

酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸

吕国英,王普*,梅建凤(浙江工业大学生物制药研究所,浙江 杭州 310014)

摘要:目的 介绍酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸的微生物代谢途径、生物转化反应涉及的酶的种类及特性,以及酶法转化生产工艺。方法 分析国内外有关文献资料,综述 L-半胱氨酸的用途及国内外研究现状。结果与结论 酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸工艺为环境友好的绿色合成工艺。固定化细胞转化技术和基因工程的发展使酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸工艺具有很好的应用开发前景。

关键词:DL-ATC;L-半胱氨酸;酶法转化

Production of L-cysteine from DL-ATC by Enzymatic Conversion

LV Guo-ying, WANG Pu, MEI Jian-feng (Institute of Biopharmaceutical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To introduce the metabolic pathway and enzymes involved in the progress of the enzyme conversion DL-ATC to L-cysteine. **METHOD** To settle and get conclusion according to the relevant domestic and international literature, and combine with the nowadays production and requirement of L-cysteine. **RESULTS AND CONCLUSION** The enzyme conversion from DL-ATC to L-cysteine is a green technology for environment, and immobilized technology and gene engineering will bring more vigor for this method.

KEY WORDS:DL-ATC; L-cysteine ; enzyme conversion

L-半胱氨酸为含硫非必需氨基酸,其所带的巯基具有许多重要的生理作用,广泛用于医药、食品和化妆品等工业^[1]。可用于治疗药物中毒,放射线障碍症,白血球减少症等疾病;能促进毛发生长,用于治疗秃发症;其衍生物可用于治疗支气管炎,鼻粘膜渗出性炎症,咳痰排出困难症等;可将褐变反应的中间体再度还原,对防止食品褐变极其有效;可用作冷烫剂及去头屑洗发精中的重要成分,并且与谷胱甘肽并存时可阻碍黑蛋白色素的形成。

L-半胱氨酸的市场需求量很大,且以每年 5%-10% 的速度递增。目前,其生产方法主要有天然产物提取法、化学合成法和酶转化法。提取法是从蛋白质水解液或毛发中提取,此法常受到原料来源的限制,而且产物中易混入其它的氨基酸。化学合成法不仅步骤较多,而且得到的产物通常为 D 型和 L 型的外消旋体,尚需拆分后得到 L-半胱氨酸。由于酶转化法具有立体选择性好,可获得单一构型的产物;产品纯度较高;反应条件温和;对环境污染较小等优点,近年来采用酶法转化生产 L-半胱氨酸已逐渐引起重视。

酶法转化生产 L-半胱氨酸主要涉及到三种底物^[2]:(1) O-乙酰丝氨酸;(2) 3-氯-L-丙氨酸;(3) DL-2-氨基-噻唑啉-4-羧酸(DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid, 简称 DL-ATC)。此外,也有将 L-丝氨酸和金属氢硫化物等巯基化合

物在色氨酸合成酶作用下催化合成的报道^[3]。在不同底物的酶法转化工艺中,以 DL-ATC 为底物的生物转化工艺研究较多。

1 酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸

1.1 微生物菌种

1977 年 Sano^[4-6] 等从土壤中筛选到一些假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 可将 DL-ATC 不对称水解为 L-半胱氨酸。随后,研究人员发现,除假单胞菌外,许多细菌也能转化 DL-ATC,并对不同种细菌的代表菌株转化 DL-ATC 生成 L-半胱氨酸与 L-胱氨酸混合物的产率情况进行了比较,见表 1。

表 1 可将 DL-ATC 转化为 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸混合物的微生物菌种及产率

Strain		Productivity of L-CySH and L-Cys (mg/L)
<i>Achromobacter delmarvae</i>	AJ1983	237
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	AJ2553	50
<i>Bacillus brevis</i>	AJ1282	43
<i>Brevibacterium flavum</i>	AJ1516	22
<i>Enterobacter aerogenes</i>	AJ2648	184
<i>Erwinia carotovora</i>	AJ2753	24
<i>Escherichia coli</i>	AJ2592	10
<i>Flavobacterium acidoficum</i>	AJ2494	10

* 通讯作者:王普,教授,浙江工业大学药学院,研究方向:微生物制药。E-mail: wangpu@zjut.edu.cn

Strain		Productivity of L-CySH and L-Cys (mg/L)
<i>Micrococcus sodonensis</i>	AJ1753	206
<i>Micoplana dimorpha</i>	AJ2809	146
<i>Pseudomonas ovalis</i>	AJ2236	68
<i>Sarcina lutea</i>	AJ1217	627
<i>Serratia marcescens</i>	AJ2698	28

1.2 代谢途径

在对不同转化菌种的研究中,对假单胞菌转化途径研究

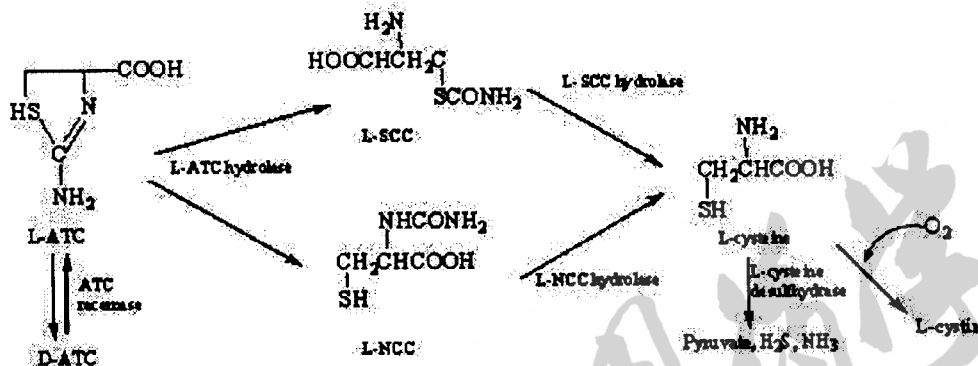


图1 假单胞菌属不同菌株的代谢途径

从图1所示的代谢途径可知在转化过程中涉及ATC消旋酶(ATC racemase)、L-ATC水解酶(L-ATC hydrolase)、L-SCC水解酶(L-SCC hydrolase)、L-NCC水解酶(L-NCC hydrolase)。这些酶均为诱导酶,须底物ATC的诱导作用,较佳的诱导浓度为0.2%~0.5%

在L-半胱氨酸产生菌中一般都同时存在L-半胱氨酸硫解酶(L-cysteine desulfhydrase),故产物L-半胱氨酸往往易被进一步降解为丙酮酸盐、硫化氢和氨气;而且产物很容易被氧化为L-胱氨酸(L-cystine)。尽管从DL-ATC转化为L-半胱氨酸需要三种酶的催化,但这些酶经底物的诱导作用,可在同一微生物细胞内同时产生,这也为生产带来了方便。

1.3 酶的特性

假单胞菌不能直接利用D-ATC为底物,但研究发现DL-ATC消旋酶的活性大于L-ATC水解酶,D-ATC转化为L-ATC的量足以满足L-ATC水解酶所需,因此DL-ATC可代替L-ATC作为转化底物直接用于酶法转化。

L-ATC水解酶是DL-ATC转化为L-半胱氨酸过程中最不稳定的酶。实验发现^[8],用饱和盐溶液与山梨醇混合液调节水活度,当水活度由0.93降至0.80时,酶的稳定性提高4倍。某些一价的离子盐,如NaCl、KCl或水溶性较小的盐如CaSO₄存在时,即使降低水活度,酶的稳定性也无明显提高。一些水溶性好的盐如MgSO₄、(NH₄)₂SO₄存在时,酶稳定性有所提高。酶的稳定性不仅受水活度影响,而且受到离子强度的影响。在同样的水活度下,二价离子的盐比一价离子的盐更利于酶的稳定。L-ATC水解酶的半衰期在山梨醇-盐调节的合适的离子强度和水活度下,可延长10~20倍。

终产物L-半胱氨酸抑制L-ATC水解酶的活性。Nam^[9]等人发现,缺氧状况对产物抑制和L-ATC水解酶的稳定性有很大影响。在空气中,L-半胱氨酸很容易被氧化成L-胱氨酸

得最为深入。实验发现,采用*Pseudomonas putida* AJ3865和*Pseudomonas* sp. ON-4a菌株进行转化时,中间产物为氮-氨甲酰-L-半胱氨酸(N-carbamoyl-L-cysteine,简称L-NCC)^[7];而*Pseudomonas* sp. CU6和*Pseudomonas thiazolinophilum*菌株的转化中间产物为硫-氨甲酰-L-半胱氨酸(S-carbamoyl-L-cysteine,简称L-SCC)。因而假单胞菌属中的不同菌株的代谢途径是有差异的,见图1。

酸,在同样的浓度下,L-胱氨酸抑制L-ATC水解酶的能力远大于L-半胱氨酸。反应液在空气中,会出现胱氨酸占绝对优势的情况,而在氮气保护的情况下,则胱氨酸所占比例减少至40.7%,这样会减少产物对L-ATC水解酶的抑制。L-ATC水解酶在空气条件下,30℃恒温振荡20h后酶活几乎全部丧失,而在同样的氮气保护条件下则保持较大的酶活。

L-半胱氨酸易被L-半胱氨酸硫解酶进一步代谢,为了积累产物,必须得到缺失此硫解酶的突变株,或者找到此酶的抑制剂。Pae^[10]等人通过紫外线诱变*Pseudomonas* sp. CU得到一株缺失L-半胱氨酸硫解酶的突变株*Pseudomonas* sp. M-38,并对它们的酶促反应动力学特征进行了研究,发现突变株与原始菌株均存在产物抑制,但是突变株受到的抑制较少。羟胺被认为是一种有效的L-半胱氨酸硫解酶抑制剂。Ryu^[11]等研究发现,在转化DL-ATC生产L-半胱氨酸的微生物酶系中,当羟胺的浓度达到最适抑制L-半胱氨酸硫解酶时,添加羟胺从L-SCC到L-半胱氨酸的反应可以较快的进行,研究表明羟胺是作为反应物与L-SCC发生等摩尔反应,但是羟胺对其它DL-ATC转化酶有抑制作用。

1.4 酶的诱导

Tamura^[12]等研究发现,L-ATC诱导消旋酶的产生,使D-ATC转化为L-ATC,而D-ATC则不能诱导产生消旋酶。L-ATC还可诱导L-ATC水解酶和L-NCC酰氨酶;D-ATC只诱导L-NCC酰氨酶。L-ATC或D-ATC,噻唑啉衍生物都不能诱导D型酶。进一步研究发现了一些酶的新的诱导剂,如:D型和L型蛋氨酸、硫-甲基-L-半胱氨酸、半胱氨酸和2-氨基乙醇磺酸,然而这些诱导剂的诱导能力比DL-ATC的诱导能力低得多。将这些诱导剂与DL-ATC组合使用,则可协同的增加诱导能力。这些新的诱导剂的共同特征是,都含硫元素,而且含有相似的基本结构,如磺酰基、甲硫基。L-半胱氨酸

和同型半胱氨酸与这些新诱导剂的结构相似,却不能诱导酶的产生。

2 酶法转化工艺

酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸的生产工艺主要由三部分组成:(1)微生物细胞的培养:包括种子培养和产酶,由于 DL-ATC 转化酶为胞内酶,因此可将含酶细胞用于转化或细胞破壁后提取粗酶制品用于转化;(2)底物的转化:将培养好的菌体或粗酶液中加入反应液(反应液由 DL-ATC、盐酸羟胺等组成),在一定的条件下进行转化反应;(3)产物的提取:转化结束后加入盐酸溶解沉淀,收集上清液中和,并加入少量催化剂使 L-半胱氨酸氧化为 L-胱氨酸,浓缩得到 L-胱氨酸结晶。

我国对酶法转化 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸的研究报道很少,南开大学刘忠^[13,14]等人从土壤中筛选到一菌株 *Pseudomonas* sp. TS1138,并对其培养条件进行了优化,酶活可达到 1524.51U/mL,研究工作尚处于实验室阶段。

3 固定化工艺与基因工程技术在 DL-ATC 酶法转化中的应用

Ryu^[15]等报道了由 DL-ATC 生产 L-半胱氨酸的固定化细胞转化工艺。由于羟胺对一些 DL-ATC 转化酶的抑制作用,固定化工艺中采用 L-半胱氨酸硫解酶缺失突变株,而不添加羟胺,菌体细胞以海藻酸钙为固定化载体。为减少转化产物 L-半胱氨酸对 L-ATC 水解酶的反馈抑制并回收转化底物,设计了一个由两个反应器和两个 L-胱氨酸提取器相串联构成的系统。两个 30mL 填充床反应器中装有固定化细胞,两个提取器中填入 DOWEX 50W(50×4-200),以仅由两个反应器构成的选择性过程作为对照。有提取器的流程的全部生产能力比无提取器高 43%。

采用分子生物学技术克隆目的基因,构建基因工程菌是实现 DL-ATC 高效转化的有效途径之一。Shiba^[16]等人克隆了包含菌株 *Pseudomonas* sp. strain BS 转化 L-ATC 生成 L-半胱氨酸所需酶系的基因片断。该片断中包含有两个基因,atcB 基因编码 L-ATC 水解酶,atcC 基因编码 L-NCC 水解酶。把此 DNA 片断引入 *Escherichia coli* 细胞可将 L-ATC 转化为 L-NCC 后进一步生成 L-半胱氨酸。最近,又克隆出了 ATC 消旋酶基因和能在 BS 菌株中更好利用 ATC 的调节基因,进一步的研究正在继续。

4 展望

近年来细胞固定化技术发展使 DL-ATC 的酶法转化工艺呈现出更大的活力,但由于 L-ATC 水解酶的不稳定性给连续生产带来困难。若能对影响酶稳定性的因素进行更深入的研究,并筛到抗 L-半胱氨酸结构类似物的菌株以解除产物反馈抑制,则有望进一步简化生产工艺,并提高产率。基因工程技术的发展和运用,在菌种改良和工艺优化中效果明显。基因工程与细胞固定化工艺的结合,将会给 L-半胱氨酸的生产带来更好的应用前景。

参考文献

[1] 张伟国,钱和. 氨基酸生成技术及应用[M]. 北京:中国轻工中国现代应用药学杂志 2004 年 9 月第 21 卷第 8 期

业出版社,1997:266.

- [2] 杨金奎,何壁梅. 微生物方法生产 L-半胱氨酸的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册,2001,22(4):179.
- [3] 陈曾三. 酶法 L-胱氨酸制造方法[J]. 江苏食品与发酵,1995,3:35.
- [4] Sano K, Yokozekik, Tamura F, *et al.* Microbial conversion of DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline 4-carboxylic acid to L-cysteine and L-cystine: screening of microorganisms and identification of products[J]. Appl Environ Microbiol, 1977,34(6):806.
- [5] Sano K, Mitsugi K. Enzymatic producing of L-cysteine from DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline 4-carboxylic acid by *Pseudomonas thiazolinophilum*: optimal conditions for the enzyme formation and enzymatic reaction[J]. Agric Biolchem, 1978,42(12):2315.
- [6] Sano K, Eguchi C, Yasuda N. *et al.* Metabolic pathway of L-cysteine formation from DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline 4-carboxylic acid by *Pseudomonas*. [J]. Agric Biolchem, 1979,43(11):2373.
- [7] Tamura Y, Nishino M, Ohmachi T. *et al.* N-Carbamoyl-L-cysteine as an intermediate in the bioconversion from DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline 4-carboxylic acid to L-cysteine by *Pseudomonas* sp. ON-4a. [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998,62(11):2226.
- [8] Ryu OH, Oh SW, Yoo SK, *et al.* The stability of L-ATC hydrolase participating in L-cysteine production[J]. Biotechnol Lett, 1995,17(3):275.
- [9] Nam KH, Ryu OH, Park J, *et al.* Effect of anoxic conditions on the enzymic conversion of DL-2-aminothiazoline-4-carboxylic acid to L-cysteine[J]. Acta Biotechnol, 1997,17(2):185.
- [10] Pae KM, Ryu OH, Yoon HS, *et al.* Kinetic properties of a L-cysteine desulhydrase-deficient mutant in the enzymatic formation of L-cysteine from DL-ATC[J]. Biotechnol Lett, 1992,4(12):1143.
- [11] Ryu OH, Yu JH, Shin CS. The role of Hydroxylamine in the Conversion of S-Carbamyl-L- cysteine to L-Cysteine [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993,57(5):829.
- [12] Tamura Y, Ohmachi T, Asada Y. Induction of DL-2-amino- Δ^2 -thiazoline 4-carboxylic acid hydrolase and N-carbamoyl-L-cysteine aminohydrolase by S-compounds in *Pseudomonas putida* AJ3865[J]. J Gen Appl Microbiol, 2001,47:193.
- [13] 刘忠,杨文博,白钢,等. 微生物酶法合成 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸[J]. 微生物学通报,2003,30(6):16.
- [14] 刘忠,杨文博,孙丹,等. 酶法生产 L-半胱氨酸培养基的响应面分析优化[J]. 南开大学学报(自然科学版),2004,37(1):83.
- [15] Ryu OH, Ju JY, Shin CS. Continuous L-cysteine production using immobilized cell reactors and product extractors[J]. Process Biochemistry, 1997, 32(3):201.
- [16] Shiba T, Takeda K, Yajima M, *et al.* Genes from *Pseudomonas* sp. strain BS involved in the conversion of L-2-amino- Δ^2 -thiazoline 4-carboxylic acid to L-cysteine[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(5):2179.

收稿日期:2004-07-25