

## 谷氨酰转肽酶合成 L-谷氨酰正丙胺

徐礼生<sup>1,2</sup>, 王梦婷<sup>1</sup>, 高贵珍<sup>1</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 焦庆才<sup>2</sup>

(1. 宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

**摘要:** 以 L-谷氨酰肼和正丙胺为底物, 利用谷氨酰转肽酶合成了 L-谷氨酰正丙胺, 考察了底物浓度、温度、pH、催化剂用量对 L-谷氨酰正丙胺合成的影响。结果表明, 谷氨酰转肽酶能有效合成 L-谷氨酰正丙胺, 在温度 37 °C、pH=10.0、L-谷氨酰肼浓度为 0.4 mol/L、正丙胺浓度为 3 mol/L 的条件下, 谷氨酰转肽酶添加量为 0.2 g, 300 mL 反应体系 L-谷氨酰正丙胺的收率为 89.7%, 经高效液相色谱法测定, L-谷氨酰正丙胺纯度为 99.8%。

**关键词:** 谷氨酰转肽酶; L-谷氨酰正丙胺; L-谷氨酰肼; 生物工程

中图分类号: TQ464.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)06-0970-05

## Synthesis of Propyl-L-glutamine by Glutamyltranspeptidase

XU Li-sheng<sup>1,2</sup>, WANG Meng-ting<sup>1</sup>, GAO Gui-zhen<sup>1</sup>, ZHAO Liang<sup>1</sup>, JIAO Qing-cai<sup>2</sup>

(1. Department of Life and Food Science, Suzhou University, Suzhou 234000, Anhui, China; 2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China)

**Abstract:** Glutamyltranspeptidase was used as a catalyst to synthesize propyl-L-glutamine with L-glutamylhydride and propylamine as substrates. The factors affecting the yield of product such as substrate concentration, temperature, pH, and catalyst dosage were investigated. The results indicated that glutamyltranspeptidase was an efficient catalyst for the synthesis of propyl-L-glutamine, and the optimum reaction conditions were obtained. When the concentration of L-glutamylhydride was 0.4 mol/L, the concentration of propylamine was 3 mol/L, the catalyst dosage was 0.2 g, the reaction temperature was 37 °C, and the pH was 10.0, the yield of propyl-L-glutamine was 89.7% in 300 mL reaction volume with a purity of 99.8 % by high performance liquid chromatography.

**Key words:** glutamyltranspeptidase; propyl-L-glutamine; L-glutamylhydride; bioengineering

**Foundation items:** Natural Science Research Key Project of Universities of Anhui Province (KJ2017A440); Quality Engineering Project of Anhui Province (2015zjjh034, 2015ckjh108, 2016jyxm1038); Academic leader program of Suzhou University (2018XJXS02)

谷氨酰转肽酶作为一种重要的酶参与谷氨酰循环反应, 能特异性地催化谷氨酰基团的迁移过程, 从而获得含有谷氨酰基团的化合物<sup>[1-2]</sup>。谷氨酰转肽酶来源广泛, 稳定特性较好<sup>[3]</sup>。动物脏器和变形杆菌可纯化得到  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶, 其对谷胱甘肽有转肽以及水解作用<sup>[4-5]</sup>。 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶在临床检查中可作为生物标识物<sup>[6]</sup>。L-谷氨酰基类化合物具有重要生物活性, 医学上该类物质应用广泛, 利用谷氨酰转肽酶可制备 L-谷氨酰基类化合物, 如谷胱甘肽、

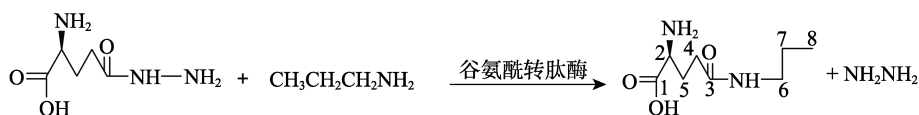
茶氨酸、谷氨酰甲胺等谷氨酰基类物质<sup>[7]</sup>。Chen<sup>[8-9]</sup>等利用地衣形芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)中  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶催化合成  $\gamma$ -L-谷酰基-S-丙烯基-L-半胱氨酸, 并且对来源于地衣形芽孢杆菌中  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶结构、功能和稳定性进行了研究。Frederik<sup>[10]</sup>等通过来源于谷氨酸棒杆菌  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶催化合成谷酰基二肽类物质。采用定点突变对来源于 *Bacillus licheniformis* 中  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶进行了改造, 定点突变的位点主要包括 His401、Thr415、Thr417、

收稿日期: 2017-07-13; 定用日期: 2017-10-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170570

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2017A440); 安徽省质量工程项目 (2015zjjh034, 2015ckjh108, 2016jyxm1038); 宿州学院学术带头人项目 (2018XJXS02)

作者简介: 徐礼生 (1980—), 男, 博士, 副教授, E-mail: xulisheng111@163.com。

Glu419 和 Arg571, 其中, Thr415 和 Thr417 在催化过程中具有重要作用<sup>[11]</sup>。L-谷氨酰基类化合物具有重要的生理活性, 如茶氨酸对单胺类新陈代谢具有作用, 在茶氨酸作用下脑中多巴胺释放显著加快, 提高脑内多巴胺生理活性<sup>[12]</sup>。研究证实茶氨酸对降低血压和抗癌等均有疗效<sup>[13-14]</sup>。含有氢硫基的谷胱甘肽, 参与人体多种生化反应, 在医学领域用于辅助性治疗肝胆病、重金属和有机物解毒以及细胞膜保护



## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

L-谷氨酰肼、正丙胺、盐酸、氯化钠、氨苄、吐温-80、甲醇、巯基乙醇、硼酸、乙酸钠、乙腈均购自国药集团上海化学试剂公司, 以上试剂均为分析纯; 酵母浸粉、鱼粉蛋白胨和乳糖均为市售生化试剂。

WT-ZNO 型洁净工作台, 郑州中旺实验室设备有限公司; ZWY-240 恒温培养振荡箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; GI100T 立式自动压力蒸汽灭菌锅, 上海博迅实业有限公司; LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司。

### 1.2 L-谷氨酰正丙胺的制备

该菌种为重组谷氨酰转肽酶基因工程菌。将此菌种按照 3.3% 的量(种子液占总体积的百分比, 种子液体积为 100  $\mu$ L)接入含有酵母浸粉原料的培养基中, 用微量进样器加入 7  $\mu$ L 氨苄, 接种完成后于 37  $^{\circ}$ C、170 r/min 的恒温摇床中培养 10 h。将活化一代后的上述菌液 2 mL 加入 100 mL 含有乳糖的培养基中, 然后在 37  $^{\circ}$ C、170 r/min 的恒温摇床中发酵 4 h, 再将其温度调节至 30  $^{\circ}$ C 后继续发酵 8 h。以上发酵菌液在 4  $^{\circ}$ C、8000 r/min 离心机中离心 10 min, 得到湿菌体细胞, 保存于 -20  $^{\circ}$ C 的冰箱中备用。

反应最优条件为: 底物 L-谷氨酰肼浓度为 0.4 mol/L, 正丙胺浓度为 3 mol/L, pH=10.0, 谷氨酰转肽酶催化剂用量为 0.2 g, L-谷氨酰肼和正丙胺物质的量比为 1 : 7.5, 反应总体积为 300 mL, 温度 37  $^{\circ}$ C 时进行反应, 离心去除菌体细胞, 活性炭脱色, 将脱色液通过 732 型阳离子交换树脂柱(原料为强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂)吸附, 用质量分数 3% 氨水洗脱, 收集洗脱液, 调至 pH=3~4, 静置析出沉淀, 真空抽滤, 烘干得粗品, 粗品经质量分数为 95% 的乙醇洗涤, 真空抽滤, 烘干得 22.20 g L-谷氨酰正丙胺白色晶体。

### 1.3 分析测定

高效液相色谱法测定 L-谷氨酰正丙胺含量, 采

等<sup>[15]</sup>。通过邻苯二甲酸酐保护谷氨酸  $\alpha$  位氨基并进行分子内羧基的环酐化反应制备 L-谷氨酰异丙胺<sup>[16]</sup>。

本文利用谷氨酰转肽酶将谷氨酰基转接到正丙胺上合成了 L-谷氨酰正丙胺, 合成路线如下所示。并考察了底物浓度、温度、pH、催化剂用量和底物物质的量比对 L-谷氨酰正丙胺合成的影响, 提高谷氨酰转肽酶活力, 以期达到有效提高 L-谷氨酰正丙胺收率的目的。

用 Agilent C18 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu$ m), 测试条件: 0.1 mol/L 醋酸钠 (pH = 4.0  $\pm$  0.05) - 甲醇(体积比为 90 : 10) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测器的检测波长为 280 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 20  $\mu$ L。

L-谷氨酰正丙胺收率/% = (L-谷氨酰正丙胺实际生成量/L-谷氨酰正丙胺理论生成量)  $\times$  100

### 1.4 数据处理

采用 SPSS11.5 软件对所得到的数据进行统计学分析, 用平均数  $\pm$  标准差来表示。每组实验重复 3 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 底物浓度对 L-谷氨酰正丙胺收率的影响

配制浓度为 0.1~0.8 mol/L 的 L-谷氨酰肼溶液, 以及相对应浓度 0.75~6 mol/L 的正丙胺溶液为底物, 其中 L-谷氨酰肼和正丙胺物质的量比固定为 1 : 7.5, 谷氨酰转肽酶催化剂用量为 0.2 g, 在 pH=10.0、37  $^{\circ}$ C、170 r/min 的恒温振荡培养箱中反应 6 h, 结果见图 1。

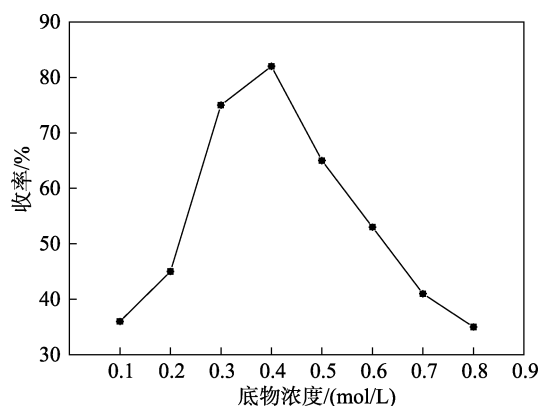


图 1 底物浓度对产物收率的影响

Fig. 1 Effect of substrate concentration on the yield of product

由图 1 可知, 随着底物浓度升高, L-谷氨酰正丙胺收率先升后降, 当底物浓度为 0.4 mol/L 时, L-谷氨酰正丙胺收率最高可达 82%。 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶

蛋白质含有两个亚基，小亚基 N-末端苏氨酸残基侧链上的活性氧原子攻击  $\gamma$ -谷氨酰类物质羰基上的碳原子，形成  $\gamma$ -谷氨酰-酶中间复合物，因此，L-谷氨酰肼浓度过高对  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶有抑制作用。

### 2.2 pH 对 L-谷氨酰正丙胺收率的影响

在谷氨酰转肽酶催化剂量为 0.2 g，正丙胺 3 mol/L、L-谷氨酰肼 0.4 mol/L、37 °C、170 r/min 下于恒温振荡培养箱中反应 6 h，通过 NaOH 调节 pH，考察 pH 对 L-谷氨酰正丙胺收率的影响，结果见图 2。

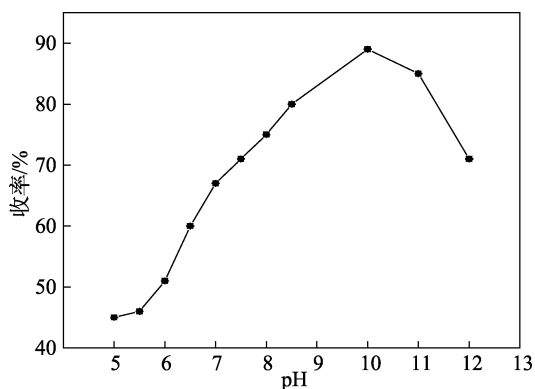


图 2 pH 对产物收率的影响  
Fig. 2 Effect of pH on the yield of product

由图 2 可知，L-谷氨酰正丙胺收率随着底物混合液 pH 的升高先升后降，当 pH=10.0 时，L-谷氨酰正丙胺收率最高，可达 89%。继续升高 pH，L-谷氨酰正丙胺收率明显下降。pH 可改变谷氨酰转肽酶活性部位上有关基团的解离状态，从而影响谷氨酰转肽酶与底物的结合，谷氨酰转肽酶酶促反应需要在适宜的 pH 中进行，当反应体系 pH=10.0 时，底物 L-谷氨酰肼与谷氨酰转肽酶结合位点比较合适。

### 2.3 温度对 L-谷氨酰正丙胺收率的影响

在 L-谷氨酰肼底物浓度为 0.4 mol/L、正丙胺 3 mol/L、谷氨酰转肽酶催化剂量为 0.2 g、pH=10.0、反应温度为 15~50 °C 以及转速为 170 r/min 的条件下，于恒温振荡培养反应 6 h，结果见图 3。

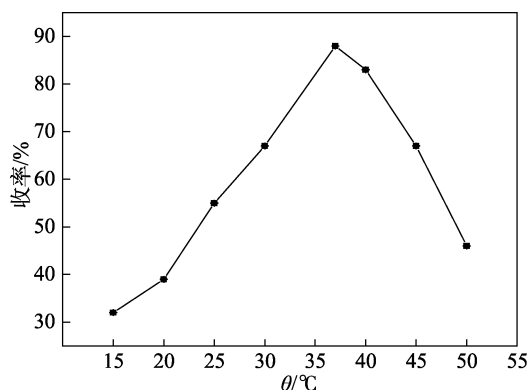


图 3 温度对产物收率的影响  
Fig. 3 Effect of temperature on the yield of product

由图 3 可知，L-谷氨酰正丙胺收率随温度升高先升后降，当温度为 37 °C，L-谷氨酰正丙胺收率最高为 88%。继续升高温度收率明显下降。该酶在温度较低时酶活力较小，在温度过高时又会渐渐地失去酶活，而使产物收率降低。

### 2.4 催化剂量对 L-谷氨酰正丙胺收率的影响

催化剂为谷氨酰转肽酶，在 L-谷氨酰肼底物浓度为 0.4 mol/L、正丙胺 3 mol/L、最适 pH=10.0、温度为 37 °C、300 mL 反应体系中添加 0.05~0.5 g 催化剂、转速为 170 r/min 的条件下，于恒温振荡培养反应 6 h，结果见图 4。

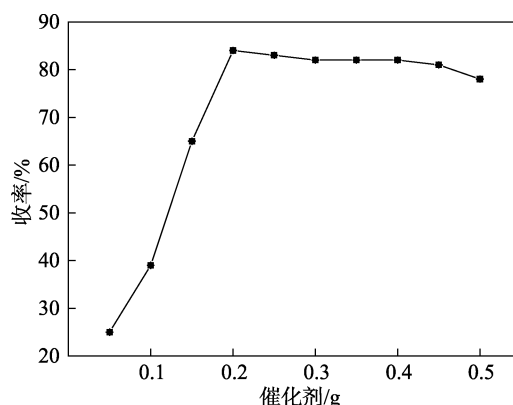


图 4 催化剂量对产物收率的影响  
Fig. 4 Effect of catalyst dosage on the yield of product

由图 4 可知，L-谷氨酰正丙胺收率随催化剂添加量上升不断增大，当催化剂添加量为 0.2 g 时，L-谷氨酰正丙胺收率最高为 84%。添加过多催化剂可能使酶之间有抑制作用的影响，酶活力稍有下降，收率略降。

### 2.5 底物物质的量比对 L-谷氨酰正丙胺收率的影响

在反应 pH=10.0、温度为 37 °C、催化剂添加量为 0.2 g、底物 L-谷氨酰肼和正丙胺物质的量比为 1 : (5~10)、转速为 170 r/min 的条件下，于恒温振荡培养反应 6 h，结果见图 5。

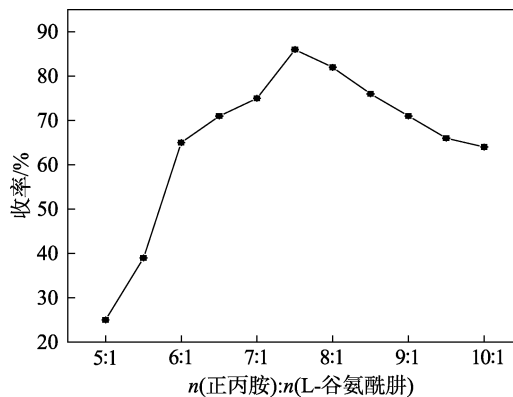


图 5 底物物质的量比对产物收率的影响  
Fig. 5 Effect of molar ratio of substrates on the yield of product

由图 5 可知, L-谷氨酰正丙胺收率随底物物质的量比升高也不断增大, 当 L-谷氨酰肼和正丙胺物质的量比为 1 : 7.5 时, L-谷氨酰正丙胺收率最高为 86%。

## 2.6 产物的表征

在 pH=10.0、底物 L-谷氨酰肼浓度为 0.4 mol/L、正丙胺浓度为 3 mol/L、温度为 37 °C、反应总体积为 300 mL 的最优条件下, 恒温振荡培养 6 h 制备 L-谷氨酰正丙胺, 收率达到 89.7%, 产物纯度为 99.8%, 熔点 222~225 °C (分解温度)。

$^1\text{H}$ NMR (500MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ : 4.05 (t,  $J=6.1$  Hz, 1H), 3.14 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H), 2.50~2.45 (m, 2H), 2.23~2.18 (m, 2H), 1.53~1.48 (m, 2H), 0.88 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ : 174.81 ( $\text{C}_1$ ), 172.73 ( $\text{C}_5$ ), 53.33 ( $\text{C}_2$ ), 42.12 ( $\text{C}_6$ ), 32.14 ( $\text{C}_4$ ), 26.72 ( $\text{C}_3$ ), 22.49 ( $\text{C}_7$ ), 11.38 ( $\text{C}_8$ )。

L-谷氨酰正丙胺的红外光谱见图 6。

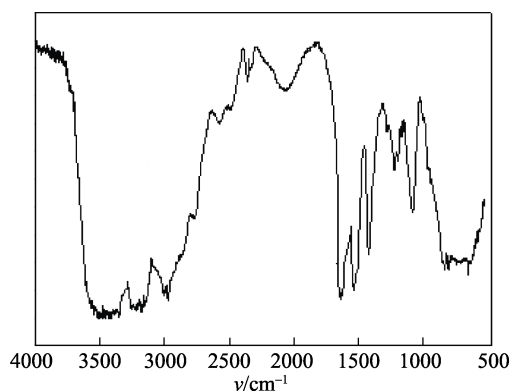


图 6 L-谷氨酰正丙胺的红外光谱图

Fig. 6 FTIR spectrum of propyl-L-glutamine

由图 6 可见,  $\alpha$ -氨基的特征吸收峰在  $2972.5\text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha$ -羧基上端羟基和羰基的特征吸收峰在  $3289.6$  和  $1580.9\text{ cm}^{-1}$  处。

L-谷氨酰正丙胺高效液相色谱图如图 7 所示。

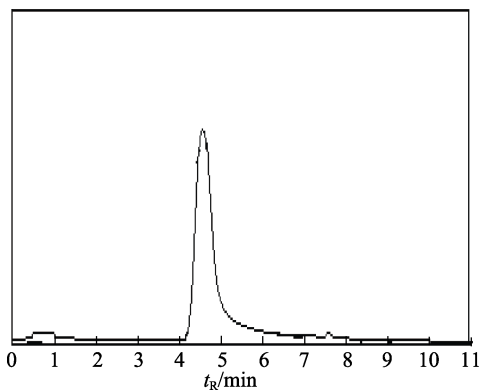


图 7 L-谷氨酰正丙胺的液相色谱图

Fig. 7 HPLC of propyl-L-glutamine

由图 7 可知, L-谷氨酰正丙胺纯度为 99.8% (峰面积归一化法)。

L-谷氨酰正丙胺质谱图如图 8 所示。

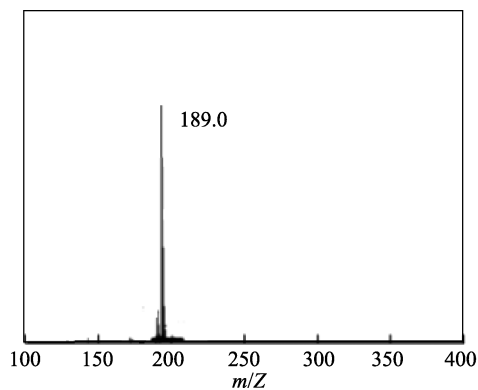


图 8 L-谷氨酰正丙胺的质谱图

Fig. 8 MS of propyl-L-glutamine

由图 8 可知, 产物的分子离子峰在  $m/z=189.0$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 处。

## 3 结论

以 L-谷氨酰肼和正丙胺为底物, 利用谷氨酰转肽酶合成 L-谷氨酰正丙胺, 考察各因素对产物收率的影响, 得到最优实验条件为: pH=10.0、底物 L-谷氨酰肼浓度为 0.4 mol/L、正丙胺浓度为 3 mol/L、温度为 37 °C、谷氨酰转肽酶催化剂添加量为 0.2 g, 在此条件下 L-谷氨酰正丙胺收率达到 89.7%, 为谷氨酰转肽酶法合成 L-谷氨酰正丙胺工业化生产提供依据。

## 参考文献:

- [1] Peng Qing (彭清), Yao Zhong (姚忠), Zhou Zhi (周治), *et al.* Improving pH stability and catalytic activity of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase by site-directed mutation[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities (高校化学工程学报), 2016, 30(1): 133-141.
- [2] Yin Jie (尹洁), Zhu Junli (朱军莉), Fu Linglin (傅玲琳), *et al.* Purification and properties of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *lentilula edodes*[J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2009, 16(2): 51-59.
- [3] Vittorio Ricci, Maria Giannouli, Marco Romano, *et al.* Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase and its pathogenic role[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(3): 630-638.
- [4] Qin Danhua (秦丹华), Yao Zhong (姚忠), Wang Haoqi (王浩琦), *et al.* Immobilization of GGT on meso- $\text{TiO}_2$ : preparation and properties[J]. CIESC Journal (化工学报), 2011, 62(2): 378-385.
- [5] Xiao Yifan (肖易凡), Ya Zhong (姚忠), Wang Haoqi (王浩琦), *et al.* Enzymatic synthesis of S-bzl- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteine with  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase immobilized onto ordered mesoporous  $\text{TiO}_2$ [J]. The Chinese Journal of Process Engineering (过程工程学报), 2010, 10(6): 1175-1180.
- [6] Wu Fang (吴芳), Sun Fengxia (孙凤霞), Xu Chunjun (徐春军). The value of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in the diagnosis and prognosis of liver diseases[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Infectious Diseases: Electronic Version (中华实验和临床感染病杂志: 电子版), 2015, 9(5): 616-620.
- [7] Lin Weidong (林伟东), Sun Weijiang (孙威江), Guo Yihong (郭义红), *et al.* The research and utilization of theanine in tea[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2016, 37(20): 201-206.

(下转第 986 页)