

# $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶表达纯化、酶学性质及其催化应用

刘鹏飞, 陆启蒙, 胡雪芹, 侯学文, 张洪斌

合肥工业大学 生物与医学工程学院, 安徽 合肥 230009

刘鹏飞, 陆启蒙, 胡雪芹, 等.  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶表达纯化、酶学性质及其催化应用. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1169–1177.

Liu PF, Lu QM, Hu XQ, et al. Expression, purification, characterization and application of  $\alpha$ -amino acid ester acyltransferase from recombinant *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1169–1177.

**摘要:**  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶 ( $\alpha$ -amino acid ester acyltransferase, AET) 能够催化底物 L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酰胺合成 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺 (L-alanyl-L-glutamine, 丙谷二肽)。利用重组大肠杆菌 saet-QC01 表达  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶, 对其表达条件进行了优化, 通过 Ni-NTA 亲和层析法分离纯化重组蛋白, 并对其酶学性质、催化应用进行了研究。适合酶表达的诱导条件: 温度 20 °C, 诱导阶段 ( $OD_{600}$ =2.0–2.5), IPTG 浓度 0.6 mmol/L, 诱导时间 12 h。 $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的最适反应温度 27 °C, 最适 pH 8.5, 在 pH 7.0–8.0 很稳定, 在酸性条件下相对稳定, 低浓度的  $Co^{2+}$ 、低浓度的 EDTA 对酶活有促进作用。在底物浓度丙氨酸甲酯盐酸盐 600 mmol/L、谷氨酰胺 480 mmol/L, 丙谷二肽的产量达到 78.2 g/L, 生产速率达到 1.955 g/(L·min), 转化率达到 75.0%。 $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶具有良好的酸碱耐受性, 催化效率高的优良特性, 在工业生产中具有较好的应用潜力。

**关键词:**  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶, 丙谷二肽, 表达条件, 酶学性质, 催化条件

## Expression, purification, characterization and application of $\alpha$ -amino acid ester acyltransferase from recombinant *Escherichia coli*

Pengfei Liu, Qimeng Lu, Xueqin Hu, Xuewen Hou, and Hongbin Zhang

School of Biological and Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China

**Abstract:**  $\alpha$ -Amino acid ester acyltransferase (Aet) catalyzes the L-alanyl-L-glutamine forming reaction from L-alanine methylester hydrochloride and L-glutamine. In this study, the recombinant *Escherichia coli* saet-QC01 was used to express the

**Received:** January 9, 2018; **Accepted:** April 23, 2018

**Supported by:** College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program of Hefei University of Technology (No. 2017CXC478), Special Fund for Independent Innovation Program of Anhui Province, China (Qishi Program of Hefei University of Technology, No. 2013AKKG0391).

**Corresponding author:** Hongbin Zhang. Tel: +86-551-62901968; E-mail: zhb5678@163.com

合肥工业大学大学生创新创业训练计划项目 (No. 2017CXC478), 安徽省自主创新专项“秋实计划” (No. 2013AKKG0391) 资助。

$\alpha$ -amino acid acyltransferase, and its expression conditions were optimized. The recombinant protein was separated and purified by Ni-NTA affinity chromatography, and its enzymatic properties and catalytic applications were studied. The induction conditions suitable for enzyme production optimized were as follows: The temperature was 20 °C, the induction stage ( $OD_{600}=2.0-2.5$ ), IPTG concentration was 0.6 mmol/L, induction time was 12 h. The optimal reaction conditions of  $\alpha$ -amino acid acyltransferase were 27 °C, pH 8.5, it was most stable between pH 7.0 and 8.0 and relatively stable in an acidic environment, and low concentration of  $Co^{2+}$  or EDTA could promote the enzyme activity. Under optimal reaction conditions, 600 mmol/L of L-alanine methylester hydrochloride and 480 mmol/L of L-glutamine, the yield of L-alanyl-L-glutamine reached 78.2 g/L and productivity of 1.955 g/L/min, the conversion rate reached 75.0%.  $\alpha$ -Amino acid ester acyltransferase has excellent acid-base resistance, high catalytic efficiency. These characteristics suggest its application prospects in the industrial production.

**Keywords:**  $\alpha$ -amino acid ester acyltransferase, L-alanyl-L-glutamine, expression conditions, characterization, catalysis conditions

谷氨酰胺 (Gln) 因为在机体的新陈代谢方面扮演着重要角色, 近年来在预防和治疗某些疾病方面受到重要关注。谷氨酰胺虽然是非必需氨基酸, 但在机体处于应激状态时, 对维护肠道结构和免疫功能的完整性具有不可替代的作用; 在机体受创、患败血症、化疗放疗中, 自身合成的谷氨酰胺不能满足需求, 使其成为一种条件必需氨基酸<sup>[1-2]</sup>。但谷氨酰胺水溶性差, 单体在酸性条件下不稳定, 在加热条件下易生成有毒的焦谷氨酸<sup>[3-4]</sup>, 限制了其在临床上的应用。而研究发现肽中谷氨酰胺的酰胺基比游离谷氨酰胺中的酰胺基要稳定<sup>[5]</sup>, 而且谷氨酰胺寡肽作为谷氨酰胺代用品具有突出的功效性和安全性。L-丙氨酸-L-谷氨酰胺 (L-alanyl-L-glutamine, 丙谷二肽) 性质稳定、溶解度高<sup>[6-7]</sup>, 在体内数分钟即分解出谷氨酰胺, 因其安全性和有效性<sup>[8]</sup>常作为注射液的主要营养组成成分用于术后患者的康复<sup>[9]</sup>。近年来, 该肽受到国内外的密切关注。

目前, 工业生产丙谷二肽的方法主要为化学法, 但化学法反应步骤繁琐, 路线较长, 中间环节多, 需要使用有毒的化学试剂, 易生成副产物, 后期分离纯化困难, 合成条件苛刻, 成本高昂<sup>[10-11]</sup>, 给工业生产带来诸多困难。

随着微生物技术在工业上的不断发展, 利用微生物酶法合成丙谷二肽也成为研究热点。

Tabata 等<sup>[12-16]</sup>发现在 *Bacillus subtilis* 168 中 ywfe 基因编码一种 L-氨基酸连接酶, 该酶以游离氨基酸为底物合成二肽, 可催化 L-丙氨酸和 L-谷氨酰胺合成丙谷二肽, 副产物较少, 但需要额外添加 ATP, 丙谷二肽的产率低且积累率低, 而且 L-氨基酸连接酶过表达对细菌生长带来负面影响。Yokozeki 等<sup>[17]</sup>筛选到一株能合成  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶 (EAET) 的短稳杆菌, 该酶能以 L-丙氨酸甲酯盐酸盐 (L-Ala-OMe·HCl) 和 L-谷氨酰胺为底物高效合成丙谷二肽。Hirao 等<sup>[18]</sup>从鞘氨醇杆菌里得到了活性更高的  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶 (SAET), 具有更高的合成丙谷二肽的能力。因此, 文中利用重组大肠杆菌表达  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶, 并对其表达条件进行优化, 通过 Ni-NTA 亲和层析法对粗酶液进行分离纯化, 以 L-丙氨酸甲酯盐酸盐和 L-谷氨酰胺为底物在重组酶的作用下合成丙谷二肽, 对其酶学性质进行研究并对催化条件进行系统优化, 为工业生产丙谷二肽提供了理论基础, 也为其他生产丙谷二肽的技术改进提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

丙谷二肽 (纯度>99%)、L-谷氨酰胺 (纯度>99%)、L-丙氨酸甲酯盐酸盐 (纯度>99%) 均

由合肥川迪医药技术有限公司提供；其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 菌株

重组  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶大肠杆菌 saet-QC01 为本实验室构建并保藏；本实验室将 pET28a 质粒与  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶基因构建重组质粒 pET28a-SAET，然后转化至 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中，成功筛选出构建成功的菌株，并将菌株命名为 saet-QC01。

## 1.3 培养基

LB 培养基：胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，NaCl 10 g/L，pH 7.0，(固体添加 1.5% 的琼脂粉)。

S 培养基：甘油 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 10 g/L，无水  $MgSO_4$  1 g/L，pH 6.3。

## 1.4 saet-QC01 的初始培养条件

将重组  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶大肠杆菌 saet-QC01 以 1% (体积分数) 的接种量接种至 20 mL 含卡那霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 液体培养基中，37  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 12 h，再按 1% (体积分数) 接种量转接至 50 mL 含卡那霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 S 液体培养基中，37  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养至  $OD_{600}=2.0$  时添加异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.6 mmol/L，25  $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导培养 6 h，并在此基础上进行后续的表达条件优化。诱导结束后发酵液以 8 000 $\times$ g 离心 15 min 后去上清，保留菌体。

## 1.5 酶液制备与纯化

50 mL 发酵液的离心后的菌体用 10 mL 的硼酸缓冲液 (pH 8.5) 重悬，超声破碎 (参数为破碎 2 s，间隔 3 s，破碎时间 15 min，破碎功率 15 W)，破碎结束后 8 000 $\times$ g 离心 15 min，取上清液即为粗酶液。将粗酶液经镍柱纯化，纯化步骤经过装柱、平衡、上样、洗涤、洗脱，收集洗脱液。

## 1.6 酶活测定

取 0.1 mL 酶液，加入 1 mL 含 200 mmol/L 谷氨酰胺、200 mmol/L 丙氨酸甲酯盐酸盐的底物溶液 (pH 8.5)，混匀后在 25  $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中反应 1 h，加入等体积 1.7% (V/V)  $H_3PO_4$  溶液终止反应，经 0.22  $\mu$ m 的滤头过滤后，按 1.7 所述测定丙谷二肽的浓度，一个酶活单位定义为 1 mL 底物在 1 h 内生成 0.1 mg 产物所需的酶量。

## 1.7 丙谷二肽检测

HPLC 检测：采用高效液相色谱法检测丙谷二肽的浓度，色谱条件：色谱柱为 TSKgel Amide-80 HR (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m)；流动相为：0.05 mol/L  $KH_2PO_4$  (pH 4.0)：乙腈=35：65；流速为 1 mL/min，检测波长 214 nm。

## 1.8 表达条件优化

对不同的诱导条件进行优化，包括诱导温度 (15、20、25、30、35  $^{\circ}$ C)，诱导剂 IPTG 浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)，诱导时间 (6、12、18、24、30 h) 和加入 TPTG 时的初始菌体浓度  $OD_{600}$  (1.0、1.5、2.0、2.5、3.0)。

## 1.9 酶学性质

最适反应温度及热稳定性：在 pH 8.5 的硼酸缓冲液中，将酶液置于不同温度下 (23、25、27、29、31  $^{\circ}$ C) 测定酶活，最高以 100% 计，计算相对活力。将酶液置于不同温度 (25、30、35、40、45、50  $^{\circ}$ C) 下处理 30 min，在最适温度下测定相应的酶活，最高以 100% 计，计算相对活力，考察热稳定性。

最适反应 pH 及 pH 稳定性：将酶液置于不同 pH 缓冲液中于 25  $^{\circ}$ C 测定酶活力，酶活最高以 100% 计，计算相对活力。将酶液置于各 pH 下，4  $^{\circ}$ C 孵育 12 h，在 25  $^{\circ}$ C 下测定相应的酶活，最高以 100% 计，计算相对活力，考察 pH 稳定性。

金属离子及化合物对酶活力的影响：用硼酸缓冲液 (pH 8.5) 配制 100 mmol/L 的  $MgCl_2$ 、

CaCl<sub>2</sub>、MnSO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、SDS、EDTA 溶液，稀释，使其在酶促反应中终浓度分别为 1、5、10 mmol/L，测定酶活力，以未加入上述试剂的酶液为对照 100%，计算相对酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的表达条件优化

saet-QC01 作为  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的合成菌株，但其表达条件需要优化。首先，在 15–35 °C 的温度范围内进行 saet-QC01 中蛋白的诱导，结果如图 1 所示，20 °C 诱导表达的酶活最高，20 °C 是最适合 saet-QC01 诱导的温度。诱导剂 IPTG 的浓度对酶的表达也产生影响，结果如图 2 所示，IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L 时，诱导表达的酶活最高。研究 saet-QC01 生长期对酶表达的影响，结果如图 3 所示，当初始菌体浓度  $OD_{600}$  为 2.0–2.5 时酶活最高，结合 saet-QC01 生长曲线，此时在大肠杆菌的生长对数期的中期，表明当在大肠杆菌生长曲线的中期对数期时最适宜加 IPTG 诱导。诱导时间对酶活的影响不显著，如图 4 所示，但在诱导 12 h 时，酶活最高，随时间的延长，酶活有所降低，诱导时间 12 h 为宜。

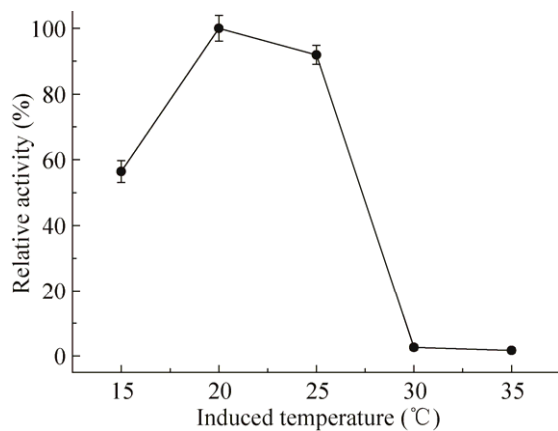


图 1 诱导温度对 SAET 表达的影响

Fig. 1 Effect of induced temperature on SAET expression.

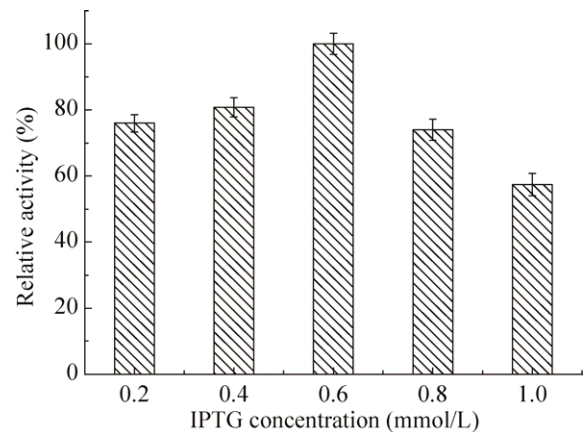


图 2 IPTG 浓度对 SAET 表达的影响

Fig. 2 Effect of IPTG concentration on SAET expression.

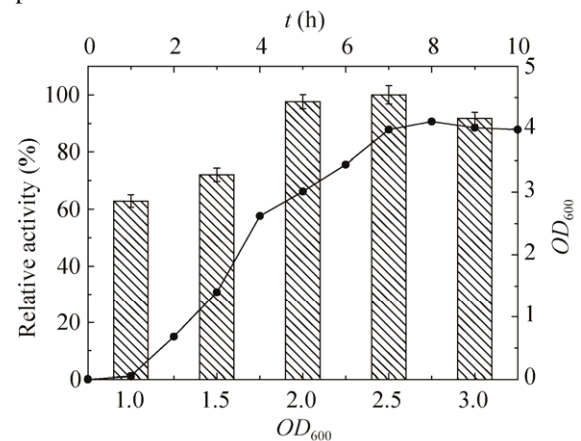


图 3  $OD_{600}$  对 SAET 表达的影响

Fig. 3 Effect of  $OD_{600}$  on SAET expression. bar graph: relative enzyme activity when induced at different  $OD_{600}$ ; line graph: growth curve of the saet-QC01.

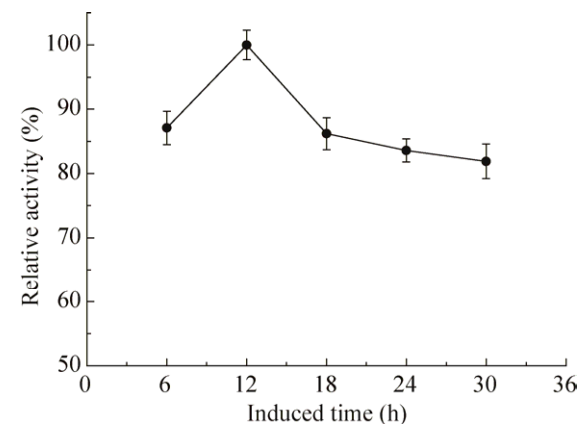


图 4 诱导时间对 SAET 表达的影响

Fig. 4 Effect of induced time on SAET expression.

## 2.2 $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的酶学性质

将发酵后的菌体破碎后收集上清并进行 SDS-PAGE, 再经考马斯亮蓝染色, 结果如图 5 所示, saet-QC01 菌体破碎上清液中出现约 68 kDa 的条带, 与文献报道  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶经 SDS-PAGE 的分子量 68 kDa 一致<sup>[19]</sup>, 但阴性对照的 pET28a 空载的破碎上清液也出现 68 kDa 的条带, 则不能证明该条带蛋白是由目的基因表达而来, 所以将 saet-QC01 菌体破碎上清液采用 Ni-NTA 亲和层析方法分离纯化, 经不同浓度的咪唑洗脱, 收集洗脱液, 经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色, 如图 6 所示, 在经 80 mmol/L 咪唑洗

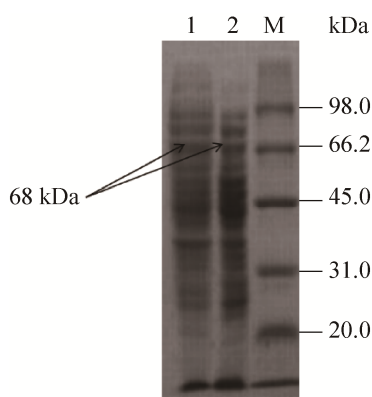


图 5 重组  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶 SDS-PAGE 分析  
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of  $\alpha$ -amino acid acyl transferase. M: marker; 1: cell disruption supernatant of saet-QC01; 2: negative control.

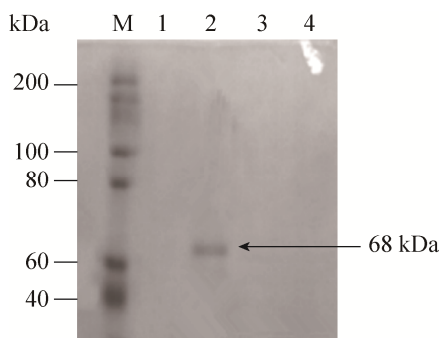


图 6 纯化  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶 SDS-PAGE  
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the purified enzyme. M: marker; 1: 40 mmol/L imidazole elution; 2: 80 mmol/L imidazole elution; 3: 120 mmol/L imidazole elution; 4: 160 mmol/L imidazole elution.

脱的洗脱液中出现分子量约为 68 kDa 的单一一条带, 说明该蛋白是由目的基因表达而来, 与文献报道  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶经 SDS-PAGE 的分子量 68 kDa 一致<sup>[19]</sup>。

考察最适反应温度对催化反应极为重要, 由图 7 所示,  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的最佳催化温度为 27 °C。由图 8 所示, 35 °C 处理 30 min, 酶活力保持在 25 °C 时酶活的 80% 以上, 45 °C 处理 30 min 后酶基本已经失活。上述结果表明, 该酶的作用温度范围不是很广泛, 对热也较为敏感, 无法长时间放置在高温的过程中。

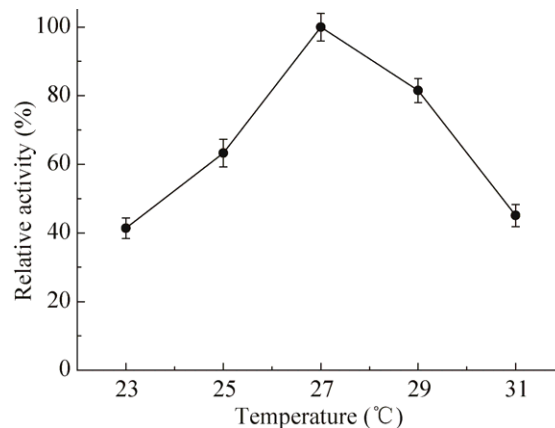


图 7 温度对 SAET 活力的影响  
Fig. 7 Effect of temperature on SAET activity.

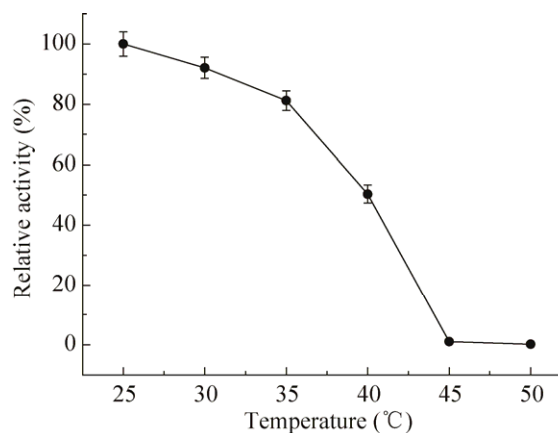


图 8 温度对 SAET 稳定性的影响  
Fig. 8 Effect of temperature on SAET stability.

反应的 pH 值对酶的稳定性有重要影响, 但酶的最适稳定 pH 不一定是最佳反应 pH, 考察最佳反应 pH 值也很重要。由图 9 所示, 在碱性范围内,  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的活性先随 pH 值的升高而升高, 在 pH 8.5 时其活性最高, pH 8.5 是  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的最佳催化 pH 值。由图 10 所示,  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶在 pH 7.0–8.0 范围内稳定性很好, 孵育 12 h, 酶活力仍能保留原来的 90% 以上。

金属离子及化合物对  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶活力的影响如表 1 所示。低浓度的  $\text{Co}^{2+}$  和低浓度的 EDTA 对该酶有轻微的促进作用, 低浓度的

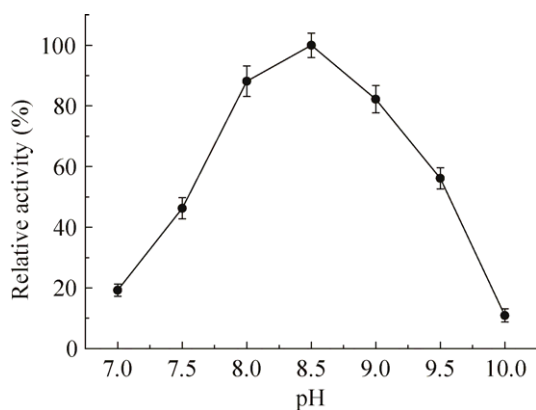


图 9 pH 对 SAET 活力的影响  
Fig. 9 Effect of pH on SAET activity.

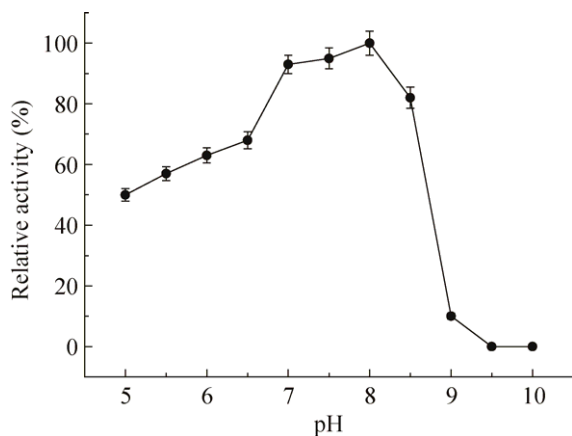


图 10 pH 对 SAET 稳定性的影响  
Fig. 10 Effect of pH on SAET stability.

表 1 金属离子及化合物对 SAET 活力的影响

Table 1 Effect of pH on SAET activity

Compound	Relative activity (%) (10 mmol/L)	Relative activity (%) (5 mmol/L)	Relative activity (%) (1 mmol/L)
Control	100	100	100
$\text{Ca}^{2+}$	88.56±0.08	92.76±0.15	96.13±0.14
$\text{Fe}^{3+}$	36.50±0.16	62.88±0.24	88.32±0.22
$\text{Mg}^{2+}$	83.35±0.19	89.54±0.16	93.31±0.17
$\text{Ni}^{2+}$	54.82±0.15	75.48±0.08	90.51±0.23
$\text{Co}^{2+}$	79.73±0.19	88.73±0.11	105.35±0.17
$\text{Mn}^{2+}$	75.43±0.09	77.62±0.19	97.69±0.26
SDS	1.20±0.08	2.50±0.13	89.85±0.21
EDTA	97.54±0.14	98.78±0.17	103.33±0.31

$\text{Co}^{2+}$  将酶活力提高 5.35%, 低浓度的 EDTA 将酶活力提高 3.33%; 高浓度的  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、SDS 对该酶有明显的抑制作用, 高浓度的 SDS 使该酶丧失酶活性; 高浓度  $\text{Mn}^{2+}$  对该酶有轻微的抑制作用;  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对该酶无明显影响。

### 2.3 $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶催化条件优化

反应底物的配比对产物的生成有重要影响, 固定丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度为 250 mmol/L, 谷氨酰胺与其的比例为 A: 0.6、B: 0.8、C: 1.0、D: 1.2, 在 27 °C、pH 8.5 下反应 1 h, 结果如图 11 所示, 丙谷二肽的产量随着底物谷氨酰胺的浓度的增加而增大, 且相对于底物谷氨酰胺的转化率依次为 19.5%、19%、15.7% 和 13.2%, 转化率是降低的, 但当比例达到 0.8 后, 产物的产量增加有限, 但转化率却降低明显, 所以当丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度为 250 mmol/L, 谷氨酰胺浓度为 200 mmol/L, 即比例为 0.8 时应为底物的最佳浓度比。

丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度为 100、200、300、400、500、600 mmol/L, 谷氨酰胺和丙氨酸甲酯盐酸盐的添加比例为 0.8, 在优化后的最佳条件下反应, 丙谷二肽的产量如图 12 所示。当反应 40 min 时, 丙谷二肽的产量趋于平衡。随着丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度从 100 mmol/L 增加到 600 mmol/L, 丙谷二肽的量分别为 15.1、29.2、42.3、56.2、69.5、

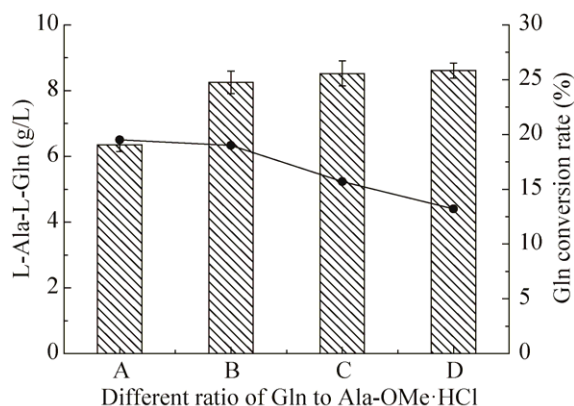


图 11 底物的比对催化反应的影响

Fig. 11 Effect of the ratio of Gln to Ala-OMe·HCl on enzymatic reaction. Bar graph: L-Ala-L-Gln yield at different substrate concentrations; Line graph: Gln conversion rate at different substrate concentration ratios. A: Gln/Ala-OMe·HCl=0.6; B: Gln/Ala-OMe·HCl=0.8; C: Gln/Ala-OMe·HCl=1.0; D: Gln/Ala-OMe·HCl=1.2.

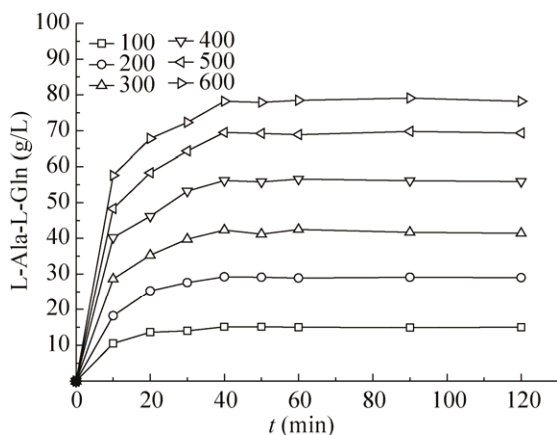


图 12 底物浓度对催化反应的影响

Fig. 12 Effect of substrates concentration on enzymatic reaction.

78.2 g/L, 相对于谷氨酰胺的转化率为 86.7%、84.0%、81.1%、80.9%、80.0% 和 75.0%。

### 3 讨论

丙谷二肽作为谷氨酰胺的替代物, 应用前景广泛, 但目前在丙谷二肽的生产方式上存在短板, 生产过程复杂, 成本高昂,  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移

酶的出现为丙谷二肽的合成带来了新的曙光。文中首先对重组大肠杆菌 saet-QC01 的表达条件进行了优化, 诱导温度在 20 °C 和 25 °C 时, 表达的酶活差别不大, 但诱导温度过高会导致蛋白质合成速度过快, 多肽链不能正确折叠, 使得疏水基因暴露在外容易形成包涵体, 因此当酶活相似时, 选取最后的诱导温度为 20 °C<sup>[20-21]</sup>; IPTG 浓度太低时蛋白的表达量低, 酶活较小, 而 IPTG 浓度过高反而会抑制蛋白的表达, 而且 IPTG 有细胞毒性, 不利于菌体生长<sup>[22-23]</sup>, 选取 IPTG 最佳诱导浓度为 0.6 mmol/L; 加入 IPTG 时,  $OD_{600}$  在 2.0–2.5 时, 酶活的大小相差不大, 结合该重组大肠杆菌的生长曲线, 当  $OD_{600}$  达到 2.0–2.5 时, 此时为该重组菌的对数生长期的中期阶段, 在此时, 菌体活力强, 生长能力旺盛, 酶的表达能力强, 所以诱导的初始菌浓度  $OD_{600}$  为 2.0–2.5 时最佳; 一般诱导时间越长, 目的蛋白的表达量越高, 但诱导时间过长, 诱导产生的氨基酸反而会抑制目的蛋白的合成<sup>[24]</sup>, 当诱导时间在 12 h 时酶活力最高; 所以最终的优化结果为: 最佳的诱导温度 20 °C, 加入 IPTG 时初始菌浓度  $OD_{600}$  为 2.0–2.5, IPTG 浓度 0.6 mmol/L, 诱导时间 12 h; 然后对  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的酶学性质进行了研究, 该酶的最佳反应温度为 27 °C, 反应 pH 8.5, 在 pH 7.0–8.0 很稳定, 在酸性条件下相对稳定, 低浓度的  $Co^{2+}$ 、低浓度的 EDTA 对酶活有促进作用; 最后对该酶催化合成丙谷二肽的催化条件进行了研究, 在最优的反应条件下实现丙谷二肽的高效合成, 即温度为 27 °C, pH 8.5, 谷氨酰胺和丙氨酸甲酯盐酸盐的添加比例为 0.8, 当丙氨酸甲酯盐酸盐的浓度为 600 mmol/L、谷氨酰胺的浓度为 480 mmol/L 时, 反应 40 min 时丙谷二肽的量为 78.2 g/L, 丙谷二肽的生产速率达到 1.955 g/(L·min), 相对于谷氨酰胺的转化率为 75.0%, 达到国际的最佳水平<sup>[25]</sup>。

在提高丙谷二肽的转化率和积累量上, 可以对反应体系中底物采取流加的方式进行研究, 可以改变流加浓度、流加速度、流加量来实现丙谷二肽的优化生产。另外还可以对  $\alpha$ -氨基酸酯酰基转移酶的结构进行模拟, 对其基因序列实行定点突变的方式, 筛选有效的突变体, 增加酶的稳定性和催化效率, 向提高丙谷二肽合成效率的方向推进。

## REFERENCES

- [1] Tapiero H, Mathé G, Couvreur P, et al. II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*, 2002, 56(9): 446–457.
- [2] Wernerman J. Suggestion for present and future use of parenteral glutamine. *Clin Nut Suppl*, 2004, 1(1): 37–42.
- [3] Fürst P. New developments in glutamine delivery. *J Nut*, 2001, 131(9): 2562S–2568S.
- [4] Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid. *Nut Rev*, 1990, 48(8): 297–309.
- [5] Abumrad NN, Morse EL, Lochs A, et al. Possible sources of Gln for Parenteral nutrition. *Am J Physiol*, 1989, 257(2 Pt 1): E228–E234.
- [6] Tritsch GL, Moore GE. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Exp Cell Res*, 1962, 28(2): 360–364.
- [7] Yagasaki M, Hashimoto SI. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(1): 13–22.
- [8] Fürst P, Pogan K, Stehle P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. *Nutrition*, 1997, 13(7/8): 731–737.
- [9] Fürst P, Stehle P. Glutamine supplemented nutrition in clinical practice--use of glutamine-containing dipeptides. *Infusionstherapie Und Transfusionsmedizin*, 1995, 22(5): 317–324.
- [10] Liu SX, Yang YH, Liu XW, et al. Direct amidation of amino acid derivatives catalyzed by arylboronic acids: applications in dipeptide synthesis. *Eur J Org Chem*, 2013, 2013(25): 5692–5700.
- [11] Nilsson BL, Soellner MB, Raines RT. Chemical Synthesis of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2005, 34(19): 91–118.
- [12] Steinborn G, Hajirezaei MJ, Hofemeister J. *bac* genes for recombinant bacilysin and anticapsin production in *Bacillus* host strains. *Arch Microbiol*, 2005, 183(2): 71–79.
- [13] Tabata K, Ikeda H, Hashimoto S. *ywfE* in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase. *J Bacteriol*, 2005, 187(15): 5195–5202.
- [14] Tabata K, Hashimoto SI. Fermentative production of L-alanyl-L-glutamine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain expressing L-amino acid alpha-ligase. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(20): 6378–6385.
- [15] Kino K, Nakazawa Y, Yagasaki M. Dipeptide synthesis by L-amino acid ligase from *Ralstonia solanacearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(3): 536–540.
- [16] Hashimoto SI, Tabata K. Microorganisms producing dipeptides and process for producing dipeptide using the microorganisms: US, US20100120126. 2010-05-13.
- [17] Yokozeki K, Hara S. A novel and efficient enzymatic method for the production of peptides from unprotected starting materials. *J Biotechnol*, 2005, 115(2): 211–220.
- [18] Hirao Y, Mihara Y, Kira I, et al. Enzymatic production of L-alanyl-L-glutamine by recombinant *E. coli* expressing  $\alpha$ -amino acid ester acyltransferase from *Sphingobacterium siyangensis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(3): 618–623.
- [19] Abe I, Hara S, Yokozeki K. Gene cloning and characterization of  $\alpha$ -amino acid ester acyl transferase in *Empedobacter brevis* ATCC14234 and *Sphingobacterium siyangensis* AJ2458. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(11): 2087–2092.
- [20] Liu M, Sun Y, Yang YK, et al. Construction of chimeric single-chain antibody efficient soluble expression in *Escherichia coli* and optimization of



- fermentation conditions. *J Biol*, 2016, 33(6): 1–6 (in Chinese).
- 刘萌, 孙杨, 杨艳坤, 等. 人-鼠嵌合单链抗体的构建及其在大肠杆菌中的高效可溶性表达和发酵条件优化. *生物学杂志*, 2016, 33(6): 1–6.
- [21] Corrales-Garcia L, Ortiz E, Castañeda-Delgado J, et al. Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human  $\beta$ -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Prot Express Purific*, 2013, 89(1): 33–43
- [22] Lange C, Rudolph R. Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Curr Pharmaceut Biotechnol*, 2009, 10(4): 408–414.
- [23] De Araujo ED, Geletu M, Gunning PT. Strategies for over-expression and purification of recombinant full length STAT5B in *Escherichia coli*. *Prot Express Purificat*, 2017, 129: 1–8.
- [24] San-Miguel T, Pérez-Bermúdez P, Gavidia I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *Springerplus*, 2013, 2: 89.
- [25] Li YM, Yuan WJ, Gao JQ, et al. Production of L-alanyl- L-glutamine by recycling *E. coli* expressing  $\alpha$ -amino acid ester acyltransferase. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1603–1609.

(本文责编 陈宏宇)