

药用氨基酸的应用及其生物催化与生物转化法生产

王远山, 徐建妙, 陈小龙, 郑裕国* (浙江工业大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310032)

摘要:目的 对药用氨基酸的应用及其生物催化与生物转化法生产进展进行综述。方法 查阅 10 余年来有关药用氨基酸的应用及其生物催化与生物转化法生产研究的国内外文献。结果 药用氨基酸在疾病治疗和药物合成方面的应用广泛, 生物催化和生物转化在药用氨基酸的生产中起的作用越来越重要。结论 应加强生物催化和生物转化法制备药用氨基酸的研究。

关键词: 药用氨基酸; 生物催化与转化

中图分类号: R915.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)09-0825-04

Applications, biocatalytic synthesis and biotransformation of pharmaceutical amino acids

WANG Yuan-shan, XU Jian-miao, CHEN Xiao-long, ZHENG Yu-guo (Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310032)

ABSTRACT: OBJECTIVE To review the development of the applications, biocatalytic synthesis and biotransformation of pharmaceutical amino acids. **METHOD** To retrospect the domestic and foreign literature about the research on the applications, biocatalytic synthesis and biotransformation of pharmaceutical amino acids in the past 10 years. **RESULTS** Pharmaceutical amino acids are widely applied in disease treatment and pharmaceutical synthesis. Biocatalysis and biotransformation plays an increasingly important role in the production of pharmaceutical amino acids. **CONCLUSION** The research on biocatalytic synthesis and biotransformation of pharmaceutical amino acids should be strengthened.

KEY WORDS: pharmaceutical amino acids; biocatalysis and biotransformation

氨基酸是合成生物体蛋白质、激素、酶及抗体的原料, 因为在其分子结构中都有不对称碳原子存在, 除甘氨酸外, 氨基酸分子都具有光学活性, 即具有 L-型和 D-型异构体。氨基酸的构型对其生物学活性具有重要的影响, 在一般情况下只有 L-型氨基酸具有生物活性。

随着对氨基酸研究的不断深入, 对氨基酸及其衍生物的生物学的功能的了解日益透彻, 氨基酸的应用范围也越来越广泛。在 20 世纪 60 年代初, 氨基酸主要用作鲜味调料, 60 年代后期开始用作饮料添加剂, 70 – 80 年代用于营养制剂; 90 年代以后用于医药保健、食品添加剂、日用化工、农药等。在自然界中已经发现了近 400 种氨基酸, 用于医疗和医药合成的药用氨基酸包括组成蛋白质的 20 种天然氨基酸和多种非天然氨基酸, 如各种 D-氨基酸。

1 药用氨基酸的应用和发展趋势

1.1 应用现状: 氨基酸在人体内参与正常的代谢和生理活动, 是治疗蛋白质代谢紊乱、蛋白质缺损所引起的一系列疾病的重要生化药物。在医药领域, 氨基酸主要用于氨基酸输液和口服氨基酸制剂的生产, 还用作治疗药物、短肽药物和

医药合成原料, 药用氨基酸以氨基酸输液量最大, 2000 年氨基酸输液产量约为 1 亿瓶, 2005 年估计将达到 3 亿-5 亿瓶。在医疗上, 氨基酸输液和口服氨基酸制剂可以用于营养不良、一些疾病患者的营养补充等, 氨基酸及其衍生物在医学上也可以用来治疗肝脏疾病、消化道疾病、呼吸道疾病等多种疾病的治疗药物, 如精氨酸、谷氨酸、 γ -氨基丁酸能用于肝昏迷的治疗; 蛋氨酸、丝氨酸能用于脂肪肝和肝硬化的防治, 蛋氨酸也被用于慢性肝炎、巴比妥类药物引起的中毒性肝炎的治疗; 天冬氨酸可以用于心血管疾病的治疗; 以苯丙氨酸形成的苯丙氨酸氮芥用作癌症等抗恶性肿瘤药; 谷氨酰胺和组氨酸有治疗胃及十二指肠溃疡作用等^[1,2]。

1.2 药用氨基酸应用的趋势: 目前, 氨基酸及其衍生物已逐渐成为合成手性药物重要的药用中间体, 越来越多地应用于新药的研制开发和手性药物的生产中。如 L-脯氨酸是胆碱酯酶抑制剂的合成原料; D-苯甘氨酸和 D-对羟基苯甘氨酸是合成新抗生素的原料; L-缬氨酸是合成环孢菌素的原料; L-苯丙氨酸是合成 HIV 蛋白酶抑制剂和抗肿瘤药物紫杉醇的重要原料; 丙氨酸及天冬氨酸是合成维生素 B6 的原料; β -丙

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (M303049), 浙江省教育厅项目

作者简介: 王远山, 男, 讲师。

* 通讯作者: 郑裕国, 男, 教授, 博士生导师, Tel: 0571-88320630; E-mail: zhengyg@zjut.edu.cn

氨酸是合成泛酸钙的原料;谷氨酸是合成叶酸的原料,色氨酸是合成抗癌药的原料等等。

据国外统计数字表明,1998 年全球 500 种畅销药物中约有 18% (90 种) 使用氨基酸及其衍生物作为基本中间体或关键体;1998 年作为合成药物中间体的氨基酸原料销售额首次超过营养性(输液用)氨基酸原料的确切销售额。目前作为活性药物合成中使用频率最高的几种氨基酸是 L-脯氨酸、D-苯甘氨酸、D-对羟基苯甘氨酸、L-缬氨酸及苯丙氨酸。生产非天然氨基酸等药用氨基酸具有很高的附加值,可以提高氨基酸生产企业的经济效益,同时也可以大力推动新药的研发,具有巨大的经济和社会效益。

2 药用氨基酸及其衍生物的生物催化和转化法生产

在药用氨基酸尤其是 D-氨基酸的生产中,通过生物催化和生物转化法生产的比例越来越高,至今生物催化和转化已涉及羟基化、环氧化、Baeyer-Villiger 反应、脱氢、氢化等氧化还原反应、水解、水合、酯化、酯转移、酰化、胺化、脱羧、脱水、异构化和芳构化等反应^[3,4]。

2.1 L-天冬氨酸-β-脱羧酶催化 L-天冬氨酸脱羧制备 L-丙氨酸

国内学者对 L-丙氨酸酶法生产做了研究,并取得了较好的成果。徐虹等筛选到具有高 L-天冬氨酸-β-脱羧酶酶活的假单胞菌 (*Pseudomonas* Nx-1), 该菌可以高效地转化 L-天冬氨酸生产 L-丙氨酸,摩尔转化率近 100%^[5]。在 800L 气升式发酵罐中进行的游离细胞法转化试验中,每升培养液可以转化 L-天冬氨酸 2kg^[6]。

2.2 L-苯丙氨酸的酶法生产

一种方法是以苯丙酮酸为前体,通过天冬氨酸苯丙酮酸转氨酶催化的转氨反应合成 L-苯丙氨酸,其工艺路线见图 1^[7]。

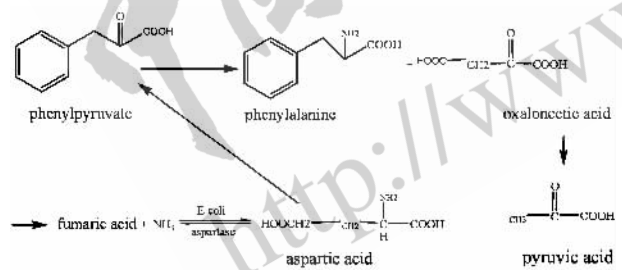


图 1 L-苯丙氨酸的酶法合成

Fig 1 Enzymatic synthesis of L-phenylalanine

潘光亮等筛选到了具有高转氨酶活性的大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 经卡拉胶包埋固定化, 该菌可以连续合成 L-苯丙氨酸, 产率可达 59.6g/L^[8]。储瑞嵩等对具有 L-苯丙氨酸氨解酶酶活的深红酵母 (*Rhodotorula rubra*) 转化反式肉桂酸生产 L-苯丙氨酸的工艺做了研究, 结果表明, 用卡拉胶固定化的该菌株可将 77.7% 的反式肉桂酸转化为 L-苯丙氨酸^[9]。目前, L-苯丙氨酸的酶法生产已经工业化。

2.3 氨基酰化酶法拆分 N-酰基-D, L-氨基酸制备手性氨基酸

氨基酰化酶是可以立体地催化氨基酸衍生物上 N-酰基

基团水解反应的酶, L-氨基酰化酶和 D-氨基酰化酶可以分别催化 N-酰基-L-氨基酸和 N-酰基-D-氨基酸上的乙酰基团的水解反应而得到 L-氨基酸和 D-氨基酸, 其反应过程见图 2^[10]。

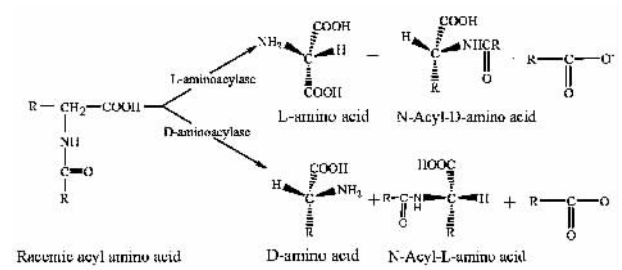


图 2 氨基酰化酶法拆分 N-酰基氨基酸的过程

Fig 2 Resolution of acyl amino acids by aminoacylase

商业化的 L-氨基酰化酶主要来自猪肾和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*), D-氨基酰化酶在假单胞菌 (*Pseudomonas*)、链霉菌 (*Streptomyces*) 和产碱菌 (*Alcaligenes*)^[11] 等微生物中都有分布。国内学者对具有氨基酰化酶的微生物法及氨基酰化酶法拆分 N-酰基-D, L-氨基酸生产 L-氨基酸也进行了研究^[12]。

2.4 乙内酰脲的生物法拆分

乙内酰脲酶是能够催化 5-取代乙内酰脲类化合物水解的一类酶, 在动物、植物和微生物中分布广泛。一般常见的高活性乙内酰脲酶产生菌主要分布在假单胞菌 (*Pseudomonas*)、土壤杆菌 (*Agrobacterium*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、棒杆菌 (*Corynebacterium*) 和放线菌 (*Actinomycetes*) 等属。乙内酰脲酶是由 3 种酶组成的酶系, 包括乙内酰脲消旋酶、乙内酰脲水解酶和 N-氨甲酰氨基酸水解酶。在 3 种酶的协同作用下外消旋底物可以完全转化为特定的手性氨基酸^[13]。

Yokozeki 等^[14] 以醛为原料, 经 Bucherer 反应合成 D, L-5-取代乙内酰脲, 然后用恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的二氢嘧啶酶催化选择性水解为 N-氨甲酰-D-氨基酸, 再经化学或酶法脱氨甲酰基得 D-氨基酸, 由 30g/L D, L-5-对羟基苯乙内酰胺生产 D-对羟基苯甘氨酸, 收率达 92%, 反应过程见图 3。

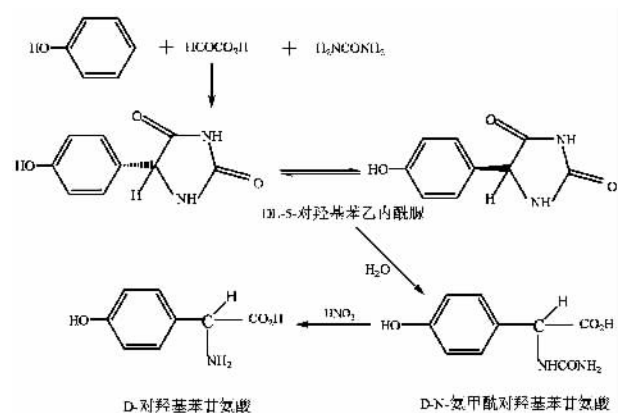


图 3 酶法拆分 D, L-乙内酰脲制备 D-对羟基苯甘氨酸

Fig 3 Production of D-p-hydroxyphenylglycine by enzymatic resolution of DL-p-hydroxyphenylhydantoin

Recordati 等^[15]利用含 D-乙内酰脲酶和能水解 N-甲氧基-D-氨基酸的水解酶的微生物放射土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)一步转化 D, L-对羟基苯乙内酰脲为 D-对羟基苯甘氨酸(图 4),两步酶反应过程的理论收率可达 100%。

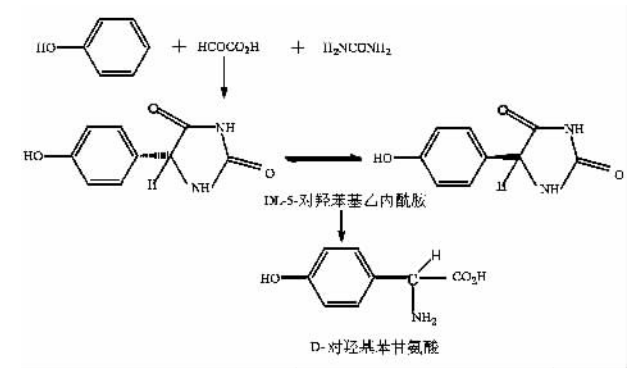


图 4 酶法拆分 DL-对羟基苯乙内酰脲制备 D-对羟基苯甘氨酸

Fig 4 Production of D-p-hydroxyphenylglycine by enzymatic resolution of DL-p-hydroxyphenylhydantoin

2.5 微生物不对称降解外消旋氨基酸制备 D-氨基酸

Umamura 等^[16]筛选到了一株麦芽假丝酵母(*Candida maltosa*),其降解 L-异构体的速度要比降解 D-异构体的快 10 倍,可用作去除 L-异构体的生物催化剂。他们开发了由该菌株不对称降解 DL-丙氨酸生产制备 D-丙氨酸的实用工艺。在最适降解条件下(30℃、pH6.0、通风量 1.0vvm 和振荡(1200r/min))。200g/L DL-丙氨酸按此工艺处理,可得 99.0% 的化学纯和 99.9% 旋光纯度的 D-丙氨酸 90g。

2.6 微生物转化腈类化合物制备 L-氨基酸

Wegman^[17]等筛选到一株具有腈水合酶和酰胺酶的红球菌(*Rhodococcus* sp.),用该菌株催苯乙腈的水解反应,可以得到 D-苯甘氨酸和 L-苯甘氨酸,D-苯甘氨酸和 L-苯甘氨酸相对产量分别为 48% 和 52%,ee 值分别为 99% 以上和 97% 以上。其反应过程见图 5。

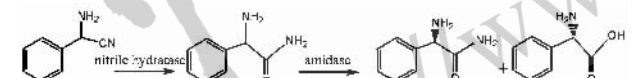


图 5 腈水合酶-酰胺酶转化苯乙腈制备 L-苯甘氨酸

Fig 5 Production of L-phenylglycine by hydration and subsequent hydrolysis of D, L-phenylglycine nitrile with nitrile hydratase and amidase

2.7 L-氨肽酶拆分 D, L-氨基酸酰胺

DSM 公司(Geleen, 荷兰)^[18]采用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)L-氨肽酶拆分 D, L-氨基酸酰胺生产半合成青霉素和头孢菌素类抗生素的重要侧链的 D-苯甘氨酸和 D-对羟基苯甘氨酸。拆分过程中不要的对映体可通过与苯甲醛形成酰胺的 Schiff 碱加合物,在升高 pH 值时发生外消旋化,外消旋氨基酸酰胺经裂解后可以被重复利用。

2.8 药用氨基酸衍生物的生物催化与转化法合成

目前已有多种药用氨基酸的衍生物被用作临床药物,如以 L-蛋氨酸为原料的氨基酸药物腺苷蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM, Adomet)。

腺苷蛋氨酸主要作为甲基供体参与各种酶促转甲基过程,并通过转巯基通路,作为合成牛黄酸、半胱氨酸及谷胱甘肽的前体,在生理上起到重要的作用。是一种广泛应用的肝病及忧郁症治疗药物,对关节炎、纤维性肌痛、偏头痛等疾病也有一定疗效^[19,20]。其生产方法主要是生物转化法,即通过微生物主要是酵母菌腺苷蛋氨酸合成酶(ATP:L-Met S-腺苷酰转移酶[EC2.5.1.6]催化 L-蛋氨酸与三磷酸腺苷(ATP)缩合而成^[21]。

本实验室从筛选到一株能产利用 L-蛋氨酸生产腺苷蛋氨酸的酵母菌株,经多轮诱变,得到了一株高产腺苷蛋氨酸的突变株 Q95,对该突变株以 L-蛋氨酸为底物制备腺苷蛋氨酸的发酵工艺和培养组分进行了优化,在优化的条件下,摇瓶培养 22h 后,发酵液中腺苷蛋氨酸可达 3000μg/mL 以上。在小试中进行了通风机机械搅拌罐和外循环气升式发酵罐发酵试验,结果表明,气升式发酵罐更适合于 SAM 的发酵生产。在自制的 11L 外循环气升式发酵罐补料发酵试验中,接种后 22h 后发酵液中腺苷蛋氨酸含量达到了 2540μg/mL,其发酵曲线见图 6。与国内的研究报告^[22-24]相比, Q₉₅ 具有转化时间短(只需要 24h 左右)、腺苷蛋氨酸产量高(摇瓶培养腺苷蛋氨酸含量就可以达到 3000μg/mL,气升式发酵罐补料发酵试验达到 2540μg/mL)等特点。

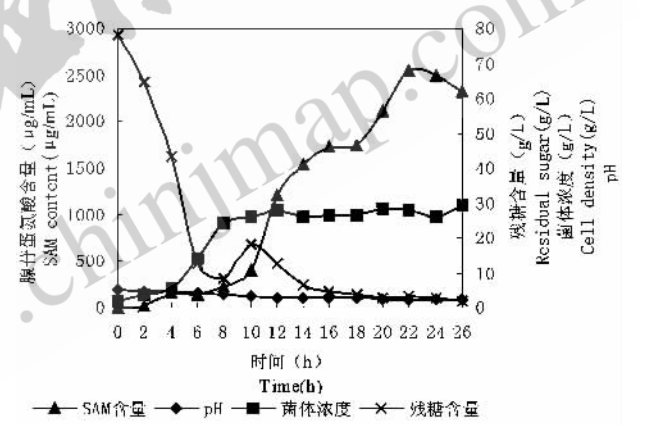


图 6 外循环气升式发酵罐补料发酵生产腺苷蛋氨酸发酵曲线

Fig 6 Fed-batch fermentation of SAM with an external-loop air-lift fermenter

3 展望

由于药用氨基酸及其衍生物已经成为非常重要的药物合成的原料和中间体,其生产技术对氨基酸药品的研发、生产有很大影响,因而日益受到重视。随着生物技术的发展,生物催化和转化技术在药用氨基酸的生产中所起的作用越来越大,虽然还存在着一些不足,如能生产的品种不多、转化效率还有待提高、特异性的生物或酶的筛选方法和改良工作还需要加强等,但随着基因工程、细胞工程、蛋白质工程等的迅速发展以及高通量筛选模式的构建,生物催化和转化技术在药用氨基酸的生产中的前景将更加光明。

参考文献

[1] 刘伟. 氨基酸的进展及应用[J]. 山东轻工业学院学报,

- 1998, 12(2):31.
- [2] 徐琪寿. 氨基酸药理学研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(1):30.
- [3] 梅乐和, 姚善泾, 关怡新, 等. D-氨基酸的生物转化与拆分技术研究的新进展[J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(5):235.
- [4] 黄锁义, 王麟生, 赵海峰. 手性氨基酸的制备及生物活性研究进展[J]. 化学研究与应用, 2003, 15(6):758.
- [5] 徐虹, 王雪根, 刘济瑞, 等. 利用假单胞菌天冬氨酸- β -脱羧酶高效生产 L-丙氨酸[J]. 南京化工学院学报, 1995, 17(1):1.
- [6] 徐虹, 王雪根, 朱建良, 等. L-丙氨酸酶法工业生产的研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(2):17.
- [7] 潘光亮, 何学军, 郑剑. L-苯丙氨酸的生物合成[J]. 南京化工大学学报, 1996, 18(1):89.
- [8] 潘光亮, 欧阳平凯. 利用转氨反应制备 L-苯丙氨酸[J]. 南京化工学院学报, 1994, 16(2):33.
- [9] 储瑞嵩, 钱悦, 李士云, 等. 利用固定化酵母细胞转化反式肉桂酸生产 L-苯丙氨酸[J]. 生物工程学报, 1997, 13(1):70.
- [10] Muniz-Lozano F. E., Dominguez-Sanchez G., Diaz-Viveros Y. *et al.* D-Aminoacylase from a novel producer: *Stenotrophomonas maltophilia* ITV-0595 [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 1998, 21: 296.
- [11] Tripathi C. K. M., Bihari Vinod, Tyagi R. D. Microbial production of D-amino acids [J]. Process Biochem, 2000, 35: 1247.
- [12] 宋正孝, 李晓敏, 王铮等. 固定化米曲霉菌体细胞光学拆分 DL 丙氨酸[J]. 生物工程学报, 1997, 13(1):168.
- [13] 张惟材, 邓兵兵. 微生物乙内酰脲酶及其研究进展[J]. 生物技术通讯, 1999, 10(2):141.
- [14] Yokozeki K., Nakamori S., Eguchi C., *et al.* Screening of microorganisms producing d-p-hydroxyphenylglycine from dl-5-(p-hydroxyphenyl)hydantoin [J]. Agric Biol Chem, 1987;51:355.
- [15] Sheldon R. Industrial synthesis of optically active compounds [J]. Chemistry and Industry, 1990, 2(7):212.
- [16] Umemura I., Yanagiya K., Komatsubara S. d-Alanine production from dl-alanine by *Candida maltosa* with asymmetric degrading activity [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992; 36(6): 722.
- [17] Wegman M. A., Heinemann U., van Rantwijk F. *et al.* Hydrolysis of D,L-phenylglycine nitrile by new bacterial cultures [J]. J Mol Catal B: Enzym, 2001, 11: 249.
- [18] Olivieri R., Fascetti E., Angelini L., *et al.* Enzymatic conversion of N-carbamoyl-D-amino acids to D-amino acids [J]. Enzyme Microb Technol, 1979, 1(3): 201.
- [19] Avila M. A., Garcia-Trevijano E. R., Martinez-Chantar M. L., *et al.* S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function [J]. Alcohol, 2002, 27(3): 163.
- [20] Lieber C. S. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of liver diseases [J]. J Hepatol, 1999; 30: 1155.
- [21] Park J., Tai J., Roessner C. A., *et al.* Overcoming product inhibition of S-Adenosyl-L-methionine (SAM) synthetase: preparation of SAM on the 30 mM scale [J]. Bioorgan Med Chem Lett, 1995, 5(19):2203.
- [22] 刘惠, 林建平, 吴坚平等. 酵母生物合成 S-腺苷-L-蛋氨酸的动力学研究 [J]. 高校化学工程学报, 2004, 18(2):168.
- [23] 刘惠, 林建平, 吴坚平等. 酿酒酵母生物转化蛋氨酸生产 S-腺苷-L-蛋氨酸 [J]. 化学反应工程与工艺, 2002, 18(4):310.
- [24] 李东阳, 于健, 田露等. 利用重组 *Pichia pastoris* 生产腺苷甲硫氨酸 [J]. 生物工程学报, 2002, 18(3):295.