

丙酮酸脱羧酶催化合成 *L*-苯基乙酰基甲醇的研究

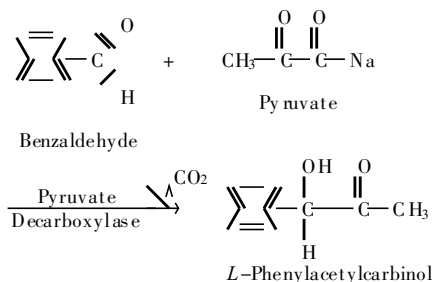
姚 尧 李继珩

(中国药科大学生物制药学教研室,南京 210009)

摘 要 用酵母的丙酮酸脱羧酶粗提物催化苯甲醛合成 *L*-苯基乙酰基甲醇 (*L*-PAC),后者为合成 *L*-麻黄素的前体。酶转化反应的最佳温度为 10℃, pH 6.8,时间为 5~ 6 h,酶用量 7 u/ml,乙醇 2.0 mol/L,苯甲醛 150~ 180 mmol/L,丙酮酸 150~ 200 mmol/L,转化液中 *L*-PAC 浓度可达 140 mmol/L。

关键词 丙酮酸脱羧酶; *L*-苯基乙酰基甲醇; 酵母; 生物转化; 催化

L-苯基乙酰基甲醇 (*L*-PAC)是合成麻黄素的中间体,由苯甲醛通过酵母丙酮酸脱羧酶 (PDC)催化乙酰化而得^[1],反应如 Scheme 1所示。



Scheme 1. Mechanism of *L*-PAC production

生物转化法合成 *L*-PAC国内无报道,国外有游离细胞转化法^[2],固定化细胞半连续转化法^[3],丙酮酸脱羧酶转化法^[4]。细胞转化法的最大缺点是苯甲醛的细胞毒性大,限制了反应体系中苯甲醛的浓度,产物浓度较低;而酶转化法则可提高苯甲醛浓度,获得较高浓度的产物。本文从酵母细胞获得了 PDC 粗提物,用以催化苯甲醛乙酰化生成 *L*-PAC,考察了酶转化反应的最佳条件,获得了较高的产物浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

活性干酵母(食用级,广东省东莞糖厂);乙醇脱氢酶(Worthington Biochemical Corporation, USA); NADH-Na₂(上海丽珠东风生物技术有限

公司);硫胺素焦磷酸酯(TPP, Merck公司);丙酮酸钠(上海曹杨第二中学化工厂);苯甲醛(分析纯,上海试剂一厂);2,3-丁二酮(分析纯, BASF进口分装,上海化学试剂采购供应站)。

1.2 仪器

721分光光度计(上海第三分析仪器厂);75紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂);2K15型冷冻高速离心机(Sigma公司);JY88-II型超声波细胞粉碎机(宁波科兴公司)。

1.3 酶的提取纯化

所有操作于 4℃进行。干酵母 2.0 g加入 20 ml 磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 6.8,含 50 μmol/L TPP, 0.3 mmol/L MgSO₄),搅拌 2 h后超声波粉碎匀浆,10000 g离心 30 min,上清液用硫酸铵分级沉淀,收集 45%~ 60%饱和度之间的沉淀,于 -20℃保存,1个月内活力无损失。

1.4 酶活力测定

PDC活力用 Ullrich方法^[5]测定。活力单位定义为:在 pH 6.0, 25℃下每分钟催化 1.0 μmol丙酮酸转化为乙醛的酶量称为 1个 PDC活力单位。

蛋白质含量测定以 Bradford法^[6]为基础,按胡卓逸等的文章^[7]作了改进。

1.5 *L*-PAC和 3-羟基-2-丁酮的测定

反应液中 *L*-PAC 和 3-羟基-2-丁酮(3-hydroxy-2-butanone,通常称 acetoin)的测定是综合 Groeger法^[8]和 Wesferfeld法^[9]进行显色测定,

用双波长法^[10]进行含量计算。用中国药科大学生物制药学教研室制备的 *L*-PAC 纯品 (经薄层层析、紫外分析、旋光分析、质谱分析确证) 和 acetoin 粗品 (不含 *L*-PAC, 用分析纯试剂 2, 3-丁二酮校正浓度^[9]) 制作标准曲线和方程。

1.6 转化反应条件考察

所有反应均在含 APP 30 μmol/L 和 MgSO₄ 0.5 mmol/L 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液中进行。需

Tab 1. Result of extraction and purification of PDC from yeast

Process	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Activity yield (unit/g dry weight)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Recovery yield (%)
Cell homogenate	230	491	246	2.13	/	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	112	337	169	3.01	1.41	68.6

2.2 最佳转化反应条件

2.2.1 温度和反应时间的影响 以图 1 可以看出, 最适宜的反应温度为 10℃; 反应时间则以 5~6 h 为佳。

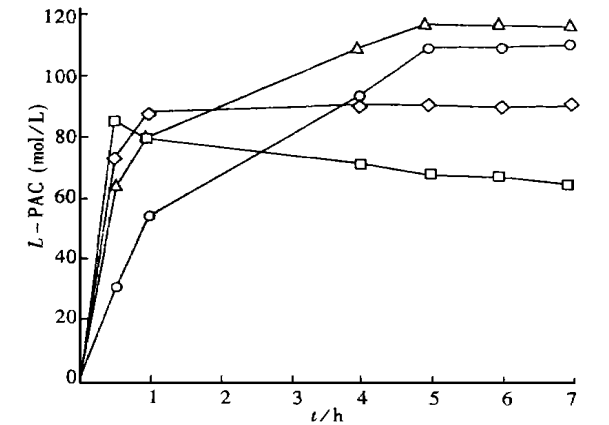


Fig 1. Effect of temperature and reaction time on the formation of *L*-PAC by PDC from yeast. pH 6.8; PDG 7 u/ml; ethanol 2.0 mol/L; benzaldehyde 150 mmol/L; pyruvate 200 mmol/L. —○— 4℃, —△— 10℃, —◇— 15℃, —□— 25℃

2.2.2 pH 的影响 从图 2 可看出, pH 6.4~7.0 为适宜的 pH 范围, 最适 pH 为 6.8。

2.2.3 乙醇浓度的影响 在反应液中加入适量乙醇, 既可提高苯甲醛在转化液中的溶解度, 又可提高溶液的疏水程度, 有利于反应进行。图 3 表明, 反应的初速度以含 3.0 mol/L 乙醇的转化液为最快, 但最终 *L*-PAC 浓度以含 2.0 mol/L 乙醇的转化液为最高, 故选 2.0 mol/L 为最佳乙醇浓度。

2.2.4 酶用量及苯甲醛浓度的影响 反应液中的酶活力的高低直接影响生成 *L*-PAC 的速度和最

考察的条件分别为: 温度、时间、pH、乙醇浓度、酶用量、苯甲醛浓度、丙酮酸浓度。

2 结果

2.1 PDC 提取

表 1 显示, 酵母细胞经超声波破碎, 匀浆用硫酸铵分级沉淀, 纯化倍数为 1.41, 沉淀于 -20℃ 保存 1 个月活力不减退。

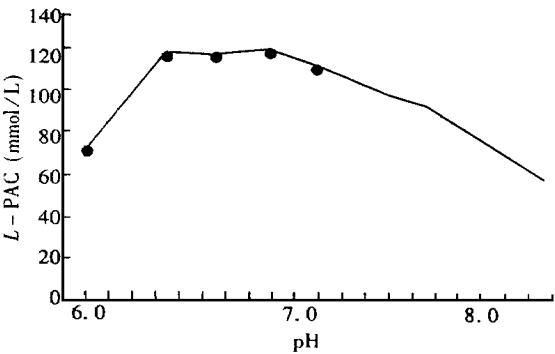


Fig 2. Effect of pH on the formation of *L*-PAC by PDC from yeast. Temp 10℃; Time 5 h; PDG 7 u/ml; ethanol 2 mol/L; benzaldehyde 150 mmol/L; pyruvate 200 mmol/L

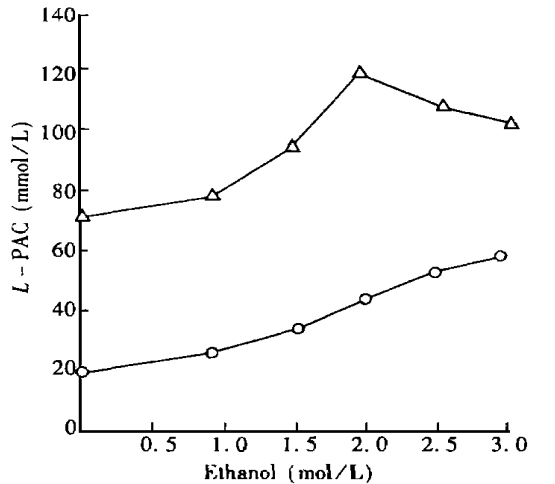


Fig 3. Effect of ethanol on the formation of *L*-PAC by PDC from yeast. Temp 10℃; pH 6.8; PDG 7 u/ml; benzaldehyde 150 mmol/L; pyruvate 200 mmol/L. —○— 0.5 h; —△— 6 h

终浓度,而苯甲醛既是参与反应的底物之一,又对PDC有一定的失活作用,我们综合考察了酶用量和苯甲醛浓度对 *L*-PAC终浓度的影响,结果见表2

Tab 2. *L*-PAC formation with various PDC activity and benzaldehyde concentration

Benzaldehyde (mmol/L)	Final Concentration of <i>L</i> -PAC (mmol/L) and molar conversion yields (%)				
	PDC Activity (unit/ml)				
	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
120	55.1	67.4	87.9	90.9	93.9 ^a
	45.9	56.2	73.2	75.7	78.3 ^b
150	71.8	86.7	113.5	123.9	125.8
	47.9	57.8	75.7	82.6	83.9
180	60.3	94.3	129.5	131.3	133.9
	33.5	52.4	72.0	73.0	74.4
200	41.6	55.0	126.9	131.1	135.5
	20.8	27.5	63.4	65.5	67.8

pH 6.8 & Temp. 10°C; Time 5 h; ethanol 2 mol/L; Conc. of pyruvate = Conc. of benzaldehyde; ^a*L*-PAC (mmol/L); ^bYp/s (mol *L*-PAC/mol benzaldehyde) × 100 (%)

从表2可以看出,随着酶用量的增大,生成的*L*-PAC的浓度和转化率也随之提高。不过,当酶用量达到7.0 u/ml以上后,提高的幅度已比较小。从节约酶用量的角度考虑,选择7.0 u/ml为最佳条件。

苯甲醛浓度则以150~180 mmol/L为适宜,若提高到200 mmol/L, *L*-PAC浓度基本不提高,而且转化率还大大下降。

2.2.5 丙酮酸浓度的影响 丙酮酸是正反应的底物之一,但是也会参与一个副反应,即脱羧生成乙醛,进一步缩合生成乙偶因。我们考察了不同的丙酮酸和苯甲醛浓度下生成*L*-PAC和乙偶因的量以及正反应的转化率,结果见表3

从表3可以看出,随着丙酮酸浓度的增加,*L*-PAC浓度提高,苯甲醛的转化率提高,但是副产物乙偶因的浓度也增加,丙酮酸的转化率随之下降。所以在实际应用中应综合考虑多方面的因素,在150~200 mmol/L的范围中确定一个适宜的丙酮酸用量。

2.2.6 小试制备实验 在前面得出的综合最佳条件下进行了三批小试,得到了比较好的结果,见表4

Tab 3. *L*-PAC formation with various pyruvate and benzaldehyde concentration acetoin (mmol/L)

Benzaldehyde (mmol/L)	Final concentration of <i>L</i> -PAC (mmol/L) and molar conversion yields (%)			
	Pyruvate (mmol/L)			
	120	150	180	200
150	104.7	120.4	132.7	137.7 ^a
	2.7	4.8	8.3	13.9 ^b
	69.8	80.3	88.4	91.8 ^c
	87.2	80.3	73.7	68.9 ^d
180	110.2	126.7	135.5	140.5
	0.4	3.5	6.5	10.0
	61.2	70.4	75.2	78.1
	91.8	84.4	75.2	70.3
200	107.1	124.7	131.1	137.9
	0.7	3.2	4.6	7.8
	53.6	62.4	65.5	69.0
	89.3	83.2	72.8	69.0

pH 6.8 & Temp. 10°C; Time 5 h; ethanol 2 mol/L; PDC 7 u/ml;
^a*L*-PAC (mmol/L); ^bAcetoin (mmol/L); ^cYp/s (mol *L*-PAC/mol benzaldehyde) × 100 (%); ^dYp/s (mol *L*-PAC/mol pyruvate) × 100 (%)

Tab 4. Result of the formation of *L*-PAC by PDC from yeast

Batch No.	Batch volume (ml)	<i>L</i> -PAC (mmol/L)	Acetoin (mmol/L)	Yield of pyruvate (%)	Yield of benzaldehyde (%)
1	200	130.6	5.2	72.6	72.6
2	200	132.3	5.0	73.5	73.5
3	200	134.0	6.3	74.4	74.4

pH 6.8 & Temp. 10°C; Time 5 h; ethanol 2 mol/L; PDC 7 u/ml; benzaldehyde 180 mmol/L; pyruvate 180 mmol/L

3 讨论

PDC需要TPP和镁离子作辅助因子,以含30 μmol/L TPP和0.5 mmol/L镁离子的50 mmol/L磷酸缓冲液为反应介质,经反复实验,得到了最佳酶转化反应条件:温度10°C, pH 6.8,反应时间5~6 h,酶用量7 u/ml,乙醇浓度2.0 mol/L,苯甲醛150~180 mmol/L,丙酮酸150~200 mmol/L, *L*-PAC浓度可达140 mmol/L,较细胞转化法更高(未公开资料)

PDC可从商品食用酵母获得,纯化步骤简单,其他酶不影响主反应^[4],例如在活细胞中还原酶可将苯甲醛还原成苯甲醇^[2],但在酶转化体系中由于缺乏还原性辅酶(如NADH等),还原反应难以进行。

PDC催化苯甲醛乙酰化生成 *L*-PAC的反应是一个双底物的反应,要求苯甲醛和丙酮酸浓度有适当比例,才能有最佳转化效果。

参 考 文 献

1 Rogers PL, Shin HS, Wang B. Biotransformation for *L*-ephedrine production. *Advances in Biochemical Engineering*, 1997, **56** 32

2 Long A, Ward OP. Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, **34** 933

3 Mahmoud WM, El-Sayed AHMM, Coughlin RW. Production of *L*-phenylacetylcarbinol by immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, **36** 55

4 Shin HS, Rogers PL. Production of *L*-phenylacetylcarbinol from benzaldehyde using partial purified pyruvate decarboxy-

lase. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **49** 52

5 Ulrich J. Yeast pyruvate decarboxylase assay of thiamine pyrophosphate, in Colowick SP, Kaplan NO. (eds). *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1970, Vol. XVIII a 109

6 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** 248

7 胡卓逸,厉滔,陈少林.考马斯亮兰 G-250染料测定蛋白质方法的改进. *中国药科大学学报*, 1987, **18** 133

8 Groeger D, Erge D. Zur analytik von phenylacetylcarbinol. *Pharmazie*, 1964, **20** 92

9 Westerfeld WW. A colorimetric determination of blood acetoin. *J Biol Chem*, 1945, **161** 495

10 于如赧,刘书田,陆明廉等.分析化学:下册.第二版.北京:人民卫生出版社,1986. 63

Production of *L*-Phenylacetylcarbinol by Pyruvate Decarboxylase

Yao Yao, Li Jiheng

School of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Biotransformation of benzaldehyde to *L*-phenylacetylcarbinol (*L*-PAC), a key intermediate for *L*-ephedrine synthesis, has been evaluated using pyruvate decarboxylase (PDC) partially purified from yeast. Optimum temperature, pH, time, PDC activity, ethanol, benzaldehyde and pyruvate were 10℃, 6.8, 5~6 h, 2.0 mol/L, 150~180 mmol/L and 150~200 mmol/L, respectively. A *L*-PAC concentration more than 140 mmol/L can be achieved.

Key words Pyruvate decarboxylase; *L*-phenylacetylcarbinol; Yeast; Biotransformation

中国药科大学首次获得二类中药新药证书

由中药学院及中药研究所周素娣、周锦祥两位教授负责研制的二类中药“西红花提取物”和“西红花多甙片”最近取得国家药品监督管理局颁发的新药证书及生产批件。这是我校获得新药证书的第二个二类中药品种,具有一定的创新性。经大量临床试验表明,该药在心血管疾病方面的疗效优于市场销售量较大的地奥心血康。