

阿斯巴甜的生物合成

林应锐

(中国科学院微生物研究所, 北京, 100080)

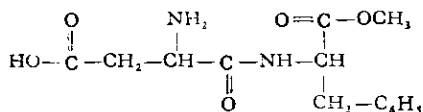
当前,世界食糖短缺,我国尤甚。自1983—1989年平均净进口164万吨^[1],1988年达330万吨,价值8.9亿美元^[2]。另一方面由于无糖低热值保健甜食流行,市场对高甜度低热值甜味剂需求增加。

在天然和人造高甜度甜味剂中,阿斯巴甜风味最佳,与蔗糖一样,无任何不良后味,而甜度是蔗糖的180—200倍。不严格地说,它是天然物质二肽的甲酯,安全性高。联合国的食品添加剂专家委员会(JECFA)评定为A(1)级食品添加剂。包括我国在内已有80余个国家和地区批准使用。

从1965年发现其甜味后,经十数年严格试验至1979年首次在美国批准使用以来发展迅速^[3],目前欧美每年约需6000—7000吨,相当于120—140万吨糖,预测近期每年将以20%速度增加^[4]。广泛用于饮料,糖果罐头等多项食品中,使用此甜味剂的食品超过3000种。

(一) 阿斯巴甜的化学结构与合成

阿斯巴甜(Aspartame, 简称 α -APM),学名 α -L-天冬氨酰-L-苯丙氨酸甲酯,结构式如下:



α -APH是由含有 α , β 二个羧基的L-天冬氨酸和L-苯丙氨酸结成二肽经甲醇酯化而得,由于分子功能团多,这二种氨基酸若不带保护基,由于自身酰化和相互酰化,可生成六种二肽。即 α -AA; β -AA; PP; α -AP; β -AP; PA*, 每一种二肽又有可能生成三种甲酯(以AP为

例,可得MAPM二甲酯和APM及MAP二种单甲酯)。因此当选用专一性较差的化学合成法时,为了减少副反应,在生成肽键之前,必须将氨基酸的某些功能团保护起来。形成肽键后再将保护基(ρ)脱去。这就使得化学合成法步骤多,收率不理想,通常化学合成包括五步。

1. 将天冬氨酸的氨基保护起来,并制成酸酐。2. 苯丙氨酸酯化成苯丙氨酸甲酯。3. 将带保护基的天冬氨酸酐和苯丙氨酸甲酯缩合成带保护基的阿斯巴甜(无甜味)。4. 脱除保护基制得阿斯巴甜的盐。5. 中和析出阿斯巴甜除去 β -APM杂质。

由于化学反应复杂,步骤多。经过20余年的研究,虽然已经工业化,但至今尚未找到满意的合成法。因此人们期望通过反应选择性强的生物合成法,简化合成步骤,提高收率,降低成本。研究主要集中在结成肽键上(即第3步)。排除 β -APM的生成,只得到 α -APM,从而提高收率和免去分离提纯的步骤。

早期多用酶促合成肽键。使用较多和较成功的是嗜热菌蛋白酶(Thermolysin, Thermolase),作用底物是L-苯丙氨酸甲酯和氨基已被保护的L-天冬氨酸。保护基是各式各样的,主要是苄氧羰基($\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{OCO}-$)^[5-13]; 其他如对甲氧苄氧羰基($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCO}-$)^[14] 甲酰基($\text{HCO}-$)^[15] 乙酰基($\text{CH}_3\text{CO}-$)^[16] 和苯乙酰基($\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{CO}-$)等^[17]。通常是在pH 6.0—6.5的缓冲溶液中形成肽键,只生成带保护基的阿斯巴甜(α - ρ -

* A代表L-天冬氨酸或L-天冬氨酰; P代表L-苯丙氨酸或L-苯丙氨酰。

APM) 没有 β - ρ -APM 杂质。使用来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白酶, 底物除 L-苯丙氨酸甲酯外, 可用不保护氨基的 L-天冬氨酸- α -甲酯或 α -酰胺一步生成阿斯巴甜^[18]。内肽酶 (Endopeptidase) 可用 N-苯甲酰-L-天冬氨酸- α -甲酯与 L-苯丙氨酸甲酯反应, 生成苯甲酰基阿斯巴甜^[19]。木瓜蛋白酶在乙酸乙酯溶液中使苄氧羰基-L-天冬氨酸同苯丙氨酸甲酯生成苄氧羰基阿斯巴甜, 甚至可用外消旋的 D,L-苯丙氨酸甲酯起反应而只生成 L 型产物。嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)^[22] 的中性蛋白酶在 pH6.4 水溶液中, 将苄氧羰基-L-天冬氨酸同苯丙氨酸甲酯盐酸盐生成带保护基的阿斯巴甜^[23]。得自溶乳酪小球菌 (*Micrococcus caseolyticus*) 阿斯巴甜水解酶 (aspartame-hydrolyzing enzyme), 能在与水可混溶的有机溶剂中直接用不带保护基的 L-天冬氨酸与 L-苯丙氨酸甲酯结合一步生成阿斯巴甜^[24]。除去蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) 菌体后, 发酵液中的蛋白酶不必抽提出来, 直接用于 pH6.8 水溶液中, 将苯酯基-L-天冬氨酸同苯丙氨酸结合生成苯酯基-L-天冬氨酸-L-苯丙氨酸^[25]。氨肽酶 (aminopeptidase) 也曾被用于合成阿斯巴甜^[26]。

此外尚有少量非合成肽键的酶反应研究工作。如利用枯草杆菌蛋白酶 (Subtilisin), 有选择的只催化酯化天冬氨酸苄丙氨酸中苯丙氨酸上的羧基成为甲酯, 生成阿斯巴甜^[27]。在有机溶剂中能起作用的脂肪酶 (lipase), 能专一地水解除去阿斯巴甜甲酯 (即 MAPM) 上天冬氨酸羧基上的甲酯基, 使其成为阿斯巴甜 (APM)^[28]。青霉素酰化酶 (Penicillin acylase) 可水解除去苯乙酰基阿斯巴甜上的苯乙酰基^[29]。从经济角度看这些反应的价值不如合成肽键的反应。

将菌体直接加至含有底物的反应体系中, 催化合成肽键也有报导, 如棒状杆菌 (*Corynebacterium*)^[30, 31]、产碱杆菌 (*Alcaligenes*)、无色杆菌 (*Achromobacter*)、黄杆菌 (*Flavobacterium*)、假丝酵母 (*Candida*)、八叠球菌

(*Sarcina*)^[31, 32]、节杆菌 (*Arthrobacter*)、纤维单孢菌 (*Cellulomonas*)、扩展短杆菌 (*Brevibacterium*)^[33]、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和掷孢酵母 (*Sporobolomyces*)^[32], 它们的作用底物除了常用的苯丙氨酸甲酯和带保护基的天冬氨酸, 也可直接用两种氨基酸生成阿斯巴甜或其前体二肽^[30-34]。

另据报道, 通过 DNA 重组技术来获得甜味剂前体天冬氨酸苄丙氨酸, 合成了具有 (L-天冬氨酸-L-苯丙氨酸)_n 密码的多聚体双链 DNA, 在 Hind III 限制性内切酶的切口处联接到 pWT121 质粒上或用 EcoRI 酶连接至 pBGP120 质粒上, 再转入大肠杆菌 K12 中, 从寄主获得含有这一重复序列的大分子肽, 提取后用胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 或枯草杆菌蛋白酶切开得到 α -L-天冬氨酸-L-苯丙氨酸, 再甲酯化成阿斯巴甜^[35, 36]。

(二) 生物方法与化学方法的比较

作为商品的阿斯巴甜, 其生产方法必须具有经济上的可行性, 因此必须与现行的化学合成法进行比较, 全面考虑。从上述资料可看到生物合成法 (不包括基因工程) 有如下优点:

1. 酶催化合成肽键时, 转化率比化学合成法高, 可望提高得率。

2. 生物催化合成肽键时, 只生成希望得到的 α -型产物。没有 β -异构体杂质。化学法目前尚无法完全排除 β -异构体杂质的生成。

3. 有可能使用不带保护基的 L-天冬氨酸作底物。化学合成法难于做到这一点。可省去化学法必须上保护基和脱保护基的步骤, 简化生产过程, 节省辅助材料, 有利于提高收率。

缺点是:

1. 生物合成法一般投料浓度和产物浓度都很低, 生产强度低, 物料处理量大, 能耗大, 收率低。

2. 生物法无法独立完成阿斯巴甜的全合成。通常甲酯化都采用化学法, 否则需用另一种酶来进行反应。生产过程需兼有生物和化学两套工艺。

实际上生物合成法优势不大, 能否扬长避

短将是成败的关键。就合成肽键这一主要反应而论,都能专一的生成希望得到的 α -异构体。如使用嗜热菌蛋白酶合成肽键的转化率很高,通常可达到95%左右,甚至达到100%^[7,17,37]。化学法一般可达到70%左右。然而生物法投料和产品浓度都很低,经提取回收,收率的大小将对这个优势带来影响。阿斯巴甜在pH4.5以上热稳定性很差,传统的直接长时间浓缩提取有一定难度。可能增加杂质降低收率。

使用其他的酶,转化率都不太高,利用菌体催化合成肽键,转化率多数低于化学合成法。

另一方面,天冬氨酸和苯丙氨酸化学性质相当稳定,易于从化学反应后的母液中回收。扣除回收后将提高化学合成法的总收率。使其能与生物法相匹敌。

(三) 生物方法的改进途径

利用什么样的底物,是生物法能否取胜的关键问题。只有选用不带保护基的L-天冬氨酸,才能减少合成步骤,否则仅是代替化学法中的一步反应,则无优势可言。遗憾的是当前公开发表的文献资料报导中,合成肽键转化率高的,如用嗜热菌蛋白酶时,多数是以带保护基的L-天冬氨酸为底物。直接以天冬氨酸为底物的多数是用菌体来催化合成肽键,但转化率则很低。

至于生物法可利用较廉价的DL-型苯丙氨酸生成L-型二肽之后,留下D-型苯丙氨酸,合成和拆旋同时进行,化学法也有类似报导^[38],但无多少利益。原因是工业生产的苯丙氨酸,可用苯丙酮酸或肉桂酸经生物催化加氢直接得到L-型产品,也可直接发酵制造L-苯丙氨酸。这二种方法目前与化学合成法并存。因而利用DL-型苯丙氨酸好处不多。

嗜热菌蛋白酶催化合成肽键达到高转化率可以说是工艺合理和不难做到的。然而由于在反应体系中底物和产物在水中溶解度都很低,成为工业化的障碍。使问题又集中到探求更好的反应用溶剂体系和设计生物反应器的研究上。

为了提高溶解度,常用的办法是在水中加

入能与水混溶的有机溶剂^[24,26]、直接使用有机溶剂^[6,13,19,26]或是使用水与有机溶剂的两相体系^[12,20,21,37]。当然有机溶剂必须对酶无害。

为了延长酶的使用寿命和便于同产物分开并能连续操作,最常用的是将酶固定化^[5,6,8,9,11,29,39]。嗜热菌蛋白酶吸附在Amberlite XAD-7树脂上,在槽式反应器中连续反应搅拌300小时,获得 α -氧羰基阿斯巴甜,转化率90%,酶活性仍保留53%^[9]。此酶吸附于Amberlite XAD-8树脂上,并带有湿润的缓冲水溶液,将它直接加入含有底物的乙酸乙酯溶液中进行酶促反应,转化率高达93%^[11]。此酶连接至超薄尼龙胶囊膜上,胶囊内容物有缓冲液,再将它浸入含有反应底物的氯仿溶液中,在40℃处经24小时酶促反应之后,在氯仿溶液中生成 α -氧羰基阿斯巴甜,转化率达到100%^[37]。采用斥离子膜技术,用膜将反应缓冲液分隔成二半。将N-甲酰-天冬氨酸- β -苄酯和苯丙氨酸甲酯(前者的 α -羧基和后者的氨基都可电离成离子,不能通过膜)和嗜热菌蛋白酶一同加入其中的一半中,经酶促反应,生成没有可电离功能团的产物,它能通过膜进入含有酰化酶I(acylase I)的另一半缓冲液中,并在酶的作用下脱去部分保护基,露出可成离子的功能团。因而不能通过膜返回,以此达到将产物和底物分开并积聚下来^[13]。采用电渗手段,将底物输送到固定化酶上参与反应,随后将产物移去,以循环操作来达到提高转化率和富集产品的目的^[39]。木瓜蛋白酶直接加至含有底物的Mellvaine缓冲液(pH6.2)和乙酸乙酯的两相溶液中,在37℃反应72小时之后,获得对甲氧 α -氧羰基阿斯巴甜,转化率达75%。若将此酶固定于Amberlite-XAD-7柱上,底物溶于用Mellvalne缓冲液饱和过的乙酸乙酯中,流经此柱,得到的转化率仅有45%^[21]。为了便于从反应体系中分出产物,使用嗜热菌蛋白酶,在高压超临界的液体二氧化碳中进行反应,合成 α -氧羰基阿斯巴甜^[13]。还有将菌和酶联合起来的反应器,固定化的不透明诺卡氏菌(*Nocardia opaca*),在高压氢之下,催化苯丙酮酸甲酯与氯化铵化合成苯丙

氨酸甲酯。接着用固定化嗜热菌蛋白酶催化苯丙氨酸甲酯与苄氧羰基天冬氨酸结合,生成苄氧羰基阿斯巴甜^[12]。

虽然生物合成法的研究起步并不晚,但存在不少需要解决的问题,故至今阿斯巴甜几乎都是用化学法生产。

1984 年日本东洋曹达 (Toyo Soda) 工业株式会社建成以酶法为基础,月产 1—2 吨的试验厂随后与荷兰 DSM 公司合作,投资 3000 万美元在荷兰设厂,计划年产 500—1000 吨,于 1987 年投产。该厂是使用嗜热溶蛋白芽孢杆菌 (*B. Thermoproteolyticus*) 的蛋白酶,以带保护基的天冬氨酸和苯丙氨酸甲酯为原料,在有机溶剂中合成带保护基的阿斯巴甜,随后再脱去保护基^[40-42]。最近法国 BioEurope 公司用更先进的酶催化合成法。直接使用天冬氨酸和苯丙氨酸甲酯,在有机溶剂中一步合成阿斯巴甜^[22]。

曾有预测,酶催化合成比化学合成的成本可降低 30%^[42],但就新近荷兰(据报道荷兰是以酶法生产的)对来自美国或日本的进口阿斯巴甜(化学法生产的)课以 38.23 美元/kg 和 41.56 美元/kg 的重税看^[43,44],以目前酶法生产工艺实际上能否降低成本,尚难确定。

我国北京、沈阳、上海等地研究机构都已完成化学合成的研制工作。有的已转入工厂试产。并有少量试验品出售,希望不久能正式投产。

参 考 文 献

1. 李永江: 中国食品信息, 4: 5—8, 1991。
2. 轻工业发展战略研究中心编: 1989 中国轻工年鉴, 第 335 页, 中国轻工年鉴社, 轻工业出版社, 北京, 1989。
3. 鎌田光雄: *New Food Industry*, 26(2): 201—226, 1984。
4. *Bio Products, Bio Industry*, 6: 47—48, 1990。
5. Hirata Akira: JP 63-209559, 1988. C. A. 110: 191281。
6. Nakanishi, Kazuhiro et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32(6): 633—635, 1990. G. A. 112: 215130。
7. 陶国良等: 化学通报, 4: 42—45, 1989。
8. Oyama, Kiyotaka et al.: Ger. Offen., 3012693, 1980. C. A. 94: 192707。
9. 惠苏(译): 工业微生物, 16(3): 51, 1986。
10. Yoshikazu and Kaoru Mori: *Tetrahedron Lett.*, 28:

- 2611—2612, 1979。
11. Kiyotaka Oyama et al.: *J. Org. Chem.*, 48: 5241—5242, 1981。
12. Nakamura Noriyuki et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, 67(6): 399—403, 1989。
13. Kamihira Masamichi et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51(12): 3427—3428, 1987。
14. Isowa Yashikazu et al.: JP. 7961140, 1979. C. A. 91: 141242。
15. Iacobucci G A: WO 88-01298; C. A. 109: 127332。
16. Takemoto Tadashi et al.: JP62-74296, 1987; C. A. 107: 95611。
17. Schmidt E et al.: DE 3612344, 1987. C. A. 109: 91589。
18. Boston M G et al.: EP 269390, 1988. C. A. 109: 228773。
19. Bennett A D: WO 88 01650; C. A. 109: 91273。
20. Fungshun Wool Co.: JP02-7993, 1990. C. A. 113: 210476。
21. Chen Shui Tein, Wang Kung Tsung: *J. Org. Chem.*, 53(19): 4589—4590, 1988。
22. *European Biotechnology News*, 4. 8. 1987。
23. Ulmer D C et al.: US 4935355, 1990. C. A. 113: 130752。
24. Faul F et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 542: 351—355, 1988。
25. Davino A A et al.: FR 2499098, 1982. C. A. 97: 196872。
26. Hill J B et al.: US 4892820, 1990. C. A. 113: 38886。
27. Davino A A: US 4293648, 1981. C. A. 96: 20471。
28. Otsabo Kazumasa: JP 62-74297, 1987. C. A. 107: 114543。
29. Fuganti C et al.: *Tetrahedron Lett.*, 27(27): 3191—3194, 1986。
30. Yokozeki Kenzo et al.: EP 124313, 1984. C. A. 102: 60780。
31. Ajinomoto Co: JP 60-62998, 1985. C. A. 103: 121708。
32. *Biotechnology Newswatch*, 3(17): 3, 1983。
33. Yokozeki Kenzo et al.: JP 61-35797, 1986. C. A. 104: 205536。
34. Harada Tsuneo et al.: EP 74095, 1983. C. A. 98: 196360。
35. Searle G D and Co.: NL 8100437, 1981. C. A. 96: 33352。
36. Bahl C P et al.: EP 36258, 1981. C. A. 96: 33354。
37. Okahata Yoshio et al.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2(1): 91—96, 1988。
38. Hajiya Toyoto et al.: EP 256812, 1988. C. A. 110: 76073。
39. Snedecor B R et al.: EP 188342, 1986. C. A. 105: 113603。
40. 发酵と工業, 43(6): 37, 1985。
41. *Biotechnology Newswatch*, 1, 1985。
42. 姚振威(译): 食品与工业发酵, 1: 87—91, 1990。
43. *Chemical Industry Notes*, 19(51): 51859, 1990。
44. *Bio. Technology*, 9, Jan. p. 9, 1991。