

## 两种 L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶的表达与酶学性质分析

陈夏林<sup>1,2</sup> 李由然<sup>1,2</sup> 顾正华<sup>1,2</sup> 丁重阳<sup>1,2</sup> 张梁<sup>1,2</sup> 石贵阳<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学 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】实现单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和杰氏棒杆菌(*Corynebacterium jeikeium*) L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因在 *Escherichia coli* 中异源表达, 纯化重组蛋白并对其酶学性质分析。【方法】依照 *E. coli* 的密码子偏好性优化来源于 *L. monocytogenes* 和 *C. jeikeium* 的 *panD* 基因序列。人工合成后以此构建表达载体 pET28a(+)-*panD*<sub>Lm</sub> 和 pET28a(+)-*panD*<sub>Cj</sub>, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 实现 *panD*<sub>Lm</sub> 和 *panD*<sub>Cj</sub> 基因的异源表达。利用亲和层析纯化获得携带组氨酸标签的纯酶后进行酶学性质研究, 并考察底物对酶反应的影响。【结果】重组菌蛋白电泳分析结果表明, 重组酶 PanD<sub>Lm</sub> 和 PanD<sub>Cj</sub> 均有自加工功能, 裂解后形成了  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基。重组酶比酶活分别为 8.9 U/mg 和 11.8 U/mg。两种酶的最适反应温度均为 60 °C, 最适 pH 分别为 7.0 和 6.0, 它们都在 30–50 °C, 酸性条件下较稳定。与目前研究最多的谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)来源的 PanD<sub>Cg</sub> 相比, PanD<sub>Lm</sub> 受底物天冬氨酸的抑制作用较小。【结论】PanD<sub>Lm</sub> 和 PanD<sub>Cj</sub> 可在高温酸性条件下特异性转化 L-天冬氨酸生成  $\beta$ -丙氨酸, 其中 PanD<sub>Lm</sub> 受底物的抑制作用较小, 具有一定的工业应用潜力。

**关键词:** L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶,  $\beta$ -丙氨酸, 单核增生李斯特菌, 杰氏棒杆菌, 酶学性质

## Expression and characterization of two L-aspartate $\alpha$ -decarboxylases

CHEN Xia-Lin<sup>1,2</sup> LI You-Ran<sup>1,2</sup> GU Zheng-Hua<sup>1,2</sup> DING Zhong-Yang<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, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

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

**Abstract:** [Objective] In this study, two L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase genes (*panD*) from *Listeria monocytogenes* (*panD*<sub>Lm</sub>) and *Corynebacterium jeikeium* (*panD*<sub>Cj</sub>) were expressed in *Escherichia coli*, respectively, and the recombinant enzymes were purified and characterized. [Methods] The *panD*

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31401674); The 13th Five-Year National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant (No. 2016YFD0401400)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: January 04, 2017; Accepted: March 22, 2017; Published online (www.cnki.net): March 24, 2017

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31401674); “十三五”国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0401400)

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

收稿日期: 2017-01-04; 接受日期: 2017-03-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-03-24

genes from *L. monocytogenes* and *C. jeikeium* were synthesized and inserted into pET28a(+) to obtain expression plasmids, which was then transformed into *E. coli* BL21(DE3). PanD<sub>Lm</sub> and PanD<sub>Cj</sub> were functionally expressed and the recombinant enzymes were purified by HisTrap<sup>TM</sup> affinity chromatography. Their catalytic properties were characterized and the effects of substrate concentration on enzymatic conversion were studied. **[Results]** Those  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were detected by Tricine-SDS-PAGE, indicating that both of the PanDs were processed by self-cleavage. The specific activities were 8.9 U/mg for PanD<sub>Lm</sub> and 11.8 U/mg for PanD<sub>Cj</sub>. They exhibited the same optimal temperature at 60 °C, while they possessed different optimal pH at 7.0 and 6.0, respectively. Both the enzymes were stable at the condition of 30–50 °C, and pH 4.0–7.0. Compared with the most studied PanD from *C. glutamicum*, the substrate inhibition effect of the PanD<sub>Lm</sub> was significantly less. **[Conclusion]** Under the high temperature and acidic conditions, PanD<sub>Lm</sub> as well as PanD<sub>Cj</sub> could specifically transform L-aspartic to  $\beta$ -alanine. PanD<sub>Lm</sub> could be more appropriate for industrial application because of less substrate inhibition.

**Keywords:** L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase,  $\beta$ -Alanine, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium jeikeium*, Enzymatic properties

L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶(L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase, EC4.1.1.11, ADC, PanD), 又称 L-天冬氨酸 1-脱羧酶, 可催化 L-天冬氨酸脱掉  $\alpha$  羧基生成  $\beta$ -丙氨酸<sup>[1-3]</sup>。 $\beta$ -丙氨酸是生物体内合成泛酸的重要前体物质, 是自然界中唯一存在的  $\beta$  型氨基酸, 是一种非蛋白氨基酸。 $\beta$ -丙氨酸及其衍生物广泛应用于医药、美容、食品、饲料及化工等领域, 市场需求量呈日渐上升趋势<sup>[4]</sup>。相较于国内外目前采用的化学合成法<sup>[5-6]</sup>, 利用 PanD 生物转化 L-天冬氨酸生产  $\beta$ -丙氨酸具有工艺简单、纯化方便、绿色无污染的特点, 具有十分明显的经济和社会效益<sup>[7]</sup>。

PanD 主要存在于细菌、古细菌、放线菌等低等生物中, 可分为丙酮酰基团依赖型和磷酸吡哆醛依赖型两类。与后者相比, 前者具有明显的优势, 其催化能力依赖自加工形成的丙酮酰基团, 无需外源辅助因子, 且催化特异性高, 因此更具工业应用前景。PanD 合成时, 最初转录翻译成无活性的原酶, 随后在 Gly24-Ser25 处发生裂解, 水解生成 N 端带有丙酮酰基团的  $\alpha$  亚基和 C 端带有羟基的  $\beta$  亚基, 该丙酮酰基团即为酶催化的关键位点<sup>[8-9]</sup>。

酶转化反应中最关键的是生物催化剂(酶)的开发, 微生物的多样性为生物转化提供了更广阔的发展空间。NCBI 数据库中已报道的 *panD* 基因有 761 种, 但目前的研究主要集中在大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[10]</sup>、结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>[11]</sup>、

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)<sup>[12]</sup>、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[13]</sup>、钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)<sup>[14]</sup>和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[7]</sup>, 而实际适合开发酶制剂的只有后 3 种。其中 PanD<sub>Bs</sub> 的酶活最高为 8.4 U/mg, PanD<sub>Cg</sub> 酶学性质的相关报道最多, 最适反应温度为 55 °C, 最适 pH 为 6.0, 在低于 37 °C, pH 4.0–7.0 稳定性较好。现有的 PanD 在催化过程中都存在一定程度的底物依赖性失活现象<sup>[10,15]</sup>, 这是限制其工业应用的关键性因素。已有的研究中, 尝试通过定点突变<sup>[16]</sup>、固定化作用<sup>[10]</sup>改变酶的性能, 但未见显著成果。因此挖掘新的 *panD* 基因来源并研究其特性对酶法合成  $\beta$ -丙氨酸具有重要的研究意义和工业价值。本文选择单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和杰氏棒杆菌(*Corynebacterium jeikeium*)来源的 *panD* 基因为研究对象, 首次实现了这两个基因的异源表达, 并对其酶学性质及底物抑制情况进行了比较分析, 为生物转化生产  $\beta$ -丙氨酸的工业应用提供了科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 目的基因、菌种及质粒:** 研究中所用 *panD* 基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成; *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)-*panD<sub>Cg</sub>* (携带有 *C.*

*glutamicum* 来源的 *panD* 基因)和质粒 pET-28a(+)均为本实验室保藏。

**1.1.2 主要试剂、仪器和培养基:** 限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III、标准分子量蛋白购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶、DNA marker 购自 TaKaRa 公司; 卡那霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; Sepharose His Trap HP 购自美国 GenScript 公司; 其他试剂为国产分析纯。核酸电泳仪、Bio-Rad 525BR 蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; 蛋白纯化仪 AKTA Avant 25 购自 GE Healthcare 公司; 高效液相色谱仪 Agilent 1260 购自美国 Agilent 公司。LB 和 TB 培养基见参考文献[13]。

## 1.2 方法

**1.2.1 重组菌 *E. coli* DE3/pET28a(+)-*panD* 的构建:** 从 NCBI 上查阅并筛选获得 *L. monocytogenes* 和 *C. jeikeium* 来源的 *panD* 序列, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。基因序列按照 *E. coli* 密码子偏好性进行优化, 5'端添加 CATATG (引入酶切位点 *Nde* I), 3'端去除终止密码子后加 AATTGC (引入酶切位点 *Hind* III), 在蛋白 N 端和 C 端加上 His-tag。基因合成后连接载体 pUC57-simple, 获得 pUC57-*panD*。提取 pUC57-*panD* 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 pET28a(+)载体上, 构建重组表达载体 pET28a(+)-*panD*, 将重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 选取卡那平板上阳性转化子提取质粒酶切验证, 得到重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*, 并保存于甘油管中。

**1.2.2 重组蛋白的诱导表达:** 从甘油管中接 10  $\mu$ L 菌体至 20 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 8 h, 取 2 mL 菌液转接至 50 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 TB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 2 h 后加入 25  $\mu$ L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 1 mol/L), 20  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 16 h。发酵

结束后收集菌体, 超声破碎, 通过 Tricine-SDS-PAGE 分析鉴定重组蛋白。Tricine-SDS-PAGE 分析方法参见文献[17]。

**1.2.3 重组蛋白的纯化:** 用结合缓冲液 A (20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、20 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、500 mmol/L NaCl、100 mmol/L 咪唑, pH 7.4)洗涤菌体 2 次, 加入 5 mL 结合缓冲液 A, 振荡混匀后测  $OD_{600}$ , 稀释  $OD$  至 10 后破碎, 破 1 s 停 2 s, 破碎时间 5 min, 破碎液于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 即为粗酶液。Sepharose His Trap HP 用结合缓冲液 A 平衡后上样, 再平衡, 洗脱缓冲液 B (20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、20 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、500 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)洗脱, 收集的洗脱液为纯酶液, 用 Tricine-SDS-PAGE 分析。采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

**1.2.4 酶活的测定:** 酶活定义: 在 37  $^{\circ}$ C, pH 7.0 的条件下, 每分钟转化产生 1  $\mu$ mol  $\beta$ -丙氨酸所需要的酶量为一个酶活单位 U ( $\mu$ mol/min)。

酶活的测定方法: 2.5 mL 转化体系中, 将 0.5 mg 的酶与磷酸缓冲液 (20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、20 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0)混合, 37  $^{\circ}$ C 预热 20 min, 加入同样预热过的终浓度 100 mmol/L 的 L-天冬氨酸 (pH 7.0, NaOH 溶解)进行转化反应, 反应 20 min, 煮沸 20 min 灭活, 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清保存, 用邻苯二甲醛 (OPA) 衍生  $\beta$ -丙氨酸, 使用 HPLC 检测衍生后  $\beta$ -丙氨酸含量<sup>[18]</sup>。

**1.2.5 重组酶最适温度及热稳定性测定:** 将重组酶分别置于 30、37、45、55、60、65、70、80  $^{\circ}$ C 下反应 20 min, 测定酶活, 以确定最适反应温度。将酶分别在以上温度放置 12 h, 然后在 37  $^{\circ}$ C 条件下测定酶活, 比较酶在不同温度条件下的稳定性。

**1.2.6 重组酶最适 pH 及 pH 稳定性:** 将 0.5 mg 重组酶分别加入 20 mmol/L pH 4.0、5.0、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、20 mmol/L pH 6.5、7.0、7.5 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液及 20 mmol/L pH 8.0、9.0 的 Tris-盐酸缓冲液中, 再加入 166  $\mu$ L

的 L-天冬氨酸(200 g/L, pH 7.0, NaOH 溶解), 37 °C 反应 20 min, 测酶活, 以确定最适反应 pH。将酶分别置于以上缓冲液中, 37 °C 放置 12 h, 然后测酶活, 比较酶在不同 pH 条件下的稳定性。

**1.2.7 底物 L-天冬氨酸对 PanD 的抑制作用:** 实验组取 5 mg 酶(PanD)加入到含有 100 g/L 的 L-天冬氨酸和 20 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)的 5 mL 反应体系中, 37 °C 反应 1 h, 用 Ni 柱回收酶, 取回收后的酶测酶活, 对照组底物浓度为 0 g/L。

**1.2.8 重组酶的转化实验:** 用 pH 7.0 磷酸缓冲液配制终浓度为 100 mmol/L 的 L-天冬氨酸底物 50 mL, 加入 10 mg 的重组酶, 37 °C、200 r/min 反应 24 h, 测  $\beta$ -丙氨酸转化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 PanD 氨基酸序列分析及密码子优化

研究中的 PanD<sub>Cj</sub> 和 PanD<sub>Lm</sub> 氨基酸序列和目前报道较多的 PanD 的氨基酸序列进行比对, 从图 1 可以看出, 这几个氨基酸序列相似程度较低, 仅有 59.91%, 其中严格保守的残基有 Lys9、His11、Arg12、Thr16、Ala18、Leu20、Tyr22、Gly24、Ser25、

Ile28、Asp29、Ile46、Asn51、Gly52、Arg54、Thr57、Tyr58、Ile60、Ile69、Asn71、Gly72、Ala73、Ala74、Ala75、Gly81、Asp82、Val84、Ile85 和 Asn111, 高度保守位点较多。这些酶的自加工位点均为 Gly24-Ser25 键, 有研究表明 Arg3、Arg54、Thr57、Tyr58 可能与 PanD 自加工和催化活性有关<sup>[9]</sup>, Arg54 可能与 PanD 的底物特异性有关, Lys9 可能对底物的  $\alpha$  羧基的去质子化起到保护作用。PanD 的来源不同, 其 PanD 氨基酸序列差异也较大, 这可能是导致其酶活与酶学性质差异的原因。

根据 *E. coli* 所偏爱的密码子对 panD<sub>Lm</sub> 和 panD<sub>Cj</sub> 基因进行密码子优化, (G+C)% 含量分别由 45.7% 和 49.3% 变成 54.18% 和 54.67%, 氨基酸未发生改变。人工合成的序列经克隆连接载体 pUC57-simple, 获得 pUC57-panD。

### 2.2 重组菌的构建

将 pUC57-panD 质粒用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后获得 panD 序列, 长度均在 400 bp 左右, 与理论值一致。将目的基因序列连接到 pET28a(+) T7 启动子下游, 获得

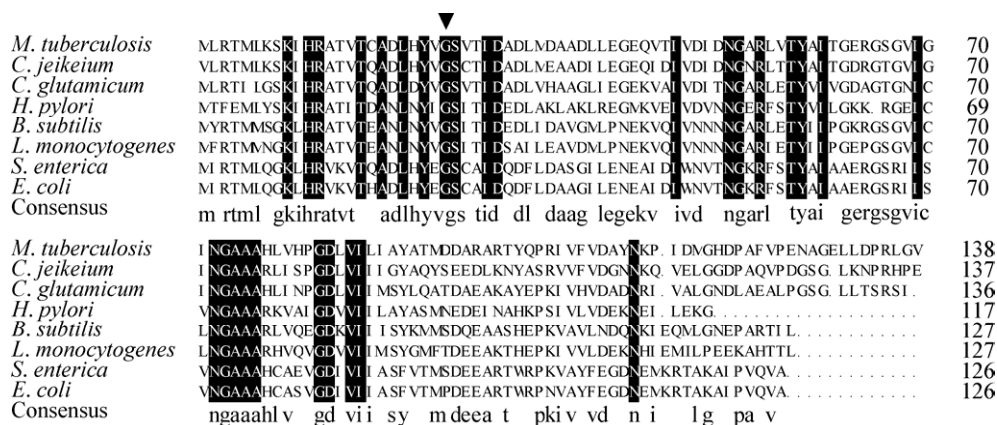


图 1 8 种不同来源的 PanD 氨基酸序列对比

Figure 1 Amino acid sequence alignment of 8 PanDs

注: 8 种 PanD 的 GenBank 登录号: *M. tuberculosis* (NP\_218118.1)、*C. jeikeium* (WP\_011273004.1)、*C. glutamicum* (NP\_599388.1)、*H. pylori* (NP\_206836.1)、*B. subtilis* (NP\_390122.1)、*L. monocytogenes* (NP\_465424.1)、*S. enterica* (NP\_459185.1)、*E. coli* (NP\_414673.1); 严格保守残基用黑色框出, 自加工位点用三角标出。

Note: Reference sequence of 8 PanDs: *M. tuberculosis* (NP\_218118.1), *C. jeikeium* (WP\_011273004.1), *C. glutamicum* (NP\_599388.1), *H. pylori* (NP\_206836.1), *B. subtilis* (NP\_390122.1), *L. monocytogenes* (NP\_465424.1), *S. enterica* (NP\_459185.1), *E. coli* (NP\_414673.1); Strictly conserved residues are boxed in black and the self-processing site is marked by a triangle.

重组质粒 pET28a(+)-*panD*, 将上述重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 获得重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*。双酶切验证, 均得到了 400 bp 左右的目的条带(图 2), 说明外源基因已经成功连接到表达载体上。

### 2.3 重组酶的诱导表达与纯化

重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD* 经 IPTG 诱导 16 h 后, 超声破碎, 离心后取上清, 经 Tricine-SDS-PAGE 电泳检验, 图 3 显示, 重组菌均成功表达了异源的 PanD, 条带分析结果显示, 表达量均达到 60% 以上。这两组重组酶的自剪切类型与 PanD<sub>C<sub>j</sub></sub> 相同, 均不需要孵育, 可自加工裂解成  $\alpha$  亚基与  $\beta$  亚基。破碎得到的上清液, 用 His Trap HP 镍柱纯化。Tricine-SDS-PAGE 电泳验证结果如图 3 所示, 均获得了较纯的目的蛋白, 可用于进一步研究。重组酶纯酶 PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> 和 PanD<sub>C<sub>j</sub></sub> 在常规的酶活测定条件下(37 °C, pH 7.0), 比酶活分别为 8.9 U/mg 和 11.8 U/mg。

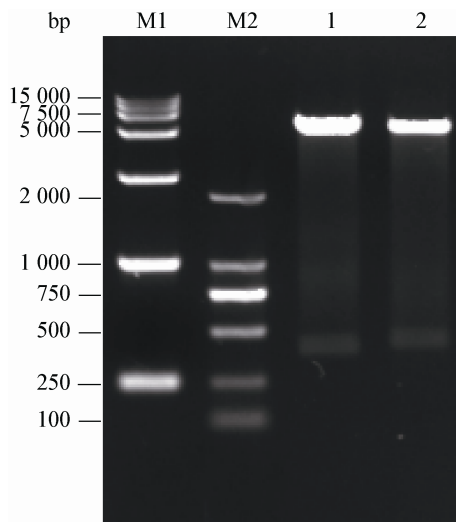


图 2 重组载体 pET28a(+)-*panD* 酶切验证

#### Figure 2 The enzymatic digestion of pET28a(+)-*panD*

注: M1: DL15000 DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1-2: *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切重组载体 pET28a(+)-*panD*<sub>L<sub>m</sub></sub> 和 pET28a(+)-*panD*<sub>C<sub>j</sub></sub>。

Note: M1: DL15000 DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1-2: Recombinant plasmid pET28a(+)-*panD*<sub>L<sub>m</sub></sub> and pET28a(+)-*panD*<sub>C<sub>j</sub></sub> digested by *Nde* I and *Hind* III.

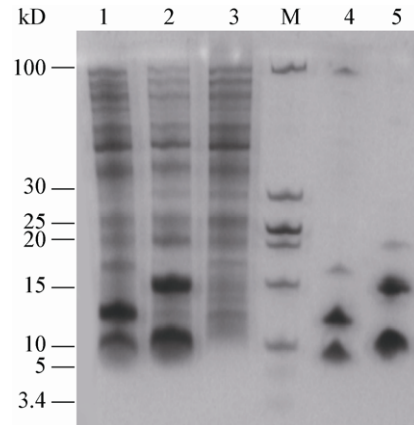


图 3 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD* 表达产物的 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析

#### Figure 3 The Tricine-SDS-PAGE analysis of expression product in recombinant strain

注: M: 标准蛋白 Marker; 1-3: 重组菌 BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*<sub>L<sub>m</sub></sub>、BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*<sub>C<sub>j</sub></sub> 和 BL21(DE3)/pET28a(+)-细胞破碎上清; 4, 5: 纯化后的重组蛋白 PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> 和 PanD<sub>C<sub>j</sub></sub>。

Note: M: Standard protein marker; 1-3: The centrifugated supernatant of the recombinant BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*<sub>L<sub>m</sub></sub>、BL21(DE3)/pET28a(+)-*panD*<sub>C<sub>j</sub></sub> and BL21(DE3)/pET28a(+); 4, 5: Purified PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> and PanD<sub>C<sub>j</sub></sub>.

### 2.4 重组酶最适温度及热稳定性

温度对两种 PanD 的酶活影响如图 4A 所示, 两者都在 60 °C 时达到最高酶活, 分别为 10.9 U/mg 和 14.5 U/mg。随着温度的升高, PanD 酶活均呈现先升高后降低的趋势。各温度下 PanD<sub>C<sub>j</sub></sub> 酶活均比 PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> 高, 对温度变化也更敏感。从重组酶的热稳定性实验结果图 4B 可以看出, 酶在设定的温度条件下放置 12 h, 酶活均有一定程度的损失, 温度越高酶活损失越快。50-65 °C 范围内, PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> 较 PanD<sub>C<sub>j</sub></sub> 稳定, 当温度达到 80 °C, 两者的酶活基本完全丧失。

### 2.5 重组酶最适 pH 及 pH 稳定性

PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> 和 PanD<sub>C<sub>j</sub></sub> 的最适 pH 和 pH 稳定性实验结果如图 5A 和图 5B 所示, 随着 pH 的增加, 两者的酶活均呈现先增后降的趋势, 都在酸性条件下比较稳定。PanD<sub>L<sub>m</sub></sub> 适合在中性或酸性环境下作用, 最适 pH 为 7.0, 当 pH 大于 7.5 时, 酶活迅速降低。PanD<sub>C<sub>j</sub></sub> 可以在较宽的 pH 范围条件下作用, 最适 pH 为 pH 6.0, 此时稳定性也最好, 酶活仅损失 21%。

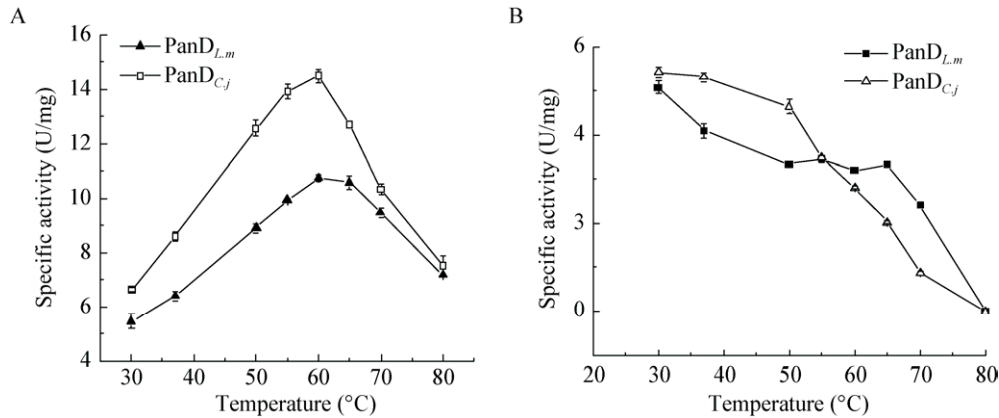


图4 温度对酶活力的影响(A)及酶的热稳定性(B)

Figure 4 Effect of reaction temperature on PanD activity (A) and thermal stability of the enzyme (B)

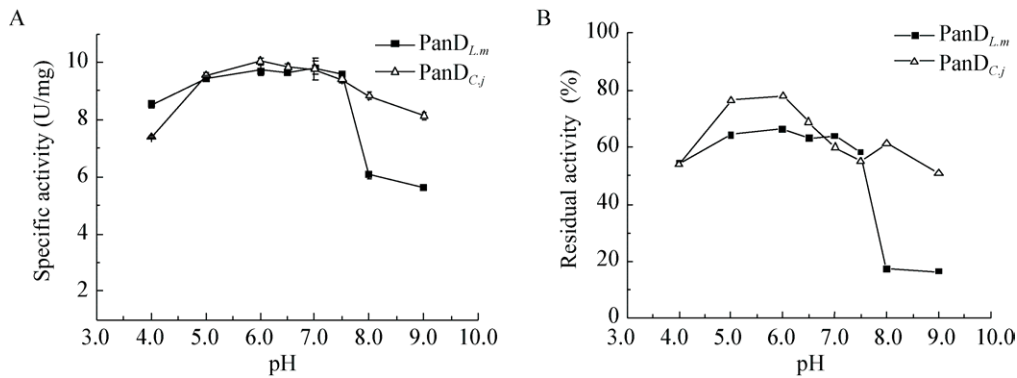


图5 pH对酶活力的影响(A)和酶的pH稳定性(B)

Figure 5 Effect of reaction pH on PanD activity (A) and pH stability of the enzyme (B)

## 2.6 底物对PanD的抑制作用

丙酮酰依赖型PanD在有底物L-天冬氨酸存在时,催化位点丙酮酰基团与磷酸吡哆醛辅因子作用相似,可与底物共价结合形成席夫碱<sup>[2]</sup>,促进底物脱羧,最终产生β-丙氨酸,但此过程中酶会发生自杀式的转氨作用,发生底物依赖性失活现象<sup>[10,15]</sup>。本研究中PanD酶与底物反应后,通过Ni柱再次纯化回收PanD酶,并去除L-天冬氨酸和反应产生的β-丙氨酸。对比PanD<sub>L,m</sub>、PanD<sub>C,j</sub>和目前研究较多的PanD<sub>C,g</sub>与底物反应前后酶活(图6),发现酶与底物反应后皆呈现出不同程度的失活现象,分别损失了11%、43%和16%,其中底物对PanD<sub>L,m</sub>的抑制作用最弱。

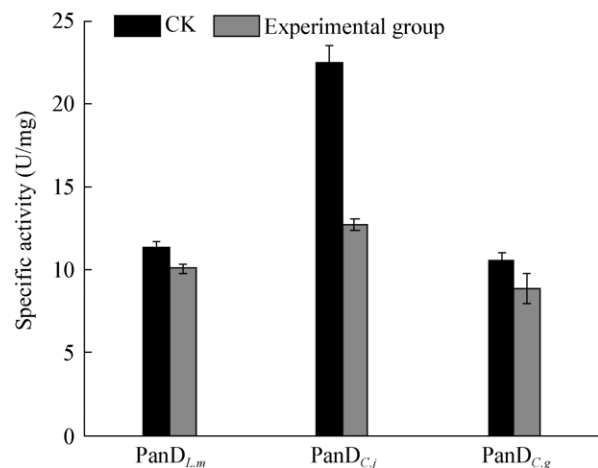


图6 底物对酶活力的影响

Figure 6 Effect of substrate on PanDs activity



## 2.7 重组酶的转化实验

转化反应过程中每隔 1 h 取样, 测定底物的转化率, 结果如图 7 所示。不同目的基因来源的 PanD 对 L-天冬氨酸的转化结果不同。反应前 4 h, 底物的转化率均迅速增长, 但随后底物转化率的增长变得缓慢, 这可能与底物对酶的不可逆抑制作用有关。反应 24 h 时, PanD<sub>Lm</sub>、PanD<sub>Cj</sub> 和 PanD<sub>Cg</sub> 三者对底物的转化率分别为 67.7%、82.2% 和 58.0%, PanD<sub>Lm</sub> 和 PanD<sub>Cj</sub> 对底物的转化率明显高于 PanD<sub>Cg</sub>, 值得进一步研究应用于工业生产。

## 3 结论与讨论

PanD 作为泛酸合成途径中的重要调控酶, 可作为一种病原微生物的药物靶细胞, 如 *H. pylori* 和 *M. tuberculosis*, 是一种潜在的抗菌剂<sup>[2,20]</sup>。在工业领域, PanD 主要用于特异性催化 L-天冬氨酸生成  $\beta$ -丙氨酸, 可将多肽藻青素获得的大量 L-天冬氨酸转化成更高价值的  $\beta$ -丙氨酸, 还可用于手性拆分制备 D-天冬氨酸和  $\beta$ -丙氨酸<sup>[10,21]</sup>。目前有关 PanD 的研究主要集中于少数几种来源的 PanD 酶的结构解析和自剪切机理方面, 很少关注 PanD 的酶学性质, 而更多来源的 PanD 的酶学特性尚不清楚, 有待研究者的开发。

本研究选择 *L. monocytogenes* 和 *C. jeikeium* 来源的 PanD 在 *E. coli* 中表达, 并对酶学性质进行了初步分析。PanD<sub>Lm</sub> 和 PanD<sub>Cj</sub> 在普通测定条件下,

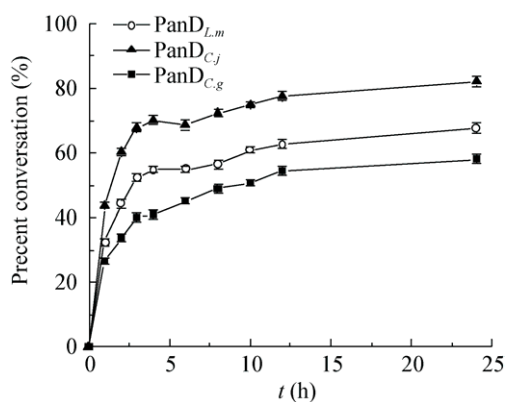


图 7 L-天冬氨酸的转化率

Figure 7 The conversion ratio of L-Asp

酶活分别达到了 8.9 U/mg 和 11.8 U/mg, 高于现有报道 PanD 酶活<sup>[7]</sup>。两种酶催化反应适宜的温度及 pH 范围与现有的 *C. glutamicum* 来源的 PanD 无明显不同, 对底物的转化率分别为 67.7% 和 82.2%, 明显高于 PanD<sub>Cg</sub>, 为工业化应用奠定了基础。在实验过程中, 我们发现这两种重组酶的热稳定性并不是很好, 其中 PanD<sub>Cj</sub> 对温度尤为敏感, 后期可能需要优化反应条件与反应体系, 或从分子水平上对其进行改造, 提高酶反应的稳定性。同时, 我们也发现 PanD<sub>Lm</sub> 和 PanD<sub>Cj</sub> 与其他丙酮酰依赖型 PanD 相同, 在转化过程中也存在不同程度的底物依赖性失活现象。虽然 PanD<sub>Lm</sub> 酶活损失程度相对较低, 有助于提升  $\beta$ -Ala 生物转化的效率, 但是目前这种不可逆的失活现象的机理研究并不透彻, 需要深入的研究, 从根本上解决 PanD 的底物依赖性失活问题, 这对于 PanD 转化 L-天冬氨酸生产  $\beta$ -丙氨酸具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] Gopalan G, Chopra S, Ranganathan A, et al. Crystal structure of uncleaved L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proteins, 2006, 65(4): 796-802
- [2] Lee BI, Suh SW. Crystal structure of the Schiff base intermediate prior to decarboxylation in the catalytic cycle of aspartate  $\alpha$ -decarboxylase[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(1): 1-7
- [3] Cronaa JE Jr.  $\beta$ -Alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 141(3): 1291-1297
- [4] Luo JX, Xue JP, Shen YC. Synthesis and application of  $\beta$ -Alanine[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2005, 27(1): 52-55 (in Chinese)  
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
- [5] Huang XM, Zhang ZB, Hong M, et al. Study on solation and purification of beta-alanine by biosynthesis[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2008, 30(3): 46-50 (in Chinese)  
黄秀敏, 张正波, 洪敏, 等. 生物法合成  $\beta$ -丙氨酸的分离纯化工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 46-50
- [6] Zhang ZB, Gao LJ, Qiu JP. Determination of  $\beta$ -alanine in biocatalysis process[J]. Bulletin of Science and Technology, 2008, 24(6): 779-791 (in Chinese)  
张正波, 高丽娟, 裘娟萍. 生物转化体系中  $\beta$ -丙氨酸含量测定方法建立与优化[J]. 科技通报, 2008, 24(6): 779-791
- [7] Deng SY, Zhang JL, Cai Z, et al. Characterization of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Bacillus subtilis*[J]. Chinese

- Journal of Biotechnology, 2015, 31(8): 1184-1193 (in Chinese)  
邓思颖, 张君丽, 蔡真, 等. 枯草芽胞杆菌 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的酶学性质[J]. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1184-1193
- [8] Monteiro DC, Patel V, Bartlett CP, et al. The structure of the PanD/PanZ protein complex reveals negative feedback regulation of pantothenate biosynthesis by coenzyme A[J]. Chemistry & Biology, 2015, 22(4): 492-503
- [9] 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
- [10] Könst PM, Franssen MCR, Scottel EL, et al. A study on the applicability of L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase in the biobased production of nitrogen containing chemicals[J]. Green Chemistry, 2009, 11(10): 1646-1652
- [11] Chen T, Xu SY, Feng Y. Inducing Conditions of Recombined L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase in Fermentor[J]. Journal of Jinling Institute of Technology, 2016, 32(3): 80-83 (in Chinese)  
陈涛, 徐世永, 冯炎. 结核杆菌 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶诱导表达条件研究[J]. 金陵科技学研学报, 2016, 32(3): 80-83
- [12] Kwon AR, Lee BI, Han BW, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of aspartate 1-decarboxylase from *Helicobacter pylori*[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2002, 58(5): 861-863
- [13] Zhao LZ, Zhang L, Shi GY. Expression of L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* and its application in enzymatic synthesis of  $\beta$ -alanine[J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2161-2170 (in Chinese)  
赵连真, 张梁, 石贵阳. 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[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2161-2170
- [14] Hong M. Study on enzymatic production of  $\beta$ -alanine[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2010 (in Chinese)  
洪敏. 酶法生产  $\beta$ -丙氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2010
- [15] Anton DL, Kutny R. Mechanism of substrate inactivation of *Escherichia coli* S-adenosylmethionine decarboxylase[J]. Biochemistry, 1987, 26(20): 6444-6447
- [16] Shen Y. Molecular modification of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* by site-directed mutagenesis[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)  
沈艳. 谷氨酸棒杆菌 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶催化性能的定点突变分子改造[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014
- [17] Schägger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 16-22
- [18] Shen Y, Zhao LZ, Li YR, et al. Synthesis of  $\beta$ -alanine from L-aspartate using L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(8): 1681-1686
- [19] Cui WJ, Shi ZX, Fang YQ, et al. Significance of Arg3, Arg54, and Tyr58 of L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum* in the process of self-cleavage[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(1): 121-126
- [20] 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
- [21] Gao LJ, Qiu JP. Research advances in L-aspartate decarboxylase[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(5): 54-59 (in Chinese)  
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): 54-59