

# 来源于葡萄球菌的 N-乙酰神经氨酸裂合酶的基因克隆及性质

周传华<sup>1,2</sup>, 陈曦<sup>2</sup>, 冯进辉<sup>2</sup>, 肖冬光<sup>1</sup>, 吴洽庆<sup>2</sup>, 朱敦明<sup>2</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

周传华, 陈曦, 冯进辉, 等. 来源于葡萄球菌 N-乙酰神经氨酸裂合酶的基因克隆及性质. 生物工程学报, 2013, 29(4): 480-489.

Zhou CH, Chen X, Feng JH, et al. Molecular cloning and characterization of a N-acetylneuraminase lyase gene from *Staphylococcus hominis*. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 480-489.

**摘 要:** 葡萄球菌 *Staphylococcus hominis* 来源的 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因 *shnal* (GenBank Accession No. EFS20452.1) 构建至 pET-28a 质粒并在大肠杆菌中得到表达。通过目的蛋白的纯化和酶学性质研究发现, ShNAL 是一个四聚体, 裂解方向的最适反应 pH 为 8.0; 合成方向的最适反应 pH 为 7.5, 最适反应温度为 45 °C。在 45 °C 下孵育 2 h 对 ShNAL 的活力基本无影响, 高于 45 °C 时, 活力迅速下降。该酶在 pH 5.0~10.0 的环境中比较稳定, 4 °C 下放置 24 h 酶的残余活力在 70% 以上。ShNAL 对 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac)、N-乙酰甘露糖胺 (Man) 和丙酮酸 (Pyr) 的  $K_m$  值分别是  $(4.0 \pm 0.2)$  mmol/L、 $(131.7 \pm 12.1)$  mmol/L 和  $(35.1 \pm 3.2)$  mmol/L,  $k_{cat}/K_m$  值分别为 1.9 L/(mmol·s)、0.08 L/(mmol·s) 和 0.08 L/(mmol·s)。

**关键词:** 葡萄球菌, N-乙酰神经氨酸裂合酶, 表达, 纯化, 生物催化

**Received:** September 19, 2012; **Accepted:** November 30, 2012

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710801).

**Corresponding author:** Qiaqing Wu. Tel/Fax: +86-22-84861963; E-mail: wu\_qq@tib.cas.cn

Dunming Zhu. Tel/Fax: +86-22-86841962; E-mail: zhu\_dm@tib.cas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710801) 资助。

# Molecular cloning and characterization of a N-acetylneuraminase lyase gene from *Staphylococcus hominis*

Chuanhua Zhou<sup>1,2</sup>, Xi Chen<sup>2</sup>, Jinhui Feng<sup>2</sup>, Dongguang Xiao<sup>1</sup>, Qiaqing Wu<sup>2</sup>, and Dunming Zhu<sup>2</sup>

1 College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** A N-acetylneuraminase lyase gene (*shnal*) from *Staphylococcus hominis* was cloned into pET-28a and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) host cells. The recombinant enzyme was purified and characterized. It is a homotetrameric enzyme with the optimum pH at 8.0 for the cleavage direction and the optimum pH and temperature were 7.5 and 45 °C for the synthetic direction. The activity of ShNAL is stable when incubated at 45 °C for 2 h but decreased rapidly over 50 °C. ShNAL showed high stability in a wide range pH from 5.0 to 10.0 with the residual activity being >70% when the enzyme was incubated in different buffers at 4 °C for 24 h. Its  $K_m$  towards N-acetylneuraminic acid, pyruvate and ManNAc were (4.0±0.2) mmol/L, (35.1±3.2) mmol/L and (131.7±12.1) mmol/L, respectively. The  $k_{cat}/K_m$  value of Neu5Ac, ManNAc, and Pyr for ShNAL were 1.9 L/(mmol·s), 0.08 L/(mmol·s) and 0.08 L/(mmol·s), respectively.

**Keywords:** *Staphylococcus hominis*, N-acetylneuraminase lyase, expression, purification, biocatalysis

羟醛缩合反应是指含有活性 $\alpha$ 氢原子的化合物如醛、酮、羧酸和酯等,在催化剂的作用下与羰基化合物发生亲核加成,得到 $\beta$ -羟基醛酮或酸。羟醛缩合反应形成新的碳-碳键,是有机合成中极为重要的一类反应<sup>[1]</sup>。目前实现不对称羟醛缩合反应的化学方法主要有添加手性助剂<sup>[2]</sup>或用手性路易斯酸<sup>[3]</sup>、有机小分子<sup>[4-6]</sup>等进行催化。相对于化学催化法,应用生物催化剂实现羟醛缩合反应具有反应条件温和、绿色无污染、底物立体选择性强等优点,在工业上具有良好的应用前景。

N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 是某些复合糖(糖脂和糖蛋白)中最常见的碳末端,在抗病毒和抗菌等多方面具有生物学活性,是合成抗病毒试剂扎那米韦 (Zanamivir) 的重要中间体<sup>[7]</sup>,在生物识别中有很重要的作用,具有极高的商业价值。

N-乙酰神经氨酸裂合酶(N-Acetyl-D-neuraminic acid lyase, EC 4.1.3.3 简称 NAL)是裂合酶(Lyase, EC 4.x.x.x.)的一种,在一定条件下,该酶既可以将 N-乙酰神经氨酸(简称 Neu5Ac)裂解成 N-乙酰甘露糖胺 (ManNAc) 和丙酮酸 (Pyr),又能催化 ManNAc 和 Pyr 羟醛缩合生成 N-乙酰神经氨酸<sup>[8]</sup>(图 1)。

NAL 在微生物界的分布非常广泛,多种微生物中都被检测到该酶的活性<sup>[9-11]</sup>,其中来源于大肠杆菌 *Escherichia coli*<sup>[12-14]</sup>、梭菌属 *Clostridium perfringens*<sup>[15]</sup>、嗜血杆菌属 *Haemophilus influenza*<sup>[16]</sup>、阴道毛滴虫 *Trichomonas vaginalis*<sup>[17]</sup>、巴氏杆菌属 *Pasteurella multocida*<sup>[18]</sup> 和乳杆菌属 *Lactobacillus plantarum*<sup>[19]</sup>的 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因已经得到克隆和表达。目前国内有关 Neu5Ac 的制备,

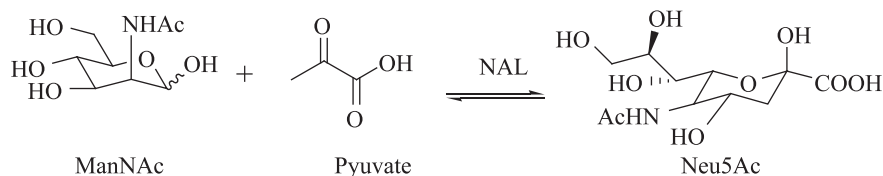


图1 酶法合成 Neu5Ac 的图示<sup>[8]</sup>

Fig. 1 Enzymatic synthesis of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) from N-acetyl-D-mannosamine (ManNAc) and pyruvate (Pyr) catalyzed by N-acetylneuraminase (NAL)<sup>[8]</sup>.

是通过乳酸氧化酶全细胞催化将乳酸转化成丙酮酸,再用 NAL 全细胞催化得到 Neu5Ac<sup>[20]</sup>。在生物催化合成 Neu5Ac 的反应中,最为关键的是醛缩酶(或裂解酶)的活性。为了获得更高活性、更有利于合成反应的 N-乙酰神经氨酸裂合酶,可以更高效地合成 Neu5Ac,我们通过基因挖矿选择了几个不同来源的基因作为研究对象,经过初步的研究发现来源于葡萄球菌 *Staphylococcus hominis* 的 N-乙酰神经氨酸裂合酶的活性较高,对该酶的性质进行了较详细的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* Trans 5a 由本实验室保存, pET28a(+)载体和 *E. coli* BL21 (DE3) 均购自 Novagen 公司。

#### 1.1.2 目的基因

通过基因挖矿获得候选基因,序列信息来源于 NCBI 数据库 (GenBank Accession No. EFS20452.1),全基因序列由上海旭冠生物科技发展有限公司合成。

#### 1.1.3 主要试剂

BCA 蛋白浓度试剂盒购自康为世纪公司

(CWBio);用于蛋白电泳的试剂及 N-乙酰神经氨酸和乳酸脱氢酶 (LDH) 购自 Sigma 公司;考马斯亮蓝 R250 购自索莱宝公司 (Solarbio);限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 以及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司;其他试剂均为分析纯或色谱纯。

### 1.2 序列分析

氨基酸序列的分析通过 BioEdit 软件 (CLUSTAL-W) 完成,对蛋白的理化性质初步预测通过网站进行 (<http://us.expasy.org/admin/users/login>)。

### 1.3 工程菌的构建

质粒的提取、酶切、连接、转化、凝胶电泳、基因的诱导表达等实验操作均按照《分子克隆实验指南》<sup>[21]</sup>进行。DNA 胶回收按照胶回收试剂盒 (Tiangen 公司) 说明书进行。目的基因 *shnal* 构建至 pET-28a 质粒的 *Nde* I 和 *Xho* I 两酶切位点之间,转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 宿主菌中。

### 1.4 目的蛋白的表达及纯化

将工程菌接入 800 mL LB 培养基 (含终浓度 50 mg/L 的卡那霉素) 中,37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.8 左右,添加终浓度为 1 mmol/L 的异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达 4~6 h。菌液 6 000 r/min 离心 10 min,生理盐水

洗涤菌体 2 次,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

将细胞重悬到 100 mL 含 5% 甘油, 500 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L, pH 8.0) 中, 通过高压匀浆破碎, 12 000 r/min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 30 min, 除去细胞碎片。上清用  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  的滤膜过滤后通过蛋白纯化仪 (Purifier 10, GE 公司) 在室温下用镍柱纯化 (填料购自 GE Health Care), 3 mL/min 流速上样, 用含 50 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L, pH 8.0) 洗脱杂蛋白, 含 0~250 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L, pH 8.0) 线性洗脱目的蛋白。收集合并目的蛋白, 经脱盐浓缩后, 适当分装,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。BCA 试剂盒进行蛋白质浓度测定, 牛血清白蛋白 BSA 作为标准蛋白。

ShNAL 在溶液中的聚集状态通过凝胶层析以及 SDS-PAGE 来进行确定。所用层析柱为 Superdex 200 10/300 GL, Gel filtration calibration kit (GE) 用于标准分子量测定。流动相为含 150 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2), 流速为 0.4 mL/min。蛋白的分子量大小通过和标准蛋白的保留体积标准曲线进行比较和计算得到。标准蛋白为: Ovalbumin (43.0 kDa), Conalbumin (75.0 kDa), Conalbumin (158.0 kDa), Ferritin (440.0 kDa), Thyroglobulin (669.0 kDa)。

## 1.5 活性的测定

### 1.5.1 裂解方向

裂解方向的活性通过酶标仪 (Spectra Max M2/M2e, Molecular Devices 公司) 测定, 其原理是: N-乙酰神经氨酸裂解生成的丙酮酸能在

NADH 和乳酸脱氢酶存在的条件下被还原成乳酸, 过程中消耗了 NADH, 引起 340 nm 波长下对 NADH 的吸光度的下降<sup>[22-23]</sup>。一个酶活力单位定义为: 在 pH 7.0、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 1 min 裂解 1  $\mu\text{mol}$  的 Neu5Ac 生成 1  $\mu\text{mol}$  的 N-乙酰-D-甘露糖胺和丙酮酸所需酶的量。反应体系包括 10 mmol/L Neu5Ac、0.25 mmol/L NADH、1 U/mL LDH、0.85  $\mu\text{g}$  ShNAL, 反应在常温下不同 pH 的 100 mmol/L 的缓冲液中进行。

### 1.5.2 合成方向

合成方向的活性通过 HPLC 测定, 其原理为: 仅加入 ManNAc、Pyr 和酶, 通过 HPLC 检测 Neu5Ac 的生成量确定活力大小。一个酶活力单位定义为: 在 pH 7.0、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 1 min 合成的 1  $\mu\text{mol}$  Neu5Ac 所需要的酶量。反应体系包括 30 mmol/L ManNAc, 100 mmol/L Pyr 和 10  $\mu\text{g}$  的酶, 在 100 mmol/L 的缓冲液中进行 30 min, 添加 10  $\mu\text{L}$  浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。

## 1.6 酶的性质分析

合成和裂解方向的最适反应 pH 测定是在 100 mmol/L 的不同 pH 值的缓冲液中进行的, 缓冲体系选用醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.0~6.0), 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0~8.0), Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0~9.0), 碳酸盐缓冲液 (pH 9.0~11.0), 裂解方向的反应温度为室温, 合成方向的反应温度控制在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5。合成方向的最适反应温度的测定是将反应放入  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  的环境中进行反应, 测定产物生成量, 反应体系同上所述。

## 1.7 酶的稳定性研究和动力学参数测定

温度耐受性测定是将酶稀释到 pH 7.0 的 100 mmol/L 的缓冲液中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  温浴 0.5~2 h,

检测裂解方向的残留活性。pH 耐受性测定是将酶稀释到 pH 4.0~11.0 的缓冲液中, 4 °C 孵育 24 h, 测定裂解方向的残留活性。

在对 Neu5Ac 的动力学测定中, 测定了不同 Neu5Ac 浓度下的活性, 反应在 pH 8.0 的缓冲液中进行。在合成方向, 反应在 pH 7.5 的缓冲液中进行, 测定 ShNAL 对丙酮酸的  $K_m$  值时, 保持 N-乙酰甘露糖胺的浓度为 30 mmol/L, 测定不同 Pyr 浓度下酶的活力; 测定 N-乙酰甘露糖胺的  $K_m$  值时, 丙酮酸的浓度 (50 mmol/L) 不变, 测定 N-乙酰甘露糖胺不同浓度下的酶活。

## 1.8 HPLC 分析条件

Agilent 公司 1100 型; 分离柱: BioRad 公司生产的型号为 Aminex HPX-87H 糖分析柱 (300 mm×7.8 mm, 9  $\mu$ m), 流动相: 5 mmol/L  $H_2SO_4$ , 流速 0.4 mL/min, 柱温 40 °C。在上述条件下检测, Neu5Ac、Pyr 和 ManNAc 的保留时间分别是 11.9 min、14.2 min 和 16.2 min。

## 1.9 合成产物的分离和鉴定

20 mL 的 Tris-HCl (100 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液反应体系中加入 300 mmol/L Pyr、100 mmol/L ManNAc、4.5 g 湿菌体, 在 37 °C、200 r/min 条件下反应 20 h, 通过离心除去菌体, 100 °C 加热除去蛋白终止反应。反应的转化率通过 HPLC 检测 ManNAc 的减少量得出, 产物是通过阴离子交换树脂 (201×7) 分离方法<sup>[20]</sup>纯化。

## 2 结果

### 2.1 氨基酸序列分析

将来源于 *Staphylococcus hominis* 与其他菌属来源的 N-乙酰神经氨酸裂合酶氨基酸序列进行比较 (图 2), 发现 ShNAL 与已知的 N-乙酰神经氨酸裂合酶, 与来源于 *Haemophilus influenzae*<sup>[16]</sup>、*Clostridium perfringens*<sup>[15]</sup>、*Trichomonas vaginalis*<sup>[17]</sup> 和 *Lactobacillus plantarum*<sup>[19]</sup> (GenBank Accession No. 分别是

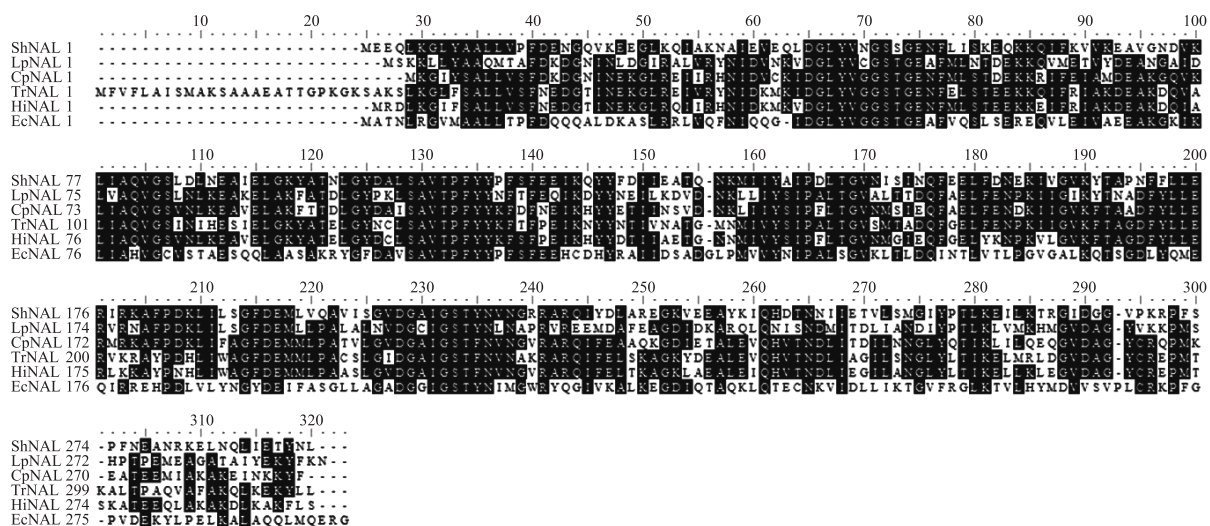


图 2 ShNAL 与已知的 N-乙酰神经氨酸裂合酶序列的比对结果

Fig. 2 Multiple sequence alignment for ShNAL and related N-acetylneuraminidase lyases.

P44539.1, Q9S4K9.2, AAB42182.1 和 NP\_786769.1) 的同源性分别为 58%、56%、53% 和 50%，而与来源于 *Escherichia coli*<sup>[11]</sup> (Accession No. AAC76257.1) 的同源性只有 30%。

ShNAL 拥有 NAL 亚家族活性位点的关键残基 (图 2), 包括 K165、Y137 (仅指 ShNAL 的氨基酸位点编号, 下同) 位点、保守的 GxxGE 底物专一性结合框架 (第 47~51 个氨基酸) 以及 D191、E192 和 S208<sup>[24-25]</sup>。GxxGE 是  $\alpha$ -酮酸的羧基结合位点, xx 通常是 S/T, 而 ShNAL 中这两个氨基酸位点 (48、49 位) 是 S/S, 这两个连续的氨基酸与 Y137 和水分子共同参与形成丙酮酸氢键网络, D191、E192 和 S208 是底物糖的结合位点。保守区域外的位点有较大差异。

## 2.2 重组酶的纯化

通过镍柱亲和层析一步纯化得到电泳纯的目的蛋白酶 (图 3 和表 1)。纯化总收率为 88.5%，纯度提高了 5.6 倍。在 pH 7.0、37 °C 的条件下, 裂解方向的比活达到了 24.8 U/mg (表 1), 在 pH 7.5、37 °C 的条件下, 合成反应方向的比活是 3.1 U/mg。用胶过滤层析测定 ShNAL 的确定分子量为 125 kDa, 其单体分子量为 33.8 kDa, 因此该酶在溶液中以四聚体形式存在。

## 2.3 酶的最适反应 pH 和温度

裂解方向的最适反应 pH 是 8.0, 高于 pH 8.0

时酶的活性迅速下降, 当 pH 升至 9.0 时活性下降到最高时的 17.5% (图 4)。合成方向的最适反应 pH 是 7.5, 升高 pH 对酶的活性影响不大, 在 pH 9.0 的碳酸盐缓冲液中该酶仍然能保持最高活力的 95% 以上 (图 5)。通过对 ShNAL 合成方向的最适反应温度研究发现, 在 20 °C~45 °C 之间, 随温度升高酶的活力不断提高, 45 °C 时达到最大活力, 当温度超过 50 °C 时酶活迅速下降 (图 6)。温度对裂解方向酶活性影响的研究表明

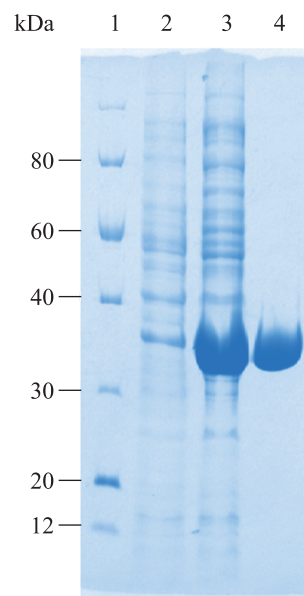


图 3 SDS-PAGE 分析 ShNAL 的纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified ShNAL. 1: protein marker; 2: cell-free extract without induction; 3: crude cell-free extract; 4: purified ShNAL.

表 1 ShNAL 蛋白纯化表

Table 1 Purification of ShNAL

| Purification step                | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Purification factor | Yield (%) |
|----------------------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|-----------|
| Crude cell-free extract          | 957.7              | 4.4                      | 1.0                 | 100.0     |
| His-trap affinity chromatography | 848.4              | 24.8                     | 5.6                 | 88.5      |

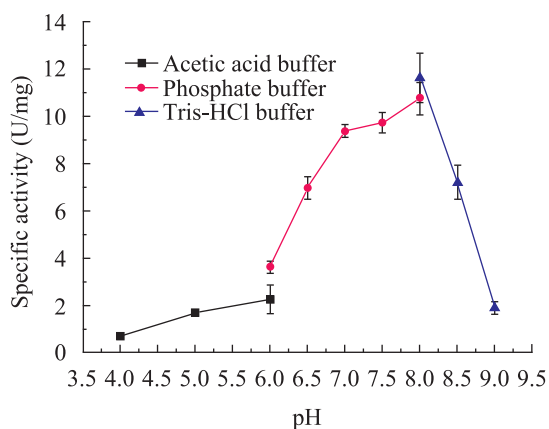


图4 pH对裂解方向酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on ShNAL activity for the cleavage direction. Acetic acid buffer (pH 4.0 to 6.0), phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0) and Tris-HCl buffer (pH 8.0 to 9.0) were used.

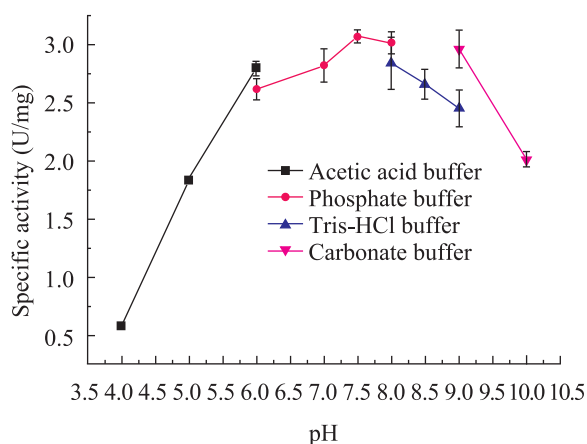


图5 pH对合成方向酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on ShNAL activity for the synthetic direction. Acetate buffer (pH 4.0 to 6.0), phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0 to 9.0) and carbonate buffer (9.0 to 10.0) were used.

(数据未显示),直到65℃时,酶的活力都随温度升高而不断提高。

## 2.4 酶的稳定性

通过测定裂解反应活性变化来研究 ShNAL 对 pH 的耐受性,结果发现,ShNAL 可以耐受较

宽的 pH 范围,在中性 pH 值范围内最稳定,在 pH 5.0~10.0 范围内 ShNAL 的残留活性能保持 70% 以上,但 pH 4.0 的过酸环境和 pH 11.0 的过碱环境都能使酶失活(图 7)。

通过测定裂解方向活性损失对 ShNAL 的热稳定性进行了研究,发现 ShNAL 具有较好的热

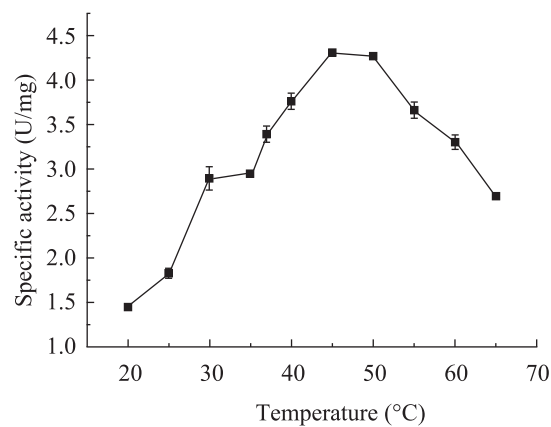


图6 温度对合成反应酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on ShNAL activity for synthetic reaction.

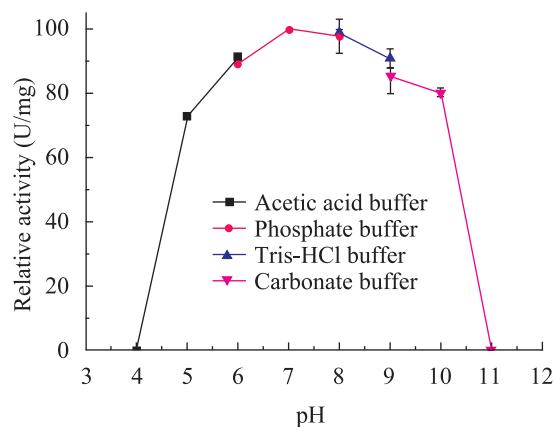


图7 pH的耐受性测定

Fig. 7 pH stability of ShNAL. Acetate buffer (pH 5.0 to 6.0), phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0 to 9.0) and carbonate buffer (pH 9.0 to 11.0) were used.

稳定性, 在 4 °C~45 °C 温度水浴 0.5~2 h 均无活性损失。在 30 °C 下孵育 210 h, ShNAL 的活性没有下降, 说明酶在 30 °C 的稳定性良好, 而当温度升到 50 °C 时, 随着时间的延长活性不断下降, 50 °C 温浴 0.5 h 活性约损失一半 (图 8)。

## 2.5 动力学参数的测定

测定合成和裂解两个方向的动力学参数, 裂解方向的 Neu5Ac 的  $K_m$  值为  $(4.0\pm 0.2)$  mmol/L, 合成方向的 ManNAc 和 Pyr 的  $K_m$  值分别为  $(131.7\pm 12.1)$  mmol/L 和  $(35.1\pm 3.2)$  mmol/L。Neu5Ac、Pyr 和 ManNAc 的  $k_{cat}/K_m$  值分别为 1.9 L/(mmol·s)、0.08 L/(mmol·s) 和 0.08 (L/mmol·s)。Neu5Ac、Pyr 的  $K_m$  值与目前报道的来源于其他菌属的 N-乙酰神经氨酸裂合酶相差不多, ManNAc 的  $K_m$  值比其他来源的酶都要小。ShNAL 与之前研究的动力学相关参数比较见表 2, ShNAL 的裂解方向的催化效率  $k_{cat}/K_m$  比已知的相关酶要低, 而合成方向的催化效率  $k_{cat}/K_m$  与

它们相当, 可能更有利于合成反应进行。

## 2.6 合成产物的分离和鉴定

通过 HPLC 检测反应转化率为 91.5%, Neu5Ac 的产率达到了 89.4% (图 9)。反应液经

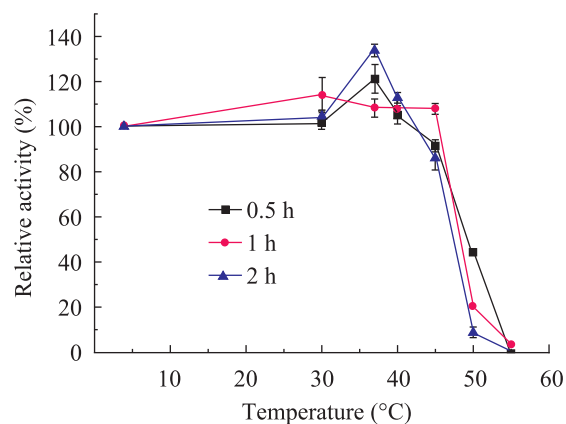


图 8 温度耐受性研究

Fig. 8 Thermal stability of ShNAL. Enzyme was incubated at certain temperature and maintain for three different times. Activity of enzyme stored in 4 °C was set as 100% relative activity.

表 2 ShNAL 与之前报道的不同来源的酶的动力学参数比较<sup>[18-19]</sup>

Table 2 Kinetic parameters of recombinant ShNAL and other previously described

| Enzymes | Activities       | Substrates | $K_m$ (mmol/L) | $k_{cat}/K_m$ (L/(mmol·s)) |
|---------|------------------|------------|----------------|----------------------------|
| LpNAL   | Cleavage         | Neu5Ac     | 1.8±0.1        | 5.60                       |
|         | Neu5Ac synthesis | ManNAc     | 160.0±5.0      | 0.03                       |
|         |                  | Pyruvate   | 19.9±0.3       | 0.11                       |
| EcNAL   | Cleavage         | Neu5Ac     | 2.5±0.3        | 4.00                       |
|         | Neu5Ac synthesis | ManNAc     | 180.0±10.0     | 0.05                       |
|         |                  | Pyruvate   | 22.0±1.0       | 0.08                       |
| PmNAL   | Cleavage         | Neu5Ac     | 4.9±0.7        | 3.00                       |
|         | Neu5Ac synthesis | ManNAc     | 220.0±30.0     | 0.05                       |
|         |                  | Pyruvate   | 23.0±1.0       | 0.08                       |
| ShNAL   | Cleavage         | Neu5Ac     | 4.0±0.2        | 1.90                       |
|         | Neu5Ac synthesis | ManNAc     | 131.7±12.1     | 0.08                       |
|         |                  | Pyruvate   | 35.1±3.2       | 0.08                       |



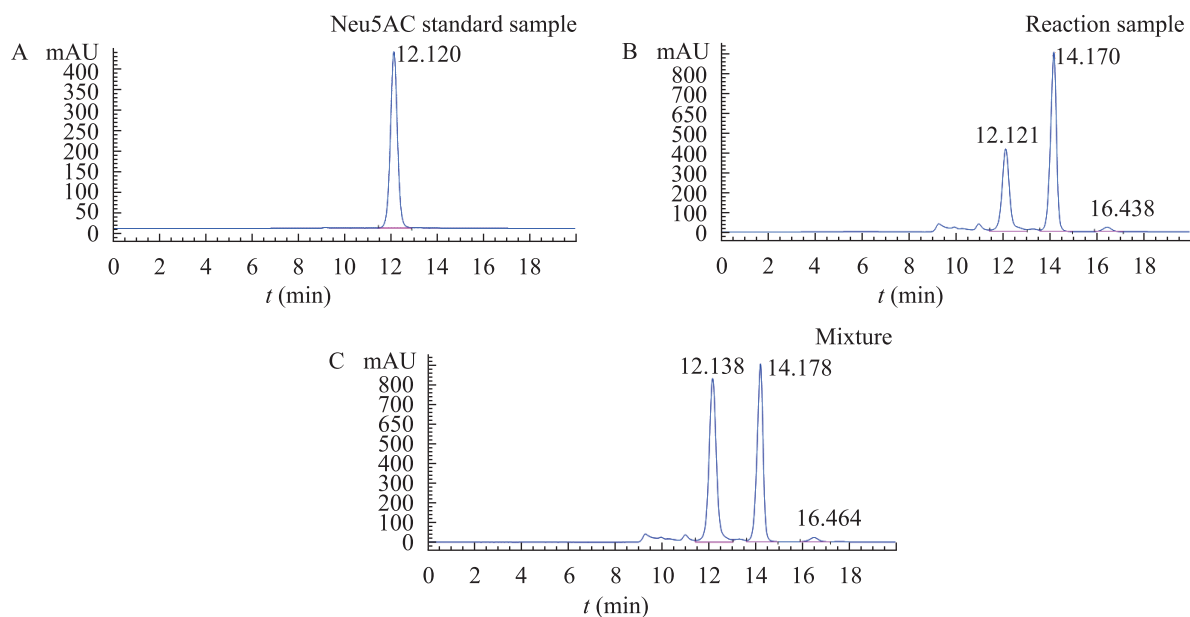


图9 Neu5Ac的HPLC图谱 (A: NeuAc标准样品; B: ShNAL催化的反应; C: NeuAc标样和反应物的混合物)  
Fig. 9 HPLC fingerprint spectrum of Neu5Ac. (A) NeuAc standard sample. (B) Reaction system. (C) Mixture of Neu5Ac standard sample and the reactant.

处理上样 0~0.2 mol/L 甲酸洗脱的样品通过减压蒸馏除去甲酸和水,得到了纯度较高的产物。质谱检测结果:MS (ES<sup>-</sup>) 计算值  $C_{11}H_{19}NO_9$  (M-H) 308.10, 实验值 307.82。

### 3 讨论

目前,国内还没有利用分离纯化的 N-乙酰神经氨酸裂合酶合成 Neu5Ac 的工业化生产的报道,限制 Neu5Ac 工业化生产的因素很多,如生产原料 ManNAc 非常昂贵外,醛缩酶(或裂解酶)的活性低等也是重要的原因。有效的解决途径可能是通过异构酶将相对廉价的 N-乙酰葡萄糖胺转化成 ManNAc,再在高活性的 N-乙酰神经氨酸裂合酶催化下来合成 Neu5Ac。

本研究克隆并表达了来自 *Staphylococcus hominis* 的潜在 N-乙酰神经氨酸裂合酶基因 *shnal*,研究了纯化酶的酶学性质和动力学参数,

与其他来源的 NAL 相比,ShNAL 对 ManNAc 的  $K_m$  值最小,  $k_{cat}/K_m$  值为 0.08 L/(mmol·s), 优于之前研究过的 0.05 L/(mmol·s) 的最大值; 在 pH 9.0 的环境中, ShNAL 在合成方向仍能保持合成反应最适 pH 下活力的 95%, 而裂解方向的活性降至最适 pH 下活力的 17.5%, 偏碱性条件更利于产物合成。综合以上特点, ShNAL 在合成反应中具有一定的优势,但是酶的催化活性有待进一步提高,以满足工业化应用的要求。

### REFERENCES

- [1] Palomo C, Oiarbide M, Garcia JM. Current progress in the asymmetric aldol addition reaction. *Chem Soc Rev*, 2004, 33(2): 65-75.
- [2] Evans DA, Bartroli J, Shih TL. Enantioselective aldol condensations. 2. Erythro-selective chiral aldol condensations via boron enolates. *J Am Chem Soc*, 1981, 103(8): 2127-2129.
- [3] Machajewski TD, Wong CH. The catalytic

- asymmetric aldol reaction. *Angew ChemInt Edit*, 2000, 39(8): 1352–1374.
- [4] Córdova A, Zou W, Dziejic P, et al. Direct asymmetric intermolecular aldol reactions catalyzed by amino acids and small peptides. *Chem Eur J*, 2006, 12(20): 5383–5397.
- [5] Dalko PI, Moisan L. In the golden age of organocatalysis. *Angew ChemInt Edit*, 2004, 43(39): 5138–5175.
- [6] Notz W, Tanaka F, Barbas CF. Enamine-based organocatalysis with proline and diamines: the development of direct catalytic asymmetric aldol, Mannich, Michael, and Diels–Alder reactions. *Acc Chem Res*, 2004, 37(8): 580–591.
- [7] Von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 1993, 363(6428): 418–423.
- [8] Groher, A. and Hoelsch K. Mechanistic model for the synthesis of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminase lyase from *Escherichia coli* K12. *J Mol Catal B: Enzym*, 2012, 83(0): 1–7.
- [9] Heimer R, Meyer K. Studies on sialic acid of submaxillary mucoid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1956, 42(10): 728–734.
- [10] Popenoe EA, Drew RM, Kee L. The action of an enzyme of *Clostridium perfringens* on orosomucoid. *J Biol Chem*, 1957, 228(2): 673–683.
- [11] Yoshihir U, Yoji T, Tsunetake S. Distribution of N-acetylneuraminase lyase in bacteria and its production by *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(1): 181–187.
- [12] Aisaka K, Uwajima T. Cloning and constitutive expression of the N-acetylneuraminase lyase gene of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 51(3): 562–565.
- [13] Ohta Y, Watanabe K, Kimura A. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* N-acetylneuraminase lyase. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(24): 8843–8852.
- [14] Ohta Y, Shimosaka M, Murata K, et al. Molecular cloning of the N-acetylneuraminase lyase gene in *Escherichia coli* K-12. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 24(5): 386–391.
- [15] Traving C, Roggentin P, Schauer R. Cloning, sequencing and expression of the acylneuraminase lyase gene from *Clostridium perfringens* A99. *Glycoconj J*, 1997, 14(7): 821–830.
- [16] Lilley GG, Barbosa JA, Pearce LA. Expression in *Escherichia coli* of the putative N-acetylneuraminase lyase gene (nanA) from *Haemophilus influenzae*: overproduction, purification, and crystallization. *Protein Expr Purif*, 1998, 12(3): 295–304.
- [17] Meysick KC, Dimock K, Garber GE. Molecular characterization and expression of a N-acetylneuraminase lyase gene from *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 76(1/2): 289–292.
- [18] Li Y, Yu H, Cao H, et al. *Pasteurella multocida* sialic acid aldolase: a promising biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(6): 963–970.
- [19] Sanchez-Carron G, Garcia-Garcia MI, Lopez-Rodriguez AB, et al. Molecular characterization of a novel N-acetylneuraminase lyase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(7): 2471–2478.
- [20] Xu P, Qiu JH, Zhang YN, et al. Efficient whole-cell biocatalytic synthesis of N-Acetyl-D-neuraminic acid. *Adv Synth Catal*, 2007, 349(10): 1614–1618.
- [21] Sambrook J, William D, Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 99–125.
- [22] Aisaka K, Igarashi A, Yamaguchi K, et al. Purification, crystallization and characterization of N-acetylneuraminase lyase from *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1991, 276(2): 541–546.
- [23] Wang TH, Lee WC. Production of 2-keto-3-deoxy-d-glycero-d-galacto-nonopyranulosonic acid (KDN) using fusion protein of N-acetyl-d-neuraminic acid aldolase. *Biochem Eng J*, 2006, 29(1/2): 75–80.
- [24] Barbosa JA, Smith BJ, DeGori R, et al. Active site modulation in the N-acetylneuraminase lyase sub-family as revealed by the structure of the inhibitor-complexed *Haemophilus influenzae* enzyme. *J Mol Biol*, 2000, 303(3): 405–421.
- [25] Lawrence MC, Barbosa JA, Smith BJ, et al. Structure and mechanism of a sub-family of enzymes related to N-acetylneuraminase lyase. *J Mol Biol*, 1997, 266(2): 381–399.

(本文责编 郝丽芳)