



西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组来源的丙氨酸消旋酶的异源表达及性质研究

杨金茹¹, 范琴¹, 黄遵锡^{1,2,3}, 韩楠玉^{1,2,3}, 许波^{1,2,3*}

1 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南 昆明 650500

杨金茹, 范琴, 黄遵锡, 韩楠玉, 许波. 西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组来源的丙氨酸消旋酶的异源表达及性质研究. 微生物学报, 2022, 62(4): 1362–1378.

Yang Jinru, Fan Qin, Huang Zunxi, Han Nanyu, Xu Bo. Heterologous expression and characterization of alanine racemase derived from fecal microbial metagenomics of *Nomascus concolor*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1362–1378.

摘要: 丙氨酸消旋酶是异构酶家族中一类重要的酶, 既能作为新型抗菌药物筛选的靶标, 又是酶法合成 D-氨基酸的关键酶之一, 有巨大的研究价值。【目的】为挖掘动物胃肠道中未培养微生物的丙氨酸消旋酶基因资源, 探究不同微生物来源丙氨酸消旋酶基因及其酶的功能和性质。【方法】本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组出发, 基于序列分析和基因功能注释, 克隆丙氨酸消旋酶基因并在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功异源表达, 进行酶功能鉴定和性质研究。【结果】从宏基因组中获得 2 个丙氨酸消旋酶基因 *NCalr 1* 和 *NCalr 6* 并进行了重组表达, 2 基因全长均为 1 170 bp, 编码 389 个氨基酸; 理论分子量分别为 43.58 kDa 和 43.94 kDa。重组酶的最适 pH 均为 12.0, 最适温度为 40 °C 和 37 °C。在 pH 9.0–12.0 条件下处理 1 h, 重组酶相对酶活性仍在 90%以上, 表明重组酶具有较好的耐碱性; 在 30–45 °C 处理 1 h, 相对酶活仍在 85%以上, 说明重组酶在 30–45 °C 条件下稳定性好。重组酶的最适 PLP 浓度为 10 μmol/L, 添加 10 μmol/L PLP 时, 可使得重组酶的相对活性提高 30%和 7%左右; 但当 PLP 的结合位点由赖氨酸突变为丙氨酸后, 相对酶活仅为初始酶活的 1%和 27%。两重组酶的 K_m 分别为 (14.81±1.66) mmol/L 和 (25.87±1.95) mmol/L。10 mmol/L 的 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 和 SDS 对重组酶具有强烈的抑制作用; Fe^{3+} 对重组酶有极强的激活作用, 10 mmol/L 的

基金项目: 国家自然科学基金(31860299)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860299)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

Received: 28 May 2021; Revised: 13 January 2022; Published online: 9 February 2022

Fe³⁺可将酶活性提高 2.6–5.1 倍。【结论】本研究首次利用宏基因组学技术从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得 2 个新型丙氨酸消旋酶, 具有较好的应用前景。

关键词: 丙氨酸消旋酶; 粪便微生物宏基因组; 异源表达; 酶学性质

Heterologous expression and characterization of alanine racemase derived from fecal microbial metagenomics of *Nomascus concolor*

YANG Jinru¹, FAN Qin¹, HUANG Zunxi^{1,2,3}, HAN Nanyu^{1,2,3}, XU Bo^{1,2,3*}

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650500, Yunnan, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: Alanine racemase belonging to the isomerase family has great research value. It can be used as a target for the screening of new antibacterial drugs and is one of the key enzymes in the enzymatic synthesis of D-amino acids. **[Objective]** To mine the alanine racemase gene resources from uncultured microorganisms in the gastrointestinal tract of animals, and clarify the functions and properties of alanine racemase genes from different microorganisms. **[Methods]** On the basis of sequence analysis and gene function annotation, alanine racemase genes were cloned from the metagenome of the fecal microorganisms of *Nomascus concolor* and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) for the identification of enzyme functions and properties. **[Results]** Two alanine racemase genes, *NCalr 1* and *NCalr 6*, were obtained, each of which had a length of 1 170 bp and encoded 389 amino acids. The deduced proteins of *NCalr 1* and *NCalr 6* had the molecular weights of 43.58 kDa and 43.94 kDa, respectively. The recombinant enzymes had the optimal performance at pH 12.0 and 40 °C/37 °C. The relative activities of the recombinant enzymes treated at pH 9.0–12.0 for 1 h were above 90%, indicating good alkali resistance. The recombinant enzymes had good stability at 30–45 °C, with the relative activity above 85% after being treated at 30–45 °C for 1 h. The optimal PLP concentration was 10 μmol/L for the two enzymes, and the incubation with 10 μmol/L PLP increased the relative activity of the enzymes by about 30% and 7%, respectively. However, the mutation from lysine to alanine at the PLP binding site reduced the relative activity of the two enzymes to only 1% and 27% of the initial activity, respectively. The K_m values of the recombinant enzymes were (14.81±1.66) mmol/L and (25.87±1.95) mmol/L, respectively. The recombinant enzymes were inhibited by 10 mmol/L Hg²⁺, Ag⁺, Zn²⁺, and SDS while activated by Fe³⁺, and 10 mmol/L Fe³⁺ increased their activities by 2.6–5.1 times. **[Conclusion]** The study obtained two new alanine racemases with good application prospects from the fecal microbial metagenomics of *N. concolor* for the first time.

Keywords: alanine racemase; fecal microbial metagenomics; heterologous expression; enzymatic properties

绝大多数氨基酸都具有手性,以 D-或 L-氨基酸(AA)的形式存在于自然界。D-Ala 是细菌肽聚糖生物合成的重要成分,以 D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽的形式参与肽聚糖单位的交联,对细菌存活具有决定性作用^[1],然而自然界并不存在游离的 D-Ala,需要通过化学或生物酶法才能合成。

生物酶法主要是利用氨基酸消旋酶对底物 L-AA 进行外消旋化获得 D-AA;而氨基酸消旋酶根据辅酶依赖性可分为磷酸吡哆醛(PLP)依赖型和 PLP 非依赖型 2 类^[2-3],其中催化 L-Ala 和 D-Ala 相互转化的丙氨酸消旋酶(alanine racemase, ALR, EC 5.1.1.1)属于 PLP 依赖型消旋酶。ALR 主要存在于原核及部分真核生物中,与细菌引起的疾病密切相关。研究表明,许多致病菌中均存在 ALR,如结核分枝杆菌^[4-5](*Mycobacterium tuberculosis*)、变异链球菌^[6-7](*Streptococcus mutans*)、假坚强芽孢杆菌^[8](*Bacillus pseudofirmus*)等。ALR 的活性决定了细菌中 D-Ala 的量,即控制了细菌细胞壁的合成,进而影响致病菌的存活,因此 ALR 已成为新型抑菌药物筛选的重要靶标^[9-10]。

通过前期宏基因组测序研究,我们发现西黑冠长臂猿(*Nomascus concolor*)粪便微生物宏基因组中存在较高丰度和多样性的氨基酸消旋酶基因。因此,本研究利用宏基因组学和生物信息学技术,从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中筛选 ALR 编码基因,根据基因序列设计引物扩增 ALR 基因片段,并在大肠杆菌中异源表达,探究重组 ALR 的酶学性质,以为 ALR 抑制剂的筛选提供新靶标以及为 D-AA 的合成提供更多稳定性好、催化活性高的 ALR。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

PrimeSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶(*Nde* I 和 *Xho* I)购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒购自美国 Omega 公司;L-AA、4-氨基安替比林、N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3-甲基苯胺钠盐(TOOS)、辣根过氧化物酶和 D-氨基酸氧化酶购自上海源叶生物科技有限公司;DNA Marker 购自北京博迈德公司;其他试剂均为分析纯。

SCIENTZ-II D 型细胞超声破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;5810 型冷冻高速离心机, Eppendorf 公司;ETC811 型 PCR 仪,苏州东胜兴业科学仪器有限公司;sub cell GT 型核酸电泳仪、estain TM 型蛋白电泳仪,伯乐生命医学产品有限公司;Mullikan Sky 型全波长酶标仪,昆明友宁科技有限公司。

1.2 样品、菌株和载体

西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA、表达载体 *pEASY-E2*,为本实验室保藏;大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞购自北京擎科新业生物技术有限公司。

1.3 丙氨酸消旋酶基因的扩增及序列分析

1.3.1 克隆目的基因

利用生物信息学技术从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组文库中筛选含有完整序列的编码 ALR 的基因 *NCalr 1* 和 *NCalr 6*,据此设计特异性引物对 *NCalr 1-F₁*、*NCalr 1-R₁* 和 *NCalr 6-F₆*、*NCalr 6-R₆*,以西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 为模板,扩增目的基因 *NCalr 1* 和 *NCalr 6*。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,其信息如下(划线部分代表 *Nde* I 和 *Xho* I 的酶切位点):

NCalr 1-F₁: 5'-TAAGAAGGAGATATACATA

TGGAATTGATGGATTCAACATTAAGCGG-3'
 NCalr 1-R₁: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGCTC
GAGCCCCCTTAAAGAAGCTC-3'

NCalr 6-F₆: 5'-TAAGAAGGAGATATACATA
TGGAATTGATGGAGAGTACACTGAAGCGC-3'
 NCalr 6-R₆: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGCTC
GAGTCCGAGGAGCTGGAGATTG-3'

NCalr 1 基因 PCR 反应体系(20.0 μL): 宏基因组文库 DNA 0.5 μL, PrimeSTAR Max 10 μL, NCalr 1-F₁ 0.5 μL, NCalr 1-R₁ 0.5 μL, ddH₂O 补足 20.0 μL (*NCalr 6* 基因同上)。PCR 反应条件为: 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 10 min。

1.3.2 序列分析

用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行核苷酸和氨基酸序列比对; 用 SignalP-4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) 预测信号肽; 蛋白质分子量使用 Bioxm 2.6 预测。用 MEGA 6.0 进行多序列比对分析和构建系统发育进化树, ESPrift 3.0 (<http://esprift.ibcp.fr/ESPrift/cgi-bin/ESPrift.cgi>) 进行比对结果美化。

1.4 连接转化

提取实验室前期构建的表达质粒 *pEASY-E2*, 并用 *Nde* I 和 *Xho* I 对其进行双酶切, 回收酶切后的载体片段。将纯化后的 ALR 基因 *NCalr 1*、*NCalr 6* 与酶切回收得到的线性化表达质粒 *pEASY-E2* 进行连接, PCR 反应体系(10.0 μL): 线性化 *pEASY-E2* 载体 1.0 μL, 纯化的目的基因 2.0 μL, Exnase II 1.0 μL, 5×CE II Buffer 2.0 μL, ddH₂O 补足 10.0 μL, 37 °C PCR 仪孵育 30 min, 后将 10.0 μL 连接产物全部转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 构建 BL-21(DE3)/NCalr 1、BL-21(DE3)/NCalr 6 重组子, 阳性克隆经验证(菌液 PCR)后, 送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.5 重组酶的表达、纯化及鉴定

取重组菌株 BL21(DE3)/NCalr 1 和 BL21(DE3)/NCalr 6, 以 0.1% 接种量接种到灭菌的含 2 L LB (含 100 mg/L Amp) 培养液的 5 L 发酵瓶中, 37 °C 振荡培养 4–6 h (OD_{600} =0.8–1.0), 加入终浓度为 0.7 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 于 16 °C、180 r/min 过夜培养 16 h 左右。4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用适量的 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液悬浮菌体后, 于冰浴条件下用超声波细胞破碎仪(变幅杆为 6 950 W)破碎菌体 15 min。细胞破碎液在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清并用 Ni-NTA Agarose 纯化含 6×His-tag 的目的蛋白即 NCALR1 和 NCALR6, 在 12% 的凝胶上进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.6 突变体的构建

以质粒 *pEASY-E2-NCalr 1* 和 *pEASY-E2-NCalr 6* 为模板, 设计突变引物, 采用 QuickMutation™ 基因定点突变试剂盒将重组酶氨基酸序列中能与 PLP 结合的第 39 位赖氨酸(Lys)突变为 Ala, 突变引物设计如下: (划线部分代表突变位点 AAG-GCG)

NCalr 1F: 5'-GTAAAATTTCTGGGCGTTG
TAGCGGCGGATGCTTACGGTCACG-3'

NCalr 1R: 5'-CGCCGCTACAACGCCAG
 AAATTTTACATCTGCGCTGAT-3'

NCalr 6F: 5'-AGGCGAAGCTCCTCGGCG
TGGTCGCGGCGGATGCCTAC-3'

NCalr 6R: 5'-CGCCGCGACCACGCCGAG
GAGCTTCGCCTTCGGCCCGAC-3'

NCalr 1 基因突变体系(25.0 μL): Nuclease-Free Water 17.0 μL, 10×BeyoFusion Buffer 2.5 μL, NCalr 1F 1.0 μL, NCalr 1R 1.0 μL, dNTPs mix 2.5 μL, 质粒 0.5 μL, BeyoFusion DNA Polymerase 0.5 μL (*NCalr 6* 基因同上)。PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60.9 °C 30 s, 68 °C 7 min,

20 个循环; 4 °C 10 min。PCR 反应结束后, 加入 1.0 μL *Dpn* I, 混匀后 37 °C 孵育 3 h。*Dpn* I 消化完毕后直接取 10.0 μL 消化产物与大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞混合, 通过含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体平板筛选, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证, 将验证条带正确的菌株送北京擎科新业生物技术有限公司测序。发酵, 纯化参看 1.5。

1.7 丙氨酸消旋酶活性测定

采用消旋反应和氧化反应两步法测定 ALR 的活性。

消旋反应: 200 μL 反应体系中含有 100 μL 40 mmol/L Britton-Robinson 缓冲液^[11], 80 μL 0.125 mol/L L-Ala, 0–5 μL 4 mmol/L PLP。37 °C 预热 5 min, 加入 20 μL 纯化后的酶蛋白(以煮沸灭活的酶液作空白对照)反应 10 min, 立即加入 25 μL 2 mol/L HCl 终止反应, 于冰上放置 2 min 后加入 25 μL 2 mol/L NaOH 溶液中中和过量的酸, 随即在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 将上层清液转移至新试管中。

氧化反应^[12]: 200 μL 显色体系中含有 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mg/mL 4-氨基安替比林, 0.1 mg/mL TOOS, 0.1 U D-氨基酸氧化酶, 2 U 辣根过氧化物酶与 200 μL 的消旋反应产物, 反应液于 37 °C 恒温反应 20 min, 测定 550 nm 吸光值。

一个酶活力单位(U)定义为 1 min 内催化生成 1 μmol D-Ala 所需要的酶量。

1.8 丙氨酸消旋酶酶学性质分析

1.8.1 最适 pH 和 pH 稳定性

37 °C 下, 以 L-Ala 为底物, 使用宽 pH 范围的 Britton-Robinson 缓冲液配制 pH 3.0–13.0 的缓冲液, 测定 NCALR1 和 NCALR6 的最适 pH。将酶液在 37 °C, pH 3.0–13.0 缓冲溶液中保温 1 h, 最适反应条件下测定其剩余酶活力,

以未作处理的酶液在最适反应条件下测定的酶活力为对照, 分析 pH 稳定性。

1.8.2 最适温度和温度稳定性

在最适 pH 条件下测定 NCALR1 和 NCALR6 的最适温度, 温度区间为 0–70 °C。将酶放置在不同温度(30、37、40、45 °C)处理 0–60 min, 在最适反应条件下测定重组酶的剩余酶活力, 以未作处理的酶液在最适反应条件下测定的酶活力为对照, 分析重组酶的热稳定性。

1.8.3 底物特异性

以 8 种终浓度为 50 mmol/L 的 L-AA 为底物, 即 Ala、丝氨酸(Ser)、半胱氨酸(Cys)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp), 在最适反应条件下测定其剩余酶活力。

1.8.4 辅因子 PLP 浓度对重组酶活性及其产物生成量的影响

以终浓度为 50 mmol/L 的 L-Ala 为底物, 在最适反应条件下测定不同浓度的 PLP (0、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$)对酶活性的影响, 并利用岛津 LCMS-8050 超高效液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)测定未添加 PLP 及最适 PLP 的反应液中产物 D-Ala 的含量。

1.8.5 酶分子动力学参数测定

以不同浓度的 L-Ala (0–50 mmol/L)为底物, 于最适反应条件下进行酶促反应。米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})的获取通过 Lineweaver-Burk 法计算得到。

1.8.6 金属离子和化学试剂对酶活性的影响测定

在酶促反应体系中加入终浓度为 10 mmol/L 的各种金属离子和化学试剂(Ag^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、EDTA、SDS、Tween-80、PEG20000、PEG4000、盐酸胍、丙酮、

乙醇), 在最适反应条件下测定重组酶的活力, 以不加金属离子和化学试剂的酶活力为对照。

1.8.7 NaCl 对重组丙氨酸消旋酶的影响和耐受性测定

用 pH 12.0 的缓冲液配制 0.5–5.0 mol/L NaCl 溶液。在重组酶的最适反应条件下, 向不同浓度的 NaCl 溶液中加入底物预热 5 min, 再加入酶液进行酶促反应, 以反应体系中不含 NaCl 为对照, 测定 NaCl 对酶的影响。将纯酶置于 0.5–5.0 mol/L NaCl 中, 37 °C 保温 1 h, 在最适反应条件下测定剩余酶活力(未除盐), 以未经 NaCl 处理的酶活力为对照, 测定 NaCl 耐受性。

1.8.8 突变体的酶活性测定

突变体的性质测定参照 1.7。

2 结果与分析

2.1 丙氨酸消旋酶基因的 PCR 扩增及序列分析

基于宏基因组序列分析, 从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组样品中筛选获得 2 条 ALR 基因, 设计引物, 通过 PCR 扩增得到 2 条 1 170 bp 的 DNA 片段 *NCalr 1* 和 *NCalr 6*, 经 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测显示条带大小与理论分子量大小相符(图 1), 将获得的目的基因与酶切后的表达载体 *pEASY-E2* 连接, 成功构建了表达载体 *pEASY-E2-NCalr 1* 和 *pEASY-E2-NCalr 6*。*NCalr 1* 和 *NCalr 6* 均不含信号肽、编码 389 个氨基酸, 蛋白分子量分别为 43.58 kDa 和 43.94 kDa, 序列 GenBank 登录号分别为 MW700274 和 MW700275。BLAST 结果显示, NCALR1 与人肠道宏基因组中毛螺科菌(*Lachnospiraceae* bacterium, MBD8917435.1)来源的 ALR 相似性最高(86.63%); NCALR6 与人肠道宏基因组中厚壁菌(*Firmicutes* bacterium, CCZ45815.1)来源

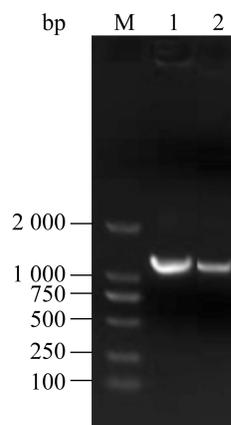


图 1 丙氨酸消旋酶基因 PCR 的电泳结果
Figure 1 Alanine racemase gene PCR electrophoresis results. M: DNA marker; 1: *NCalr 1* gene; 2: *NCalr 6* gene.

的 ALR 相似性最高(98.71%), 上述同源序列均来自宏基因组测序, 尚无相关研究报道, 表明来自西黑冠长臂猿粪便微生物编码的 NCALR1 和 NCALR6 属于新型 ALR。

将 NCALR1 和 NCALR6 与其他来源 ALR 的氨基酸序列进行多序列比对发现(图 2), 不同来源 ALR 的氨基酸序列存在多个保守区域, 如序列 N 端有一个含有 Lys(K)的 PLP 结合位点保守区域 G-V-[IV]-K-A-D-A-Y-G-H-G; 序列 C-端有参与催化 L-Ala 为 D-Ala 消旋作用的 Tyr (Y)的关键区域[AG]-[VT]-x-P-[IY]-G-Y-A-D-G-[FL]^[13]。但从图中可看出 NCALR1 和 NCALR6 在 C 端保守区域内第 44 位氨基酸残基不相同, 在 N 端保守区域内第 285、287、289 和 295 这 4 个位点的氨基酸残基也不相同, 这可能会引起其功能和性质的差异。

选取 GenBank 数据库中不同来源的 ALR 序列与 NCALR1 和 NCALR6 构建系统发育树(图 3), 结果表明 NCALR1 和 NCALR6 与人胃肠道粪便微生物来源的 ALR 相似性较高。尽管 NCALR1 和 NCALR6 的氨基酸序列较为相似, 然

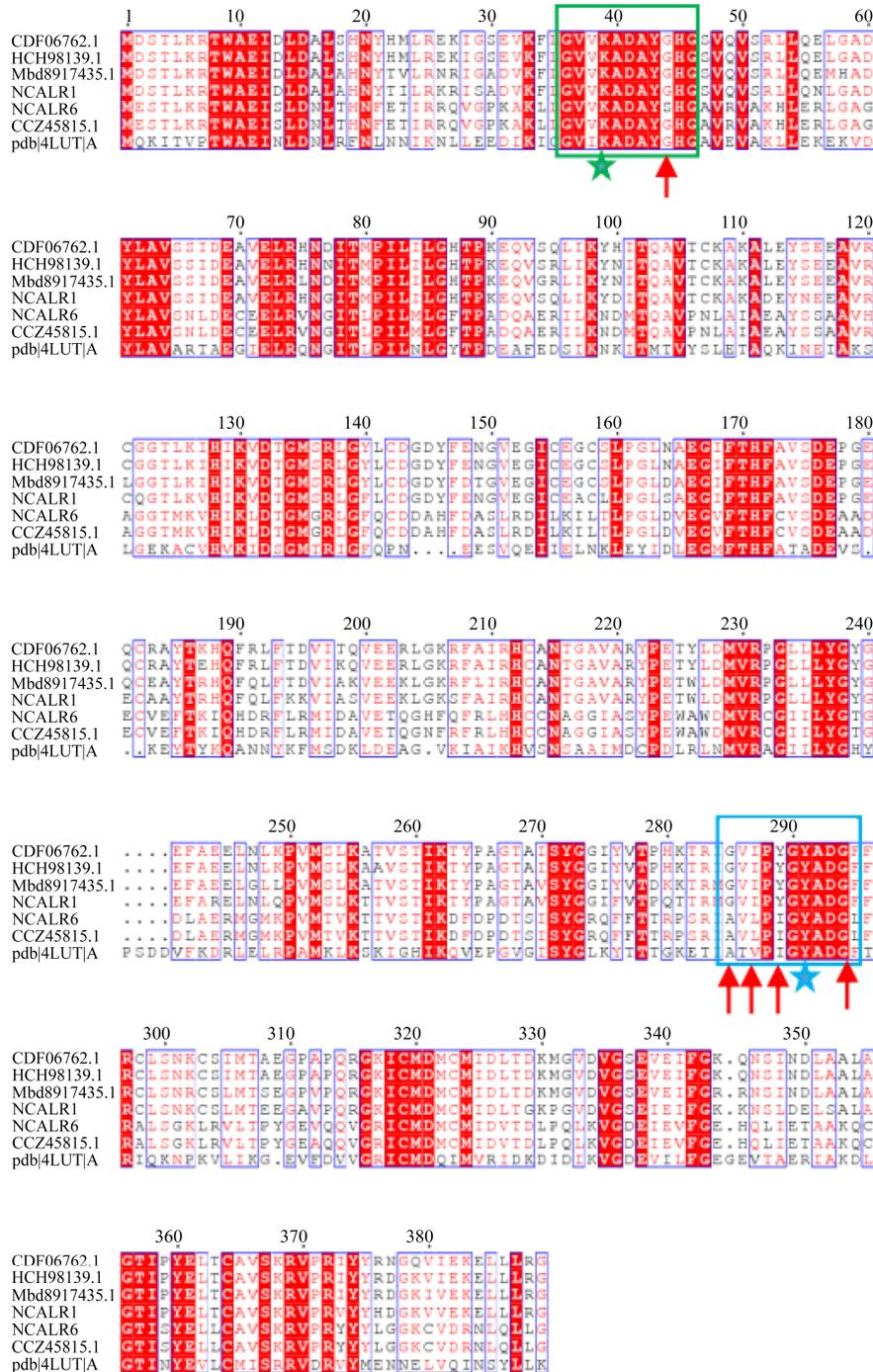


图 2 重组酶氨基酸序列与其他不同来源的 ALR 氨基酸序列比对分析

Figure 2 Alignment analysis of the amino acid sequence of the recombinase with other ALR amino acid sequences from different sources. The green box represents the conserved residues of the C-terminal catalytic site, the green five-pointed star represents the PLP binding site, the blue box represents the conserved residues of the N-terminal catalytic site, and the blue five-pointed star represents the site that catalyzes the racemization reaction, the red arrow indicates that there are differences in some amino acids in the conserved regions of the two recombinant alanine racemase enzymes.

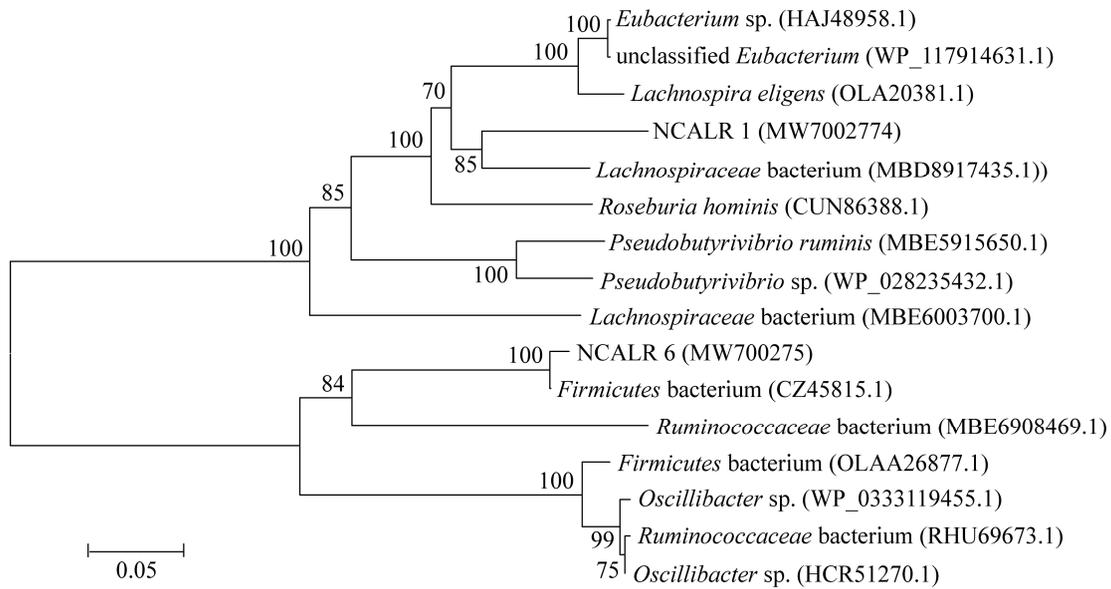


图 3 NCALR1 和 NCALR6 与其他微生物来源的 ALR 氨基酸序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of NCALR1 and NCALR6 and ALR from different sources. The phylogenetic tree analysis was constructed using the neighbor-joining (NJ) method using MEGA 6.0. The numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The number near the branch line indicates the percentage of reliability of the branch in the test, the scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position. All sequences are from GenBank.

而两者并未聚在一个大的分支。NCALR1 与毛螺科菌(*Lachnospiraceae* bacterium, MBD8917435.1) ALR 聚到一个分支, NCALR6 则与厚壁菌(*Firmicutes* bacterium, CCZ45815.1) ALR 聚在一个分支, 表明 NCALR1 和 NCALR6 可能分别来源于厚壁菌门的两种细菌。

2.2 重组丙氨酸消旋酶 NCALR1 和 NCALR6 的异源表达、纯化及鉴定

将成功构建的表达载体 *pEASY-E2-NCalr 1* 和 *pEASY-E2-NCalr 6* 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 将经测序确认的重组大肠杆菌 BL21(DE3)/NCalr1 和 BL21(DE3)/NCalr6 进行扩大培养, 经 0.7 mmol/L IPTG 诱导表达、破壁、离心后获得 NCALR1 和 NCALR6 粗酶液。用 Ni-NTA Agarose 对重组酶进行纯化, 在 SDS-PAGE 中分别得到分子量约为 44 kDa 的单一一条带(图 4), 与理论分子量一致。

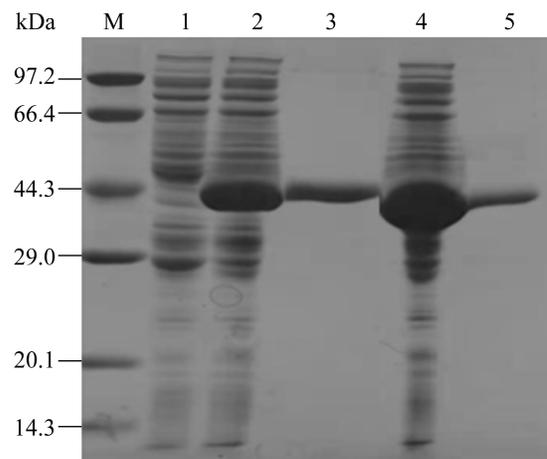


图 4 重组丙氨酸消旋酶 NCALR1 和 NCALR6 的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of recombinant NCALR1 and NCALR6. M: protein molecular weight marker; 1: extracts of IPTG-induced *E. coli* BL21(DE3) containing the empty *pEASY-E2*; 2: unpurified NCALR1; 3: purified NCALR1; 4: unpurified NCALR6; 5: purified NCALR6.

2.3 突变体的构建

以重组质粒为模板, 通过突变试剂盒进行 PCR 突变扩增, 获得突变型重组质粒, 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 阳性克隆和测序验证后获得突变型重组大肠杆菌菌株 BL21(DE3)/NCalr 1-7 和 BL21(DE3)/NCalr 6-2。发酵、纯化条件与野生型相同。

2.4 重组丙氨酸消旋酶 NCALR1 和 NCALR6 酶学特性表征

2.4.1 最适 pH 值及 pH 稳定性

图 5A 显示 2 个重组酶的最适 pH 均为 12.0, 在 pH 低于 7.0 时, 2 个重组酶几乎无活性。pH 耐受结果如图 5B 显示, 重组酶在 pH 9.0–12.0

处理 1 h, 酶活力均保持在 80%以上, 在 pH 3.0–7.0 处理 1 h, NCALR6 残存酶活力在 20%–60%左右, 而 NCALR1 基本无活性, 说明重组酶耐碱能力较耐酸能力强, 且在 pH 3.0–8.0 NCALR6 的 pH 稳定性较 NCALR1 好。

2.4.2 最适温度及温度稳定性

图 6A 显示, NCALR1 和 NCALR6 的最适温度分别为 40 °C 和 37 °C。将重组酶置于 30、37、40、45 °C 下保温 60 min, 以未经处理的为对照, 将处理 60 min 时的相对酶活进行作图 (图 6B) 显示, 重组酶在 4 个温度下处理 60 min 后相对活性均高于 80%, 且 NCALR1 在 40 °C 条件下耐受 60 min 后其相对活性达到 118%,

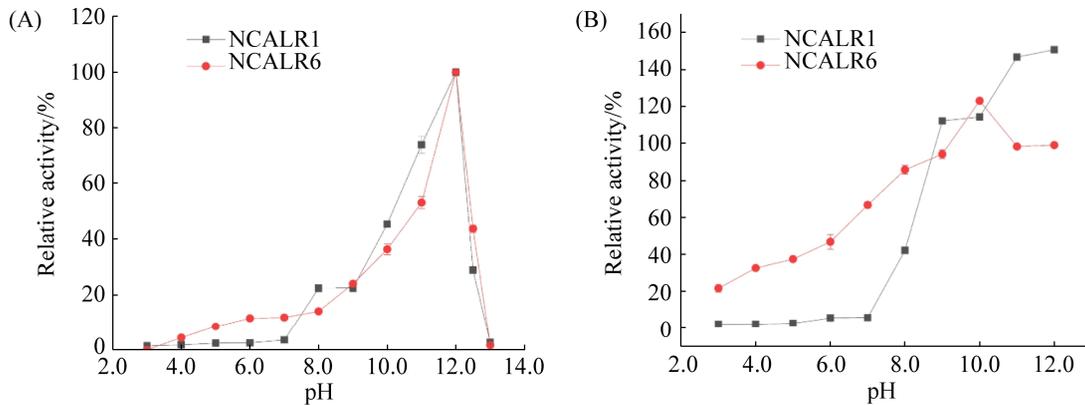


图 5 重组丙氨酸消旋酶最适 pH (A) 和 pH 稳定性 (B)

Figure 5 Optimal pH (A) and pH stability (B) of recombinant alanine racemase.

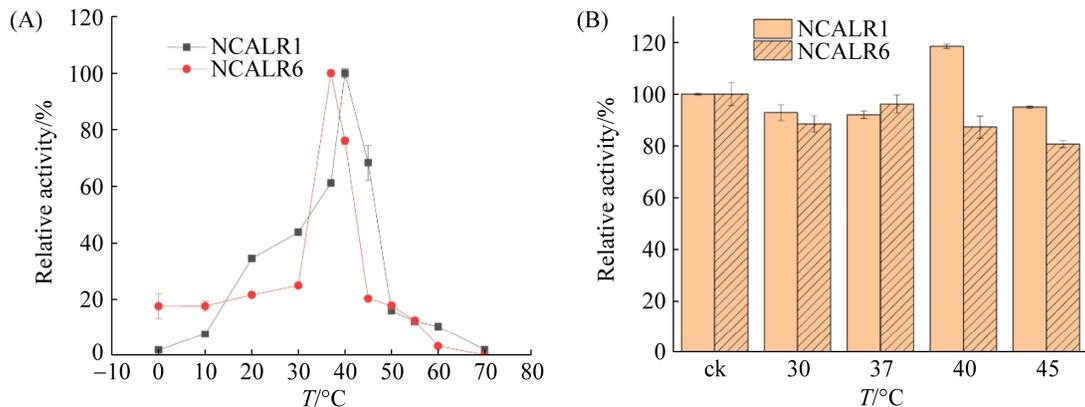


图 6 重组丙氨酸消旋酶最适温度 (A) 和热稳定性 (B)

Figure 6 Optimum temperature (A) and thermal stability (B) of recombinant alanine racemase.

说明重组酶在 37–45 °C 条件下稳定性较好, 且 NCALR1 在 30、40、45 °C 条件下的温度稳定性较 NCALR6 好。

2.4.3 底物特异性

由图 7 可见, 重组酶的最适底物均为 L-Ala, 对其他 7 种 L-AA 的相对活性均低于 10%, 说明重组酶具有严格的底物特异性。

2.4.4 辅因子 PLP 浓度对重组酶活性及其产物生成量的影响

添加外源辅因子对重组酶活性具有一定的影响, 结果如图 8 所示, 添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ PLP 可使得 NCALR1 的相对活性提高 30% 左右, 添加 10 $\mu\text{mol/L}$ PLP 可使得 NCALR6 相对活性提高 7% 左右; 说明重组酶的最适外加 PLP 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。利用 LC-MS/MS 测定未添加 PLP 和添加最适 PLP (10 $\mu\text{mol/L}$) 的反应液中 D-Ala 的含量, 结果如图 9 所示, NCALR1 和 NCALR6 在未添加 PLP 和添加 10 $\mu\text{mol/L}$ PLP 后均能产生 D-Ala, 且产物生成量相差不大, 说明重组 ALR 分泌至胞外前已经结合微生物细胞中的内源性 PLP, 进一步证明了该酶的酶活性并不依赖外源 PLP。

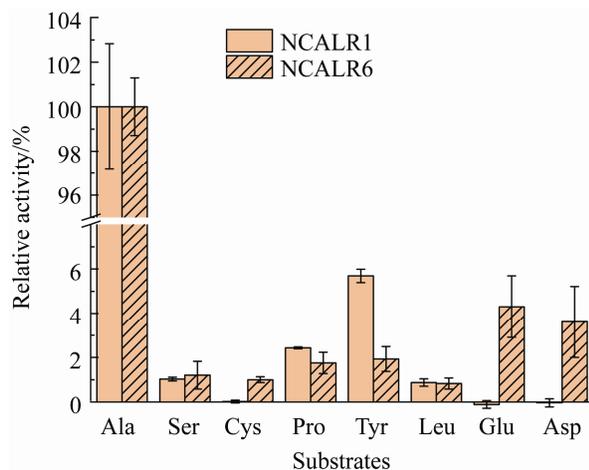


图 7 重组酶底物特异性
Figure 7 Substrate specificity.

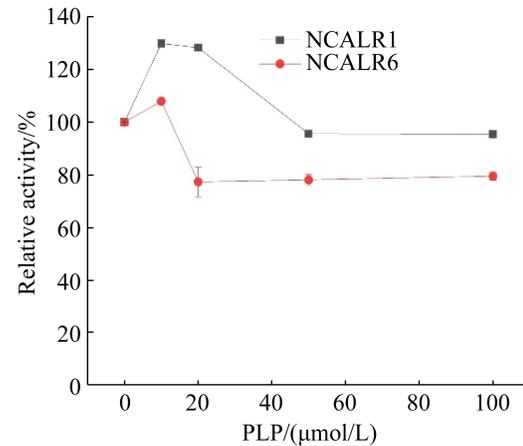


图 8 PLP 辅因子依赖性
Figure 8 PLP-dependent.

2.4.5 重组酶分子动力学参数分析

以 0、2、4、10、25、50 mmol/L 的 L-Ala 为底物, 在最适反应条件下测定酶活性, 根据双倒数图(图 10)测定和计算 K_m 和 V_{max} , NCALR1 的 K_m 和 V_{max} 分别为 (14.81 ± 1.66) mmol/L 和 (89.06 ± 4.26) $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$; NCALR6 的 K_m 和 V_{max} 分别为 (25.87 ± 1.95) mmol/L 和 (72.18 ± 1.42) $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

2.4.6 金属离子及化学试剂对酶蛋白活性的影响

在酶促反应体系中加入终浓度为 10 mmol/L 的各种金属离子和化学试剂, 结果如表 1。表 1 中的数据显示, 10 mmol/L 的 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 SDS 对重组酶有较强的抑制作用; Mg^{2+} 、 Co^{2+} 和 EDTA 对 NCALR1 抑制作用高于 50%, 而对 NCALR6 抑制作用较小。 Fe^{3+} 对 2 个重组酶都有激活作用, 其活性可提高 2.6–5.1 倍; Cu^{2+} 对 NCALR1 具有激活作用, 将其活性提高 0.5 倍, 但对 NCALR6 几乎没有影响; 乙醇对 NCALR1 有较强抑制作用, 而对 NCALR6 具有激活作用, 在实验条件下可促使其活性提高 0.5 倍; 其余金属离子和化学试剂对重组酶的影响较小(表 1)。

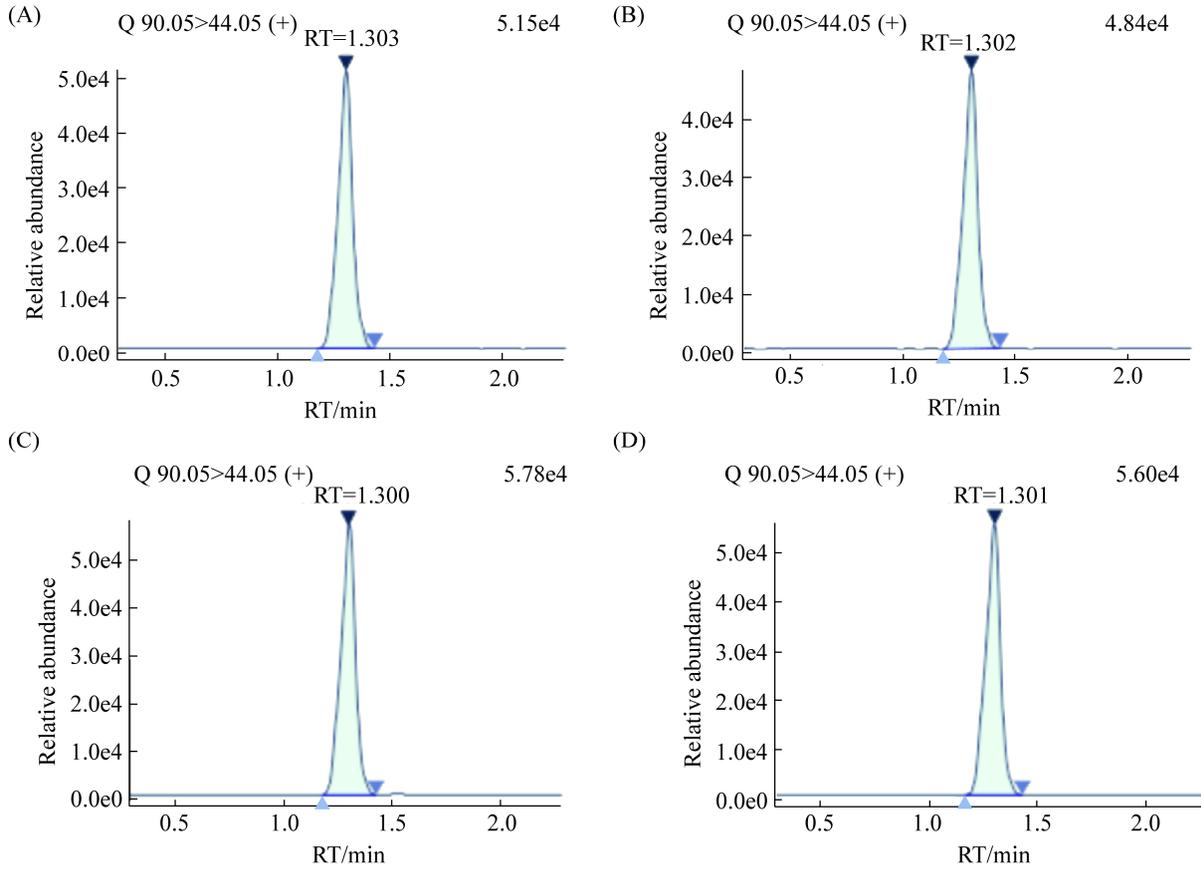


图 9 重组丙氨酸消旋酶消旋产物 LC-MS/MS 分析

Figure 9 LC-MS/MS analysis of racemization products of recombinant alanine racemase. A: the amount of D-Ala produced in the NCALR1 reaction solution without PLP; B: the amount of D-Ala produced in the NCALR1 reaction solution with 10 $\mu\text{mol/L}$ PLP; C: the amount of D-Ala produced in the NCALR6 reaction solution without PLP; D: the amount of D-Ala produced in the NCALR6 reaction solution with 10 $\mu\text{mol/L}$ PLP.

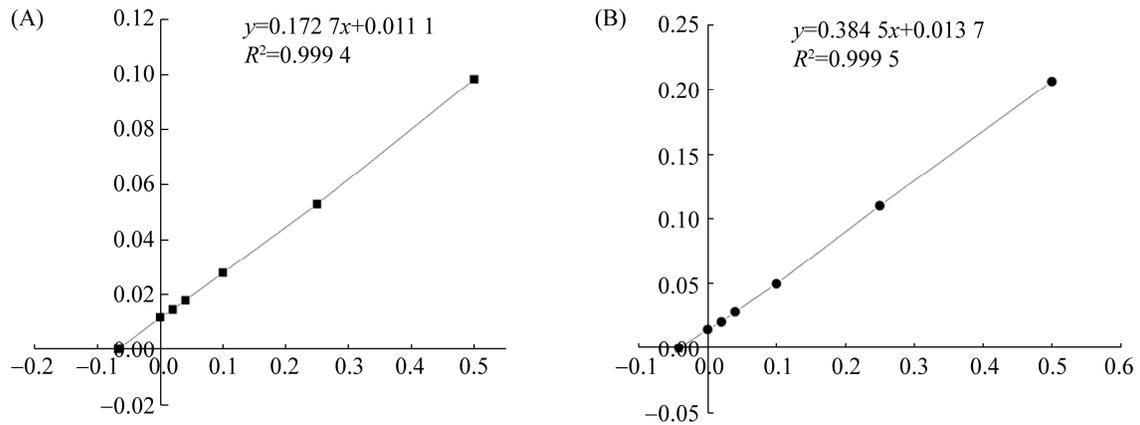


图 10 重组酶 NCALR1 (A)和 NCALR6 (B) Lineweaver-Burk 双倒数图

Figure 10 Lineweaver-Burk plot of recombinase NCALR1 (A) and NCALR6 (B).

表 1 金属离子和化学试剂对重组酶 NCALR1 和 NCALR6 活力的影响

Table 1 Effects of metal ions and chemical agents on enzyme NCALR1 and NCALR6 activity

| Metal ions and chemical agents (10 mmol/L) | NCALR1 relative activity/% | NCALR6 relative activity/% |
|--|----------------------------|----------------------------|
| None | 100.00±0.68 | 100.00±0.50 |
| Ag ⁺ | -0.43±0.23 | 1.53±0.28 |
| Zn ²⁺ | 8.15±1.21 | 15.97±1.28 |
| Ni ²⁺ | 4.89±0.33 | 19.24±0.41 |
| Fe ²⁺ | 16.4±0.85 | 13.81±1.98 |
| Fe ³⁺ | 366.15±3.12 | 617.01±8.24 |
| Ca ²⁺ | 41.99±1.51 | 44.05±0.67 |
| Cu ²⁺ | 157.51±3.22 | 92.76±0.84 |
| Hg ²⁺ | 0.31±0.26 | 1.47±0.42 |
| Li ⁺ | 78.59±1.99 | 69.65±1.45 |
| Mg ²⁺ | 28.03±0.52 | 83.99±2.25 |
| Pb ²⁺ | 6.09±0.16 | 21.96±0.34 |
| K ⁺ | 95.86±2.29 | 101.32±1.33 |
| Al ³⁺ | 6.10±0.54 | 8.59±0.74 |
| Mn ²⁺ | 27.16±1.89 | 37.63±0.57 |
| Na ⁺ | 91.99±2.39 | 100.12±3.17 |
| Co ²⁺ | 37.25±1.32 | 75.06±1.80 |
| Guanidine hydrochloride | 81.31±1.51 | 87.27±1.42 |
| PEG20000 | 64.08±0.42 | 101.63±1.90 |
| SDS | -0.10±0.15 | -0.93±0.21 |
| Tween-80 | 59.40±1.91 | 93.88±1.89 |
| PEG40000 | 53.50±0.27 | 88.59±0.82 |
| EDTA | 36.33±0.66 | 59.88±0.14 |
| Acetone | 41.47±1.03 | 119.73±1.62 |
| Ethanol | 27.24±0.09 | 150.26±2.72 |

2.4.7 NaCl 浓度对重组丙氨酸消旋酶 NCALR1 和 NCALR6 的影响和 NaCl 耐受性

不同 NaCl 浓度(0–5.0 mol/L)对重组酶活性的影响结果如图 11A 所示,重组酶的活性随 NaCl 浓度的增加而降低。当 NaCl 的浓度为 1.0 mol/L 时, NCALR1 酶活性降至 41%以下; NCALR6 酶活性降至 53%以下,且 NCALR1 和 NCALR6 在 1.5–5.0 mol/L NaCl 浓度范围内相对酶活低于 35%,说明高浓度的 NaCl 强烈抑制该重组酶

的活性。

NaCl 稳定性由图 11B 可知,重组酶在 37 °C、0.5–5.0 mol/L NaCl 中处理 1 h 后,NCALR1 在 0.5 mol/L 时的酶活性为 57%, NCALR6 在 0.5 mol/L 时的酶活性为 63%,且 2 个重组酶的活性随 NaCl 浓度的增高呈下降趋势,说明重组酶对 NaCl 不具耐受性。

2.4.8 突变菌株的 ALR 活性测定

在野生型重组酶的最适反应条件下同时测定野生型与突变型重组酶的酶活,结果如表 2。以不添加 PLP 的野生型 NCALR1 和 NCALR6

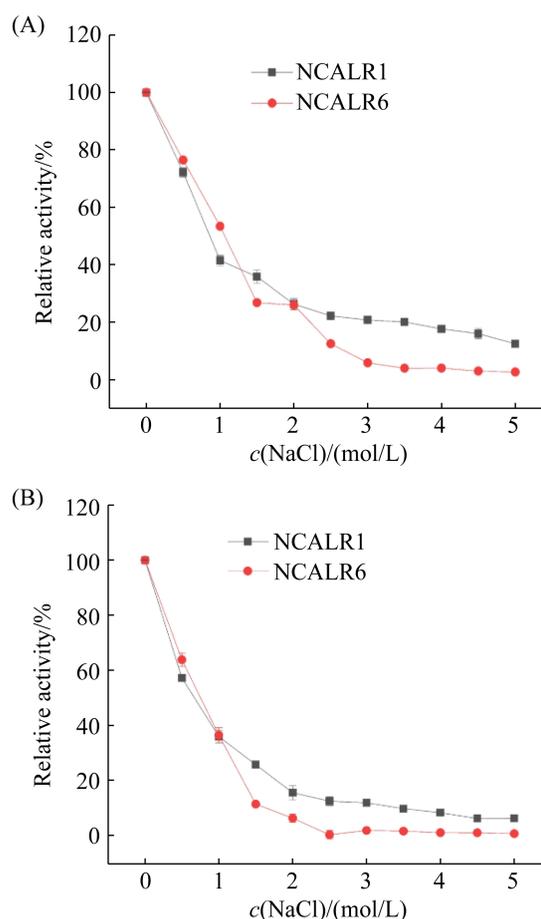


图 11 NaCl 对重组酶 NCALR1 和 NCALR6 的影响(A)及其稳定性(B)

Figure 11 The effect of NaCl on recombinant NCALR1 and NCALR6 (A) and its stability (B).

表 2 重组酶 NCALR1 和 NCALR6 与其突变体相对酶活对比

Table 2 Comparison of the relative enzyme activities of recombinases NCALR1 and NCALR6 and their mutants

| Enzymes | Relative activity/% |
|-------------|---------------------|
| WT/(NCALR1) | 100.00±1.04 |
| NCALR1-7 | 1.41±0.39 |
| WT/(NCALR6) | 100.00±0.21 |
| NCALR6-2 | 27.55±0.11 |

的相对酶活为对照(100%)，突变与辅因子结合的第 39 位氨基酸后，突变体 NCALR1-7 相对酶活几乎为零；而突变体 NCALR6-2 仅剩 27% 的相对酶活，进一步证实重组 ALR 为 PLP 依赖型消旋酶。

3 讨论与结论

本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得 2 个重组 ALR，多序列比对发现 NCALR1 和 NCALR6 都含有与酶催化功能密切相关的保守区域，包括序列 N 端含 Lys 的 PLP 结合位点和 C 端参与催化 L-Ala 到 D-Ala 的 Tyr 残基的低保守性区域，同时二者在 C 端保守区域内第 44 位氨基酸残基，在 N 端保守区域内第 285、287、289 和 295 这 4 个位点的氨基酸残基存在差异(图 2)。将重组酶与 PDB 蛋白高级结构数据进行比对发现 2 个重组酶与库中其他 ALR 相似性低于 40%，无法进行同源建模分析其构型，说明从动物粪便微生物宏基因组中筛选获得的 2 个重组 ALR 属于新型 ALR。

酶学性质研究发现，2 个重组酶最适 pH 均为 12.0，比较分析显示，宏基因组来源的 2 个 ALR 的最适 pH 均高于已报道的其他微生物来源的 ALR (表 3)，且在 pH 9.0–12.0 下处理 1 h 的酶活性也高于其他微生物来源的 ALR。NCALR1 最适温度为 40 °C，与已报道的铜绿假

单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1^[14]、*P. aeruginosa* 6-3^[15]、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)^[16] 和 *Bacillus pseudofirmus* OF₄^[17] 等来源的 ALR 相同；NCALR6 最适温度为 37 °C，与已报道的恶臭假单胞菌 (*P. putida*) YZ-26^[18] 来源的 ALR 相同；宏基因组来源的重组酶的最适温度与海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)^[19]、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*) UCC 118^[20] 及其突变菌株来源的 ALR 相似。NCALR6 在 0–70 °C 范围内有酶活，且在 0 °C 时还有 20% 左右的相对酶活，具有中低温酶活的特性，该重组酶的温度范围与 *P. putida* YZ-26 相似，而 NCALR1 在 0 °C 基本没有活性，不利于在低温环境中应用。热稳定性研究发现，2 个重组酶在 30–45 °C 条件下表现出了较好的稳定性，在 30、37、40、45 °C 条件下处理 1 h 后酶活性几乎不变，与 *P. aeruginosa* PAO1 相似，且 NCALR1 在 40 °C 条件下耐受 60 min 后其相对酶活可达 120% 以上，高于其他微生物来源的 ALR，说明在 40 °C 条件下酶分子适度的构象变化更有利于酶活性的表达。因此，宏基因组来源的重组 ALR 兼有耐碱性和中温酶的特性，NCALR1 较 NCALR6 在 40 °C 和 45 °C 条件下更为稳定，而 NCALR6 较 NCALR1 在 0 °C 条件下更为稳定。

研究表明，ALR 是 PLP 依赖型消旋酶^[2–3]。然而探究外源 PLP 对 ALR 活性的影响发现，在一定条件下添加外源 PLP 对 2 个重组酶活性有一定的激活作用，与 *B. pseudofirmus* OF₄^[17] 来源 ALR 的研究基本一致；而当 PLP 终浓度超过 10 μmol/L 时，由于酶活性中心已被 PLP 饱和，酶活性已达到最高，所以添加过多的 PLP 反而可能会抑制酶活性。LC-MS/MS 分析显示无外源 PLP 和添加 10 μmol/L 外源 PLP 的反应液中均能检测到产物 D-Ala (图 9)，可能是 ALR 分

表 3 重组 NCALR1 和 NCALR6 与部分微生物来源的丙氨酸消旋酶酶学性质比较

Table 3 Comparison of the enzymatic properties of recombinant NCALR1 and NCALR6 with alanine racemase derived from other microorganisms

| Origin | Names | Opt pH | Opt Temp./°C | pH stability | Temperature stability | PLP-dependent | References |
|--|---------------------------|--------|--------------|--|--|-----------------------------------|------------|
| Fecal microbial metagenomics of <i>Nomascus concolor</i> | NCALR1 | 12.0 | 40 | pH 9.0–12.0 for 1 h has more than 90% activities | 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C for 1 h has more than 90% activities | Without PLP it has 77% activities | This study |
| | NCALR6 | 12.0 | 37 | pH 9.0–12.0 for 1 h has more than 84% activities | 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C for 1 h has more than 85% activities | Without PLP it has 93% activities | |
| <i>P. putida</i> YZ-26 | Alr | 8.0 | 37 | pH 7.0–11.0 for 0.5 h has more than 50% activities | 4–40 °C for 0.5 h has more than 80% activities | 10 μmol/L PLP | [18] |
| <i>P. aeruginosa</i> PAO1 | PaAlr | 10.0 | 40 | pH 8.0–10.0 for 1 h has more than 100% activities | 30 °C, 40 °C for 1 h has more than 90% activities | 10 mmol/L PLP | [14] |
| <i>P. aeruginosa</i> 6-3 | PaAlr | 10.0 | 40 | pH 8.0–10.0 for 3 h has more than 100% activities | 30 °C for 20 h has more than 100% activities; 40 °C for 3 h has more than 50% activities | 10 μmol/L PLP | [15] |
| <i>C. perfringens</i> | CPAlr | 8.0 | 40 | pH 7.0–9.0 for 2 h has few activities | 30 °C, 40 °C, 50 °C for 1 h has few activities | 10 μmol/L PLP | [16] |
| <i>B. pseudofirmus</i> OF ₄ | dadXOF4 | 10.5 | 40 | – | – | It doesn't require exogenous PLP | [17] |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | UCC 118 ALR | 8.0 | 35 | – | – | 50 μmol/L PLP | [20] |
| | A131 ALR ^{A131K} | 9.0 | 45 | – | – | | |
| <i>S. iniae</i> | SiAlr | 9.5 | 35 | pH 8.5–9.5 for 2 h has more than 50% activities | 30 °C, 35 °C for 2 h has more than 50% activities | More than 10 μmol/L PLP | [19] |

泌至胞外前已经结合了微生物细胞中内源性的 PLP。本研究进一步将重组 ALR 中的 PLP 结合位点, 即第 39 位 Lys 突变为 Ala 后, 突变体 NCALR1-7 和 NCALR6-2 酶活性显著降低, 仅为初始酶活的 1% 和 27%, 结果证实重组 ALR 确实为 PLP 依赖型消旋酶。

金属离子和化学试剂对酶活性影响的研究表明, 大部分金属离子和化学试剂对 2 个重组酶具有抑制作用(表 1)。但是 Fe³⁺对重组酶有激活作用, 可将其活性提高 2.6–5.1 倍, 推测 Fe³⁺

可能与重组酶中某些位点相互作用, 使酶的构象发生更易于与底物结合与催化的变化, 从而发挥更高的活性。而且目前有关金属离子和化学试剂对 ALR 活性影响的研究较少, 本实验探究了 16 种金属离子和 8 种化学试剂对重组 ALR 活性的影响, 为其他微生物来源的 ALR 活性的提升奠定了实验基础。

研究表明, 动物胃肠道腔(0.3 mol/L NaCl)属于一个相对高渗的环境, 课题组前期研究已从动物粪便宏基因组中挖掘到一些耐盐酶类及

基因^[21],此外 ALR 及其催化生成的 D-Ala 也与水生无脊椎动物适应高渗透胁迫有关^[22-23]。因此,我们探究了 NaCl 对重组 ALR 酶活性的影响,结果发现 2 个重组酶在 0.5 mol/L NaCl 的条件下剩余酶活仍维持在 70%以上,在 0.5 mol/L NaCl 条件下处理 1 h 仍保留 50%以上活性(图 11),但是二者并不耐受高浓度 NaCl (1.5–5.0 mol/L)。

ALR 活性的提高对生物酶法合成 D-Ala 至关重要。因为 D-Ala 是无法从自然界直接获得的一类非蛋白光学性氨基酸,在微生物^[24-25]、哺乳动物^[26-27]和植物^[28]等中均有 D-Ala。且随着研究的深入,科研人员挖掘出 D-AA 在医药、食品、化妆品和农业等^[29-30]领域均有应用价值,因此, D-AA 的合成便也成为人们研究的热点。目前主要有 5 种酶类被用于 D-AA 的合成^[31-32], ALR 是关键酶之一, Galkin 等曾利用甲酸脱氢酶、L-丙氨酸脱氢酶、ALR 和 D-氨基酸转氨酶等共同作用生产 D-AA^[33]。近年来的研究表明利用 ALR 参与的生物酶法合成 D-Ala 具有反应过程简单、低污染和低成本等优点,但目前用于生物酶法合成 D-AA 的 ALR 存在热稳定性较差、催化活性低以及转化效率低等缺点,是生物酶法合成 D-AA 面临的主要难题,而且目前用于生物酶法合成 D-AA 的消旋酶均为碱性酶^[34-36];而本研究获得的重组 ALR 兼有耐碱性和中温酶的特性,可将其尝试用于生物酶法合成 D-AA,有待其能够提高 D-AA 的产量。因此,兼有耐碱性和中温酶特性的 NCALR1 和 NCALR6 在食品、医药、化妆品等领域具有巨大的潜在价值。

综上所述,本研究首次对粪便微生物宏基因组来源的 2 个丙氨酸消旋酶进行了异源表达和功能鉴定。重组酶兼有耐碱性和中温酶的特性,自身带有内源性辅因子,因此可以在不添

加外源 PLP 的条件下发挥较高的催化活性,有利于节约成本,在生物酶法合成 D-AA、临床治疗、医药、食品、化妆品及农业等领域具有广泛的应用前景,同时也为酶蛋白抑制剂的筛选提供了更丰富的酶资源。

参考文献

- [1] 邱伟,周学东,李星云. 丙氨酸消旋酶的研究进展. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(2): 228–232.
Qiu W, Zhou XD, Li MY. Research progress on alanine racemase. *International Journal of Stomatology*, 2016, 43(2): 228–232. (in Chinese)
- [2] Yoshimura T, Esak N. Amino acid racemases: functions and mechanisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(2): 103–109.
- [3] Strauch RC, Svedin E, Dilkes B, Chapple C, Li X. Discovery of a novel amino acid racemase through exploration of natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 2015, 112(37): 11726–11731.
- [4] 马娟娟,张国防,陈帅,姚丽娜,刘祥. 以结核分枝杆菌丙氨酸消旋酶为靶点的抗结核药物筛选及其与 D-环丝氨酸的共结晶. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1613–1620.
Ma JJ, Zhang GF, Chen S, Yao LN, Liu X. Anti-tuberculosis drug screening of alanine racemase from *Mycobacterium tuberculosis* and its co-crystallized with D-cycloserine. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1613–1620. (in Chinese)
- [5] Nakatani Y, Opel-Reading HK, Merker M, Machado D, Andres S, Kumar SS, Moradigaravand D, Coll F, Perdigão J, Portugal I, Schön T, Nair D, Devi KRU, Kohl TA, Beckert P, Clark TG, Maphalala G, Khumalo D, Diel R, Klaus K, Aung HL, Cook GM, Parkhill J, Peacock SJ, Swaminathan S, Viveiros M, Niemann S, Krause KL, Köser CU. Role of alanine racemase mutations in *Mycobacterium tuberculosis* D-cycloserine resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(12): e01575–e01517.
- [6] 郭笑,邱伟,周学东,程磊,李星云. 变异链球菌丙氨酸消旋酶基因表达纯化及活性测定. 口腔医学研究, 2018, 34(6): 597–600.
Guo X, Qiu W, Zhou XD, Cheng L, Li MY. Gene expression, purification, and activity determination of alanine racemase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Science Research*, 2018, 34(6): 597–600. (in Chinese)

- [7] Liu S, Wei Y, Zhou X, Zhang K, Peng X, Ren B, Chen V, Cheng L, Li M. Function of alanine racemase in the physiological activity and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Scientific Reports*, 2018, 8: 5984.
- [8] Dong H, Hu TT, He GZ, Lu DR, Qi JX, Dou YS, Long W, He X, Ju JS, Su D. Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Bacillus pseudofirmus* OF₄. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 497(1): 139–145.
- [9] Couñago RM, Davlieva M, Strych U, Hill RE, Krause KL. Biochemical and structural characterization of alanine racemase from *Bacillus anthracis* (Ames). *BMC Structural Biology*, 2009, 9: 53.
- [10] Im H, Sharpe ML, Strych U, Davlieva M, Krause KL. The crystal structure of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*, a target for structure-based drug design. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 116.
- [11] Fotouhi L, Ganjavi M, Nematollahi D. Electrochemical study of iodide in the presence of phenol and o-cresol: application to the catalytic determination of phenol and o-cresol. *Sensors*, 2004, 4(11): 170–180.
- [12] Soda K. Microdetermination of D-amino acids and D-amino acid oxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25: 228–235.
- [13] 曹芹, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 恶臭假单胞菌丙氨酸消旋酶基因的克隆、序列分析及表达. *微生物学报*, 2006, 46(1): 80–84.
Cao Q, Zhao Z, Zhang YZ, Wang Y, Ding JY. Cloning, sequence analysis and expression of alanine racemase gene in *Pseudomonas putida*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(1): 80–84. (in Chinese)
- [14] Dong H, Han QQ, Guo Y, Ju JS, Wang SS, Yuan C, Long W, He X, Xu SJ, Li S. Enzymatic characterization and crystal structure of biosynthetic alanine racemase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(4): 2319–2325.
- [15] 牛晓平, 韩卿卿, 何广正, 鞠建松, 徐书景. 铜绿假单胞菌中丙氨酸消旋酶的酶学特性及菌株检测. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2019, 43(1): 67–75.
Niu XP, Han QQ, He GZ, Ju JS, Xu SJ. Enzymatic characterization of alanine racemase from *Pseudomonas aeruginosa* and strain detection of *P. aeruginosa*. *Journal of Hebei Normal University: Natural Science Edition*, 2019, 43(1): 67–75. (in Chinese)
- [16] Israr M, Lv GP, Xu SJ, Li YH, Ding ST, Zhao BH, Ju JS. Biochemical characterization and mutational analysis of alanine racemase from *Clostridium perfringens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 149–155.
- [17] Ju JS, Xu SJ, Wen JX, Li G, Ohnishi K, Xue YF, Ma YH. Characterization of endogenous pyridoxal 5'-phosphate-dependent alanine racemase from *Bacillus pseudofirmus* OF₄. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(3): 225–229.
- [18] 刘俊林. 恶臭假单胞杆菌 YZ-26 中丙氨酸消旋酶结构与功能的研究. 山西大学硕士学位论文, 2011.
- [19] Muhammad M, Li YY, Gong SY, Shi YM, Ju JS, Zhao BH, Liu D. Purification, characterization and inhibition of alanine racemase from a pathogenic strain of *Streptococcus iniae*. *Polish Journal of Microbiology*, 2019, 68(3): 331–341.
- [20] Kobayashi J, Yukimoto J, Shimizu Y, Ohmori T, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. Characterization of *Lactobacillus salivarius* alanine racemase: short-chain carboxylate-activation and the role of A131. *SpringerPlus*, 2015, 4: 639.
- [21] Emiko O, Hiroki A. Total D-amino acids and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1994, 109(1): 191–197.
- [22] Abe H, Okuma E, Amano H, Noda H, Watanabe K. Role of free D- and L-alanine in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* to intracellular osmoregulation during downstream spawning migration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1999, 123(1): 55–59.
- [23] Yang YX, Yang YJ, Fan Q, Huang ZX, Li JJ, Wu Q, Tang XH, Ding JM, Han NY, Xu B. Molecular and biochemical characterization of salt-tolerant trehalose-6-phosphate hydrolases identified by screening and sequencing salt-tolerant clones from the metagenomic library of the gastrointestinal tract. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1466.
- [24] Vollmer W, Blant D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 149–167.
- [25] Cava F, De Pedro MA, Lam H, Davis BM, Waldor MK. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *The EMBO Journal*, 2011, 30(16): 3442–3453.
- [26] Yoshimura T, Goto M. D-amino acids in the brain:

- structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *The FEBS Journal*, 2008, 275(14): 3527–3537.
- [27] Morikawa A, Hamase K, Zaitso K. Determination of D-alanine in the rat central nervous system and periphery using column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 2003, 312(1): 66–72.
- [28] Vranova V, Zahradnickova H, Janous D, Skene KR, Matharu AS, Rejsek K, Formanek P. The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps. *Plant and Soil*, 2012, 354(1/2): 21–39.
- [29] 祝捷, 方维臻, 陆群. 氟胺氰菊酯的合成. *农药*, 2011, 50(7): 487–488, 491.
Zhu J, Fang WZ, Lu Q. Synthesis of fluvalinate. *Agrochemicals*, 2011, 50(7): 487–488, 491. (in Chinese)
- [30] Schmid A, Hollmann F, Park JB, Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 359–366.
- [31] Pollegioni L, Rosini E, Molla G. Advances in enzymatic synthesis of D-amino acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(9): 3206.
- [32] Martínez-Rodríguez S, Torres JM, Sánchez P, Ortega E. Overview on multienzymatic cascades for the production of non-canonical α -amino acids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 887.
- [33] Galkin A, Kulakova L, Yoshimura T, Soda K, Esaki N. Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4651–4656.
- [34] 何广正, 韩卿卿, 徐书景, 赵宝华, 鞠建松. 腾冲嗜热厌氧菌丙氨酸消旋酶底物通道氨基酸位点的功能. *微生物学报*, 2018, 58(8): 1397–1406.
He GZ, Han QQ, Xu SJ, Zhao BH, Ju JS. Function of amino acid sites in the substrate entryway of alanine racemase TtAlr from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(8): 1397–1406. (in Chinese)
- [35] 郑豆豆, 罗素亚, 杜穆花, 何广正, 徐书景, 鞠建松. 通过易错 PCR 提高鼠伤寒沙门氏菌丙氨酸消旋酶催化活性. *微生物学报*, 2020, 60(11): 2475–2486.
Zheng DD, Luo SY, Du MH, He GZ, Xu SJ, Ju JS. Improving catalytic activity of alanine racemase from *Salmonella typhimurium* by error-prone PCR. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(11): 2475–2486. (in Chinese)
- [36] 何广正, 韩卿卿, 翟浠佐, 徐书景, 鞠建松. 丙氨酸消旋酶 C-端结构域重组体的构建及其功能初探. *微生物学报*, 2021, 61(7): 1983–1996.
He GZ, Han QQ, Zhai XZ, Xu SJ, Ju JS. Study on the construction and function of C-terminal domain recombinant of alanine racemase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 1983–1996. (in Chinese)

(本文责编 李磊)