

研究报告

对羟基扁桃酸合酶基因的克隆表达及催化特性

叶玉成^{1,2} 刘双平^{1,2} 张梁^{1,2} 丁重阳^{1,2} 石贵阳^{1,2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】比较两种不同来源基因重组的对羟基扁桃酸合酶(HmaS), 考察其在大肠杆菌中的表达效率。【方法】分别对东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)和天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)来源的 *hmas* 进行异源表达, 经离子交换层析和凝胶过滤色谱分离纯化获得 HmaS, 并检测 HmaS 的酶活和催化特性。【结果】来源于 *S. coelicolor* 的 HmaS_{SC2} 比酶活是来源于 *A. orientalis* 的 3.6 倍; 来源于 *A. orientalis* 的 HmaS_{AO} 最适反应温度为 28 °C, 在弱碱性条件下的酶活稳定性较好; 来源于 *S. coelicolor* 的 HmaS_{SC2} 最适反应温度为 35 °C, 在 28–45 °C 内保持较高的酶活, 具有良好耐热性, 在 pH 7.0 左右酶活最高, 更易在偏中性的条件下发挥功能。【结论】HmaS_{SC2} 更适用于代谢工程改造大肠杆菌发酵法生产扁桃酸。

关键词: 对羟基扁桃酸合酶, *hmas*, 东方拟无枝酸, 天蓝色链霉菌

Cloning, expression and catalytic characterization of hydroxymandelate synthase

YE Yu-Cheng^{1,2} LIU Shuang-Ping^{1,2} ZHANG Liang^{1,2} DING Zhong-Yang^{1,2}
SHI Gui-Yang^{1,2*}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To investigate the characters of hydroxymandelate synthase (HmaS) gene in *Escherichia coli*, the activities of HmaS encoded by *hmas* isolated from *Amycolatopsis orientalis* and *Streptomyces coelicolor* were compared. [Methods] The coding sequences of *hmas* were respectively amplified from the genomic DNAs of *A. orientalis* and *S. coelicolor* and were heterologous expressed in *E. coli*. The expressing proteins were isolated and purified by anion exchange chromatography and gel filtration chromatography, then the enzymatic activity and catalytic properties of HmaS were evaluated. [Results] The activity of HmaS_{SC2} from *S. coelicolor* was almost 3.6 times as

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021201); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(No. NCET-11-0665); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(No. PADP); 江苏省 2012 年度普通高校研究生科研创新计划项目(No. CXLX12_0733); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. JUDCF12016)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918229; 信箱: gyshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-02-26; 接受日期: 2013-04-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

of *A. orientalis*. The optimum reaction temperature of HmaS_{AO} is 28 °C with high storage stability in weak alkaline condition. HmaS_{SC2} has the optimum reaction temperature of 35 °C and maintains high activity between 28 °C and 45 °C. HmaS_{SC2} functions well under neutral conditions. **[Conclusion]** The characters of HmaS_{SC2} from *S. coelicolor* is more suitable for metabolic engineering of *E. coli* to produce mandelic acid.

Keywords: Hydroxymandelate synthase, *hmas*, *Amycolatopsis orientalis*, *Streptomyces coelicolor*

扁桃酸, 是一种重要的医药和染料中间体, 是合成头孢类抗生素、血管扩张药环扁桃酸酯和尿路消毒剂扁桃酸乌洛托品的重要原材料^[1], 在生物和化学合成中有着广泛的应用。传统上主要以氰化钠为原料采用苯甲醛法生产扁桃酸, 但环境污染严重、成本高^[2]。近年来, 国内外开始尝试利用发酵法生产扁桃酸, 有研究^[3]在已有的苯丙氨酸合成途径的基础上引入对羟基扁桃酸合酶(Hydroxymandelate synthase, HmaS)基因实现了发酵法生产扁桃酸, 但由于对羟基扁桃酸合酶酶活较低, 扁桃酸的产量只有 0.092 g/L, 限制了由苯丙酮酸向扁桃酸的转化。寻找具有高催化活性的对羟基扁桃酸合酶成为提高扁桃酸发酵强度的先决条件。

对羟基扁桃酸合酶是由 *hmas* 编码的 Fe²⁺ 依赖型双加氧酶, 能催化苯丙酮酸反应生成扁桃酸, 该酶不属于 α -酮酸依赖型加氧酶(α KAO)家族成员^[4], 与一般的氧化还原酶不同, 该反应脱去支链中一个碳原子, 反应相对困难, 只在少数放线菌中被发现^[4]。通常 α -酮酸依赖型加氧酶催化需要 3 种底物: α -酮戊二酸盐(α KG)、分子氧和专一性底物, 而对羟基扁桃酸合酶的特殊之处在于催化反应仅需 2 个底物, 对羟基苯丙酮酸或苯丙酮酸和分子氧, 并不需要 α -酮戊二酸盐(α KG), α -酮酸是由有机物取代基的丙酮酸配基提供, 最后被羟基化^[4-9]。与其它所有已知的羟基苯丙酮酸双加氧酶相比, HmaS 的脱羧和羟基化反应显示该酶具有新颖独特的区域选择性, 将底物的苄基位点羟基化, 而不是苯基环, 并伴随着乙酸侧链迁移^[10]。对此酶的研究不仅能够促进扁桃酸及其衍生物的发酵

法生产^[3,11], 对于其反应特性的研究也具有重要意义^[9]。目前, 国内外尚未有对羟基扁桃酸合酶基因的深入研究报告, 本研究对东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)和天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)来源的 *hmas* 进行了比较, 以获得具有应用价值的 HmaS。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

放线菌 *Amycolatopsis orientalis* subsp. *orientalis* ATCC 19795、*Streptomyces coelicolor* ATCC 23899 为 *hmas* 来源菌株, pMD18-T Simple Vector 购自 TaKaRa, *E. coli* str. K-12 substr. JM109、*E. coli* BL21(DE3)和 pET-28a(+)购自 Invitrogen。

1.2 方法

1.2.1 *hmas* 的克隆: 东方拟无枝酸菌(*A. orientalis*)、天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)基因组 DNA 的提取按分子克隆实验指南操作^[12]进行。根据 NCBI 公布的基因序列信息设计引物(表 1), 以 *A. orientalis* 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1 和 P2 扩增 *hmas*_{AO}; 以 *S. coelicolor* 基因组 DNA 为模板, 分别用引物 P3、P5 和 P4、P5 扩增两段 *hmas*_{SC1} 和 *hmas*_{SC2} (*hmas*_{SC1} 来源于 NCBI 中标注的基因序列, 序列号 NC_003888.3, *hmas*_{SC2} 来源于文献[12]报道的序列)。将 PCR 产物进行纯化, 分别与 pMD18-T Simple Vector 连接, 并进行酶切和电泳, 构建重组载体 T-HmaS_{AO}、T-HmaS_{SC1}、T-HmaS_{SC2}, 并通过上海生工测序, 之后采用酶切连接的方法, 与含有互补末端的 pET-28a(+)连接, 构建重组质粒 pETHmaS、pETHmaS1 和 pETHmaS2, 并分别转入 *E. coli* BL21(DE3)中。

表 1 本课题研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5' 3')	Restriction sites
P1	TCCCCCGGGGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAG CGGATAACAATTAAGGAGGAACAGACATGCAGAATTTCTGA	<i>Sma</i> I
P2	CCCCAAGCTTGGGTTATTAAACCCATGGGTCATCGACGGGCGGGGCCGAGCT	<i>Hind</i>
P3	TTCCCTAGTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGCTCCCTCC TTTCCCCTT	<i>Xba</i> I
P4	TTCCCTAGTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGCCGCCAG TGACATCGC	<i>Xba</i> I
P5	TCCCTAGCCCCAAGCTTATCGGCCGGCCACTTCC	<i>Hind</i>

注：下划线为限制性酶切位点。

Note: Restriction sites are underlined.

1.2.2 重组菌的诱导表达及功能验证：将重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS、*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1 和 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2 及空白对照 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) 接种到含 30 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜后，按 2% 接种量转接到含卡那霉素 30 mg/L 的 TB 培养基中，37 °C、200 r/min 培养，分别在 OD_{600} 约为 0.6 时，添加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 转到 25 °C、150 r/min 条件下诱导 12 h 后收集菌体，用 200 mmol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，再用磷酸盐缓冲液重悬菌体到相同 OD，冰浴超声波破碎 5 min。细胞破碎液于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min，离心后上清液即为粗酶液，以 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) 细胞破碎上清液作空白对照。

1.2.3 酶活力的测定：参照文献[3,12]方法，反应体系如下：5 mL 反应混合物中含 200 mmol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液，5 mmol/L 苯丙酮酸，44 mmol/L 抗坏血酸，0.3 mmol/L FeSO₄ 和 3 mL 酶液，在 28 °C 条件下反应 10 min。500 μ L 样品中加入 100 μ L 1 mol/L HCl 终止反应，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，用 HPLC 检测产物中扁桃酸的含量。HPLC 检测条件为流动相：0.01 mol/L 稀硫酸，流速：0.8 mL/min，柱温：50 °C，糖柱 (SUGAR, SH1011)，紫外检测器 (UVD170U)。在上述反应条件下，每分钟形成 1 nmol 扁桃酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.2.4 重组对羟基扁桃酸合酶的分离纯化：取一定体积的粗酶液，用 0.22 μ m 滤膜过滤，通过离子交换柱 (HiPrep 16/10 DEAE FF)，用含不同浓度 NaCl 的磷酸盐缓冲液洗脱，用 SDS-PAGE 鉴定纯度，并将有较高活性的组分经超滤膜 (截留量 30 kD) 脱盐浓缩，用凝胶柱 (Sephadex G-75) 进行纯化，流速 0.5 mL/min，收集各洗脱峰，鉴定纯度，测定各步纯化所得酶液活力及蛋白含量 (Bradford 法^[13]测蛋白浓度)，并计算其比酶活。

1.2.5 重组对羟基扁桃酸合酶的催化性质分析：将酶液分别在 25–90 °C 条件下反应 10 min，测定残余活性 (以最高的酶活力为 100%)，分析两种酶的最适催化温度；酶液在不同的温度 (28–50 °C) 保温不同时间后，分别在最适反应温度下测定其残存活性 (以未保温在最适温度下测得的酶活力为 100%)，分析两种酶的热稳定性。

配制不同 pH 5.5–8.5 的重组对羟基扁桃酸合酶酶液，37 °C 恒温放置，定时取样，分别在最适反应温度下测定残余酶活，以 pH 7.5 的酶液初始酶活为 100%，分析两种酶的 pH 稳定性。

2 结果与分析

2.1 hmas 的克隆

以东方拟无枝酸菌 (*A. orientalis*)、天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) 的基因组 DNA 为模板，扩增得到 3 段 PCR 产物，分别约为 1 154、1 179、1 140 bp

(图 1), 与 GenBank 报道的大小一致。

重组质粒 pETHmaS 用 *Pst* I/*Hind* III 双酶切得到大小约为 5 632 bp 和 863 bp 两条带(图 1A)。重组质粒 pETHmaS1 用 *Xba* I/*Hind* III 双酶切得到大小约为 5 207 bp 和 1 155 bp 两条带(图 1B), 重组质粒 pETHmaS2 用 *Xba* I/*Hind* III 双酶切得到大小约为 5 207 bp 和 1 116 bp 两条带(图 1C), 说明各质粒均构建正确, 可用于后续研究。

2.2 重组菌的诱导表达及功能验证

重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS、*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1 和 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2 与空白对照 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)经 IPTG 诱导表达后, 测定胞内酶活(表 2), 发现 3 株重组菌细胞破碎上清液中的粗酶活分别为 12.03、22.35 和 26.65 U/mg, 而在空白对照中

未检测到酶活, 同时在 SDS-PAGE 中发现 3 株重组菌在相应大小处均含有明显的变粗的目的条带(图 2), 说明各 *hmas* 均在 *E. coli* BL21(DE3)中成功表达。

2.3 重组对羟基扁桃酸合酶的分离纯化

将 3 种酶的粗酶液分别进行离子交换层析, 采用阶段梯度洗脱后, SDS-PAGE 纯度检验(图 2)发现还有少量杂蛋白, 之后采用凝胶过滤色谱进一步分离, 纯化过程的洗脱曲线如图 3 所示。SDS-PAGE 结果显示: 3 种酶液在 35–40 kD 之间均有一条明显较粗条带; 经分子筛过层析(Sephadex G-75 相对分子量分级范围为 1–80 kD)大约 38 kD 左右处都相应得到了较明显的单一条带, 且检测到较高酶活, 进一步说明外源基因在宿主菌中得到了正确的表达, 且经分离纯化得

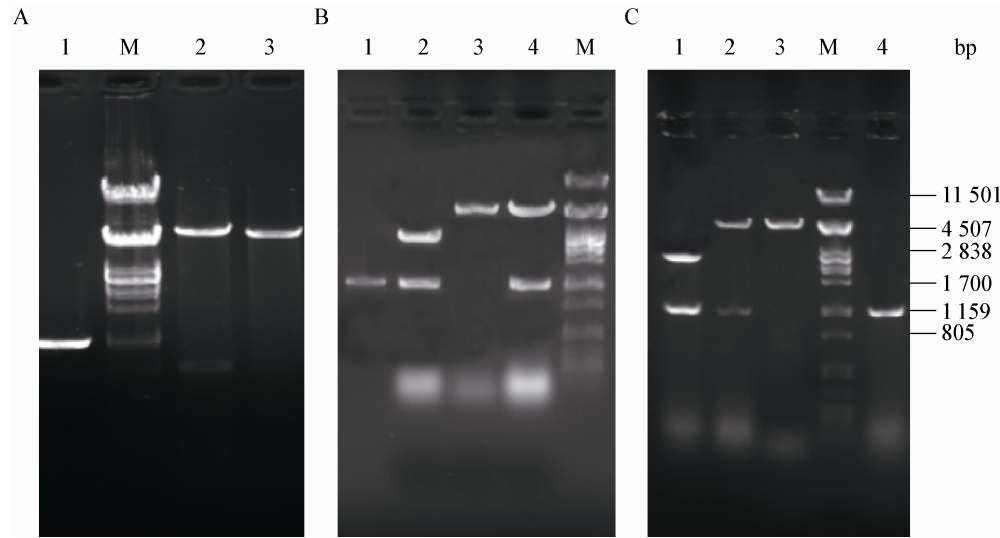


图 1 重组质粒酶切鉴定

Figure 1 Restriction analysis of recombinant plasmids

注: A: 1: *hmas*_{AO} 的 PCR 产物; 2: pETHmaS *Pst* I/*Hind* III 双酶切; 3: pET-28a(+) *Eco*R I/*Hind* III 双酶切; M: λ /*Pst* I DNA marker. B: 1: *hmas*_{SC1} 的 PCR 产物; 2: T-HmaS_{SC1} *Xba* I/*Hind* III 双酶切; 3: pET-28a(+) *Xba* I/*Hind* III 双酶切; 4: pETHmaS1 *Xba* I/*Hind* III 双酶切. C: 1: T-HmaS_{SC2} *Xba* I/*Hind* III 双酶切; 2: pETHmaS2 *Xba* I/*Hind* III 双酶切; 3: pET-28a(+) *Xba* I/*Hind* III 双酶切; 4: *hmas*_{SC2} 的 PCR 产物。

Note: A: 1: PCR product of *hmas*_{AO}; 2: Recombinant plasmid pETHmaS digested by *Pst* I and *Hind* III; 3: Plasmid pET-28a(+) digested by *Eco*R I and *Hind* III; M: λ /*Pst* I DNA marker. B: 1: PCR product of *hmas*_{SC1}; 2: Recombinant plasmid T-HmaS_{SC1} digested by *Xba* I and *Hind* III; 3: Plasmid pET-28a(+) digested by *Xba* I and *Hind* III; 4: Recombinant plasmid pETHmaS1 digested by *Xba* I and *Hind* III. C: 1: Recombinant plasmid T-HmaS_{SC2} digested by *Xba* I and *Hind* III; 2: Recombinant plasmid pETHmaS2 digested by *Xba* I and *Hind* III; 3: Plasmid pET-28a(+) digested by *Xba* I and *Hind* III; 4: PCR product of *hmas*_{SC2}.

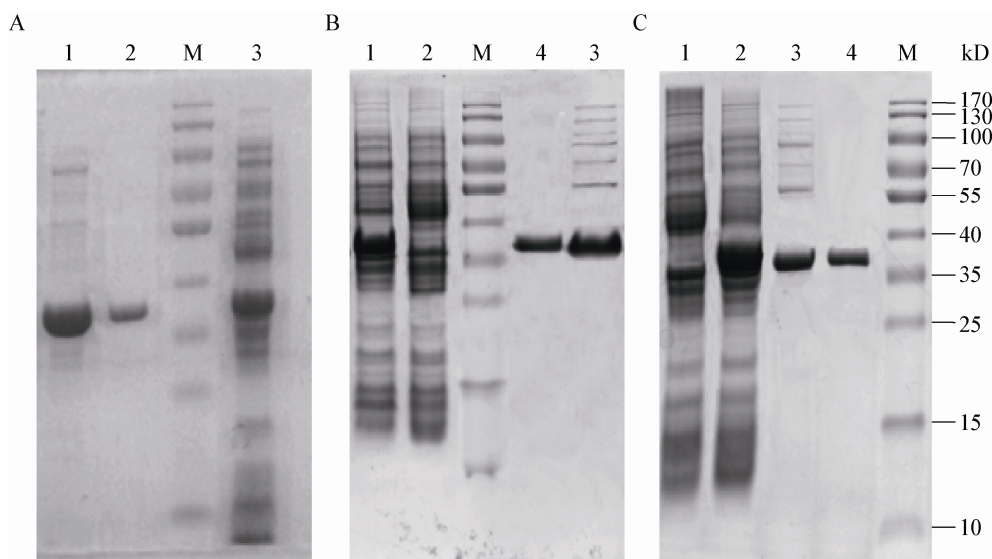


图2 重组菌粗酶液纯化前后 SDS-PAGE 鉴定

Figure 2 SDS-PAGE analysis of purification of crude enzyme solution

注：A：重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS. 1：DEAE 洗脱峰；2：Sephadex G-75 洗脱峰；3：*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS 粗酶液；M：Protein marker. B：重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2. 1：*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2 粗酶液；2：*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)细胞破碎上清液；3：DEAE 洗脱峰；4：Sephadex G-75 洗脱峰. C：重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1. 1：*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)细胞破碎上清液；2：*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1 粗酶液；3：DEAE 洗脱峰；4：Sephadex G-75 洗脱峰.

Note: A: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS. 1: HiPrep 16/10 DEAE FF elution peak; 2: Sephadex G-75 elution peak; 3: Crude enzyme solution of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS; M: Protein marker. B: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2. 1: Crude enzyme solution of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2; 2: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+); 3: HiPrep 16/10 DEAE FF elution peak; 4: Sephadex G-75 elution peak. C: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1. 1: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+); 2: Crude enzyme solution of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1; 3: HiPrep 16/10 DEAE FF elution peak; 4: Sephadex G-75 elution peak.

到了纯的目的蛋白。纯化过程中的总蛋白、比酶活和蛋白收率的变化如表 2 所示，重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS、*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1 和 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2 表达的 HmaS 的比酶活分别提高了 12.79、22.61、20.91 倍。

重组质粒 pETHmaS、pETHmaS1、pETHmaS2 所表达的蛋白 HmaS 的比酶活差异显著，由高到低的顺序为 HmaS_{SC2}>HmaS_{SC1}>HmaS_{AO}，来源于 *S. coelicolor* 的对羟基扁桃酸合酶的比酶活是来源于 *A. orientalis* 的 3.6 倍，这与扁桃酸下游代谢途径中 *S. coelicolor* 内部的 *hmo* 表达产生的对羟基扁桃酸氧化酶(Hmo)的酶活高于来源于 *A. orientalis* 的 Hmo 的结果是一致的^[11]。有研究报道称大肠杆菌表达的 *S. coelicolor* 的 HmaS 粗酶液酶活性低于

A. orientalis^[11]，然而本研究中报道的是纯酶酶活，与已有研究并不矛盾。

来自 *S. coelicolor* 的 *hmaS*_{SC1} 和 *hmaS*_{SC2} 的测序结果经比对，*hmaS*_{SC2} 的起始密码 ATG 上游缺少 39 个碱基，其基因序列 96.42%是一致的，*hmaS*_{SC2} 表达目的蛋白 HmaS_{SC2} 的比酶活略高于 *hmaS*_{SC1} 所表达的酶蛋白 HmaS_{SC1}，说明 *hmaS*_{SC1} 上游序列所编码的 13 个氨基酸对酶活的发挥并不是必需的，*hmaS*_{SC2} 序列具有更好的效果，后续研究中采用 *hmaS*_{SC2} 做进一步实验。

2.4 重组对羟基扁桃酸合酶的催化性质分析

2.4.1 重组对羟基扁桃酸合酶最适反应温度：不同反应温度对对羟基扁桃酸合酶活力的影响如图 4A 和 B 所示，HmaS_{AO} 的最适反应温度为 28 °C，在

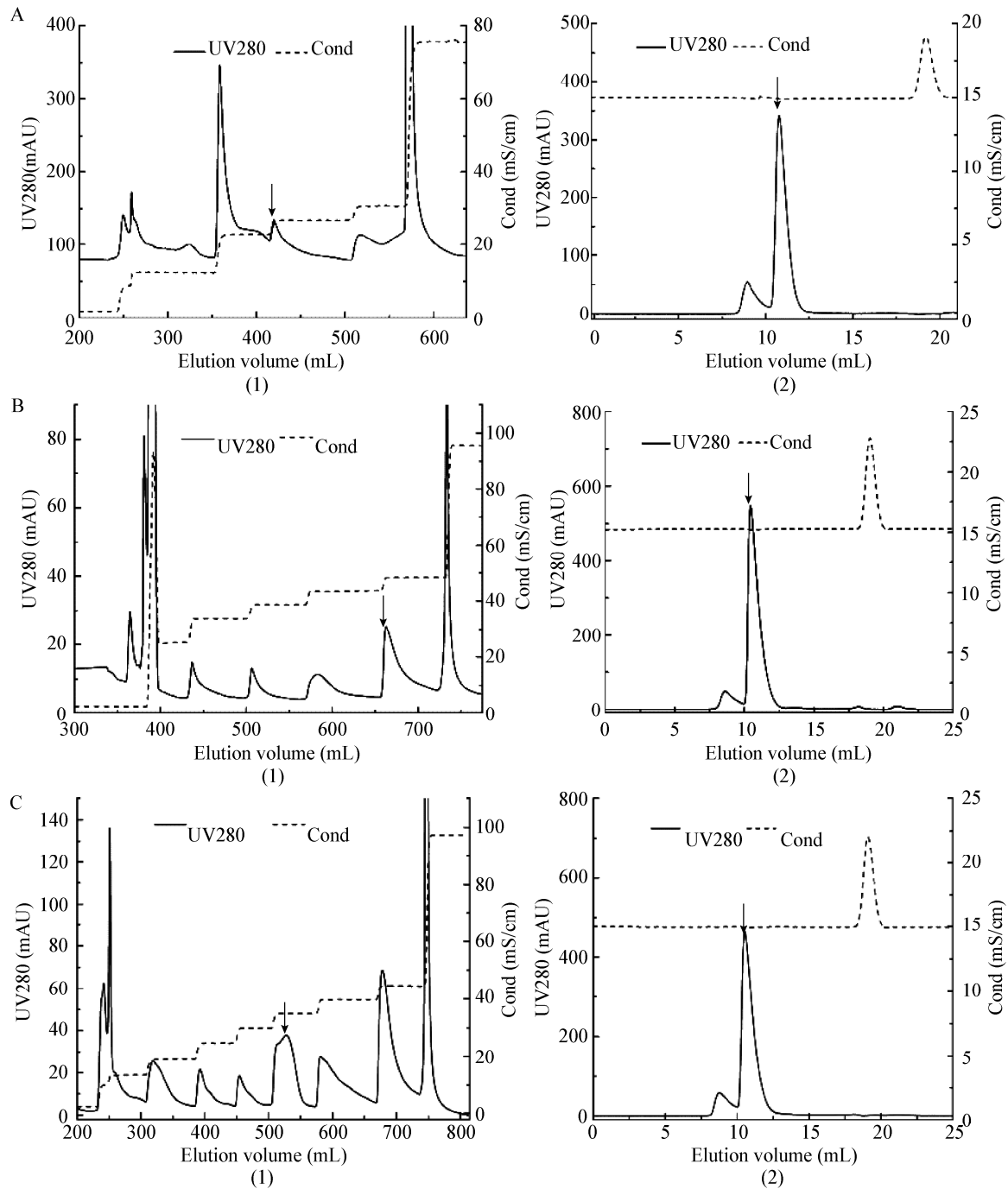


图3 HmaS 的分离纯化

Figure 3 The purification of HmaS

注：A：HmaSAO 的分离纯化；B：HmaSSC1 的分离纯化；C：HmaSSC2 的分离纯化。A(1)、B(1)、C(1)：HiPrep 16/10 DEAE FF 弱阴离子交换柱对重组对羟基扁桃酸合酶的分离纯化；A(2)、B(2)、C(2)：经 DEAE 纯化后的 HmaS 用 Sephadex G-75 进一步纯化；↓：目标蛋白峰。

Note: A: The purification of HmaSAO; B: The purification of HmaSSC1; C: The purification of HmaSSC2. A(1), B(1), C(1): Purification of HmaS by HiPrep 16/10 DEAE FF; A(2), B(2), C(2): Sephadex G-75 gel filtration purification of the collections in DEAE anion exchange chromatography; ↓: Target protein peak.

表 2 重组对羟基扁桃酸合酶纯化结果							
Table 2 Summary of hydroxymandelate synthase purification							
Purification steps		总酶活	总蛋白	比酶活	纯化倍数	蛋白收率	回收率
		Total activity (U)	Total protein (mg)	Special activity (U/mg)	Purification fold	Protein yield (%)	Recovery (%)
Crude enzyme	(1)	2677.12	222.56	12.03	1	1	1
	(2)	2632.75	117.79	22.35	1	1	1
	(3)	2693.91	101.10	26.65	1	1	1
HiPrep16/10 DEAE FF	(1)	1387.09	9.74	142.36	11.83	4.38	51.81
	(2)	1272.13	5.13	248.07	11.10	4.36	48.32
	(3)	1269.18	3.72	341.63	12.82	3.68	47.11
Sephadex G-75	(1)	868.19	5.64	153.91	12.79	2.53	32.43
	(2)	713.13	1.41	505.31	22.61	1.20	27.09
	(3)	713.28	1.28	557.25	20.91	1.27	26.48

注：(1)：HmaSAO 的分离纯化；(2)：HmaSC1 的分离纯化；(3)：HmaSC2 的分离纯化。
Note: (1): The purification of HmaSAO; (2): The purification of HmaSC1; (3): The purification of HmaSC2.

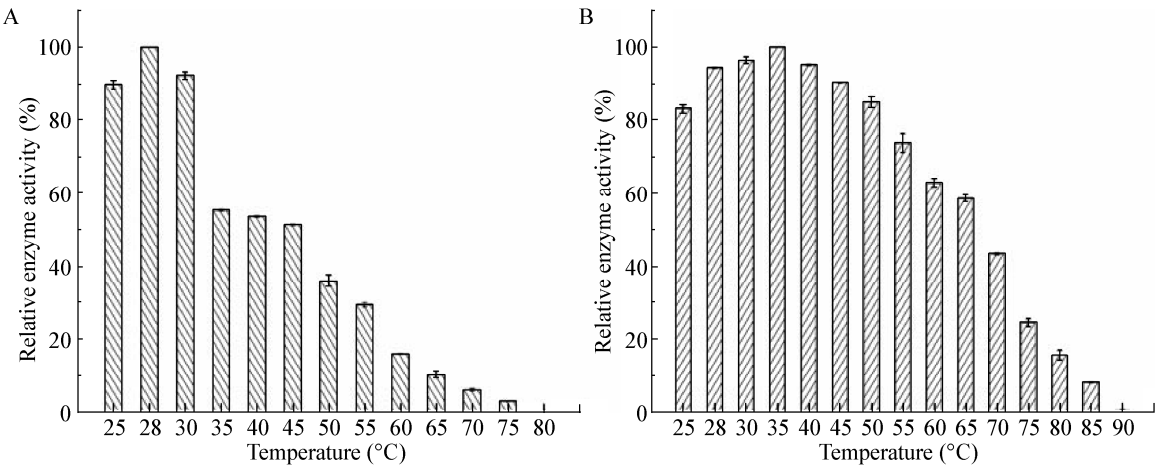


图 4 反应温度对对羟基扁桃酸合酶活力的影响

Figure 4 Effects of reaction temperature on enzyme activity

注：A：重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS；B：重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2。
Note: A: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS; B: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2.

25–80 °C 范围内，呈现先增加再逐渐下降的趋势，温度高于 28 °C 时，酶活力开始逐渐下降，温度高于 45 °C 时，酶活降到 28 °C 的一半，由于在大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌的发酵过程通常在 37 °C 时进行，较低的反应温度不利于产物的积累，这与已有报道采用 *A. orientalis* 的 HmaSAO 时产量较低的结果^[3]相一致。

HmaSC2 的最适反应温度为 35 °C，在 28–45 °C 保持了较高的酶活力(图 4)，更适用于大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌的发酵过程，且其纯酶酶活较高，更能有效积累扁桃酸。
2.4.2 重组对羟基扁桃酸合酶热稳定性：随着保温时间延长酶活力会逐渐下降(图 5)，在相同保温时间下，HmaSAO 和 HmaSC2 的重组对羟基扁桃酸合

酶相对残余活性从 28–50 °C 都呈现逐渐下降趋势,但在相同温度和保温时间条件下,HmaS_{SC2} 相对残余酶活性高于 HmaS_{AO},这也说明 HmaS_{SC2} 的热稳定性更强,作为代谢工程改造的基因来源更为适合。

2.4.3 重组对羟基扁桃酸合酶 pH 稳定性: 本实验考察了重组对羟基扁桃酸合酶在不同 pH 条件下的酶活稳定性, pH 7.5 的酶液初始酶活为 100% 作图

(图 6) HmaS_{AO} 在 pH 5.7–7.8 之间随着 pH 的升高,酶活稳定性逐渐增强,说明该酶在偏碱性的条件下更稳定,随着放置时间的延长,其相对酶活性逐渐下降。HmaS_{SC2} 在 pH 5.5–8.5 之间随着 pH 的升高,酶活先升高再下降,在 pH 7.0 左右酶活最高,其最适 pH 与胞内 pH 更为接近,说明该酶更适用于代谢工程改造。

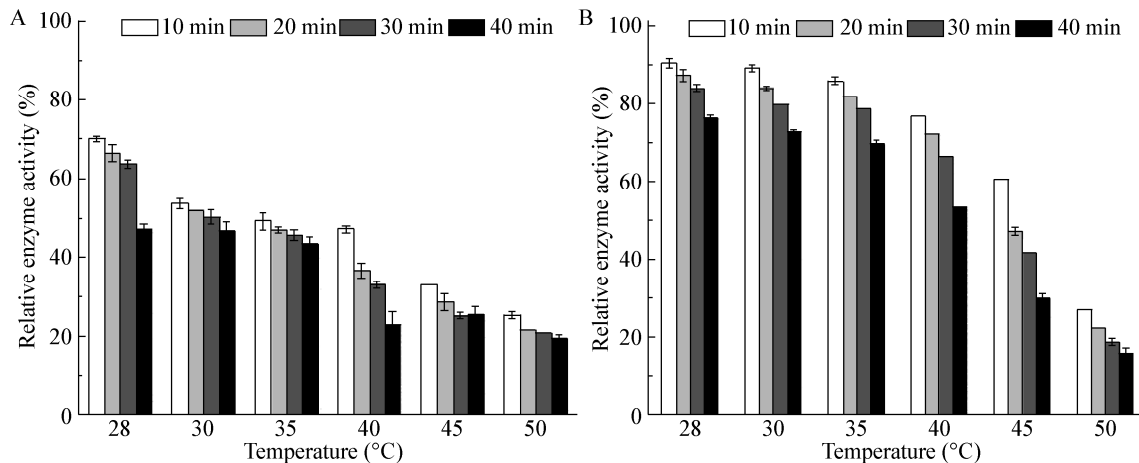


图 5 温度对酶稳定性的影响

Figure 5 Effects of temperature on the stability of HmaS

注: A: 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS; B: 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2.

Note: A: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS; B: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2.

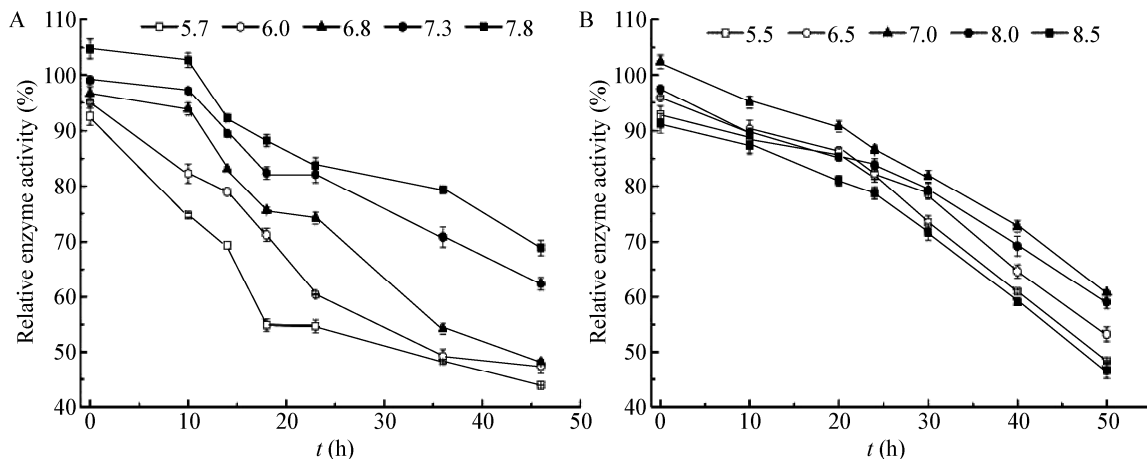


图 6 pH 对 HmaS 酶活稳定性的影响

Figure 6 Effects of pH on the activity and stability of HmaS

注: A: 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS; B: 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2.

Note: A: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS; B: Recombinant strain of *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2.

3 讨论

本实验中,成功地克隆 3 个对羟基扁桃酸合酶基因,分别构建了重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS、*E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS1 和 *E. coli* BL21(DE3)/pETHmaS2,经离子交换层析和凝胶色谱分离纯化测定其纯酶比酶活,发现来源于 *S. coelicolor* 的 *hmaS_{SC2}* 表达产生的重组蛋白 HmaS_{SC2} 酶活性是来源于 *A. orientalis* 的 3.6 倍, *hmaS_{SC2}* 表达目的蛋白 HmaS_{SC2} 的比酶活略高于 *hmaS_{SC1}* 所表达的蛋白 HmaS_{SC1}。来源于 *S. coelicolor* 的 HmaS_{SC2} 最适反应温度为 35 °C,在 28–45 °C 内保持较高的酶活,具有良好耐热性,在 pH 7.0 酶活最高,更易在中性的条件下发挥功能, HmaS_{SC2} 更适用于代谢工程改造大肠杆菌发酵法生产扁桃酸。由于目前国内外尚未有对羟基扁桃酸纯酶酶活的报道,根据对羟基扁桃酸粗酶活的比较,来源于 *S. coelicolor* 的 *hmaS_{SC2}* 表达产生的重组蛋白 HmaS_{SC2} 的酶活 26.65 U/mg 为目前报道中最高的,因此,选择具有较高酶活来源的基因更有利于提高其在大肠杆菌中的表达效率。

扁桃酸作为重要医药和精细化学中间体的双加氧酶而备受人们关注,对羟基扁桃酸合酶(HmaS)能够催化合成 S-扁桃酸,实现生物法制备手性扁桃酸^[3]。然而,现有报道中采用的对羟基扁桃酸合酶的酶活较低成为限制扁桃酸生物合成关键步骤,本研究通过 *hmas* 的异源过量表达和 HmaS 的酶学性质研究,筛选到 *S. coelicolor* 来源的 *hmaS_{SC2}*,其表达的蛋白具有较高比酶活、较好的热稳定性和最适 pH,为代谢工程改造大肠杆菌高效生产扁桃酸提供了参考。

参考文献

[1] Oda S, Inada Y, Kobayashi A, et al. Production of ethyl

- (R)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate via reduction of ethyl-2-oxo-4-phenylbutanoate in an interface bioreactor[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1998, 62(9): 1762-1767.
- [2] He XQ. Study on the synthesis of mandelic acid[J]. Guizhou Chemical Industry, 2007, 32(1): 11-12.
- [3] Sun ZT, Ning YY, Liu LX, et al. Metabolic engineering of the L-phenylalanine pathway in *Escherichia coli* for the production of S- or R-mandelic acid[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 71.
- [4] Brownlee J, He PQ, Moran GR, et al. Two roads diverged: the structure of hydroxymandelate synthase from *Amycolatopsis orientalis* in complex with 4-hydroxymandelate[J]. Biochemistry, 2008, 47(7): 2002-2013.
- [5] Hojati Z, Milne C, Harvey B, et al. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*[J]. Chemistry and Biology, 2002, 9(11): 1175-1187.
- [6] Muller I, Kahnert A, Pape T, et al. Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily[J]. Biochemistry, 2004, 43(11): 3075-3088.
- [7] Zhang ZH, Ren JS, Stammers DK, et al. Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase[J]. Nature Structural Biology, 2000, 7(2): 127-133.
- [8] Choroba OW, Williams DH, Spencer JB. Biosynthesis of the vancomycin group of antibiotics: involvement of an unusual dioxygenase in the pathway to (S)-4-hydroxyphenylglycine[J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122: 5389-5390.
- [9] He P, Conrad JA, Moran GR. The rate-limiting catalytic steps of hydroxymandelate synthase from *Amycolatopsis orientalis*[J]. Biochemistry, 2010, 49(9): 1998-2007.
- [10] Hubbard BK, Thomas MG, Walsh CT. Biosynthesis of L-p-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics[J]. Chemistry and Biology, 2000, 7(12): 931-942.
- [11] Muller U, van Assema F, Gunsior M, et al. Metabolic engineering of the *E. coli* L-phenylalanine pathway for the production of D-phenylglycine (D-Phg)[J]. Metabolic Engineering, 2006, 8(3): 196-208.
- [12] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学技术出版社, 1996: 69-338.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.