

文章编号:1673-1689(2006)02-0020-04

高固液比体系中酶催化合成 Z-Phe-Leu-OMe 的研究

黄振龙, 宗璟, 陈英文, 沈树宝*

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要:以模型二肽 Z-Phe-Leu-OMe 的合成为对象讨论了高固液比条件下酶催化体系的性质。研究了固液比高低对二肽产率的影响,测定了高固液比条件下随着反应进行体系 pH 的变化,尝试提出该类体系 pH 变化的机理,并采用 KHCO_3 和 CaCO_3 调节该体系的 pH 来提高催化效率。

关键词:高固液比;模型二肽;酶催化;pH 值

中图分类号:Q 55

文献标识码:A

Enzymatic Synthesis of Z-Phe-Leu-OMe in A High Solid-Liquid Ratio System

HUANG Zhen-long, ZONG Jing, CHEN Ying-wen, SHEN Shu-bao*

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Enzymatic synthesis of model dipeptide Z-Phe-Leu-OMe in a high solid-liquid ratio system was investigated. Effects of solid-liquid ratio on the dipeptide yield were analyzed. In addition, the pH change of the system during the reaction was monitored, and the mechanism of this change was presented. The catalytic efficiency of Z-Phe-Leu-OMe enzymatic synthesis was further promoted by adjusting pH of the system through addition of KHCO_3 and CaCO_3 .

Key words: high solid-liquid ratio; model dipeptide; enzymatic catalysis; pH value

酶催化反应条件温和、立体和区域选择性强,因而酶催化一直在手性化合物及药物生产等方面有很多应用。20 世纪 90 年代以来,随着有机介质中酶催化理论的发展,有机介质中酶催化合成得到了很大的发展^[1-3]。然而选择合适的有机溶剂使它既对反应底物具有良好的溶解性而又不使酶失活是非常困难的,且有机溶剂的使用会带来环境污染问题,极大地限制了有机介质中酶法合成在医药、食品及香料等行业中的应用。上世纪末出现了低共熔、拟低共熔、底物悬浮及固-固酶催化体系^[4-7]

等一类高固液比酶催化体系,有效地克服了有机介质中酶催化反应的不足。

本文将模型二肽 Z-Phe-Leu-OMe 的合成为对象研究高固液比条件下酶催化体系的性质,探索高固液比条件下体系固液比和酸碱度对催化效率的影响,尝试通过加入 KHCO_3 和 CaCO_3 调节体系的酸碱度以提高催化效率,并归纳提出该体系的 pH 变化机理,初步解释高固液比条件下体系酸碱度的变化,分析高固液比条件下该体系催化效率高的原因。

收稿日期:2004-12-13; 修回日期:2005-10-13.

基金项目:国家自然科学基金项目(20376034),江苏省自然科学基金项目(BK2003084).

作者简介:黄振龙(1982-),男,江苏溧水人,生物化工硕士研究生;*为通讯作者.

1 材料与方 法

1.1 材 料

嗜热菌蛋白酶 T7902: 购于 sigma 公司; Z-Phe-Leu-OMe · HCl 及 Z-Phe-Leu-OMe 标准品: 购于上海吉尔生化有限公司; 其它试剂均为市售分析纯或色谱纯。

1.2 主要仪器

P680 高效液相色谱: 美国 Dionex 公司生产; 数显恒温磁力搅拌器: 常州国华电器有限公司生产; 雷磁 pH 计: 上海雷磁仪器厂生产; 旋转蒸发器: 上海申顺生物科技有限公司生产; 数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司生产; 10 mL 微型反应器: 自制。

1.3 实验方法

1.3.1 反应体系的预反应 分别称取 1 mmol 两底物氨基酸 Z-Phe 及 Leu-OMe · HCl 于反应器中, 加入等摩尔 KHCO_3 及一定量水中中和反应。

超声处理数分钟后, 磁力搅拌 30 min, 除去反应产生的 CO_2 同时使体系充分混合均匀。

1.3.2 酶催化二肽的合成 称取 5 mg 嗜热蛋白酶直接加入预反应好的体系中, 恒温磁力搅拌, 温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 转速 200 r/min。

1.4 分析方法

底物和产物的分析采用高效液相色谱法。色谱柱为 Kromasil C18 250 mm × 4.6 mm, 以甲醇: 水 (0.1% 三氟乙酸) 75% : 25% 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 在 UV220 nm 处检测。产物 Z-Phe-Leu-OMe 保留时间与标准品一致。

2 结果与讨论

2.1 固液比高低对产物得率的影响

通过控制液相介质水的加量来调节体系固液比的高低, 不同固液比条件下体系产物得率如图 1 所示。

当水加量为 4 mL 即体系固液比较低时, 产物得率最高接近 70%, 反应 15 h 后产物得率明显下降。作者认为当水含量高时, 反应后期水解逆反应明显加强, 造成产物得率较大的降低。水加量为 1 mL 时体系的固液比太高, 由于受反应器和搅拌设备的限制, 反应过程中固体底物容易粘附在反应器壁上, 体系传质效率很低, 体系的催化效率受到了很大的影响。因此, 适当的固液比对体系的催化效

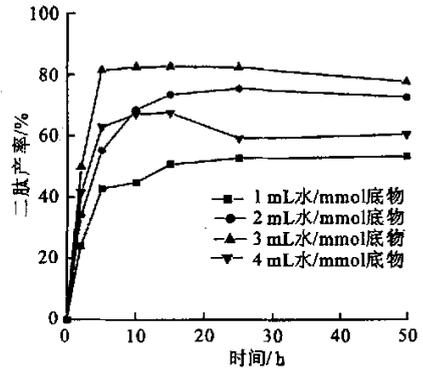


图 1 固液比高低对二肽产率的影响

Fig. 1 Effect of solid-liquid ratio on yield of peptide

率影响很大, 本体系水加量为 3 mL 时催化效率较高, 反应 5 h 后产物得率即达到 81%。分析其原因如下:

1) 液相介质中酰基受体浓度远远高于酰基供体浓度。水中两底物的溶解度数据^[8]如下: Z-Phe 0.0028 mol/L, Leu-OMe 1.1 mol/L, 因此, 高固液比条件下 3 mL 水介质中, Leu-OMe 浓度为 0.33 mol/L 而 Z-Phe 浓度为 0.0028 mol/L, 酰基受体与酰基供体浓度之比达到 119.05; 而有机溶剂催化体系中由于两底物均完全溶解, 酰基受体与酰基供体浓度之比为 1。因此高固液比条件大大有利于肽键的生成。

2) 产物从液相介质中沉淀析出, 促使平衡向右进行。反应的平衡常数^[9] K 约为 1.38, 反应达到平衡时产物浓度 $c = K * [\text{Z-Phe}] * [\text{Leu-OMe}]$ 。水中产物浓度达到溶解度 $S (9.38 \times 10^{-5} \text{ mol/L}^{-1}, \text{HPLC 自测})$ 且反应达到平衡时 Leu-OMe 浓度为 $[\text{Leu-OMe}] = c / (K * [\text{Z-Phe}]) = 0.024 \text{ mol/L}^{-1}$, 因此当 $[\text{Leu-OMe}]$ 大于 0.024 mol/L 时, 反应未达到平衡, 产物即从水相沉淀析出, 促使反应继续进行。

2.2 体系 pH 值变化及对产物得率的影响

高固液比体系 (1 mmol 底物、1 mmol KHCO_3 、3 mL 水及 5 mg 酶) pH 值随时间的变化曲线如图 2 所示。从图中可以看出, 体系的初始 pH 值为 6.7 左右, 随着反应的进行体系 pH 呈明显的下降的趋势。反应 15 h 后, pH 值稳定在 5.2 左右。图 1 中 3 mL 水体系随着反应的进行, 反应速率明显下降且反应后期产物得率有一定的下降。这与体系图 2 所示体系 pH 值的明显降低有很大的关系。

作者尝试加入过量 KHCO_3 来调控体系的 pH, 不同 KHCO_3 加量对产物得率的影响见图 3。

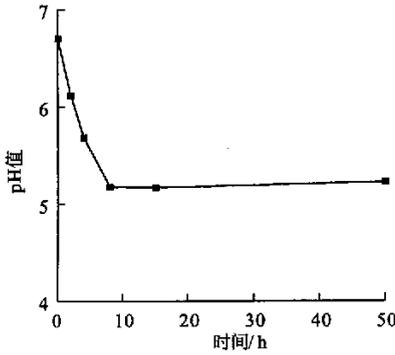


图 2 体系 pH 值随时间的变化曲线

Fig. 2 The time curve of pH

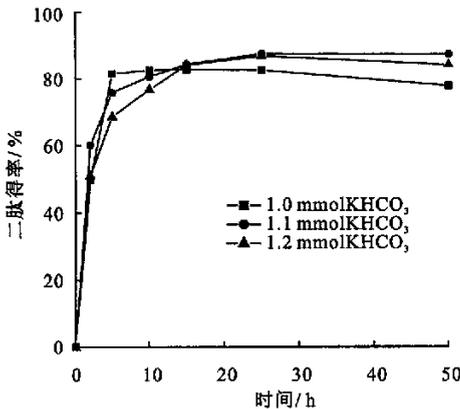


图 3 KHCO₃ 加量对二肽产率的影响

Fig. 3 Effect of KHCO₃ addition on yield of peptide

由实验数据可知,加入 KHCO₃ 体系催化效率有了一定的提高,KHCO₃ 加量为 1.1 mmol 时,产物得率可达到 87.38%。同时,测量了不同 KHCO₃ 加量下体系 pH 值的变化,如表 1 所示。

表 1 KHCO₃ 添加量对体系 pH 值的影响

Tab. 1 Effect of KHCO₃ addition on pH

KHCO ₃ 添加量/ mmol	体系初始 pH 值	反应 50 h 体系 pH 值
1.0	6.70	5.18
1.1	6.94	5.83
1.2	7.04	8.02

实验数据证明,加入 KHCO₃ 可以一定程度上调节体系的 pH 值,但体系的 pH 变化却不尽相同。当体系的初始 pH 值为 6.70 和 6.94 时,随着反应的进行,体系 pH 朝酸性方向变化;而当体系的初始 pH 值为 7.04 时,随着反应的进行,体系的 pH 朝碱性方向变化。

与均相酶催化体系相比,高固液比酶催化体系的 pH 调节有着很大的区别。由于高固液比条件下

万方数据

体系液相介质质量相对较小且固体底物的量较高,液相介质的缓冲能力有限,液相介质的酸碱度易受外在环境(包括固体底物溶解及反应进程等)的影响。加入等摩尔的 KHCO₃ 中和 Leu-OMe · HCL 后尝试采用难溶的 CaCO₃ 调控体系的 pH。不同 CaCO₃ 加量对产物得率的影响如图 4 所示。CaCO₃ 加量为 0.1 mmol 时,反应最高产率可达到 90.92%。同时,体系的 pH 值也得到了较好的控制,反应结束后体系的 pH 值为 7.54。

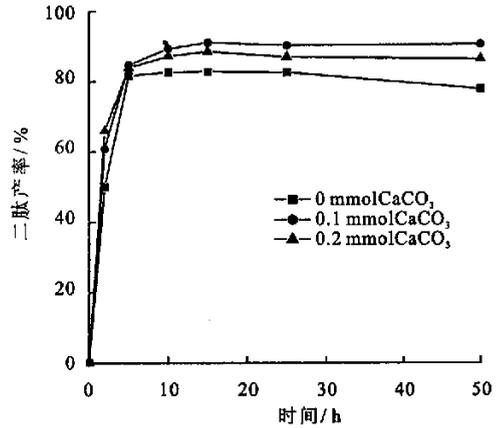


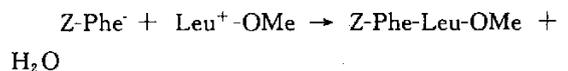
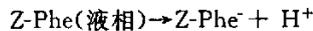
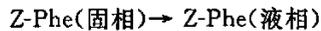
图 4 CaCO₃ 加量对二肽产率的影响

Fig. 4 Effect of CaCO₃ addition on yield of peptide

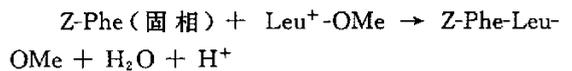
2.3 体系 pH 变化的机理分析

高固液比条件下本体系的酸碱度变化与初始 pH 关系很大。水中两底物的溶解度数据^[8]如下: Z-Phe 0.0028 mol/L, Leu-OMe 1.1 mol/L, 因此,在反应初始阶段 Z-Phe 几乎完全以固相形式存在而 Leu-OMe 完全溶解在水相中。两底物氨基酸的 PK 值如下: Z-Phe, 2.83; Leu-OMe, 6.98。

当 KHCO₃ 添加量为 1.0 mmol 时,体系初始 pH 值为 6.70,两底物氨基酸分别主要以 Z-Phe⁻ 和 Leu⁺-OMe 形式存在。随着反应的进行,Z-Phe⁻ 不断的被消耗,固体 Z-Phe 不断溶解在液相中,方程式如下:



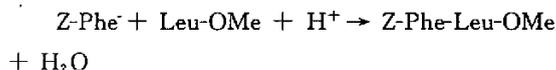
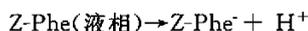
归纳三方程可得



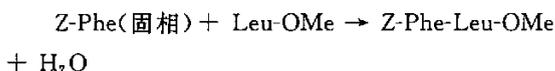
因此,如图 2 所示随着反应的进行体系的 pH 值不断下降。

当 KHCO₃ 添加量为 1.2 mmol 时,体系初始 pH 为 7.04,两底物氨基酸分别主要以 Z-Phe⁻ 和

Leu-OMe 形式存在。同理,方程式如下:



归纳三方程可得



因此,随着反应的进行底物氨基酸逐渐被反应完全,过量的 KHCO_3 存在下体系 pH 值升高。

参考文献:

- [1] Zaks A, Klibanov A M. Influence of organic solvents on papain kinetics[J]. *Science*, 1984, 224:1249-1251.
- [2] 闫爱新,田桂玲,叶蕴华. 蛋白酶在有机合成中的应用的新进展[J]. *化学进展*, 2001, 13:203-208.
- [3] 沈鸿雁,田桂玲,叶蕴华. 非水介质中酶催化反应研究新进展[J]. *有机化学*, 2003, 23:221-229.
- [4] Halling P J, Eichhorn U, Kuhl P. Thermodynamics of solid-to-solid conversion and application to enzymic peptide synthesis[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17:601-606.
- [5] Erbdinger M, Ni X W, Halling P J. Kinetics of enzymatic solid-to-solid peptide synthesis: Synthesis of Z-aspartame and control of acid-base conditions by using inorganic salts[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72:69-76.
- [6] 鞠培培,黄克文,沈树宝,等. 拟低共熔体系中脂肪酶水解拆分萘普生酯[J]. *化工学报*, 2003, 54(7):1025-1028.
- [7] 黄振龙,陈英文,沈树宝. 高固液比生物催化体系的研究进展[J]. *化工进展*, 2005, 24:155-158.
- [8] Ulijn R V, Janssen A, Halling P J. Predicting when precipitation-driven synthesis is feasible: Application to biocatalysis[J]. *Chem Eur J*, 2001, 10:2089-2098.
- [9] Elegmann A V, Tattersall R. Energetics of Peptide bond formation at elevated temperatures[J]. *J Mol Evol*, 1979, 12:349.

(责任编辑:杨萌)

(上接第19页)

制备出免疫原和包被原。用免疫原免疫新西兰大白兔,获得的抗体效价达到 $1:12\ 800$,其工作质量浓度为 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$,抗体稀释倍数为 $1:10\ 000$ 。其标准曲线在 $5.105 \times 10^{-3} \sim 3.972 \times 10^{-1}\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内呈相关性,抗体对薯蓣皂苷有特异性识别。

除具有较宽的检测范围外,最低检测限可达到 $2.468 \times 10^{-3}\ \mu\text{g}/\text{mL}$,而且免疫学检测方法还具有前处理简单,分析成本低等优点,适宜于对现场及实验室大批量样品进行快速测定,为黄精皂苷 ELISA 检测方法的建立创造良好的基础条件。

参考文献:

- [1] Darcy R Driedger, Peter Sporns. Development of an antibody against diosgenin and spiroaminoketal alkaloids[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2001, 13:33-38.
- [2] Chu F S, Grossman S, Wei R D, et al. Production of antibody against T-2 toxin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 37(1):104-108.
- [3] Wang Shu-cai, Zhou Xie, Sang Yong-ming. Establishment of indirect enzyme linked immunosorbent assay for salicylic acid[J]. *Plant Physiology Communications*, 1997, 33(6):441-444.
- [4] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000. 18-22.
- [5] 甄永苏,邵容光. 抗体工程药物[M]. 北京:化学工业出版社,2002. 95-96.
- [6] Manju Aarkar, Shashi B Mahato. Homogeneous enzyme immunoassay of diosgenin and its glycosides[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 136:168-174.
- [7] Li K, Li Q X. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2000, 48:3378-3382.

(责任编辑:李春丽)