

成团泛菌苯丙氨酸氨基变位酶的性质 表征及用于合成 β -苯丙氨酸

朱龙宝, 杨瑾, 葛飞, 陶玉贵*, 宋平

(安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 克隆来源于 *Pantoea agglomerans* 的苯丙氨酸氨基变位酶基因 (*pam*), 构建表达载体, 转入大肠杆菌中进行异源表达, 采用亲和层析制备电泳纯的重组酶 (*PaPAM*), 用于催化合成 β -苯丙氨酸。结果表明: 成功克隆得到基因 *pam*, 长度为 1626 bp, 编码 541 个氨基酸长度的 *PaPAM*, 构建了大肠杆菌表达载体 pET28a-*pam*, 转入 *E. coli* BL21 中经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 镍柱亲和层析纯化获得电泳纯的重组 *PaPAM*。MS 和 NMR 表征结果表明, 重组 *PaPAM* 能异构化 α -苯丙氨酸为 β -苯丙氨酸, 在最佳条件下 (30 °C、pH 9、1.5 mol/L NH_4^+), 酶活力达到 2.5 kU/g, 在 30~50 °C、pH 8~10 下 *PaPAM* 具有较高的稳定性, 金属离子 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 对 *PaPAM* 的活性影响较小, 表面活性剂 SDS 和 Triton 100 对 *PaPAM* 有较强抑制作用, 在最佳反应条件下, 底物的转化率达到 92%。

关键词: 成团泛菌; 苯丙氨酸氨基变位酶; β -苯丙氨酸; 基因克隆; 异源表达; 生物工程

中图分类号: TQ226.36 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2019)03-0449-07

Characterization of Phenylalanine Aminomutase from *Pantoea Agglomerans* and Synthesis of β -phenylalanine

ZHU Long-bao, YANG Jin, GE Fei, TAO Yu-gui*, SONG Ping

(School of Biochemical and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: The gene of phenylalanine aminomutase (*pam*) was cloned from *Pantoea agglomerans* and the expression vector was constructed for heterologous expression in *E. coli*. The electrophoretically pure recombinant phenylalanine aminomutase (*PaPAM*) obtained by affinity chromatography was used to synthesize β -phenylalanine. The results showed that the gene *pam* with 1626 bp encoding 541 amino acids of *PaPAM* was successfully cloned. The expression vector pET28a-*pam* was constructed and transferred into *E. coli* BL21 for induced expression using isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). The product of β -phenylalanine was characterized by MS and NMR. The enzyme activity reached 2.5 kU/g under the optimum conditions of 30 °C, pH 9.0 and 1.5 mol/L NH_4^+ . The enzyme exhibited high stability at 30~50 °C and pH 8~10. Metal ions Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} and Fe^{3+} had little effect on the activity of *PaPAM*, while surfactants SDS and Triton 100 had strong inhibitory effect on *PaPAM*. Under the optimal reaction condition, the conversion of α -phenylalanine reached 92%.

Key words: *Pantoea agglomerans*; phenylalanine aminomutase; β -phenylalanine; gene cloning; heterogeneous expression; biological engineering

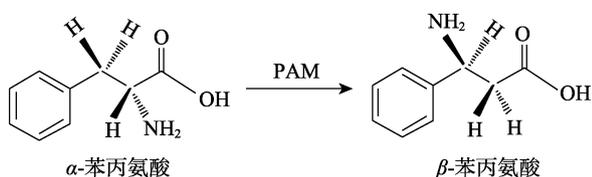
Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31671797); Natural Science Foundation for Colleges and Universities in Anhui Province (KJ2016A801); Youth Talent Support Program of Anhui Polytechnic University (2016BJRC006)

收稿日期: 2018-11-11; 定用日期: 2019-01-16; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180834

基金项目: 国家自然科学基金 (31671797); 安徽省高校自然科学基金 (KJ2016A801); 安徽工程大学拔尖人才项目 (2016BJRC006)

作者简介: 朱龙宝 (1979—), 男, 副教授, E-mail: lbzhu2008@126.com. 联系人: 陶玉贵 (1965—), 男, 教授, E-mail: swgtaoyg@126.com.

成团泛菌(*P. agglomerans*)是革兰氏阴性细菌,能在细胞内合成一种重要的次级代谢产物 Andrimid,能强烈抑制乙酰辅酶 A 羧化酶活性^[1]。Andrimid 作为一种新的多肽类抗生素近年来受到广泛关注,其重要的结构单元是 β -苯丙氨酸。*P. agglomerans* 中的苯丙氨酸氨基变位酶(PAM)可催化 α -苯丙氨酸合成 β -苯丙氨酸^[2]。同时, β -苯丙氨酸是一种重要的工业原料,广泛应用于内酰胺、萜类、生物碱及活性多肽等药物的生产中^[3-4]。目前, β -苯丙氨酸主要采用不对称化学合成,但生产工艺复杂,副产物多,而且存在环境污染问题,迫切需要建立绿色合成方法^[5]。酶法转化具有工艺简单、生产过程绿色、无环境污染等优点,因而越来越受到重视。目前,酶法合成 β -苯丙氨酸主要采用脂肪酶^[6]、青霉素酰化酶^[7]及氨基转移酶^[8-9]等,需要添加外源性辅因子,如金属离子、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)或黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH₂)及磷酸吡哆醛(PLP)等,导致反应过程复杂,难以实现大规模工业化生产^[9]。因而,催化工艺步骤少、生产工艺简单、无需添加辅因子的酶法合成方法更具应用潜力。由于苯丙氨酸氨基变位酶不需要添加外源性辅因子,能够一步异构化 α -苯丙氨酸产生 β -苯丙氨酸(反应式如下所示),因而与其他酶法合成相比具有更好的应用前景^[10]。



目前,对苯丙氨酸氨基变位酶的研究主要集中在来源于植物紫杉(*Taxus chinensis*)的苯丙氨酸氨基变位酶^[11-12],对来源于微生物的酶的报道相对较少,有报道来源于微生物链霉菌(*Streptomyces maritimus*)的苯丙氨酸氨基变位酶具有较好的热稳定性,但催化效率较低^[13-14]。为满足工业应用,需要获得催化效率高、热稳定性好的微生物来源的苯丙氨酸氨基变位酶,因而可克隆革兰氏阴性细菌 *P. agglomerans* 中的苯丙氨酸氨基变位酶基因,构建表达载体,转入大肠杆菌中进行异源表达,制备重组酶,用于合成 β -苯丙氨酸。

本文克隆了来源于 *Pantoea agglomerans* 的苯丙氨酸氨基变位酶基因(*pam*),构建了表达载体,转入大肠杆菌中进行异源表达,采用亲和层析制备电泳纯的重组酶(*PaPAM*),用于催化合成 β -苯丙氨酸。

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

Escherichia coli BL21、*Escherichia coli* JM109 购自宝生物工程(大连)有限公司;克隆载体 pMD18-T 和表达载体 pET28a(+) 均购自美国 Invitrogen 公司。实验中所用培养基均为 Luria-Bertani(LB)培养基。

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒均购自上海生物工程有限公司;限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、蛋白质 Marker、DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;用于酶学分析的底物 α -苯丙氨酸、 β -苯丙氨酸均购自 Sigma 公司,其他试剂为国产 AR。

基因扩增仪(PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司);LCMS-8030 三重四极杆质谱仪、LC-20 高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司;Bruker Ultrashield 400 PLUS 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;超声波细胞破碎仪,美国 Branson 公司;AKTApriime 蛋白纯化仪,美国 GE Healthcare 公司;Z326K 型高速冷冻离心机,德国 Hermle 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆

根据 GenBank 中提供的 *P. agglomerans* 苯丙氨酸氨基变位酶基因(*pam*)序列(AY192157.1),委托上海生物工程公司合成基因 *pam*,并插入克隆载体 pUC18T-*pam* 中,在基因的两端引入限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 的酶切位点。利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 同时对 pUC18T-*pam* 和表达载体 pET28a(+) 进行双酶切,割胶回收目的基因片段和 pET28a(+) 载体;然后,将双酶切产物(目的基因)与载体 pET28a(+) 于 16 °C 下过夜连接,将连接产物转入 *E. coli* JM109 中,涂布含有卡那霉素(50 mg/L)的 LB 平板,于 37 °C 培养,阳性重组子采用菌落 PCR 和质粒双酶切进行鉴定,送上海生工测序确认基因序列,构建重组表达质粒命名为 pET28a-*pam*。

1.2.2 重组酶的表达及分离纯化

将 pET28a-*pam* 转入 *E. coli* BL21 中,涂布含有卡那霉素(50 mg/L)的 LB 平板,于 37 °C 培养 12 h,挑取单菌落至 5 mL 的 LB 培养基中,于 37 °C 培养 10 h。取 5 mL 培养液至 500 mL 的 LB 培养基中,于 37 °C 培养至吸光度值(OD₆₀₀)为 0.6 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),于 26 °C 诱导表达 12 h 后,离心收

集菌体。用 A 液 (20 mmol/L 磷酸钠+0.5 mol/L NaCl+5 mmol/L 咪唑, pH 8) 重悬菌体, 超声破碎 (功率 250 W, 超声 1 s, 间歇 3 s, 共 15 min) 后冷冻离心, 收集上清液。将上清液采用 His-Trap TM/FF 亲和层析柱进行分离纯化, 用 B 液 (20 mmol/L 磷酸钠+0.5 mol/L NaCl+250 mmol/L 咪唑, pH 8) 进行梯度洗脱, 收集活性部分, 采用 SDS-PAGE 检测酶蛋白纯度。

1.2.3 酶活力及动力学参数检测

取适量的酶液与 400 μ L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)-盐酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 9) 和 100 μ L 底物 α -苯丙氨酸混合, 反应总体积为 500 μ L。于 30 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后加入 500 μ L 无水甲醇终止反应。用 C18 反相色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 检测 β -苯丙氨酸, 流动相为甲醇 (0~15 min, 甲醇体积分数由 20% 增加到 50%), 进样 20 μ L, 流速 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 245 nm。酶活单位的定义: 30 $^{\circ}$ C 下每分钟生成 1 μ g 的 α -苯丙氨酸需要的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

表观米氏常数 (K_m) 及转换常数 (K_{cat}) 的测定: 配制不同浓度的 α -苯丙氨酸底物溶液, 分别与酶液在 30 $^{\circ}$ C、pH 9 条件下反应, 测定酶反应速率, 然后按照米氏方程, 采用 Lineweaver-Burk 作图法确定酶的 K_m 及 V_{max} 值, 根据公式 $K_{cat}=V_{max}/\text{酶浓度}$, 求重组酶的 K_m 和 K_{cat} 。

1.2.4 蛋白质含量测定

酶蛋白质含量采用 Bradford 法测定^[15]。

1.2.5 酶学性质表征

1.2.5.1 温度对酶活性的影响

在 pH 9.0, 15~45 $^{\circ}$ C 下测定酶活力, 确定酶反应最适温度。为研究酶的热稳定性, 分别将酶在 40、50、60 $^{\circ}$ C 下保温 0.5~3.0 h 后测定残余酶活力, 并以在 30 $^{\circ}$ C 下测定的酶活力为 100% 计算相对酶活力。

1.2.5.2 pH 对酶活性的影响

在 30 $^{\circ}$ C 下, 分别在不同缓冲体系 (pH 5~7, 25 mmol/L 醋酸钠缓冲液; pH 7~9, 25 mmol/L Tris-盐酸; pH 9~10, 25 mmol/L 碳酸钠缓冲液) 中测定酶活力, 确定酶催化反应的最适 pH。将酶分别溶解于不同 pH 的缓冲体系 (pH 7~9, 25 mmol/L Tris-盐酸; pH 9~10) 中并保持 4~24 h, 每隔 4 h 取样测定剩余酶活力, 以 pH 9 下测定的酶活力为 100% 计算相对酶活力, 以确定酶的 pH 稳定性。

1.2.5.3 金属离子及表面活性剂对酶活性的影响

在反应体系中分别加入不同的金属离子 (1 mmol/L, Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+}) 和表面活性剂 (1 mmol/L, Triton 100、Tween 80、SDS、CTAB)。在 30 $^{\circ}$ C、pH 9 下测定酶活力,

以未加金属离子及表面活性剂反应体系测得的酶活力为 100% 计算相对酶活力, 研究其对酶活性的影响。

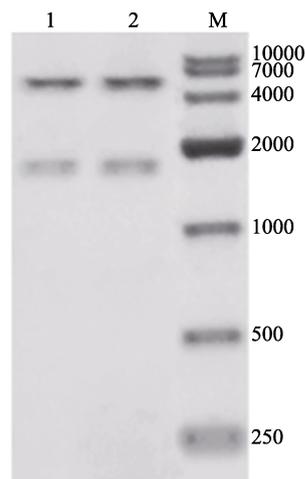
1.2.5.4 NH_4^+ 浓度对酶活性的影响

在反应体系中分别加入终浓度为 0.05~2.5 mol/L 的氨水溶液, 同时用盐酸调整 pH, 在最适温度、最适 pH 下测定 NH_4^+ 对酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 表达载体构建

对 1.2.1 节构建的表达载体 pET28a-pam 进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切验证, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。在 1600 bp 左右出现目的基因条带, 与理论值相一致, 表明成功构建表达载体 pET28a-pam, 并将其送往上海生工测序, 测序结果与 GenBank 中 *P. agglomerans* 苯丙氨酸氨基变位酶基因序列 (AY192157.1) 完全一致。



M: DNA marker; 泳道 1 和 2 代表 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pET28a-pam

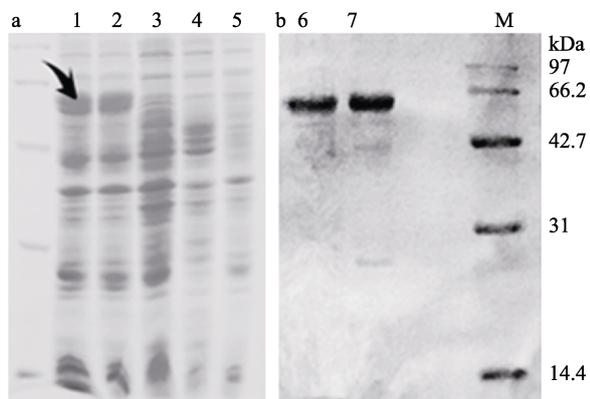
图 1 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切验证重组表达载体 pET28a-pam

Fig. 1 Identification of recombinant pET28a-pam digested with *EcoR* I and *Hind* III

2.2 重组酶的表达和纯化

将表达载体 pET28a-pam 转入 *E. coli* BL21, 挑选重组子于 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG, 使 IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L, 于 26 $^{\circ}$ C 诱导培养 12 h。离心收集菌体, 超声破碎细胞后离心, 分别取上清液和沉淀进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 带有 pET28a-pam 的重组子在 IPTG 诱导下成功实现了表达, 在 60 kDa 出现可溶性的目的蛋白条带, 条带的大小与理论值一致, pam 在大肠杆菌中实现了高效表达。进一步采用 His Trap TM/FF

亲和层析柱对酶进行分离纯化，SDS-PAGE 电泳分析纯化产物，获得电泳纯的重组酶，质量浓度达到 2.8 g/L。

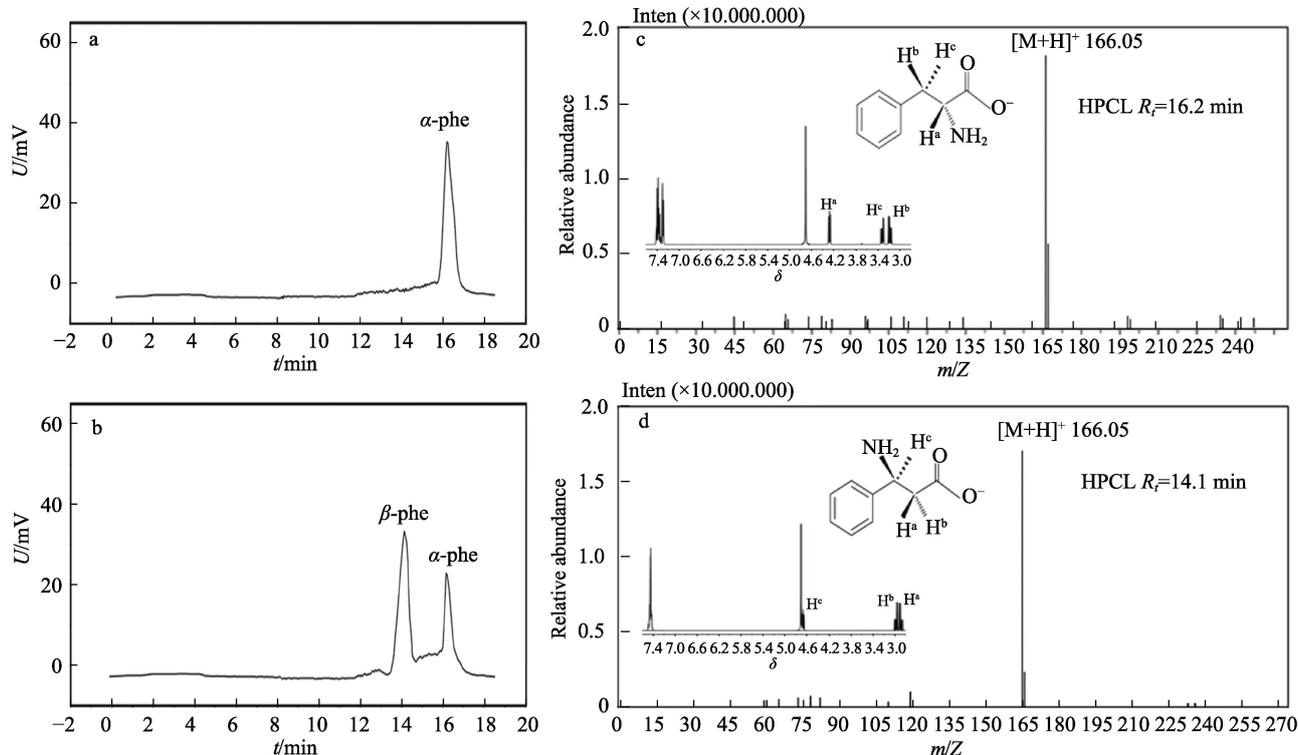


M: protein marker; 泳道 1 和 2 代表 IPTG 诱导的重组菌破碎上清液; 泳道 3 代表未用 IPTG 诱导的重组菌破碎上清液; 泳道 4 和 5 代表 IPTG 诱导的不带重组质粒的 *E. coli* BL21 破碎液上清液; 泳道 6 和 7 代表 His Trap TM/FF 亲和和色谱纯化后的重组酶
图 2 重组苯丙氨酸氨基变位酶表达 (a) 及利用 His Trap TM/FF 纯化酶的 SDS-PAGE 图 (b)

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant enzyme expressed in *E. coli* BL21 (a) and purification of the recombinant enzyme using His Trap TM/FF (b)

2.3 重组酶催化产物分析

往 500 μ L Tris-盐酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 9) 中加入 10 mmol/L 底物 α -苯丙氨酸和适量的酶蛋白, 于 30 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后加入 500 μ L 无水甲醇终止反应。HPLC、MS 和 NMR 检测底物和酶催化的产物, 结果如图 3 所示。底物 α -苯丙氨酸和 β -苯丙氨酸标样的 HPLC 出峰时间 (R_t) 分别是 16.2 min 和 14.1 min (图 3a 和 3b), 底物 α -苯丙氨酸经酶催化反应 1 h 后, 在 14.1 min 出现一个峰 (图 3b)。采用制备柱分离纯化两个目标峰, 利用 MS 和 NMR 进一步鉴定酶反应底物和产物, MS 结果表明两个峰的化合物的 m/Z ($[M+H]^+$) 均为 166.05 (图 3c 和 3d), NMR 结果表明, 出峰时间为 16.2 min 核磁表征结果表明是底物 α -苯丙氨酸 (图 3c) [1 HNMR 400 MHz, D_2O , δ : 7.51~7.35 (m, 5H), 4.38~4.33 (dd, $J=7.6$ 、2.0 Hz, 1H), 3.43~3.36 (dd, $J=14.8$ 、9.2 Hz, 1H), 3.30~3.22 (dd, $J=14.4$ 、6.8 Hz, 1H)]。出峰时间为 14.1min 的核磁表征结果表明产物是 β -苯丙氨酸 [1 HNMR 400 MHz, D_2O , δ : 7.46~7.43 (m, 5H), 4.68~4.64 (m, 1H), 2.97~2.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 2.92~2.88 (d, $J=6.4$ Hz, 1H)] (图 3d)。



a—底物 α -苯丙氨酸的 HPLC 图; b—标准品 β -苯丙氨酸的 HPLC 图; c—底物 α -苯丙氨酸的 MS 图, 其 1 HNMR 插入在 MS 图中; d—酶催化产物的 MS 图, 其 1 HNMR 插入在 MS 图中; R_t 为出峰时间

图 3 酶催化底物和产物的 HPLC、MS 和 1 HNMR 图

Fig. 3 HPLC, MS, and NMR charts of enzyme-catalyzed substrate and product

2.4 重组酶的性质

2.4.1 温度对酶活性的影响

在 pH 9 下考察了温度对重组 PaPAM 活性的影

响, 结果见图 4a。从图 4a 可知, 随着温度的升高, 酶活性逐渐提高, 在 30 $^{\circ}$ C 时酶活性达到最大值 (2.1 kU/g), 温度继续升高, 酶活性呈下降趋势,

表明酶的最适温度为 30 °C。进一步研究了酶的温度稳定性, 分别在 40、50 和 60 °C 下处理酶 0.5~3.0 h 后, 测定剩余酶活力, 结果见图 4b。结果表明, 重组 PaPAM 在 40~50 °C 下处理 3.0 h 时酶活性保持 90% 以上, 在 60 °C 下处理 3.0 h 后仍具有约 40% 的酶活力 (图 4b), 表明酶的热稳定性较高, 与来源于 *S. maritimus* 的苯丙氨酸氨基变位酶 (*SmPAM*) 具有相似的稳定性和最适反应温度^[14], 而来源于植物 *T. chinensis* 的苯丙氨酸氨基变位酶 (*TcPAM*) 的活性最适温度为 15 °C, 超过 30 °C 时主要表现出脱氨酶活性 (催化底物脱氨生成反式肉桂酸)^[16], 表明微生物来源的酶在合成 β-苯丙氨酸方面更适合工业应用。

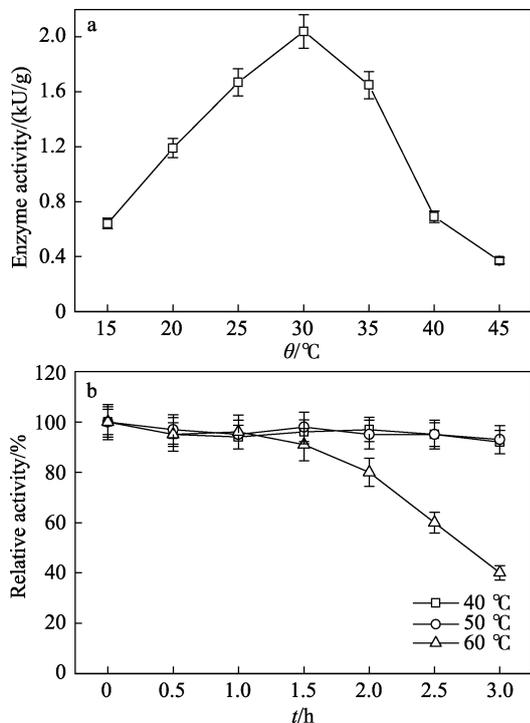


图 4 温度对酶活性 (a) 及稳定性 (b) 的影响
Fig. 4 Effects of temperature on the activity (a) and stability (b) of enzyme

2.4.2 pH 对酶活性的影响

在 30 °C 下考察了 pH 对 PaPAM 活性的影响, 结果见图 5。从图 5 可知, 酶的最适 pH 为 9, 酶活达 2.1 kU/g (图 5a)。将酶分别在 pH 8、9、10 下处理 4~24 h, 每隔 4 h 取样测定剩余酶活力, 结果见图 5b。由图 5b 可知, 酶在 pH 8~10 内较稳定, 活性保持在 98% 以上。

2.4.3 金属离子及表面活性剂对酶活性的影响

金属离子和表面活性剂 (1 mmol/L) 对 PaPAM 活性的影响如图 6 所示。由图 6a 可见, Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺ 在 1 mmol/L 的浓度下对 PaPAM 的活性影响较小; Mn²⁺、Zn²⁺ 的影响较大, 明显抑制了酶的

活性, 而 Cu²⁺ 强烈抑制酶活性, 相对酶活性仅剩 34%, 抑制酶活性达到 66%。由图 6b 可见, 在 1 mmol/L 的浓度下, SDS 和 Triton 100 对酶的活性影响较大, 而 Tween 80 和 CTAB 的影响较小。

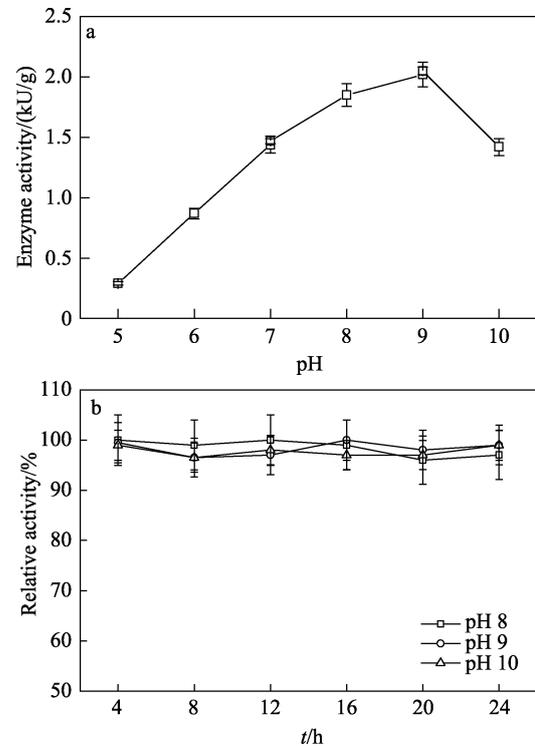


图 5 pH 对酶活性 (a) 及稳定性 (b) 的影响
Fig. 5 Effects of pH on PaPAM activity (a) and stability (b)

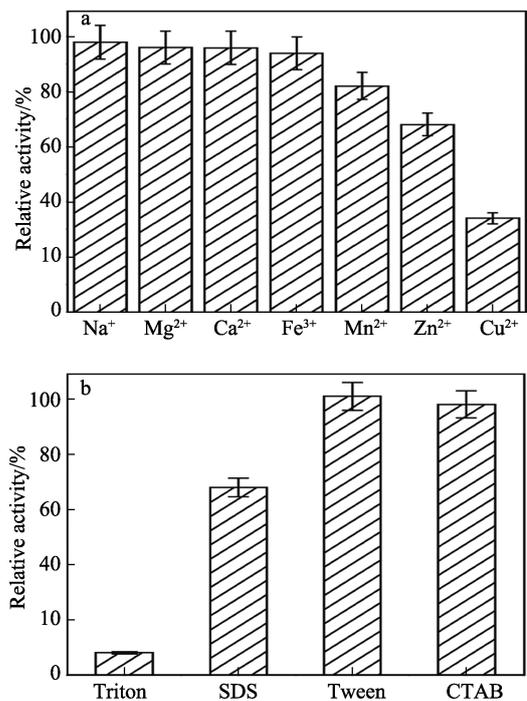


图 6 金属离子 (a) 及表面活性剂 (b) 对酶活性的影响
Fig. 6 Effects of metal ions (a) and surfactants (b) on the activity of recombinant PaPAM

2.4.4 NH₄⁺浓度对酶活性的影响

在反应体系中分别加入浓度为 0.05~2.5 mol/L 的氨水,用盐酸调整 pH 为 9,结果如图 7 所示。当铵离子低于 1.5 mol/L 时,对酶催化活力有明显促进作用。根据 PaPAM 催化反应过程,PaPAM 首先催化底物 α-苯丙氨酸脱除 α-氨基,形成中间产物反式肉桂酸和铵离子,形成的肉桂酸和铵离子仍然停留在酶活性中心,然后 PaPAM 将铵再次传递给中间产物反式肉桂酸的 β 位碳原子,形成产物 β-苯丙氨酸。在反应体系中添加一定浓度的铵离子,可能有利于反应平衡向生成产物 β-苯丙氨酸的方向移动,从而在反应体系中添加铵离子促进酶活性的提高,但铵离子浓度超过 1.5 mol/L 时,可能影响酶蛋白的电荷性质,导致酶的胶体性质及结构发生改变,从而抑制酶的活性。

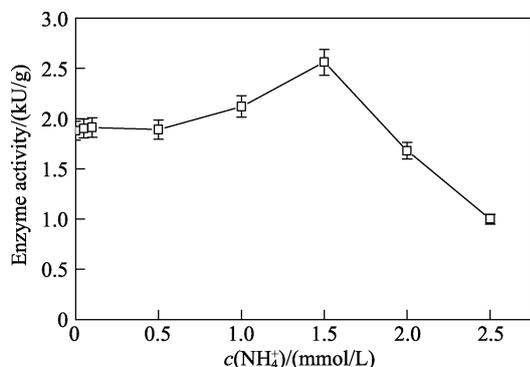


图 7 铵离子浓度对酶活性的影响

Fig. 7 Effects of NH₄⁺ concentration on the activity of recombinant PaPAM

2.4.5 不同来源苯丙氨酸氨基变位酶的催化效率

根据不同底物浓度与酶促反应的关系,按照米氏方程,采用 Lineweaver-Burk 作图法,求重组酶的表现米氏常数,结果如表 1 所示。PaPAM 的 K_m 为 0.0199 mmol/L, K_{cat} 为 2.2×10⁻⁴ s⁻¹, K_{cat}/K_m 为 11.2×10⁻³ mmol/(L·s), S. maritimus 和 T. chinensis 来源的苯丙氨酸氨基变位酶的 K_{cat}/K_m 分别为 7.19×10⁻³ mmol/(L·s)和 3.8×10⁻⁴ mmol/(L·s),表明微生物来源的催化效率明显高于植物来源的酶,而微生物中 PaPAM 的催化效率(K_{cat}/K_m)更高,表明 PaPAM 比 SmPAM 更具应用前景。

表 1 苯丙氨酸氨基变位酶的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of phenylalanine aminomutase

Enzyme	K _m / (mmol/L)	K _{cat} / (×10 ⁻³ s ⁻¹)	(K _{cat} /K _m) / [×10 ⁻³ mmol/(L·s)]	Ref
PaPAM	0.0199	0.220	11.20	This work
SmPAM	0.0220	0.159	7.19	[13]
TcPAM	0.0340	0.013	0.38	[17-18]

Pa, Sm, Tc are P. agglomerans, S. maritimus and T. chinensis, respectively.

2.4.6 β-苯丙氨酸的合成

向含有 50~250 mmol/L 底物 α-苯丙氨酸的 Tris 盐酸缓冲液中 (25 mmol/L, pH 9) 加入 10 U 的重组 PaPAM,于 30 °C 下催化 22 h 合成 β-苯丙氨酸,结果如图 8 所示。底物为 50 mmol/L 时,10 h 转化率达到 92.1%,浓度为 100 mmol/L 时,经过 22 h 反应转化率达到 92%,当底物浓度为 150 mmol/L 时,22 h 转化率为 65%左右,超过 150 mmol/L 时,转化率低于 60%。可能是产物的抑制作用导致转化率下降。所以,最适的底物浓度为 100 mmol/L。为验证是否存在产物抑制现象,向含有 100 mmol/L 底物 α-苯丙氨酸的溶液同时加入 100 mmol/L 的 β-苯丙氨酸,酶转化 22 h,测定底物 α-苯丙氨酸的转化率,底物 α-苯丙氨酸的转化仅为 40%左右,明显低于不添加 β-苯丙氨酸时的转化率,表明存在产物抑制现象。

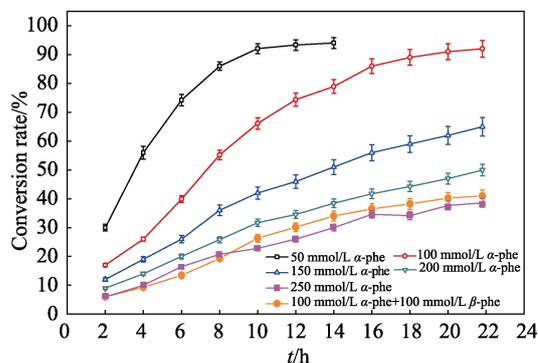


图 8 重组 PaPAM 催化底物 α-苯丙氨酸合成 β-苯丙氨酸的过程

Fig. 8 Synthesis of β-phenylalanine from α-phenylalanine catalyzed by the recombinant PaPAM

3 结论

成功构建了 PaPAM 的大肠杆菌表达载体 pET28a-pam,在 E.coli BL21 中实现了高效表达,采用亲和层析的方法成功制备出电泳纯的 PaPAM。重组 PaPAM 能够异构化 α-苯丙氨酸,催化生成 β-苯丙氨酸,在单因素分析基础上的最适反应条件下 (30 °C、pH 9、1.5 mol/L NH₄⁺),重组酶的活性达到 2.5 kU/g,重组酶具有较高的温度和 pH 稳定性,在最佳反应条件下,转化率达到 96%,来源于 P. agglomerans 的苯丙氨酸氨基变位酶具有较好的应用前景,为后续的进一步生产 β-苯丙氨酸奠定基础。

参考文献:

[1] Jin M, Fischbach M A, Clardy J. A biosynthetic gene cluster for the acetyl-CoA carboxylase inhibitor andrimid[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(33): 10660-10661.