细胞催化消旋氨基酸去消旋化涉及多个酶系,其机理解析较纯酶反应体系复杂. Chibata 等 [12] 假设 Pseudomonas fluorescens 和 Pseudomonas miyamizu 细胞催化(R)-苯丙氨酸手性反转和(RS)-苯丙氨酸去消旋化为(S)-苯丙氨酸经历两个步骤:(R)-苯丙氨酸首先在(R)-氨基酸氧化酶作用下形成相应的苯丙酮酸,苯丙酮酸随后通过转氨化或还原氨化转化为(S)-苯丙氨酸. Kato 等 [13] 通过实验证实 Nocardia diaphanozonaria JCM 3208 细胞催化(RS)-4-氯苯丙氨酸去消旋化涉及(R)-氨基酸脱氨酶和(S)-氨基酸转移酶.

为了解析珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转和(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化机理,我们采用反相 HPLC 直接检

测(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转、(S)-4-氟苯甘氨酸代谢和(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化过程中的中间体(图4a、4b,图5).结果表明,3个反应过程中均存在4-氟苯甲酰甲酸,其浓度在24h时达到最大,48h时完全消失.此外,我们研究了反应气氛对(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化的影响(表1).在氩气氛围下,去消旋化反应不能平稳进行.这些结果表明珊瑚色诺卡氏菌CGMCC4.1037细胞催化(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化反应是一个(R)-氨基酸氧化酶而非(R)-氨基酸脱氨酶参与的需氧反应.

表 1 反应气氛对珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化的影响

Table 1 Effect of reaction atmosphere on the deracemization of (RS)-4-FPG by whole cells of Nocardia corallina CGMCC 4.1037

Reaction atmosphere	Reaction time /h	(S)-4-FPG /(mmol·L ⁻¹)	ee /%
Air	48	6.3	99.2
Ar	48	5.1	57.1

2 mL reaction mixture, 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 10 mmol/L (RS)-4-FPG, 2.9 g dwc/L, 30 °C, 150 rpm, 48 h

去消旋化反应体系中加入氨基酸脱氢酶所需的 辅酶(氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,NAD⁺)、辅 底物(葡萄糖)和氨源(氯化铵)稍微降低(S)-4-氟 苯甘氨酸的产率. 氨基酸转移酶所需辅酶(5^{*}-磷酸 吡哆醛,PLP)和氨授体(L-谷氨酸)的加入显著提 高(S)-4-氟苯甘氨酸的产率(表 2). 这些结果表 明,珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞中含有负 责将 4-氟苯甲酰甲酸转化为(S)-4-氟苯甘氨酸的 (S)-氨基酸转移酶而非(S)-氨基酸脱氢酶.

表 2 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞 4-氟苯甲酰甲酸转化为(S)-4-氟苯甘氨酸

Table 2 Formation of (S)-4-FPG from 4-FBFA by whole cells of *Nocardia corallina* CGMCC 4.1037

	(S)-4-FPG/		
Additives	$(\text{mmol} \cdot L^{-1})$	/%	
Control	3.6	100	
30 mmol/L $NH_4Cl + 4 mmol/L$	3.4	100	
Glucose+ 1 mmol/L NAD^+	3.4		
30 mmol/L L-Glutamic	4.5	100	
acid + 2 mmol/L PLP	4. 3	100	

2 mL reaction mixture, 100 mmol/L KPB buffer (pH 7.0), 5 mmol/L 4-FBFA, 2.9 g dwc/L, 30 °C, 150 rpm, 48 h

苯甘氨酸及其类似物的微生物代谢已有较多报道,不同的微生物有不同的代谢途径. Pseudomonas pudita LW-4 利用氨基酸转移酶将苯甘氨酸的两个对映体转化为苯甲酰甲酸,随后通过苯甲醛、苯甲酸等中间体进一步代谢^[17]. FlavobacteriumF24^[18]、Pseudomonas pudita ATCC 12633^[19]细胞中的(S)-氨基酸转移酶和(R)-氨基酸脱氢酶分别催化(S)-苯甘氨酸和(R)-苯甘氨酸转化为苯甲酰甲酸. 苯甲酰甲酸进一步脱羧为苯甲醛,后者在苯甲醛脱氢酶作用下转化为苯甲酸.

在我们的研究中,5 mmol/L(R)-、(S)-4-氟苯甘氨酸和 10 mmol/L(RS)-4-氟苯甘氨酸为底物与珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞保温反应 48 h,4-氟苯甘氨酸分别损失 48%、43%和 36%(图 4a、4b,图 5).在这三个反应过程中除了检测到 4-氟苯甲酰甲酸外,也检测到 4-氟苯甲醛.4-氟苯甲醛浓度分别在反应时间为 12、8 和 8 h 时达到最大,24 h 后完全消失(表 3).

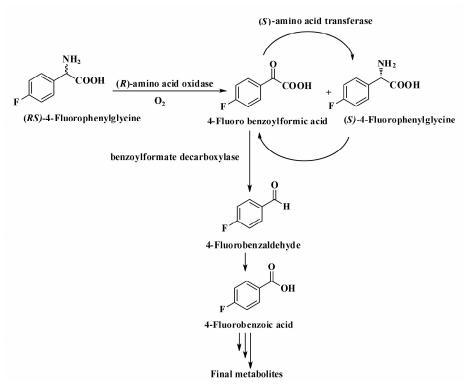
结合前人的研究和我们的实验结果,推测珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 全细胞催化(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化机理和代谢途径为:(R)-氨基酸氧化酶催化(RS)-4-氟苯甘氨酸中的(R)-对映体氧

表 3 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞 4-氟苯甘氨酸代谢生成 4-氟苯甲醛

Table 3 Formation of 4-FBA during the metabolism of 4-FPG by cells of *Nocardia corallina* CGMCC 4.1037

C.1	Reaction	4-FBA /
Substrate	time /h	$(mmol\boldsymbol{\cdot}L^{\scriptscriptstyle{-1}})$
$\frac{1}{5 \text{ mmol/L}(R) - 4-\text{FPG}}$	12	0.02
	24	0
5 mmol/L (S)-4-FPG	8	0.025
	24	0
10 mmol/L (<i>RS</i>)-4-FPG	8	0.043
	24	0

化脱氨为 4-氟苯甲酰甲酸,后者在(S)-氨基酸转移酶催化下原位转化为(S)-4-氟苯甘氨酸.两个酶的协同作用导致(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化.(R)-4-氟苯甘氨酸的代谢以(R)-氨基酸氧化酶催化形成的 4-氟苯甲酰甲酸为中间体,在苯甲酰甲酸脱羧酶作用下转化为 4-氟苯甲醛,4-氟苯甲醛进一步代谢.(S)-4-氟苯甘氨酸的代谢可能是通过(S)-氨基酸转移酶催化的可逆转氨反应形成 4-氟苯甲酰甲酸,然后与(R)-4-氟苯甘氨酸相同的途径转化为 4-氟苯甲醛并进一步代谢(图示 2).



图示 2 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化机理和代谢途径推测 Scheme 2 Proposed deracemizatic mechanism and metabolic pathways of (RS)-4-FPG by whole cells of Nocardia corallina CGMCC 4.1037

3 结论

珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞中的 (R)-氨基酸氧化酶/(S)-氨基酸转移酶体系立体特异地催化(R)-4-氟苯甘氨酸立体反转为(S)-4-氟苯甘氨酸,相反方向的反应不能进行. 珊瑚色诺卡氏菌 CGMCC 4.1037 细胞催化(RS)-4-氟苯甘氨酸去消旋化转化为(S)-4-氟苯甘氨酸,产率63%, ee 99.2%.(R)-和(S)-4-氟苯甘氨酸分别在(R)-氨基酸氧化酶和(S)-氨基酸转移酶作用下形成的4-氟苯甲酰甲酸中间体,通过苯甲酰甲酸脱羧酶作用形成4-氟苯甲醛,4-氟苯甲醛通过多个途径转化为最终代谢产物. 我们建立的方法为利用微生物细胞制备作为阿瑞吡坦关键手性中间体的对映纯(S)-4-氟苯甘氨酸提供了一个简单有效的途径.

参考文献:

- a. Patel R N. Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals [J]. Biomole, 2013, 3(4): 741-777.
 - b. Li Wei-xiang(李伟翔), Li Chun(李春), Liu Gui-yan(刘桂艳), et al. Advances of enzyme catalyzed asymmetric synthesis system(酶促不对称催化手性合成系统研究进展) [J]. J Mol Catal(China)(分子催化), 2014, 28(6): 581-594.
 - c. Xu Hong-mei(徐红梅), He Cong-lin(何从林), Xia Shi-wen(夏仕文). Racemization of L-tyrosine methyl ester and preparation of D-tyrosine via alcalase 2. 4L-catalyzed enantioselective hydrolysis(L-酪氨酸甲酯消旋及Alcalase 2. 4L 催化对映选择性水解制备 D-酪氨酸)[J]. J Mol Catal(China)(分子催化), 2013, 27(3): 212-217.
- [2] a. Servi S, Tessaro D, Pedrocchi-Fantoni G. Chemo-enzymatic deracemization methods for the preparation of enantiopure non-natural α-amino acids [J]. Coord Chem Rev, 2008, 252: 715–726.
 - b. Xu Hong-mei (徐红梅), He Cong-lin (何从林), Xiong Wen-juan (熊文娟), et al. Preparation of (R)-o-chloromandelic acid via dynamic kinetic resolution of o-chloromandelonitrile by whole cells of alcaligenes faecalis CGMCC 1. 2006 (Alcaligenes faecalis CGMCC 1. 2006 整细胞催化邻氯扁桃腈动态动力学拆分制备(R)-邻氯扁桃酸)[J]. J Mol Catal (China) (分子催化), 2014, 28(2): 174-181.
 - c. Xia Shi-wen(夏仕文), Xiong Wen-juan(熊文娟),

- Wei Yan-chan(韦燕婵), *et al.* Advances in the amino acid oxidase-catalyzed synthesis of non-natural chiral amino acids(氨基酸氧化酶催化合成非天然手性氨基酸研究进展)[J]. *J Mol Catal*(*China*)(分子催化), 2015, **29**(3): 288-298.
- [3] Turner N J. Enantioselective oxidation of C-O and C-N bonds using oxidases [J]. Chem Rev, 2011, 111 (7): 4073-4087.
- [4] Rachwalski M, Vermue N, Rutjes F P J T. Recent advances in enzymatic and chemical deracemisation of racemic compounds [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42: 9268-9282.
- [5] Xia Shi-wen(夏仕文), Xiong Wen-juan (熊文娟), Wei Yan-chan(韦燕婵), et al. Advances in the amino acid oxidase-catalyzed synthesis of non-natural chiral amino acids (氨基酸氧化酶催化合成非天然手性氨基酸研究进展)[J]. J Mol Catal (Chin)(分子催化), 2015, 29(3); 288-298.
- [6] Fotheringham I, Archer I, Carr R, et al. Preparative deracemization of unnatural amino acids [J], Biochem Soc Trans, 2006, 34: 287-290.
- [7] Xu Hong-mei(徐红梅), He Cong-lin(何从林), Xia Shi-wen(夏仕文). Preparation of non-natural L-amino acids via deracemization of DL-amino acids catalyzed by immobilized D-amino acid oxidase(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)
 [J]. J Mol Catal(Chin)(分子催化), 2012, 26(2): 192-196.
- [8] Hanson R L, Schwinden M D, Banerjee A, et al. Enzymatic synthesis of 1-6-hydroxynorleucine [J]. Bioorg Med Chem, 1999, 7: 2247-2252.
- [9] Seo Y M, Mathew S, Bea H S, et al. Deracemization of unnatural amino acid: homoalanine using D-amino acid oxidase and ω-transaminase [J]. Org Biomol Chem, 2012, 10(12): 2482-2485.
- [10] Chen Y, Goldberg S L, Hanson R L, et al. Enzymatic preparation of an (S)-amino acid from a racemic acid [J]. Org Proc Res & Dev, 2011, 15(1): 241-248.
- [11] Caligiuri A, D'Arrigo P, Gefflaut T, et al. Multistep enzyme catalysed deracemisation of 2-naphthylalanine [J]. Biocat Biotrans, 2006, 24(6): 409-413.
- [12] Chitata I, Tosa T, Sano R. Amino acid isomerization in the production of L-phenylalanine from D-phenylalanine by bacteria [J]. *Appl Microbiol*, 1965, **13**(4): 618-624.
- [13] Kato D I, Miyamoto K, Ohta H. Microbial deracemization of α -amino acids[J]. J Mol Catal B: Enzymatic,

- 2005, 32: 157-165.
- [14] Castaer J, Silvestre J S, Bays M, *et al.* Aprepitant and L-758298[J]. *Drugs Fut*, 2002, **27**(3); 211.
- [15] Evans D A, Britton T C, Ellman J A, et al. The asymmetric synthesis of α-amino acids. Electrophilic azidation of chiral imide enolates, a practical approach to the synthesis of (R)- and (S)-α-azido carboxylic acids [J]. J Am Chem Soc, 1990, 112 (10): 4011-4030.
- [16] Moseley J D, Williams B J, Owen S N, et al. Crystallisation induced resolution of 4-fluorophenylglycine [J].

 Tetrahedron: Asymmetry, 1996, 7(12): 3351-3352.
- [17] van den Tweel W J J, Smits J P, de Bont J A M. Micro-

- bial metabolism of D- and L-phenylglycine by *Pseudo-monas putida* LW-4[J]. *Arch Microbiol*, 1986, **144**(2): 169–174.
- [18] van den Tweel W J J, de Bont J A M. Metabolism of both stereoisomer of phenylglycine by different routes in Flavobacter F24[J]. J Gen Microbiol, 1987, 133: 745-754.
- [19] Hermes H F M, Croes L M, Peeters W P H, et al. Metabolism of amino acid amides in Pseudomonas putida ATCC 12633 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993; 40 (4): 519-525.

Biocatalytic Deracemization of (RS)-4-Fluorophenylglycine to (S)-4-Fluorophenylglycine by Whole Cells of Nocardia Corallina CGMCC 4. 1037

XIA Shi-wen, XIONG Wen-juan, WEI Yan-chan, HE Cong-lin, XU Hong-mei (College of Bio-informatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Abstract: Whole cells of *Nocardia corallina* CGMCC 4.1037 were capable of catalyzing the stereo-inversion of (R)-4-fluorophenylglycine to its (S)-enantiomer, but not in the reverse direction. The effects of reaction conditions on the stereo-inversion of (R)-4-fluorophenylglycine were studied. Under the optimal conditions, 5mmol/L (R)-, and 10mmol/L (RS)-4-fluorophenylglycine were stereo-inverted and deracemized to (S)-4-fluorophenylglycine in 52% and 63% yield, 99.5% and 99.2% ee respectively. The deracemization process of (RS)-4-fluorophenylglycine was realized by two enzymatic reactions in the whole cells of *Nocardia corallina* CGMCC 4.1037. (R)-4-fluorophenylglycine is oxidized to 4-fluorophenylglycine by (S)-amino acid oxidase, and 4-fluorophenylglycine capable of catalyzing the stereo-inversion of 4-fluorophenylglycine by (S)-amino acid transferase. The metabolic pathways of both enantiomers of 4-fluorophenylglycin were also discussed.

Key words: *Nocardia corallina* CGMCC 4.1037; stereo-inversion; deracemization; (*RS*)-4-fluorophenylglycine; (*S*)-4-fluorophenylglycine