

# 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶在大肠杆菌中的表达及酶转化生产 $\beta$ -丙氨酸

赵连真<sup>1,2</sup> 张梁<sup>1,2</sup> 石贵阳<sup>1,2\*</sup>

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】克隆谷氨酸棒杆菌来源 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因, 实现其在大肠杆菌中的异源表达, 并进行酶转化 L-天冬氨酸合成  $\beta$ -丙氨酸的研究。【方法】PCR 扩增谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *pand*, 构建表达载体 pET24a(+)-Pand, 转化宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3), 对重组菌进行诱导表达, 表达产物经 DEAE 离子交换层析和 G-75 分子筛层析纯化后进行酶学性质研究, 然后进行酶转化实验, 说明底物和产物对酶转化的影响。【结果】重组菌 SDS-PAGE 分析表明 Pand 表达量可达菌体总蛋白的 50% 以上, AccQ-Tag 法检测酶活达到 94.16 U/mL。该重组酶最适反应温度为 55 °C, 在低于 37 °C 时保持较好的稳定性, 最适 pH 为 6.0, 在 pH 4.0–7.0 范围内有较好的稳定性。酶转化实验说明: 底物 L-天冬氨酸和产物  $\beta$ -丙氨酸对转化反应均有抑制作用; 实验建立了较优的酶转化反应方式, 在加酶量为每克天冬氨酸 3 000 U 时, 以分批加入固体底物 L-天冬氨酸的形式, 使 100 g/L 底物转化率达到 97.8%。【结论】重组 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶在大肠杆菌中获得高效表达, 研究了酶转化生产  $\beta$ -丙氨酸的影响因素, 为其工业应用奠定了基础。

**关键词:** L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶,  $\beta$ -丙氨酸, 谷氨酸棒杆菌, 表达, 纯化, 转化率

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021201, 2011AA100905); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (No. NCET-11-0665)

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

收稿日期: 2012-12-26; 接受日期: 2013-03-15

# Expression of L-aspartate $\alpha$ -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* and its application in enzymatic synthesis of $\beta$ -alanine

ZHAO Lian-Zhen<sup>1,2</sup> ZHANG Liang<sup>1,2</sup> SHI Gui-Yang<sup>1,2\*</sup>

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] An L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase gene was amplified from *Corynebacterium glutamicum* and expressed in *Escherichia coli*, to catalyze L-aspartate to  $\beta$ -alanine. The catalysis characterization of this  $\alpha$ -decarboxylase was also studied. [Methods] The Pand gene was amplified from *C. glutamicum* and cloned into the expression plasmid pET24a(+), the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3). Pand was then successfully expressed with induction. To explore the enzymatic characteristics of Pand, high purity of Pand was obtained by DEAE ion exchange chromatography and G-75 chromatography. Then the effects of substrate and product on enzymatic conversion were studied. [Results] The Pand constituted more than 50% of the total cell proteins and achieved the activity of 94.16 U/mL analyzed by SDS-PAGE and AccQ·Tag assays respectively. The optimal reaction temperature of the purified Pand was at 55 °C and stable below 37 °C. The optimal reaction pH of Pand was at 6.0 and stable at 4.0–7.0. The enzymatic synthesis was inhibited by L-aspartate and  $\beta$ -alanine. When L-Asp was added in batches with 3 000 U Pand per gram L-Asp, the conversion ratio of 100 g/L L-Asp reached 97.8%. [Conclusion] The L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase gene from *C. glutamicum* was successfully expressed in *E. coli*.

**Keywords:** L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase,  $\beta$ -Alanine, *Corynebacterium glutamicum*, Expression, Purification, Conversion ratio

L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶(L-aspartate-alpha-decarboxylase, Pand)以 L-天冬氨酸为底物脱去  $\alpha$ -羧基生成  $\beta$ -丙氨酸。 $\beta$ -丙氨酸( $\beta$ -Ala)是自然界中唯一存在的  $\beta$  型氨基酸,其用途广泛:工业上,是合成泛酸钙的重要原料<sup>[1-2]</sup>,也是合成肌肽的两种氨基酸之一<sup>[3]</sup>;医药上,作为原料用于合成抑制恶性肿瘤骨转移的帕米膦酸钠和抗结肠炎药物巴柳氮<sup>[4]</sup>,还是复方氨基酸的一种重要成分;同时还可作为铅中毒的解毒剂<sup>[5]</sup>

以及用于合成甜味剂等。由于  $\beta$ -丙氨酸及其衍生物在医药、美容、食品、饲料及化工等领域的广泛应用,市场需求量呈日渐上升趋势。

目前,国内外  $\beta$ -丙氨酸工业化生产主要采用化学合成法,包括丙烯酸氨化法、丙烯腈氨化水解法及  $\beta$ -氨基丙腈水解法,国内工业生产主要采用丙烯腈氨化水解法<sup>[6]</sup>,这些方法大多需要强酸强碱、高温高压的条件,而且产物纯化繁琐,腈类物质等存在着环境污染的问题,

随着  $\beta$ -丙氨酸需求量的不断增加, 寻求绿色的生产方法具有十分明显的经济和社会效益。

本实验采用构建高表达 L-天门冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶重组菌的方法使 L-天冬氨酸一步脱羧生产  $\beta$ -丙氨酸。酶转化法制备  $\beta$ -丙氨酸具有工艺简单、纯化方便、绿色无污染的特点, 该方法现已逐步成为人们研究的热点。编码 L-天门冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的基因 *pand* 被发现广泛地存在于大肠杆菌<sup>[7]</sup>、谷氨酸棒杆菌<sup>[8]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[9-10]</sup>、沙门氏菌<sup>[11]</sup>等微生物中, 目前研究最多的是 *E. coli*<sup>[12-15]</sup>, 高丽娟等将 *E. coli* DH5 $\alpha$  来源基因 *pand* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达构建重组菌, 酶活为 224.96 U/L<sup>[16]</sup>。Nicole 等克隆了 *C. glutamicum pand* 基因(*pand*<sub>C.g.</sub>)和 *E. coli pand* 基因(*pand*<sub>E.c.</sub>)并在 *E. coli* 中表达, *Pand*<sub>C.g.</sub> 酶活 3.42 U/mg, *Pand*<sub>E.c.</sub> 酶活 0.22 U/mg, 随后重点研究了 *E. coli* 中 *pand*<sub>C.g.</sub> 和 *pand*<sub>E.c.</sub> 基因表达对泛酸积累的影响, 结果显示 *pand*<sub>C.g.</sub> 基因表达能消除  $\beta$ -Ala 对泛酸合成的限制, 而 *pand*<sub>E.c.</sub> 基因表达时培养基中仍需外加  $\beta$ -Ala 才能获得泛酸大量积累<sup>[8]</sup>, 这说明 *Pand*<sub>C.g.</sub> 比 *Pand*<sub>E.c.</sub> 活性更高。本实验选择以谷氨酸棒杆菌为基因来源, 扩增其 *pand* 基因转化 *E. coli* BL21(DE3) 构建高表达 L-天门冬氨酸- $\alpha$ -脱羧酶的重组菌, 表达产物经纯化后对其性质进行了研究, 并对该重组菌酶转化生产  $\beta$ -丙氨酸进行了初步探讨, 为其在酶转化生产  $\beta$ -丙氨酸的应用奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒:** 大肠杆菌 BL21(DE3) [*E. coli* BL21(DE3)]、大肠杆菌 JM109 (*E. coli* JM109)、谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 (*C. glutamicum* ATCC13032)、质粒 pET-24a(+)由本实验室保存, 质粒 PMD18-T Simple Vector 购自

TaKaRa 公司。

**1.1.2 酶、引物和主要试剂:** 扩增谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *pand* 的引物(表 1)由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其上、下游引物分别加入 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点(下划线标示), 限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等分子生物学工具酶和 PCR 产物回收试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。标准分子量蛋白购自 Fermentas 公司, HiPrep DEAE FF16/10 离子交换层析柱和 Superdex 7510/300GL 凝胶层析柱购自 GenScript 公司, 其他化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因的克隆及表达载体的构建:** 提取谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组 DNA, 以该基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *pand*, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后连接 PMD18-T Simple Vector 并转入大肠杆菌 JM109 感受态中, 氨苄平板筛选出单菌落, 提取连接好的质粒, 用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后, 用 T4 DNA 连接酶连接到同样经过 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切的 pET24a(+)载体上, 构建重组表达载体 pET24a(+)-Pand, 转化大肠杆菌 JM109, 卡那平板筛选出单菌落, 提取质粒双酶切鉴定, 筛选出阳性克隆进行测序分析。

**1.2.2 重组蛋白 Pand 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达:** 将重组质粒 pET24a(+)-Pand 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 卡那平板筛选出单菌落, 即为重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-Pand, 重组菌接种至含有 30 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 活化培养 8-10 h, 以 5%接种量转接到含有 50 mg/L 卡

表 1 克隆目的基因 *pand* 的引物  
Table 1 Primers for cloning of target genes

引物 Primers	引物序列 Primer sequence (5'→3')
上游引物 Forward primer	AATTC <u>CATATG</u> CTGCGCACCATCCTCGGAAG
下游引物 Reverse primer	CCC <u>AAGCTT</u> CTAATGCTTCTCGACGTCAAAAAG

那霉素 TB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 2 h 后加入 1 mmol/L IPTG, 25 °C、200 r/min 培养 14 h 诱导表达重组蛋白 Pand, 培养后将发酵液离心取菌体, 无菌水洗涤 2 次, 重悬于 pH 7.0、50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中, 超声破碎, 显微镜镜检至完全破碎, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清和沉淀测酶活并以空载体 pET24a(+)转化的 *E. coli* BL21(DE3)为对照, 进行蛋白电泳, 凝胶成像仪分析软件进行光密度扫描计算酶表达情况。SDS-PAGE 蛋白电泳体系: 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%, 考马斯亮蓝染色。

**1.2.3 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶活力的测定:** 酶反应体系: pH 7.0、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 2.0 mL、酶液 0.1 mL、L-天冬氨酸(200 g/L) 0.4 mL, 天冬氨酸用 NaOH 调节 pH 使其溶解, 反应 1 h, 按 1:1 比例加入 10%三氯乙酸 4 °C 放置终止反应, AccQ-Tag 法<sup>[17]</sup>测酶活, 即使用 Waters 的 AccQ-Fluor 试剂盒柱前衍生 HPLC 检测  $\beta$ -丙氨酸含量。

酶活定义: 在 pH 7.0、温度 37 °C 的条件下, 每毫升发酵液所得菌体每 1 h 转化生成产物  $\beta$ -Ala 1  $\mu$ mol 所需的酶量定义为一个酶活力单位  $\mu$ mol/(mL·h), 简称为 U/mL。

**1.2.4 重组蛋白的纯化:** (1) 硫酸铵盐析: 取发酵菌悬液 200 mL, 离心取菌体, 无菌水洗涤 2 次, 重悬于 pH 7.0、50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中, 超声破碎, 显微镜镜检至完全破碎, 离心取上清, 然后在冰浴条件下以最适硫酸铵浓度(根据冰浴条件下不同浓度硫酸铵沉淀的结果绘制盐析曲线, 以确定最适硫酸铵浓度)进行沉

淀, 沉淀完全后 8 000 r/min 离心 10 min, 所得沉淀用缓冲液复溶, 脱盐柱脱盐, 超滤浓缩作为下一步待分离的样品。(2) HiPrep DEAE FF16/10 阴离子交换层析: 将上一步得到的样品上样至 DEAE FF 层析柱, 进行离子交换, 收集活性成分。分离条件: 0–1 mol/L NaCl 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液, pH 7.5, 线性梯度洗脱, 流速: 2 mL/min。将收集到的活性组分超滤浓缩。(3) Superdex 7510/300GL 凝胶过滤层析: 将离子交换得到的活性成分上样至 Superdex 7510/300GL 层析分离, Superdex 7510/300GL 层析分离。色谱条件: 0.15 mol/L NaCl-50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液, pH 7.5, 流速: 0.5 mL/min。收集活性组分超滤浓缩并 SDS-PAGE 电泳鉴定其纯度。SDS-PAGE 蛋白电泳体系: 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%, 考马斯亮蓝染色。

**1.2.5 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的性质分析:** Pand 最适反应温度及热稳定性: 按照上述酶活测定方法, 分别在 16 °C、25 °C、30 °C、37 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C、85 °C、100 °C 测定酶活, 以确定最适反应温度。将酶液分别在以上温度放置 12 h, 然后在 37 °C 条件下测酶活, 比较酶在不同温度条件下的稳定性。

Pand 最适 pH 及 pH 稳定性: 配制 0.1 mol/L pH 为 3、4、5、6、7、8、9 的柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液, 分别用以上缓冲液配制 50 g/L 的 L-天冬氨酸钠溶液, pH 7.0 的酶液用以上缓冲液稀释 10 倍, 取天冬氨酸钠溶液 2.4 mL, 酶液 0.1 mL, 37 °C 反应 1 h 测定

酶活, 确定最适 pH。将 pH 7.0 的酶液分别用以上缓冲液稀释 10 倍, 37 °C 放置 12 h, 然后在 pH 7.0 条件下测酶活, 以确定酶在不同 pH 条件下的稳定性。

**1.2.6 酶转化合成  $\beta$ -丙氨酸底物、产物及加酶量对转化反应的影响:** 底物 L-天冬氨酸对酶转化的影响: 反应体系 2.5 mL, 其中底物 L-天冬氨酸钠的浓度分别为 0、30、60、100、150 g/L, 加酶量为 400 U, 37 °C 反应 4 h, 超滤除去 L-Asp 和  $\beta$ -Ala, 取超滤后液体测定酶活(为避免超滤过程残留  $\beta$ -Ala 造成的影响, 测酶活时应以灭活后酶液作为对照)和蛋白含量, 并以此计算出比酶活来说明不同浓度 L-天冬氨酸对酶转化过程中酶活变化的影响。

产物  $\beta$ -丙氨酸对酶转化的影响: 反应体系 2.5 mL, 底物 L-天冬氨酸钠浓度为 30 g/L, 反应前加入  $\beta$ -Ala, 使其终浓度分别为: 0、10、30、50、70、90、110、130、150 g/L, 加酶量为 180 U, 37 °C 反应 1 h, 测  $\beta$ -丙氨酸生成量来说明产物  $\beta$ -Ala 对酶转化的影响。为考察产物  $\beta$ -Ala 的抑制是否为可逆性抑制, 取上述反应 1 h 后的液体 2 mL, 超滤除去 L-Asp 和  $\beta$ -Ala, 对超滤后液体测定酶活(为避免超滤过程残留  $\beta$ -Ala 造成的影响, 测酶活时应以灭活后酶液作为对照)和蛋白含量, 并以此计算出比酶活来说明不同浓度  $\beta$ -丙氨酸对酶转化过程中酶活变化的影响。

不同转化方式对重组酶转化反应的影响: 反应体系 20 mL, 底物 L-天冬氨酸钠 100 g/L, 加酶量分别为 1 000、3 000、5 000、10 000 U/g 底物, 37 °C 反应 48 h, 底物以不同方式进行添加, 分别为一次性加入天冬氨酸钠液体、分 5 批加入天冬氨酸钠液体和分 5 批加入天冬氨酸固体, 测定  $\beta$ -丙氨酸生成量以计算底物转化率, 对不同底物添加方式进行比较, 选择加酶量

少、转化率高的方式进行酶转化。

## 2 结果与分析

### 2.1 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶基因的克隆及表达载体的构建

以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到目的基因 *pand* (411 bp), 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收与 PMD18-T Simple Vector 连接后, 与 pET24a(+) 同时用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切纯化并连接, 得到重组质粒 pET24a(+)-Pand, 酶切鉴定表明重组载体构建成功(图 1), 测序结果表明与 GenBank 序列一致。

### 2.2 重组蛋白 Pand 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的诱导表达

重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-Pand 经诱导表达, 破碎, 离心后, 菌体破碎液上清、

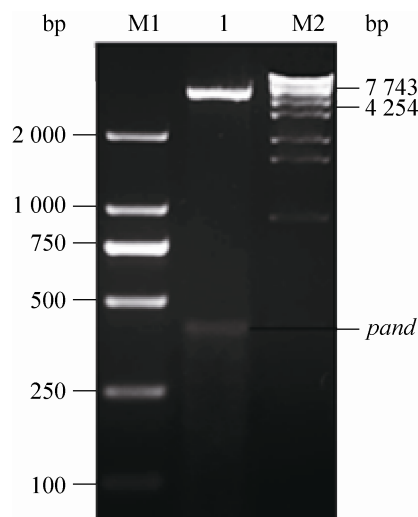


图 1 重组质粒 pET24a(+)-Pand 酶切鉴定

**Fig. 1 Identification of recombinant pET24a(+)-Pand by enzyme digestion**

注: M1: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 pET24a(+)-Pand 酶切验证; M2: DNA 分子量标准。

Note: M1: DL2000™ DNA marker; 1: Restricted DNA products of pET24a(+)-Pand; M2:  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA marker.

沉淀和空载体转化菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+) 经 SDS-PAGE 蛋白分析, 结果如图 2 所示。泳道 2、3 与 1 对照在 10–15 kD 处有明显条带, 说明 *pand* 基因已表达, 与泳道 4 对照发现重组蛋白主要存在于上清中, 经光密度扫描检测, 重组蛋白 Pand 占菌体总蛋白的 50% 以上, 菌体量为 3.22 g/L, 酶活达到 94.16 U/mL, 菌体破碎沉淀未检测到酶活, 与蛋白电泳结果一致。

### 2.3 重组蛋白的纯化

细胞破碎液经离心后, 取上清酶液依次进行硫酸铵沉淀, 脱盐, HiPrep DEAE FF16/10 离子交换层析, Superdex 7510/300GL 凝胶过滤

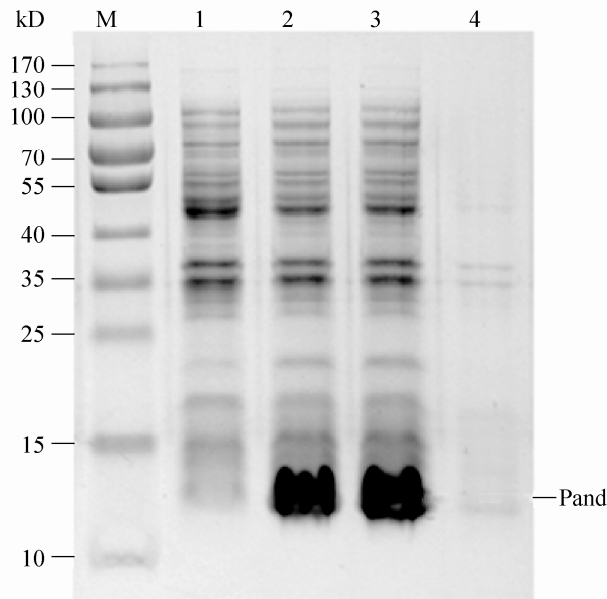


图 2 Pand 在重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-Pand 中表达电泳图谱

Fig. 2 Expression of Pand in recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-Pand

注: M: 蛋白分子量标准; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+) 诱导破碎后上清; 2, 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-Pand 诱导破碎后上清; 4: *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-Pand 诱导破碎后沉淀。

Note: M: Protein maker; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+); 2, 3: The centrifugated supernatant after ultrasonication of the recombinant; 4: The centrifugated deposit after ultrasonication of the recombinant.

层析, 收集活性组分并用 SDS-PAGE 电泳观察纯化结果, 得到单一条带组分, 结果如图 3 所示, 在 10–15 kD 之间收集到 Pand 单一条带。

*C. glutamicum* ATCC13032 的 *pand* 基因含 411 个碱基, 编码 136 个氨基酸, 表达蛋白的分子量理论值为 14.1 kD, 如图 3 所示, 在 10–15 kD 之间有一条带, 但分子量略小于 14.1 kD, 图 2 蛋白电泳图为培养结束后 12 h 内完成, 图 3 中样品经过多步纯化, 在低于 37 °C 条件下放置时间超过 24 h, 这与 *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>[18-19]</sup> 和 *M. tuberculosis*<sup>[20]</sup> *pand* 基因在大肠杆菌中重组表达, 重组蛋白 Pand 纯化后的结果一致, 重组蛋白 Pand 在等于或低于 37 °C 条件下放置 24 h 以上就会出现蛋白的裂解, 自剪切得到  $\alpha$ -亚基和  $\beta$ -亚基,  $\beta$ -亚基分子量较小, 电泳检测不到, 大肠杆菌来源重组蛋白 Pand 大小为 13.8 kD, 自剪切后

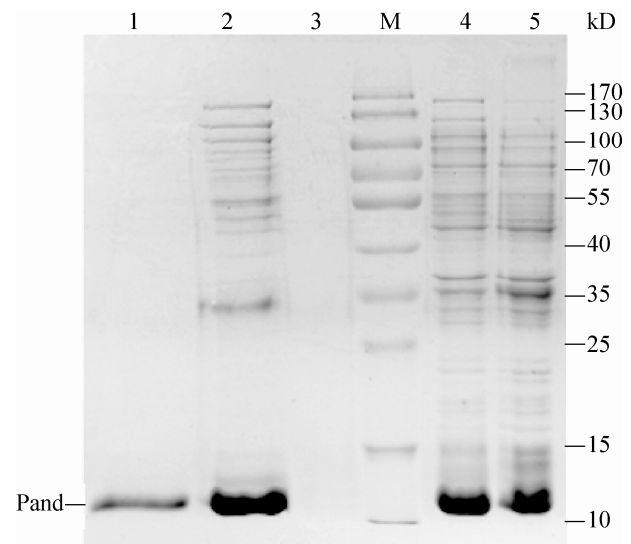


图 3 纯化后 Pand 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified Pand

注: 1: Superdex 7510/300GL 凝胶过滤层析结果; 2: HiPrep DEAE FF16/10 离子交换层析结果; 3: 空白对照; M: 蛋白分子量标准; 4: 硫酸铵盐析结果; 5: 粗酶液。

Note: 1: Fractions from the Superdex 7510/300GL column; 2: Fractions from the HiPrep DEAE FF16/10 column; 3: Blank control; M: Protein marker; 4: Fractions from ammonium sulfate fractionation; 5: Crude enzyme.

$\alpha$ -亚基和  $\beta$ -亚基大小分别为 11 kD 和 2.8 kD<sup>[16]</sup>。

#### 2.4 L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶的性质分析

重组 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的最适反应温度实验结果如图 4A 所示, 随着反应温度的升高(从 16 °C 到 100 °C), Pand 的酶活呈现先上升后下降趋势, 在 55 °C 条件下酶活最高, 37 °C 酶活略低于 55 °C。重组 Pand 的热稳定性实验结果如图 4B 所示, 表明酶的热稳定性在较低的温度范围内较好, 在 37 °C 以下酶活基本无损失, 在较高的温度下酶活损失非常快, 55 °C 下酶活便迅速下降, 只剩下 52%, 70 °C 时酶活基本完

全丧失, 由以上实验结果得出, 重组 Pand 脱羧反应最适温度为 55 °C, 但酶的稳定性在 37 °C 以下时保持稳定, 重组 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶在进行脱羧反应时间较长时选择 37 °C 比较合适, 能够在保证较高酶活的同时保持较高稳定性。

重组 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的最适反应 pH 实验结果如图 5A 所示, 随着 pH 的上升(pH 3.0 到 pH 9.0), Pand 的酶活也呈现先升后降的趋势, 最适 pH 为 6.0。重组 Pand 在不同 pH 条件下的稳定性如图 5B 所示, 该重组酶在 pH 4.0–7.0 的范围内有较好的稳定性。

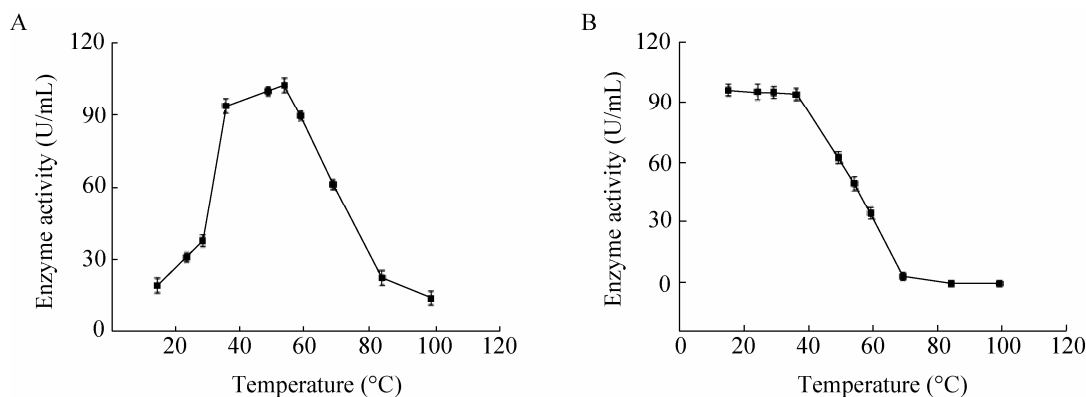


图 4 重组 Pand 反应最适温度和热稳定性

Fig. 4 Optimal temperature and thermostability of recombinant Pand

注: A: 重组 Pand 反应最适温度; B: 重组 Pand 热稳定性.

Note: A: Optimal temperature of recombinant Pand; B: Thermostability of recombinant Pand.

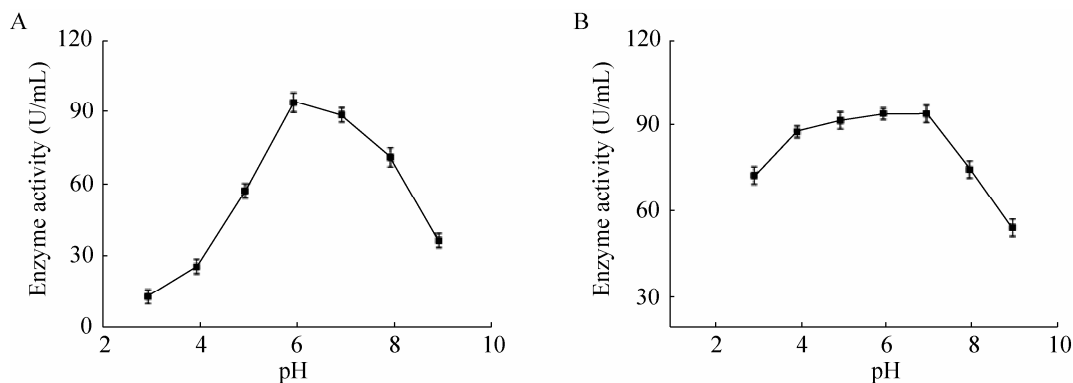


图 5 重组 Pand 反应最适 pH 和 pH 稳定性

Fig. 5 Optimal pH and pH stability of recombinant Pand

注: A: 重组 Pand 反应最适 pH; B: 重组 Pand 的 pH 稳定性.

Note: A: Optimal pH of recombinant Pand; B: pH stability of recombinant Pand.

## 2.5 酶转化合成 $\beta$ -丙氨酸底物、产物及加酶量对酶转化的影响

不同浓度底物 L-天冬氨酸对重组酶 Pand 转化反应的影响: 结果如图 6 所示, 随着底物 L-天冬氨酸浓度的升高, 重组酶比酶活逐渐降低, 底物对重组酶酶活有抑制作用, 且随着底物浓度的提高抑制作用逐渐加强。

不同浓度产物  $\beta$ -丙氨酸对重组酶 Pand 转化反应的影响: 结果如图 7 所示, 随着加入的  $\beta$ -丙氨酸量的增加, 产物  $\beta$ -丙氨酸生成量逐渐降低, 说明产物  $\beta$ -丙氨酸对酶转化反应产生了抑制, 为考察该抑制是否为可逆性抑制, 进一步进行超滤测酶活, 计算比酶活, 结果如图 7 所示, 随

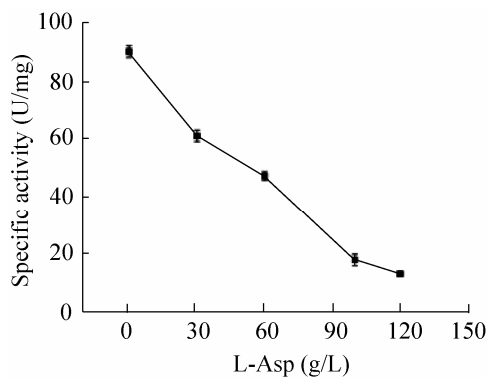


图 6 底物 L-天冬氨酸浓度对酶转化反应的影响  
Fig. 6 Effect of substrate concentration on conversion

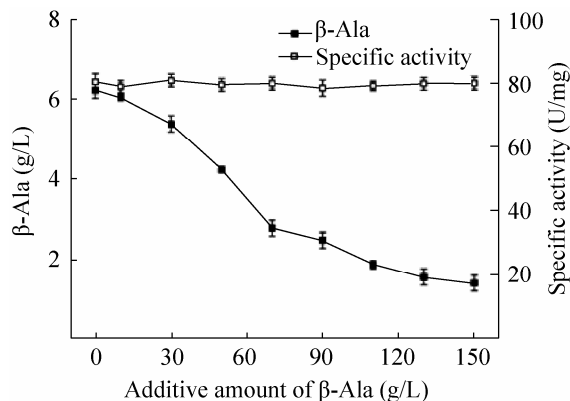


图 7 产物  $\beta$ -丙氨酸浓度对酶转化反应的影响  
Fig. 7 Effect of product concentration on conversion

着加入  $\beta$ -丙氨酸量的增加, 重组酶比酶活没有发生变化, 由以上实验结果得出, 产物  $\beta$ -丙氨酸对酶转化反应有抑制作用, 但该抑制为可逆性抑制。

不同转化方式对重组酶转化反应的影响: 结果如图 8 所示, 一次性加入液体天冬氨酸钠底物, 加酶量在 10 000 U/g 底物时, 100 g/L 底物转化率为 100%, pH 变化范围 7.0-9.2; 分批加入液体天冬氨酸钠底物, 加酶量在 10 000 U/g 底物时, 100 g/L 底物转化率为 89.06%; 分批加入固体天冬氨酸底物, 加酶量在 3 000 U/g 底物时, 100 g/L 底物转化率为 97.8%, pH 变化范围 4.6 到 8.3。结合该重组酶的性质, 重组 Pand 在 pH 4.0-7.0 的范围内有较好稳定性, 固体底物分批加入使 pH 维持在该重组酶 pH 稳定性较高的范围内, 酶活损失较少, 且分批加入底物避免了高浓度底物造成的酶活大幅下降的问题, 与其它转化方式相比较, 分批加入固体天冬氨酸进行转化为最优的酶转化反应方式。

## 3 讨论

$\beta$ -丙氨酸及其衍生物在医药、美容、食品、

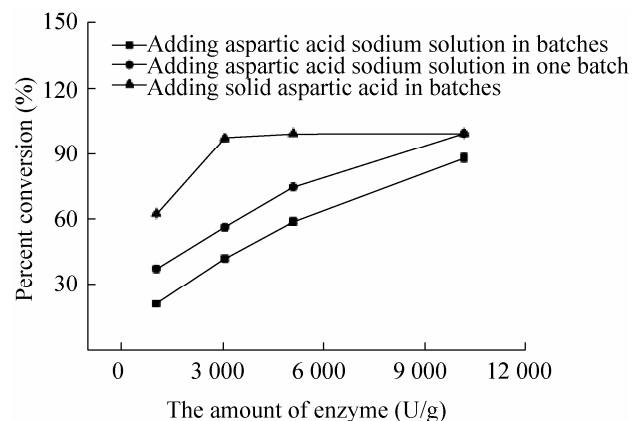


图 8 不同加酶量对 L-Asp 转化率的影响  
Fig. 8 Effect of the amount of enzyme on conversion ratio of L-Asp



饲料及化工等领域应用广泛, 市场需求量呈日渐上升趋势。目前国内外  $\beta$ -丙氨酸工业化生产主要是化学合成法, 但是该方法存在着纯化难、原料成本高、工艺条件苛刻、腈类物质污染环境等问题, 因此酶转化法合成  $\beta$ -丙氨酸作为一种绿色经济的生产方法已成为研究的热点。

本实验以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 为基因来源, 扩增其 *pand* 基因, 构建表达载体 pET24a(+)-Pand, 转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 构建高表达 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的重组菌, 酶活达到 94.16 U/mL, 为目前报道最高水平。该重组酶在进行酶转化时高浓度的底物 L-天冬氨酸的存在使酶活大幅下降, 产物  $\beta$ -丙氨酸也会影响酶转化速率, 但此抑制为可逆性抑制, 根据该重组酶的性质特点, 选择在 37 °C 以分批加入固体底物 L-天冬氨酸的形式进行酶转化, 实现在加酶量为 3 000 U/g 底物时, 100 g/L 的 L-天冬氨酸转化率达到 97.8%, 基本达到完全转化, 为其工业化应用奠定了基础。虽然该重组酶蛋白的酶活和高浓度底物转化率较之前报道结果均有大幅提高, 但是在转化反应过程中仍存在着加酶量大和底物 L-天冬氨酸、产物  $\beta$ -丙氨酸对转化反应有抑制作用等问题, 可以在此实验的基础上对以上问题进行分析解决, 改变反应条件或者对酶的结构进行改造, 这对于酶转化法生产  $\beta$ -丙氨酸具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [1] John E, Cronan JR.  $\beta$ -Alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, 141(3): 1291-1297.
- [2] 周糯玉, 王志峰. D-泛酸钙的用途、市场与生产[J]. *现代化工*, 1999, 19(3): 42-43.
- [3] Coxon KM, Chakauya E, Ottenhof HH, et al. Pantothenate biosynthesis in higher plants[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2005(33): 743-746.
- [4] 苏丽, 王娟, 陈小立, 等. 巴柳氮的合成改进[J]. *化学工业与工程*, 2005, 22(4): 313-315.
- [5] El-Wassef A. Beta-alanine as lead antidote[J]. *Oriental Journal of Chemistry*, 1988, 4(1): 103-103.
- [6] 罗积杏, 薛建萍, 沈寅初.  $\beta$ -氨基丙酸的合成与应用[J]. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(1): 52-55.
- [7] 高丽娟, 裘娟萍. L-天冬氨酸脱羧酶研究进展[J]. *工业微生物*, 2007, 37(5): 54-58.
- [8] Dusch N, Puhler A, Kalinowski J. Expression of the *Corynebacterium glutamicum pand* gene encoding L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1530-1539.
- [9] Gopalan G, Chopra S, Ranganathan A, et al. Crystal structure of uncleaved L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65(4): 796-802.
- [10] Chopra S, Pai H, Ranganathan A. Expression, purification, and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* aspartate decarboxylase, Pand[J]. *Protein Expression and Purification*, 2002, 25(3): 533-540.
- [11] Ortega MV, Cardenas A, Ubiera D. *pand*, a new chromosomal locus of *Salmonella typhimurium* for the biosynthesis of  $\beta$ -alanine[J]. *Molecular and General Genetics*, 1975, 140(2): 159-164.
- [12] Kennedy J, Kealey JT. Tools for metabolic engineering in *Escherichia coli*: inactivation of *pand* by a point mutation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 327(1): 91-96.
- [13] Williamson JM, Brown GM. Purification and properties of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of  $\beta$ -alanine in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(16): 8074-8082.
- [14] Fouad WM, Rathinasabapathi B. Expression of bacterial L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase in tobacco increases  $\beta$ -alanine and pantothenate levels and

- improves thermotolerance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60(4): 495-505.
- [15] Pantaleone DP, Fotheringham IG, Ton JL. Process and composition for preparing D-aspartic acid: US, 5834259[P/OL]. 1996-10-28.
- [16] 高丽娟. L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶生产  $\beta$ -丙氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2007.
- [17] 陈宇堃, 梁蔚阳, 薛巧如, 等. AccQ-Tag 法测定复方氨基酸注射液(18AA-(九))中17种氨基酸的含量[J]. *广东药学院学报*, 2008, 24(2): 243-246.
- [18] Schmitzberger F, Kilkenny ML, Lobley CM, et al. Structural constraints on protein self-processing in L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(23): 6193-6204.
- [19] 洪敏, 赵春田, 张正波, 等. L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶工程菌株的构建及其培养条件研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2011, 39(3): 252-256.
- [20] Ramjee MK, Genschel U, Abell C, et al. *Escherichia coli* L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 323(3): 661-669.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc(x)格式的电子稿,凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整,不用缩写,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- 期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1-3.  
[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514-36519.
- 图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.  
[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华璐等. *核农学进展*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00

(下转 p.2253)