

Citrobacter freundii 休止细胞催化合成 L-多巴

张莉 李文 肖正华 王云霞 夏仕文*

(第三军医大学医学检验系生物转化实验室 重庆 400038)

摘要: 以在 L-酪氨酸诱导下高效表达酪氨酸酚解酶的菌株 *Citrobacter freundii* 48003-3 的休止细胞为生物催化剂, 以邻苯二酚、丙酮酸钠、醋酸铵为前体, 选择性合成 L-DOPA。研究了反应温度、pH 和前体浓度等对合成 L-DOPA 的影响。最优反应条件下, 反应 12h, L-DOPA 的量可达到 9.5g/L。

关键词: L-多巴, 酪氨酸酚解酶, 微生物转化

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0045-04

SYNTHESIS OF L-DOPA BY *CITROBACTER FERUNDII* RESTING CELLS

ZHANG Li LI Wen XIAO Zheng-Hua WANG Yun-Xia XIA Shi-Wen

(Biotransformation Laboratory, Faculty of Medical Laboratory Sciences,

The Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: The resting cells of *Citrobacter freundii* 48003-3 expressing high tyrosine phenol lyase activity under the inducing of L-tyrosine were used for L-DOPA synthesis from catechol, pyruvate and ammonia. In this paper, the effects of temperature, pH and substrate concentrations on the synthesis of L-DOPA were studied. At the optimal conditions of reaction, 9.5g/L of L-DOPA was obtained in 12h.

Key words: L-DOPA, Tyrosine phenol lyase, Microbial conversion

多巴(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA) 含一个手性中心, 其 D-对映体有毒副作用, L-对映体不仅是治疗常见老年病-帕金森氏综合症的主要药物, 还可用于肝昏迷、CO 中毒、心力衰竭、精神病等的治疗^[1]。随着我国人口老龄化速度的加快和 L-DOPA 潜在用途的增加, L-DOPA 的需求将迅速增大。目前国内市场的 L-DOPA 主要依靠进口。

L-DOPA 的生产主要有化学不对称合成^[2]、从豆科植物中提取^[3]和微生物酶催化合成 3 个途径。酶催化不对称合成 L-DOPA 具有反应条件温和、对映选择性高、环境友好、工艺简单等优点。依据所用酶的不同, 其合成途径有 3 种: 酪氨酸酶 (Tyrosinase) 转化法, 即以 L-Tyr 为前体生产 L-DOPA^[4]; 以邻苯二酚、丙酮酸钠、醋酸铵为前体, 利用酪氨酸酚解酶 (Tyrosine phenol lyase) 催化合成 L-DOPA^[5]; 转氨酶 (Transaminase) 转化法, 以 L-Asp 为前体生产 L-DOPA^[6]。由于酪氨酸酚解酶转化法的产物浓度和前体利用率均较高, 所以本文采用该法合成 L-DOPA, 研究各反应条件对合成的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

所有试剂均为分析纯。Perkin-Elmer LC-65T 型液相色谱仪, DSHZ-300 多用途水浴恒

* 联系人

收稿日期: 2002-05-08, 修回日期: 2002-08-25

温振荡器, GL-20B 冷冻离心机, UV-9501 紫外-可见分光光度计。

1.2 实验菌株

弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii* 48003-3 由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供, 保存于斜面培养基上。

1.3 培养基

斜面培养基: 蛋白胨 10.0g, NaCl 5.0g, 酵母膏 5.0g, 琼脂 20g, 加水溶解后定容至 1,000mL, 调 pH7.0。

液体种子培养基: 蛋白胨 5.0g, 牛肉浸膏 5.0g, NaCl 2.0g, 酵母膏 0.5g, 加水溶解后定容至 1,000 mL, 调 pH7.0。500mL 锥形瓶分装 50mL, 棉球塞瓶口, 高温灭菌。

液体培养基: 在液体种子培养基中加入 0.2% L-酪氨酸, 500mL 锥形瓶分装 50mL, 棉球塞瓶口, 高温灭菌。

1.4 菌种培养

取保存菌种转接入液体种子培养基中, 置于 150r/min 恒温振荡器上 30℃ 培养 12h, 再以 10% 的接种量将液体种子转接入液体培养基中, 相同温度和转速下培养 12h。离心收集菌体细胞, 用磷酸缓冲液 (0.1mol/L, pH7.4) 洗涤两次后悬浮于相同的磷酸缓冲液中, 冷藏备用。

1.5 细胞干重测量

菌悬液离心, 蒸馏水洗涤两次, 110℃ 烘干, 冷却称重。于 650nm 下测菌悬液 OD 值。由此法测定菌悬液中干细胞浓度为 31.34mg/mL。

1.6 酶活测定

按文献 [7] 的方法测定酶活。

1.7 L-DOPA 的合成

100mL 锥形瓶中加入 0.1mol/L 邻苯二酚、0.1mol/L 丙酮酸钠、0.6mol/L 醋酸铵, 磷酸缓冲液 (0.1mol/L, pH8.5) 各 2mL, 再加入 EDTA 0.01g, Na_2SO_3 0.02g 及与邻苯二酚等物质的量浓度的硼酸钠, 最后加入菌悬液 2mL, 37℃ 下, 200r/min 恒温振荡器上反应。

1.8 分析方法

定时移取 1mL 反应混合液, 加入 1mol/L HCl 0.1mL 使反应停止, 离心, 取上清液在高效液相色谱仪上测定 L-DOPA 的生成量。HPLC 条件: Kromasil C18 色谱柱 (250mm × 4.6mm), 醋酸铵 (0.01mol/L, pH3.5) 作流动相, 流速 1.0mL/min, 于 280nm 波长下检测, 进样体积 4μL, 外标法测定。

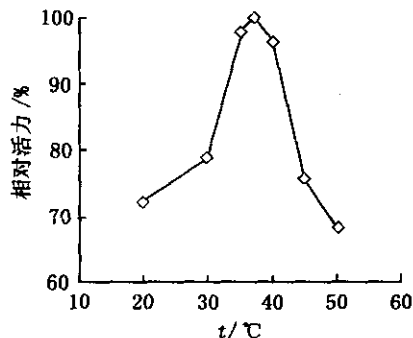


图 1 温度对 L-DOPA 合成的影响

2 结果与讨论

2.1 温度对合成的影响

保持其他条件不变, 测定不同温度下 L-多巴的合成, 结果如图 1。酪氨酸酚解酶催化合成 L-DOPA 反应的最适温度为 37℃。低于 37℃, L-DOPA 的合成初速度随温度升高而增加。高于 37℃, 由于高温下酶的热失活和 L-DOPA 的稳定性降低, 导致初速度

降低。

2.2 pH对合成的影响

pH会改变酶的活性中心或与之有关的基团的解离状态^[8]。保持其他条件不变,测定不同pH下L-DOPA的合成,图2的结果表明,催化反应的初速度随pH的增加而加快,在pH8.5以后,随pH的增加而降低,故反应的最适pH为8.5。

2.3 底物浓度对合成的影响

酶催化合成L-DOPA反应的初速度与各底物浓度有关,在最适温度、pH下分别测定3个底物不同浓度时的酶活。由图3的结果可知,邻

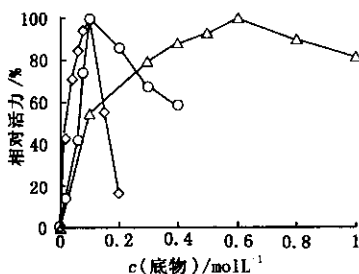
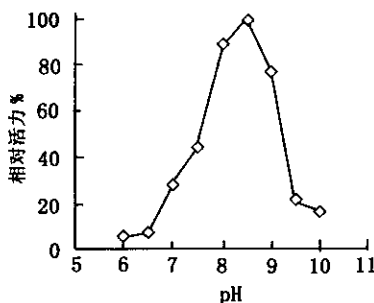


图3 各底物浓度对L-DOPA合成的影响

◇ 邻苯二酚, ○ 丙酮酸钠, △ 醋酸铵

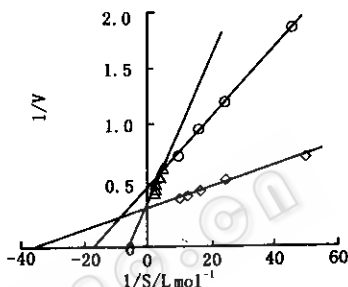


图4 各底物的Lineweaver-Burk图

◇ 邻苯二酚, ○ 丙酮酸钠, △ 醋酸铵

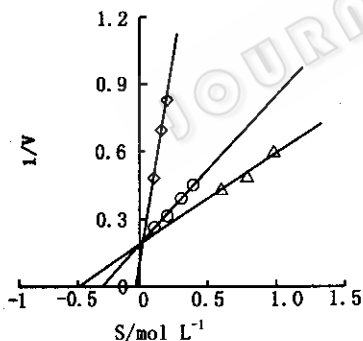


图5 各底物的1/v-S图

◇ 邻苯二酚, ○ 丙酮酸钠, △ 醋酸铵

苯二酚、丙酮酸钠、醋酸铵的最佳浓度分别为0.1mol/L、0.1mol/L、0.6mol/L。用Michaelis-Menten动力学方程处理各曲线前部分(图4), Lineweaver-Burk作图法作 $1/v-1/S$ 图, 得线性曲线, 求得邻苯二酚、丙酮酸钠、醋酸铵的表观米氏常数 K_{mapp} 分别为0.029mol/L、0.059mol/L、0.18mol/L。利用底物抑制动力学方程处理曲线的后部分(图5), 求得表观抑制常数 K_{sapp} 分别为0.063mol/L、0.25mol/L、0.49mol/L。 K_{mapp} 越大, 酶和底物间的亲和力越小; K_{sapp} 越小, 抑制作用越强。

从上述结果发现, 随着各底物浓度的增加, 酶活逐渐增至最大值后, 浓度继续增加反而引起酶活的降低, 说明各底物在高浓度时会产生抑制作用, 其中邻苯二酚的抑制作用最强, 还会导致酶的不可逆失活, 因此必须重点控制邻苯二酚的浓度以减小底物抑制。实验中加入与邻苯二酚等物质的量浓度的硼酸钠, 形成邻苯二酚-硼酸复合物, 可大大降低邻苯二酚对酪氨酸解酶的抑制及失活作用。由于反应混合液中

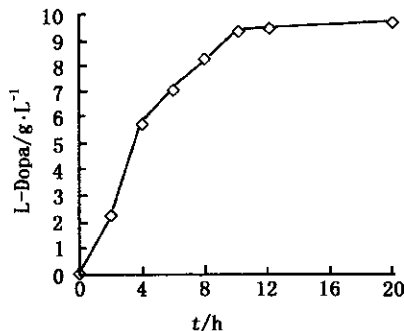


图6 L-DOPA催化合成动力学曲线

的 L-多巴稳定性较差, 还需加入 2g/L Na_2SO_3 和 1g/L EDTA 防止其氧化。

2.4 L-多巴的合成

利用根据 L-DOPA 合成初速度得到的最适反应温度、pH、各底物浓度进行 L-DOPA 的催化合成反应。同时加入 2g/L Na_2SO_3 、1g/L EDTA 及与邻苯二酚等物质的量浓度的硼酸钠, 按此条件进行 L-DOPA 的酶催化合成反应, 作出反应动力学曲线, 如图 6。可知, 反应 12h 后 L-DOPA 的量达到 9.5g/L。

参考文献

- [1] 尹洪波, 陈 坚, 李 静, 等. 生物技术, 1998, 8 (2): 5~8.
- [2] 王伟文, 惠云身. 西北药学杂志, 1994, 9 (4): 172~173.
- [3] 张 晓, 苏大荣, 许家伟, 等. 中国医药工业杂志, 1991, 22 (5): 207, 214.
- [4] Pialis P, Saville B A. Enzyme-Microb Technol, 1998, 22 (11): 261~268.
- [5] Para G, Baratti J. Biocatalysis, 1988, 2 (1): 39~50.
- [6] Chattopadhyay S, Das A. FEMS Microbiol Lett, 1990, 72 (1~2): 195~199.
- [7] Para G, Baratti J. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 28 (3): 222~228.
- [8] 陈石根, 周润琦. 酶学 (第一版). 上海: 复旦大学出版社, 2001. 192~194.