

## 工业生物技术

# 枯草芽胞杆菌 L-天冬氨酸 $\alpha$ 脱羧酶的酶学性质

邓思颖<sup>1,2</sup>, 张君丽<sup>3</sup>, 蔡真<sup>1</sup>, 李寅<sup>1</sup>

- 1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101
- 2 中国科学院大学, 北京 100049
- 3 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

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. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1184–1193.

Deng SY, Zhang JL, Cai Z, et al. Characterization of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2015, 31(8): 1184–1193.

**摘要:**  $\beta$ -丙氨酸是一种重要的医药化工原料, 目前主要依靠化学法进行生产。探寻更为环保和高效的生物生产法是未来研究的一个方向。L-天冬氨酸 $\alpha$ 脱羧酶 (PanD) 能特异地脱去 L-天冬氨酸的 $\alpha$ 羧基, 生成 $\beta$ -丙氨酸。本文比较了 3 种分别来源于大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌及枯草芽胞杆菌的 PanD 比酶活 (分别为 0.98、7.52 和 8.4 U/mg)。后两者的最适 pH 均为 6.5, 最适反应温度分别为 65 °C 及 60 °C。与目前研究最多的来源于大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌的 PanD 相比, 来源于枯草芽胞杆菌的 PanD 具有更好的活性和热稳定性, 具有更强的工业应用潜力。同时, 本文对该酶特有的翻译后自剪切及机理性失活现象进行了分析和讨论。

**关键词:** L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶,  $\beta$ -丙氨酸, 枯草芽胞杆菌, 谷氨酸棒状杆菌, 酶学性质

## Characterization of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Bacillus subtilis*

Siyang Deng<sup>1,2</sup>, Junli Zhang<sup>3</sup>, Zhen Cai<sup>1</sup>, and Yin Li<sup>1</sup>

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** As an important material in pharmaceutical and chemical industry,  $\beta$ -alanine was mainly produced by chemical

**Received:** February 20, 2014; **Accepted:** March 27, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21106175).

**Corresponding author:** Yin Li. Tel/Fax: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 21106175) 资助。

methods. L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase could catalyze the  $\alpha$ -decarboxylation from L-aspartate to  $\beta$ -alanine. Determinations for specific activities of PanDs from *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* and *Bacillus subtilis* were performed in this study (0.98 U/mg, 7.52 U/mg and 8.4 U/mg respectively). The optimal temperature and pH of PanDs from *C. glutamicum* and *B. subtilis* were 65 °C, pH 6.5 and 60 °C, pH 6.5 respectively. According to our research, PanD from *B. subtilis* could be more appropriate for industrial application because of the higher activity and thermostability when compared to PanDs from *E. coli* and *C. glutamicum* which had been the most studied. We also analyzed and discussed the special post-translation self-cleavage phenomenon and the mechanism based inactivation.

**Keywords:** L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase,  $\beta$ -alanine, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, enzyme characterization

$\beta$ -丙氨酸是自然界中唯一存在的 $\beta$ 型氨基酸, 是一种非蛋白氨基酸。目前 $\beta$ -丙氨酸主要用于合成泛酸钙、肌肽、帕米磷酸钠、 $\beta$ -丙氨酸金属配合物和巴柳氮等医药化工领域重要产品<sup>[1]</sup>。国内外多以化学法合成 $\beta$ -丙氨酸。化学合成法或是需要高温高压, 或是产生大量的盐, 或是副反应多, 对动力和三废处理的要求较高<sup>[1]</sup>。因此探索更为环保的生物法生产 $\beta$ -丙氨酸是未来的一个研究方向。

研究发现 L-天冬氨酸 $\alpha$ 脱羧酶 (L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase, EC4.1.1.11, PanD) 能特异性识别 L-天冬氨酸, 催化其脱掉 $\alpha$ 羧基生成 $\beta$ -丙氨酸。目前 $\beta$ -丙氨酸和 L-天冬氨酸的售价有 4-5 倍的差值, 这使得由 L-天冬氨酸生物法生产 $\beta$ -丙氨酸极具工业化潜能。因此生物生产法的研究重点是如何寻找到一个高效的 PanD。

研究发现 PanD 仅存在于微生物和植物中, 是泛酸合成途径中的关键酶<sup>[2]</sup>。PanD 是一个非常特殊的四聚体蛋白<sup>[3]</sup>。它转录翻译后得到 1 个无活性的前体蛋白 ( $\pi$ -蛋白, 约 14 kDa)。 $\pi$ -蛋白在第 24 位甘氨酸 (Gly<sup>24</sup>) 和第 25 位丝氨酸 (Ser<sup>25</sup>) 之间发生分子内重排, 从而导致肽链断裂, 自剪切形成 1 个 C 端含有羟基的 $\beta$ -亚基 (约 3 kDa) 和 1 个 N 端含有丙酮酰基的 $\alpha$ -亚

基 (约 11 kDa)。这 2 个亚基的空间位置非常紧密, 但却没有共价键链接<sup>[2]</sup>。而 PanD 的四聚体蛋白则是由 3 个剪切的 $\pi$ -蛋白和 1 个未剪切的 $\pi$ -蛋白组合而成, 其中未剪切的 $\pi$ -蛋白在 Gly<sup>24</sup>-Ser<sup>25</sup> 处已发生重排形成酯键<sup>[4]</sup>。

目前报道的 PanD 主要来源于大肠杆菌 *Escherichia coli*、谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 及部分病原菌 (幽门螺旋杆菌、肺结核杆菌)。对 *E. coli* PanD (PanD<sub>Ec</sub>) 的研究主要集中于结构解析和自剪切机理<sup>[3-7]</sup>。对病原菌 PanD 的研究则主要希望找到其剪切和催化的关键位点作为抗菌药物的新靶点<sup>[8-9]</sup>。这些研究均很少关注 PanD 的酶学性质。目前只有来源于 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 的 PanD 有酶活数据<sup>[10-12]</sup>。而对于选取生物催化剂时至关重要的几个考虑因素 (比如酶活、最适反应条件、热稳定性等) 却鲜有报道。这为选择一个高效的 PanD 来催化 L-天冬氨酸生产 $\beta$ -丙氨酸带来困难。

本研究通过前期筛选发现, 来源于枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 的 PanD (PanD<sub>Bs</sub>) 具有较高的比酶活。随后详细测定了它的最适温度、最适 pH、热稳定性及转化 L-天冬氨酸生产 $\beta$ -丙氨酸的能力等, 并与目前研究较多的来源于

*E. coli* 和 *C. glutamicum* 的 PanD 进行比较。研究表明 PanD<sub>Bs</sub> 具有更高的活性和更好的热稳定性, 因而具有更好的工业应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

*B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168、*C. glutamicum* ATCC 13032 及 *E. coli* BL21(DE3) 均来自实验室菌种保藏。质粒 pET-30a(+) 购自 Novagen 公司。

#### 1.1.2 主要酶、引物及试剂

DNA 聚合酶、各限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒均购自 Omega 公司; His Trap 纯化柱购自 Novagen 公司。本研究所用引物序列如表 1 所示。

表 1 本研究中所用到的引物

Table 1 Primers used for this work

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PanD <sub>Bs</sub> -For	GGCTTCCATATGCACCACCACCACCA CCACATGTATCGAACAAATGATGAGC
PanD <sub>Bs</sub> -Rev	GCGCACGGTACCCTACAAAATTGTAC GGGCTG
PanD <sub>Cg</sub> -For	GGCTTCCATATGCACCACCACCACCA CCACATGCTGCGTACCATCCTGGGT
PanD <sub>Cg</sub> -Rev	TTGCACGGTACCCTCAAATACTACGGC TCGTCA
PanD <sub>Ec</sub> -For	GGCTTCCATATGCACCACCACCACCA CCACATGATTTCGCACGATGCTGCAG
PanD <sub>Ec</sub> -Rev	GTGCACGGTACCCTCAAGCAACCTGTG CCGGAA
PanZ-For	GCTTGTGACGATAGTCAGATCGATCT CGATCCCCGCGAA
PanZ-Rev	GCTTGTGACTATCGTCTTAACAATTCT CCCAGCCGC

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因克隆及表达质粒构建方法

分别以 *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168、*C. glutamicum* ATCC 13032 及 *E. coli* BL21(DE3) 的基因组为模板, 以 PanD<sub>Bs</sub>-For 和 PanD<sub>Bs</sub>-Rev、PanD<sub>Cg</sub>-For 和 PanD<sub>Cg</sub>-Rev 以及 PanD<sub>Ec</sub>-For 和 PanD<sub>Ec</sub>-Rev 为引物对在 100 μL 体系中扩增 *panD* 片段, 从而得到 N 端带有 His 标签的 DNA 片段 *panD*<sub>Bs</sub>、*panD*<sub>Cg</sub> 及 *panD*<sub>Ec</sub>。利用 *Nde* I 及 *Kpn* I 双酶切后连接到经同样酶切的质粒载体 pET-30a(+) 上, 获得重组质粒 pET-30a-*panD*<sub>Bs</sub>、pET-30a-*panD*<sub>Cg</sub> 及 pET-30a-*panD*<sub>Ec</sub>。同时利用引物对 PanZ-For 和 PanZ-Rev 从 *E. coli* 基因组克隆得到 *panZ* 基因, 利用 *PshA* I 连接于 *panD*<sub>Ec</sub> 之后得到重组质粒 pET-30a-*panD*<sub>Ec</sub>-*panZ*。

### 1.2.2 重组蛋白诱导表达、纯化及 SDS-PAGE 检测方法

将重组质粒 pET-30a-*panD*<sub>Bs</sub>、pET-30a-*panD*<sub>Cg</sub>、pET-30a-*panD*<sub>Ec</sub> 及 pET-30a-*panD*<sub>Ec</sub>-*panZ* 分别转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3), 获得重组大肠杆菌 BL21(DE3)/*panD*<sub>Bs</sub>、BL21(DE3)/*panD*<sub>Cg</sub>、BL21(DE3)/*panD*<sub>Ec</sub> 及 BL21(DE3)/*panD*<sub>Ec</sub>/*panZ*。从平板上分别挑取各个重组菌的单菌落, 接种于 5 mL 含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 振荡过夜培养。将 1 mL 上述过夜培养物接种于 100 mL 含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub>=0.4 后加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L。30 °C 振荡培养 12 h 后收集 100 mL 菌体。将收集菌体用 10 mL 的超声缓冲液 (HEPPS 0.1 mol/L, pH 8.0; EDTA 1 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 20 mmol/L) 复悬后进行超声破碎。超声破碎上

清经 His Trap 柱纯化 (方法参照 Novagen His Bind Kits) 后用 SDS-PAGE 检测纯度。

### 1.2.3 $\beta$ -丙氨酸及 L-天冬氨酸浓度的 HPLC 检测方法

流动相: 0.035 mol/L 乙酸钠, 30% (V/V) 甲醇水溶液。衍生剂: 邻苯二甲醛 0.1 mol/L, N-乙酰-L-半胱氨酸 0.036 mol/L, 20% (V/V) 乙醇水溶液。衍生反应: 取 300  $\mu$ L 待测样品加入 360  $\mu$ L 硼酸钠缓冲液 (0.05 mol/L, pH 9.5), 再加入 240  $\mu$ L 衍生剂, 充分混匀后静置 2 min, 之后进样 10  $\mu$ L 检测。色谱柱为 Agilent ZRABOX SB-C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m), 检测波长 334 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 流速 1 mL/min。

### 1.2.4 重组酶最适温度的测定

酶活定义: 每分钟转化底物 L-天冬氨酸生成 1  $\mu$ mol 产物 $\beta$ -丙氨酸所需的酶量为 1 个酶活力单位 (1 U)。

将 25  $\mu$ g 重组酶加入 1 mL 含 50 mmol/L L-天冬氨酸的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 中, 分别于 37、45、55、60、65、70、75 及 80  $^{\circ}$ C 下反应 20 min, 加入 0.1 mL NaOH 溶液 (1 mol/L) 终止反应, 利用 HPLC 测定 $\beta$ -丙氨酸产量并计算酶活。

### 1.2.5 重组酶热稳定性的测定

将 25  $\mu$ g 重组酶加入 0.933 mL 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 中, 分别于 37、50、60 及 65  $^{\circ}$ C 下温育 12 h。然后加入 67  $\mu$ L L-天冬氨酸溶液 (750 mmol/L, NaOH 溶解, pH 7.0), 在相同温度下反应 20 min。加入 0.1 mL NaOH 溶液 (1 mol/L) 终止反应。利用 HPLC 测定 $\beta$ -丙氨酸产量并计算酶活。

### 1.2.6 重组酶反应过程中稳定性的测定

将 25  $\mu$ g 重组酶加入 1 mL 含 50 mmol/L L-天冬氨酸的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 中, 分别于 37、50 及 60  $^{\circ}$ C 下反应 20 min、40 min、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 及 4 h, 加入 0.1 mL NaOH 溶液 (1 mol/L) 终止反应, 利用 HPLC 测定 $\beta$ -丙氨酸产量随时间变化的曲线。将曲线进行多项式拟合, 以  $R^2$  值大于 99% 为宜。对该多项式求导, 计算各个时刻的瞬时酶活。

### 1.2.7 重组酶最适 pH 的测定

将 25  $\mu$ g 重组酶分别加入 0.933 mL 的 pH 5.0、5.6、6.0、6.5、7.0、7.6、8.0 及 9.0 的缓冲液中静置 5 min, 后加入 67  $\mu$ L L-天冬氨酸溶液 (750 mmol/L, NaOH 溶解, pH 7.0)。37  $^{\circ}$ C 下反应 20 min, 后加入 0.1 mL NaOH 溶液 (1 mol/L) 终止反应。利用 HPLC 测定 $\beta$ -丙氨酸产量并计算酶活。

pH 5.0、5.6、6.0 缓冲液用 0.05 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制。pH 6.5、7.0 缓冲液用 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液配制。pH 7.6、8.0、9.0 缓冲液用 0.02 mol/L 巴比妥钠-盐酸缓冲液配制。

### 1.2.8 重组酶的转化实验

将 7.5 mg 重组酶投入 300 mL 的 L-天冬氨酸溶液 (50 mmol/L, NaOH 溶解, pH 6.5) 中。37  $^{\circ}$ C 水浴, 350 r/min 搅拌, 并鼓泡通气, 用 1 mol/L  $H_2SO_4$  控制反应体系 pH 为 (6.5 $\pm$ 0.3)。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组酶的构建及纯化

通过 PCR 从 *B. subtilis*、*C. glutamicum* 及

*E. coli* 基因组中克隆得到长度分别为 384、411 及 381 bp 的基因片段 *panD<sub>Bs</sub>*、*panD<sub>Cg</sub>* 及 *panD<sub>Ec</sub>*，并通过引物在其 N 端加入含有 6 个组氨酸的 His6 标签。将上述基因片段置于 pET-30a(+) 上 T7 启动子下游，得到 3 个重组质粒 pET-30a-*panD<sub>Bs</sub>*、pET-30a-*panD<sub>Cg</sub>*、pET-30a-*panD<sub>Ec</sub>*。考虑到 *PanD<sub>Ec</sub>* 必须在另一蛋白 *PanZ* 的辅助下才能在常温下发生自剪切<sup>[5]</sup>，因此我们从 *E. coli* 基因组中克隆得到 384 bp 的 *panZ* 片段，将其连同 T7 启动子一起插入 pET-30a-*panD<sub>Ec</sub>* 中，得到重组质粒 pET-30a-*panD<sub>Ec</sub>*-*panZ*。

将上述 4 个重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)，在 0.2 mmol/L IPTG 作用下 30 °C 诱导 12 h 后破碎细胞。利用镍柱对超声破碎液进行亲和纯化，纯化后的重组酶 SDS-PAGE 验证结果如图 1 所示，纯度均在 90% 以上。

如图 1 所示，在没有 *panZ* 基因的情况下，表达 *PanD<sub>Ec</sub>* 后得到的是完全没有剪切的无活性

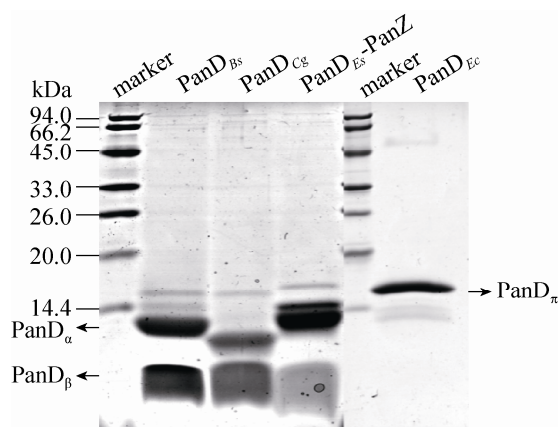


图 1 PanD 的纯化

Fig.1 Purification of PanD.

的  $\pi$ -蛋白。而在共表达 *panZ* 基因后，*PanD<sub>Ec</sub>* 几乎完全剪切，形成  $\alpha$  亚基 (约 12–13 kDa) 及  $\beta$  亚基 (约 2.8 kDa)。有趣的是，*PanD<sub>Bs</sub>* 和 *PanD<sub>Cg</sub>* 不需要任何辅助因子即可完成自剪切。这表明不同来源的 *PanD* 有着不同的剪切机理。

## 2.2 重组酶的比酶活

在常规反应条件 (37 °C, pH 7.0) 下，3 种重组酶的比酶活分别为 0.98、7.52 和 8.4 U/mg。由于 *PanD<sub>Ec</sub>* 比酶活太低，且在表达过程中需要添加 *PanZ* 辅助剪切，较难实现工业应用，因此后续实验主要以 *PanD<sub>Bs</sub>* 及 *PanD<sub>Cg</sub>* 为研究对象。

## 2.3 重组酶的最适反应条件

*PanD<sub>Cg</sub>* 和 *PanD<sub>Bs</sub>* 在不同温度下的酶活如图 3A 所示。两者的酶活随温度升高均呈现先急剧上升后快速下降的趋势，其最适温度分别为 65 °C 和 60 °C。两者在最适反应温度下的酶活为 15.2 U/mg 和 17.2 U/mg，分别为 37 °C 酶活

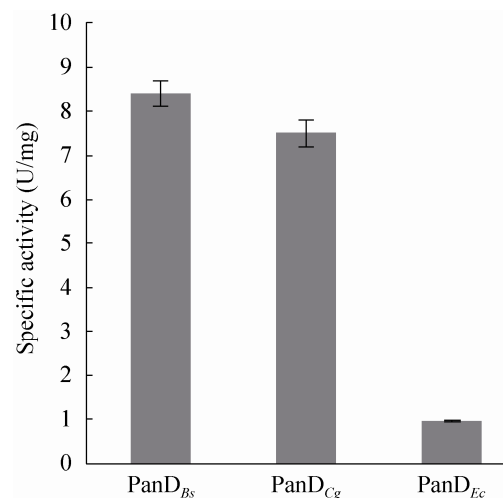


图 2 PanD 的比酶活

Fig. 2 Specific activity of PanD.

的 2.4 倍和 2.3 倍。表明该酶的活性对温度变化非常敏感。另外, 各个温度下  $\text{PanD}_{Bs}$  的酶活均比  $\text{PanD}_{Cg}$  高出 13% 左右。

37 °C 下  $\text{PanD}_{Bs}$  和  $\text{PanD}_{Cg}$  的酶活随 pH 同样呈现先上升后下降的趋势, 但在 pH 5.0 到 9.0 之间, 两者的酶活变化幅度仅为 45% 左右。这说明该酶具有较宽范围的 pH 适应性。2 个酶的最适 pH 均为 6.5 (图 3B)。酸性条件下  $\text{PanD}_{Bs}$  的优势不明显, 而在中性及碱性条件下,

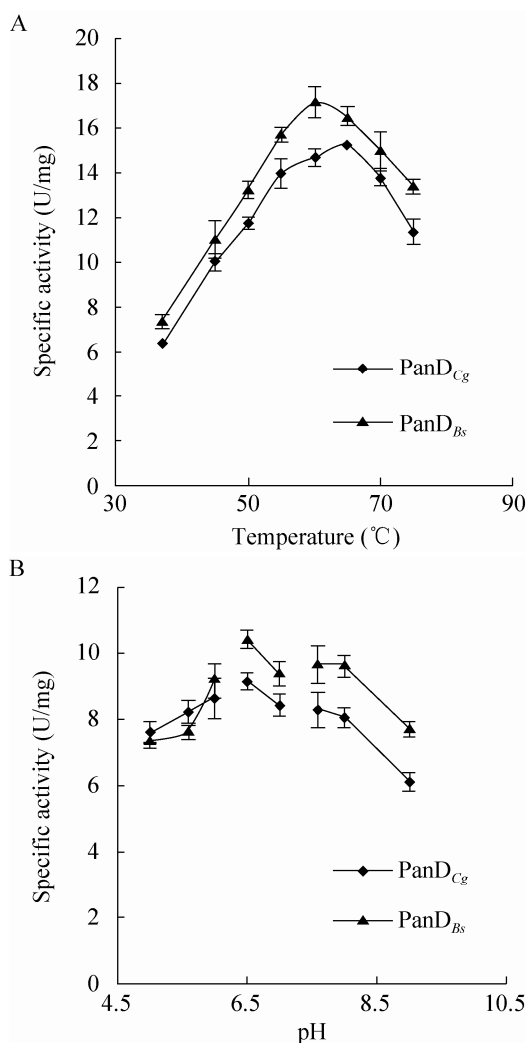


图 3 PanD 的最适反应条件  
Fig. 3 Optimal temperature and pH of PanD.

$\text{PanD}_{Bs}$  的酶活普遍比  $\text{PanD}_{Cg}$  高出 10%–20%。

## 2.4 重组酶的稳定性

$\text{PanD}_{Bs}$  和  $\text{PanD}_{Cg}$  在不同温度下温浴 12 h 后的残余活性如图 4 A 所示。37 °C 温浴 12 h 后,  $\text{PanD}_{Bs}$  和  $\text{PanD}_{Cg}$  的酶活损失仅为 1% 和 8%。说明两者在该温度下具有较好的稳定性。随着温浴温度升高, 两者的酶活损失也增多。65 °C 条件下两者的酶活损失分别增至 27% 和 57%。对比 2 组数据可以看出, 各个温度下  $\text{PanD}_{Cg}$  的酶活损失均高于  $\text{PanD}_{Bs}$ , 且温度越高这种差距越明显, 表明  $\text{PanD}_{Bs}$  具有更强的热稳定性。

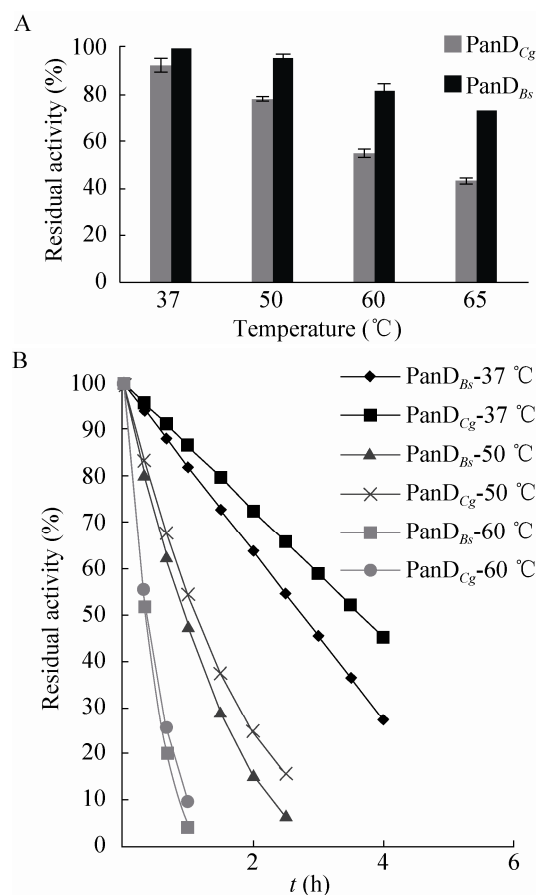


图 4 PanD 的稳定性  
Fig. 4 Stability of PanD. (A) Thermostability of PanD. (B) Reaction stability of PanD.

PanD<sub>Cg</sub> 和 PanD<sub>Bs</sub> 在不同温度下反应的稳定性如图 4B 所示。各个温度下, 两者的酶活随反应时间线性失活, 且温度越高, 失活速率越快。37 °C 反应 1 h, 两者酶活损失约为 14%–18%。50 °C 反应 1 h, 两者酶活损失约为 46%–52%。而 60 °C 反应 1 h 酶活损失约为 90%–96%。与图 4A 中温浴的酶活损失相比, 这 2 个酶在反应时酶活损失非常剧烈。比如, 60 °C 温浴 12 h, PanD<sub>Bs</sub> 和 PanD<sub>Cg</sub> 的酶活损失为 27% 及 57%, 而同样温度下反应 1 h, 两者的酶活损失即高达 96% 和 90%。这是因为 PanD 属于丙酮酰基依赖型脱羧酶, 在催化过程中会出现因电子错误重排导致活性中心改变而发生机理性失活<sup>[13-15]</sup>。这种机理性失活和催化过程相伴相生, 且催化越多, 失活越快。这也可以解释由于 PanD<sub>Bs</sub> 的酶活略高于 PanD<sub>Cg</sub>, 因而在反应过程中会表现出比 PanD<sub>Cg</sub> 略快的失活。

## 2.5 重组酶的转化实验

虽然提高反应温度有助于提高 PanD<sub>Bs</sub> 和 PanD<sub>Cg</sub> 的酶活, 但在高温条件下反应时, 酶活损失非常快, 因此我们仍然选取常规的 37 °C 进行转化实验。转化过程中每隔 1 h 测定反应体系中 β-丙氨酸的浓度, 结果如图 5 所示。无论是哪个酶, β-丙氨酸产量均未随反应时间线性增长, 这是由于 2.4 小节中提到的机理性失活所致。转化 8 h 后, PanD<sub>Bs</sub> 得到 2.23 g/L β-丙氨酸, 比 PanD<sub>Cg</sub> 提高 18%, 具有更大的工业应用潜力。

## 3 讨论

在石油资源枯竭以及生存环境恶化的大背景下, 化学品的生物生产法因其能耗低、污染

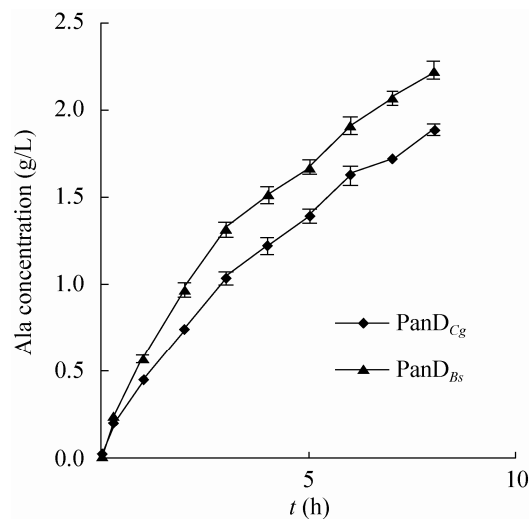


图 5 PanD 的转化实验

Fig. 5 Production of β-alanine by PanD.

小而备受瞩目。而生物催化走向工业化生产的最大障碍是能否找到一个足够高效和廉价的生物催化剂。因此酶的搜寻和改进一直是生物催化的核心。本课题组在前期筛选过程中发现来源于 *B. subtilis* 的 PanD 具有更高的比酶活。本文的详细表征也表明该酶具有更好的热稳定性, 并能在实际转化过程中得到更多的产物, 为生物催化 L-天冬氨酸生产 β-丙氨酸提供了一个更好的催化剂选择。

本研究中 3 种不同来源的 PanD 的氨基酸序列相似性不高, 如图 6 所示, 仅为 53.0%。其中 α 亚基的相似性为 72.2%, 而 β 亚基相似性仅为 48.7%。其中, PanD<sub>Bs</sub> 和 PanD<sub>Cg</sub> 两者的氨基酸序列相似性为 48.91%, 略高于它们各自与 PanD<sub>Ec</sub> 的相似性 (44.88% 和 39.71%), 这或许可以解释前两者与后者的酶学性质差别较大的原因。NCBI 上公布的 PanD 序列超过 5 000 种, 有大量潜在基因值得分析比较。通过基因筛选有望获得更高酶活和稳定性的 PanD。

PanD <sub>Bs</sub>	MYRTMMSGKLRHRTVTEANLNLYVGSITIDEDLIDAVGMLP	40
PanD <sub>Cg</sub>	MLRTILGSKIHRATVTQADLDYVGSVTIDADLVHAAGLIE	40
PanD <sub>Ec</sub>	MIRTMLGGKLRHVKVTHADLHYEGSCAIDQDFLDAAGILE	40
PanD <sub>Bs</sub>	NEKVQIVNNNGARLETYIIPGKRQSGVTCINGAAARLVQ	80
PanD <sub>Cg</sub>	GEKVAIVDITNGARLETYVIVGDAGTGNICINGAAHLIN	80
PanD <sub>Ec</sub>	NEAIDIVNVTNGKRFSTYAIIAERGSRIISVNGAAAHCAS	80
PanD <sub>Bs</sub>	EGDKVITISYKMSDQGEAASHEPKVAVLNDQNKIEQMLGN	120
PanD <sub>Cg</sub>	PGDLVITMSYLGATDAEAKAYEPKIVHVDADNRIVALGND	120
PanD <sub>Ec</sub>	VGDIVLIASFVTMPDEEARTWRPNVAYFEGDNEMKRTAKA	120
PanD <sub>Bs</sub>	EPARTIL	127
PanD <sub>Cg</sub>	LAEALPGSGLLTSRSI	135
PanD <sub>Ec</sub>	IPVQVA	126

图 6 PanD 序列比对

Fig. 6 Sequence alignment of PanD.

PanD 作为丙酮酰基依赖型的脱羧酶,需要在翻译后通过电子重排促使肽链断裂,形成丙酮酰基<sup>[2]</sup>。早期研究普遍认为 PanD 的剪切是完全自发进行的。直到 2012 年才发现来源于 *E. coli* 和沙门氏菌 *Salmonella enterica* 的 PanD 必须在另一蛋白 (PanZ 或 PanM) 的作用下才能在常温下进行剪切形成丙酮酰基<sup>[5,16]</sup>。而本研究也证实, PanD<sub>Ec</sub> 在没有 PanZ 时几乎完全不剪切,而过表达 PanZ 后几乎完全剪切。表明 PanZ 确实能促进 PanD<sub>Ec</sub> 剪切。但是 PanD<sub>Bs</sub> 和 PanD<sub>Cg</sub> 却完全不需要任何促进因子。究竟是什么造成了这种剪切的差异还有待进一步研究。Nozaki 等<sup>[5]</sup>曾对 32 种不同来源的 PanD 进行了氨基酸序列比对,并在其基因组中搜索 PanZ 同源序列。结果表明, PanZ 只存在于以 *E. coli* 为代表的肠道内生菌中,这可能是由于肠道内生菌生活在泛酸相对丰富的环境中,细菌通过 PanZ 调节 PanD 自剪切能有效控制  $\beta$ -丙氨酸的生成,从而调控泛酸的代谢<sup>[5,16]</sup>。已有研究表明 PanZ/PanM 受到乙酰-CoA 的调控,对于微生物体内泛酸的合成途径具有一定的调节作用<sup>[5,16-17]</sup>。

PanD 的另一个显著特点是存在机理性失活。1987 年 Anton 等<sup>[14-15]</sup>发现 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶 (丙酮酰基依赖型脱羧酶) 在转化过程中发生快速失活。随后机理研究表明失活的原因是酶-底物复合物脱羧后的电子错误重排。丙酮酰基作为活性中心,会与底物结合形成 1 个含有席夫碱的酶-底物复合物。该复合物发生脱羧后形成 1 个烯醇化物类似物。若该烯醇化物类似物发生正确的电子重排,则会形成新的希夫碱,水解生成产物并还原酶分子上的丙酮酰基。若电子重排错误则不能形成希夫碱,后续水解释放醛化底物并在酶分子上生成丙氨酸残基,即活性中心发生转氨基作用而失活<sup>[9,18-19]</sup>。

虽然对于 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶的机理性失活研究较为透彻,但关于 PanD 的机理性失活现象直到 2009 年才有报道。研究者发现来源于 PanD<sub>Ec</sub> 在转化过程中会发生不可逆失活,且这种失活不能通过固定化手段来减少<sup>[20]</sup>。我们研究表明 PanD<sub>Bs</sub> 和 PanD<sub>Cg</sub> 在多个反应温度下均存在机理性失活,而且反应温度越高,酶活越高,失活也越快。因而推测 PanD 可能具有和 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶同样的失活机理。由于机理性失活中酶的失活和产物生成是两条相伴相生的并行路径,形成了“不催化则不失活,催化越多失活越快”的矛盾。传统的优化反应条件、固定化酶等手段均无法改善。因此,我们认为,只有对酶分子本身进行改造,特别是对酶分子中那些与催化密切相关的氨基酸进行改造,才有可能改变现有的酶-底物复合物发生正确重排和错误重排的比例,减少机理性失活。而且理论上,如果改变后的酶分子结构有利于酶-底物复合物的正确电子重排,则其催化效率也有可能



增加,从而实现稳定性和催化活性的同步提高。这部分工作我们也正在进行中。

## REFERENCES

- [1] Luo JX, Xue JP, Shen YC. Synthesis and application of  $\beta$ -alanine. *Amino Acids Biotic Resour*, 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. *氨基酸与生物资源*, 2005, 27(1): 52–55.
- [2] Vanpoelje PD, Snell EE. Pyruvoyl-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 29–59.
- [3] Ramjee MK, Genschel U, Smith AG, et al. *Escherichia coli* L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry. *Biochem J*, 1997, 323: 661–669.
- [4] Schmitzberger F, Kilkenny ML, Lobley CMC, et al. Structural constraints on protein self-processing in L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase. *Embo J*, 2003, 22(23): 6193–6204.
- [5] Nozaki S, Webb ME, Niki H. An activator for pyruvoyl-dependent L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase is conserved in a small group of the  $\gamma$ -proteobacteria including *Escherichia coli*. *Microbiol Open*, 2012, 1(3): 298–310.
- [6] Stuecker TN, Hodge KM, Escalante-Semerena JC. The missing link in coenzyme A biosynthesis: PanM (formerly YhhK), a yeast GCN5 acetyltransferase homolog triggers aspartate decarboxylase (PanD) maturation in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 2012, 84(4): 608–619.
- [7] Webb ME, Lobley CMC, Soliman F, et al. Structure of *Escherichia coli* aspartate  $\alpha$ -decarboxylase Asn72Ala: probing the role of Asn72 in pyruvoyl cofactor formation. *Struct Biol Cryst Commun*, 2012, 68: 414–417.
- [8] Chopra S, Pai H, Ranganathan A. Expression, purification, and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* aspartate decarboxylase, PanD. *Protein Expres Purif*, 2002, 25(3): 533–540.
- [9] Lee B, Suh SW. Crystal structure of the schiff base intermediate prior to decarboxylation in the catalytic cycle of aspartate  $\alpha$ -decarboxylase. *J Mol Biol*, 2004, 340(1): 1–7.
- [10] 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*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1530–1539.
- [11] Shi ZX, Cui WJ, Zhou L, et al. Cloning and characterization of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bull*, 2013(4): 110–115 (in Chinese).  
石增秀, 崔文璟, 周丽, 等. 谷氨酸棒状杆菌 L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶基因的克隆及重组酶性质研究. *生物技术通报*, 2013(4): 110–115.
- [12] 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. *Microbiol China*, 2013, 40(12): 2161–2170 (in Chinese).  
赵连真, 张梁, 石贵阳. 谷氨酸棒状杆菌 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. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2161–2170.
- [13] Li YF, Hess S, Pannell LK. *In vivo* mechanism-based inactivation of S-adenosylmethionine decarboxylases from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10578–10583.
- [14] Anton DL, Kutny R. Mechanism of substrate inactivation of *Escherichia coli* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemistry*, 1987, 26(20): 6444–6447.
- [15] Diaz E, Anton DL. Alkylation of an active-site cysteinyl residue during substrate-dependent inactivation of *Escherichia coli* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochemistry*, 1991, 30(16): 4078–4081.

- [16] Stuecker TN, Tucker AC, Escalante-Semerena JC. PanM, an acetyl-coenzyme a sensor required for maturation of L-aspartate decarboxylase (PanD). MBio, 2012, 3(4): e00158–12.
- [17] Monteiro DC, Rugen MD, Shepherd D, et al. Formation of a heterooctameric complex between aspartate alpha-decarboxylase and its cognate activating factor, PanZ, is CoA-dependent. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 426(3): 350–355
- [18] Armando A, Venugopal D, Ulrich G, et al. Crystal structure of aspartate decarboxylase at 2.2 Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing. Nat Struct Mol Biol, 1998, 5: 289–293.
- [19] Saldanha SA, Birch LM, Webb ME, et al. Identification of Tyr58 as the proton donor in the aspartate- $\alpha$ -decarboxylase reaction. Chem Commun, 2001(18): 1760–1761.
- [20] Konst PM, Franssen MCR, Scott EL, et al. A study on the applicability of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase in the biobased production of nitrogen containing chemicals. Green Chem, 2009, 11(10): 1646–1652.

(本文责编 陈宏宇)



## 《生物工程学报》入选“中国精品科技期刊”

2014年9月26日,中国科学技术信息研究所发布了《2014年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《生物工程学报》入选300种“第3届中国精品科技期刊”,为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

《2014年中国科技期刊引证报告(核心版)》,涵盖了1989种中国科技核心期刊2013年的评价指标。通过对影响因子和总被引频次等指标进行综合评价,《生物工程学报》综合评分列生物工程类核心期刊第一名。

