

工业生物技术

一种来源于 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 的 ω -转氨酶的表达纯化及性质分析

杜允成^{1,2}, 董文玥¹, 姜进举^{1,2}, 陈启佳^{1,2}, 冯进辉¹, 吴洽庆¹, 朱敦明¹

1 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

2 中国科学院大学 北京 100049

杜允成, 董文玥, 姜进举, 等. 一种来源于 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 的 ω -转氨酶的表达纯化及性质分析. 生物工程学报, 2016, 32(7): 912–926.

Du YC, Dong WY, Jiang JJ, et al. Expression and characterization of a novel ω -transaminase from *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 912–926.

摘 要: ω -转氨酶 (ω -transaminase) 可以通过手性拆分和不对称合成的催化反应来获得光学纯的手性胺类化合物和非天然氨基酸, 在医药中间体合成中是一种重要的生物催化剂。采用基因挖掘技术, 在基因组数据库中获得一个来自伯克氏菌 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 的 ω -转氨酶基因 (*hbp*), 将该基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中克隆、表达, 利用镍柱亲和层析将该酶 (HBP) 进行纯化并研究了其酶学性质和底物谱。结果表明, 以 β -苯丙氨酸 (β -Phe) 为氨基供体、丙酮酸为氨基受体, HBP 具有较高的活力 (33.80 U/mg) 和立体选择性; 其最适温度为 40 °C 左右, 最适 pH 在 8.0–8.5 之间。研究过程中, 建立了一种简便快捷的紫外吸收法来检测 β -Phe 的脱氨反应, 证明了该反应的热力学平衡性质。底物谱研究表明 HBP 可以以 β -Phe 及其衍生物为氨基供体。结果表明 HBP 能够有效地手性拆分 *rac*- β -Phe 及其衍生物, 转化率在 50% 左右, ee>99%。

关键词: ω -转氨酶, 伯克氏菌, 芳香族 β -氨基酸, 手性拆分

Received: October 27, 2015; **Accepted:** February 17, 2016

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710800).

Corresponding authors: Qiaqing Wu. Tel: +86-22-84861963; Fax: +86-22-84861996; E-mail: wu_qq@tib.cas.cn

Dunming Zhu. Tel: +86-22-84861962; Fax: +86-22-84861996; E-mail: zhu_dm@tib.cas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710800) 资助。

Expression and characterization of a novel ω -transaminase from *Burkholderia phytofirmans* PsJN

Yuncheng Du^{1,2}, Wenyue Dong¹, Jinju Jiang^{1,2}, Qijia Chen^{1,2}, Jinhui Feng¹,
Qiaqing Wu¹, and Dunming Zhu¹

¹ National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

² College of Life Science, University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: Production of chiral amines and unnatural amino-acid using ω -transaminase can be achieved by kinetic resolution and asymmetric synthesis, thus ω -transaminase is of great importance in the synthesis of pharmaceutical intermediates. By genomic data mining, a putative ω -transaminase gene *hbp* was found in *Burkholderia phytofirmans* PsJN. The gene was cloned and over-expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant enzyme (HBP) was purified by Ni-NTA column and its catalytic properties and substrate profile were studied. HBP showed high relative activity (33.80 U/mg) and enantioselectivity toward β -phenylalanine (β -Phe). The optimal reaction temperature and pH were 40 °C and 8.0–8.5, respectively. We also established a simpler and more effective method to detect the deamination reaction of β -Phe by UV absorption method using microplate reader, and demonstrated the thermodynamic property of this reaction. The substrate profiling showed that HBP was specific to β -Phe and its derivatives as the amino donor. HBP catalyzed the resolution of *rac*- β -Phe and its derivatives, the products (*R*)-amino acids were obtained with about 50% conversions and 99% *ee*.

Keywords: ω -transaminase, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, aromatic β -amino acids, chiral resolution

转氨酶 (EC 2.6.1.X) 又叫氨基转移酶, 是一种以磷酸吡哆醛 (PLP) 为辅酶, 能够将氨基供体的氨基基团转移至氨基受体羰基位置的生物催化剂^[1]。根据转氨酶作用的底物, 转氨酶可以分为 α -转氨酶和 ω -转氨酶两大类。与 α -转氨酶不同, ω -转氨酶催化的两个底物, 至少有一个为非 α -酮酸或者 α -氨基酸 (图 1)^[2]。 ω -转氨酶能够通过手性拆分或者不对称合成的方法催化合成光学纯的手性胺类化合物和非天然氨基酸。由于医药和农药工业中, 大约有 40% 的生物活性物质都含有手性胺结构^[1], 因此, ω -转氨酶在有机合成中是一种非常重要的生物催化剂。

上世纪 50 年代, 实验证实了在哺乳动物中存在 ω -转氨酶催化的化学反应^[3]。1990 年,

Celgene 公司在 ω -转氨酶研究方面取得了重大突破, 实现了 ω -转氨酶催化手性胺类化合物的拆分^[4], 这项研究极大地促进了 ω -转氨酶的研究。在过去的 20 多年中, ω -转氨酶催化合成手

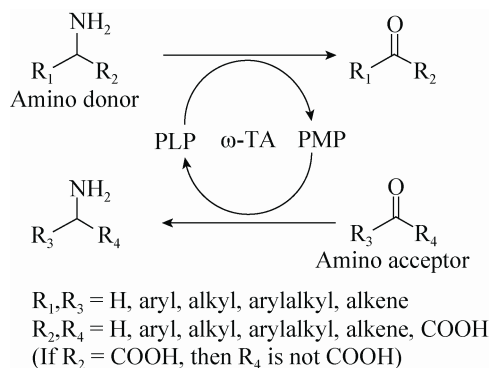


图 1 ω -转氨酶催化的反应

Fig. 1 The reaction catalyzed by the ω -transaminase (ω -TA).

性胺类化合物及非天然氨基酸的研究广受关注并取得了巨大的进展^[5-7]。1999年, Celgro公司以异丙胺和甲氧基异丙酮为底物, 建立了 ω -转氨酶催化(S)-甲氧基丙胺的生产路线^[8]; 这是 ω -转氨酶工业生产农用手性胺类药物中间体的代表。2010年, 美国Codexis和Merck公司, 对 ω -转氨酶进行了11轮的突变, 成功实现了酶法催化西他列汀(治疗糖尿病药物)的合成工艺, 彻底取代了重金属铑催化的化学合成路线^[9]; 该成果获得了2010年美国绿色化学奖, 是生物催化工业应用的一个里程碑。

根据 ω -转氨酶作用底物的立体构型, 可将 ω -转氨酶分为(S)- ω -转氨酶和(R)- ω -转氨酶。(S)- ω -转氨酶作用于(S)-型底物, (R)- ω -转氨酶作用于(R)-型底物。文献报道较多的是(S)- ω -转氨酶^[5,10], 其中研究最广泛、最透彻的是来自河流弧菌 *Vibrio fluvialis* JS17的 ω -转氨酶, 该酶有两个底物结合口袋, 大口袋能够接受底物的苯环或者羧基基团, 小口袋对大于乙基的基团具有严格的空位阻效应^[11]; 由于小口袋限制, 大大缩小了其应用范围, Nobili等通过分子改造扩大了这个酶的小口袋^[12]。与(S)- ω -转氨酶相比, (R)- ω -转氨酶的数量屈指可数; 直到2010年, Höhne等通过生物信息学分析, 根据两个Motif对6 000多条标注为“L-分支链氨基酸转移酶”氨基酸序列进行逐条分析, 最终获得了21条可能的(R)- ω -转氨酶序列, 实验确定其中17条为(R)- ω -转氨酶^[13]; 随后, 我们实验室将两个Motif合并, 又成功挖掘出5个(R)- ω -转氨酶^[14]。(R)- ω -转氨酶逐步丰富起来。

ω -转氨酶不仅可以催化手性胺类化合物, 还可以实现 β -氨基酸的手性合成。虽然已有多

种酶法合成 β -氨基酸^[15-18], 但由于 ω -转氨酶拥有反应快速、底物谱广泛以及不需要辅因子再生等优势, 利用 ω -转氨酶合成 β -氨基酸是一种更加理想的选择。目前, 能够作用于芳香族 β -氨基酸的 ω -转氨酶相对较少^[19-23], 寻找新的 ω -转氨酶来催化获得光学纯的芳香族 β -氨基酸具有重要意义。本文通过基因挖掘技术, 获得了一种来自 *Burkholderia phytofirmans* PsJN的 ω -转氨酶, 实现了芳香族 β -氨基酸的手性拆分。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及主要试剂

pET-32a(+) 质粒购自Novagen公司; 蛋白胨和酵母提取物均来自BD公司; Bradford BCA蛋白浓度试剂盒购自康为世纪公司; 考马斯亮蓝R250购自Solarbio公司。氨基供体底物, *rac*- β -Phe (Alfa Aesar)、(R)- β -Phe (百灵威科技有限公司), *rac*-3-氨基-3-(4-氟苯基) 丙酸 (国药集团化学试剂有限公司)、*rac*-3-氨基-3-(4-甲氧基苯基) 丙酸 (上海韶远化学科技有限公司)、*rac*-3-氨基-3-(4-甲基苯基) 丙酸 (国药集团化学试剂有限公司)、*rac*-3-氨基-3-(4-硝基苯基) 丙酸 (Sigma公司)、*rac*-3-氨基-3-(4-羟基苯基) 丙酸 (上海韶远化学科技有限公司)、*rac*-3-氨基-4-甲基戊酸 (阿拉丁)、(S)-苯乙胺 (Alfa Aesar)、*rac*-2-戊胺 (TCI); 氨基受体底物丙酮酸 (Alfa Aesar)、 α -酮戊二酸 (国药集团化学试剂有限公司)、丙酮酸乙酯 (Alfa Aesar)、苯甲醛 (Alfa Aesar)、乙醛酸 (百灵威科技有限公司)、苯乙酮 (Alfa Aesar)、其他氨基受体 (Sigma公司)。

1.1.2 主要仪器

高压匀浆破碎仪购自德国 APV 公司;RC6⁺ 高速冷冻离心机购自 Thermo 公司;凝胶成像系统购自 BIO-RAD 公司;ÄKTA purifier 10, 所用层析柱均为 GE 公司;高效液相色谱仪 (HPLC 1260), 购自 Agilent 公司;酶标仪 (SpectraMax M2e)。

1.2 基因挖掘

通过文献调研, 发现来自根瘤菌属 *Mesorhizobium* sp. LUK 的 (S)-立体选择性 ω -转氨酶能够以 β -Phe 为氨基供体, 以丙酮酸、草酰乙酸和 α -酮戊二酸为氨基受体进行反应^[20], 表明这个酶能够催化芳香族 β -氨基酸, 并且有比较宽的氨基受体底物谱。因此, 以来自 *Mesorhizobium* sp. LUK 的 ω -转氨酶蛋白序列 (EF127643.1) 为模板, 在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行 Blastp (默认设置) 搜索, 来挖掘能够作用于芳香族 β -氨基酸的 ω -转氨酶。从 Blast 结果列表中选择了一条来自 *Burkholderia phytofirmans* PsJN, 标注为 “class III aminotransferase” 的候选蛋白序列 (YP_001890102.1, 将该蛋白序列在 N 端加上 His₆ 后命名为 HBP), 与已经报道的能够作用于芳香族 β -氨基酸的 ω -转氨酶 (分别来自 *Mesorhizobium* sp. LMK^[20]、胞菌属 *Polaromonas* sp. JS666^[21] 和争论贪噬菌属 *Variovorax paradoxus*^[22]、伯克氏菌属 *Burkholderia graminis*^[23]) 进行 Pr-Blast, HBP 与之同源性都较高, 分别为 51%、55%、59%、83%。通过在线的 jcat 密码子优化程序 (<http://www.jcat.de>), 对 HBP 的原始基因序列进行了针对 *E. coli* (K12) 表达的密码子优化, 在

N 端加上 His₆ 标签, 目的基因直接合成至 pET-32a 原核表达载体的 *Nde* I (691 bp 处) 与 *Bam*H I 酶切位点之间。

1.3 目的蛋白的表达纯化

工程菌构建: 将重组载体 pET-32a-hbp 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中。

诱导表达: 将工程菌接种到装有 LB 液体培养基 (Amp 含量 100 μ g/mL) 的三角瓶 (800 mL/瓶) 里, 置于 37 °C 的恒温培养摇床 (200 r/min) 中培养至对数期 (OD_{600} 为 0.6–1.0), 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 置于 25 °C、200 r/min 的恒温培养摇床中诱导表达 12 h。

收菌破胞: 将诱导表达的菌液离心并收集菌体, 用冰浴过的磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0) 清洗菌体两遍; 之后将菌体用 100 mL 冰浴过的破胞缓冲液重悬, 破胞缓冲液为磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0), 其中添加有 20 μ mol/L 磷酸吡哆醛 (PLP)、1 mmol/L 的 PMSF、0.01% (V/V) 的 β -巯基乙醇、30 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 氯化钠; 重悬好的菌液用高压匀浆机 (提前预冷至 4 °C) 进行细胞破碎。

纯化透析: 将细胞破碎液离心收集破菌上清液 (呈淡黄色), 用 0.45 μ m 的滤器过滤。纯化过程主要在 ÄKTA 蛋白质纯化仪上进行, 所用层析柱为 Ni-NTA 亲和层析柱 (实验室自装 10 mL 手工柱), 纯化用到的缓冲液主要为上样溶液 A (pH 7.0 的 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液, 含有 30 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 的氯化钠) 和洗脱溶液 B (pH 7.0 的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 含有 500 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 氯化钠), 采用咪唑线性浓度对目的酶蛋白进行洗脱; 得到纯酶后对其进行透析, 透析缓冲液为

含有 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 PLP 和 0.01% (V/V) 的 β -巯基乙醇的磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0), 透析过程在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境进行; 透析完成之后, 所得纯酶溶液加入 10% 的甘油后分装密封后保存在 -80°C 冰箱中冷藏备用。

1.4 酶学性质测定

1.4.1 反应体系

典型的反应体系: 体积为 1 mL 的含有 PLP (20 $\mu\text{mol/L}$)、氨基供体 *rac*- β -Phe、氨基受体丙酮酸的缓冲液 (100 mmol/L), 在水浴中孵育至与设定温度相同后, 加入 6.6 μg 的 HBP 纯酶启动反应, 反应 5 min 后, 取 100 μL 的反应液加入 200 μL 的丙酮终止反应。丙酮中含有 30 mmol/L 的 1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酰胺 (氨基酸衍生剂, 参见 FDAA, Marfey's Reagent 说明书), 然后加入 40 μL 的 1 mol/L 碳酸氢钠溶液, 混匀, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h, 冷却至室温后, 加入 20 μL 的 2 mol/L 盐酸溶液。衍生完成后, 底物 *rac*- β -Phe 的减少和产物丙氨酸的生成通过 HPLC 进行测定。HPLC 检测条件为: 色谱柱为 Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm \times 150 mm, Agilent), 流动相为三乙胺溶液 (50 mmol/L 三乙胺, 磷酸调节 pH 至 3.0) 乙腈=62.5 37.5, 等度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 340 nm。

1.4.2 最适反应 pH 及其最适反应温度

最适反应 pH 的测定: 采用典型的反应体系, 氨基供体 *rac*- β -Phe 和氨基受体丙酮酸的浓度分别为 20 mmol/L 和 10 mmol/L, 反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 其余保持不变。以 pH 为变量, 测定在一系列 pH (6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0) 的条件下底物 (*rac*- β -Phe) 的减少量, 通过比

较不同 pH 条件下氨基底物的减少, 来表征 pH 对该酶活力的影响。用到的 pH 缓冲液 (浓度皆为 100 mmol/L) 为醋酸钠缓冲液 (pH 3.8–5.6)、磷酸钠缓冲液 (pH 5.8–7.6)、硼酸硼砂缓冲液 (pH 7.8–9.2) 和硼砂氢氧化钠缓冲液 (pH 9.3–10.1)。

最适反应温度的测定: 采用典型的反应体系, 反应 pH 为上述测定的最适反应 pH (8.2), 氨基供体 *rac*- β -Phe 和氨基受体丙酮酸的浓度分别为 20 mmol/L 和 10 mmol/L, 其余保持不变。以反应温度为变量, 测定在一系列温度 (25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$) 条件下底物的减少量, 通过比较不同反应温度条件下底物 *rac*- β -Phe 的减少, 来表征反应温度对该酶活力的影响。

1.4.3 pH 稳定性和温度稳定性

pH 稳定性的测定: 采用典型反应体系, 氨基供体 *rac*- β -Phe 和氨基受体丙酮酸的浓度分别为 20 mmol/L 和 10 mmol/L, 反应温度为 1.4.2 测定的最适反应温度 (40 $^{\circ}\text{C}$), 但是反应所用的酶分别在不同 pH 的缓冲液中进行酸碱处理。具体为: 将多份酶分别置于 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的缓冲液中处理 24 h (室温 25 $^{\circ}\text{C}$), 之后测定不同 pH 处理 24 h 之后的残留酶活力。通过比较各反应氨基供体底物 *rac*- β -Phe 的减少, 便可以计算出经过不同 pH 处理之后的酶活损失情况。使用的 pH 缓冲液 (浓度皆为 100 mmol/L) 为醋酸钠缓冲液 (pH 3.8–5.6)、磷酸钠缓冲液 (pH 5.8–7.6)、硼酸硼砂缓冲液 (pH 7.8–9.2) 和硼砂氢氧化钠缓冲液 (pH 9.3–10.1)。

温度稳定性的测定: 采用典型反应体系

(氨基供体 *rac*- β -Phe 和氨基受体丙酮酸的浓度分别为 20 mmol/L 和 10 mmol/L), 反应温度和反应 pH 均为最适反应条件 (40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.2), 但是反应所用的酶经过不同温度的热处理。具体为: 将多份酶液 (50 mmol/L 磷酸钠缓冲体系, pH 7.0) 分别置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 温度下热处理 20 min, 测定不同温度下热处理之后的残留酶活力。通过比较各反应底物减少, 来表示不同温度热处理之后的酶活损失情况。

1.4.4 动力学参数和底物抑制测定

HPLC 检测该反应 (图 2) 拥有精确度高的优点, 已有报道中检测 *rac*- β -Phe 脱氨反应 (图 2) 也都采用 HPLC 方法, 但这种方法十分费时耗力。因此, 本研究建立了一种紫外吸收法来测定该酶的酶活, 并成功应用于动力学参数的测定中。

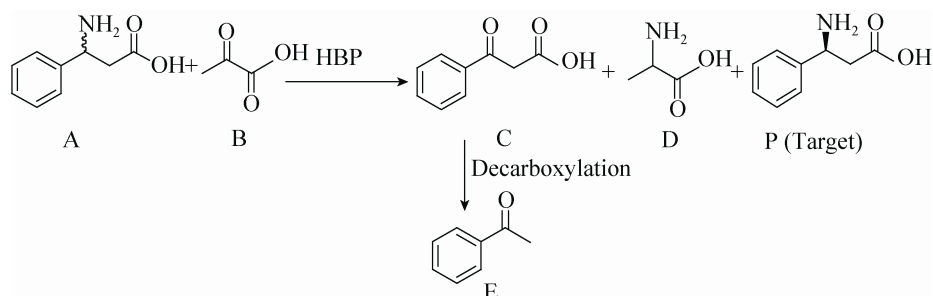


图 2 HBP 手性拆分 *rac*- β -Phe

Fig. 2 The kinetic resolution of *rac*- β -Phe catalyzed by HBP.

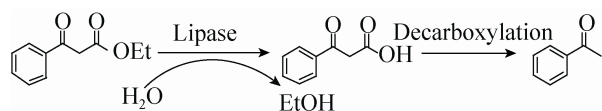


图 3 脂肪酶 Nov435 水解酯

Fig. 3 The hydrolysis reaction of ester catalyzed by lipase Nov435.

首先, 由于产物 C (3-羰基-3-苯基丙酸) 能够自发脱羧, 是一种不稳定的 β -酮酸类化合物^[24], 因此研究了温度对该化合物 C 稳定性的影响以及产物 C 的自发脱羧速率。温度对化合物 C 的影响: 脂肪酶 Nov435 水解其酯而制备产物 C (图 3), 水解完全后, 将其置于不同的温度下处理 2 h, 此段时间内, 产物 C 进行脱羧反应; 2 h 后, 通过得到苯乙酮的量来计算其分解产率, 分解产物苯乙酮是通过 HPLC 进行检测的。分解速率的确定: 将产物 C 置于 HPLC 的样品盘中, 每隔 0.5 h 检测一次样品, 来测定此时苯乙酮的量; 12 h 后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 0.5 h, 使产物 C 全部脱羧分解为苯乙酮, 来确定苯乙酮的总量。HPLC 检测条件为: 色谱柱为 Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm \times 150 mm, Agilent), 流动相为水 乙腈=1 1, 等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 205 nm。

其次, 产物 C 有一种特殊的超级共轭结构, 表明产物 C 有特殊的紫外吸收, 我们将 200 μL (缓冲液为 200 mmol/L 的硼酸硼砂缓冲液) 的底物和产物 (10 mmol *rac*- β -Phe、10 mmol 丙酮酸、0.5 mmol 3-羰基-3-苯基丙酸) 分别在酶标仪上进行紫外扫描, 检测产物 C 的特殊紫外

吸收情况, 来确定检测该反应的合适波长。确定好检测波长之后, 测定底物及产物浓度和紫外吸收的关系, 最终确定 200 μL 反应体系中, 反应速率和紫外吸收之间的关系。

再次, 在同样的反应体系中 (10 mmol 底物, pH 8.2, 浓度为 100 mmol 的硼酸硼砂缓冲液), 加入纯酶 3.5 $\mu\text{g/mL}$, 分别用酶标仪和 HPLC 来测定反应的转化率情况, 进行比较, 来验证方法的可行性。

最后, 方法确定后, 用酶标仪检测不同底物浓度条件下的反应初速度。反应在 200 mmol/L 硼酸硼砂缓冲液 (pH 8.2)、室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行 (注: 测定动力学常数时, 使用的是第二批次纯化的酶, 其他实验均为第一批次纯化的酶)。具体操作为: 将 1.89 μg 的纯酶加入到 96 微孔板中, 随后加入不同浓度的底物 (终体积为 200 μL) 启动反应, 用酶标仪检测该反应体系的紫外吸收变化, 检测波长 290 nm, 时间为 1 min, 间隔为 10 s, 这样便可以测定不同底物浓度下的反应初速度。底物浓度的具体变化情况: 当测定 HBP 对 *rac*- β -Phe 的动力学参数和底物抑制时, 固定氨基受体丙酮酸的浓度为 50 mmol/L, 使 *rac*- β -Phe 的浓度为唯一变量, 测定反应初速度; 当测定氨基受体丙酮酸时, 固定氨基供体 *rac*- β -Phe 的浓度为 10 mmol/L, 使丙酮酸的浓度为唯一变量。

酶活的定义: 25 $^{\circ}\text{C}$ 下, 在含有 10 mmol/L *rac*- β -Phe 和 10 mmol/L 丙酮酸的反应体系中, 1 min 内催化生成 1 μmol 产物 (丙氨酸或 3-羰基-3-苯基丙酸) 所需要的酶量, 即 1 U=1 $\mu\text{mol/min}$ 。

1.5 底物谱的测定

HBP 的氨基供体底物特异性采用典型的反

应体系进行测定, 但氨基供体更换成表 2 中的氨基化合物, 浓度为 10 mmol/L, 丙酮酸的浓度为 10 mmol/L, 反应温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.2 (100 mmol/L 硼酸硼砂缓冲液)。反应 5 min 后, 用 HPLC 检测产物丙氨酸的生成量来标定反应进行的程度, 检测条件与 1.4.1 相同。丙氨酸的生成量越多, 说明反应速度越快, 酶活越高。其中, 以 *rac*- β -Phe 为底物的反应为标准, 将该反应丙氨酸的生成量设定为 100%, 其他氨基供体的活力采用相对活力来表示, 即相对活力=其他氨基底物丙氨酸的生成量除以 *rac*- β -Phe 反应体系中丙氨酸的生成量 $\times 100\%$ 。测定氨基受体时, 底物反之, 条件亦然, 反应结束后, 用 HPLC 检测底物 *rac*- β -Phe 的减少量来标定反应进行的程度。

1.6 *rac*- β -Phe 及其衍生物的手性拆分

采用典型的反应体系, 氨基供体 (*rac*- β -Phe 或其衍生物) 和丙酮酸的浓度均为 10 mmol/L, 反应温度为室温 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 为 8.2 (100 mmol/L 硼酸硼砂缓冲液), 加入 66 μg 的纯酶启动反应, 反应 12 h 后, 用 HPLC 检测产物的 ee 值和底物的转化率。ee 值的检测条件与 1.4.1 条件一致; 转化率的检测条件: 色谱柱为 CROWNPAK CR (+) column (4.0 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相为高氯酸水溶液 (加入 10% 甲醇, pH 1.5), 流速为 0.5 mL/min, 等度洗脱, 检测 210 nm 条件下的紫外吸收值。

2 结果与讨论

2.1 序列比对分析

HBP 与已经报道的能够作用于芳香族 β -氨基酸的 ω -转氨酶 (分别来自 *Mesorhizobium* sp. LUK、*Polaromonas* sp. JS666、*Variovorax*

paradoxus 和 *Burkholderia graminis*) 进行 Pr-Blast, HBP 与之同源性都较高, 分别为 51%、55%、59%和 83%。这说明 HBP 极有可能作用于芳香族 β -氨基酸。

2.2 HBP 的表达纯化

将重组载体 pET32a (+)-*hbp* 转化到 BL21 (DE3) 中表达纯化, 经过 SDS-PAGE 电泳分析, 0.1 mmol IPTG、25 °C 诱导可以表达出大量的可溶性蛋白, 经过镍柱纯化后即可除去大量杂质, 得到纯酶; HBP 的单亚基分子量约为 45 kDa (图 4), 分子排阻实验测得该酶的分子量约为 91.5 kDa, 说明 HBP 由两个相同的亚基组成, 与报道的大多数 ω -转氨酶相同^[25-26]。

2.3 HBP 的最适反应 pH 和最适反应温度

HBP 的最适反应 pH 是通过测定其在不同的反应 pH 条件下的活力来确定的。观察实验结果, 可以发现 HBP 喜碱厌酸, 这一现象与已经报道的 ω -转氨酶相似^[27-28]; HBP 的最适反应 pH 在 8.0–8.5 之间 (图 5A)。

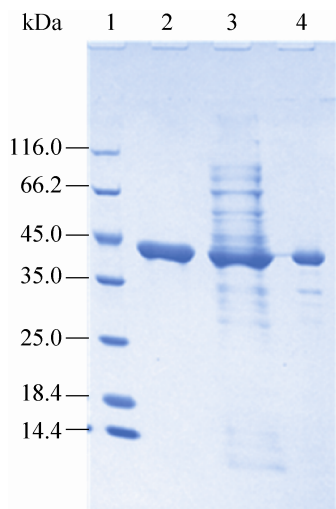


图 4 HBP 的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 4 SDS-PAGE of HBP. 1: protein marker; 2: purified HBP; 3: soluble fraction of cell extract; 4: precipitate fraction of cell extract.

选取 pH 8.2 的条件研究 HBP 的最适反应温度, 结果表明, 该酶的最适反应温度为 40 °C 左右 (图 5B), 因此后续反应在此条件下进行。

2.4 HBP 的 pH 稳定性和温度稳定性

HBP 的稳定性是通过测定不同温度和 pH 条件处理后的残余活力来测定的。pH 在 6.0–10.0 之间时, HBP 的活性能够保持 70% 以上, 而当 pH 降到酸性 pH 5.0 的时候, HBP 的活力只有处理前的 20%, 表明酶的结构已经发生了严重变化, 丧失了大部分活力 (图 5C)。

由图 5D 可以看出温度对 HBP 稳定性的影响, 在当温度低于 50 °C 时, HBP 的活力均能保持在 80% 以上, 此时酶比较稳定; 然而, 当温度高于 50 °C 后, 活力出现大幅度下降, 该酶不再稳定, 温度到达 60 °C 时, 几乎丧失了全部活力。因此, 在 HBP 的研究或应用过程中应该避免 50 °C 以上的高温。

2.5 HBP 的动力学参数和底物抑制情况

2.5.1 3-羰基-3-苯基丙酸的分解情况

β -酮酸是一种容易自发脱羧的不稳定化合物^[24], 因此我们研究了温度对产物 C (3-羰基-3-苯基丙酸) 稳定性的影响。产物 C 的稳定性与温度呈负相关 (图 6A), 不同温度处理 2 h 后其分解产物苯乙酮随着温度的升高而增加; 室温条件下, 只有 3% 左右的酮酸产物 C 分解成苯乙酮, 而当温度上升到 60 °C 时, 有 65% 左右的酮酸 C 分解成苯乙酮。产物 C 在 25 °C 条件下的分解速率为 0.03 %/min (图 6B), 分解速率极其缓慢, 1 min 内的分解对检测的影响可以忽略。实验初期, 我们误以为该反应的主要推动力是产物 C 的减少, 然而实验表明, 产物 C 在室温 25 °C 放置 12 h 后, 大部分并没有分解 (大约 14% 分解), 说明该反应平衡的主要推动力并不是产物

的减少,而是该反应在此条件下的固有性质,即该反应的热力学平衡极其偏向于丙氨酸生成

一方。这一结果,加深了我们对该反应历程的理解,对该反应的后续研究具有指导意义。

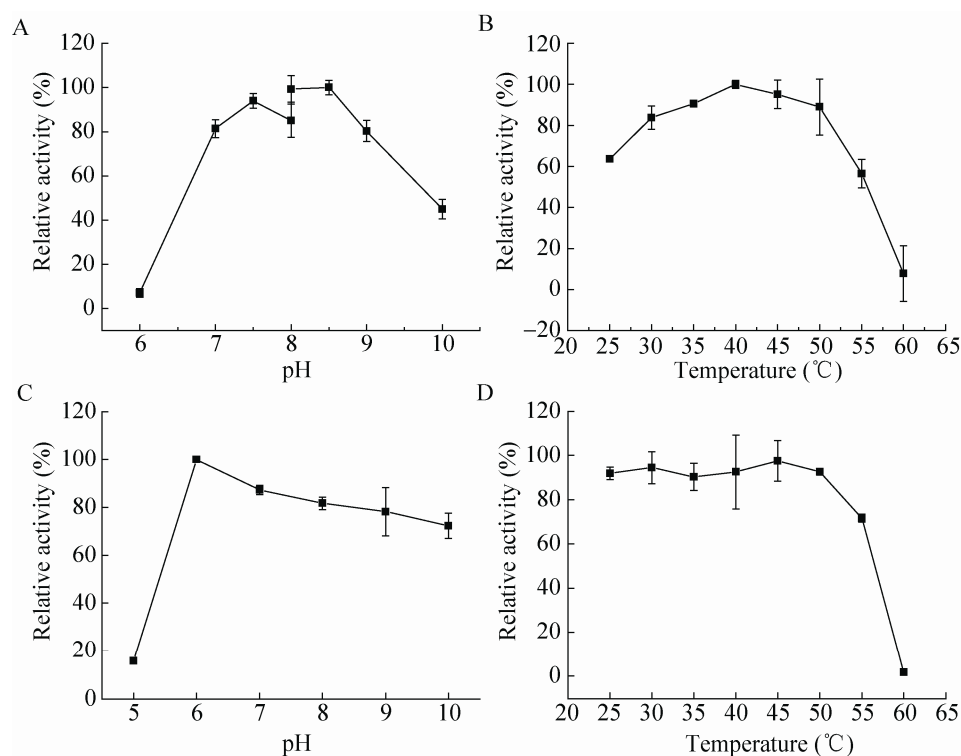


图 5 pH 和温度对 HBP 活力的影响

Fig. 5 Effect of pH and temperature on the activity and stability of HBP. (A) Effect of pH on the activity of HBP. (B) Effect of temperature on the activity of HBP. (C) Effect of pH on the stability of HBP. (D) Effect of temperature on the stability of HBP.

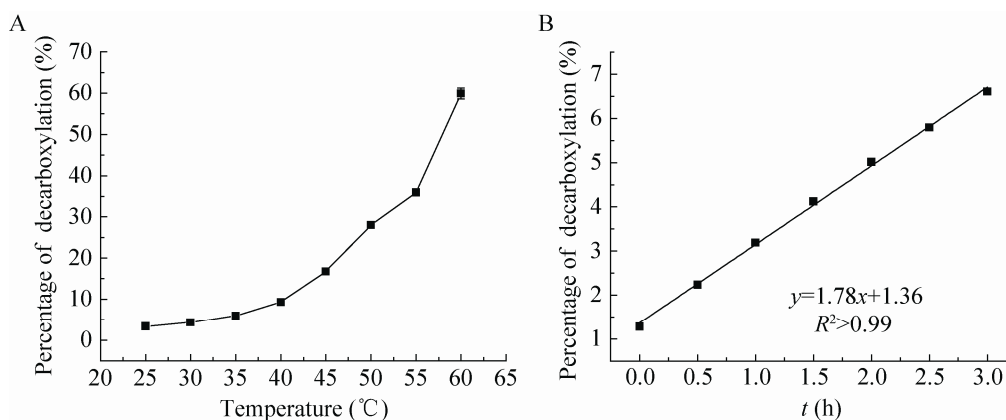


图 6 温度对 C 分解的影响和分解速率

Fig. 6 Effect of temperature on the decarboxylation of C (A) and the rate of its decarboxylation (B).

2.5.2 反应底物和产物的浓度与紫外吸收的关系

通过紫外全波长扫描,产物 C 在 250 nm 左右有最大的紫外吸收 (图 7A),但是底物丙酮酸和 β -Phe 在 250 nm 下同样具有较强的紫外吸收;考虑到仪器的量程和背景吸收的问题,因此我们选择在 290 nm 的波长下进行检测。此条件下,底物和产物 C 的紫外吸收与浓度呈线性关系,符合朗伯比尔定律 (图 7B、7C、7D)。由此我们可以计算出在 200 μ L 的反应体系 (pH 8.2 硼酸硼砂缓冲液) 下,底物浓度变化 1.0 mmol/L, ΔOD_{290} 为 0.73。

由此可知,酶的比活力计算公式为:
每分钟紫外吸收的变化($\Delta OD_{290}/\Delta t$) \times 反应液总

体积(L)/(0.73 \times 酶量)。

其中,时间 t 的单位为 min,反应液总体积为常数 200 μ L,酶量的单位为 mg。

2.5.3 紫外吸收法和 HPLC 方法的比较

相同条件下,酶标仪测定反应的转化率为 5.97% \pm 0.57%,HPLC 测定反应的转化率为 5.77% \pm 0.44%。两种方法测量的结果差距较小,因此可以采用紫外吸收法测定该反应的反应速率。并且计算得到酶活为 33.80 U/mg。

2.5.4 底物浓度对酶活的影响

采用以上建立的紫外吸收法,测定不同底物浓度条件下反应的酶活,这样不仅可以计算出 HBP 的动力学参数,还可以了解底物的抑制情

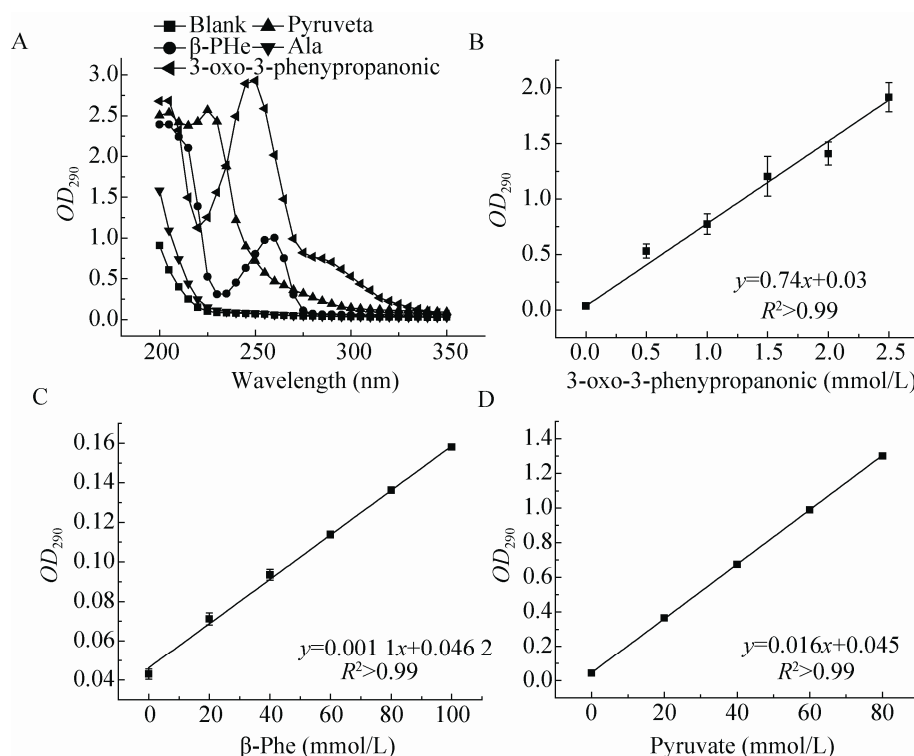


图 7 底物和产物的全波长及其 OD_{290} 与其浓度的关系

Fig. 7 The wavelength screening of substrates & products and the relations of OD_{290} & their different concentrations.

况。根据不同底物浓度下的反应初速度,由sigmaplot软件计算出HBP对 rac - β -Phe和丙酮酸的 K_m 分别是1.6 mmol/L和8.6 mmol/L, k_{cat} 分别为142.3 s^{-1} 和148.5 s^{-1} ,此时 V_{max} 分别为88.5 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 和92.9 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ (图8)。底物浓度升高时,显示出微弱的底物抑制现象,当 rac - β -Phe的浓度增加到80 mmol时,其活力为83.28 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$;当丙酮酸的浓度升高到200 mmol时,其反应速率为70.98 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 。

2.6 HBP的底物谱情况

2.6.1 氨基供体底物谱

HBP的氨基供体特性是以丙酮酸为氨基受体来测定的。由表1可以看出HBP对不同种类

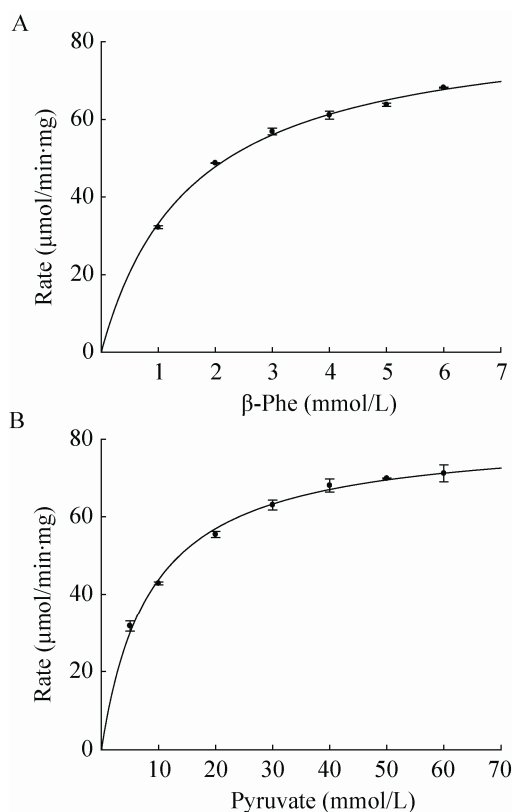


图8 HBP对底物的米氏方程曲线

Fig. 8 The Michaelis-Menten plot of HBP for substrates.

表1 HBP的氨基供体底物谱

Table 1 Amino donors specificity of HBP

No.	Substrates	Relative activity (%)
A1	<chem>N[C@@H](Cc1ccccc1)CC(=O)O</chem>	100
A2	<chem>N[C@@H](Cc1ccc(F)cc1)CC(=O)O</chem>	96.30
A3	<chem>N[C@@H](Cc1ccc(OC)cc1)CC(=O)O</chem>	128.17
A4	<chem>N[C@@H](Cc1ccc(C)cc1)CC(=O)O</chem>	88.09
A5	<chem>N[C@@H](Cc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)CC(=O)O</chem>	61.09
A6	<chem>N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)CC(=O)O</chem>	125.09
A7	<chem>N[C@@H](C(C)C)CC(=O)O</chem>	100.72
A8	<chem>N[C@@H](CCNC(=O)O)CC(=O)O</chem>	0
A9	<chem>N[C@@H](C)Cc1ccccc1</chem>	0
A10	<chem>N[C@@H](CC)Cc1ccccc1</chem>	0
A11	<chem>N[C@@H](Cc1ccccc1)CC(=O)O</chem>	0
A12	<chem>N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)O</chem>	0

的芳香族 β -氨基酸都有活性,并且活力差别不大,比较A5和A6,这两种底物的侧链都是给电子基团,A5的活力低于A1,A6的活力高于A1,因此,芳香族 β -氨基酸苯环侧链的不同,对位基团的供给电子能力并不能对反应活性造

成绝对的影响,反应活力的高低取决于底物和酶的综合性相互作用。比较特别的是,HBP 对脂肪族 β -氨基酸 A8 没有活性,却对含有支链的脂肪族 β -氨基酸 A7 活力较高,表明 HBP 的小口袋比较大,只能接受侧链相对较大的基团,不能接受侧链比较小的基团。有意思的是,对于典型的氨基供体 A9 (苯乙胺),几乎所有报道的 ω -转氨酶都对其表现出高活性^[5,11],但是 HBP 对其却没有任何活性。由上可知,HBP 催化的底物比较专一,对芳香族 β -氨基酸和支链的脂肪族 β -氨基酸有特异性。














2.6.2 氨基受体底物谱

HBP 的氨基受体底物特性是以 *rac*- β -Phe 为氨基供体来测定的。结果显示,与其他能够作用于芳香族 β -氨基酸的转氨酶^[20-22,25]相似,HBP 能够作用于含有羧酸基团的底物 B1、B2 和 B3,并且表现出完美的立体选择性,相对应的产物 ee 值在 99% 以上。对于 B4,HBP 表现出较高的活力,有意思的是,检测到 B4 对应的产物为 L-Ala,由于检测条件是碱性的,底物 B4 和其对应的产物都是酯类,所以无法确定 HBP 能否以丙酮酸乙酯为氨基受体;可以推测,此反应存在两种可能:第一,HBP 以 B4 为底物,反应生成手性的丙氨酸乙酯在碱性条件下水解生成 L-Ala;第二,HBP 不能以 B4 为底物进行反应,而是底物 B4 在碱性条件下先水解成丙酮酸,然后 HBP 以丙酮酸为底物进行反应。对于 B5,其对应的产物是具有应用价值的 γ -氨基酸^[29],可惜的是当 HBP 以 *rac*- β -Phe 作为氨基供体时,得到的两种产物 (3-氨基-3-苯基丙酸和 4-氨基-4-苯基丁酸) 结构上非常相似从而很难分离;对于醛类 B6 是一种廉价从而非常适合进行拆分的氨基受体。有趣的是,HBP 对 B7 没有活性,

B7 与 B1 相比,拥有更小的位阻,理论上应该具有相似的活性,但是 HBP 对 B7 没有活力,我们推测其底物结合口袋处,有一些特殊的结构而导致这一现象,希望之后能够通过三维结构得到解释;其他底物,B8 到 B13,其中有一些和标准底物 (β -Phe 和 丙酮酸) 的结构很相

表 2 HBP 的氨基受体底物谱

Table 2 Amino acceptors specificity of HBP

No.	Substrates	Relative activity (%)	ee (%)
B1		100	>99 (L)
B2		85.47	>99 (L)
B3		<1	>99 (L)
B4		85.47	>99
B5		33.33	>99
B6		33.33	N
B7		0	—
B8		0	—
B9		0	—
B10		0	—
B11		0	—
B12		0	—
B13		0	—

近,但是 HBP 对这些底物都没有催化活性。总之, HBP 催化的底物相对比较专一,只对特有的底物有活力。

2.7 *rac*- β -Phe 及其衍生物的手性拆分

rac- β -Phe 及其衍生物的手性拆分是在典型的反应体系中测定的。首先我们测定 HBP 对 10 mmol/L 的 *rac*- β -Phe 及其衍生物的拆分情况。反应 12 h 后,检测结果如表 3 所示,结果显示,对于 *rac*- β -Phe 及其不同的衍生物, HBP 均能有效地将其进行手性拆分,最终得到光学纯的芳香族 β -氨基酸产物。其转化率均在 50%左右, ee>99%。

为了进一步研究 HBP 手性拆分芳香族 β -氨基酸的能力,选取 *rac*- β -Phe 为代表,逐步提高底物的浓度;采用典型的反应体系,但有一些

表 3 HBP 动力学拆分 *rac*- β -Phe 及其衍生物

Table 3 Preparation of (*R*)-Phe and its derivatives using HBP-catalyzed kinetic resolution of racemic substrates

No.	Substrates	Conversion (%)	ee (%)
1		50.30±0.10	>99 ^R
2		49.42±0.39	>99
3		49.57±0.17	>99
4		50.01±0.04	>99
5		50.04±0.30	>99
6		49.78±0.54	>99

不同,缓冲液采用 200 mmol/L 的硼酸硼砂缓冲液(通过增加缓冲液的浓度来增加缓冲液的缓冲能力, pH 8.2)。底物 *rac*- β -Phe 的浓度增加到 100 mmol/L (接近饱和)时,氨基受体采用 100 mmol/L 的丙酮酸钠(丙酮酸钠取代丙酮酸,防止 pH 变化过大);反应进行 7 h, β -Phe 的 ee 值大于 99%,说明 HBP 可以将 100 mmol/L 的 *rac*- β -Phe 有效地拆分(图 9)。当我们继续增加底物浓度,到 150 mmol/L 时,反应初期底物 *rac*- β -Phe 处于溶解平衡状态,随着反应的进行, *rac*- β -Phe 逐渐溶解,反应体系逐渐清澈,24 h 后补加 66 μ g 的纯酶,总反应进行 36 h 时, ee 值达到 97.47%。

2.8 几种不同 ω -转氨酶的性质比较

根据前面的实验结果,我们将 HBP 与最近报道的能够作用于芳香族 β -Phe 的 ω -转氨酶进行了简单的比较。通过比较发现, HBP 的最适反应温度与其他几个酶比较相似,最适反应 pH 都偏向于碱性条件。手性拆分的底物浓度比较高(150 mmol),不足之处在于不能进行 β -Phe 的不对称合成(表 4)。

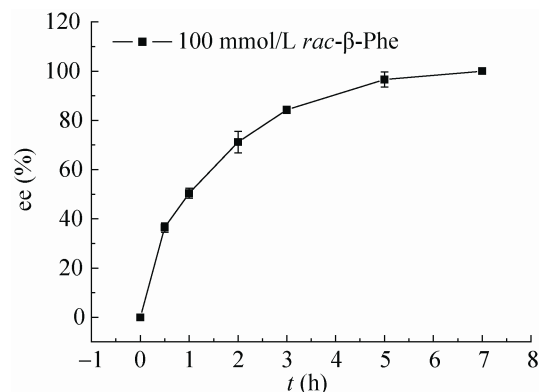


图 9 HBP 动力学拆分 100 mmol/L 的 *rac*- β -Phe

Fig. 9 Preparation of (*R*)-Phe using HBP-catalyzed kinetic resolution of 100 mmol/L *rac*- β -Phe.

表 4 几种不同 ω -转氨酶的性质比较Table 4 Comparison of different ω -transaminases

Microorganisms	Temperature optimum (°C)	pH optimum	Kinetic resolution (mmol/L)	Asymmetric synthesis	Ref
<i>Mesorhizobium</i> sp. LUK	—	7.6	—	+	20
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	—	8.5	200	+	21
<i>Variovorax paradoxus</i>	55	4–11.2	—	—	22
<i>Burkholderia graminis</i>	30–40	8.0	25	—	23
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	40	8.0–8.5	150	—	This study

3 结论

本研究中,采用基因挖矿的方法从 NCBI 数据库中发现了一个来自 *Burkholderia phytofirmans* PsJN 的新型 (*S*) 立体选择性 ω -转氨酶,并将其在 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行异源表达,之后测定了 HBP 的酶学性质、动力学参数并研究了其底物谱。HBP 最适反应 pH 在 8.0–8.5 之间,最适反应温度为 40 °C。测定过程中,建立了一种简便快捷的检测方法,加深了我们对 β -Phe 脱氨反应热力学平衡的认识。此酶表现出严格的 (*S*) 立体选择性和相对专一的底物选择性。对于氨基供体, HBP 能特异性地识别侧链比较大的芳香族 β -氨基酸,包括芳香族 β -氨基酸和带有支链的脂肪族 β -氨基酸,与已经报道的 ω -转氨酶不同的是, HBP 不能以苯乙胺为氨基供体。对于氨基受体,该酶对比较常见的氨基受体丙酮酸的活力较高,能够以 B5 (4-羰基-4-苯基丁酸) 为氨基受体,不对称合成芳香族 γ -氨基酸,遗憾的是我们尚未发现理想的氨基供体。总体而言, HBP 是一种可以有效地拆分芳香族 β -氨基酸的生物催化剂。

REFERENCES

- [1] Zhu DM, Hua L. Biocatalytic asymmetric amination of carbonyl functional groups—a synthetic biology approach to organic chemistry. *Biotechnol J*, 2009, 4(10): 1420–1431.
- [2] Koszelewski D, Tauber K, Faber K, et al. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(6): 324–332.
- [3] Bessman SP, Rossen J, Layne EC. γ -Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. *J Biol Chem*, 1953, 201(1): 385–391.
- [4] Stirling DI, Zeitlin AL, Matcham GW. Enantiomeric enrichment and stereoselective synthesis of chiral amines: US, 4950606. 1990-08-21.
- [5] Mathew S, Yun H. ω -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. *ACS Catal*, 2012, 2(6): 993–1001.
- [6] Malik MS, Park ES, Shin JS. Features and technical applications of ω -transaminases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(5): 1163–1171.
- [7] Höhne M, Bornscheuer UT. Application of transaminases//Drauz K, Gröger H, May O, Eds. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012: 779–820.
- [8] Matcham G, Bhatia M, Lang W, et al. Enzyme and reaction engineering in biocatalysis: synthesis of (*S*)-methoxyisopropylamine(= (*S*)-1-Methoxypropan-2-amine). *CHIMIA*, 1999, 53(12): 584–589.
- [9] Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, et al.

- Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science*, 2010, 329(5989): 305–309.
- [10] Jiang JJ, Chen X, Feng JH, et al. Substrate profile of an ω -transaminase from *Burkholderia vietnamiensis* and its potential for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. *J Mol Catal B: Enzym*, 2014, 100: 32–39.
- [11] Shin JS, Kim BG. Exploring the active site of amine: pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship. *J Org Chem*, 2002, 67(9): 2848–2853.
- [12] Nobili A, Steffen-Munsberg F, Kohls H, et al. Engineering the active site of the amine transaminase from *Vibrio fluvialis* for the asymmetric synthesis of aryl-alkyl amines and amino alcohols. *ChemCatChem*, 2015, 7(5): 757–760.
- [13] Höhne M, Schätzle S, Jochens H, et al. Rational assignment of key motifs for function guides *in silico* enzyme identification. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(11): 807–813.
- [14] Jiang JJ, Chen X, Zhang DL, et al. Characterization of (*R*)-selective amine transaminases identified by *in silico* motif sequence blast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(6): 2613–2621.
- [15] Grayson JJ, Roos J, Osswald S. Development of a commercial process for (*S*)- β -phenylalanine. *Org Process Res Dev*, 2011, 15(5): 1201–1206.
- [16] Preiml M, Hillmayer K, Klempier N. A new approach to β -amino acids: biotransformation of *N*-protected β -amino nitriles. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44(27): 5057–5059.
- [17] Turner NJ. Ammonia lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of α -amino and β -amino acids. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(2): 234–240.
- [18] Zhang DL, Chen X, Zhang R, et al. Development of β -amino acid dehydrogenase for the synthesis of β -amino acids *via* reductive amination of β -keto acids. *ACS Catal*, 2015, 5(4): 2220–2224.
- [19] Rudat J, Brucher BR, Sylatk C. Transaminases for the synthesis of enantiopure β -amino acids. *AMB Express*, 2012, 2(1): 11.
- [20] Kim J, Kyung D, Yun H, et al. Cloning and characterization of a novel β -transaminase from *Mesorhizobium* sp. strain LUK: a new biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure β -amino acids. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6): 1772–1782.
- [21] Bea HS, Park HJ, Lee SH, et al. Kinetic resolution of aromatic β -amino acids by ω -transaminase. *Chem Commun*, 2011, 47(20): 5894–5896.
- [22] Crismaru CG, Wybenga GG, Szymanski W, et al. Biochemical properties and crystal structure of a β -phenylalanine aminotransferase from *Variovorax paradoxus*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(1): 185–195.
- [23] Mathew S, Bea H, Nadarajan SP, et al. Production of chiral β -amino acids using ω -transaminase from *Burkholderia graminis*. *J Biotechnol*, 2015, 196–197: 1–8.
- [24] Bach RD, Canepa C. Electronic factors influencing the decarboxylation of β -keto acids. A model enzyme study. *J Org Chem*, 1996, 61(18): 6346–6353.
- [25] Wybenga GG, Crismaru CG, Janssen DB, et al. Structural determinants of the β -selectivity of a bacterial aminotransferase. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28495–28502.
- [26] Rausch C, Lerchner A, Schiefner A, et al. Crystal structure of the ω -aminotransferase from *Paracoccus denitrificans* and its phylogenetic relationship with other class III aminotransferases that have biotechnological potential. *Proteins*, 2013, 81(5): 774–787.
- [27] Hwang BY, Ko SH, Park HY, et al. Identification of ω -Aminotransferase from *Caulobacter crescentus* and sitedirected mutagenesis to broaden substrate specificity. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(1): 48–54.
- [28] Kaulmann U, Smithies K, Smith MEB, et al. Substrate spectrum of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 41(5): 628–637.
- [29] Shon M, Shanmugavel R, Shin G, et al. Enzymatic synthesis of chiral γ -amino acids using ω -transaminase. *Chem Commun*, 2014, 50(84): 12680–12683.

(本文责编 郝丽芳)