

基于金属有机沸石咪唑骨架的固定化细胞的制备及其在丙谷二肽制备中的应用

张营康¹, 程婷¹, 赵飞扬¹, 易炎琴¹, 李青清¹, 卢振华², 吴绵斌², 王涛¹, 刘晓环^{1*}

1 济宁医学院生物科学学院, 山东 日照 276800

2 浙江大学化学工程与生物工程学院, 浙江 杭州 310000

张营康, 程婷, 赵飞扬, 易炎琴, 李青清, 卢振华, 吴绵斌, 王涛, 刘晓环. 基于金属有机沸石咪唑骨架的固定化细胞的制备及其在丙谷二肽制备中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1131-1141.

ZHANG Yingkang, CHENG Ting, ZHAO Feiyang, YI Yanqin, LI Qingqing, LU Zhenhua, WU Mianbin, WANG Tao, LIU Xiaohuan. Immobilizing engineered *Escherichia coli* cells into zeolitic imidazolate framework 8 for efficient biosynthesis of Ala-Gln[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1131-1141.

摘要: 来源于鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium siyangensis*)中的 α -氨基酸酯酰基转移酶(α -amino acid ester acyltransferase, SAET), 是目前发现的丙谷二肽催化合成能力最高的酶之一, 能够以非保护的 L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺合成 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺[即丙谷二肽(L-alanyl-L-glutamine, Ala-Gln)]。为了解决其在催化过程中的稳定问题, 本研究在水相体系中采用“一步法”快速制备固定化细胞(SAET@ZIF-8), 在构筑金属有机沸石咪唑骨架结构(ZIF-8)的同时, 将表达有 SAET 的大肠杆菌(*Escherichia coli*)包裹在其内部空间中。在此基础上, 对其结构、催化活性和重复使用性及储存稳定性等催化性能进行探究。结果表明, 通过该方法制备的 SAET@ZIF-8 纳米颗粒与文献报道的 ZIF-8 材料的形貌基本相同, 细胞的引入没有明显改变 ZIF-8 的形貌。重复使用 7 次后, SAET@ZIF-8 仍能保持 67%左右的初始酶活; 室温下放置 4 d 时, 固定化酶还保留有 50%左右的初始酶活, 表明 SAET@ZIF-8 具有较好的重复使用及储存稳定性。将 SAET@ZIF-8 用于丙谷二肽的催化实验中, 当反应 30 min 后丙谷二肽的浓度达到 62.83 mmol/L (13.65 g/L), 时空产率达到 0.455 g/(L·min), 相对于谷氨酰胺的转化率为 62.83%。以上结果表明, 基于金属有机沸石咪唑骨架的固定化细胞是一种高效制备丙谷二肽的方法策略。

关键词: α -氨基酸酯酰基转移酶; 金属有机框架; 沸石咪唑酸酯骨架-8; 丙谷二肽; 固定化

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2019BB062); 济宁医学院贺林院士新医学临床转化工作站科研基金(JYHL2021MS23); 2022 年大学生创新创业计划(202210443001)

This work was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (ZR2019BB062), the Research Fund for Academician Lin He New Medicine (JYHL2021MS23), and the 2022 College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (202210443001).

*Corresponding author. E-mail: lxh0704@mail.jnmc.edu.cn

Received: 2022-10-23; Accepted: 2022-12-07

Immobilizing engineered *Escherichia coli* cells into zeolitic imidazolate framework 8 for efficient biosynthesis of Ala-Gln

ZHANG Yingkang¹, CHENG Ting¹, ZHAO Feiyang¹, YI Yanqin¹, LI Qingqing¹, LU Zhenhua², WU Mianbin², WANG Tao¹, LIU Xiaohuan^{1*}

¹ School of Biological Science, Jining Medical University, Rizhao 276800, Shandong, China

² College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

Abstract: The α -amino acid ester acyltransferase (SAET) from *Sphingobacterium siyangensis* is one of the enzymes with the highest catalytic ability for the biosynthesis of L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln) with unprotected L-alanine methylester and L-glutamine. To improve the catalytic performance of SAET, a one-step method was used to rapidly prepare the immobilized cells (SAET@ZIF-8) in the aqueous system. The engineered *Escherichia coli* (*E. coli*) expressing SAET was encapsulated into the imidazole framework structure of metal organic zeolite (ZIF-8). Subsequently, the obtained SAET@ZIF-8 was characterized, and the catalytic activity, reusability and storage stability were also investigated. Results showed that the morphology of the prepared SAET@ZIF-8 nanoparticles was basically the same as that of the standard ZIF-8 materials reported in literature, and the introduction of cells did not significantly change the morphology of ZIF-8. After repeated use for 7 times, SAET@ZIF-8 could still retain 67% of the initial catalytic activity. Maintained at room temperature for 4 days, 50% of the original catalytic activity of SAET@ZIF-8 could be retained, indicating that SAET@ZIF-8 has good stability for reuse and storage. When used in the biosynthesis of Ala-Gln, the final concentration of Ala-Gln reached 62.83 mmol/L (13.65 g/L) after 30 min, the yield reached 0.455 g/(L·min), and the conversion rate relative to glutamine was 62.83%. All these results suggested that the preparation of SAET@ZIF-8 is an efficient strategy for the biosynthesis of Ala-Gln.

Keywords: α -amino acid ester acyl transferase; metal-organic frameworks; zeolitic imidazolate framework-8; L-alanyl-L-glutamine; immobilization

丙谷二肽是一种特殊的生物活性肽(L-alanyl-L-glutamine, Ala-Gln), 具有良好的水溶性、热稳定性及生物相容性。结构的特异性导致其表现出多种生理活性, 例如调节术后组织纤维化^[1]、保护角膜内皮细胞^[2]、营养补充剂^[3-4]、减少腹膜透析相关血管病变^[5]等。丙谷二肽在体内能够迅速水解释放出谷氨酰胺, 因其安全性和有效性, 已被多国批准上市作为注射液的主要营养成分用于术后患者的康复。目前丙谷二肽的生产主要依赖传统的化学合成^[6-7], 但

这些方法通常工艺比较复杂, 不仅产率低, 而且费时、费力及需要有毒化学品。在“节能减排, 绿色发展”的大背景下, 迫切需要开发一种绿色、高效的丙谷二肽生产工艺。

随着现代生物技术的不断进步, 合成生物学技术广泛应用于生物催化领域, 利用微生物酶法合成丙谷二肽也成为研究热点。目前已鉴定出 3 种蛋白酶能够以非保护的氨基酸作为底物催化合成丙谷二肽, 例如: 非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)^[8-11]、

L-氨基酸连接酶(L-amino acid ligase, Lal)^[12-14]以及 α -氨基酸酯酰基转移酶(α -amino acid ester acyltransferase, AET)^[15-17]。NRPS 是一类分子量巨大的蛋白复合物,由一系列催化结构域组成,能识别、激活、转运氨基酸底物并按特定顺序合成非核糖体肽。虽然近几年运用合成生物学的手段对 NRPS 进行工程改造不断取得突破^[18-29],但由于对 NRPS 的生物合成过程缺乏足够的认识等原因,常规的改造往往难以实现目的产物的高效合成,难以实现产业化应用^[20-22]。Lals 属于腺嘌呤核苷三磷酸依赖性羧酸-胺连接(ATP-grasp)酶超家族的一员,虽然能够催化非保护的 L-丙氨酸和 L-谷氨酰胺合成丙谷二肽,但是由于其催化效率低及底物特异性较差的问题,大大限制了其在丙谷二肽生物合成中的应用。AET 属于丝氨酸蛋白酶家族一员,能够以丙氨酸甲酯盐和 L-谷氨酰胺为底物,高效地催化合成丙谷二肽。虽然其底物谱仍然较广、稳定性有待提高,但是鉴于其极高的催化活力^[15,23],仍具有重要的应用潜力。

将生物催化剂固定在多孔结构的纳米颗粒上,可以大大提高其在反应条件下的操作稳定性及重复使用次数。金属有机骨架材料(metal-organic frameworks, MOFs)作为一种无机-有机纳米晶体材料,因具有多孔骨架结构、比表面积大、稳定性好等优势,近年来被广泛地应用于酶的固定化^[24-25]。其中类沸石咪唑酯骨架材料(zeolitic imidazolate framework, ZIF)是由金属原子(Zn、Co)和咪唑,或者是咪唑衍生物组装而成。由于在沸石分子筛中的硅或铝原子被过渡金属(如锌或铝)所取代,并且咪唑配体取代了其中的氧桥。所以,这种 ZIFs 不仅具备了传统沸石的优点,同时也拥有 MOFs 材料的优点,例如在比表面积、孔体积、孔道结构、稳定性等方面都具有很好的优势。

为了解决 SAET 在催化过程中稳定性差的问题,本研究通过“一锅法”,将其与形成 ZIF-8 材料的原料液直接混合,在晶胞骨架形成的同时将工程细胞包埋在 MOFs 晶体内部,获得 SAET@ZIF-8 纳米颗粒。这样既能实现催化细胞的固定化,又因为 ZIF-8 框架的屏蔽作用,对催化酶活性位点起到很好的保护作用而提高其稳定性。同时以丙谷二肽的生物合成反应为模型反应,考察了纳米催化剂 SAET@ZIF-8 的催化活性,探讨了游离细胞及固定化细胞的操作稳定性,并考察了其在丙谷二肽生物合成中的应用情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本实验所用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* Origami(DE3)及质粒 pET28(a)均为实验室保存。来源于 *Sphingobacterium siyangensis* AJ 2458 的 *saet* 基因(GenBank 登录号: AB610978.1)由生工生物工程(上海)股份有限公司优化并化学合成。*E. coli* DH5 α 用于质粒构建及其他基因操作, *E. coli* Origami(DE3)用于 SAET 蛋白的异源表达。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I, T4 DNA 连接酶, PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase, 购自 TaKaRa 公司。细菌质粒小量抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒及相关电泳 Marker 购自 Solarbio 公司。

培养基(Luria-Bertani 培养基)、抗生素(卡那霉素, 50 μ g/mL)及其他生化试剂均购自国药集团。

1.2 方法

1.2.1 SAET 蛋白表达载体的构建、异源表达及酶活测定方法

PCR 克隆合成的 *saet* 基因,在该过程中在该

序列的上下游分别引入限制性内切酶 *Nde I/Xho I* 的酶切位点, 将 PCR 扩增产物用 *Nde I/Xho I* 双酶切后并克隆至载体 pET28(a)。经酶切和 PCR 验证后, 对所获得的阳性克隆进一步测序验证, 将测序正确的阳性质粒命名为 pET28(a)-S。

将 pET28(a)-S 质粒通过热激法转化到 *E. coli* Origami(DE3)感受态细胞中, 挑取转化子通过菌液 PCR 进行验证, 将阳性转化子命名为 Ep28S。将 Ep28S 接种于含有浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 50 mL Luria-Bertani 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 左右加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)。16 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 10–12 h, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 $\times g$ 离心 10 min 收集菌体, 并用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.0)洗涤 3 次。

取 0.5 mL 菌液, 加入 500 μL 含有 10 mmol/L Gln、15 mmol/L Ala-OMe-HCl、pH 9.0 的 0.1 mol/L 硼酸-NaOH 缓冲液, 混匀后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 30 min, 6 000 $\times g$ 离心 5 min, 取反应液测定丙谷二肽浓度。丙谷二肽的浓度通过高效液相法检测, 具体如前文所述^[16]。

1.2.2 SAET@ZIF8 的合成和结构鉴定

通过“一锅法”, 将诱导后的工程细胞与形成 ZIF-8 材料的原料液直接混合, 在晶胞骨架形成的同时将细胞引入“孔道”中^[25,26], 具体实验方法参考^[26]。100 mL 烧杯中加入 500 μL 聚乙烯吡咯烷酮溶液(Mw: 10 000, 10 mg/mL)和 2.5 mL 细胞悬液($OD_{600}=3$), 混合均匀, 再加入 2 mL $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液(0.3 mol/L)和 25 mL 2-甲基咪唑溶液(1.25 mol/L), 混合均匀后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时搅拌 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min, 除去上层液体; 并用硼酸缓冲液洗涤, 除去游离的细胞。重复洗涤 3 次后, 将得到的纳米颗粒真空冷冻干燥 10 h, 将获得的 MOF 纳米颗粒命

名为 SAET@ZIF8。作为阳性对照, 利用同样的方法, 将能够表达绿色荧光蛋白的工程大肠杆菌(实验室保存)进行固定化, 将获得的纳米颗粒命名为 GFP@ZIF-8。

SAET@ZIF8 的形貌特征表征由以下技术手段表征: 荧光显微镜(FM, S2 Ranger, Bruker); Hitachi HT7700 型发射扫描电子显微镜(TEM), 在加速电压 120 kV 下, 观察样品的表面形貌; Hitachi SU8010 型发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM), 在加速电压 20.0 kV 下, 观察样品的表面形貌; FTIR Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪进行红外光谱测定, 扫描波数范围为 0 cm^{-1} 到 4 500 cm^{-1} , 但由于实验需要, 只需截取 400–4 000 cm^{-1} 范围内的数据进行分析即可; X-射线粉末衍射分析(XRD)采用岛津 X 射线衍射仪(XRD-7000)。

1.2.3 基于 SAET@ZIF-8 的丙谷二肽制备及其稳定性分析

取 50 mg SAET@ZIF-8, 加入 1.0 mL 含有 100 mmol/L Gln、125 mmol/L Ala-OMe-HCl、pH 8.5 的底物溶液, 混匀后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 40 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取反应液上清按 1.2.4 中所述测定丙谷二肽浓度。

重复使用性: 按照上述的方法进行催化实验。重复测定 10 次, 确定 SAET@ZIF-8 重复使用稳定性; 并以游离细胞作为对照进行实验。

储存稳定性: 取 10 g SAET@ZIF-8 在室温下(25 $^{\circ}\text{C}$)储存, 每隔 1 d 取出 50 mg SAET@ZIF-8 测定其催化能力的变化, 确定其储存稳定性; 并以游离细胞作为对照进行实验。

1.2.4 分析方法

本研究中以邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)作为柱前衍生化试剂, 结合高效液相色谱法, 测定体系中底物氨基酸及产物丙谷二肽的浓度^[27]。衍生后, 用 0.22 μm 有机滤膜过

滤, 静置 15 min 后进样分析, 进样量 10 μL 。

具体条件如下: UPLC (Waters); C18 柱 (Agilent 5TC-C18, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm ; Agilent Technologies Inc., American), 流动相: 磷酸缓冲液(12.5 mmol/L, pH 7.2):乙腈=83:17; 流速 1 mL/min。检测器: PDA 检测器(激发波长 338 nm, 发射波长 450 nm)^[16]。

一个酶活单位定义为 1 min 内生成 1 μmol 产物所需催化剂的量。

2 结果与分析

2.1 SAET@ZIF-8 纳米颗粒的结构鉴定

由于细胞被包裹在 ZIF-8 的内部, 通过扫描电镜与透射电镜一般难以观察到其内部的情况; 另外, 由于本研究利用聚乙烯吡咯烷酮为添加剂, 以 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 和 2-甲基咪唑为原料制备 ZIF-8 纳米颗粒, 在这一过程中未参与形成晶胞骨架的固体原料及未能被成功包埋的细胞会被同时洗脱下来, 这样就会给细胞浓度测定造成很大的干扰, 导致无法准确计算细胞固定化效率。因此本研究中以表达有绿色荧光蛋白的大肠杆菌作为对照菌, 按照同样的方法进行固定。通过荧光显微镜分析发现(图 1), 被绿色荧光蛋白标记的细胞能够被成功地包裹, 并均匀分散在纳米颗粒的内部; 后续的扫描电镜同时显示该纳米颗粒粒径较为均匀, 颗粒较大, 这表明利用该方法具有较高的细胞固定化效率。

2.1.1 傅里叶红外光谱分析 SAET@ZIF-8 的结构

ZIF-8 是目前应用十分广泛的一种有机金属骨架材料, 其可以在水溶液中以 2-甲基咪唑为有机配体, 与金属 Zn^{2+} 通过自组装构成笼状配位化合物 ZIF-8。近年来, 通过“一锅法”, 将酶(细胞)加入到 ZIF-8 前体物中, 在 ZIF-8 形成过程中将酶与 ZIF-8 晶体共沉淀包埋 ZIF-8

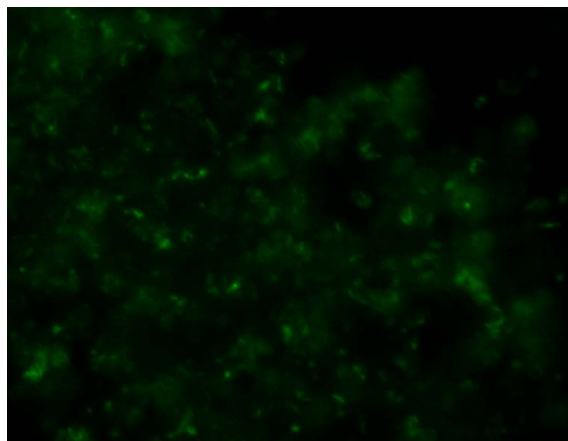


图 1 荧光显微镜分析 GFP@ZIF-8 的结构

Figure 1 Analysis of the prepared GFP@ZIF-8 nanocomposites by fluorescence microscope.

的空隙和网格中, 这种方法制备的固定化酶稳定性好, 对酶的保护效果好, 应用较为普遍。由于 ZIF-8 的 Zn^{2+} 供体主要有 2 种(硝酸锌和醋酸锌), 然而不同 Zn^{2+} 供体是否会对目标酶或者细胞造成破坏仍需要进一步的验证, 所以本实验中采用物理化学性质相对温和的硝酸锌作为 Zn^{2+} 供体。因此, 对获得的 SAET@ZIF-8 进行结构鉴定尤为重要。本研究中, 以自组装的 ZIF-8 晶体作为对照, 验证所获得的固定化细胞 SAET@ZIF-8 的结构合理性。

红外光谱分析是通过分子振动、转动光谱研究分子结构的一种技术, 能识别有机官能团。如图 2 所示, SAET@ZIF-8 与 ZIF-8 衍射峰分布规律基本一致。同时, 可以发现 SAET@ZIF-8 在 422 cm^{-1} 处出现 ZIF-8 的 Zn-N 键的伸缩振动吸收峰^[28], 在 694 cm^{-1} 和 760 cm^{-1} 处出现咪唑环的平面外弯曲特异吸收峰, 在 $1\,310\text{ cm}^{-1}$ 处出现咪唑环的平面内弯曲特异吸收峰^[29], 这些特异吸收峰与文献中报道的 ZIF-8 的特异吸收峰一致。同时, SAET@ZIF-8 在约 $1\,640\text{--}1\,660\text{ cm}^{-1}$ 出现蛋白质的酰胺键的特异吸收峰^[30]。在 $2\,925\text{ cm}^{-1}$ 和 $3\,124\text{ cm}^{-1}$ 附近处出现咪唑的脂肪族和芳香族

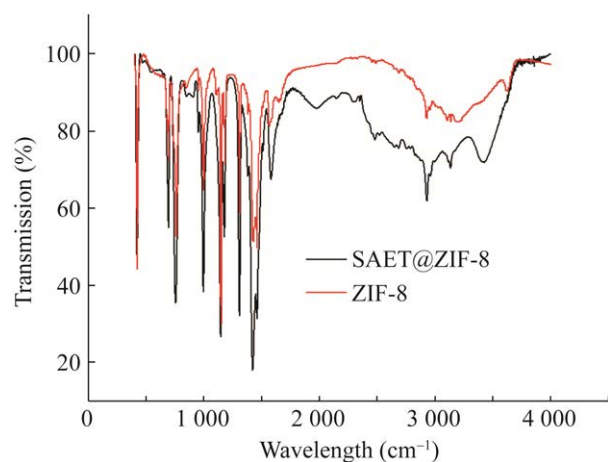


图2 傅里叶红外光谱分析 ZIF-8 及 SAET@ZIF-8 的结构

Figure 2 FTIR analysis of ZIF-8 and SAET@ZIF-8.

的 C-H 键的伸缩振动吸收峰,与文献报道一致。另外,在 2 000–4 000 cm^{-1} 区间内二者的不一致,主要是由于细胞中 $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ 及其他含氢化学键所致。综合以上分析表明:细胞被包进了 ZIF-8 纳米颗粒中,且细胞固定化对 ZIF-8 的晶体结构没有显著的影响。

2.1.2 X 射线衍射(XRD)分析 SAET@ZIF-8 的结构

图 3 显示 SAET@ZIF-8 与 ZIF-8 的 XRD 图谱基本一致,衍射峰位相同,也与文献报道的特征衍射峰相符($2\theta=7.32^\circ$, 10.36° , 12.7° , 14.66° , 16.42° , 18.02° , 22.12° , 24.5° , 25.6° , 26.64° , 29.66° , 30.56° 等)^[31]。表明本研究中所采用的方法能够得到具有高结晶度的沸石咪唑骨架结构材料,同时细胞的引入不会影响 ZIF-8 骨架的基本形态^[32]。

2.1.3 SAET@ZIF-8 的扫描电镜与透射电镜分析

由图 4、图 5 发现,SAETL@ZIF-8 与标准的 ZIF-8 纳米颗粒的形貌基本相同^[33],表明细胞的引入没有明显改变 ZIF-8 的形态结构。SAETL@ZIF-8 生长粒径大小相对均匀,直径约为 775 nm,呈现标准的菱形十二面体的形态。

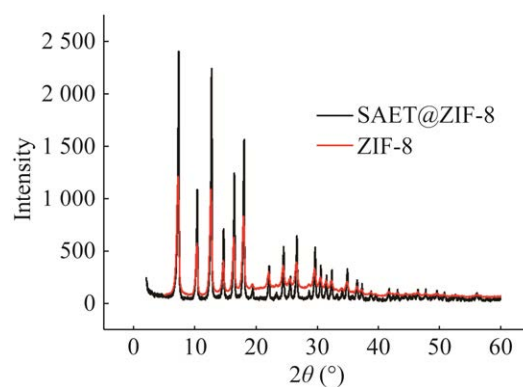


图3 ZIF-8 及 SAET@ZIF-8 的 XRD 谱图

Figure 3 XRD patterns of particles ZIF-8 and SAET@ZIF-8.

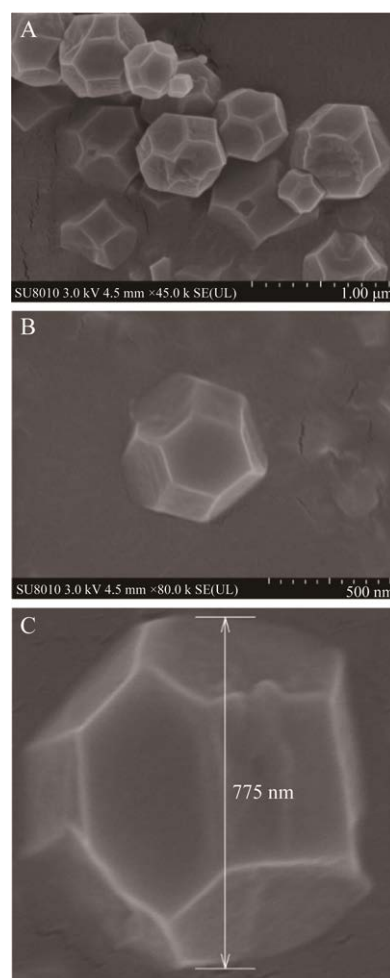


图4 SAET@ZIF-8 的 SEM 图

Figure 4 SEM analysis of SAET@ZIF-8. A: Nano-particles of SAET@ZIF-8. B: Nano-particle of SAET@ZIF-8. C: Particle size of SAET@ZIF-8.

与常规的 ZIF-8 颗粒相比(~ 400 nm), 本研究中制备的固定化纳米颗粒, 明显较大, 这可能是细胞引入所致。同时发现 SAETL@ZIF-8 表面出现了不同程度的不规则凹陷, 这可能也是由于其内部负载填充了细胞引起的; 另外, 可能是由于咪唑浓度的不同导致, 因为研究发现咪唑能够直接影响金属有机框架物的整体空间结构, 对 ZIF-8 的空间结构起到支撑作用。

2.2 SAET@ZIF-8 的重复使用性和储藏稳定性

如图 6A 所示, SAET@ZIF-8 残留催化活力

随着使用次数的增加逐渐降低, 当重复利用 4 次 ($\sim 90\%$) 后, 催化活力出现急剧的下降, 但重复使用了 7 次之后, 其仍保留原始催化活力的 67% 左右; 而游离细胞当重复使用 4 次后, 仅保留大约 50% 左右的原始酶活力, 这表明 SAET@ZIF-8 具有较好的重复使用稳定性。如图 6B 所示, 室温储存条件下($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), SAET@ZIF-8 酶活残留率随着天数的增加, 下降趋势明显, 第 4 天时, 固定化酶还保留有初始酶活的 50% 左右, 而游离的细胞此时仅残留约 20% 的原始酶活

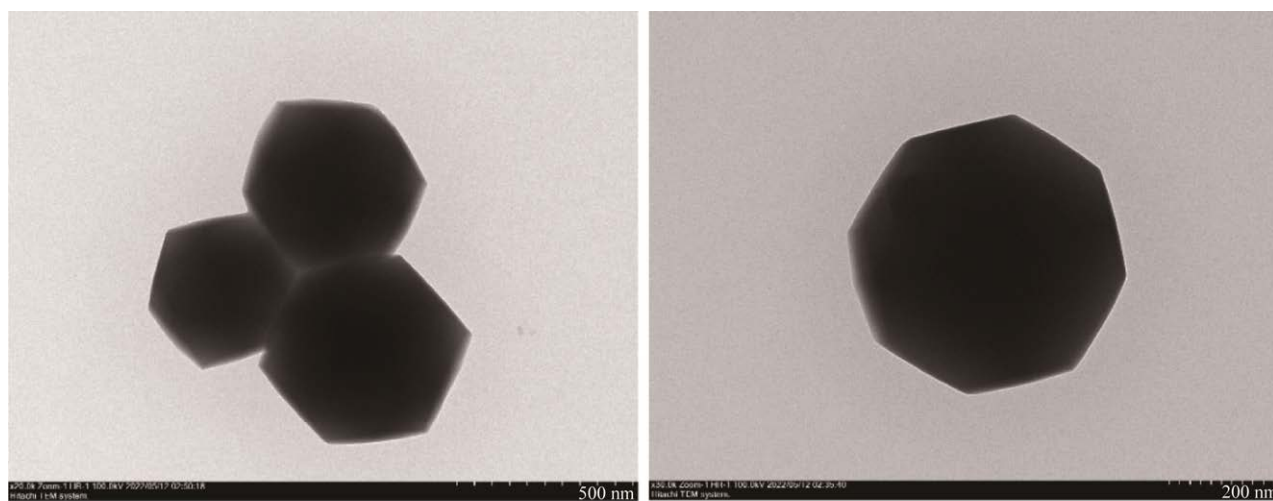


图 5 SAET@ZIF-8 的 TEM 图

Figure 5 TEM analysis of SAET@ZIF-8.

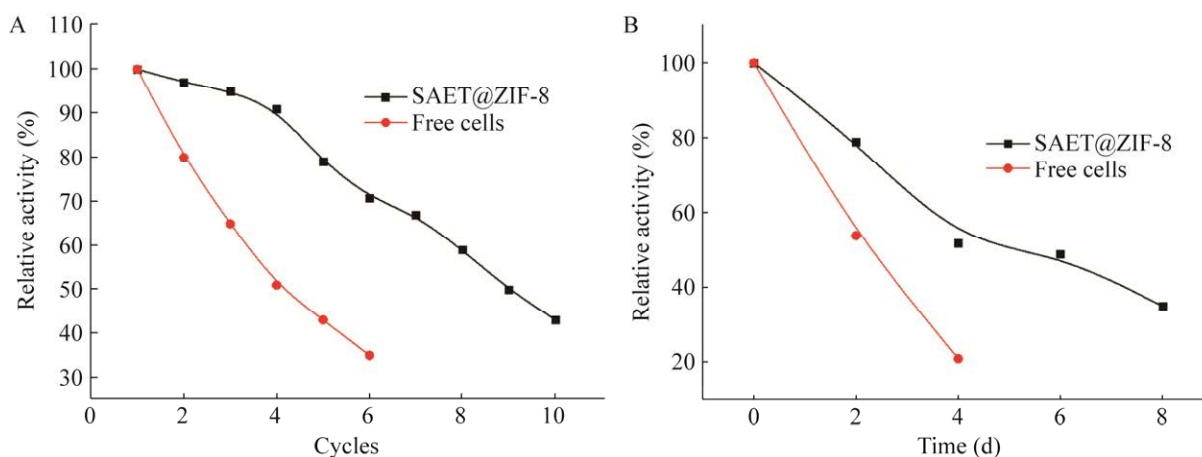


图 6 SAET@ZIF-8 重复使用性(A)及储存稳定(B)实验

Figure 6 Reusability (A) and stability (B) of SAET@ZIF-8.

力,说明 ZIF-8 的固定化延长了 SAET 的储存时间,使其储存稳定性得到了提高。

2.3 SAET@ZIF-8 在丙谷二肽生物合成中的应用

根据前期的研究结果发现,SAET 在催化合成丙谷二肽的反应中,反应底物的配比对丙谷二肽的最终产量有重要影响;因此本研究采用谷氨酰胺和丙氨酸甲酯盐酸盐的添加比例为 0.8^[34-36],即固定丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度为 125 mmol/L,谷氨酰胺的浓度为 80 mmol/L,在 25 °C、pH 8.5 条件下进行反应。结果如图 7 所示,丙谷二肽的产量随着反应时间的增加而增大。当反应 20 min 时,丙谷二肽的产量趋于最大水平,当反应 30 min 后丙谷二肽的浓度达到 62.83 mmol/L (13.65 g/L),此时丙谷二肽的时空产率达到 0.455 g/(L·min),相对于谷氨酰胺的转化率为 62.83%。

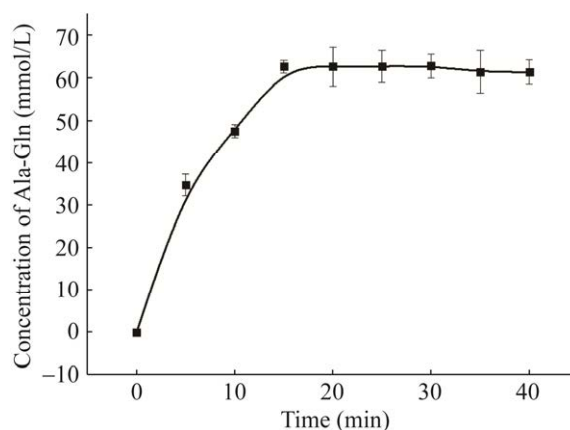


图 7 SAET@ZIF-8 催化合成丙谷二肽的过程曲线
Figure 7 Time-course of Ala-Gln synthesized by SAET@ZIF-8.

相较于之前的研究(表 1),本研究中丙谷二肽的时空产率偏小,一方面是由于本研究采用的底物浓度较小[(125 mmol/L (Ala·OMe)/谷氨酰胺 80 mmol/L (Gln))。有研究指出,当谷氨

表 1 利用 L-氨基酸连接酶及 α -酯酰基转移酶生物合成丙谷二肽的结果对比

Table 1 Biosynthesis of Ala-Gln catalyzed by L-amino acid ligase and α -amino acid ester acyltransferase

Enzymes	Operation mode	Substrate (mmol/L)	Yield (Ala-Gln)	Productivity	Mole conversion rate (% Gln)	Time	References
Lals	Catalyzed by pure enzyme	L-Ala/L-Gln=20/20	2.59 mmol/L	0.370 mg/(L·min)	12.95	26 h	[14]
	Catalyzed by engineered <i>E. coli</i>	L-Ala/L-Gln=125/100	71.70 mmol/L	14.400 mg/(L·min)	71.70	18 h	[15]
	Feed batch fermentation of engineered <i>E. coli</i>	/	100.10 mmol/L	7.600 mg/(L·min)	/	47 h	[37]
	Catalyzed by pure enzyme	L-Ala/L-Gln=30/30	22.40 mmol/L	5.800 mg/(L·min)	74.70	14 h	[38]
AETs	Catalyzed by pure enzyme	AlaOMe/Gln=100/200	83.00 mmol/L	0.150 g/(L·min)	63.00	120 min	[7]
	Catalyzed by immobilized engineered <i>E. coli</i>	AlaOMe/Gln=200/400	55.80 g/L	2.790 g/(L·min)	45.00	20 min	[16]
	Catalyzed by immobilized engineered <i>E. coli</i>	AlaOMe/Gln=100/100	73.30 mmol/L	0.796 g/(L·min)	73.30	20 min	[17]
	Catalyzed by immobilized engineered <i>E. coli</i>	AlaOMe/Gln=524/524	321.00 mmol/L 69.70 g/L	1.740 g/(L·min)	67.00	40 min	[24]
	Catalyzed by pure enzyme	AlaOMe/Gln=600/480	78.20 g/L	1.955 g/(L·min)	75.00	40 min	[35]
	Catalyzed by immobilized engineered <i>Pichia pastoris</i>	AlaOMe/Gln=150/100	63.50 mmol/L	0.345 g/(L·min)	63.50	40 min	[36]
	Catalyzed by immobilized engineered <i>E. coli</i>	AlaOMe/Gln=125/80	62.83 mmol/L	0.455 g/(L·min)	62.83	20 min	This study

/: No given.

酰胺和丙氨酸甲酯盐酸盐的添加比例为 0.8 时, SAET 的催化效率最高; 同时底物浓度的变化都会造成丙谷二肽的产率及摩尔转换率出现不同程度的下降(约 12%–15%)^[16,36]。另一方面, 本研究中发现通过常规的实验手段利用大肠杆菌(*E. coli* Origami(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* Origami(DE3)、*E. coli* CondonPlus(DE3)及 pET 系列载体 pET28(a)、pET30(a)、pETDuet 在进行 SAET 的异源表达时, 会产生较多的包涵体, 造成比酶活的降低。因此, 在前期的实验中通过筛选我们选择表达效果较好的 *E. coli* Origami(DE3)为宿主进行后续的实验, 在一定程度上解决蛋白表达的问题。但该方法也不能完全解决包涵体产生的问题, 目前课题组正在探索利用枯草芽孢杆菌 BS168 及表达载体 pHT43 进行 SAET 的分泌型表达, 期望可以从根本上解决包涵体产生的问题, 从而提高其催化效率。

3 结论

α -氨基酸酯酰基转移酶 SAET 是目前发现的催化合成丙谷二肽效率最高的蛋白酶之一, 但由于其底物特异性与稳定性的问题限制了其进一步的工业化应用。本研究中利用“一锅法”, 在室温水相的温和条件下, 将表达有 SAET 的工程菌, 通过自组装的方式被均匀地“包埋”在 ZIF-8 金属有机骨架网络中, 成功制备了固定化细胞 SAET@ZIF-8。该方法反应条件温和, 操作简单; 同时利用 ZIF-8 纳米颗粒提供的刚性屏蔽环境, 可以有效改善催化剂(细胞)的稳定性(如储存稳定性)及可重复利用效率。重复使用 7 次后, 其相对活性仍能保持 67%左右; 储存 4 d 后, 仍能保留有初始酶活的 50%左右。反应 30 min 后丙谷二肽的时空产率达到 0.455 g/(L·min), 相对于谷氨酰胺的转化率为 62.83%。这表明基

于金属有机沸石咪唑骨架的细胞固定化适合应用于丙谷二肽的生物合成体系中, 同时也将为 SAET 的产业化应用提供借鉴和参考。

REFERENCES

- [1] ROBERTSON LM, FLETCHER NM, DIAMOND MP, SAED GM. Evitar (L-alanyl-L-glutamine) regulates key signaling molecules in the pathogenesis of postoperative tissue fibrosis[J]. Reproductive Sciences, 2019, 26(6): 724-733.
- [2] JIN MY, WANG YZ, WANG YX, LI YP, WANG GL, LIU XZ, XUE YH, LIU ZG, LI C. Protective effects on corneal endothelium during intracameral irrigation using N-(2)-L-alanyl-L-glutamine[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 369.
- [3] McCORMACK WP, HOFFMAN JR, PRUNA GJ, JAJTNER AR, TOWNSEND JR, STOUT JR, FRAGALA MS, FUKUDA DH. Effects of L-alanyl-L-glutamine ingestion on one-hour run performance[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2015, 34(6): 488-496.
- [4] TOM DIECK H, SCHÖN C, WAGNER T, PANKOKE HC, FLUEGEL M, SPECKMANN B. A synbiotic formulation comprising *Bacillus subtilis* DSM 32315 and L-alanyl-L-glutamine improves intestinal butyrate levels and lipid metabolism in healthy humans[J]. Nutrients, 2021, 14(1): 143.
- [5] HERZOG R, BARTOSOVA M, TARANTINO S, WAGNER A, UNTERWURZACHER M, SACNUN JM, LICHTENAUER AM, KUSTER L, SCHAEFER B, ALPER SL, AUFRICHT C, SCHMITT CP, KRATOCHWILL K. Peritoneal dialysis fluid supplementation with alanyl-glutamine attenuates conventional dialysis fluid-mediated endothelial cell injury by restoring perturbed cytoprotective responses[J]. Biomolecules, 2020, 10(12): 1678.
- [6] WANG MF, QI W, YU QX, SU RX, HE ZM. Kinetically controlled enzymatic synthesis of dipeptide precursor of L-alanyl-L-glutamine[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2011, 58(6): 449-455.
- [7] YOKOZEKI K, HARA S. A novel and efficient enzymatic method for the production of peptides from unprotected starting materials[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(2): 211-220.
- [8] CALCOTT MJ, OWEN JG, ACKERLEY DF. Efficient rational modification of non-ribosomal peptides by

- adenylation domain substitution[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4554.
- [9] PATTESON JB, DUNN ZD, LI B. *In vitro* biosynthesis of the nonproteinogenic amino acid methoxyvinylglycine[J]. Angewandte Chemie, 2018, 130(23): 6896-6901.
- [10] SHI J, XU X, LIU PY, HU YL, ZHANG B, JIAO RH, BASHIRI G, TAN RX, GE HM. Discovery and biosynthesis of guanipiperazine from a NRPS-like pathway[J]. Chemical Science, 2021, 12(8): 2925-2930.
- [11] KANO S, SUZUKI S, HARA R, KINO K. Synthesis of D-amino acid-containing dipeptides using the adenylation domains of nonribosomal peptide synthetase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(13): e00120-e00119.
- [12] WANG T, ZHANG YF, NING LX, WANG YF, LIU XH, LI R, CHEN XE. L-amino acid ligase: a promising alternative for the biosynthesis of L-dipeptides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 136: 109537.
- [13] LIU XH, NING LX, ZHANG YF, WANG YF, LU ZH, WANG T. Rational engineering of BaLal₁₆ from a novel *Bacillus amyloliquefaciens* strain to improve catalytic performance[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 146: 109781.
- [14] ZHU JM, YANG W, WANG BH, LIU Q, ZHONG XT, GAO QX, LIU JZ, HUANG JZ, LIN BX, TAO Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-alanyl-L-glutamine[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-10.
- [15] PEI XZ, LI YM, DU C, YUAN TG, FAN C, HONG H, YUAN WJ. Production of L-alanyl-L-glutamine by immobilized *Escherichia coli* expressing amino acid ester acyltransferase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 6967-6976.
- [16] LI YM, YUAN WJ, GAO JQ, FAN C, WU WZ, BAI FW. Production of L-alanyl-L-glutamine by recycling *E. coli* expressing α -amino acid ester acyltransferase[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1603-1609.
- [17] YOKOZEKI K, ABE I. A novel route for aspartame production by combining enzymatic and chemical reactions for industrial use[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2021, 85(2): 464-466.
- [18] WATZEL J, HACKER C, DUCHARDT-FERNER E, BODE HB, WÖHNERT J. A new docking domain type in the peptide-antimicrobial *Xenorhabdus* peptide producing nonribosomal peptide synthetase from *Xenorhabdus bovienii*[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15(4): 982-989.
- [19] BOZHÜYÜK KAJ, FLEISCHHACKER F, LINCK A, WESCHE F, TIETZE A, NIESERT CP, BODE HB. *De novo* design and engineering of non-ribosomal peptide synthetases[J]. Nature Chemistry, 2018, 10(3): 275-281.
- [20] BROWN AS, CALCOTT MJ, OWEN JG, ACKERLEY DF. Structural, functional and evolutionary perspectives on effective re-engineering of non-ribosomal peptide synthetase assembly lines[J]. Natural Product Reports, 2018, 35(11): 1210-1228.
- [21] LIU XY, HUA KM, LIU DX, WU ZL, WANG Y, ZHANG HR, DENG ZX, PFEIFER BA, JIANG M. Heterologous biosynthesis of type II polyketide products using *E. coli*[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15(5): 1177-1183.
- [22] POGOREVC D, TANG Y, HOFFMANN M, ZIPF G, BERNAUER HS, POPOFF A, STEINMETZ H, WENZEL SC. Biosynthesis and heterologous production of argyrins[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(5): 1121-1133.
- [23] HIRAO Y, MIHARA Y, KIRA I, ABE I, YOKOZEKI K. Enzymatic production of L-alanyl-L-glutamine by recombinant *E. coli* expressing α -amino acid ester acyltransferase from *Sphingobacterium siyangensis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77(3): 618-623.
- [24] NADAR SS, RATHOD VK. Facile synthesis of glucoamylase embedded metal-organic frameworks (glucoamylase-MOF) with enhanced stability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 511-519.
- [25] CHEN XG, DI HJ, LI SX, LIU XD, TING C, ZHAO FY, CHEN HG, LU ZH, LIU XH, WANG T. Cell@MOF nanocomposites with improved catalytic performance for the enzymatic biosynthesis of Ala-Gln[J]. Catalysis Letters, 2022, 152(11): 3213-3219.
- [26] LYU FJ, ZHANG YF, ZARE RN, GE J, LIU Z. One-pot synthesis of protein-embedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities[J]. Nano Letters, 2014, 14(10): 5761-5765.
- [27] JONES BN, GILLIGAN JP. *o*-phthalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids[J]. Journal of Chromatography A, 1983, 266: 471-482.
- [28] JIAN MP, LIU B, LIU RP, QU JH, WANG HT, ZHANG XW. Water-based synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 with high morphology level

- at room temperature[J]. RSC Advances, 2015, 5(60): 48433-48441.
- [29] LIANG H, JIANG SH, YUAN QP, LI GF, WANG F, ZHANG ZJ, LIU JW. Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: improved stability and an enzyme cascade for glucose detection[J]. Nanoscale, 2016, 8(11): 6071-6078.
- [30] WANG XL, SHI JF, LI Z, ZHANG SH, WU H, JIANG ZY, YANG C, TIAN CY. Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(16): 14522-14532.
- [31] Tu M, Wiktor C, Rösler C, Fischer RA. Rapid room temperature syntheses of zeolitic-imidazolate framework (ZIF) nanocrystals[J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(87):13258-13260.
- [32] KIDA K, OKITA M, FUJITA K, TANAKA S, MIYAKE Y. Formation of high crystalline ZIF-8 in an aqueous solution[J]. CrystEngComm, 2013, 15(9): 1794.
- [33] PAN YC, LIU YY, ZENG GF, ZHAO L, LAI ZP. Rapid synthesis of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) nanocrystals in an aqueous system[J]. Chemical Communications, 2011, 47(7): 2071.
- [34] 刘鹏飞, 陆启蒙, 胡雪芹, 侯学文, 张洪斌. α -氨基酸酯酰基转移酶表达纯化、酶学性质及其催化应用[J]. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1169-1177.
- LIU PF, LU QM, HU XQ, HOU XW, ZHANG HB. Expression, purification, characterization and application of α -amino acid ester acyltransferase from recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(7): 1169-1177 (in Chinese).
- [35] LI YM, GAO JQ, PEI XZ, DU C, FAN C, YUAN WJ, BAI FW. Production of L-alanyl-L-glutamine by immobilized *Pichia pastoris* GS115 expressing α -amino acid ester acyltransferase[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-12.
- [36] ABE I, HARA S, YOKOZEKI K. Gene cloning and characterization of α -amino acid ester acyl transferase in *Empedobacter brevis* ATCC 14234 and *Sphingobacterium siyangensis* AJ2458[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(11): 2087-2092.
- [37] TABATA K, HASHIMOTO SI. Fermentative production of L-alanyl-L-glutamine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain expressing L-amino acid α -ligase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6378-6385.
- [38] 洪翔, 朱新雅, 贾子樊, 黄晗, 谭旭, 范晓光. 利用重组枯草芽孢杆菌 L-氨基酸连接酶合成丙谷二肽[J]. 发酵科技通讯, 2017, 46(2): 83-87.
- HONG X, ZHU XY, JIA ZF, HUANG H, TAN X, FAN XG. Enzymatic synthesis of L-alanyl-L-glutamine by L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis*[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2017, 46(2): 83-87 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)