

综述与专论

L-肉碱的生理功能与生物学方法生产

杨 能 张 惟 杰

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

提 要

L-肉碱是动物体内与脂肪酸代谢有关的化合物。它的主要功能是做为载体将长链脂肪酸从线粒体膜外运送到膜内促进脂肪酸的 β -氧化。当动物因先天性或代谢性疾病引起体内肉碱缺乏时,会使机体乏力和产生许多心血管疾病。目前L-肉碱除以强化营养用于婴儿和体弱多病者外,还做为药物用于降低血脂、减肥和医治心血管疾病,由于其疗效显著正引起人们的极大兴趣与关注,并正通过生物酶和微生物的转化合成方法对其生产进行积极的研究和开发。

关键词 肉碱,载体,脂肪酸代谢,生物酶和微生物生产,维生素 B_{12}

肉碱(carnitine)在无脊椎动物和脊椎动物组织中普遍存在,也存在于一些植物和微生物中。1905年 Gulewitsch 和 Krimberg 从肉抽提物(Liebig's meat extract)中发现了肉碱。1927年 Tomita 和 Sendju 证实了其分子结构为L- β -羟- γ -三甲铵丁酸(L- β -hydroxy- γ -butyrobetaine)。1948年 Fraenkel 发现大黄粉虫(*Tenebrio molitor*)幼虫的生长需要一种生长因子并将此命名为维生素 B_{12} 。1952年 Carter 等人确证了维生素 B_{12} 即是肉碱。从1953年开始肉碱列在美国《化学文摘》中 Vitamin B_{12} 的索引栏目下。在此以后,世界各国研究人员对肉碱的生理、生化、营养和临床等方面进行了深入而广泛的研究,作了大量的报道。

本文将在介绍肉碱的生理功能和生物合成的基础上,着重讨论肉碱的各种生物学生产方法和可能的开发前景。

1 L-肉碱的生理功能

L-肉碱是动物体内与能量代谢有关的化合物,它所起的生理作用可概括为以下三个方

面:

1.1 作为载体以脂酰肉碱的形式将长链脂肪酸从线粒体膜外运送到膜内,起到促进脂肪酸 β -氧化的作用^[1,2]。整个过程由肉碱酰基辅酶A转移酶I和II(CoA:carnitine acyltransferase I and II)两种同功酶催化完成(见图1)。

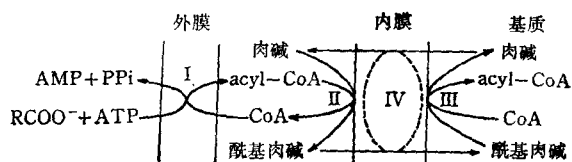


图1 脂肪酸以肉碱为载体穿过线粒体内膜
I 酰基辅酶A合成酶 II 肉碱酰基辅酶A转移酶 I
III 肉碱酰基辅酶A转移酶 II IV 肉碱/酰基肉碱转位酶

1.2 作为载体以酰基肉碱的形式将线粒体内的短链酰基(乙酰、丙酰、支链酰等)运送到膜外,起到调节线粒体内酰基CoA/CoA比率的

作用^[1,2],并为细胞质中脂肪酸合成提供乙酰基原料。此过程由肉碱酰基辅酶A转移酶(CoA: carnitine acyltransferase)催化完成。线粒体基质中的乙酰基若不及时运出,乙酰CoA/CoA比率上升,对丙酮酸脱氢酶有抑制作用,从而影响能量代谢。同时,一些支链酰基是亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的代谢产物,支链酰基的及时运出有利于这些氨基酸的正常代谢^[3]。

1.3 网罗体内过量的和非生理性的酰基团,将它们排出体外,起到排除机体因酰基积累而造成的代谢毒性;还能促进乙酰乙酸的氧化,在酮体的消除和利用中起作用^[3]。

由此可见肉碱主要在脂肪酸代谢有关的能量代谢中起着重要的作用。

2 L-肉碱的生物合成

人们对于肉碱生物合成的了解大多来自动物材料。肉碱的生物合成起始于体内必需氨基酸赖氨酸和甲硫氨酸。首先是富含赖氨酸的蛋白质在蛋白质甲基化酶(protein methylase)的催化下,由S-腺苷甲硫氨酸供给甲基将多肽链中的赖氨酸转化为ε-三甲赖氨酸(ε-trimethyllysine),随后通过体内蛋白酶(proteinase)水解生成三甲赖氨酸,三甲赖氨酸再经过四步酶促反应合成肉碱^[1,2](见图2)。其中反应(3)(6)为双加氧酶(dioxygenases)催化的羟化反应,它以α-酮戊二酸为协同底物,并需要抗坏血酸、Fe²⁺和分子氧的参与^[4]。反应(6)严格地限制在动物的肝、肾组织中^[5]。Borum认为该反应是肉碱的限速反应,但Olson和Rebouche认为在新生儿中并不表现为限速反应^[6]。肌肉组织中肉碱含量虽然较高,但是肌肉并不能合成肉碱,而要依赖来自肝、肾的血液输送(见图3)。

可以说对肉碱生物合成的全貌已有了初步了解,但对整个过程的细节和调控方式还不十分清楚。

3 L-肉碱的临床应用与营养补剂

一般来说人体能够合成自身所需的肉碱,常年素食者(蔬菜中肉碱含量极低)体内各组织

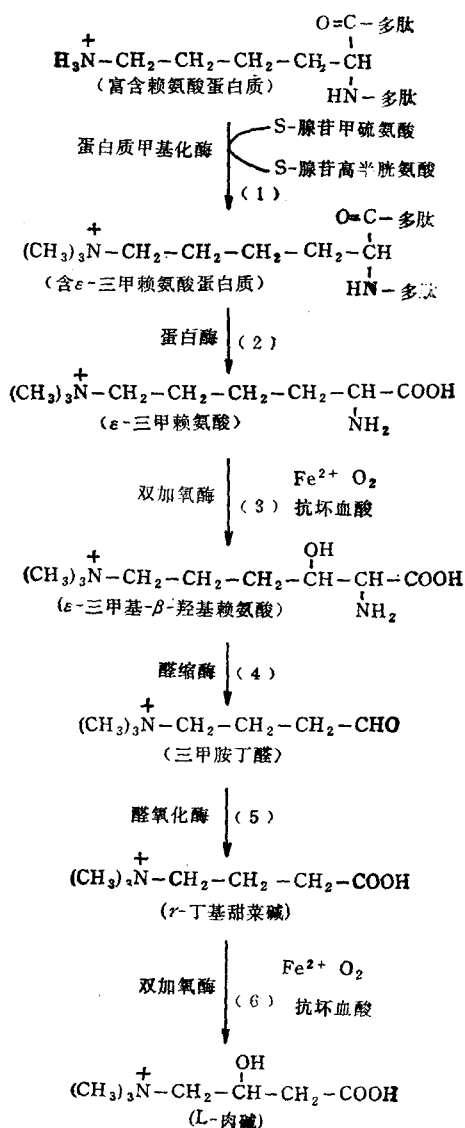


图2 肉碱的生物合成

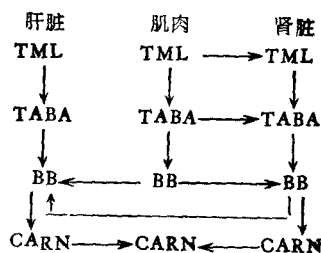


图3 三甲赖氨酸(TML)、三甲胺丁醛(TABA)、丁基甜菜碱(BB)和肉碱(CARN)的组织间转移

中亦能维持正常代谢所需的肉碱浓度。但是先天性或代谢性疾病带来的多种原因可以引起肉碱缺乏。由于肉碱在脂肪代谢和能量代谢中所

起的重要作用,因此一旦体内肉碱合成受阻或肉碱排出和降解过盛以及肉碱转移系统酶活性降低和丧失,都将造成机体脂类代谢的紊乱,影响能量供应,导致许多疾病.由于上述原因脂肪酸不能氧化时,一方面会造成肌肉供能不足,使骨骼肌运动强度和耐力下降,易产生疲劳,即所谓肌乏力,并使心肌、血管平滑肌收缩乏力产生一系列心血管疾病如心绞痛、心律不齐、心脏供血不足等;另一方面还会造成血脂上升,脂类物质在肌纤维和肝脏中聚积产生肥胖、脂肪肝和许多与此相关的疾病.因此在临床上肉碱作为药物主要用于降低血脂、减肥和治疗心血管疾病,还作为强化营养,大量用于婴儿和体弱多病者.目前世界各国都未规定人对肉碱的最低日摄入量,但是用于医药和营养补剂的肉碱的需要量增加很快,据估计日本年需要量数以吨计.

化学合成的肉碱为 DL-旋光对映体,近年来 L-型肉碱在临床医疗上所呈现的显著疗效引起人们的极大兴趣与关注, L-肉碱的需要量大为提高.历来 L-肉碱的生产用的是化学拆分的方法.它是根据肉碱合成前体物 DL-肉碱腈与 N-乙酰-D-谷氨酸(或 N-乙酰-L-谷氨酸)反应所生成盐的溶解度的不同而加以分离.但是由于此方法操作复杂,收率较低,而且作为分离剂使用的 N-乙酰-D-谷氨酸价格昂贵,所以产量难以大幅度提高.因此,人们都在力求寻找其它简单而有效的 L-肉碱的生产方法.

4 L-肉碱的生物学方法生产

4.1 直接从 DL-肉碱拆分得到 L-肉碱

1957 年 Fraenkel 等人报道了利用假单胞菌(*Pseudomonad*)降解 L-肉碱的能力,从 DL-肉碱中得到 D-肉碱的研究.这一研究使人们设想是否能在自然界中找到专一降解 D-肉碱的微生物用于 L-肉碱的生产.1977 年 Kleber 报道乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)在 L-肉碱的诱导下具有降解 D-肉碱的能力,但同时也能降解 L-肉碱^[5].1983 年 Minra-Fraboni 等人报道了乙酸钙不动杆菌变异株可以在以 D-肉碱或 L-肉碱为唯一碳

源的培养基中生长^[6].1985 年 Charles 等人选育出专一性降解 D-肉碱的乙酸钙不动杆菌 ATCC39647 菌株,该菌株在含有 DL-肉碱 20g/L(D:L=1:1)的培养基中经 25℃ 44h 培养, D 型肉碱全部消失, L 型肉碱剩下 38%^[7].1988 年 Charles 等人再次报道了该菌株对不同比例的 DL-肉碱的降解研究,在含有 DL-肉碱 50g/L(D:L=2:8)的培养基中,经 25℃ 69h 的培养, D 型肉碱全部消失, L 型肉碱得率 75%^[8].

4.2 通过 DL-肉碱衍生物拆分得到 L-肉碱

酰化氨基酸水解酶(aminoacylase)在 DL-氨基酸消旋上所获得的巨大成功,使人们想到在 L-肉碱的生产上是否也可采用类似的方法.

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase)的应用:乙酰胆碱酯酶有广泛的作用底物,它除了能水解天然底物乙酰胆碱酯外,还能水解许多不同类型的乙酸酯. Dropsy 等人发现电鳗乙酰胆碱酯酶能水解 D-乙酰肉碱,从而发展了用乙酰胆碱酯酶生产 L-肉碱的方法(见图 4).他们用 1800 单位的乙酰胆碱酯酶作用于 40ml 1mol/L DL-乙酰肉碱,在 37℃ 下酶解 13h,获得 2.5g L-乙酰肉碱,再经水解得 1.7g L-肉碱^[9].

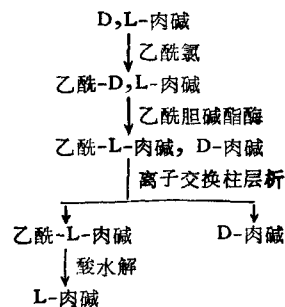


图 4 用乙酰胆碱酯酶从 DL-肉碱中制备 L-肉碱

微生物酯酶(esterase)的应用:在化学上 DL-肉碱 β 位羟基很易起反应生成各种酯类化合物.人们设法从这些衍生物中生产 L-肉碱.河村昌男等人用 20 个属的微生物菌株对图 5 中的各种 DL-肉碱酯化物进行作用,结果许多微生物具有将 DL-肉碱酯化物转化为 L-肉

碱的能力。其中柠檬酸细菌 (*Citrobacter*) 属的 IF013539 菌株酯解能力最强, 在菌体浓度为湿菌体 10mg/ml, pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液中, 经 30℃ 18h 振荡反应, 该菌株能将 20mmol/L 甲基化、乙基化、8-十七碳烯基化和苯基化的 DL-肉碱酯化物分别转化为 9.4、9.1、4.1、2.8mmol/L 的 L-肉碱^[10]。中山清等人也报道了利用微生物酯解 DL-肉碱烷基酯化物生产 L-肉碱的研究。

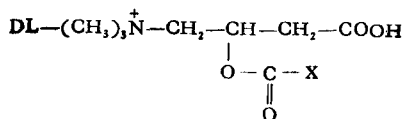


图 5 DL-肉碱酯类衍生物
X: 烷基、链状烯基、芳基基

微生物酰胺酶 (amidase) 的应用: 中山清等人报道了利用微生物将 DL-肉碱酰胺 (DL-carnitinamide) 转化为 L-肉碱的研究^[11]。

微生物腈水解酶 (nitrilase) 的应用: 中山清等人报道了利用微生物将 DL-肉碱腈 (DL-carnitine nitrile) 转化为 L-肉碱的研究^[12]。

4.3 从肉碱衍生物转化得到 L-肉碱

许多微生物有降解 L-肉碱的能力, 其中一些降解途径已得到阐明 (见图 6)。现知道在大肠杆菌 (*E. coli*) 中 L-肉碱的代谢过程至少包括肉碱脱水酶 (carnitine dehydratase) 和巴豆甜菜碱还原酶 (crotonobetaine reductase) 催化的两步还原反应, 并且这两个酶都是可诱导的; 在假单胞菌中 L-肉碱首先是被可诱导的脱

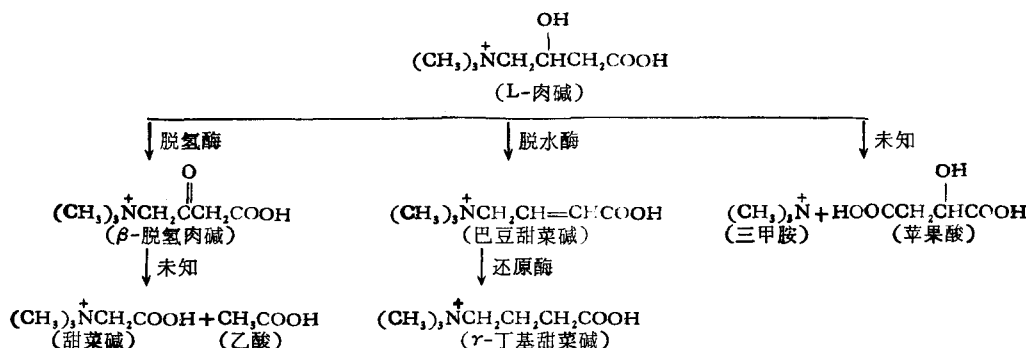


图 6 微生物中的肉碱降解

氢酶 (dehydrogenase) 降解的。这些肉碱分解代谢途径的阐明使人们看到了利用微生物将肉碱衍生物转化为 L-肉碱的生产前景。

丁基甜菜碱 (butyrobetaine) 的利用: Hans 等人用诱变的方法选育出高效将丁基甜菜碱转化为 L-肉碱的菌株 HK4, 该菌株在含有丁基甜菜碱的培养基中, 经 30℃ 通气培养 20h 获得 8.8g/L L-肉碱, 其转化率为 99.2%^[13]。库拉基·卡巴扎等人将用超声波破碎粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 孢子而制成的酶液, 在 30℃ 与丁基甜菜碱反应 30min, 结果有 80% 的底物转化为 L-肉碱^[14]。

巴豆甜菜碱 (crotonobetaine) 的利用: 在巴豆甜菜碱转化为 L-肉碱方面目前研究得最为广泛而深入。研究所用到的微生物有细菌、放线菌、真菌 (酵母、霉菌) 中的数十个属的上百

个菌株。研究的内容有: 菌体浓度、菌龄、底物浓度与 L-肉碱合成的关系; 好氧和厌氧环境对 L-肉碱合成的影响; 营养物、诱导物、金属离子对 L-肉碱合成的影响; 电子受体和电子传递抑制剂对 L-肉碱合成的影响。研究的方法有“增殖转化法”和“静止转化法”两种。所谓“增殖转化法”是指在菌体培养的增殖过程中将底物转化为产物的方法, 所谓“静止转化法”是指用培养后的菌体细胞在一定的反应条件下将底物转化为产物的方法。这些研究表明: 不同的微生物具有不同的底物转化能力; 菌体经厌氧培养比好氧培养有更强的转化能力; 菌体经诱导物的诱导能显著地提高转化能力; “静止转化法”明显优于“增殖转化法”; 添加延胡索酸等电子受体能促进 L-肉碱的合成并能减少丁基甜菜碱的生成; 添加硝酸盐等电子传递抑制剂会抑制 L-

肉碱的合成;菌体浓度、菌龄、底物浓度对 L-肉碱的合成都有影响。如大肠杆菌 O44K 74 菌株用好氧培养“增殖转化”的方法,底物转化率为 13.3%,在添加延胡索酸时转化率提高到 21.8%,在添加硝酸钾时转化率降低到 1.8%;而用好氧培养“静止转化”的方法,底物转化率达到 24.4%^[15]。又如大肠杆菌 IF03301 菌株用不诱导好氧培养“静止转化”的方法,底物转化率仅为 2.8%;而用诱导厌氧培养“静止转化”的方法,底物转化率高达 50.4%^[16]。

β -脱氢肉碱 (β -dehydrocarnitine) 的利用: Jean-Paul 从恶臭假单胞菌 T1 (*Pseudomonas putida* T1) 中提取肉碱脱氢酶用于转化 β -脱氢肉碱,获得 95% 的底物转化率和 45 g/L 的 L-肉碱^[17]。Jerome 等人研究了此反应系统的最适离子强度,结果在 0.788mol/L 的离子浓度下底物转化率达到 98%,而在 0.28mol/L 的离子浓度下底物转化率仅为 14%^[18]。Jerome 等人用 868 单位的肉碱脱氢酶转化 1 mol/L β -脱氢肉碱,获得 98% 的底物转化率和 1.67g/(L·h) 的 L-肉碱^[19]。Patrick 报道了用肉碱脱氢酶连续催化生产 L-肉碱的研究,获得 81% 的底物转化率和 48.3g/h/L 的 L-肉碱^[20]。

目前 L-肉碱的生物合成还处在研究阶段,尚未形成工业化生产。上述种种方法各有特点。总的来说用生物酶法生产产量和底物转化率都相对较高,但由于酶和辅酶因子价格昂贵、

反应条件要求严格等原因,还较难商业化生产;用微生物法生产产量和底物转化率都相对较低,需要通过菌株的选育和方法上的改进来加以提高;一些转化底物如各种肉碱酯类衍生物和巴豆甜菜碱由于化学合成比较容易而且价格低廉,因而是很有前途的,但是像丁基甜菜碱那样价格较贵的转化底物就商业上而言并不十分理想。总之,选育高效转化能力的微生物菌株,寻找廉价的转化底物,确立最适转化条件将是今后 L-肉碱生物学法生产的发展方向。

参 考 文 献

- 1 Bremer J. *Physiol Rev*, 1983; **63**: 1420
- 2 Bieber L L. *Ann Rev Biochem*, 1988; **57**: 261
- 3 Siliprandi N *et al. Clinica Chimica Acta*, 1989; **183**: 3
- 4 Hughes R E. *Med Sci Res*, 1988; **15**: 721
- 5 Kleber H P *et al. Arch Microbiol*, 1977; **112**: 201
- 6 Miura-Fraboni J *et al. Fems Microbiol Lett*, 1983; **18**: 113
- 7 Charles S J *et al. PCT Int Appl*, 1985; **WO 85 04**: 900
- 8 Charles S J *et al. U S Pat*, 1988; **US 4**, 751: 182
- 9 Dropsy E P *et al. Biotechnol Bioeng*, 1984; **26**: 911
- 10 河村昌男 *et al. 公開特許公報*, 1987; **昭62**: 118899
- 11 中山清 *et al. Ger Offen*, 1988; **DE3**, 728: 321
- 12 中山清 *et al. Eur Pat Appl*, 1989; **EP319**: 344
- 13 Hans K *et al. Eur Pat Appl*, 1984; **EP158**: 194
- 14 库拉基·卡巴扎. *公開特許公報*, 1982; **昭57**: 39791
- 15 海尔蒙·扎衣姆 *et al. 公開特許公報*, 1985; **昭60**: 137295
- 16 河村昌男 *et al. 公開特許公報*, 1986; **昭61**: 234794
- 17 Jean-Paul V *et al. Appl Environ Microbiol*, 1980; **39**: 327
- 18 Jeroms S *et al. Fr Demande*, 1988; **FR2**, 605, 516
- 19 Jerome S *et al. Fr Demande*, 1989; **FR2**, 612, 325
- 20 Patrick C *et al. Fr Demande*, 1989; **FR2**, 623, 520

酶 稳 定 化 研 究 进 展

罗 贵 民

(吉林大学酶工程实验室, 长春130023)

提 要

酶稳定性研究无论对阐明酶结构与功能关系, 还是对酶在生物工程中的应用都