

新型扁桃酸消旋酶的基因挖掘和性能表征

周茂志¹, 唐存多², 许建和¹, 郁惠蕾¹

1 华东理工大学 生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 南阳师范学院 昆虫生物反应器河南省工程实验室, 河南 南阳 473061

周茂志, 唐存多, 许建和, 等. 新型扁桃酸消旋酶的基因挖掘和性能表征. 生物工程学报, 2018, 34(6): 897–905.

Zhou MZ, Tang CD, Xu JH, et al. Genome mining and characterization of a new mandelate racemase. Chin J Biotech, 2018, 34(6): 897–905.

摘要: 消旋酶是实现手性化合物去消旋化制备光学纯化学品的重要工具, 来源于恶臭假单胞菌的扁桃酸消旋酶(MR), 是目前唯一可以催化两种构型扁桃酸互相转换的消旋酶。通过基因组数据挖掘获得了 9 个新的扁桃酸消旋酶基因及活性蛋白, 其中来源于放射性土壤杆菌 *Agrobacterium radiobacter* 的 ArMR 酶对扁桃酸和邻氯扁桃酸具有较高的催化活力, 而且该酶的异源表达水平也较理想。ArMR 催化扁桃酸消旋反应的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 7.8。该酶在 30 °C、40 °C 和 50 °C 下的半衰期分别为 70.7、7.2、0.17 h。ArMR 对(R)-和(S)-扁桃酸的 K_M 值分别为 1.44 mmol/L 和 0.81 mmol/L, k_{cat} 值分别为 410 s⁻¹ 和 218 s⁻¹; 对(R)-和(S)-邻氯扁桃酸的 K_M 值分别为 6.48 mmol/L 和 6.37 mmol/L, 而 k_{cat} 值为 0.22 s⁻¹ 和 0.23 s⁻¹。Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 对该酶的活力有促进作用, 而 Zn²⁺ 使其完全失活。新型扁桃酸消旋酶的发现和表征为今后此类酶的深入研究和开发提供了更多资源和数据参考。

关键词: 扁桃酸消旋酶, 扁桃酸, 邻氯扁桃酸, 基因挖掘, 催化性能, 动力学常数

Genome mining and characterization of a new mandelate racemase

Maozhi Zhou¹, Cunduo Tang², Jianhe Xu¹, and Huilei Yu¹

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 Henan Provincial Engineering Laboratory of Insect Bio-reactor, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China

Abstract: Racemases have been applied for the synthesis of enantiomerically pure compounds through the deracemization methods. Mandelate racemase from *Pseudomonas putida* was the only enzyme that catalyzes the interconversion of mandelate enantiomers. Using genome mining approaches, we identified 9 mandelate racemases (MRs). A novel racemase named ArMR with higher activity and better soluble protein expression, was isolated from *Agrobacterium radiobacter*. ArMR displayed the optimum catalytic activity at 50 °C, pH 7.8 in Tris-HCl buffer. The half-life of ArMR at 50, 40 and 30 °C was 0.17, 27.2 and 70.7 h, respectively. K_M parameter of ArMR towards (R)- and (S)-mandelic acid was 1.44 and 0.81 mmol/L, respectively; the

Received: November 12, 2017; **Accepted:** December 22, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21536004).

Corresponding author: Huilei Yu. Tel: +86-21-64250840; E-mail: huileiyu@ecust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21536004) 资助。

corresponding k_{cat} value was 410 s^{-1} and 218 s^{-1} . In addition, K_{M} of ArMR towards (*R*)- and (*S*)-2-chloro mandelic acid was 6.48 and 6.37 mmol/L, and the corresponding k_{cat} value 0.22 s^{-1} and 0.23 s^{-1} , respectively. Meanwhile, Mg^{2+} and Mn^{2+} could activate the enzyme whereas Zn^{2+} inactivated the enzyme completely. Discovery of more novel MRs provides supports further research and development of these racemases.

Keywords: mandelate racemase, mandelate, 2-chloromandelate, discovery, catalytic performance, kinetic constants

光学纯化合物可广泛应用于医药、香精香料和特殊化学品等制造行业,其合成需求日益增加。在现代有机化学制造过程中,部分单一构型化学品的合成仍然具有挑战性^[1]。近年来有机催化、金属催化与生物催化技术的进步推动了光学纯化合物的制备,其中外消旋体的催化动力学拆分仍然是工业制备手性化学品的主要方式之一^[2]。然而,此类传统的动力学拆分方法存在明显的缺陷,即单个对映体的理论得率最高为 50%。研究人员从过程经济性和绿色环保的角度考虑,提出了一种理论得率可达到 100%的拆分途径,即动态动力学拆分或称作去消旋化。动态动力学拆分结合传统动力学拆分和原位消旋化两种方法将外消旋形式的底物完全转化成单一构型的目标产物,理论得率可达到 100%,同时省去反应中间体的分离步骤^[3-5]。相比于化学法原位消旋化过程,酶促消旋化反应的条件更加温和,往往在常温常压及中性 pH 环境下完成,可以避免缩合、重排等副反应发生,在工业应用中可能更具优势^[6-7]。消旋酶(Racemase)是催化互为对映异构体的两种化合物之间相互转化的酶类,属于异构酶家族,酶学分类号为 EC 5.1.X.X。尽管目前所报道的消旋酶种类非常有限,但其在合成中的应用前景不可忽视。

扁桃酸消旋酶(EC 5.1.2.2)可催化扁桃酸对映异构体之间的相互转化^[8-11]。2012年奥地利生物有机化学家 Faber K.教授报道了由扁桃酸脱氢酶、氨基酸脱氢酶与扁桃酸消旋酶级联催化的一锅煮反应,从外消旋扁桃酸出发直接制备获得光学纯 *L*-苯甘氨酸,最终产物得率高达 94%,*ee* 值大于 97%^[12]。该级联反应条件温和、选择性高,成为

L-苯甘氨酸及其衍生物合成的一条新途径^[13]。所得产物可用于合成 β -内酰胺类抗生素及抗血小板类药物,在医药工业有着重要价值。因此进一步挖掘和研究新的扁桃酸消旋酶资源,对于拓宽上述多酶级联反应的催化效率和应用范围具有重要意义。文中以文献报道的唯一扁桃酸消旋酶序列^[4]为探针,通过基因数据挖掘方法寻找新型的扁桃酸消旋酶,并研究其酶学性质和催化动力学。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器

扁桃酸(Mandelic acid, MA)与邻氯扁桃酸(2-chloromandelic acid, 2-Cl MA)由江西科苑生物药业有限公司提供,分析纯;间氯扁桃酸与对氯扁桃酸由本实验室制备,纯度>97%;异丙醇购自迪马科技有限公司,色谱纯。如非特殊说明,实验用其他试剂和材料均来源于市售,试剂纯度均为分析纯;消旋酶催化反应的进度通过岛津 LC-2100A 高效液相色谱分析检测;蛋白浓度通过 BCA 试剂盒与 BioTek Power Wave XS2 酶标仪结合测定;核酸浓度定量使用 ThermoFisher 紫外分光光度计 NanoDrop ND-2000 测定。

1.1.2 菌株与质粒

所用的菌种和质粒由本实验室保藏。

1.1.3 培养基

LB 培养基 酵母提取物 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L;调节 pH 至 7.0,在 121 °C 灭菌 20 min。在液体 LB 培养基中加入 1.5%–2%的琼脂配成固体培养基,相同条件灭菌使用。

1.2 方法

1.2.1 扁桃酸消旋酶的基因挖掘与筛选

本文以扁桃酸为目标底物,寻找对其有活力的消旋酶。文献调研发现,已经报道的对此类底物有消旋活力的只有来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* ATCC 12633 扁桃酸消旋酶 PpMR (Uniprot 登录号 P11444)。本研究以该酶作为探针,将其蛋白序列在 NCBI 数据库中进行 BLASTp。为保证序列多样性,挑选与探针序列相似性在 20%–60% 左右的候选序列作为待克隆蛋白,这些序列功能上并没有经过详细注释和验证。对虚拟筛选得到的序列分别进行克隆和诱导表达。

考察粗酶催化底物转化的情况,1 mL 反应体系(2 mL 圆底离心管)如下:1 mmol/L 单一构型的扁桃酸或邻氯扁桃酸,100 μ L 上清酶液,3.3 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,840 μ L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5,100 mmol/L)。混匀之后将 2 mL 离心管置于振荡器上,30 $^{\circ}C$ 、1 000 r/min 反应 12 h,加入适量 2 mol/L 硫酸终止反应,然后再用等体积的乙酸乙酯萃取处理后的反应液,14 000 r/min 离心 2 min 吸取上层有机相液体,加入少许无水硫酸钠干燥 8 h 以上,干燥结束后样品经离心过滤处理,通过液相色谱法检测底物转化情况。综合比较目标蛋白的催化效率和表达情况,选择最优的消旋酶进行进一步实验。

1.2.2 重组消旋酶的纯化

本实验选择 pET28a 作为原核表达载体,该质粒在表达目的蛋白过程中可在蛋白 C 端或 N 端引入多聚组氨酸纯化标签,基于亲和层析原理利用 HisTrap 预装柱(GE Healthcare)可直接一步捕获重组菌体破碎上清的目标蛋白。因为该酶在活性中心含有金属离子,纯化时选择 Tris-HCl 缓冲体系。纯化过程主要由 4 个步骤组成:漂洗、平衡、上样和洗脱;洗脱收集的样品经过 SDS-PAGE 分析选择电泳纯度较高的样品进行透析换液,获得的纯酶低温储存用于该酶的性质

表征。

1.2.3 分析方法及扁桃酸消旋酶纯酶活力的测定

扁桃酸消旋酶纯酶活力的测定是通过反应检测产物的生成速率计算其活力。1 mL 反应体系应包括 100 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)、2 mmol/L 底物、3.3 mmol/L 镁离子、适量纯酶。30 $^{\circ}C$ 、1 000 r/min 离心,反应特定的时间,终止反应分析产物的生成量,计算其比活力。

采用液相色谱法分析反应过程中底物的转化和产物的生成量。所用检测条件:色谱柱为 CHIRALCEL[®]OJ-H(4.6 mm \times 250 mm),检测波长 228 nm,柱温 30 $^{\circ}C$;流动相为正己烷/异丙醇(92:8,V/V),添加 1%三氟乙酸;流速为 1 mL/min。(R)-扁桃酸出峰时间为 21.5 min,(S)-扁桃酸出峰时间为 24.9 min,(R)-邻氯扁桃酸出峰时间为 21.4 min,(S)-邻氯扁桃酸出峰时间为 26.4 min。

1.2.4 扁桃酸消旋酶最适温度及温度稳定性

测定不同温度下该酶的催化效率,反应体系如下(1 mL):2 mmol/L (R)-扁桃酸、3.3 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 和适量纯酶,HEPES 缓冲体系;在 1 000 r/min、不同温度(20、30、40、50、60 $^{\circ}C$)下反应 15 min 后,加硫酸酸化终止反应,等体积乙酸乙酯萃取,离心后吸取上层置于通风厨中挥干,加入异丙醇溶解并干燥处理样品,液相分析反应结果,从而计算不同温度下该酶的催化活力。

将纯酶液用 HEPES 缓冲液稀释成合适的浓度,在 30 $^{\circ}C$ 、40 $^{\circ}C$ 、50 $^{\circ}C$ 下分别保温,不同的时间点取样,按 1.2.3 所述方法进行残余活力的测定。研究其相对活力与时间的进程关系,以未保温前的活力为基准点 100%。对相对活力取对数与时间关系进行拟合,计算不同温度下扁桃酸消旋酶催化活性的半衰期。

1.2.5 扁桃酸消旋酶最适 pH 的研究

配置不同 pH 的缓冲液,包括 pH 4.0–6.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、pH 6.0–7.0 磷酸盐缓冲液、pH 7.5–9.0 Tris-HCl 缓冲液、pH 9.0–11.0 甘氨酸-

氢氧化钠缓冲液等。考察不同 pH 环境中该酶的催化活力,按如下反应体系(1 mL):2 mmol/L (R)-扁桃酸、3.3 mmol/L MgCl₂·6H₂O 和适量纯酶,不同 pH 缓冲液补足至 1 mL,置于 30 °C、1 000 r/min 反应 15 min 后加 2 mol/L 硫酸终止反应,按照 1.2.3 所述方法,分析该酶在不同 pH 缓冲条件下的活力。

1.2.6 添加剂对扁桃酸消旋酶活力的影响

反应体系中加入数种不同的添加剂进行该酶的催化反应,体系内组分如下:2 mmol/L (R)-扁桃酸、适量纯酶,添加剂 1 mmol/L, Tris-HCl 缓冲体系;30 °C 反应 10 min,终止反应,处理和样品;计算不同添加剂环境下的催化活力,考察添加剂对该酶活力的影响。

1.2.7 扁桃酸消旋酶对其他底物的活力

考察该酶对不同底物的活性,反应底物浓度同为 2 mmol/L,测活及分析方法参见 1.2.3。

1.2.8 扁桃酸消旋酶催化动力学研究

对 4 种不同的底物[(R)-扁桃酸、(S)-扁桃酸、(S)-邻氯扁桃酸、(R)-邻氯扁桃酸]进行动力学的研究,按照酶动力学研究标准方法,设定不同的底物浓度值,测定反应速率和时间的关系。采用 Origin 拟合动力学曲线,得到所对应的催化动力学常数,包括表征酶与底物亲和力的米氏常数 K_m 与最大反应速率 V_{max} ,从而计算出酶针对不同分子的催化转换速率常数 k_{cat} 值。

2 结果与分析

2.1 扁桃酸消旋酶的克隆表达与功能筛选

目前唯一报道的扁桃酸消旋酶是来源于恶臭假单胞菌的 *PpMR*,经数十年的研究其分子结构和催化机理已经得到充分的解析^[11-15]。*PpMR* 催化扁桃酸消旋反应的转换频率(k_{cat} 值)约为 500 s⁻¹,其米氏常数(K_m 值)约为 1 mmol/L,是目前研究高 pKa 值羧基羧酸酶促去质子化作用的经典催化剂范本^[16-18]。

通过基因挖掘的手段^[19],成功克隆得到 28 个

目标蛋白(表 1)。SDS-PAGE 分析所表达的蛋白大小都在 40 kDa 左右,与数据库预测的大小一致。对目标蛋白的功能筛选发现其中存在 9 个蛋白(*Bj2*、*Ar*、*Eb2*、*Tf2*、*Ar2*、*Eb1*、*St3*、*Bj7*、*Cl*)可催化扁桃酸的消旋反应,但当以单一构型的邻氯扁桃酸为底物时,只有两个酶蛋白(*Ar*、*Bj2*)可检测到催化活性,但 *Bj2* 只转化很少量的底物,而且表达量低、可溶性很差。与探针 *PpMR* 酶的综合性能相比,来源于 *Agrobacterium radiobacter* 的扁桃酸消旋酶 *ArMR* 具有更好的可溶性表达和催化活力(表 2),因此我们选择 *ArMR* 酶作为进一步研究的对象。其他 8 个扁桃酸消旋酶也增加了该类酶资源的有用文献信息,为今后深入考察此类扁桃酸消旋酶打下了一定基础。

2.2 扁桃酸消旋酶 *ArMR* 的纯化

基于亲和层析的原理,通过 Ni-NTA 对 *ArMR* 进行纯化,获得纯度较高的纯化酶用于该酶的酶学性质表征。如图 1 所示,SDS-PAGE 清楚地展示了该酶的表达与纯化效果,可见大肠杆菌异源表达的 *ArMR* 酶部分可溶(泳道 1、3),但沉淀部分仍有可观量的包涵体蛋白有待进一步复性利用。纯化所得到的酶(泳道 5)条带足够清晰单一,符合酶学特性表征的要求。测定纯酶活力,对 (R)-扁桃酸的比活为 320 U/mg。

2.3 扁桃酸消旋酶 *ArMR* 的表征

2.3.1 *ArMR* 的最适温度及温度稳定性

在本实验中,研究最适温度和温度稳定性所选用的是 pH 7.5 的 HEPES 缓冲液,因为 Tris-HCl 缓冲液的 pH 受温度影响较大。温度对 *ArMR* 酶活力的影响如图 2 所示。随着温度的上升,该酶活力呈现先上升后下降的趋势,最适宜温度是 50 °C。在 30 °C 和 40 °C 时,相对活力约为 50% 和 70%,但当温度降到 20 °C 时只有 20% 左右的相对活力。在高温如 60 °C 情况下,仍然能有 70% 的相对活力。

表 1 扁桃酸消旋酶的基因克隆与表达

Table 1 Cloning and expression of mandelate racemase

Target proteins	Accession No.	Organism	Mass (kDa)	Identity to <i>PpMR</i> (%)
Bj2	A0A038GMM5	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	39.1	57
Ar	B9JQ28	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	38.7	57
Eb2	D8MW22	<i>Erwinia billingiae</i>	48.0	27
Tf2	R9F6C1	<i>Thermobifida fusca</i>	38.7	33
Ar2	B9JAW7	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	40.4	31
Eb1	D8MLK0	<i>Erwinia billingiae</i>	41.3	28
St3	Q96XF6	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	42.2	23
Bj7	A0A038GY43	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	44.3	27
Cl	D8GJQ9	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	46.5	20
At	W8FLW8	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43.5	30
Ph1	G4RFL4	<i>Pelagibacterium halotolerans</i>	41.5	31
Pc	C6DAG0	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	43.8	30
St1	Q972M4	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	42.2	29
Ph2	G4RFN1	<i>Pelagibacterium halotolerans</i>	41.5	30
Pd	F4CW58	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	38.7	43
Tf1	Q47P67	<i>Thermobifida fusca</i>	38.7	32
Lf	C0WZ23	<i>Lactobacillus fermentum</i>	46.0	20
Ev	L0FZ31	<i>Echinicola vietnamensis</i>	50.4	23
St2	Q96XE5	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	44.7	25
St4	Q96Y01	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	39.4	26
Bj1	A0A038GLD1	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	40.3	30
Bj3	A0A038GS62	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	48.2	24
Bj4	A0A038GTM5	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	43.5	30
Bj5	A0A038GUG0	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	40.1	28
Bj6	A0A038GWG4	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	41.7	31
Bj8	A0A038H0N7	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	44.8	25
Bj9	A0A038H5T4	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	47.0	23
Bj10	A0A038H410	<i>Burkholderia jiangsuensis</i>	44.8	32

The Proteins highlighted in bold type have showed the racemic activity.

表 2 *ArMR* 与 *PpMR* 粗酶催化邻氯扁桃酸消旋化的性能比较Table 2 Comparison between *ArMR* and *PpMR* cell-free extracts for racemization of (*S*)-2-chloromandelate

Enzyme ^[a]	Time (h)	Conversion (%)
<i>ArMR</i>	2	1.8
	12	12.5
<i>PpMR</i>	2	< 1 ^[b]
	12	3.3

Reaction mixture (1 mL): CFE 100 μ L, substrate 5 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C, shaken at 1 000 r/min. ^[a] Cell-free extract (CFE) was produced by sonic disruption of cell suspension (50 g/L, wet weight) in Tris-HCl buffer (pH 7.5, 100 mmol/L). ^[b] Undetectable using the assay procedure.

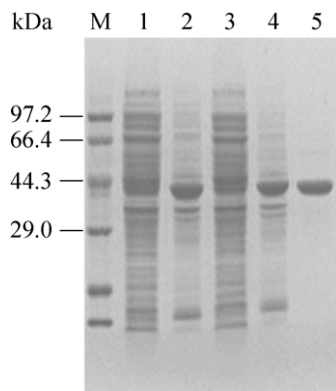


图1 扁桃酸消旋酶 *ArMR* 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified *ArMR*. lane M: low molecular weight protein marker; lanes 1 & 3: cell lysate supernatant of recombinant *ArMR*; lanes 2 & 4: cell lysate precipitate of recombinant *ArMR*; lane 5: the purified *ArMR*.

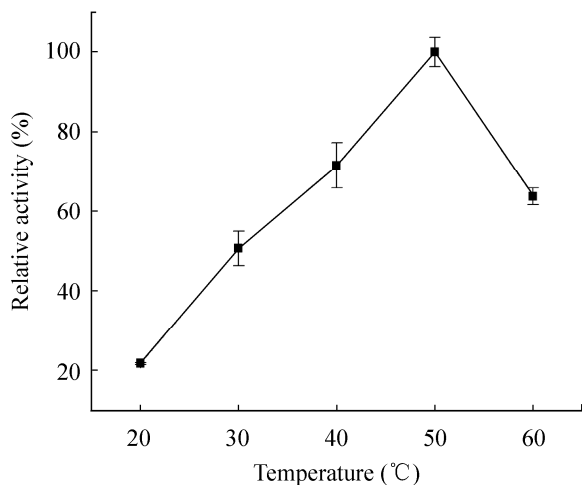


图2 温度对酶 *ArMR* 活性的影响
Fig. 2 Effects of temperature on the activity of purified *ArMR*.

不同温度下热稳定性考察结果表明, *ArMR* 纯酶在 30 °C、40 °C 与 50 °C 下的半衰期分别为 70.7、27.2 和 0.17 h。最适温度研究表明该酶在 50 °C 时催化反应的效果最佳, 可其半衰期仅为 12 min, 可能会限制未来该酶的实际应用, 因此 *ArMR* 的热稳定性还存着较大的提升空间。

2.3.2 *ArMR* 催化消旋化的最适 pH

如图 3 所示, pH 对该酶的活力有明显影响, 整体趋势呈现钟罩状。在 pH 6 以下的酸性环境中基本没有消旋活力, 因为该酶催化机理符合双碱机制, 由典型的两个碱性氨基酸残基催化质子的得失^[14], 推测较酸性的环境不利于质子转移, 明显降低催化活性。在碱性 pH 范围内该酶活力有较好的接纳范围, 甚至在 pH 为 10 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中仍然保留着 10% 以上的相对活力。*ArMR* 在 pH 8 左右的 Tris-HCl 缓冲液中表现出最大的活力。

2.3.3 金属离子及 EDTA 对 *ArMR* 活性的影响

考察了 11 种不同添加剂, 主要是考察二价金属离子对 *ArMR* 催化活力的影响。添加剂浓度设定为 1 mmol/L, 结果如表 3 所示。除了 Zn^{2+} 对该酶有完全的失活作用, 其他添加剂的影响较小。二价镁离子和锰离子对酶有部分的激活作用, 其他金属离子包括二价铁离子、铜离子和钴离子等对酶活基本无影响。在体系中添加 1 mmol/L 的 EDTA 进行保温, 结果发现仍保留 86% 的相对活力。

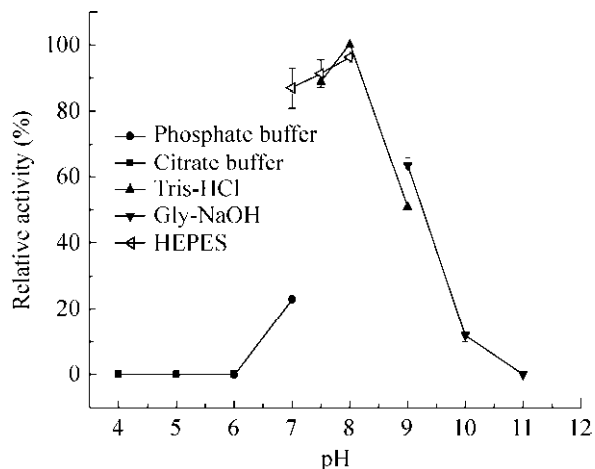


图3 pH 对酶 *ArMR* 活性的影响
Fig. 3 Effects of pH on the activity of purified *ArMR*.

表 3 添加剂对 *ArMR* 活力的影响Table 3 Effects of metal ions and EDTA on *ArMR* activity

Additive (1 mmol/L)	Relative activity (%)
None	100.0
EDTA	86.9±0.2
Na ⁺	96.2±0.1
K ⁺	96.9±0.3
Mg ²⁺	121.3±0.6
Cu ²⁺	91.3±0.1
Ca ²⁺	97.5±0.0
Ba ²⁺	95.6±0.2
Fe ²⁺	83.8±0.3
Co ²⁺	97.5±0.1
Mn ²⁺	114.0±1.0
Zn ²⁺	0.0

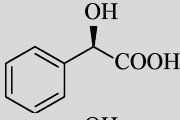
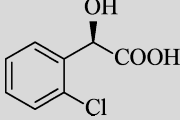
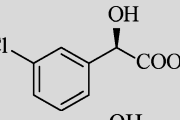
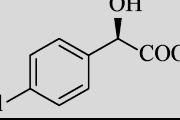
2.3.4 *ArMR* 对其他底物的相对活性

测定 *ArMR* 纯酶对不同底物的相对活力结果, 比较其对不同底物的活力与 *PpMR* 的差异。结果如表 4 所示, 可见这两个扁桃酸消旋酶在底物的偏好性上有明显的差异。*PpMR* 对对氯扁桃酸活力要好于间氯扁桃酸^[20]; 相比于扁桃酸, 该酶对间氯扁桃酸的相对活力有所下降。而 *ArMR* 对间氯和对氯底物的活力都比扁桃酸要好, 同时对间氯底物的活性要高于对氯扁桃酸。两者的共同之处在于它们对邻氯扁桃酸的消旋化活力仍然严重偏低, 不及扁桃酸的千分之一, 未来需要通过定点突变^[21]等技术加以改造。由于这两个酶的蛋白序列一致性只有 57%, 因此在催化的底物专一性上出现一定差异也就不难理解。

2.3.5 *ArMR* 的催化动力学常数

选择 4 种不同的底物进行动力学考察, 即 (*R*)-扁桃酸、(*S*)-扁桃酸、(*R*)-邻氯扁桃酸和 (*S*)-邻氯扁桃酸。反应体系如下: 不同浓度的该底物, 3.3 mmol/L 镁离子, 添加适量的 *ArMR* 纯酶, 缓冲

表 4 *PpMR* 与 *ArMR* 对不同底物的相对活力Table 4 Relative activities of *ArMR* and *PpMR* toward different substrates

Substrates	Relative activity (%)	
	<i>ArMR</i>	<i>PpMR</i>
	100	100
	< 0.1	< 0.1
	287	61
	158	326

液浓度为 Tris-HCl 缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.8), 在 30 °C、1 000 r/min 振荡器上反应若干时间, 测定该酶催化不同浓度底物的反应初速度。利用 Origin 软件对不同底物浓度的反应初速度进行非线性拟合, 求得 K_m 和 V_{max} 值, 根据所添加的纯酶浓度计算酶的转化频率 (k_{cat} 值), 如表 5 所示。

表 5 列出 *ArMR* 催化 4 种不同底物的动力学参数, *ArMR* 对扁桃酸的 K_m 值在 1 mmol/L 左右, 对 *R* 型底物的 k_{cat} 为 410 s^{-1} , 对 *S* 型底物的 k_{cat} 为 218 s^{-1} 。催化 *R/S* 两种不同构型扁桃酸的最大反应速度分别为 582 、 $310 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。同时该酶对邻氯扁桃酸的 K_m 值约为 6 mmol/L, 对 *R* 型邻氯扁桃酸的 k_{cat} 值为 0.22 s^{-1} , 对 *S* 型邻氯扁桃酸的 k_{cat} 为 0.23 s^{-1} 。催化 *R/S* 两种不同构型邻氯扁桃酸的最大反应速度分别为 0.31 、 $0.33 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, k_{cat}/K_m 值分别为 $0.034 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 和 $0.036 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。而 *PpMR* 纯酶催化两种不同构型邻氯扁桃酸的 k_{cat}/K_m 分别为 $0.060 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 和 $0.056 \text{ L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$, *PpMR* 纯酶的催化效率稍稍高于 *ArMR*^[22]。

表 5 *ArMR* 对不同底物的动力学参数测定Table 5 Kinetic constants of *ArMR* towards different substrates

Substrate	Direction	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
MA	R→S	1.44±0.19	582.00±27.00	410.00	285.000
	S→R	0.81±0.07	310.00±8.00	218.00	270.000
2-Cl MA	R→S	6.48±0.88	0.31±0.02	0.22	0.034
	S→R	6.37±0.79	0.33±0.02	0.23	0.036

3 讨论

计算机信息技术的进步使生物科学同样步入了大数据时代,这大大加速了生物信息学的发展,基因和蛋白数据库容量得到飞速提高。如何在浩瀚的生物信息海洋中快速定位获得所需要的信息,是目前生物资源更充分利用所遇到的难题。针对类似问题,新的数据挖掘技术应运而生。基因组挖掘 (Genome mining) 利用已知的探针在基因和蛋白质数据库中进行序列比对和分析,能够快速挖掘到研究所需的目的序列。NCBI 数据库中现已存储数万条完整的微生物基因组序列,其中含有大量未被发现的新酶。在生物信息学工具的辅助下,如多序列比对与同源序列查找等,本研究利用文献报道的来自于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* ATCC 12633 中的扁桃酸消旋酶 *PpMR* 为探针,在数据库中进行目标序列的虚拟筛选,利用分子生物学手段进行异源克隆表达,以目标底物扁桃酸和邻氯扁桃酸进行功能筛选,成功克隆得到 9 个新型的扁桃酸消旋酶,丰富了 α -羟基酸类手性化合物消旋酶的品种数目,为未来深入研究此类手性合成工具酶提供了便利和参考。针对底物扁桃酸和邻氯扁桃酸,对催化性能较好的消旋酶 *ArMR* 进行了表征,并测定了动力学和热力学等理化特征参数。结合新型的酶促外消旋化和传统合成技术的去消旋化过程,可望满足化学工业发展的绿色化需求,而该酶对非天然底物的催化活力,显示其可用于拓展

合成 *L*-苯甘氨酸及其衍生物的酶促级联反应,有望发展成为合成重要非天然氨基酸类化合物的新途径。

REFERENCES

- [1] Rachwalski M, Vermue N, Rutjes FPJT. Recent advances in enzymatic and chemical deracemisation of racemic compounds. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(24): 9268–9282.
- [2] Lin GQ, You QD, Cheng JF. *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*. New York: John Wiley & Sons, 2011: 3–28.
- [3] Turner NJ. Deracemisation methods. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(2): 115–121.
- [4] Caddick S, Jenkins K. Dynamic resolutions in asymmetric synthesis. *Chem Soc Rev*, 1996, 25(6): 447–456.
- [5] Strauss UT, Felfer U, Faber K. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. *Tetrahedron Asymmetry*, 1999, 10(1): 107–117.
- [6] Schnell B, Faber K, Kroutil W. Enzymatic racemisation and its application to synthetic biotransformations. *Adv Synth Catal*, 2003, 345(6/7): 653–666.
- [7] Pàmies O, Bäckvall JE. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(3): 130–135.
- [8] St. Maurice M, Bearne SL. Hydrophobic nature of the active site of mandelate racemase. *Biochemistry*, 2004, 43(9): 2524–2532.
- [9] Siddiqi F, Bourque JR, Jiang HY, et al. Perturbing the hydrophobic pocket of mandelate racemase to probe phenyl motion during catalysis. *Biochemistry*, 2005,

- 44(25): 9013–9021.
- [10] Goriup M, Strauss UT, Felfer U, et al. Substrate spectrum of mandelate racemase: Part 1: variation of the α -hydroxy acid moiety. *J Mol Catal B Enzym*, 2001, 15(4/6): 207–211.
- [11] Narmandakh A, Bearne SL. Purification of recombinant mandelate racemase: improved catalytic activity. *Protein Expr Purif*, 2010, 69(1): 39–46.
- [12] Resch V, Fabian WMF, Kroutil W. Deracemisation of mandelic acid to optically pure non-natural L-phenylglycine *via* a redox-neutral biocatalytic cascade. *Adv Synth Catal*, 2010, 352(6): 993–997.
- [13] Fan CW, Xu GC, Ma BD, et al. A novel D-mandelate dehydrogenase used in three-enzyme cascade reaction for highly efficient synthesis of non-natural chiral amino acids. *J Biotechnol*, 2015, 195: 67–71.
- [14] Nagar M, Bearne SL. An additional role for the brønsted acid–base catalysts of mandelate racemase in transition state stabilization. *Biochemistry*, 2015, 54(44): 6743–6752.
- [15] Lietzan AD, Nagar M, Pellmann EA, et al. Structure of mandelate racemase with bound intermediate analogues benzohydroxamate and cupferron. *Biochemistry*, 2012, 51(6): 1160–1170.
- [16] Burley RKM, Bearne SL. Inhibition of mandelate racemase by the substrate-intermediate-product analogue 1,1-diphenyl-1-hydroxymethylphosphonate. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(19): 4342–4344.
- [17] Bourque JR, Bearne SL. Mutational analysis of the active site flap (20s loop) of mandelate racemase. *Biochemistry*, 2008, 47(2): 566–578.
- [18] Bearne SL, St. Maurice M, Vaughan MD. An assay for mandelate racemase using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1999, 269(2): 332–336.
- [19] Li CX, Jiang XC, Qiu YJ, et al. Identification of a new thermostable and alkali-tolerant α -carbonic anhydrase from *Lactobacillus delbrueckii* as a biocatalyst for CO₂ biomineralization. *Bioresour Bioprocess*, 2015, 2: 44.
- [20] Felfer U, Goriup M, Koegl MF, et al. The substrate spectrum of mandelate racemase: minimum structural requirements for substrates and substrate model. *Adv Synth Catal*, 2005, 347(7/8): 951–961.
- [21] Chen J, Luo XJ, Chen Q, et al. Marked enhancement of *Acinetobacter* sp. organophosphorus hydrolase activity by a single residue substitution Ile211Ala. *Bioresour Bioprocess*, 2015, 2: 39.
- [22] Yang CC, Ye LD, Gu JL, et al. Directed evolution of mandelate racemase by a novel high-throughput screening method. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(3): 1063–1072.

(本文责编 陈宏宇)