生物工程

L-苏氨酸醛缩酶催化合成 L-4-硝基苯基丝氨酸

余进海[1]，吴 婷[1]，刘均忠[1]，张宏娟[2]，焦庆才[1*]

（1. 医药生物技术国家重点实验室 南京大学 生命科学学院，江苏 南京 210093；2. 南京医科大学 药学院，江苏 南京 210029）

摘要：利用 pGEX-KG 载体在大肠杆菌 BL21(DE3)中重组表达 L-苏氨酸醛缩酶，以对硝基苯甲醛、甘氨酸为底物，采用酶法合成了 L-4-硝基苯基丝氨酸，优化了反应条件，得到的最佳条件为：反应温度 45 ℃，pH=8.0，甘氨酸浓度 500 mmol/L，对硝基苯甲醛浓度 100 mmol/L，每升转化液含 1.6 g 全细胞，反应 24 h 后，L-4-硝基苯基丝氨酸质量浓度达到 9.72 g/L，对硝基苯甲醛转化率为 43%。放大至 500 mL 后转化液经过活性炭分离纯化得到产物 3.92 g，总收率为 35%。

关键词：L-苏氨酸醛缩酶；对硝基苯甲醛；L-4-硝基苯基丝氨酸；活性炭吸附柱；生物工程

中图分类号：Q55 **文献标识码：**A **文章编号：**1003-5214 (2018) 12-2039-07

Synthesis of 4-Nitrophenylserine by Whole Cell with Recombinant L-Threonine Aldolase

YU Jin-hai[1], WU Ting[1], LIU Jun-zhong[1], ZHANG Hong-juan[2], JIAO Qing-cai[1*]

（1. *State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing* 210093, *Jiangsu, China*; 2. *School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing* 210029, *Jiangsu, China*）

Abstract: The recombinant pGEX-KG plasmid was constructed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and expressed with L-threonine aldolase. Then, the obtained L-threonine aldolase was used as a catalyst for the synthesis of L-4-nitrophenylserine from 4-nitrobenzaldehyde and glycine. The reaction conditions were optimized. The results showed that the optimal conditions were as follows: reaction temperature was 45℃, pH value was 8.0, the concentration of glycine was 500 mmol/L, the concentration of 4-nitrobenzaldehyde was 100 mmol/L, the mass concentration of L-threonine aldolase whole cell was 1.6 g/L, and reaction time was 24 h. Under these conditions, the mass concentration of L-4-nitrophenylserine reached 9.72 g/L and the conversion of 4-nitrobenzaldehyde was 43%. After amplification experiment (500 mL), the conversion solution was isolated and further purified by active carbon, 3.96 g L-4-nitrophenylserine was obtained with a total yield of 35%.

Key words: L-threonine aldolase; 4-nitrobenzaldehyde; L-4-nitrophenylserine; active carbon adsorption column; biological engineering

Foundation item: National Nature Science Foundation of China (21302100)

L-4-硝基苯基丝氨酸是一种重要的 β-羟基-α-氨基酸，广泛用于多种重要化合物如手性相转移催化剂，氨肽酶 N（APN）/CD13 抑制剂的合成[1-2]，近年来作为合成广谱抗生素氯霉素及其衍生物的重要中间体[3]引起人们广泛关注。

目前，化学法合成 L-4-硝基苯基丝氨酸需要强酸和强碱的环境，反应条件严苛[4]，收率低，立体选择性较差；反应需要用到有毒有机溶剂[5]或使用昂贵的重金属做为手性催化剂[6]，拆分试剂毒性较大[7]。相较于化学法，酶催化法具有转化条件温和，立体选择性强，催化效率高等优点[8]。酶法合成 L-4-硝基苯基丝氨酸主要涉及 L-丝氨酸羟甲基转移酶[9]和丙氨酸消旋酶[10]，其中 L-丝氨酸羟甲基转移酶只有在有机溶剂（DMSO 或 DMF）存在下活性较高，对

收稿日期：2018-01-19; 定用日期：2018-05-10; **DOI:** 10.13550/j.jxhg.20180056

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（21302100）

作者简介：余进海（1991—），男，硕士生。联系人：焦庆才（1959—），男，教授，博士生导师，电话：025-89685469，E-mail：jiaoqc@163.com。

环境污染较大，反应温度为 25 ℃，酶的温度耐受性以及可靠性较差；丙氨酸消旋酶在 50 ℃、pH=9.5 的条件下催化反应，条件较严苛，且转化率较低，二者均不适用于大规模工业化生产。因此，如何更加绿色、高效、经济地合成 L-4-硝基苯基丝氨酸至关重要。

L-苏氨酸醛缩酶（EC 4.1.2.5, L-TA）是磷酸吡哆醛（PLP）依赖型酶，能够直接催化不同的醛与甘氨酸进行 Aldol 缩合反应，形成不对称 C—C 键，从而得到高附加值的 *β*-羟基-*α*-氨基酸，在生物合成药物方面具有很大前景[11-12]。已有文献报道利用不同微生物来源的苏氨酸醛缩酶催化合成丝氨酸以及其衍生物[13]。Fesko[14-15]等利用重组苏氨酸醛缩酶催化合成苯基丝氨酸，以及抗帕金森药物 L-苏式-3,4-二羟基苯基丝氨酸（L-DOPS）[16]，均获得较好的收率和立体选择性。近年来，苏氨酸醛缩酶晶体结构、功能特征和催化机制的研究不断深入[17-18]，利用蛋白质工程对苏氨酸醛缩酶进行改造以得到更高转化率和更广泛底物的酶[19]，然而利用重组 L-苏氨酸醛缩酶催化制备 L-4-硝基苯基丝氨酸的工艺却鲜有报道。

本文通过基因工程手段重组表达了大肠杆菌来源的低特异性 L-苏氨酸醛缩酶，以对硝基苯甲醛和甘氨酸为底物，全细胞催化合成 L-4-硝基苯基丝氨酸，通过活性炭吸附柱分离转化产物[20]，同时考察了 L-苏氨酸醛缩酶的酶学性质，优化了酶促反应条件，旨在为绿色、高效合成 L-4-硝基苯基丝氨酸提供一种新思路。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

1.1.1 试剂与仪器

大肠杆菌表达宿主 *E. coli* BL21（DE3）菌株，质粒 pGEX-KG 由本实验室保藏；聚合酶链式反应（PCR）引物，南京金斯瑞生物公司；pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶，英国 New England Biolabs 公司；AP-MN-P-250 质粒提取试剂盒、AP-GX-250 PCR 产物柱纯化试剂盒、AP-GX-250 DNA 凝胶回收试剂盒，美国 Axygen 公司；对硝基苯甲醛，分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

MG48+型 PCR 仪，杭州朗基科学仪器有限公司；THZ-C 恒温培养箱，上海跃进医疗器械一厂；Waters e2695 型高效液相色谱仪，美国 Waters 公司。

1.1.2 菌种及培养基

L-苏氨酸醛缩酶基因（*ltaE*）检索自 GenBank（Gene ID: 944955），L-TA 基因工程菌由本实验室构建，构建方法参考《分子克隆实验指南》[21]，PCR 所用引物序列如下（下划线部分为限制性酶切位点）：

引物 1：GGGGGATCCATGATTGATTTACGCAGTG

引物 2：TGGGAATTCTTAACGCGCCAGGAATGCACG

实验中所用培养基均为 LB 培养基。

1.2 方法

1.2.1 基因工程菌[*E. coli* BL21(DE3)/pGEX-KG-*ltaE*)构建

1.2.1.1 *ltaE* 基因克隆

以大肠杆菌 K-12 MG1655 基因组为模板，利用上述引物 PCR 扩增 *ltaE*。PCR 程序设定为：预变性：94 ℃预变性 3 min；PCR 扩增过程：94 ℃变性 30 s，65 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，重复此过程 30 个循环；72 ℃延伸 10 min。

1.2.1.2 构建 pGEX-KG-*ltaE* 重组质粒

将 PCR 扩增并纯化后的 *ltaE* 基因片段和载体 pGEX-KG 分别用 *BamHI* 和 *EcoRI* 限制性内切酶双酶切，胶回收双酶切后的 *ltaE* 基因片段和 pGEX-KG 线性化片段，用 T4 DNA 连接酶连接，获得重组质粒 pGEX-KG-*ltaE*。

1.2.1.3 重组 L-苏氨酸醛缩酶蛋白诱导表达

将重组质粒 pGEX-KG-*ltaE* 通过热激法转化至 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞中，涂布于含氨苄抗性的 LB 平板上，37 ℃培养 12 h，筛选获得基因工程菌 BL21（DE3）/pGEX-KG-*ltaE* 菌落。挑选含目的基因且测序正确的单菌落于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上划线，37 ℃培养 12 h；然后接种于 3 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中，37 ℃、200 r/min 摇床培养 12 h；将上述培养物按体积分数 1%接种量接入含 50 mg/L 氨苄青霉素的 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中，37 ℃、200 r/min 摇床培养至 OD_{600} 为 0.5，加入终浓度为 0.3 mmol/L 的异丙基-*β*-D-硫代半乳糖苷（IPTG），30 ℃诱导 7 h。诱导结束后 4000 r/min 离心 15 min 收集菌体细胞，冷冻干燥，SDS-PAGE 分析重组蛋白表达。

1.2.2 酶活性测定方法

酶活性测定反应体系为：在 10 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液（pH=8.0）中加入 L-TA 全细胞 16 mg，0.2 mmol/L PLP，500 mmol/L 甘氨酸和 100 mmol/L 对硝基苯甲醛，45 ℃水浴振荡反应 24 h，利用 HPLC 检测反应液中生成的 L-4-硝基苯基丝氨酸。酶活力单位（U）定义为：在上述反应条件下每分钟生成 1 μmol L-4-硝基苯基丝氨酸所需的酶量。

HPLC 检测 L-4-硝基苯基丝氨酸。色谱条件[22]：色谱柱: XBridge C18 柱（250 mm×4.6 mm× 5 μm）；流动相: *V*（CH_3CN）：*V*（50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液）= 7：93；检测波长: 270 nm；流速: 1 mL/min；进样量: 20 μL；柱温: 25 ℃。

1.2.3　重组 L-苏氨酸醛缩酶酶学性质研究

1.2.3.1　温度对酶活性的影响

按照 1.2.2 节构建反应体系，在其他条件不变时，分别在 30、35、40、45、50、55 和 60 ℃下进行反应，测定 L-TA 的酶活性，以各温度下的 L-TA 相对酶活（酶活性与酶最大活性的百分比）对温度作图。

另将重组 L-TA，分别置于不同温度（40、45、50、60 和 70 ℃）的水浴锅中温育，每隔 0.5 h 取出一份，3 h 后取毕，将取出的每一份酶按照 1.2.2 节反应体系进行酶转化反应，检测各自的酶活性，以此测定酶的热稳定性。

1.2.3.2　pH 对酶活性的影响

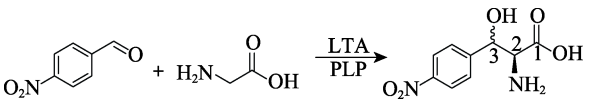
按照 1.2.2 节构建反应体系，在其他条件不变时分别在 pH=5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 下测定 L-TA 的酶活性，以各 pH 条件下的 L-TA 相对酶活对 pH 作图，得出酶的最适作用 pH。

另将重组 L-TA 置于不同 pH（6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0）的缓冲溶液中，45 ℃温育，每隔 0.5 h 取出一份，3 h 后取毕，检测酶活性，将上述 pH 下温浴不同时间后的酶活性进行对比，以此探究重组 L-TA 的 pH 稳定性。

1.2.4　重组 L-苏氨酸醛缩酶在 L-4-硝基苯基丝氨酸合成中的应用

1.2.4.1　催化反应路线

L-苏氨酸醛缩酶催化合成 L-4-硝基苯基丝氨酸的反应路线如下所示：



重组 L-苏氨酸醛缩酶在辅酶 PLP 的协助下，催化甘氨酸和对硝基苯甲醛合成 L-4-硝基苯基丝氨酸。

1.2.4.2　底物物质的量比的影响

分别在各 10 mL 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液（pH=8.0）中加入 16 mg 全细胞，0.2 mmol/L PLP，500 mmol/L 甘氨酸，以及与甘氨酸不同物质的量比的对硝基苯甲醛，45 ℃水浴振荡反应 24 h，考察不同底物物质的量比对反应的影响。

1.2.4.3　甘氨酸浓度的影响

在 10 mL 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液（pH=8.0）中加入 16 mg 全细胞，0.2 mmol/L PLP，再加入甘氨酸，使其终浓度为 100、300、500、1000、1500 mol/L，并各自按照 *n*（甘氨酸）：*n*（对硝基苯甲醛）=5：1 的比例加入不同量的对硝基苯甲醛，45 ℃水浴振荡反应，每隔 6 h 取样检测。

1.2.4.4　反应时间的影响

在 10 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液（pH=8.0）中含 L-TA 全细胞 16 mg，0.2 mmol/L PLP，500 mmol/L 甘氨酸和 100 mmol/L 对硝基苯甲醛，45 ℃水浴振荡反应，每隔 4 h 取样品，利用 HPLC 检测反应液中生成的 L-4-硝基苯基丝氨酸，考察反应时间对酶反应的影响。

1.2.4.5　L-4-硝基苯基丝氨酸的分离纯化

在 500 mL pH=8.0 的磷酸缓冲液中加入 0.8 g 全细胞、18.8 g 甘氨酸、7.6 g 对硝基苯甲醛，0.2 mmol/L PLP，在 45 ℃水浴振荡反应，HPLC 检测产物不再生成时，离心去除全细胞及未反应的对硝基苯甲醛，浓缩至 200 mL。调 pH= 3.0，加入 1 g 活性炭在 70 ℃水浴搅拌脱色 30 min，趁热过滤除去活性炭，转化液冷却至室温，调 pH=5.0，作为上柱液备用。

取 100 g 活性炭颗粒于 500 mL 的烧杯中，加入上述反应液，充分搅拌，静置 15 min，湿法装柱。用蒸馏水洗脱，去除溶液中未反应的甘氨酸。纸层析检测，直至无甘氨酸流出，则甘氨酸冲洗完全。再用体积分数为 50%的乙醇洗脱产物，以 50 mL 为单位体积，收集产物洗脱液，纸层析检测洗脱终点。合并洗脱液，浓缩得粗品，体积分数为 50%的乙醇重结晶，乙醇洗涤后得淡黄色结晶。

产物收率按下式计算：

$$收率/\% = m/M \times 100$$

式中：m 为实际得到的产物质量，g；M 为理论产物质量，g。

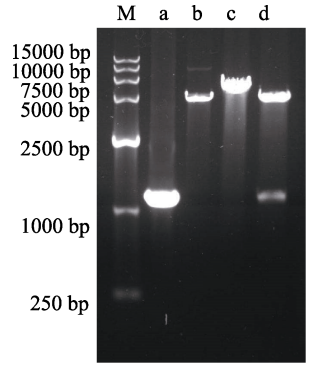
根据反应原理，在甘氨酸过量的情况下，产物的理论物质的量与对硝基苯甲醛物质的量相等，因此：

理论产物的质量(g)=L-4-硝基苯基丝氨酸的相对分子质量(g/mol)×对硝基苯甲醛物质的量(mol)。

2　结果与讨论

2.1　*ltaE* 基因克隆

ltaE 基因克隆结果，如图 1 所示。



M—D15000 Marker；a—*ltaE* PCR 产物；b—pGEX-KG 质粒单酶切产物；c—pGEX-KG-*ltaE* 单酶切产物；d—pGEX-KG-*ltaE* 双酶切产物

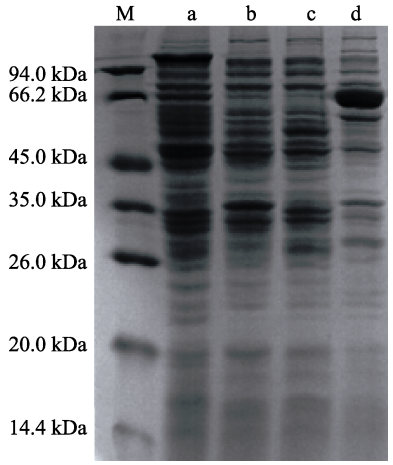
图 1　*ltaE* PCR 产物和 pGEX-KG-*ltaE* 重组质粒酶切验证

Fig. 1　Identification of *ltaE* PCR product and the recombinant plasmid pGEX-KG-*ltaE*

如图 1 所示，以大肠杆菌基因组为模板，通过 PCR 扩增获得大小约为 1000 bp 的核酸条带，与理论大小相符。重组质粒 pGEX-KG-*ltaE* 用 *BamHI* 和 *EcoRI* 限制性内切酶双酶切，经琼脂糖凝胶电泳验证，获得大小约为 5000 和 1000 bp 的条带，长度分别与 pGEX-KG 载体和 *ltaE* 基因相符。重组质粒中的 *ltaE* 基因以 pGEX-KG 质粒通用引物测序，与目的基因序列一致，上述结果表明 *ltaE* 基因已成功连接到 pGEX-KG 载体上。

2.2　重组 L-TA 蛋白诱导表达

重组 L-TA 蛋白诱导表达鉴定如图 2 所示。SDS-PAGE 方法参见文献[23]。



M—蛋白质 Marker；a—*E. coli* K-12 总蛋白；b—BL21 总蛋白；c—未诱导 pGEX-KG-*ltaE*/BL21 总蛋白；d—诱导 pGEX-KG-*ltaE*/BL21 总蛋白

图 2　重组 L-TA 蛋白 SDS-PAGE 验证

Fig. 2　Cell protein certification of the recombinant L-TA with SDS-PAGE

如图 2 所示，重组 L-TA 菌株经 IPTG 诱导、细胞超声波破碎、SDS-PAGE 电泳验证，电泳图谱显示在 61 kDa 处有特异性表达条带。

2.3　酶催化反应产物分析

按照 1.2.2 方法检测酶转化液中的 L-4-硝基苯基丝氨酸，结果如表 1 所示。

表 1　酶催化反应产物 HPLC 分析

Table 1　HPLC chromatogram of standard L-4-nitrophenyl-serine and its conversion solution

	保留时间/min	峰面积/(μV·s)	峰高/μV
产物标样	5.430	5440319	810810
反应液	5.424	7288185	975088

如表 1 所示，酶转化液中主要产物的色谱峰保留时间与 L-4-硝基苯基丝氨酸标准品保留时间相同，说明生成的产物是 L-4-硝基苯基丝氨酸，并以此为依据检测酶活性。

2.4　重组 L-苏氨酸醛缩酶酶学性质研究

2.4.1　温度对酶活性的影响

温度过低时酶活性较低，温度升高时酶活性随之升高，酶促反应速度加快。而温度过高时又会导致酶活性急剧下降，甚至导致酶蛋白变性失活。因此，酶促反应的最适反应温度是综合平衡的结果。温度对重组 L-TA 活性的影响如图 3 所示。

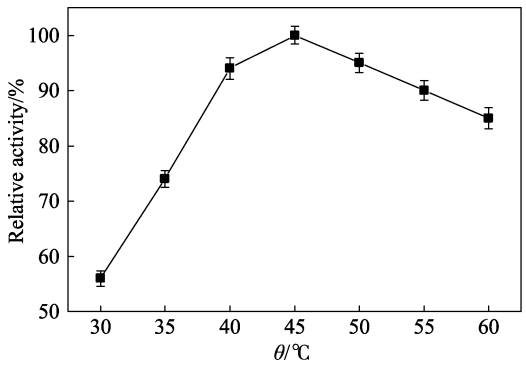


图 3　反应温度对重组 L-TA 酶活性的影响

Fig. 3　Effect of temperature on the recombinant L-TA enzymatic activities

由图 3 可知，在 45 ℃时，重组 L-TA 酶活性最高，相比文献报道的 *Pseudomonas sp.*来源的低特异性 L-TA 最适温度 25 ℃[14]，大肠杆菌来源的 L-TA 最适转化温度 45 ℃更有利于工业化生产。

酶促反应过程中存在酶蛋白热变性累积效应，表现为前期温度较高时酶活性较高，后期由于蛋白变性酶活性下降较快，使酶促反应不持久，为此有必要考察重组 L-TA 的热稳定性，结果如图 4 所示。

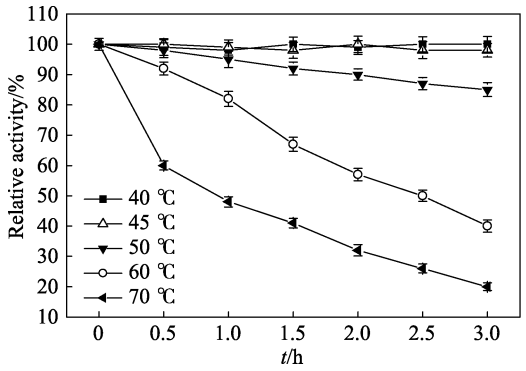


图 4　重组 L-TA 的热稳定性

Fig. 4　Thermal stability of the recombinant L-TA

由图 4 可知，重组 L-TA 具有很高的热稳定性，即使在 60 ℃温育 1 h 也能保留 80%的酶活性，但在 70 ℃时酶活性开始急剧下降，在 45 ℃时酶稳定性好，L-TA 酶活性更高。因此，酶促反应温度设定在 45 ℃。文献报道[14]*Pseudomonas sp.*来源的 L-TA 在 40 ℃中温育 15 min 后失去了一半活性，说明了大肠杆菌来源的 L-TA 具有耐高温的特性。

2.4.2　pH 对酶活性的影响

pH 对重组 L-TA 活性的影响如图 5 所示。

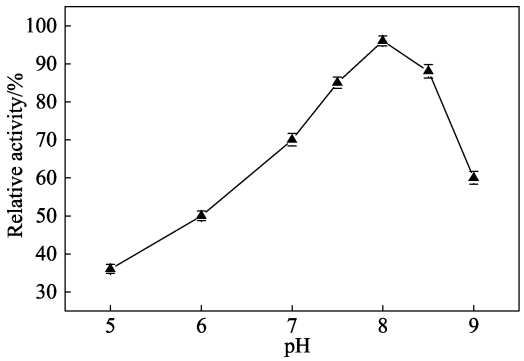


图 5　pH 对重组 L-TA 的酶活性影响

Fig. 5　Effect of pH on the recombinant L-TA enzymatic activities

由图 5 可知，pH 过低或过高都能影响 L-TA 的酶活性。在 pH=8.0 时，酶活性最好，底物对硝基苯甲醛的转化率最高。酶促反应需要在适宜的 pH 环境中进行。在反应体系中 pH 可以改变酶活性中心有关基团的解离或聚集状态，pH 也可影响底物和辅酶的解离程度。

pH 的变化能够影响酶蛋白结构的稳定性。参考文献方法[24]，本实验考察了重组 L-TA 在不同 pH 下的稳定性，结果如图 6 所示。

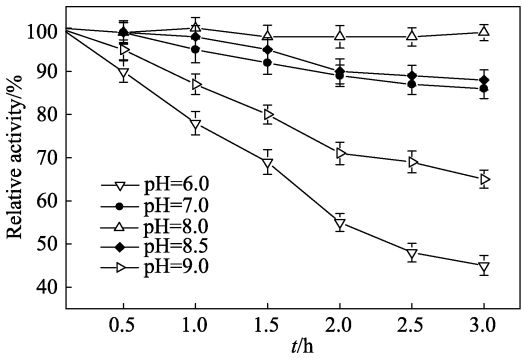


图 6　重组 L-TA 酶的 pH 稳定性

Fig. 6　pH stability of the recombinant L-TA

过高或过低的 pH 会引起金属辅基的解离和蛋白质电荷状态的变化，从而影响酶稳定性。由图 6 可以看出，重组 L-TA 在 pH=8.0 的缓冲液中，45 ℃温浴 3 h 后仍能保留 98%的活性，高于在其他不同 pH 值缓冲液中温浴的酶液。因此，pH=8.0 时酶稳定性最好，这与上述分析结果相一致。

2.5　重组 L-苏氨酸醛缩酶合成 L-4-硝基苯基丝氨酸的应用

2.5.1　底物物质的量比对酶反应的影响

由于苏氨酸醛缩酶催化的羟醛缩合反应是可逆的，对硝基苯甲醛转化率低，而目前已知的醛缩酶只能用甘氨酸作为底物[13]，所以在甘氨酸过量的情况下可以提高对硝基苯甲醛的转化率。故本文考察了在重组 L-TA 催化作用下甘氨酸与对硝基苯甲醛的物质的量比对反应结果的影响，如图 7 所示。

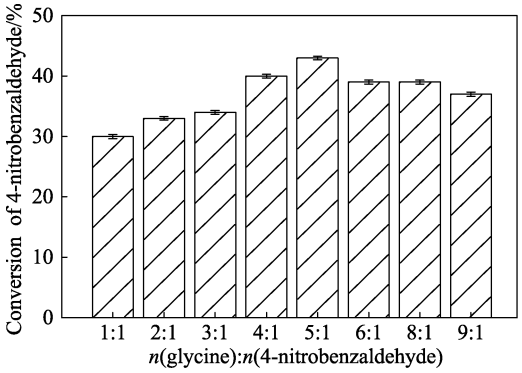


图 7　底物物质的量比对转化率的影响

Fig. 7　Effect of the molar ratio of glycine to 4-nitrobenzaldehyde on the enzymatic activities

由图 7 所示，当甘氨酸的浓度为 500 mmol/L，n（甘氨酸）：n（对硝基苯甲醛）=4：1 或 5：1 时得到相对较高的转化率，分别为 40%和 43%。因此，n（甘氨酸）：n（对硝基苯甲醛）=5：1 为宜。

2.5.2　甘氨酸浓度对酶反应的影响

底物浓度过高或过低均不利于酶促反应的进行，甘氨酸浓度对酶反应的影响如图 8 所示。

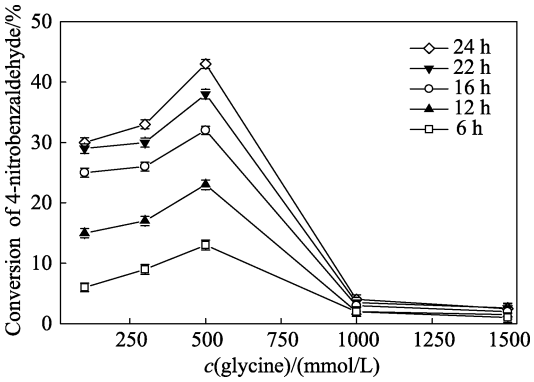


图 8　甘氨酸浓度对转化率的影响

Fig. 8　Effect of concentration of glycine on the enzymatic activities

由图 8 所示，随着甘氨酸浓度的增加，底物的转化率也在逐渐增加，当甘氨酸浓度达到 500 mmol/L 时，底物对硝基苯甲醛转化率达到最大值 43%，之后随着甘氨酸浓度的增大，抑制了酶活性，对硝基苯甲醛转化率急剧下降。综合考虑，确定甘氨酸反应的浓度为 500 mmol/L。

2.5.3　反应时间对酶反应的影响

酶反应的转化率随着反应时间的延长而增加，但由于反应逐渐趋于平衡，当反应进行到一定时间，

转化率的增长也逐渐减慢甚至不再增加。因此，从经济性角度考虑，选择适当的转化时间停止反应既可得到较高的收率，同时又能减少能源的消耗，所以本文考察了反应时间对酶反应的影响如图 9 所示。

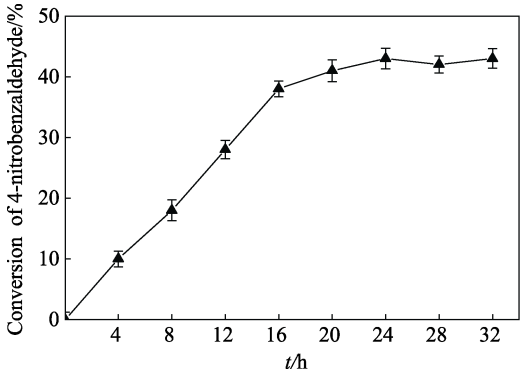


图 9　反应时间对转化率的影响

Fig. 9　Effect of reaction time on the enzymatic activities

由图 9 可见，酶促反应随着时间延长底物转化率逐渐升高，反应进行到 24 h 后反应逐渐趋于平衡，4-硝基苯甲醛转化率达到 43%时不再增加，因此，该酶促反应的最适转化时间为 24 h。

2.5.4　L-4-硝基苯基丝氨酸的分离纯化

分离纯化过程中吸附温度以及吸附介质的 pH 对活性炭的吸附特性和效果均有影响。结合文献[20]，以及实验摸索得出，在高温和低 pH （pH=3）条件下，活性炭对 L-4-硝基苯基丝氨酸的吸附量较低，对转化液中残余的全细胞和反应过程产生的少量色素等有机杂质具有较高的吸附能力。同时，在较高 pH（pH=5）以及较低温度（25~30 ℃）条件下对芳香族氨基酸具有很高的吸附能力，远高于对甘氨酸的吸附能力。因此，按照方法 1.2.4.5 节方法处理酶转化液。洗脱分离时，先用蒸馏水洗脱，去除甘氨酸和缓冲盐。再用体积分数为 50%的乙醇解吸附目标产物，洗脱完全后，合并乙醇洗脱液，减压蒸馏，得到粗品，体积分数 50%的乙醇重结晶，乙醇洗涤，得到淡黄色结晶。

1.2.4.5 节反应体系中理论上可得到 L-4-硝基苯基丝氨酸 11.3 g，经过 HPLC 检测反应液中含有 4.86 g 产物，因此，重组 L-TA 对底物的转化率为 43%。反应液经过分离纯化后得到 L-4-硝基苯基丝氨酸 3.96 g，此步骤收率为 81%，总收率为 35%。

2.5.5　L-4-硝基苯基丝氨酸的鉴别

L-4-硝基苯基丝氨酸存在两个手性中心，L-TA 催化合成的产物中 2 位手性中心保持 *S* 构型（即 L 构型），3 位的手性中心则包含 *R* 和 *S* 两种构型。因此，产物实际为（2*S*,3*R*）-4-硝基苯基丝氨酸与（2*S*,3*S*）-4-硝基苯基丝氨酸两种异构体的混合物。

根据 ^{1}HNMR 数据，并结合两种异构体的结构差异及文献[6]，可推断出在本文中制备的 L-TA 酶催化下，两种异构体的比例为：*n*〔（2*S*,3*R*）-4-硝基苯基丝氨酸〕：*n*〔（2*S*,3*S*）-4-硝基苯基丝氨酸〕=2：1。^{1}HNMR（D_2O, 600 MHz）数据可归属为：δ: 8.21〔d, *J*=8.76 Hz, 2H, (2*S*, 3*R*)〕, 8.17〔d, *J*=8.82 Hz, 2H, (2*S*, 3*S*)〕, 7.60〔d, *J*=8.64 Hz, 2H, (2*S*, 3*R*)〕, 7.53〔d, *J*=8.70 Hz, 2H, (2*S*, 3*S*)〕, 5.38 (d, *J*=3.60 Hz, 1H,〔2*S*, 3*S*)〕, 5.32〔d, *J*=4.26 Hz, 1H, (2*S*, 3*R*)〕, 4.05〔d, *J*=3.84 Hz, 1H, (2*S*, 3*S*)〕, 3.87〔d, *J*=4.44 Hz, 1H, (2*S*, 3*R*)〕。

3　结论

针对化学法合成 L-4-硝基苯基丝氨酸需要强酸和强碱的环境，反应需要有毒有机溶剂，环境污染较大的问题，在宿主细胞 *E. coli* BL21（DE3）中重组表达大肠杆菌来源的 L-苏氨酸醛缩酶，以该酶为催化剂，甘氨酸和对硝基苯甲醛为底物能成功催化合成 L-4-硝基苯基丝氨酸，避免强酸、强碱和有毒有机试剂的使用，反应条件温和。

研究表明，在 45 ℃、pH=8.0，*n*（甘氨酸）：*n*（对硝基苯甲醛）=5：1、甘氨酸浓度 500 mmol/L 的条件下反应 24 h，目标产物 L-4-硝基苯基丝氨酸质量浓度达到 9.72 g/L，4-硝基苯甲醛转化率达到 43%。

目前，虽然重组 L-苏氨酸醛缩酶对底物对硝基苯甲醛的转化率有所提高，但离工业化应用还有一定距离。因此，利用蛋白质工程技术对 L-苏氨酸醛缩酶进行定向进化，从而进一步提高 L-苏氨酸醛缩酶的催化效率将是我们下一步研究的重点。

参考文献：

[1] Hua Yuxia (华玉夏), Jiao Xiaoyun (焦晓云), Liu Wenlu (刘文陆), *et al*. Synthesis and asymmetric induction of chiral phase transfer catalysts I-(1S,2R)-(-)-(1-paranitrophenyl-1,3-dihydroxyl-2-propyl) trimethylammonium iodide[J]. Chemical Reagents (化学试剂), 2003, 25(4): 201-202.

[2] Yang K, Wang Q, Su L, *et al*. Design and synthesis of novel chloramphenicol amine derivatives as potent aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitors[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(11): 3810-3817.

[3] Alkhodir F, Refat M S. Synthesis, spectroscopic, thermal and anticancer studies of metal-antibiotic chelations: Ca(II), Fe(III), Pd(II) and Au(III) chloramphenicol complexes[J]. Journal of Molecular Structure, 2016, 1119: 157-166.

[4] Tetsuya Ichikawa S M, Younosuke A, Yoshiharu I. Synthetic studies of amino acids by the use of the copper complex.I. Syntheses of β-hydroxy DL-amino acids by the use of the complex of copper(II) with the Schiff base derived from glycine and pyruvic Acid[J]. Journal of the American Chemical Society, 1970,92(18): 5514-5516.

（下转第 2064 页）