

海因酶的催化特性及其反应机理*

封霞 袁静明**

(山西大学生物技术研究所 太原 030006)

摘要: 目前, 已发现多种水解海因类的酰胺酶, 如 D-海因酶、二氢嘧啶酶、尿囊素酶、亚酰胺酶等海因酶。海因酶具有底物依赖的对映体选择性。在金属离子的参与下, 它催化海因、5'-单替代海因及其衍生物发生水解。海因酶是有重要应用价值的工业酶, 被广泛应用于生产具光学活性的 D-和 L-型氨基酸。综述了海因酶的催化特性、反应机理及应用前景。

关键词: 海因酶, 催化特性, 反应机理, D-型氨基酸

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0095-04

海因酶 (Hydantoinase, EC 3.5.2.2), 亦称乙内酰脲酶, 是一类催化海因、5'-单替代海因及其衍生物环酰胺键断裂的酰胺水解酶。广泛存在于微生物、植物、动物等各类有机体中。但有工业化应用前景的海因酶主要来源于微生物^[1]。海因酶主要用于手性氨基酸的生物合成。天然蛋白质中都是 L-型氨基酸, 自然界中 D-型氨基酸甚少, 而 D-型氨基酸作为医药及食品领域的重要原材料, 被广泛用于半合成抗生素、多肽激素、拟除虫菊脂、杀虫剂、甜味剂等生产^[2]。因此, 利用 D-海因酶转化 D-型氨基酸已成为手性产物研究领域的热点。

1 海因酶的催化特性

海因酶一般为同源二聚体或四聚体, 亚基分子量在 50 ~ 60kD, 最适 pH7.0 ~ 10.5, 等电点一般小于 pH5.8^[3]。大多数海因酶都是热不稳定的, 因而人们对于其酶学性质和分子结构的了解较少。到目前为止, 已发现一些具不同功能的海因酶, 如 D-海因酶、二氢嘧啶酶、尿囊素酶、亚酰胺酶等 (图 1)。根据其作用底物的特异性或产物光学活性的不同, 又可将海因酶分为 D-型、L-型和 DL-型 3 种。

1.1 D-海因酶 (D-Hydantoinase) D-海因酶是生物转化 D-型氨基酸过程中第一步反应的酶。以 D-苯海因或 D-对羟基苯海因为底物时, 在 D-海因酶的作用下首先生成 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸或 N-氨甲酰基-D-对羟基苯甘氨酸。产物再在 N-氨甲酰基-D-氨基酸酰胺水解酶的作用下生成 D-苯甘氨酸 (D-PG) 或 D-对羟基苯甘氨酸 (D-HPG)^[4, 5]。D-苯甘氨酸和 D-对羟基苯甘氨酸是重要的医药和精细化学工业的中间体, 是合成 β -内酰胺类和头孢类半合成抗菌素的重要侧链, 用于生产羟氨苄青霉素、头孢克罗、头孢立新、头孢拉定等抗菌素药物。

1.2 二氢嘧啶酶 (Dihydropyrimidinase) 二氢嘧啶酶在嘧啶及其类似物的还原代谢途径中起重要的作用。尿嘧啶在嘧啶脱氢酶、二氢嘧啶酶、3-脲基丙酸酶的联合作用下水解成 β -丙氨酸。这一途径存在于细菌、酵母、动物、植物体内, 而在人体代谢中也具有非常重要的作用。此酶可作用于嘧啶类似物的分解代谢, 如可使肿瘤治疗剂 5-氟尿

* 山西省重点行业科技项目 (No. 993225)

** 联系人

收稿日期: 2002-06-14, 修回日期: 2002-08-10

乳化能力,因而把由微生物、植物或动物产生的天然表面活性剂称为生物表面活性剂(Biosurfactant)。同一般化学合成表面活性剂一样,生物表面活性剂分子中也包括疏水基和亲水基。疏水基一般是脂肪酰基链;极性亲水基则有多种结构,如中性脂的酯或醇功能团、脂肪酸或氨基酸的羧基、磷脂中含磷的部分以及糖脂中的糖基等。其中最大的一类生物表面活性剂是糖脂类。生物表面活性剂通常比合成表面活性剂拥有更为复杂和庞大的化学结构,单个分子占据更大的空间,因而显示出较低的临界胶团浓度(Critical Micell Concentration, CMC)。它们一般都具有显著的降低表面张力、界面张力的性能。与化学合成表面活性剂相比,生物表面活性剂具有选择性好,用量少,无毒,能够被生物完全降解,不对环境造成污染,可用微生物方法引入化学方法难以合成的新化学基团等优点。另外,微生物发酵法生产表面活性剂时,工艺简便,生产规模大时生产成本较低。

1 生物表面活性剂微生物源的研究

1.1 产生物表面活性剂微生物种类的研究 大多数生物表面活性剂来源于细菌,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)产生鼠李糖脂,也有酵母如球拟酵母(*Torulopsis bombicola*)产生脂肽和其他真菌如玉米黑粉菌(*Ustilago zeae*)合成纤维二糖脂。

Desai 和 Banat^[1]曾将生物表面活性剂的特性和微生物来源作了一个总结,见表1。

1.2 生物表面活性剂产生菌的选育 选育生物表面活性剂产生菌的关键在于建立有效的筛选模型。Mulligan 等1984年^[2]利用某些生物表面活性剂(尤其是水溶性糖脂和脂肽)能够溶解红血球的特性,建立了血平板筛选模型,将富集培养基中分离出的微生物接种于红血球琼脂平板上,通过比较红血球琼脂平板上的菌落周围形成的透明圈直径的方法进行快速有效的筛选。对于只在烃类物质上生长期间产生表面活性剂的、或产生粘连于细胞壁上而不具有扩散性糖脂的微生物,不适宜采用此类方法。

Van der veeg 等^[3]建立了轴对称液滴形状分析法(ADSA-P法)来检测生物表面活性剂产生菌:培养液的液滴滴在氟代乙烯-丙烯表面,微滴的外形用弧面检测器进行测定,并计算其表面张力。只有生物表面活性剂产生菌的悬浮液出现表面张力减少现象。Shulga 等^[4]描述了一种用比色测定法测定生物表面活性剂的方法,测定时要求阴离子表面活性剂能与阳离子指示剂反应生成显色性物质。

另外,还有一些简单的测定方法:(1)快速破泡实验:滴一滴悬浮液于一油性表面,不含有生物表面活性剂的液滴保持稳定而含有生物表面活性剂的液滴立即破灭。(2)薄层层析法:将富集培养基中分离的微生物接种在含不同碳源的琼脂平板上培养成菌落,每个菌落直接转移到硅胶TLC薄板上。先用正己烷和二氯甲烷的混合物或正己烷作为展开剂进行预展以去掉细胞物,再用二氯甲烷和甲醇的混合物作为展开剂进行薄层层析。最好用糖脂试剂检验展开的斑点。此法适合于产生胞壁粘连糖脂的微生物。(3)乳化指数值测定:将培养液和同等体积的煤油猛力摇晃,24h后测量其乳化值,这种方法特别适用于乳化生物表面活性剂。

2 生物表面活性剂的发酵生产

2.1 发酵机理研究 大多数生物表面活性剂都在指数生长期被释放进培养基中的,但也有由休止细胞或固定化细胞产生的。

表1 生物表面活性剂的特性及其微生物来源

生物表面活性剂	微生物种类	表面张力(mN/m)	CMC	界面张力(mN/m)
糖脂类				
鼠李糖脂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29		0.25
	<i>Pseudomonas</i> sp.	25~30	0.1~10	1
海藻糖脂	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32~36	4	14~17
	<i>Nocardia erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium</i> sp.	38	0.3	15
槐糖脂	<i>Torulopsis bombicola</i>	33		1.8
	<i>Torulopsis apicola</i>	30		0.9
	<i>Torulopsis petrophilum</i>			
纤维二糖脂	<i>Ustilago zeae</i>			
	<i>Ustilago maydis</i>			
脂肽和脂蛋白				
肽类脂	<i>Bacillus licheniformis</i>	27	12~20	0.1~0.3
Serratwettin	<i>Serratia marcescens</i>	28~33		
粘液菌素	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26.5	150	
表面活性蛋白	<i>Bacillus subtilis</i>	27~32	23~160	1
枯草溶菌素	<i>Bacillus subtilis</i>			
短杆菌肽	<i>Bacillus brevis</i>			
多粘菌素	<i>Bacillus polymyxa</i>			
脂肪酸,中性脂类,磷脂				
脂肪酸	<i>Candida lepus</i>	30	150	2
中性脂类	<i>Nocardia erythropolis</i>	32		3
磷脂	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>			
聚合表面活性剂				
乳化剂	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
生物分散剂				
甘露聚糖~脂~蛋白	<i>Candida tropicalis</i>			
脂类剂	<i>Candida lipolytica</i>			
糖~蛋白质~脂	<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
蛋白质 PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
粒状表面活性剂	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			

有些生物表面活性剂可以在生长周期的某个时候产生,然后失活或者与其它代谢物结合。棒杆菌(*Corynebacterium lepus*)在发酵生长期间产生两种绝然不同的表面活性剂:在生长早期产生棒杆菌菌酸,该化合物随后结合成脂肽,后者是生长后期的主要表面活性剂。

2.2 发酵技术研究 碳源和溶氧条件是生物表面活性剂产量的主要影响因素^[5]。培养基中的碳源是决定微生物表面活性剂产量和结构的重要因素。有的微生物仅在烃类培养基上生长时才产生生物表面活性剂,但也有的只需要一些糖类和氨基酸就可以产生。钱欣平等^[6]就将菜油作为大规模生产生物表面活性剂的首选碳源。而铜绿假单胞菌则在两类基质中都能产生表面活性剂,只是在烃类基质中产量更高一些。烃链长度对培养基中产生表面活性剂的浓度也有显著影响。

培养基的其余成份都可能对生物表面活性剂的生产有重要影响。例如,C/N比可以

决定假单胞菌对糖脂的生产。 NaNO_3 是石蜡酯杆菌 B126 (*Caseobacter paraffinicum* B126) 合成糖脂的适宜氮源, 用铵盐作氮源则产量较低^[7]。增加铁和镁的浓度能提高表面活性蛋白产量。培养基中加入抗生素, 如青霉素或氯霉素能够提高或减少表面活性剂产量。球拟酵母 (*Torulopsis* sp.) 对糖脂的合成要受到酵母膏浓度的影响。Zhou 和 Kosaric^[8] 使 *Candida bombicola* 产生了高达 150~160 g/L 的槐糖脂。

3 生物表面活性剂的提取和纯化

用于石油工业的生物表面活性剂可以直接使用发酵液, 而用于食品和医药等行业的生物表面活性剂则对产品的纯度要求较高。

对于大多数细菌分泌形成表面活性剂的分离提取和产品纯化的方法均相类似: 萃取、盐析、渗析、离心、沉淀、结晶以及冷冻干燥。

据报道^[9]: 一般情况下, 发酵液慢慢冷却后, 加入电解质, 使发酵液分为两层, 取出上层澄清部分。沉淀部分再用饱和电解质溶液清洗, 并离心分出上层清亮部分, 合并两次的液体部分用硅藻土过滤。将收集到的沉淀溶于水中, 用乙醚萃取后, 再用蒸馏水渗析, 然后冷冻干燥, 即可得到一种属于聚合糖类的生物表面活性剂的粗产品。粗产品溶于水中, 室温下加入十六烷基三甲基溴化铵, 使其凝聚沉淀, 然后进行离心分离, 沉淀部分用蒸馏水清洗, 再将洗后的沉淀溶于硫酸钠溶液中, 不溶部分通过离心而除去。然后加碘化钾, 形成的十六烷基三甲基溴化铵进行离心分离。所剩清液部分用蒸馏水渗析, 然后冷冻干燥, 得到白色固体, 即为较纯净的表面活性剂。

华兆哲等^[10] 报道利用三氯甲烷和丙酮混合液作为洗脱液进行硅胶柱层析可获得甘露糖赤藓糖醇脂。Kim 等^[11] 在分离目的产物过程中则采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离、冷冻丙酮和正己烷处理、硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 凝胶柱层析等步骤。在分离生物表面活性剂, 尤其是糖脂类生物表面活性剂时, 较多采用溶剂法和硅胶柱法^[12]。Kuyukina 等^[13] 发现用叔丁基甲醚提取生物表面活性剂时, 粗提液中收率高达 10 g/L, CMC 达 130~170 mg/L, 表面张力和界面张力分别为 29 mN/m 和 0.9 mN/m。

4 基因工程的应用

重组 DNA 技术的发展与应用大大促进了发酵法生产生物表面活性剂技术的发展。Nakano 和 Zuber 等^[14] 对表面活性蛋白生物合成基因及其调节机理的研究发现共有 3 个基因座位即 *srfA*、*srfB* 和 *srP* 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 产生表面活性蛋白有关。*srfA* 是一个 25 kb 以上的大操纵子, 负责编码催化表面活性蛋白合成的几个酶。*SrfA* 的突变株不仅中止合成表面活性蛋白, 而且还影响细胞利用异种 DNA 和形成孢子的能力, 因此这个操纵子表达的蛋白质在细胞特化和分化中有重要作用, *srfB* 包括 *comP* 和 *comA* 基因, 它形成一个信号转导系统, 并调节 *srfA* 的转录。曾分离到一株在 *srfB* 位置发生突变从而增加表面活性蛋白产量的菌株。*srP* 基因编码了一个有 224 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质是表面活性蛋白合成系统的关键成份。它直接或间接地调节表面活性蛋白合成基因的表达。*srP* 蛋白质的过量合成会降低 *srfA* 操纵子中 *lacZ* 的转录融合。Kim 等^[15] 将 *Bacillus subtilis* C₉ 的 *sfp* 基因导入 *Bacillus subtilis* 168 并表达。其衍生菌为 *Bacillus subtilis* 103, 表面张力和乳化性能增强, 将发酵液分离的化合物作 TLC 分析, 表明已生

成表面活性剂。

乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter caluoceticux*-KA 57) 在原油污泥上生长时出现 4 种质粒。质粒 pSR4 控制着这种微生物利用原油基质。这个 20 kb 的质粒编码了一个与细胞表面紧密相连的因子, 从而使细胞能与烃类基质产生生理作用。在食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*) 中位于 OCT 质粒的 *alkBAC* 基因编码了一个烷烃末端羟化和脱氢所必需的烷烃利用系统, *alkBAC* 操纵子中调节基因和结构基因在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 中的异源表达使这些微生物能以正辛烷为唯一碳源和能源而生长。

铜绿假单胞菌中乳糖基因的表达使其能够依靠乳糖或者干酪乳清生长并产生鼠李糖脂, 其 *rhLABR* 基因簇编码合成鼠李糖脂所需的调节蛋白 *rh1R* 和鼠李糖苷转移酶 *rh1AB*。

5 工业应用前景

5.1 石油工业 生物表面活性剂应用潜力最大的是石油工业, 由于它对生物表面活性剂的纯度和专一性要求不高, 可直接使用含完整细胞的发酵液。微生物法提高石油采收率技术 (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR) 可以将工厂中生产出来的微生物表面活性剂直接注入油层以改善水的驱油性能 (Extra Situ MEOR, 地面法 MEOR); 也可以将整个储油层作为一个巨大的生物反应器, 把能产生表面活性剂的活微生物注入油层, 或者直接利用油层中的土著微生物, 同时注入微生物生长必需的营养物, 从而让它们在储油层中的细胞-油界面上生产表面活性剂 (In Situ MEOR, 地下法 MEOR)。紫红诺卡氏菌 (*Nocardia rhodochrous*) 产生的海藻糖脂, 用于地下砂石中石油的回收, 出油率提高了 30%。

5.2 环境工程 生物表面活性剂在环境生物工程领域有着极大的应用潜力。在受烷烃和原油污染的土壤中加入表面活性剂, 能够增强憎水性化合物的亲水性和生物可利用性, 可以提高土壤微生物的数量。这样, 既避免了接种非土壤微生物去降解污染物, 又提高了烷烃的降解速度, 而且降解速度的提高远远高于单独加入某种营养成分所提高的速度, 因而被认为是现代生物修复技术的一部分。

5.3 食品工业 在食品工业中, 生物表面活性剂可作为添加剂。由于生物表面活性剂符合功能性食品和绿色食品添加剂的要求, 随着人们对于健康的日益重视, 将成为一种广泛应用的食品添加剂。蔗糖酯 (Sucrose ester 或 Sucrose fatty acid ester) 是目前引人注目的一种表面活性剂, 无色, 无味, 无毒, 广泛应用于食品、医药、化妆品、制糖、果蔬保鲜、化肥、饲料及炸药等领域。蔗糖酯水解后成为蔗糖和可食用的脂肪酸, 具有营养价值。与一般合成的表面活性剂不同, 蔗糖酯在好氧和厌氧的条件下都能生物降解, 是一种绿色表面活性剂。

5.4 其他领域 表面活性剂可以用于口红和作为皮肤及头发的保湿剂。表面活性剂在医药、造纸、纺织、农药、采矿等领域也有着广阔的前景。

随着重组 DNA 技术等基因工程手段在提高生产菌株表达量上的应用和高效筛选模型的建立, 以及廉价底物的选择、培养工艺和提取技术的不断提高, 发酵法生产生物表面活性剂的经济成本会不断降低, 其应用将会随之得到不断推广。

参 考 文 献

- [1] Desai J D, Banat I M. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61** (1): 47 ~ 64.
- [2] Mulligan C N, Cooper D G, Neufeld R J. *J Ferment Technol*, 1984, **62** (4): 311 ~ 314.
- [3] Van der Vegt W, Van der Mei H C, Noordmans J, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **35**: 766 ~ 770.
- [4] Shulga A N, Karpenko E V, Eliseev S A, *et al.* *Microbiol J*, 1993, **55**: 85 ~ 88.
- [5] Adamczak M, Bednarski W. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 313 ~ 316.
- [6] 钱欣平, 阳永荣, 孟 琴. *日用化学工业*, 2002, **32** (1): 15 ~ 17.
- [7] 薛燕芬, 王修垣. *微生物学报*, 1995, **35** (6): 465 ~ 469.
- [8] Zhou Q, Kosaric N. *J Am Oil Chem Soc*, 1995, **72** (1): 67 ~ 71.
- [9] US Patent 4, 395, 354.
- [10] 华兆哲, 陈 坚, 朱文昌, 等. *天然产物研究与开发*, 1999, **11** (3): 11 ~ 16.
- [11] Kim S H, Lim E J, Lee S O, *et al.* *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, **31** (3): 249 ~ 253.
- [12] 刁虎欣, 王 践, 张心平, 等. *微生物学通报*, 2000, **27** (6): 413 ~ 416.
- [13] Kuyukina M S, Ivshina I B, Philp J C, *et al.* *J Microbiol Methods*, 2001, **46** (2): 149 ~ 156.
- [14] Nakano M M, Corbell N, Besson J, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1992, **232**: 313 ~ 321.
- [15] Kim H S, Kim S B, Park S H, *et al.* *Biotechnol Lett*, 2000, **22** (10): 1175 ~ 1178.