

Arthrobacter K1108 乙内酰脲酶反应条件和立体选择性研究

张惟材^{1*} 袁红杰¹ 郝淑凤² 彭清忠¹ 王书锦² 朱厚础¹ 黄留玉¹

¹(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

²(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

摘 要 研究了 *Arthrobacter* K1108 乙内酰脲酶的反应条件,结果表明,K1108 乙内酰脲酶的最适反应温度为 55℃,最适 pH 为 7.0,Co²⁺ 和 Fe²⁺ 对该酶有激活作用,而 Ca²⁺ 有严重抑制作用。K1108 乙内酰脲酶的底物专一性较强,其最适底物为 5-苄基乙内酰脲,5-苯基乙内酰脲和 5-吡啶甲基乙内酰脲均不能作为其有效底物。对 K1108 乙内酰脲酶立体反应机制研究结果表明,其乙内酰脲水解酶不具立体选择性,决定产物立体构型的酶是 N-氨甲酰氨基酸水解酶。

关键词 节杆菌,乙内酰脲酶,反应条件,底物专一性

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0635-04

乙内酰脲酶是存在于某些微生物和动植物的一种酶系,其中有乙内酰脲水解酶、N-氨甲酰氨基酸水解酶和乙内酰脲消旋酶。该酶可将 5-位单取代乙内酰脲类化合物水解为相应氨基酸。不同来源乙内酰脲酶系在组成、底物专一性、立体选择性和反应机制等方面可存在很大差别。不同立体选择性的乙内酰脲酶水解产物可为 D-型、L-型或外消旋型,因此乙内酰脲酶可广泛应用于各种氨基酸的酶法生产。在该反应体系中,由 3 种酶协同作用连续进行水解拆分、转化、消旋、再水解拆分的循环,最终可使外消旋底物完全转化为特定的手性氨基酸。因此该法转化率高、工艺简便、副产物少、产品易于精制,在各种酶法生产氨基酸的路线中独具特点和优势^[1,2]。我们从沈阳市浑河一带污泥中分离得到了一株乙内酰脲酶产生菌 *Arthrobacter* K1108,该菌可将 5-苄基乙内酰脲特异水解为 L-苯丙氨酸,可能用于 L-苯丙氨酸或其他 L-氨基酸的酶法生产^[3,4]。本文对该菌乙内酰脲酶反应条件和立体选择机制进行了研究,现报道于下。

1 材料和方法

1.1 菌株

Arthrobacter K1108 由本室分离得到并鉴定为节杆菌属的一个种。

1.2 试剂

5-苄基乙内酰脲(5-BH)、N-氨甲酰基苯丙氨酸(N-CP)、5-苯基乙内酰脲(5-PH)、N-氨甲酰基苯甘氨酸(N-CG)、5-吡啶甲基乙内酰脲(5-IMH)和 N-氨甲酰色氨酸(N-CT)等乙内酰脲类化合物及衍生物系本室化学合成,L-苯丙氨酸系日本味之素公司产品,其他均为市售分析纯化学试剂。底物悬液:将 1g 5-BH 溶于 2mol/L NaOH,用 2mol/L HCl 中和至 pH7.0,再加 CoCl₂ 6.5mg,十六烷基三甲基溴化铵 10mg,溶解后定容至 10mL。Ehrlich 试剂:10% 对二氨基苯甲醛溶于 6mol/L HCl。

1.3 培养基

GYP 培养基:葡萄糖 5g,酵母膏 10g,蛋白胨 10g,加蒸馏水至 1L。调 pH 至 7.2,121℃ 灭菌 20min。GYPBH 培养基:每升 GYP 培养基中补加诱导物 5-BH 1g。

1.4 产酶休止细胞的制备

从斜面上接一环 K1108 菌种至含 5mL GYP 培养基的试管中,30℃ 260r/min 振荡培养 24h,再按 5%接种量转接至含 GYPBH 的摇瓶中,30℃ 260r/min 振荡培养 24h,10 000r/min 离心收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次,重悬于适当缓冲液中。

1.5 酶活的定量测定

Arthrobacter K1108 休止细胞 4mL,0.1% 底物溶

收稿日期:2001-05-15,修回日期:2001-08-10。

* 通讯作者。 Tel:86-10-63895913; Fax:86-10-63895646; E-mail: zhangwc@nic.bmi.ac.cn

液 4mL, 于 45℃ 水浴中反应 1h, 加 12% 三氯乙酸 2mL 中止反应, 离心, 用高效液相色谱法测定上清液中转化产物的含量。以 5-BH 为底物测定苯丙氨酸生成速率计算总酶活, 测定 N-CP 的生成速率计算乙内酰胺水解酶活力, 以 N-CP 为底物测定苯丙氨酸的生成速率计算 N-氨甲酰氨基酸水解酶活力。

1.6 转化和产物及中间产物的提取和精制

将产酶休止细胞重悬在含 0.5mmol/L CoCl₂ 的 100mL 0.1mol/L pH7.0 Tris-HCl 缓冲液中, 加 5g 5-BH, 在 45℃ 水浴中于三颈瓶内中速搅拌反应, 反应过程中维持 pH 在 7.0~7.5 范围内。如欲获得中间产物可待不溶的底物恰好消失终止反应, 如欲使反应进行完全则适当延长反应时间, 直到用 TLC 检测不到 NCP 的存在为止。反应完成后转化液经 10 000r/min 离心, 上清液通过 732 阳离子交换树脂柱, 用蒸馏水洗下未吸附的流份, 减压浓缩, 析出的结晶再重结晶 2 次, 可得中间产物; 用 0.2mol/L NH₄OH 洗脱吸附在树脂柱上的组份, 浓缩, 调 pH 至 5.48, 加乙醇, 冷却使结晶, 再用乙醇重结晶 2 次, 干燥得酶转化产物。

2 结果和讨论

2.1 温度对酶活的影响

研究了温度对酶活的影响, 结果见图 1。从图 1 看到, K1108 乙内酰胺酶的最适反应温度为 55℃。但我们发现在这个温度下酶的热稳定性较差, 因此在实际测定酶活时采用 45℃, 而进行高浓度底物转化时采用 37℃。

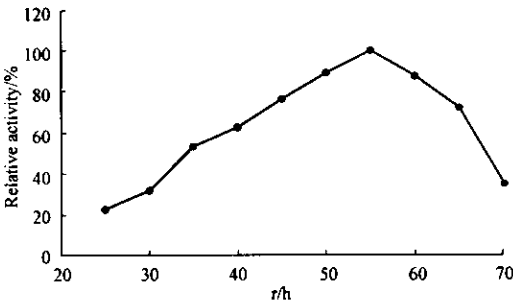


图 1 温度对 K1108 乙内酰胺酶活力的影响
Fig.1 Effect of temperature on K1108 hydantoinase

2.2 pH 对酶活的影响

考察了 pH 对酶活的影响, 结果见图 2。从这个结果看到, 在 pH 为 7.0 时测得的酶活最高。这与国外报道过的一些其他芳基取代乙内酰胺酶类略有不同^[5-7]。

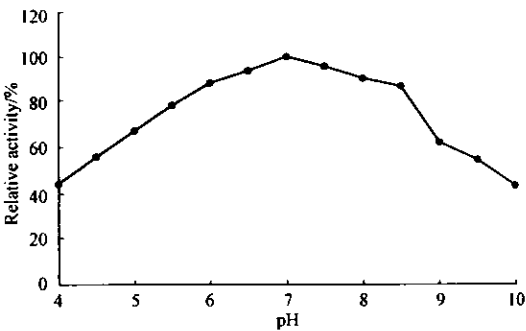


图 2 pH 对 K1108 乙内酰胺酶活性的影响
Fig.2 Effect of pH on K1108 hydantoinase

2.3 无机离子对酶活的影响

考察了 Co²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 和 Cu²⁺ 等金属离子对酶活的影响, 结果见表 1。

表 1 一些金属离子对 K1108 乙内酰胺酶活力的影响
Table 1 Effect of metal ion on K1108 hydantoinase

Concentration /(mmol/L)	Metal ions					
	Co ²⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cu ²⁺
0.0	100	100	100	100	100	100
0.5	187	130	166	121	68	98
1.0	225	190	230	119	17	93
2.0	332	253	288	136	7	95
5.0	334	265	302	166	2	87

从表 1 结果可以看到, Co²⁺、Mn²⁺ 和 Fe²⁺ 对乙内酰胺酶有激活作用, 而 Ca²⁺ 对酶活有明显的抑制作用, 而 Mg²⁺ 和 Cu²⁺ 对酶活的影响不大。Co²⁺ 对酶活的激活作用最强, 能使 *Arthrobacter* K1108 乙内酰胺酶活力提高约 2 倍多, 因此在底物的转化中可加入 0.5~2mmol/L 的 CoCl₂ 以提高酶活, Fe²⁺ 对酶的激活作用亦很强, 且廉价无毒, 也可代替 Co²⁺。

2.4 K1108 乙内酰胺酶的底物专一性

考察了 K1108 乙内酰胺酶对各种 5-位单取代乙内酰胺类化合物和几种 N-氨甲酰氨基酸类化合物的转化作用, 结果见表 2。由表 2 结果可见, 在考察的 16 种化合物中, 能够作为 *Arthrobacter* K1108 乙内酰胺酶底物的化合物只有 4 种。其中, 5-苄基乙内酰胺(5-BH)为该酶的最适底物, 而 DL-N-CP 和 L-N-CP 实际上是 5-BH 被酶解的中间体; 另一种底物 5-对羟苯甲基乙内酰胺(5-HPH)实际上是 5-BH 的羟基化衍生物。除此之外其它 12 种化合物均不能作为 K1108 乙内酰胺酶的底物。表明该菌的乙内酰胺酶具有较高的底物专一性。国外报道过的一些对 5-芳基取代乙内酰胺化合物有效的乙内酰胺酶多以

表 2 K1108 的底物专一性
Table 2 Substrate specificity of K1108

Substrates	Abbreviations	Corresponding aminoacids	Relative activity/ %
5-Benzylhydantoin	5-BH	Phenylalanine	100
5-Phenylhydantoin	5-PH	Phenylglycine	0
5-Indolylmethylhydantoin	5-IMH	Tryptophan	0
5-(4'-Hydroxy)phenylmethylhydantoin	5-HPH	Tyrocine	86
5-Benzylthiohydantoin	5-BTH	Phenylalanine	0
5-Methylhydantoin	5-AlaH	Alanine	0
5-(2-Methyl)-propylhydantoin	5-LeuH	Leucine	0
5-(1-Methyl)-propylhydantoin	5-IleH	Isoleucine	0
5-Isopropylhydantoin	5-ValH	Valine	0
Hydantoin	Hyd	Glycine	0
5-Butylaminehydantoin	5-LysH	Lysine	0
5-Propionyloxyhydantoin	5-GluH	Glutamic acid	0
5-(2'-Methyl)thioethylhydantoin	5-MetH	Methionine	0
N-Carbamoyltryptophan	N-CT	Tryptophan	0
DL-N-Carbamoylphenylalanine	DL-N-CP	Phenylalanine	46
L-N-Carbamoylphenylalanine	L-N-CP	Phenylalanine	94

5-吡啶甲基乙内酰脲(5-IMH)为最适底物^[5-7],而 K1108 的乙内酰脲酶对 5-IMH 却没有水解活性,而且对 5-IMH 水解的中间产物 N-氨甲酰苯基色氨酸(N-CT)亦无水解活性。具有这种底物专一性的乙内酰脲酶尚未见报道。比较几种乙内酰脲类化合物结构(图 3)可以看出,K1108 菌株的乙内酰脲酶对乙内酰脲的 5-位取代基的结构要求较高,5-BH 与 5-PH 两者之间仅相差一个亚甲基,但具有这个亚甲基的 5-BH 为最适底物,缺少这个亚甲基的 5-PH 却没有底物活性。另一方面,在 5-IMH 与 5-BH 分子中的芳基与乙内酰脲环之间均有一个亚甲基,但 5-IMH 仍不具底物活性,可见用吡啶环代替苯环后也不能为该乙内酰脲酶水解。

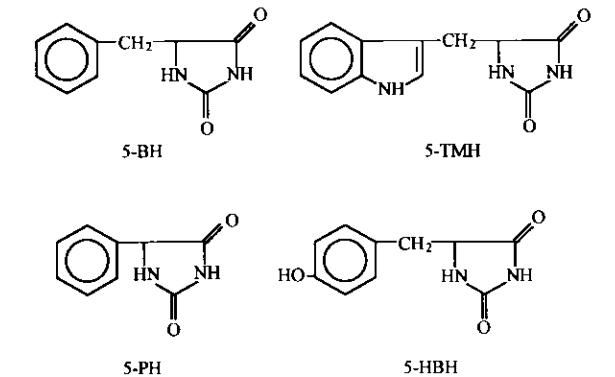


图 3 几种 5-芳代乙内酰脲类化合物的结构比较
Fig.3 Structures of some 5-monoarylsusbstituted hydantoin

此外还注意到,乙内酰脲酶对底物和诱导物的选择性似乎存在一定联系,国外报道过的一些芳基取代乙内酰脲酶类是以 5-IMH 为最适底物和诱导物。而 K1108 乙内酰脲酶不但不能以 5-IMH 作底物,我们还发现 5-IMH 也不能作为其诱导物,其最适诱导物也是 5-BH^[8]。这一有趣的现象似乎提示在乙内酰脲酶与其调控蛋白的结构之间可能存在一定联系。

2.5 K1108 乙内酰脲酶的立体选择机制

已知底物的转化过程实际是由乙内酰脲水解酶(简作 EI)、N-氨甲酰氨基酸水解酶(简作 EII)和乙内酰脲消旋酶(EIII)三个酶共同完成的^[1]。产物的立体构型取决于两种水解酶的立体选择性,不同类型的乙内酰脲酶具有不同的立体选择性和反应机制。阐明乙内酰脲酶的立体选择机制在理论和应用上都非常重要。K1108 乙内酰脲酶立体选择性有 3 种可能:一是仅 EI 为 L-专一性,二是仅 EII 为 L-专一性,三是 EI 和 EII 都为 L-专一性。分别以 DL-5-BH、DL-N-CP 和 L-N-CP 为底物进行转化,分离得到酶转化产物苯丙氨酸和中间产物 N-氨甲酰苯丙氨酸,对产物的立体构型进行分析,结果见表 3。

表 3 K1108 乙内酰脲酶的立体选择性
Table 3 Stereoselectivity of K1108 hydantoinase

Substrates	Enzyme	Products	Specific rotation		Conlution
			Products	Standards	
DL-5-BH	EI	N-CP	- 0.2	L-N-CP, + 37.0	DL-N-CP
DL-N-CP	EII	Phe	- 34.0	L-Phe, - 34.5	L-Phe
L-N-CP	EII	Phe	- 34.2	L-Phe, - 34.5	L-Phe

从表 3 结果看出, *Arthrobacter* K1108 以 DL-5-BH 为底物转化得到的中间产物 N-CP 为消旋体,说明 EI 不具立体选择性;而无论以 DL-N-CP 还是以 L-N-CP 为底物得到的产物均为 L-Phe,说明 EII 具有立体选择性。因此其可能的立体反应机制如图 4 所示。首先外消旋底物均可被 EI 水解为 L-N-CP 和 D-N-CP,前者可被 EII 进一步水解为 L-苯丙氨酸,后者被 EI 催化的逆反应再转化为 D-5-BH。随着 L-5-BH 的

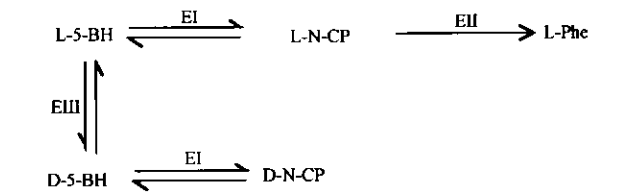


图 4 K1108 乙内酰脲酶立体选择机制
Fig.4 Stereoselectivity mechanism of K1108 hydantoinase

消耗,乙内酰胺消旋酶(EIII)催化的消旋反应向生成 L-型异构体的方向移动,使 L-5-BH 随时得到补充,直至所有外消旋的底物全部转化为 L-苯丙氨酸。N-氨甲酰氨基酸水解酶是 K1108 乙内酰胺酶系中决定产物立体结构的关键酶。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHANG W C(张惟材). An Overview of Microbial Hydantoinases Research. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 1999, 10(2): 141 ~ 144
- [2] Sylatak C and May O. Microbial hydantoinase-industrial enzymes from the origin of life? *Appl Microbiol*, 1999, 51(3): 293 ~ 309
- [3] ZHANG W C(张惟材), SHA Y(沙沂), SONG A H(宋爱华) *et al.* Isolation and Identification of a Hydantoinase Producing Strain *Arthrobacter* K1108. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 1999, 10(3): 161 ~ 163
- [4] ZHANG W C(张惟材), SONG A H(宋爱华), SHA Y(沙沂) *et al.* Identification of Bioconversion Product with *Arthrobacter* K1108 Hydantoinase. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 1999, 10(3): 164 ~ 166
- [5] Nishida Y, Nakamichi K, Nabe K *et al.* Enzymatic production of L-tryptophan from DL-5-indolylmethylhydantoin by *Flavobacterium* sp. *Enzyme-Microb. Technol*, 1987, 9(12): 721 ~ 725
- [6] Gross C, Sylatak C, Mackowiak V *et al.* Production of L-tryptophan from D, L-5-indolylmethylhydantoin by resting cells of a mutant of *Arthrobacter* species (DSM 3747). *J Biotechnol*, 1990, 14(3 ~ 4): 363 ~ 376
- [7] Sylatak C, Cotoras D, Dombach G *et al.* Substrate- and stereospecificity, induction and metallo-dependence of a microbial hydantoinase. *Biotechnol. Lett*, 1987, 9(1): 25 ~ 30
- [8] ZHANG W C(张惟材), HAO S F(郝淑凤), YUAN H J(袁红杰) *et al.* Studies on hydantoinase producing conditions of *Arthrobacter* K1108. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), to be published.

Studies on Bioconversion Conditions and Stereoselectivity of *Arthrobacter* K1108 Hydantoinase

ZHANG Wei-Cai¹* YUAN Hong-Jie¹ HAO Shu-Feng² PENG Qing-Zhong¹
WANG Shu-Jin² ZHU Hou-Chu¹ HUANG Liu-Yu¹

¹ (Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

² (Institute of Ecology, Chinese Academy of Science, Shenyang 110015, China)

Abstract The bioconversion conditions of hydantoinase of *Arthrobacter* K1108 were studied. It was shown that the optimum temperature of the enzyme is 55 °C, and the optimum pH is 7.0. The enzyme can be activated by Co²⁺ and Fe²⁺, while inhibited by Ca²⁺. The optimal substrate of the hydantoinase is 5-benzylhydantoin, while 5-phenylhydantoin and 5-indolylmethylhydantoin cannot effectively digested, showing a high specificity on the substrates. An investigation on the hydantoinase stereoselectivity mechanism showed that the N-carbamoylamino acid hydrolase is stereoselective but the hydantoin hydrolase is not.

Key words *Arthrobacter*, hydantoinase, bioconversion conditions, substrate specificity

Received: May 15, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948827; Fax: 86-10-63895646; E-mail: zhangwc@nic.bmi.ac.cn

本刊征订启事

《生物工程学报》2002 年征订工作已经开始,定价仍与今年相同,每期 23 元,全年 138 元。邮发代号为 82-13,欢迎广大读者踊跃前往邮局订阅,也可直接到编辑部预订,不收邮费。

《生物工程学报》编辑部

2001 年 9 月