

研究报告

类肌肽 4(5)-丙氨酰胺-5(4)-羧酸咪唑的酶促合成及表征

周小华¹, 苏霞利¹, 陆瑶²

1 重庆大学化学化工学院, 重庆 400030

2 四川文理学院材料系, 自贡 643000

摘要: 肌肽(β -Ala-L-His)是一种高效抗氧化剂, 广泛应用于生物、化工、医药等领域。应用微水相酶促合成类肌肽, 效率高价格低, 且具有相似性质, 开发前景广阔。本研究以 L-丙氨酸和 4,5-二羧酸咪唑制备类肌肽 4(5)-丙氨酰胺-5(4)-羧酸咪唑, 正交实验下的最佳合成条件为: 四氢呋喃:pH 8 磷酸缓冲溶液 = 10:1.6 (V/V), L-丙氨酸:4,5-二羧酸咪唑=1:3 (m/m), α -胰凝乳蛋白酶:底物=1:200(m/m), 35°C 下磁力搅拌 1.5 h。硅胶 G60 薄层色谱(TLC)分离反应产物, R_f =0.81 处出现新斑点; 刮下该点纯化后进行紫外扫描, 高效液相色谱(HPLC)和核磁共振, 紫外光谱 253 nm 处吸收明显增强, 310 nm 处出现新吸收峰; 253 nm、310 nm、330 nm 高效液相色谱保留时间均为 4.0 min; ¹³C 核磁共振显示 8 组碳原子。结合胰凝乳蛋白酶的催化机理, 得出产物结构为 4(5)-丙氨酰胺-5(4)-羧酸咪唑。

关键词: 类肌肽, 4(5)-丙氨酰胺-5(4)-羧酸咪唑, α -胰凝乳蛋白酶, 非水相, 合成

Enzymatic synthesis and characterization of a carnosine analogue in non-aqueous solvent

Xiaohua Zhou¹, Xiali Su¹, and Yao Lu²

1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China

2 Department of Materials, Sichuan Arts and Science University, Zigong 643000, China

Abstract: Carnosine (β -Ala-L-His) has high antioxidant activity, and it is widely used in biology, chemical engineering, medicine and other fields. Its analogue synthesised in non-aqueous solvent and catalyzed by enzymes is high-effective but low-price, so it has great prospect. Here, we synthesized a carnosine analogue imidazole 4(5)-alanylamine-5(4)-carboxylic acid with imidazole-4,5-dicarboxylic acid and L-Alanine as substrates, α -chymotrypsin as catalyst in tetrahydrofuran (THF) solvent. Based on the orthogonal experiments, the optimized synthetic conditions are 4,5-dicarboxylic acid : L-alanine = 1:3 (m/m), α -chymotrypsin : substrates (4,5-dicarboxyl acid and L-alanine) = 1:200 (m/m), pH 8 phosphate buffer:THF = 1.6:10 (V/V), reaction temperature 35°C, time 1.5 h. We separated the product with silica gel G60 thin-layer chromatography (TLC), and a new spot appeared at R_f (ratio to front) = 0.81; then the new spot was purified and characterized with UV spectra, high performance liquid chromatogram (HPLC) and ¹³C NMR (¹³C nuclear magnetic resonance). The UV spectra shows a new absorption peak at 310 nm, and the peak in 253 nm is largely strengthened; HPLC reserve times are all 4.5 min at 253 nm, 310 nm, 330 nm; ¹³C NMR shows 8 carbons. Combing with the catalytic mechanism of α -chymotrypsin, structure of the analogue is confirmed, i.e. imidazole 4(5)-alanylamine-5(4)-carboxylic acid.

Keywords: carnosine analogue, imidazole 4(5)-alanylamine-5(4)-carboxylic acid, α -chymotrypsin, non-aqueous solvent, synthesis

Received: July 29, 2009; Accepted: November 10, 2009

Corresponding author: Xiaohua Zhou. Tel: +86-23-65111179; Fax: +86-23-65111179; E-mail: zhou65306590@tom.com

肌肽(β -丙氨酸-L-组氨酸, Carnosine)是发现于多数脊椎动物骨骼肌中的水溶内源性二肽, 由肌肽合成酶以 β -丙氨酸和 L-组氨酸为底物合成, 具有抗氧化、增强免疫、调节酶活力、缓冲 pH 和神经传导等生理功能。其中最主要的是抗氧化, 如捕获活性氧成分和自由基、螯合金属离子、抑制血红蛋白、核黄素和脂肪氧合酶催化的脂质氧化、保护超氧化物歧化酶等, 受到广泛关注^[1-5]。

目前肌肽的制备方法主要有两种^[6], 一是直接从肌肉中提取分离, 该法获得的产品具有最高抗氧化活性, 但肌肉中肌肽浓度一般在 5~70 mmol/L, 含量低, 提取分离程序复杂且收率和纯度均低, 制备成本极高^[7]; 二是化学合成, 该法虽产率较高, 但在合成时必须使用保护基团的氨基酸, 合成后则须脱除保护基团, 产生大量污染环境的有机废水。因而, 有必要开发高效率、绿色及低成本的肌肽或其类似物合成的新方法。

肌肽的抗氧化机制源于组氨酸咪唑基与酰胺键的共轭效应^[8-9], 肌肽咪唑环上的 N 既是路易斯酸又是路易斯碱, 还可与过渡金属离子配位成键, 它们与 β -丙氨酸的游离氨基一起, 成为肌肽发挥生物学功能的主要官能团。从理论上讲, 将含咪唑及氨基的小分子缩合, 制备出的物质也应具有相似的抗氧化活性。

Zaks 和 Klivanov^[10]发现, 在 99% 的有机介质中, 猪胰脂肪酶可催化三丁酸甘油酯与醇的酯交换反应, 从而开拓了非水相酶促合成的新领域。非水相中酶不溶解, 其活性部位与水溶液酶的构象一致, 温度、pH 稳定性等均提高, 保持酶催化反应的高度专一性, 水解酶的催化方向发生逆转, 成为合成酶, 且底物溶解性增大。因此, 在非水相中进行酶促反应既保持反应的专一性, 又可在温和条件下进行, 还可减少分离纯化步骤^[11], 是一种很有发展潜力的定向合成新方法, 已经逐渐应用于肽类等的制备中。Miyazawa 等^[12]以杆状蛋白酶为催化剂, 在含微量水的乙腈溶剂中催化合成二肽, 产率较高。Klein 等^[13]研究了枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 在不同极性有机溶剂中催化肽键的合成, 改变含水量, 在一定的范围内, 产率随含水量的降低而增大。Quiroga 等^[14]以半

胱氨酸蛋白酶为催化剂, 在含微量水的有机溶剂中催化合成苦味二肽前体 Z-Ala-Phe-OMe。目前, 有机溶剂中酶促合成短肽的底物一般是保护基团的氨基酸衍生物, 与化学合成法相比较, 仅降低了反应温度, 优势不明显, 必须设法以氨基酸替代保护基团的氨基酸衍生物。

酶反应的中间产物学说指出, 酶首先须与底物形成中间产物, 然后再形成产物, 酶作用的专一性指的是对作用底物构象等的选择性。18 种蛋白质氨基酸的构象均不同, 可能被酶识别, 所以氨基酸底物完全可能替代氨基酸衍生物用于酶促短肽合成。目前以氨基酸为底物直接合成肽的文献鲜有报道^[15]。

医药中间体 4,5-咪唑二羧酸主要用于合成头孢咪唑。该分子与组氨酸类似, 具有典型的芳香性, 可能接受 α -胰凝乳蛋白酶的专一性催化, 且与组氨酸相比较, 价格便宜; 同时咪唑环¹N 上的氢可在¹N 和³N 间进行可逆迁移, 这种迁移使得环上的 C-4 和 C-5 等同, 即咪唑的两个互变异构体为同一物质, 因此, 以其为底物酶促合成的肌肽类似物结构也仅一种。本研究在四氢呋喃(THF)非水体系中, 以 α -胰凝乳蛋白酶为催化剂, 4,5-二羧酸咪唑和 L-丙氨酸为底物, 研究合成类肌肽 4(5)-丙氨酸-5(4)-羧酸咪唑的主要工艺条件, 旨在获得一种可替代肌肽的新型抗氧化剂, 直接食用或用于食品和药品抗氧化, 延长保质期。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

4,5-二羧酸咪唑(99%)、L-丙氨酸(L-Ala)和 α -胰凝乳蛋白酶(~4000 ATEU/mg)均为生物纯; 盐酸、冰乙酸、氢氧化钠、四氢呋喃(THF)、吡啶、正丁醇、羧甲基纤维素钠(CMC)、硅胶 G60 和重水均为分析纯; 实验用水均为双蒸水。

85-1 型恒温磁力搅拌器(江苏中大仪器厂), YLE-I 手提式紫外灯(北京亚力恩科学器材公司), FD-1 冷冻干燥机(北京德天佑分析仪器有限公司), 岛津紫外可见分光光度计 UV-2450/2550(日本岛津), 1100 型 HPLC(安捷伦仪器公司(英国)), AV500MHZ

型核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司), TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 类肌肽合成实验

用一定 pH 的磷酸盐缓冲溶液将按一定比例混合的底物 L-丙氨酸、4,5-二羧酸咪唑及适量酶润湿, 后加入 10 mL 有机溶剂, 夹套反应器中磁力搅拌下恒温反应一段时间后, 于 10 000 r/min 的台式离心机中离心 10 min, 收集上清液, 用紫外分光光谱扫描。每组均以同质量 120°C 热失活 20 min 的酶反应体系为对照。在单因素实验的基础上进行正交实验, 得到合成类肌肽的最佳条件。

1.2.2 紫外光谱

取 1.2.1 中的离心上清液, 用岛津紫外可见分光光度计 UV-2450/2550 于 200~360 nm 进行紫外差光谱扫描分析。根据紫外扫描结果, 得出类肌肽的最佳合成条件。

1.2.3 薄层层析(TLC)

取 L-丙氨酸标准品, 4,5-二羧酸咪唑标准品和 1.2.1 中获得的离心上清液进行硅胶 G60 薄层层析(TLC)。层析展开剂为吡啶-乙酸-正丁醇-水(20:7:34:12.5), 点样的薄板先在层析缸内饱和 20 min, 再于 25°C 上行展开, 当溶剂距硅胶板前沿约 1 cm 时, 停止层析。冷风吹干溶剂后先分别用 254 nm 和 365 nm 的紫外灯检视层析斑点, 再于 120°C 干燥 1.5 h, 冷却后用碘蒸气显色。测量并计算斑点的 R_f 值, 制作示意图。

1.2.4 冻干粉制备

用不锈钢刀片小心刮下 1.2.3 中层析薄板上的斑点, 用双蒸水反复恒温振荡洗涤数次, 每次洗涤后, 均以 10 000 r/min 速度离心 10 min, 以除去硅胶, 收集并合并上清液, -18°C 预冷冻后转移至真空冻干机, 在压力 14~16 Pa、温度 -56°C~-60°C 下冷冻干燥 20 h, 得到白色冻干粉, 密闭保存。

1.2.5 高效液相色谱

定量冻干粉用 THF:H₂O=10:1.2(摩尔比)充分溶解, 然后进行高效液相色谱分析。色谱条件为: 色谱柱 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 10 μm); 流动相: 乙腈:水=80:20; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 253 nm、

310 nm、330 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 25°C。

1.2.6 ¹³C 核磁共振

适量冻干粉用 D₂O 充分溶解后用 AV500MHZ 型核磁共振谱仪进行 ¹³C 核磁共振实验, 以 TMS 作内标。

2 结果与讨论

2.1 类肌肽合成的最佳条件

参考文献[16], 选取温度、时间、水相 pH 值、酶用量、体系含水量、4,5-二羧酸咪唑:L-丙氨酸(摩尔比)进行单因素实验。结果指出, 在 70 min 内, 类肌肽产率呈线性增加; 70 min 时达到平衡, 产率为 51.7%; 胰凝乳蛋白酶的温度活力区间为 30°C~50°C, 在最适温度 37°C 时产率达到 49%; 胰凝乳蛋白酶的 pH 活力区间为 6.0~8.5, 在最适 pH 8.5 时产率为 55%; L-Ala/4,5-二羧酸咪唑=1:1(mol/mol), α-胰凝乳蛋白酶/L-Ala≤0.04(mol/mol), 类肌肽产率与 α-胰凝乳蛋白酶用量呈正相关, 在最佳比例(0.04, mol/mol)时, 产率达 47%; L-Ala/4,5-二羧酸咪唑(mol/mol)≤1.5, 类肌肽产率与该比例呈正相关; 在最佳比例(1.5)时, 产率为 47%, 比例在 1.5~2.5 范围内时产率恒定; 体系含水量小于 10%(V/V), 4-羧基,5-丙氨酰胺咪唑产率随含水量增加而升高, 含水量为 14%(V/V)时, 产率达到 49.7%, 含水量大于 14%时, 产率则随含水量降低。

在单因素实验的基础上, 本研究设计了 L₂₅(6⁵) 正交实验(表 1), 以期获得最优化合成条件。其中选择了温度、时间、水相 pH 值、酶的用量、微水相体系含水量和底物比例(4,5-二羧酸咪唑:L-丙氨酸, 质量比, 总质量为 0.200 g)因素, 根据单因素实验的结果来选择各因素的水平, 每个处理重复 3 次, 实验结果见表 1。

从表 1 极差分析结果可见, 用 4,5-二羧酸咪唑和 L-丙氨酸为底物合成肌肽类似物的最佳条件为 A2B3C5D1E5F2。即反应温度为 35°C; 反应时间为 1.5 h; 整个体系(0.200 g 底物)酶的用量为 1 mg; pH 8 微水相体系中 10 mL THF 中含水量为 1.6 mL; 两底物比例 4,5-二羧酸咪唑/L-丙氨酸=3:1。在最佳条件下进行合成肌肽类似物实验, 所测得的平均产率为 63.4%。

表 1 肽类似物合成正交实验结果分析

Table 1 Results analysis of the orthogonal of the synthesized simulacrum

| No. | Factors | | | | | | Yield (%) |
|---------|---------|--------|---------------------|--------|--------|--------|-----------|
| | A | B | C | D | E | F | |
| 1 | 30(1) | 0.5(1) | 6.0(1) | 1(1) | 0(1) | 1/1(1) | 0.071 |
| 2 | 30 | 1.0(2) | 7.0(2) | 2(2) | 0.4(2) | 1/3(2) | 10.206 |
| 3 | 30 | 1.5(3) | 8.0(3) | 3(3) | 0.8(3) | 1/9(3) | 22.037 |
| 4 | 30 | 2.0(4) | 9.0(4) | 4(4) | 1.2(4) | 3/1(4) | 2.828 |
| 5 | 30 | 2.5(5) | H ₂ O(5) | 5(5) | 1.6(5) | 9/1(5) | 50.084 |
| 6 | 35(2) | 0.5 | 8.0 | 4 | 0.4 | 9/1 | 32.565 |
| 7 | 35 | 1.0 | 9.0 | 5 | 0.8 | 1/1 | 2.515 |
| 8 | 35 | 1.5 | H ₂ O | 1 | 1.2 | 1/3 | 63.404 |
| 9 | 35 | 2.0 | 6.0 | 2 | 1.6 | 1/9 | 19.477 |
| 10 | 35 | 2.5 | 7.0 | 3 | 0 | 3/1 | 0.018 |
| 11 | 40(3) | 0.5 | H ₂ O | 2 | 0.8 | 3/1 | 10.092 |
| 12 | 40 | 1.0 | 6.0 | 3 | 1.2 | 9/1 | 0.945 |
| 13 | 40 | 1.5 | 7.0 | 4 | 1.6 | 1/1 | 12.720 |
| 14 | 40 | 2.0 | 8.0 | 5 | 0 | 1/3 | 0.053 |
| 15 | 40 | 2.5 | 9.0 | 1 | 0.4 | 1/9 | 4.105 |
| 16 | 45(4) | 0.5 | 7.0 | 5 | 1.2 | 1/9 | 3.152 |
| 17 | 45 | 1.0 | 8.0 | 1 | 1.6 | 3/1 | 2.568 |
| 18 | 45 | 1.5 | 9.0 | 2 | 0 | 9/1 | 0.018 |
| 19 | 45 | 2.0 | H ₂ O | 3 | 0.4 | 1/1 | 10.297 |
| 20 | 45 | 2.5 | 6.0 | 4 | 0.8 | 1/9 | 0.907 |
| 21 | 50(5) | 0.5 | 9.0 | 3 | 1.6 | 1/3 | 0.157 |
| 22 | 50 | 1.0 | H ₂ O | 4 | 0 | 1/9 | 0.036 |
| 23 | 50 | 1.5 | 6.0 | 5 | 0.4 | 3/1 | 0.121 |
| 24 | 50 | 2.0 | 7.0 | 1 | 0.8 | 9/1 | 0.116 |
| 25 | 50 | 2.5 | 8.0 | 2 | 1.2 | 1/1 | 0.311 |
| I | 17.045 | 9.207 | 4.304 | 14.053 | 0.039 | 5.183 | |
| II | 23.596 | 3.254 | 5.242 | 8.021 | 11.459 | 18.455 | |
| III | 5.583 | 19.660 | 11.507 | 6.691 | 7.133 | 8.286 | |
| IV | 3.388 | 6.554 | 1.925 | 9.811 | 14.128 | 3.125 | |
| V | 0.148 | 11.085 | 26.783 | 11.185 | 17.001 | 16.746 | |
| Range R | 23.448 | 16.406 | 24.858 | 7.362 | 16.962 | 15.330 | |

表 2 正交试验各因素方差分析

Table 2 Results analysis of variance of the orthogonal test

| Factors | Variance | Free degree | F | F _{0.10} | Significance |
|------------------|----------|-------------|--------|-------------------|--------------|
| Temperature | 1973.751 | 4 | 12.064 | 4.110 | ** |
| Time | 762.458 | 4 | 4.660 | 4.110 | * |
| Water content | 878.044 | 4 | 5.367 | 4.110 | * |
| pH value | 2021.018 | 4 | 12.353 | 4.110 | ** |
| Enzyme dosage | 163.608 | 4 | 1.000 | 4.110 | |
| Substrates ratio | 883.368 | 4 | 5.399 | 4.110 | * |
| Error term | 163.61 | 4 | | | |

**: significant; *: less significant.

对试验数据进行方差计算,以酶量为误差项,得到表2,由表2可以得出结论,试验的数据经过计算得到的 $F > F_{0.10}$,则该 F 值在 $\alpha = 0.10$ 水平上显著,说明试验数据的可信度为90%。

方差分析结果表明,温度和pH值对肌肽类似物合成反应产率的影响极显著;而微水相体系中的含水量、时间和底物比例对产率的影响显著。因此在合成肌肽类似物的合成反应中应严格控制这些条件。

2.2 肌肽类似物的紫外光谱

图1是最佳合成条件下的检测结果,4,5-二羧酸咪唑在253 nm有紫外吸收,而类肌肽在253 nm吸收峰明显加强,且出现了310 nm的新吸收。这是因为产物中形成了酰胺键,根据Woodward-Fieser规则^[17],每增加一个-NR₂取代,紫外吸收红移60 nm,实际测得数据与此一致。由此可知产物中生成了酰胺键,即合成出了类肌肽,其结构见图2,由于4,5-二羧酸咪唑C-4和C-5是等同的,因而这两种结构等同。

2.3 薄层色谱(TLC)

图3是硅胶G60薄层层析分离的示意图。与反应前相比较,反应后出现一个新斑点,说明有新物

质生成。测量并计算各点的 R_f 值,L-Ala,4,5-二羧酸咪唑和产物的 R_f 分别为0.42、0.60和0.81,制作示意图,见图3。展开剂为吡啶-乙酸-正丁醇-水,其比例为20:7:34:12.5(V/V/V/V),其极性值分别为5.3、6.2、3.9和9.0,根据混合溶剂极性的计算公式^[18],得到展开剂的平均极性值为5.37,因此是极性展开剂。在硅胶G60极性载体上,使用极性展开剂,样品的极性越小,其 R_f 越大。说明新物质极性最小,这是由于与L-Ala反应生产肽键,封闭了一个羧基,且碳链加长,使极性减小所致。只出现一个点,说明只生成一种新物质。

2.4 高效液相色谱(HPLC)

图4是冻干粉高效液相色谱的检测结果。在不同波长253 nm、310 nm、330 nm下,该物质都有相同的出峰时间(4.0 min),且基线平滑,说明冻干样品纯净,可以利用此样品进行核磁共振实验。

2.5 ¹³C核磁共振

图5是冻干粉¹³C核磁共振的结果。可以看出产物分子内存在8组碳原子,分别归属为:C₉(δ 185.376 ppm),

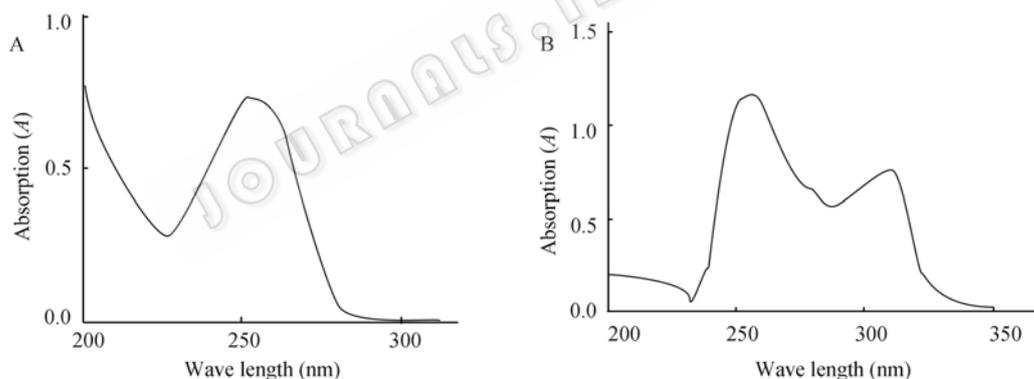


图1 4,5-二羧酸(A)和类肌肽(B)的紫外光谱
Fig. 1 UV spectrum of imidazole 4,5-dicarboxylic acid (A) and carnosine analogue (B).

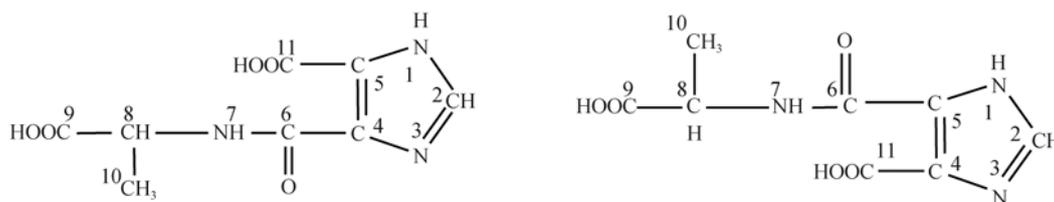


图2 产物4(5)-丙氨酰胺-5(4)-羧酸咪唑的结构
Fig. 2 Structure of imidazole 4(5)-alanylamine-5(4)-carboxylic acid.

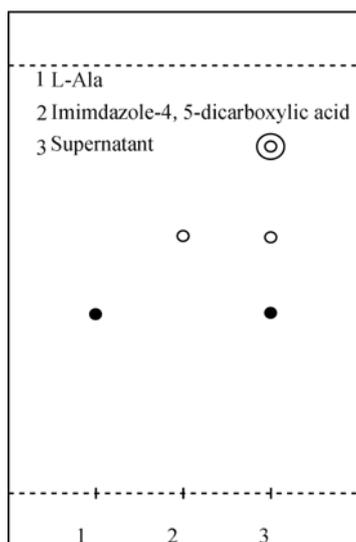


图 3 L-丙氨酸、4,5-二羧酸咪唑和上清液的 TLC 示意图
Fig. 3 Schematic diagram of L-Ala, imidazole-4,5-dicarboxylic acid and supernatant.

C11 (δ 181.498 ppm), C6(δ 145.730 ppm), C2 (δ 144.417 ppm), C4 和 C5(δ 128.086 ppm), C8(δ 58.848 ppm), C10(δ 23.271 ppm)。

3 类肌肽结构推导

α -胰凝乳蛋白酶的活性中心的结构是由 Ser-195、His-57 和 Asp-102 组成, X-衍射分析表明, Ser-195 和 His-57 邻近, Asp-102 在蛋白质分子内部, 也靠近 His-57, 这 3 个氨基酸构成了催化组合, 其中和底物直接作用的是 Asp-102 的 OH 基和 His-57 的咪唑基, Ser-195 也参与电子传递。

Asp-102 的羧基处于 His-57、Ala-55、Cys-58、Ile-199、Tyr-94、Ser-124 所形成的疏水的微环境中, 使质子不能接近而保持解离状态。当 pH 在中性以上, 即 His-57 的咪唑基的亚氨基(>NH)能解离的条件下

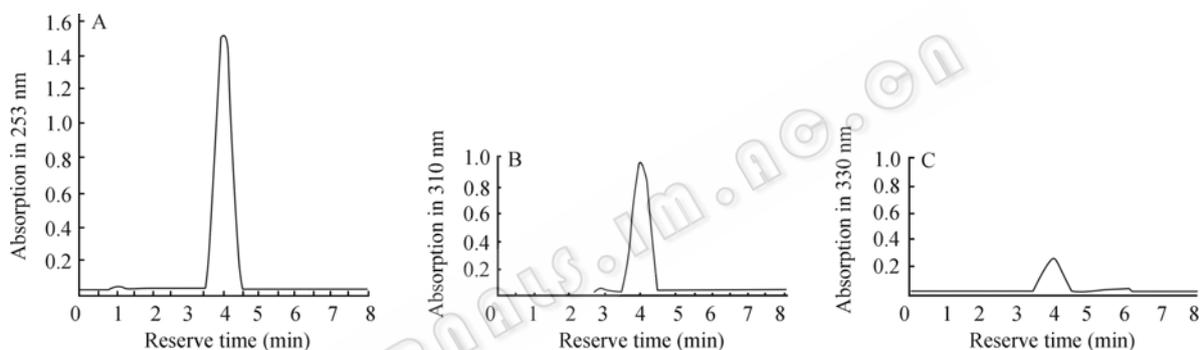


图 4 类肌肽在 253 nm(A)、310 nm(B)、330 nm(C)下的高效液相色谱
Fig. 4 HPLC of imidazole 4-carboxylic acid-5-ananylamide at 253 nm, 310 nm, 330 nm.

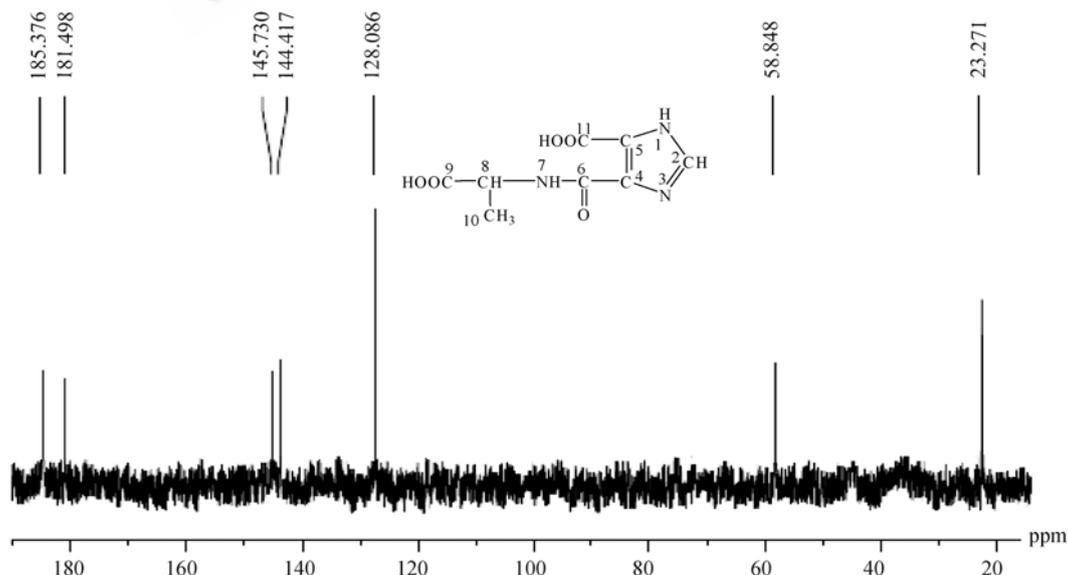


图 5 类肌肽的 ^{13}C NMR 图
Fig. 5 ^{13}C -NMR of the carnosine analogue.

($pK=6.7$), 可提供一个质子, 使 Asp-102 的羧基结合成 $-COOH$, 其电子则通过氢键和咪唑环被传递到 Ser-195 上, 结果使催化部位上的 Ser-195 的羟基氧形成活化的阴离子状态。

在微水相体系中, 酶分子活性中心获得足量的“必需水”后显示出“柔性”结构。4, 5-二羧酸咪唑在微水相体系中有一定的溶解度, 在溶液中 4, 5-二羧酸咪唑 5 位羧基 C 带有更多的正电荷, 而 L-Ala 的 N 带有更多的负电荷。

当两底物进入活性部位时, Ser-195 的羟基氧原子对底物进行亲核攻击, 一个质子从 Ser-195 的羟基传递到 His-57, 此时 Asp-102 的羧基与 His-57 带正电荷的咪唑基形成氢键, 使组氨酸正确定位。这样, 3 个氨基酸侧链构成了一个电荷接力系统, 在催化底物反应中, 直接参与电子的接受和传递。

Ser-195 活化的羟基氧阴离子攻击底物 4,5-二羧酸咪唑羧基上的羰基氧, 同时 His-57 咪唑环上的亚氨基与 L-Ala 羧基上的 O 形成氢键, 生成中间产物。然后中间产物脱水形成酰胺键, 生成类肌肽。酶重新游离出来进行下一次催化反应。反应过程如图 6 所示, 由于 C-4、C-5 等效, 因而本图只列出了 C-4 位上的反应过程。

4 结论

在单因素实验基础上进行的 $L_{25}(6^5)$ 正交实验结果指出, 合成类肌肽的最佳条件为: L-丙氨酸:4,5-二羧酸咪唑=1:3 (m/m), 催化剂 α -胰凝乳蛋白酶用量为底物总质量的 1/200, pH 8 磷酸缓冲溶液/THF = 1.6 : 10 (V/V), 反应温度 35°C , 磁力搅拌反应 1.5 h, 在此条件下合成物的产率为 63.4%。温度和 pH 值极

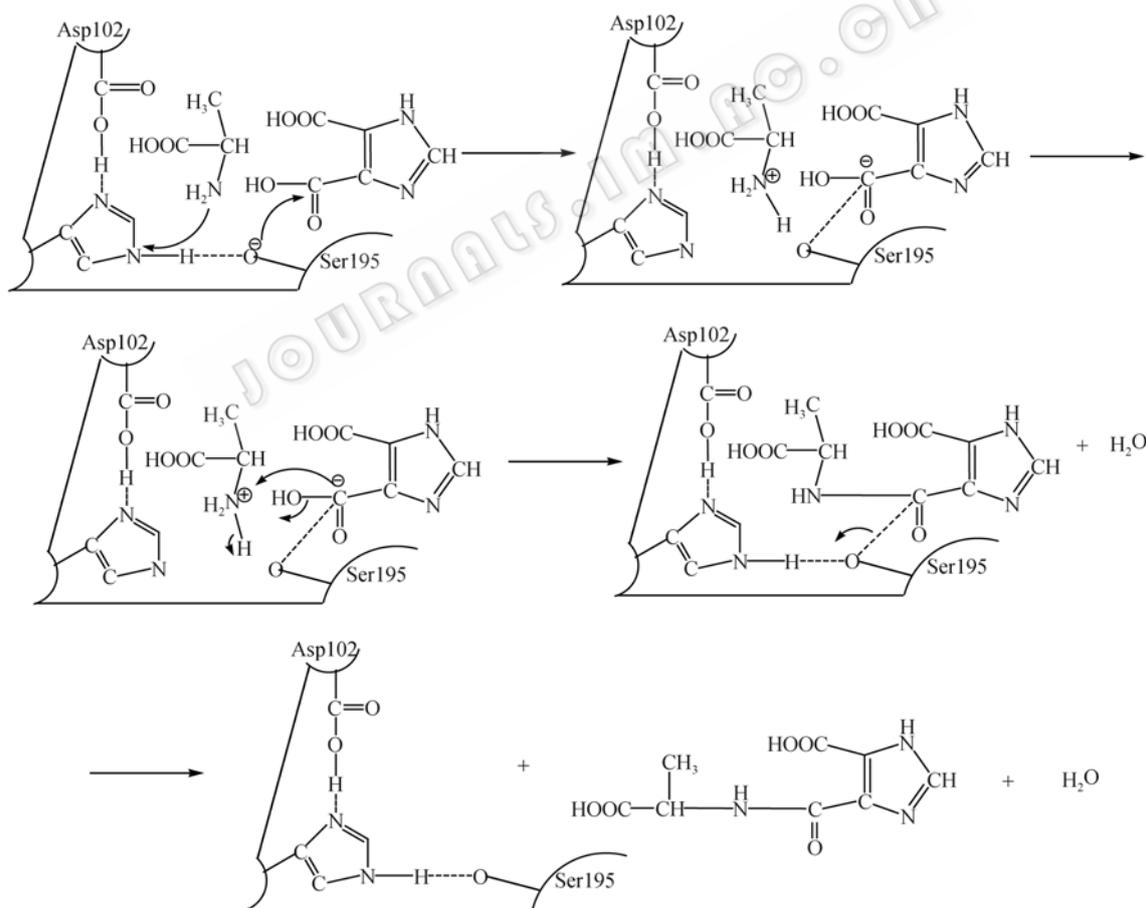


图 6 类肌肽酶催化合成的机理

Fig. 6 Mechanism of the carnosine analogue synthesis catalyzed by α -Chymotrypsin.

显著影响合成反应的产率, 而体系含水量、时间和底物比例的影响显著。硅胶 G60 纯化合成物的 R_f 为 0.81, 利用紫外光谱、HPLC、 ^{13}C NMR 对其进行表征, 并根据 α -胰凝乳蛋白酶作用机制推导确证: 其结构为 4(5)-丙氨酸-5(4)-羧酸咪唑互变异构体。该方法合成类肌肽, 快速高效, 产物易分离, 但由于底物溶解度均较小, 需要及时分离产物。

REFERENCES

- [1] Nevidimava T, Prokopyeva V, Najdenova N, *et al.* Effects of anti-oxidant carnosine on immunity in addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2003, **13**(Sup1): S25.
- [2] Deaker EA. Strategies for manipulating the prooxidative /anti-oxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol*, 1998, **9**(6): 241–248.
- [3] Zhao G, Zhao L, Xiong Y. The extract method and the antioxidant functions of carnosine. *Anim Sci Abroad*, 2000, **27**(6): 42–45.
赵赣, 赵利, 熊瑜. 肌肽的提取及其抗氧化特性. 国外畜牧科技, 2000, **27**(6): 42–45.
- [4] Han LQ, Yang GY, Wang YL. Scavenging effect of carnosine on DPPH radical. *J Henan Agri Univ*, 2006, **40**(2): 164–167.
韩立强, 杨国宇, 王艳玲. 肌肽对 DPPH 自由基清除效果的研究. 河南农业大学学报, 2006, **40**(2): 164–167.
- [5] Wang AM, Dong J, Wang BA *et al.* Comparison of scavenging effect of carnosine and SOD on radical. *Basic Clinic Med*, 1995, **15**(1): 74.
王爱民, 董军, 王保安, 等. 肌肽和 SOD 对自由基清除作用的比较. 基础医学与临床, 1995, **15**(1): 74.
- [6] Robert HS, Vigneaud V. A new synthesis of carnosine: with some observations on the splitting of the benzyl group from benzylthio ethers. *Biol Chem*, 1935, **108**: 753–761.
- [7] Zheng YG, Wang YS, Xue YP, *et al.* Production and Application of Anti-oxidant Agent. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 273–277.
- [8] Decker EA. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol*, 1998, **9**(6): 241–248.
- [9] Muszkat L, Feigelson L, Bir L, *et al.* Titanium dioxide photocatalyzed oxidation of proteins in biocontaminated waters. *J Photochem Photobiol B*, 2001, **60**(1): 32–36.
- [10] Zaks A, Klivanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 3192–3196.
- [11] Yuan QS, Zhao J. Enzymes and Enzyme Engineering. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2005: 172–178.
袁勤生, 赵健. 酶与酶工程. 上海: 华东理工大学出版社, 2005: 172–178.
- [12] Toshifumi M, Shino M, Kayoko T, *et al.* Peptide syntheses mediated by *Bacillus subtilis* protease. *J Pept Sci*, 2003, **10**: 83–87.
- [13] Juwe K, Alexandra P, Vaclav C. The applicability of subtilisin *Carlsberg* in peptide synthesis. *J Pept Sci*, 2000, **6**: 541–549.
- [14] Quiroga E, Priolo N, Obregon D. Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (*Asclepiadaceae*) fruit. *Biochem Eng J*, 2008, **39**: 115–120.
- [15] Fernandez MM, Margot AO, Falender CA, *et al.* Enzymatic synthesis of peptides containing unnatural amino acids. *Enzyme Microb Technol*, 1995, **17**: 964–971.
- [16] Zhang XZ, Wang X, Chen SM, *et al.* Protease-catalyzed small peptide synthesis in organic media. *Enzyme Microb Technol*, 1996, **19**: 538–544.
- [17] Pretsch E, Buhlmann P, Affolter C, *et al.* Spectral Data Table to Resolve the Structure of Organic Compounds. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2000: 387.
- [18] Shi JJ, Ma XZ. Chromatography Methods. Chongqing: Chongqing University Press, 1995: 176.
史景江, 马熙中. 色谱分析法. 重庆: 重庆大学出版社, 1995: 176.