

研究报告

α -酮戊二酸依赖型双加氧酶催化特性及反应耦联辅因子对其催化羟基化反应的影响

文方¹ 聂尧^{1*} 穆晓清¹ 徐岩^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 食品生物技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘 要:【目的】以重组大肠杆菌表达的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) L-异亮氨酸双加氧酶(L-isoleucine dioxygenase, IDO)为研究对象, 考察其催化 L-异亮氨酸(L-Ile)羟基化反应的影响因素, 构建 IDO 催化合成羟基氨基酸的反应体系。【方法】通过 Ni-NTA 亲和层析法从重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21/pET28a-ido 中纯化获得重组 IDO, 以 L-Ile 为底物, 考察重组 IDO 催化羟基化反应的影响因素, 并进一步针对耦联反应优化 α -酮戊二酸(α -KG)在重组 IDO 酶促转化体系中的添加浓度。【结果】基于重组 IDO 催化 L-Ile 羟基化的活性测定, 计算该酶 K_m 为 0.247 mmol/L, k_{cat} 为 1.260 s⁻¹, k_{cat}/K_m 为 5.101 L/(mmol·s), 与其他同源酶动力学参数比较分析表明, 重组 IDO 的底物亲和性及催化效率较高。重组 IDO 催化反应的最适温度为 20 °C、最适 pH 为 7.0; 在 35 °C 以下较为稳定; 反应体系中 Fe²⁺最适浓度为 1 mmol/L。重组 IDO 可催化不同 L-氨基酸反应, 对 L-异亮氨酸、L-正亮氨酸、L-甲硫氨酸的活性较高。通过优化 α -KG 浓度, 反应体系中添加 30 mmol/L α -KG 时, 可将底物浓度提高至 70 mmol/L, 产物 4-羟基异亮氨酸(4-HIL)的摩尔产率达 66.20%, 表明 α -KG 作为反应耦联辅因子, 其浓度对重组 IDO 催化 L-Ile 羟基化具有显著影响。【结论】重组 IDO 的底物亲和性、催化效率、最适催化条件、稳定性等基本性质有利于催化 L-Ile 羟基化反应。在其催化反应体系中, α -KG 作为反应耦联辅因子, 对酶促转化效果影响显著。研究结果为 4-HIL 及其他羟基氨基酸的酶促转化提供了研究基础。

关键词: 双加氧酶, 异亮氨酸, 4-羟基异亮氨酸, 酶学特性, 羟基化反应

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2015AA021004, 2011AA02A209, 2011AA02A210); National Natural Science Foundation of China (No. 21376107, 21336009); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20151124); 111 Project (No. 111-2-06); Program for Advanced Talents within Six Industries of Jiangsu Province (No. 2015-NY-007); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85197760; Fax: 86-510-85918201; E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

Received: December 26, 2015; **Accepted:** April 26, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(No. 2015AA021004, 2011AA02A209, 2011AA02A210); 国家自然科学基金项目(No. 21376107, 21336009); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20151124); 高等学校学科创新引智计划项目(111 计划)(No. 111-2-06); 江苏省六大人才高峰计划项目(No. 2015-NY-007); 江苏高校优势学科建设工程项目

***通讯作者:** Tel: 86-510-85197760; Fax: 86-510-85918201; E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-12-26; **接受日期:** 2016-04-26; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-24

Characterization of α -ketoglutaric acid-dependent dioxygenase and the effect of reaction-coupled cofactor on dioxygenase-catalyzed hydroxylation

WEN Fang¹ NIE Yao^{1*} MU Xiao-Qing¹ XU Yan^{1,2}

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

(2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] In order to construct a biocatalytic system to synthesize 4-hydroxyl isoleucine (4-HIL), L-isoleucine (L-Ile) dioxygenase (IDO) from *Bacillus subtilis* expressed in recombinant *Escherichia coli* was purified and characterized. [Methods] The recombinant IDO was purified by Ni-NTA affinity chromatography from recombinant *Escherichia coli* BL21/pET28a-ido. The enzyme was characterized by using L-Ile as the substrate. As the necessary cofactor of IDO, the concentration of α -ketoglutaric acid (α -KG) in the enzymatic system was further optimized to improve the catalytic efficiency. [Results] Kinetic parameters of the enzyme were obtained as K_m 0.247 mmol/L, k_{cat} 1.260 s⁻¹, and k_{cat}/K_m 5.101 L/(mmol·s). Compared with other homologous enzymes, the recombinant IDO had higher substrate affinity and catalytic efficiency. The recombinant IDO was more active at 20 °C and pH 7.0, and more stable at the temperatures below 35 °C. The optimal concentration of Fe²⁺ was 1 mmol/L in the catalytic system. The recombinant IDO was active to a variety of L-amino acids, of which L-isoleucine, L-norleucine, and L-methionine were more suitable for the IDO catalyzing hydroxylation. By optimization of α -KG concentration in enzymatic catalysis, 4-HIL with the yield of 66.20% was achieved from 70 mmol/L L-Ile by adding 30 mmol/L α -KG in the reaction system. Thus, the addition of α -KG as the reaction-coupled cofactor had a significant impact on the reaction efficiency of recombinant IDO-mediated L-Ile hydroxylation. [Conclusion] This study provides the basis for enzymatic conversion of 4-HIL and other hydroxylated amino acids.

Keywords: Dioxygenase, Isoleucine, 4-Hydroxy isoleucine, Enzymatic characteristics, Hydroxylation

加氧酶能够催化氧原子与底物结合,属于氧化还原酶类,分为催化双原子氧与底物结合的双加氧酶和仅催化结合单原子氧的单加氧酶。加氧酶可催化多种有机化合物的氧化还原反应,与大部分化学催化剂相比,加氧酶通常具有较高的区域或对映选择性,广泛用于合成具有特定化学结构的手性化合物^[1-2]。

双加氧酶通过在氨基酸分子中引入羟基基团,催化氨基酸的羟基化反应,用于合成医药和化工领域的多种功能性化学品^[3-5]。其中,游离 L-氨基酸的羟基化主要由 Fe²⁺和 α -酮戊二酸(α -KG)依赖的细菌来源的双加氧酶催化。Kodera 等^[6]在苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)中发现了催化 L-异亮氨酸(L-Ile)生成 4-羟基异亮氨酸(4-HIL)的 L-异亮氨酸双加氧酶(IDO),并发现其胞内催化的羟基化反应

与 α -KG 的代谢相关。Smirnov 等^[7]将苏云金芽孢杆菌的 L-异亮氨酸双加氧酶基因(ido)克隆至大肠杆菌,研究了基因表达调控和 4-HIL 的生物合成。

IDO 依赖于辅因子 α -KG、Fe²⁺和抗坏血酸,在氧气参与的情况下催化 L-Ile 生成 4-HIL^[8-9]。其中,生成 4-HIL 的主反应与 α -KG 氧化脱羧生成琥珀酸的辅反应相耦联^[10]。此外,IDO 还可催化其他底物的氧化反应,例如,多种疏水性脂肪族 L-氨基酸的立体选择性羟基化、(2S,3R,4S)-HIL 脱氢生成 (2S,3R)-2-氨基-3-甲基-4-戊酸酮、含硫 L-氨基酸的磺化氧化作用等。IDO 广泛用于催化游离氨基酸的羟基化反应,在医药中间体、功能肽等的生物合成中具有重要作用,研究该类双加氧酶的催化特性具有一定的实际应用价值^[11-12]。

本文基于已有新型 IDO 及其重组大肠杆菌

BL21/pET28a-ido 表达菌株^[13], 在获得重组 IDO 的基础上, 考察该酶催化 L-Ile 羟基化基本特性和主要影响因素, 并进一步针对耦联反应优化 α -KG 在重组 IDO 酶促转化体系中的添加浓度, 为提高 4-HIL 的合成效率及其他羟基氨基酸的生物合成提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

重组大肠杆菌 BL21/pET28a-ido 由江南大学酿造微生物学及应用酶学研究室保藏。

1.2 主要试剂和仪器

标准品 L-异亮氨酸(L-Ile)、4-羟基-L-异亮氨酸(4-HIL)购自美国 Sigma 公司; 乙腈、甲醇购自阿达玛斯贝塔(上海)化学试剂有限公司; 其他试剂药品均为国产分析纯。液质联用仪 LCMS-2010A, 日本岛津公司; 高效液相色谱仪 2695, Waters 公司。

1.3 培养基

LB 液体培养基^[13], LB 固体培养基为液体培养基中加入 20 g/L 琼脂。培养基的灭菌条件: 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 重组 IDO 的诱导表达及分离纯化

挑取重组大肠杆菌 BL21/pET28a-ido 单菌落接种至 5 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 并以 1% 的接种量转接至 100 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 后加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 30 °C、200 r/min 诱导培养 12 h。

6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体并用生理盐水洗涤, 菌体重悬于 20 mmol/L、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 高压匀浆破碎后, 12 000 r/min 离心 30 min 收集上清。采用 Ni-NTA 亲和层析法对重组 IDO 分离纯化: 在 4 °C 条件下, 先后用 20 mL 乙醇和 40 mL 去离子水冲洗层析柱, 然后用 20 mL 的结合缓冲液(40 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris、0.3 mol/L NaCl, pH 7.5)平衡层析柱; 细胞破碎上清液经 0.22 μ m 滤

膜过滤后缓慢注入层析柱中, 先用洗脱缓冲液 1 (60 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris、0.3 mol/L NaCl, pH 7.5)洗下杂蛋白后, 利用洗脱缓冲液 2 (220 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris、0.3 mol/L NaCl, pH 7.5)洗脱目的蛋白; 目的蛋白洗脱液经脱盐柱和脱盐缓冲液(5 mmol/L DTT、10 mmol/L Tris、0.1 mol/L NaCl, pH 7.5)处理后, 通过 SDS-PAGE 检验蛋白纯化样品的纯度^[14]。

1.5 重组 IDO 的酶活和催化条件分析

重组 IDO 酶活测定体系: 10 mmol/L L-Ile, 0.5 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L 抗坏血酸, 10 mmol/L α -KG, 0.2 g/L 重组 IDO 纯酶, 50 mmol/L Bis-Tris 缓冲液(pH 6.0)。

1 个酶活力单位是指在 25 °C 条件下, 每分钟催化 L-Ile 羟基化反应生成 1 μ mol 产物 4-HIL 所需的酶量。酶活力测定条件为 25 °C 反应 10 min。

动力学参数的测定: 在酶活测定体系中底物 L-Ile 浓度梯度为 0.2–10 mmol/L, 其他条件不变, 分别测定不同底物浓度下重组 IDO 的酶活, 利用双倒数作图法(Lineweaver Burk)计算动力学参数 K_m 和 V_{\max} 。

分别在不同温度梯度(10–80 °C)和 pH 梯度(2.0–9.0)下测定重组 IDO 的酶活, 确定其催化的最适温度和最适 pH 值。

将重组 IDO 分别置于 15、25、35、45 °C 处理不同时间, 测定其热稳定性。

在反应体系中不同 Fe^{2+} 浓度(0、0.2、0.5、1.0、1.5 mmol/L)下测定重组 IDO 的酶活, 考察 Fe^{2+} 对重组 IDO 活性的影响。

在酶活测定体系中分别以 2 mmol/L L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸、L-亮氨酸、L-正亮氨酸、L-脯氨酸为底物, 通过测定重组 IDO 对不同底物的活性, 考察其底物特异性。通过液相色谱/电喷雾电离质谱(LC/ESI-MS)方法, 测定体系中不同羟基氨基酸的含量。利用装有色谱柱 TSK 凝胶酰胺-80HR 柱(4.6 mm \times 250 mm)的液质联用仪 LCMS-2010A, 于 40 °C 分析目标产物, 流动相为

1.5 mmol/L 乙酸铵(pH 5.0)溶于 85%乙腈, 流速 1.0 mL/min。MS 条件为: 离子源温度 200 °C, 去溶剂温度 250 °C 检测电压 1.5 kV 雾化气流 1.5 L/min。

在重组 IDO 催化 10 mmol/L L-Ile 羟基化反应的过程中, 反应不同时间后取样测定 4-HIL 的产量并计算摩尔产率, 考察重组 IDO 催化 L-Ile 羟基化的反应进程。

1.6 α -KG 浓度和底物浓度对重组 IDO 催化反应的影响

诱导表达的重组菌 6 000 r/min 离心 5 min 收集后用生理盐水洗涤 2 次, 菌体重悬于 50 mmol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液, 高压匀浆破碎后, 细胞破碎液于 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清作为粗酶液。粗酶浓度以破碎前细胞悬浮液中等质量的菌体浓度计。

重组 IDO 粗酶反应体系组成为: 粗酶浓度 10%, L-Ile 20 mmol/L, α -KG 20 mmol/L, 葡萄糖 30 mmol/L, 抗坏血酸 5 mmol/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%, KH_2PO_4 0.015%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, CaCl_2 0.5 mmol/L, 初始 pH 7.0。反应于 28 °C、200 r/min 振荡培养 12 h。基于上述基本反应体系组成, 在不同 α -KG 浓度(10–40 mmol/L)下测定 4-HIL 的产量和底物消耗量, 考察 α -KG 浓度对重组 IDO 粗酶催化反应的影响。在 30 mmol/L α -KG 浓度下, 考察底物 L-Ile 浓度(20–100 mmol/L)对重组 IDO 粗酶催化反应的影响。利用 F-kit 试剂盒(罗氏诊断产品有限公司)测定反应体系中琥珀酸的产量^[15]。

1.7 底物和产物的分析

1.7.1 衍生化反应: 反应液离心后, 取 250 μL 上清液转移至 5 mL 离心管中, 加入 250 μL 硼酸缓冲液(2 mol/L, pH 9.2), 再加入 500 μL 茚甲氧羰酰氯(Fmoc-Cl)溶液(0.01 mol/L, 溶于乙腈), 溶液混匀后静置, 于 25 °C 衍生反应 15 min。然后, 加入 500 μL 2-氨基金刚烷(ADAM)溶液(0.04 mol/L, 溶于乙腈与水体积比为 1:1 的溶液), 反应液经 0.22 μm 的有机膜过滤后用于 HPLC 检测。

1.7.2 HPLC 检测条件: Diomansil C_{18} 柱(250 mm \times

4.6 mm), 紫外检测波长 263 nm, 流动相 A 为 0.05 mol/L NaAc-HAc 缓冲液(pH 4.2), 流动相 B 为乙腈, 流动相 A 和流动相 B 采用 50:50 等度洗脱, 流速 1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 重组 IDO 的表达及纯化

重组大肠杆菌 BL21/pET28a-ido 中的重组 IDO 基因(ido)经 IPTG 诱导表达后, 通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化目的重组 IDO 蛋白。由纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析结果(图 1)可以看出, 纯化获得单一蛋白条带, 其分子量约为 29 kD, 与重组 IDO 的理论分子量 28.92 kD 一致。纯化获得重组 IDO 目的蛋白, 用于催化 L-Ile 羟基化的反应特性和影响因素研究。

2.2 重组 IDO 的催化特性分析

2.2.1 重组 IDO 的动力学参数分析: 测定不同 L-Ile 浓度下重组 IDO 的酶促反应速度, 计算其动力学参数, 结果如图 2 所示。在酶活测定条件下, 重组 IDO 催化 L-Ile 羟基化反应的 K_m 为 0.247 mmol/L、 V_{\max} 为 2.703 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 、 k_{cat} 为 1.260 s^{-1} 、 k_{cat}/K_m 为 5.101 L/(mmol \cdot s)。与已报道的来源于苏云金芽孢杆菌 2-e-2 的 IDO (BtIDo) [相同测定条件下, K_m

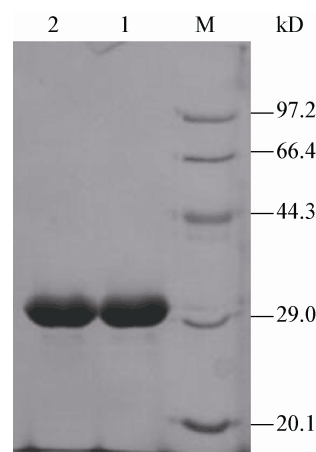


图 1 重组 IDO 纯化蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified recombinant IDO

注: M: Marker; 1–2: 重组 IDO 的纯化蛋白样品。

Note: M: Marker; 1–2: Purified recombinant IDO.

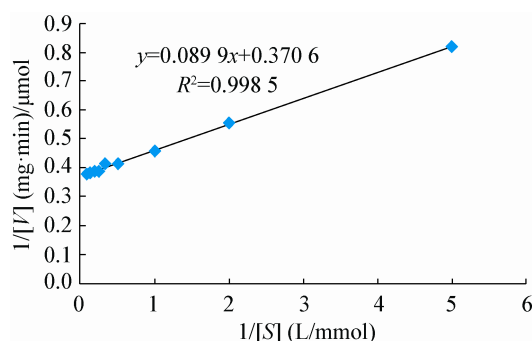


图2 测定重组IDO动力学参数的双倒数曲线

Figure 2 Double reciprocal curve for measuring kinetic parameters of recombinant IDO

为 0.27 mmol/L、 V_{\max} 为 1.13 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 、 k_{cat} 为 0.527 s^{-1} 、 k_{cat}/K_m 为 1.952 $\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$]相比^[15], 重组 IDO 的 K_m 值略低, 表明其与底物的亲和性略高于 BtIDO; 重组 IDO 的 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值较高, 说明该酶具有更高的催化活性和反应效率。

重组 IDO 与 BtIDO 的序列比较分析表明, 二者的基因序列同源性为 98%、氨基酸序列同源性为 99%。其中, 重组 IDO 第 4、36、130 位的氨基酸残基分别为天冬酰胺、精氨酸、苏氨酸, 而 BtIDO 中相应位点分别为丝氨酸、丝氨酸、赖氨酸, 二者氨基酸位点的组成差异与其底物亲和性和催化效率的差异存在一定的相关性。

2.2.2 重组 IDO 的最适反应温度和最适 pH 值: 分别考察温度和 pH 值对重组 IDO 催化活性的影响, 结果如图 3 和图 4 所示。在 10–30 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内, 重组 IDO 的相对酶活保持在 80% 以上, 并在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值; 在高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内, 重组 IDO 活性随温度升高而降低。在反应 pH 值的影响方面, 当 pH 值为 7.0 时, 重组 IDO 的活性达到最高; pH 值高于或低于 7.0 时, 重组 IDO 的活性均有所下降。

2.2.3 重组 IDO 的热稳定性: 在不同温度下处理重组 IDO 以考察其热稳定性, 结果如图 5 所示。重组 IDO 在 15、25、35 $^{\circ}\text{C}$ 下热稳定性较好, 酶活随着处理时间的延长缓慢下降, 保温处理 15 h, 相对酶活仍保持在 80% 以上; 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 其酶活随

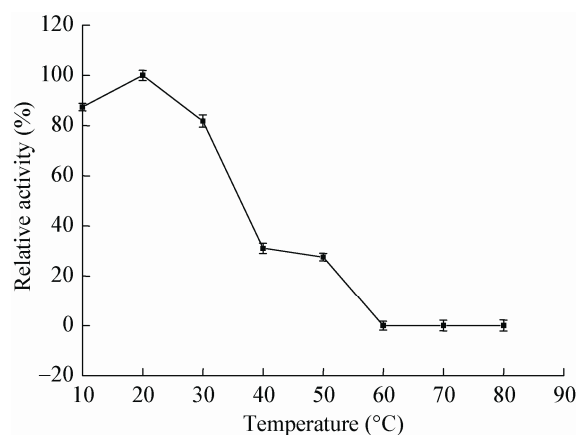


图3 温度对重组IDO活性的影响

Figure 3 Effect of temperature on the activity of recombinant IDO

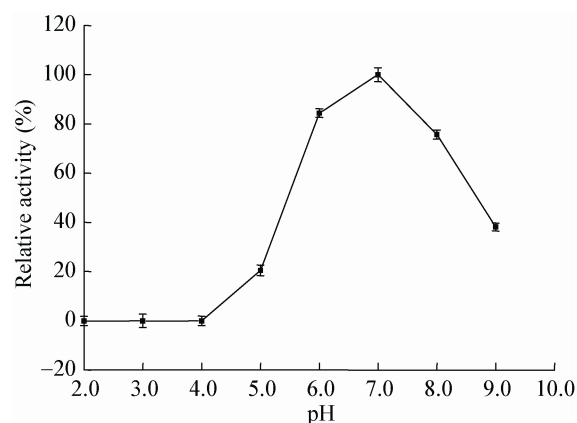


图4 pH对重组IDO活性的影响

Figure 4 Effect of pH on the activity of recombinant IDO

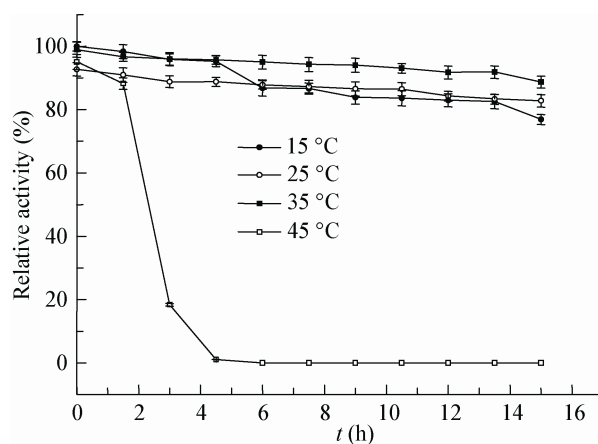


图5 重组IDO的热稳定性

Figure 5 Thermal stability of recombinant IDO

处理时间的延长下降明显。已报道的来源于苏云金芽孢杆菌 TCCC11826 的 IDO 与重组 IDO 具有相似的热稳定性趋势,而该酶在 25 °C 和 35 °C 下放置 8 h 酶活就已降低至 60%左右^[16]。二者微生物来源不同,其基因序列和氨基酸序列的同源性分别为 97%和 98%,相关氨基酸位点的酸碱性和带电性差异会影响其稳定性等酶学特性。上述结果表明,重组 IDO 在 35 °C 以下较为稳定,具有在常温条件下催化羟基化反应的潜力。

2.2.4 金属离子 Fe^{2+} 对重组 IDO 活性的影响: 金属离子 Fe^{2+} 为重组 IDO 的辅助因子,其金属中心可与底物发生作用,并对该酶活性及其催化羟基化反应有较大影响^[17]。由图 6 可知,随着 Fe^{2+} 浓度的增大,重组 IDO 的酶活逐渐增大,当 Fe^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时,重组 IDO 的酶活达到最大;之后随着 Fe^{2+} 浓度的增大,重组 IDO 的酶活有所下降。在双加氧酶催化羟基化反应过程中,活性 Fe^{2+} 结合 α -KG 形成八面配位体复合物, α -KG 氧化脱羧的同时, Fe^{2+} 生成高价氧化铁 $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]$ 并与底物作用发生羟基化反应,酶促体系中 Fe^{2+} 含量会对高价氧化铁的形成及反应体系的氧化性产生影响^[18]。

2.2.5 重组 IDO 的底物特异性: IDO 通常可催化不同氨基酸的羟基化反应^[4,15]。针对重组 IDO,以不同 L-氨基酸为底物,考察其催化氨基酸羟基化反应的底物特异性。如表 1 所示,重组 IDO 对多种 L-氨

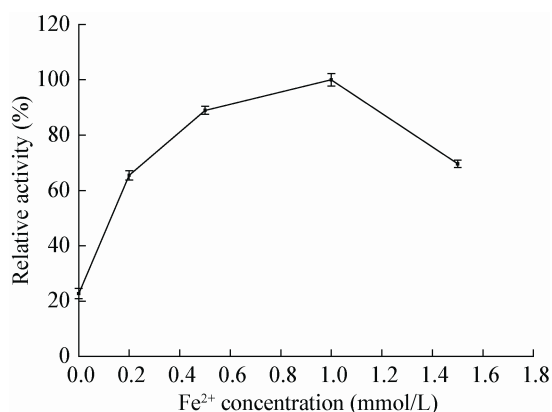


图 6 Fe^{2+} 浓度对重组 IDO 活性的影响

Figure 6 Effect of Fe^{2+} concentration on the activity of recombinant IDO

表 1 重组 IDO 的底物特异性
Table 1 Substrate specificity of recombinant IDO

| 底物 Substrate | 相对酶活 Relative activity (%) |
|---------------------|-------------------------------|
| L-异亮氨酸 L-isoleucine | 100.00 |
| L-甲硫氨酸 L-methionine | 74.80 |
| L-半胱氨酸 L-cysteine | 42.59 |
| L-亮氨酸 L-leucine | 10.65 |
| L-正亮氨酸 L-norleucine | 89.99 |
| L-脯氨酸 L-proline | 11.50 |

基酸均具有一定的催化能力。其中,该酶对 L-异亮氨酸的催化能力最强,相对酶活为 100%;此外,该酶对 L-正亮氨酸、L-甲硫氨酸也具有较强的催化活性。

2.2.6 重组 IDO 催化反应过程分析: 将重组 IDO 与底物 L-Ile 反应不同时间,测定 4-HIL 的产量并计算其摩尔产率,结果如图 7 所示。在 0.5–6 h 的反应阶段内,4-HIL 的摩尔产率快速上升;随着反应的进行,4-HIL 摩尔产率的上升趋势逐渐变缓,并在反应 12 h 左右达到稳定。该反应中,利用 0.2 g/L 的重组 IDO 纯酶催化 10 mmol/L 底物,反应 10 h 即可使 4-HIL 的摩尔产率增至 60%以上。

2.3 α -KG 浓度和底物浓度对重组 IDO 催化反应的影响

IDO 是一种 α -KG 依赖型双加氧酶,酶促羟基化反应与 α -KG 氧化脱羧反应相耦联,反应体系中 α -KG 的添加量对 IDO 的酶活及羟基氨基酸的合成有着显著的影响^[19]。针对重组 IDO 粗酶催化系统,考察 α -KG 浓度对 IDO 催化转化 4-HIL 反应效率的影响,结果如表 2 所示。当 α -KG 在 10–30 mmol/L 之间变化时,4-HIL 的产量由最初未添加 α -KG 时的 0.39 mmol/L 提高至 15.36 mmol/L 左右,其中 α -KG 为 30 mmol/L 时,副产物琥珀酸含量为 10.32 mmol/L;随着 α -KG 浓度的进一步提高 4-HIL 的产量及 L-Ile 的消耗急速降低,当 α -KG 增至 35 mmol/L 时,副产物琥珀酸含量仍相对较高,为 10.57 mmol/L。结果表明, α -KG 氧化脱羧生成琥珀酸的反应与 L-Ile 羟基化反应相耦联,反应体系中高浓度 α -KG 会抑

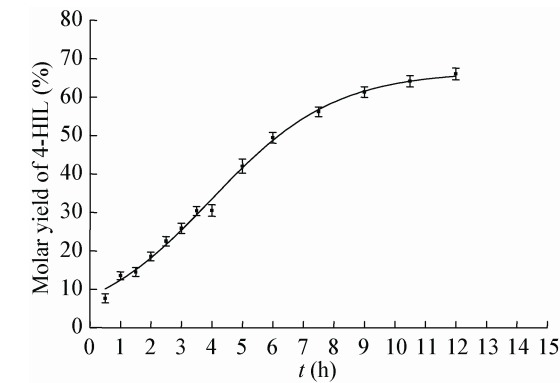


图 7 重组 IDO 纯酶催化 L-Ile 羟基化的反应时间曲线
Figure 7 Reaction process of L-Ile hydroxylation catalyzed by recombinant IDO

| 表 2 重组 IDO 粗酶催化体系中 α -KG 浓度对 L-Ile 羟基化反应的影响 | | | |
|--|---|--|---|
| Table 2 Effect of α -KG concentration on L-Ile hydroxylation by crude recombinant IDO | | | |
| α -KG 浓度 Concentration of α -KG (mmol/L) | L-Ile 消耗率 Consumption rate of L-Ile (%) | 4-HIL 产量 Yield of 4-HIL (mmol/L) | 4-HIL 摩尔产率 Molar yield of 4-HIL (%) |
| 10 | 100.00 | 15.02 | 75.08 |
| 20 | 100.00 | 15.36 | 76.78 |
| 25 | 100.00 | 15.36 | 76.78 |
| 30 | 98.43 | 14.20 | 71.01 |
| 35 | 23.86 | 0.54 | 2.72 |
| 40 | 22.66 | 0.54 | 2.72 |

制 IDO 催化的羟基化耦联反应，导致 α -KG 趋向于细胞裂解液的粗酶体系中其他生成琥珀酸的途径^[11]，而琥珀酸作为羟基化反应的副产物，其积累不利于目标产物 4-HIL 的合成。因此，该酶促反应中，20–30 mmol/L 的 α -KG 较有利于反应的进行。

基于 α -KG 浓度对重组 IDO 催化反应的影响，在较优 α -KG 浓度(30 mmol/L)条件下，进一步考察底物 L-Ile 浓度对反应效果的影响(表 3)。在重组 IDO 粗酶催化体系中，当 L-Ile 为 40 mmol/L，4-HIL 摩尔产率最高为 82.05%；当底物浓度提高至 70 mmol/L 时，4-HIL 产量为 46.34 mmol/L、摩尔产率达到 66.20%。与 IDO 重组菌催化羟基化反应的前期研究结果(α -KG 浓度 10 mmol/L，底物浓度 10 mmol/L，4-HIL 摩尔产率 60%左右)相比^[13]，

| 表 3 重组 IDO 粗酶催化体系中底物浓度对 L-Ile 羟基化反应的影响 | | | |
|---|---|--|---|
| Table 3 Effect of substrate concentration on L-Ile hydroxylation by crude recombinant IDO | | | |
| L-Ile 浓度 Concentration of L-Ile (mmol/L) | L-Ile 消耗率 Consumption rate of L-Ile (%) | 4-HIL 产量 Yield of 4-HIL (mmol/L) | 4-HIL 摩尔产率 Molar yield of 4-HIL (%) |
| 20 | 100.00 | 7.07 | 47.56 |
| 40 | 100.00 | 32.82 | 82.05 |
| 60 | 92.39 | 44.37 | 73.95 |
| 70 | 81.79 | 46.34 | 66.20 |
| 80 | 74.47 | 45.66 | 57.08 |
| 100 | 69.97 | 48.79 | 48.79 |

该酶促反应的底物浓度为重组菌催化体系的 7 倍，且 4-HIL 摩尔产率保持在 66%以上。因此，重组 IDO 粗酶催化体系有利于提高反应效果，针对该反应过程，反应耦联必需的辅因子对于反应效果具有显著影响，通过在反应体系中添加 30 mmol/L 的 α -KG，底物浓度可提高至 70 mmol/L，为进一步的反应体系调控和过程强化提供研究基础。

3 结论

4-HIL 具有促进胰岛素分泌、治疗 II 型糖尿病的特性，而目前的生产工艺复杂、分离纯化较难，使得应用异亮氨酸双加氧酶生产合成 4-HIL 受到越来越多的关注。该研究从重组大肠杆菌 BL21/pET28a-ido 出发，以 L-Ile 为底物，通过对纯化得到的重组 IDO 进行酶学特性分析，为 4-HIL 的高效生物合成提供研究基础。该重组 IDO 的催化性质有利于其催化 L-Ile 选择性羟基化反应的进行。而且，该酶对于多种 L-氨基酸底物具有活性，为合成其他重要羟基氨基酸提供前提条件。在重组 IDO 的催化反应体系中， α -KG 作为反应耦联辅因子，对转化效果影响显著。研究结果不仅为 4-HIL 的酶促转化提供理论和实际应用基础，同时为其它羟基氨基酸的生物转化提供借鉴，促进酶促氨基酸羟基化共性反应体系的建立。

参 考 文 献

[1] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis

- today and tomorrow[J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 258-268
- [2] Liu JH, Wu XF, Li FM, et al. Recent progress in oxygenase-catalyzed biotransformations[J]. *Chemical Production and Technology*, 2006, 13(4): 36-39 (in Chinese)
刘均洪, 吴小飞, 李凤梅, 等. 加氧酶催化生物转化研究最新进展[J]. *化工生产与技术*, 2006, 13(4): 36-39
- [3] Wang Q, Ouazzani J, Sasaki NA, et al. A practical synthesis of (2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine, a potent insulinotropic α -amino acid from fenugreek[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, 2002(5): 834-839
- [4] Smirnov SV, Sokolov PM, Kodera T, et al. A novel family of bacterial dioxygenases that catalyse the hydroxylation of free L-amino acids[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 331(2): 97-104
- [5] Aouadi K, Jeanneau E, Msaddek M, et al. 1,3-Dipolar cycloaddition of a chiral nitron to (*E*)-1,4-dichloro-2-butene: a new efficient synthesis of (2*S*,3*S*,4*R*)-4-hydroxyisoleucine[J]. *Tetrahedron Letters*, 2012, 53(23): 2817-2821
- [6] Kodera T, Smirnov SV, Samsonova NN, et al. A novel L-isoleucine hydroxylating enzyme, L-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390(3): 506-510
- [7] Smirnov SV, Kodera T, Samsonova NN, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(3): 719-726
- [8] Haefel  C, Bonfils C, Sauvaire Y. Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis[J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(4): 563-566
- [9] Fowden L, Pratt HM, Smith A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*[J]. *Phytochemistry*, 1973, 12(7): 1707-1711
- [10] Hausinger RP. Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 39(1): 21-68
- [11] Ogawa J, Kodera T, Smirnov SV, et al. A novel L-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2*S*,3*R*,4*S*)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(6): 1929-1938
- [12] Smirnov SV, Samsonova NN, Novikova AE, et al. A novel strategy for enzymatic synthesis of 4-hydroxyisoleucine: identification of an enzyme possessing HMKP (4-hydroxy-3-methyl-2-keto-pentanoate) aldolase activity[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 273(1): 70-77
- [13] Fu MJ, Nie Y, Mu XQ, et al. A novel isoleucine dioxygenase and its expression in recombinant *Escherichia coli* for synthesis of 4-hydroxyisoleucine[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014, 33(11): 3037-3044 (in Chinese)
付敏杰, 聂尧, 穆晓清, 等. 新型异亮氨酸双加氧酶及其重组大肠杆菌合成羟基异亮氨酸[J]. *化工进展*, 2014, 33(11): 3037-3044
- [14] Qiao YY, Fan DD, Deng JJ, et al. The purification of recombinant human-like collagen by Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography[J]. *Highlights of Sciencepaper Online*, 2013, 6(5): 402-406 (in Chinese)
乔媛媛, 范代娣, 邓建军, 等. 镍离子亲和层析纯化重组类人胶原蛋白[J]. *中国科技论文在线*, 2013, 6(5): 402-406
- [15] Hibi M, Kawashima T, Kodera T, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* L-isoleucine dioxygenase for production of useful amino acids[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 6926-6930
- [16] Zhang CL, Liu Y, Xue N, et al. Characterization of recombinant L-isoleucine-4-hydroxylase from *Bacillus thuringiensis* and its application in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(8): 889-896 (in Chinese)
张成林, 刘远, 薛宁, 等. 苏云金芽孢杆菌重组 L-异亮氨酸羟化酶的酶学性质及其在 4-羟基异亮氨酸合成中的应用[J]. *微生物学报*, 2014, 54(8): 889-896
- [17] Wang A, Zeng YH, Han HJ, et al. Biochemical and structural characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Bfd and FPR: ferredoxin NADP⁺ reductase and not ferredoxin is the redox partner of heme oxygenase under iron-starvation conditions[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(43): 12198-12211
- [18] Hoffart LM, Barr EW, Guyer RB, et al. Direct spectroscopic detection of a C-H-cleaving high-spin Fe(IV) complex in a prolyl-4-hydroxylase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(40): 14738-14743
- [19] Ogawa J, Yamanaka H, Mano J, et al. Synthesis of 4-hydroxyisoleucine by the aldolase-transaminase coupling reaction and basic characterization of the aldolase from *Arthrobacter simplex* AKU 626[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(7): 1607-1615