



# 不对称水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯新菌种的分离鉴定及酯酶基因的克隆、表达

卢亚南, 张朝晖\*, 张利坤, 陆跃乐

浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310014

**摘要:** 【目的】筛选鉴定1株可以选择性水解农药甲霜灵的中间体(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)的菌株, 并克隆、表达该菌株中的酯酶基因。【方法】以MAP为唯一碳源, 对活性污泥样品中的微生物进行富集培养, 采用罗丹明B平板显色法进行初筛, 通过摇瓶复筛得到了1株对MAP具有最高对映体选择性和水解活力的新菌株, 根据其形态、生理生化特征及16S rRNA序列分析, 确立该菌株的系统发育学地位。构建该菌株的基因文库, 筛选获得含目的基因的克隆子, 通过序列分析和引物扩增得到酯酶基因, 将基因与表达载体pET28a (+)连接后, 转化大肠杆菌BL21Gold (DE3) plysS, 构建重组菌。【结果】该菌属于革兰氏阴性菌, 结合16S rRNA基因、形态特征和生理生化实验结果, 鉴定该菌为反硝化无色杆菌。通过基因文库法, 找到了该菌中的酯酶基因EHest, 并成功构建了重组大肠杆菌EHest-pET28a (+)-BL21Gold (DE3) plysS, 表达了来自*Achromobacter denitrificans* 1104且具有不对称水解MAP活性的酯酶EHesterase, 大小约27 kDa, 表达酶活是原始菌株的27.1倍。用EHesterase催化MAP水解, 底物浓度50 g/L, 反应1 h, 底物转化率为29.5%, 产物(酸)的 $ee_p$ 为85.1%, 对映体选择性为R型。该酶的最适反应pH和温度分别为pH 9.0和50 °C。它水解MAP的活性分别是水解橄榄油和乙酸乙酯活性的333倍和667倍。【结论】筛选到1株具有不对称水解MAP能力的新菌株*Achromobacter denitrificans* 1104。

**关键词:** 反硝化无色杆菌, (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯, 对映体选择性水解, 酯酶基因, 克隆表达, 甲霜灵

手性产品在医药、农药、化学品等领域正受到越来越多的关注。与化学法相比, 利用生物催化剂生产手性物质具有条件温和、选择性高、污染少的优点。由于脂肪酶/酯酶具有商业上易得、

无需辅因子、高稳定性和在有机介质中有活性等优点, 使用它们催化酯水解或羧酸酯化是目前最常用的制备手性醇、酸和酯的方法, 其中用脂肪酶催化的生物拆分法已发展为生产手性化学品的

基金项目: 国家自然科学基金(21447005)

\*通信作者。Tel: +86-576-88320571; E-mail: zzh@zjut.edu.cn

收稿日期: 2015-11-16; 修回日期: 2016-01-11; 网络出版日期: 2016-02-02

重要方法之一<sup>[1]</sup>。

(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)(图1)是甲霜灵、氯霜灵、呋霜灵、异霜灵和苯霜灵等杀菌剂的中间体。目前甲霜灵是市场上最受欢迎的植物真菌杀菌剂之一,它是典型的旋光活性农药<sup>[2]</sup>,在体内,R-(-)-对映体的活性比S-(+)-对映体高3-10倍<sup>[3]</sup>。在市场上,甲霜灵的手性产品称为精甲霜灵(R体大约占97%),它由化学法生产,且产量较低。光学纯产品替代外消旋产品,不仅能提高单位药效而且还减少了释放到环境中的农药总量,减少非活性异构体在生物圈内的扩展,从而减小对非靶标生物潜在副作用。此外,光学纯产品的使用量只有外消旋产品的一半,有利于运输和储存。

在生产甲霜灵的手性产品时,一条有效途径是对其中间体(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)进行生物拆分,如图1。目前国内外报道的可选择性拆分MAP的酶类催化剂主要有:脂肪酶,如Lipase PS(来自*Burkholderia cepacia*, Amano公司)、Lipase OF(*Candida rugosa*)、Lipase QLM(*Alcaligenes sp.*)<sup>[4]</sup>、Lipase CRL(*Candida rugosa*)<sup>[5-6]</sup>、PSL(假单胞菌)<sup>[7-8]</sup>、CAL-B(南极假丝酵母)<sup>[8]</sup>;碱性蛋白酶Alcalase(*Bacillus licheniformis*)以及酰基转移酶Acylase Amano(*Aspergillus melleus*)<sup>[4]</sup>。微生物催化剂有*Burkholderia sp.* MC16-3和99-2-1<sup>[9]</sup>。这些催化剂对底物的立体选择性有R型的(如Lipase PS),也有S型(如PSL)。上述酶中,对Lipase PS的研究比较

透彻<sup>[4]</sup>。Park等<sup>[10]</sup>还专门研究了用Lipase PS小试规模拆分MAP生产R-甲霜灵的完整工艺。要想使此类工艺具有产业化价值,需要寻找性能更好的新生物催化剂。

本文将利用(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)为唯一碳源的培养基,从污泥样品中筛选能水解MAP的菌种,然后通过形态、生理生化特征及16S rRNA序列分析对筛选到的菌种进行鉴定。在此基础上,用基因文库法寻找菌种中的目标酯酶基因。然后,将找到的基因在大肠杆菌中进行克隆和表达,最后研究重组酯酶的酶学性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:** 活性污泥样品来源于某厂废水池。

**1.1.2 试剂:** (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯由某厂赠送,其他化学试剂均为国药分析纯。限制性内切酶*Sau3A I*、*EcoR I*、*Hind III*、Antarctic Phosphatase购于NEB公司;Ligation high Ver.2, KOD FX购于Toboyo公司;DNA Marker DL2000、DNA Marker DL10000购于TaKaRa公司;基因组抽提试剂盒,DNA凝胶回收试剂盒、PCR清洗试剂盒、质粒DNA小量提取试剂购于AxyPrep公司。

**1.1.3 培养基:** 富集培养基(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 0.2, NaCl 1.0, (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯 10,

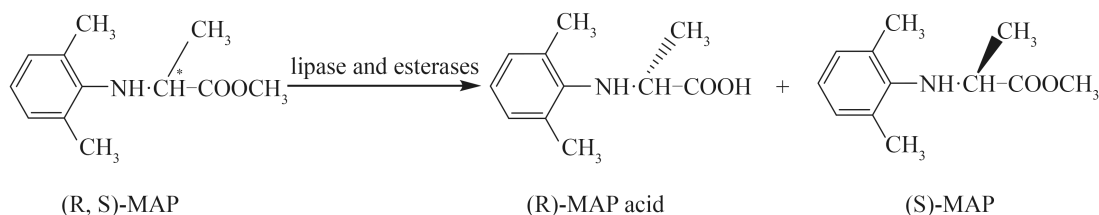


图1. 生物催化剂水解拆分(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)

Figure 1. Enantioselective hydrolysis of methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate (MAP) catalyzed by biocatalysts.

自来水定容至1000 mL, 用NaOH调pH为7.0。初筛固体培养基(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4$  0.2, NaCl 1.0, 琼脂 15–20, (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯30, 自来水定容至1000 mL, 用NaOH调pH为7.0, 121 °C灭菌20 min, 加入过滤除菌的罗丹明B至10 mg/L作为指示剂。复筛液体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉 2.5, 葡萄糖 1.0, (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯 10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  0.2, 自来水定容至1000 mL, 用NaOH调节pH值为7.0, 115 °C灭菌20 min。发酵培养基(g/L): 蛋白胨5.0, 酵母粉 2.5, 葡萄糖1.0, 橄榄油 10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  0.2, 自来水定容至1000 mL, 用NaOH调节pH值为7.0, 115 °C灭菌20 min。

### 1.2 (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯及其产物(酸)的分析检测

正相HPLC用于检测R型和S型底物和产物(酸)。流动相为正己烷:异丙醇=98:2 (加入0.1%的三氟乙酸), 流速0.5 mL/min, 检测紫外波长220 nm, 柱温30 °C, 进样量10  $\mu\text{L}$ , 大赛璐手性OD柱250 mm $\times$ 4 mm。色谱仪Waters。反相HPLC用于检测总底物和总产物(酸)。流动相是乙腈:水=60:40 (加入0.1%三氟乙酸), 流速1 mL/min, 检测紫外波长220 nm, 柱温25 °C, 进样量10  $\mu\text{L}$ ,  $\text{C}_{18}$ 柱250 mm $\times$ 4 mm。对映体过量值( $ee$ )和底物总转化率( $C$ )按以下计算:

$$\text{底物 } ee_s(\%) = \left| \frac{[S]_S - [S]_R}{[S]_S + [S]_R} \right| \times 100\%$$

$$\text{产物 } ee_p(\%) = \left| \frac{[P]_S - [P]_R}{[P]_S + [P]_R} \right| \times 100\%$$

$$\text{底物转化率 } C(\%) = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100\%$$

式中,  $[S]_S$ 和 $[S]_R$ 分别为样品中S和R型底物的含量,  $[P]_S$ 和 $[P]_R$ 分别是S和R型产物(酸)的含量,  $ee_s$ 和 $ee_p$ 分别为底物和产物对映体过量值。

### 1.3 菌种筛选

初筛: 取活性污泥样品1 mL, 接入装有 49 mL

富集培养基中, 30 °C、180 r/min摇床培养5 d, 移取1 mL富集液转入新鲜的富集培养基中, 重复培养若干轮。取少量富集液适当稀释后涂布到含罗丹明B的初筛固体培养基, 30 °C培养3–5 d, 置于365 nm紫外线下, 观察菌落周围有无荧光变色圈及大小。复筛: 挑取紫外灯下荧光变色圈明显的菌株接种于发酵培养液中, 30 °C培养, 摇床转速180 r/min。定时取样, 分析细胞的催化活性。

### 1.4 菌种鉴定

**1.4.1 形态和生理生化特征:** 将筛选到的菌株划线于LB固体培养基, 30 °C培养2–4 d, 观察单菌落形状、大小、颜色和突起等特征, 并对其革兰氏染色, 采用光学显微镜(10 $\times$ 100)对其观察。菌株的生理生化鉴定采用梅里埃VITEK 2 Compact全自动微生物分析系统仪和革兰氏阴性杆菌鉴定卡GN进行。

**1.4.2 菌株的16S rRNA 序列分析:** 用SK8255柱式细菌基因组DNA 抽提试剂盒抽提细胞的全基因组, 用通用27F/1492R引物(正向5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行16S rRNA的PCR扩增, 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增的DNA用SK8131 DNA柱式胶回收试剂盒纯化后, pMD18-T载体连接, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序得到的16S rRNA序列上交NCBI 核酸序列库, 并将16S rRNA序列在核糖体数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)和BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)上进行分析。通过Clustal X软件进行序列比对, 采用MEGA 4.0软件中的邻近法(Neighbor-Joining)法与1000次Bootstrap的统计检验构建进化树。

### 1.5 菌体及发酵上清液催化水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯

将20 mL发酵液离心获得的湿菌体(约40 mg)

和发酵上清液(约2 mL), 分别加入(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(终浓度10 g/L)、磷酸缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0)、吐温80(终浓度20 g/L)于具塞锥形瓶中, 总体积为10 mL。在37 °C摇床(转速180 r/min)中反应。

## 1.6 基因组DNA的*Sau3A I*酶切

将菌种接种于LB培养基中, 37 °C恒温摇床培养过夜, 离心获得菌体。按AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep说明书, 提取基因组DNA。*Sau3A I*酶切体系: 基因组DNA 44 μL; 10×NEBuffer1.1 5 μL; *Sau3A I* 0.1 μL; ddH<sub>2</sub>O 0.9 μL。配置50 μL基因组DNA酶切反应体系, 并分成5管, 每一管10 μL, 标号分别为2、3、4、5、6, 相对应的酶切反应时间分别为10、20、30、40、50 min, 反应温度37 °C。反应结束后, 立即放入冰浴中, 并加入一定量的10×Loading buffer 终止反应。琼脂糖凝胶电泳检测, 所需DNA凝胶回收试剂盒为AxyPrep™ DNA Gel Extraction G Kit。

## 1.7 基因文库的构建与筛选

**1.7.1 质粒pUC19单酶切:** 质粒pUC19 44 μL; 10×NEBuffer 3.1 5 μL; *BamH I* 1 μL。反应温度37 °C, 酶切时间2 h。反应结束后对酶切体系直接去磷酸化处理。单酶切质粒pUC19去磷酸化: 酶切质粒pUC19 50 μL; 10×Antarctic Phosphatase Action buffer 6 μL; Antarctic Phosphatase 1 μL; ddH<sub>2</sub>O 3 μL。反应温度37 °C, 反应时间15 min, 失活温度65 °C, 失活反应时间5 min。反应结束后, 使用PCR清洗试剂盒AxyPrep™ PCR Cleanup Kit进行清洗, 用于连接反应。

**1.7.2 基因文库的构建和阳性克隆子的筛选:** 酶切质粒pUC19 2 μL; 外源DNA片段3 μL; Ligation high Ver.2 5 μL。将连接液置于PCR仪16 °C恒温连接1 h, 然后全部转化到*E. coli* DH5α宿主菌中, 涂布于抗性筛选培养基(LB固体培养基, 含100 μg/mL

氨苄青霉素、60 g/L的(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯、50 mg/L的溴甲酚紫)平板上, 37 °C培养1-2d。挑取平板上的黄色单菌落, 接于含100 μg/mL氨苄青霉素抗性的LB液体培养基上富集培养, 使用AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit提取重组质粒, 质粒*BamH I*单酶切体系验证阳性克隆, 琼脂糖电泳检测, 送样测序。

## 1.8 酯酶基因的克隆及重组菌的构建

设计酯酶基因引物EHest-F (5'-GGAATTC ATGCTGGCGCACGGCTCCT-3', *EcoR I*)和EHest-R (5'-CCC AAGCTTTCAGGACAGGCCAGCAAC-3', *Hind III*)。以菌种基因组为模板, PCR扩增: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 68 °C 1 min, 30个循环; 68 °C 10 min。PCR扩增的条带和pET-28a(+)用限制性内切酶进行酶切, 并用Ligation high Ver.2连接酶连接, 转化*E. coli* BL21 Gold (DE3) plysS。挑单菌落, 提取质粒, 质粒PCR验证和DNA序列测序。

## 1.9 重组酯酶的表达与SDS-PAGE电泳分析

将重组菌在含卡那霉素抗性和氯霉素抗性的LB液体培养基中, 37 °C培养至菌液OD<sub>600</sub>约为0.5-0.8, 分别标记为诱导组和未诱导组。在宿主菌(单独)组、空载体菌组和诱导组中添加IPTG至终浓度为1.0 mmol/L, 未诱导组加等量的无菌水, 25 °C、180 r/min培养10 h。分别取宿主菌组、空载体菌组、未诱导组和诱导组菌液, 4 °C、10000 r/min离心10 min后弃上清液, 细胞悬浮于100 mmol/L的pH 8.0 Tris-HCl缓冲液中, 菌体浓度约为0.05 g/mL, 冰浴下超声破碎。4 °C、10000 r/min离心30 min, 取上清液(酶液), 进行SDS-PAGE电泳分析。

## 1.10 重组菌与原始菌的表达酶活测定

分别取原始菌和诱导培养后的重组菌湿菌体各15 g, 用50 mL磷酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)悬浮, 经超声破壁后, 离心, 上清液即为酶

液。取适量的酶液(EHestase酶液取10  $\mu$ L, 原始菌株酶液取50  $\mu$ L), 0.25 g (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯为底物, 0.1 g吐温80作为乳化剂, 一定量的磷酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0), 总反应体系为5 mL, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min摇床中反应1 h, 用6 mol/L盐酸终止反应。

### 1.11 重组酯酶EHestase的酶学性质

**1.11.1 酶的最适温度和最适pH:** 取适量的酶液, 分别在20、30、40、50、60、70  $^{\circ}$ C下测定酶活, 反应10 min, 其它条件同1.10。将酶液在不同的pH (pH 3.0、4.0、5.0为100 mmol/L柠檬酸钠缓冲液, pH 6.0、7.0、8.0为100 mmol/L磷酸盐缓冲液, pH 9.0为100 mmol/L Tris-HCl缓冲液, pH 10.0、11.0为Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液)测定酶活, 反应10 min。

**1.11.2 底物浓度对酶反应转化率和立体选择性的影响:** 取200  $\mu$ L的酶液, (R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯的初始浓度分别为25、50、100、150、200、250 g/L, 其它条件同1.10, 37  $^{\circ}$ C摇床中反应3 h。

**1.11.3 酶对不同底物的水解活性测定:** 以(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯为底物, 取适量酶液, 底物浓度为150 mmol/L, 反应时间10 min, 其它条件同1.10。以橄榄油、乙酸丁酯、乙酸乙酯为底物测定酶活<sup>[11]</sup>, 37  $^{\circ}$ C、pH 7.0下进行。酶活力单位U: 在酶活测定条件下, 1分钟转化底物生成1微摩尔产物所需的酶量。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌种筛选

初筛固体培养基以(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯为唯一碳源, 以罗丹明B为显色剂, 用于筛选产酯酶/脂肪酶微生物。罗丹明B与酸性产物结合, 在365紫外灯下能产生荧光, 反应灵敏。

本实验根据荧光圈大小, 筛出了具有降解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯能力的菌株, 如图2。初筛共得到27株菌株, 这些菌株经过摇瓶复筛, 其中菌株OD3水解能力和选择性都最强。

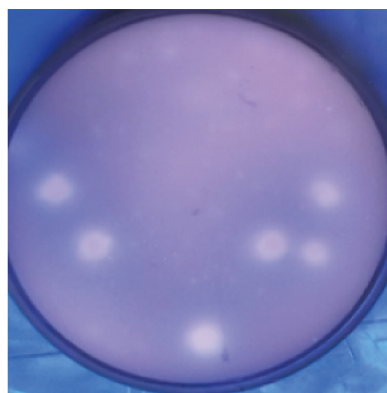


图2. 菌种平板初筛的结果

Figure 2. Results of strains screening. Using methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate as the sole carbon source and Rhodamine B as the indicator.

### 2.2 菌种鉴定

**2.2.1 菌种形态及生理生化鉴定结果:** 将筛选到的最佳菌株OD3划线于LB固体培养基, 30  $^{\circ}$ C培养2-4 d, 挑取菌落进行革兰氏染色, 在显微镜下观察, 呈杆状, 无芽孢, 为革兰氏阴性菌。菌株在LB平板上菌落均呈圆形, 表面隆起, 边缘整齐, 湿润, 光滑, 不透明, 乳白色, 随着时间的推移逐渐变成微黄色。生理生化鉴定采用梅里埃VITEK 2 Compact全自动微生物分析系统仪和革兰氏阴性杆菌鉴定卡GN进行, 鉴定报告显示菌株与*Achromobacter denitrificans*同种的概率达到99%。具体生理生化鉴定结果如表1。

**2.2.2 16S rRNA 分子生物学鉴定:** 以菌株OD3基因组DNA为模板, 采用通用引物27F和1492R进行PCR扩增, 扩增得到的序列测序之后递交NCBI基因库, GenBank序列号: KT832691。16S rRNA的序列长度1434 bp, 将测定的16S rRNA序列在核糖体数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsu>)上比对, 结果显示该菌株属于*Achromobacter*

表1. 菌株OD3生理生化指标  
Table 1. Physiological and biochemical index of strain OD3

D-glucose	Growth	5-Keto -D-gluconate	Growth	$\beta$ -Alanine arylamidase pNA	Growth	Lysine decarboxylase	Growth
D-mannitol	-	Urea	-	L-Pyrrolydonyl-arylamidase	+	Glu-Gly-Arg-arylamidase	-
D-maltose	-	Citrate(sodium)	+	Glutamyl Arylamidase pNA	+	Ornithine decarboxylase	-
D-mannose	-	Malonate	-	$\beta$ -glucosidase	+	$\beta$ -xylosidase	-
Palatinose	-	Courmarate	-	Ellman	-	Tyrosine arylamidase	+
D-tagatose	-	H <sub>2</sub> S production	-	Ala-Phe-Pro -arylamidase	-	$\alpha$ -glucosidase	-
D-cellobiose	-	L-lactate alkalinisation	+	$\beta$ -N-acetyl -glucosaminidase	-	Lipase	-
Saccharose	-	Succinate alkalinisation	+	$\beta$ -D-galactosidase	-	Glycine arylamidase	-
D- trehalose	-	L-lactate assimilation	-	Proline arylamidase	+	$\beta$ - Glucoronidase	-
D-sorbitol	-	L-malate assimilation	-	$\gamma$ -glutamyl -transferase	-	$\alpha$ - Galactosidase	-
L-arabitol	-	L-Histidine assimilation	-	Phosphatase	-		
adonitol	-	O/129 Resistance (comp.vibrio.)	-	N-acetyl- $\beta$ -galactosaminidase	-		
Fermentation/ glucose	-						

+: growth or positive; -: not growth or negative.

属的细菌。将该菌株的16S rRNA与GenBank数据库序列进行BLAST比对，菌株OD3 (KT832691)与 *Achromobacter xylosoxidans*、*Achromobacter denitrificans*、*Achromobacter sp.*、*Achromobacter ruhlandii*的16S rRNA 基因序列相似性达到99%。调聚与该菌株同源性的典型菌株序列，采用邻近法构建16S rRNA 基因序列的系统进化树(图3)。菌株OD3与 *Achromobacter denitrificans*和 *Achromobacter xylosoxidans*系统发育关系密切，尤其菌株OD3与 *Achromobacter denitrificans*遗传距离最小。结合菌株形态学和生理生化特征，鉴定菌株OD3属于 *Achromobacter denitrificans*，将其命名为反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*) 1104。

### 2.3 菌体和发酵上清液催化水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯

20 mL的 *A. denitrificans* 1104菌液离心得到菌体和发酵上清液，分别催化水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)，底物浓度10 g/L，结果如表2和图4。由表2知，反硝化无色杆菌 1104菌

株所产的酶是胞内酶，用菌体细胞催化24 h，底物转化率达到41.5%，产物 $ee_p$ 达到了83.8%。发酵上清液基本无酶活。利用正相HPLC分析了水解1 h和12 h时的情况，见图4。由图可知，该菌体对(R)-MAP的选择性较高，优先水解(R)-MAP生成(R)-MAP酸；而它对(S)-MAP的选择性较差，水解(S)-MAP生成的(S)-MAP酸的量少得多。

### 2.4 基因文库法寻找 *A. denitrificans* 1104中的酯酶基因

**2.4.1 基因组DNA的Sau3A I酶切：**首先提取该菌的基因组，然后用Sau3A I酶切，酶切结果如图5，可以看出，在酶量一定的情况下，随着酶切反应时间的增加，基因组片段在逐渐减小。在酶切反应20 min时，大多数的片段集中在2-10 kb范围内，由图5知，最佳酶切反应时间为20 min (条带3)。

**2.4.2 基因文库的构建和筛选：**本实验筛选培养基仍以溴甲酚紫作为指示剂，它会随着pH的下降由紫色变成黄色。共2次连接转化，共得到大约1000个克隆子，其中发生变色的有5个克隆子。挑

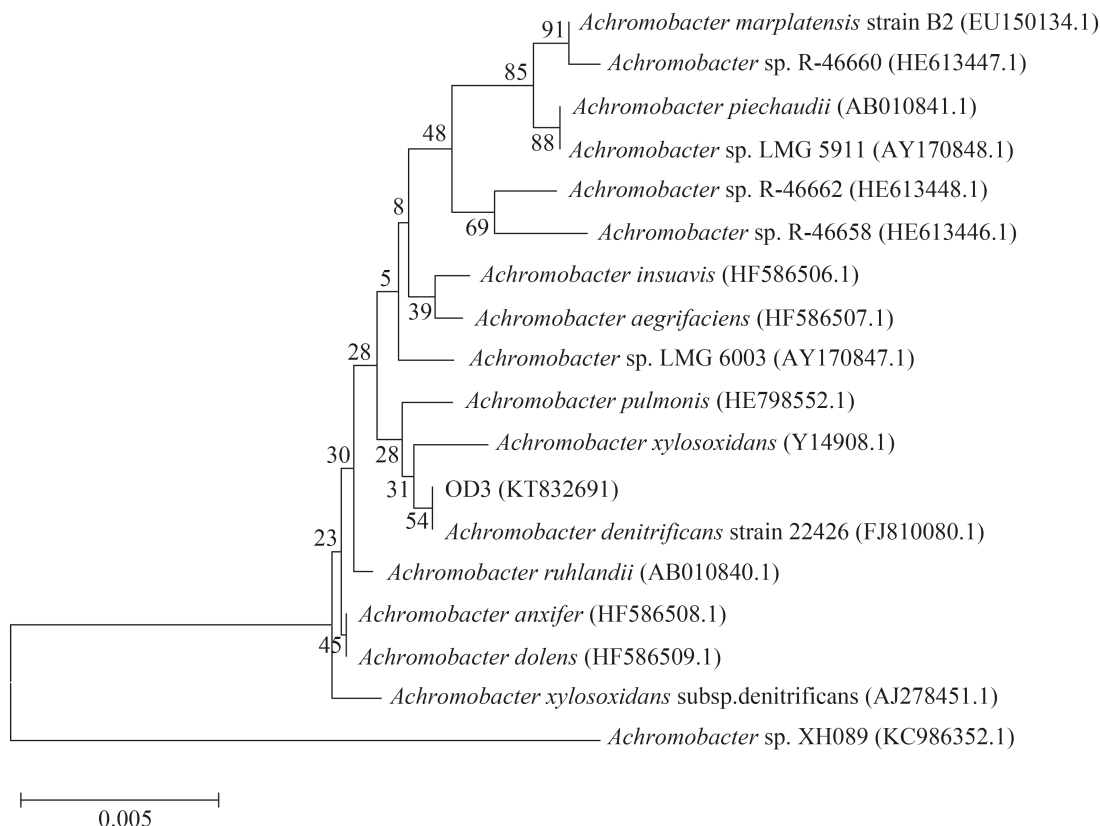


图 3. *Achromobacter denitrificans* 1104 (即菌株OD3)的16S rRNA系统发育树

Figure 3. 16S rRNA phylogenetic tree of *Achromobacter denitrificans* 1104. The numbers on branches indicate bootstrap values. The tree rooted was constructed by Kimura-2-Parameter model and N-J method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Bar, 0.5% sequence divergence.

表2. *Achromobacter denitrificans* 1104菌体及上清液催化(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯水解的比较  
Table 2. Performance of *Achromobacter denitrificans* 1104 catalyzing hydrolysis of methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate by its cells and broth supernatant respectively

	Time/h	Conversion of substrate/%	$ee_s$ /%	$ee_p$ /%	Configuration of product
Cells	24	41.50	59.4	83.8	R
	48	52.90	85.2	75.7	R
broth supernatant	24	0.90			
	48	0.95			

取变色单菌落接种于LB液体培养基(含氨苄抗性)中, 37 °C过夜培养, 发现菌体长得比较慢。离心取菌体, 使用AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit提取质粒, 并使用BamH I对重组质粒进行单酶切验

证, 如图6。从图6中可以看出, 连接上的DNA片段大小在1.2 kb左右, 是pUC19载体的大小4倍多。从这一点推测菌体生长速度慢可能是由于片段太大导致宿主负电荷量比较重。重组质粒单酶切

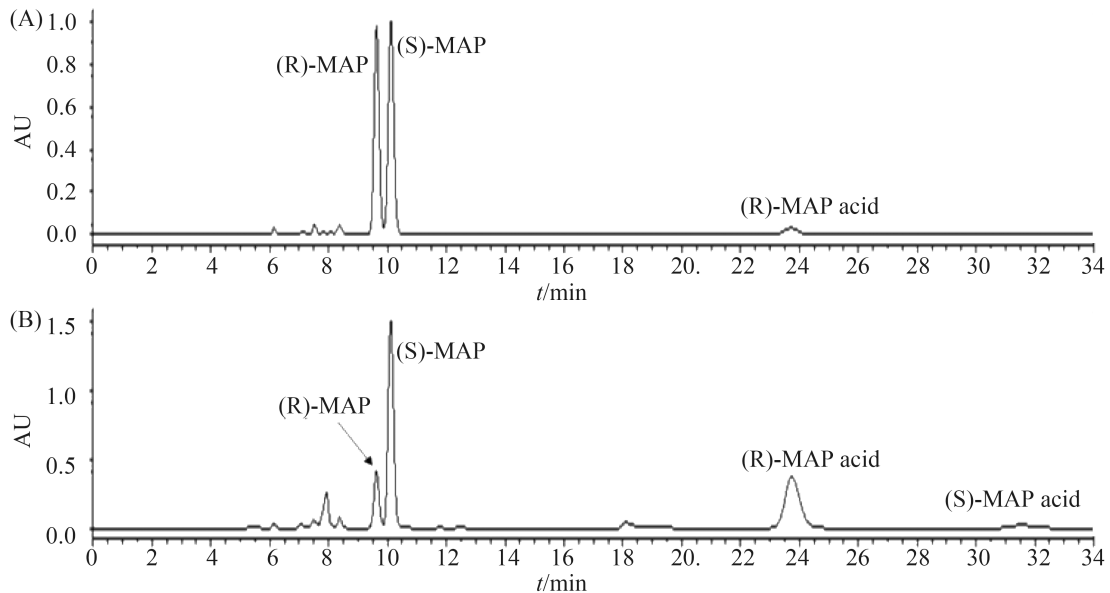


图 4. 正相HPLC分析*A. denitrificans* 1104湿菌体拆分(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)的过程

Figure 4. HPLC graphs in the course of hydrolysis of methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate (MAP) catalyzed by *A. denitrificans* 1104 cells. A: reaction 1 h; B: reaction 12 h; (R)-MAP acid and (S)-MAP acid was the hydrolysate (acid) of (R)-MAP and (S)-MAP respectively.

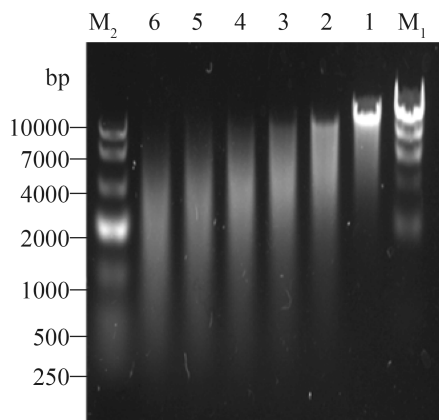


图 5. *Sau3A I*对*A. denitrificans* 1104基因组DNA不同时间的酶切结果

Figure 5. The partial digestion of *A. denitrificans* 1104 genomic DNA with *Sau3A I* in different times. M<sub>1</sub>;  $\lambda$ -*Hind III* digest marker; lane 1: genomic DNA; lane 2: 10 min digestion; lane 3: 20 min; lane 4: 30 min; lane 5: 40 min; lane 6: 50 min; M<sub>2</sub>: DL10000 DNA marker.

出现2条条带，其中一条小于2000 bp，其大小和线性pUC19不在一条线上，取该克隆子重组质粒片段送样测序。

**2.4.3 基因序列分析：**因技术原因，未测得重组质粒pUC19中插入的外源片段的完整序列，只分

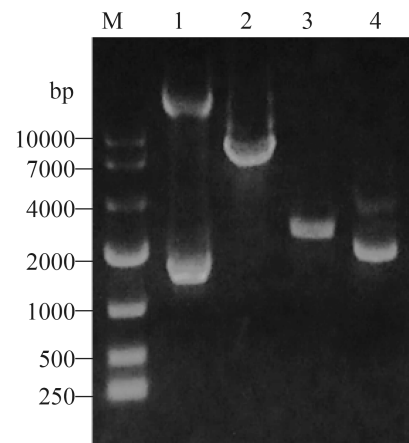


图 6. 来自基因文库的、含目的基因的重组pUC19质粒的*BamH I*单酶切图

Figure 6. The results of *BamH I* digestion recombinant plasmid pUC19. M: marker; lane 1: *BamH I*-digested recombinant pUC19 plasmid; lane 2: recombinant pUC19 plasmid without digestion; lane 3: *BamH I*-digested plasmid pUC19; lane 4: plasmid pUC19.

别测得首尾两端的各一段序列，获得的首段和尾段序列大小分别为1236 bp和1250 bp。在NCBI上进行比对发现，这2个序列与*Achromobacter xylosoxidans* C54的相应同源片段相似度均最高，



为94%。由于该菌株的全基因组序列已经测序, 点击进入GenBank, 再进入Fast, 分别查找与上述核苷酸相似度最高的同源序列在这个菌株基因组确切的位置, 再点击进入Graphics, 以这2个同源序列为首尾, 截得大小为11550 bp的一段长序列。发现*A. xylooxidans* C54的这段长序列中含有酯酶基因片段, 以GTG为起始密码子, 碱基大小708 bp, 编码蛋白质235个氨基酸, 基因编号: LH59-14460。

## 2.5 酯酶基因的克隆与重组菌的构建

以反硝化无色杆菌(*A. denitrificans*)1104基因组为模板, 根据同源酯酶基因LH59-14460的序列设计引物, 进行PCR扩增, 扩增后琼脂糖凝胶电泳检测, 如图7。从图7中可以看出, 在500–1000 bp左右都有明亮的条带, 无非特异性扩增, 与预期大小相符。使用AxyPrep™ DNA Gel Extraction G Kit切胶回收目的片段。目的基因和pET-28a (+)经双酶切, 连接后得到重组质粒, 然后全部转化到*E. coli* BL21Gold (DE3) plysS宿主菌, 获得EHest-pET28a (+)-BL21Gold (DE3) plysS。随机挑取平板上的2个单菌落, LB液体培养基(含50 μg/mL卡那霉素抗性和35 μg/mL氯霉素抗性)过夜富集培养。提取重组质粒, 做质粒PCR验证, 琼脂糖电泳检测, EHest基因序列大小约为700 bp, 与预期基因

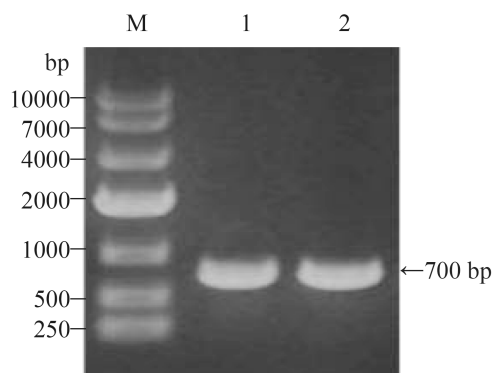


图7. PCR扩增的反硝化无色杆菌(*A. denitrificans*)1104的EHest基因的琼脂糖电泳图

Figure 7. The agarose gel electrophoresis of PCR amplified EHest gene from *A. denitrificans* 1104.

相符。取该重组质粒送样测序, 测序结果表明, 重组大肠杆菌构建成功, EHest片段大小708 bp。登陆NCBI比对片段, EHest基因序列与*Achromobacter xylooxidans* C54的同源基因LH59-14460的同源性为96%, 编码235个氨基酸。通过DNAMAN 8.0软件将它的氨基酸序列分别与NCBI上高度同源的几个酯酶以及文献报道有相同酯酶活性的Lipase PS<sup>[4,9]</sup>的氨基酸序列进行比对, 发现EHest基因的氨基酸序列与*A. xylooxidans* C54的基因LH59-14460预测的酯酶的氨基酸序列同源性最高, 达98%; 但是, 它与Lipase PS氨基酸序列同源性很低, 只有13.4%。

## 2.6 重组酯酶的表达与SDS-PAGE电泳分析

分别取宿主菌组、空载体菌组、未诱导组和诱导组的胞内蛋白粗提液(发酵液离心获菌体, 超声破碎后, 取上清液)进行SDS-PAGE电泳分析, 如图8可知, 经IPTG诱导, 重组大肠杆菌有目的

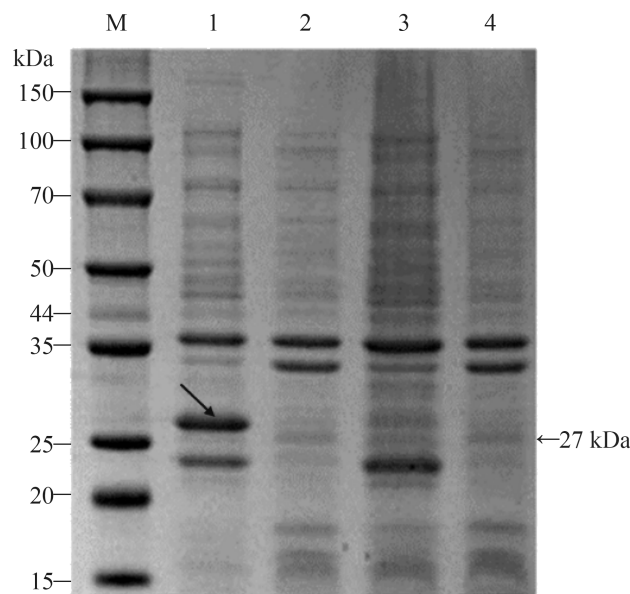


图8. 重组菌EHest-pET28a(+)-BL21Gold(DE3)plysS表达产物的SDS-PAGE图

Figure 8. SDS-PAGE analysis of expression proteins in recombinant EHest-pET28a(+)-BL21Gold(DE3)plysS. M: marker; lane 1: with IPTG induction (arrow indicated target protein); lane 2: without induction; lane 3: host stain with empty vector; lane 4: host strain only.

蛋白的表达, 目的蛋白大小约为27 kDa, 与预期相符。说明基因在大肠杆菌BL21Gold (DE3) plysS成功异源表达。测得重组菌EHest-pET28a (+) - BL21Gold (DE3) plysS的表达酶活为476 U/mL, 是原始菌株表达酶活的27.1倍, 为超表达。

将重组菌破壁, 离心取上清酶液, 用获得的重组酯酶EHesterase催化(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯水解, 底物浓度50 g/L, 反应1 h, 底物的转化率达到29.5%, 产物的 $ee_p$ 达到了85.1%, 对映体选择性为R型。这个结果与该酯酶的原始来源菌株—反硝化无色杆菌 (*Achromobacter denitrificans*) 1104细胞催化结果(底物浓度10 g/L, 催化24 h,

底物转化率41.5%, 产物 $ee_p$ 83.8%)相比有所差别, 原因可能与酶/底物的比例不同、细胞中的酶与游离酶的催化性能有所差异等因素有关。

## 2.7 重组酯酶EHesterase的酶学性质

**2.7.1 酶的最适温度和最适pH:** 分别测定不同温度下的酶活, 以最高酶活为100%, 结果如图9-A。该酯酶在50 °C时酶活最高, 在40 °C和60 °C时酶活保持在80%以上。当温度高于70 °C时, 酶的活性迅速下降。分别测定不同pH下的酶活, 以最高酶活为100%。结果如图9-B。该酯酶在pH为9.0时活性最高, pH达到11时, 依然保持相当高的活性, 而在酸性条件下, 酶的活性迅速下降。

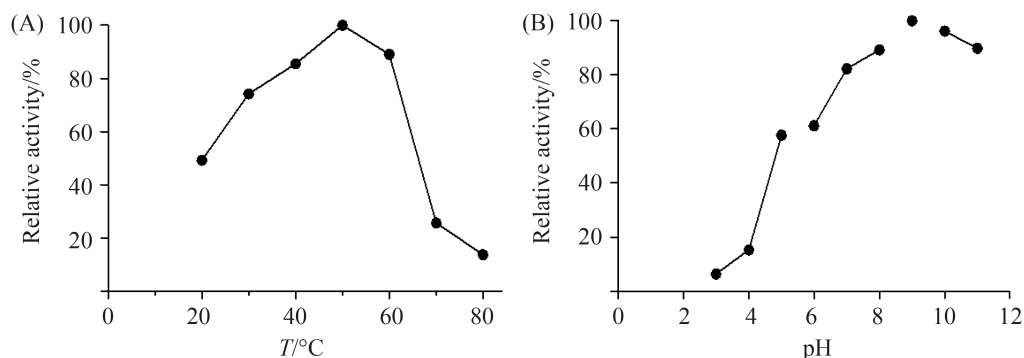


图 9. 温度(A)和pH (B)对重组酯酶EHesterase酶活影响

Figure 9. Effect of temperature (A) and pH (B) on EHesterase's activity.

**2.7.2 底物MAP浓度对酶催化反应转化率和立体选择性的影响:** 图10显示, 反应在较宽的初始底物浓度范围(25–250 g/L)进行, 反应时间(3 h)也较长。对产物的 $ee_p$ 来说, 存在2个明显不同的区域。当初始底物浓度大于100 g/L时,  $ee_p$ 较高, 基本在80%以上; 但当初始底物浓度较低时(25–50 g/L),  $ee_p$ 明显下降。这是因为, 当初始底物浓度高时, 反应即使进行了较长时间, 但R型底物的含量仍高, 由于酶是R型选择性的, 所以反应一直以R型底物的水解为主, 所以 $ee_p$ 较高。当初始底物浓度较低时, 反应3 h, R型底物基本转化完全, 剩下的底物以S型为主, 继续反应, 产物的 $ee_p$ 就会下降。图中显示, 当初始底物较低(25–50 g/L)时,

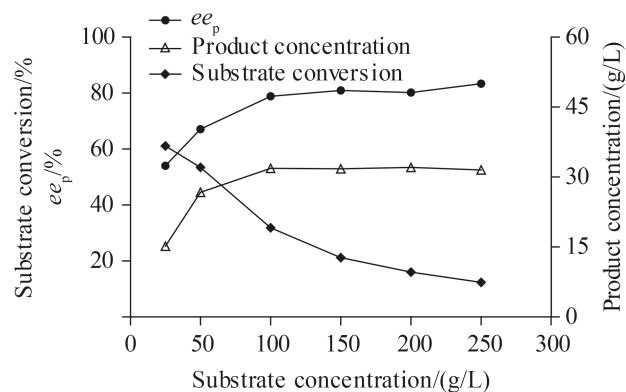


图 10. 底物MAP浓度对重组酯酶EHesterase催化底物转化、产物(酸)生成和立体选择性的影响

Figure 10. Effect of substrate MAP concentration on substrate conversion, product acid concentration and  $ee_p$  in reaction catalyzed by EHesterase.

反应3 h, 底物转化率已超过50%, R型底物在此之前已经转化完。由图10还可以看出, 当初始底物浓度大于100 g/L时, 产物浓度基本没有增加。这是因为, 在实验酶浓度下, 100 g/L以上的底物浓度已是饱和浓度, 再增加底物浓度, 对反应速率没有影响。

**2.7.3 酶对不同底物的相对水解活性:** 从表3可知, 重组酯酶水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯的活性是水解橄榄油(脂肪)活性的333倍, 但它对其它2种酯(乙酸乙酯和乙酸丁酯)的水解活性不高。由于(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯是芳香氨基酸的酯, 而乙酸乙酯和乙酸丁酯是脂肪酸的酯, 该酶可能对芳香氨基酸残基的选择性大于脂肪酸残基。

表3. 重组酯酶EHesterase对几种不同底物的相对水解活性

Table 3. Relative activities of EHesterase hydrolyzing several substrates

Substrates	Substrate concentration/(mmol/L)	Relative activity
methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate	150	100.00
Olive oil	160	0.30
butyl acetate	530	0.15
ethyl acetate	410	0.15

### 3 讨论

本研究从活性污泥中筛选出1株可不对称水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)的菌株, 经形态观察、生理生化鉴定和16S rRNA序列分析, 鉴定为*Achromobacter denitrificans*。本研究为第1次报道反硝化无色杆菌对MAP的拆分反应。本文筛选出的菌种对底物的立体选择性不是很高, 主要原因在于本文的筛选模型是针对水解活力高低的筛选法(根据荧光圈和变色圈的大小), 对立体选择性好坏挑选不出。

为寻找反硝化无色杆菌*Achromobacter denitrificans* 1104的酯酶/脂肪酶基因, 我们在NCBI上搜索了*Achromobacter denitrificans*的酯酶和脂肪酶, 未找到相关条目, 又搜索了*Achromobacter xylosoxidans*(次高同源性)的酯酶和脂肪酶, 分别找到723和589个条目, 因此很难直接通过NCBI上报道或预测的同源性酯酶/脂肪酶基因找到菌株*A. denitrificans* 1104所特有的酯酶/脂肪酶基因。本文采用基因文库法寻找酶基因, 可以极大地减小搜索范围, 证明是一个非常有效的寻找方法。

用脂肪酶拆分(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP), 前人已经做过一些研究<sup>[4-7,9]</sup>。Park等<sup>[4]</sup>用Lipase PS做催化剂, 底物浓度未知, 酶粉和底物用量之比为1:2(g/g), 反应3 h, 转化率为17.1%,  $ee_p$ 达到96.6%, 选择性为R型。王岩等<sup>[7]</sup>利用南极假丝酵母脂肪酶CAL-B, 底物浓度22 g/L, 酶粉和底物用量之比为1:5.5(g/g), 反应2 h, 转化率为48.2%, 产物的 $ee_p$ 为69.2%, 选择性是R型。本文用重组酯酶EHesterase(从重组湿菌体中提取)对MAP进行拆分, 相应的重组湿菌体与底物的质量比为1:2.4(g/g), 底物浓度50 g/L, 反应1 h, 底物转化率为29.5%, 产物的 $ee_p$ 是85.1%(R型选择性)。由于某一种酶在湿菌体中所占的比重是很低的, 与上述报道相比, EHesterase的活性远高于Lipase PS和脂肪酶CAL-B, 但它的立体选择性低于前者, 与后者相当。

本文首次报道了有不对称水解MAP活性的无色杆菌属(*Achromobacter*)的酯酶基因和基因工程菌。该酯酶基因与*Achromobacter xylosoxidans* C54的疑似酯酶基因LH59-14460的同源性最高。它的氨基酸序列与有相同酯酶活性的Lipase PS的氨基酸序列同源性很低(13.4%)。可以推断, 本文报道的酯酶EHesterase和Lipase PS的蛋白结构有较大的差别, 这是它们活性和立体选择性差别较大的主要原因。

## 4 结论

本研究从活性污泥中筛选出了1株可以对映体选择性水解(R,S)-2,6-二甲基苯基氨基丙酸甲酯(MAP)的菌株,经形态观察、生理生化鉴定和16S rRNA序列分析,鉴定为*Achromobacter denitrificans*,命名为反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*) 1104。

通过构建反硝化无色杆菌*A. denitrificans* 1104基因文库,获得了酯酶基因EHest,其核苷酸序列长度为708 bp,编码235个氨基酸。基因与表达载体pET28a (+)连接后,成功在*E. coli* BL21Gold (DE3) plysS中诱导表达,表达蛋白的分子量为27 kDa,表达酶活为476 U/mL,是原始菌株的表达酶活的27.1倍。用重组酯酶EHesterase对MAP进行水解拆分,底物浓度50 g/L,反应1 h,底物转化率29.5%,产物的 $ee_p$ 为85.14%。该酶的最适反应pH和温度分别为pH 8.0和50 °C。酶水解MAP的活性分别是水解橄榄油和乙酸乙酯活性的333倍和667倍。

## 参考文献

- [1] Chikusa Y, Hirayama Y, Ikunaka M, Inoue T, Kamiyama S, Moriwaki M, Nishimoto Y, Nomoto F, Ogawa K, Ohno T, Otsuka K, Sakota AK, Shirasaka N, Uzura A, Uzura K. There's no industrial biocatalyst like hydrolase: development of scalable enantioselective processes using hydrolytic enzymes. *Organic Process Research & Development*, 2003, 7(3): 289–296.
- [2] Liu XL, Ma AJ, Lin JP, Liu PF. The comparison of inhibitory action between stereoisomers of metalaxyl. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2003, 5(3): 45–49. (in Chinese)  
刘西莉, 马安捷, 林吉柏, 刘鹏飞. 精甲霜灵与外消旋体甲霜灵对掘氏疫霉菌的抑菌活性比较. *农药学报*, 2003, 5(3): 45–49.
- [3] Zadra C, Marucchini C, Zazzerini A. Behavior of metalaxyl and its pure *R*-enantiomer in sunflower plants (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(19): 5373–5377.
- [4] Park OJ, Lee SH, Park TY, Lee SW, Cho KH. Enzyme-catalyzed preparation of methyl (*R*)-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alaninate: a key intermediate for (*R*)-metalaxyl. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(6): 1221–1225.
- [5] Huang LQ, Chen DW, Yang H. Enzymatic resolution of methyl ( $\pm$ )-*N*-(2,6-Dimethylphenyl) alanine. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2005, 25(12): 1575–1579. (in Chinese)  
黄丽琴, 陈道文, 杨红. 酶法拆分( $\pm$ )-*N*-(2,6-二甲苯基)-丙氨酸甲酯. *有机化学*, 2005, 25(12): 1575–1579.
- [6] Huang LQ, Yang H. The lipase catalyzed reaction of methyl ( $\pm$ )-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alanine and determination of conversion. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2007, 30(4): 135–139. (in Chinese)  
黄丽琴, 杨红. ( $\pm$ )-*N*-(2,6-二甲苯基)-丙氨酸甲酯的脂肪酶酶促水解拆分方法. *南京农业大学学报*, 2007, 30(4): 135–139.
- [7] Wang Y. Study on the synthesis of *R*-metalaxyl. Master Dissertation of Jilin University, 2008. (in Chinese)  
王岩. 精甲霜灵的合成研究. 吉林大学硕士学位论文, 2008.
- [8] Wang SH. Study on the immobilization of lipase by micro capsule and resolution chiral amine. Master Dissertation of Jilin University, 2010. (in Chinese)  
王世辉. 微胶囊法固定脂肪酶及拆分手性胺的研究. 吉林大学硕士学位论文, 2010.
- [9] Park OJ, Lee SH. Stereoselective lipases from *Burkholderia* sp., cloning and their application to preparation of methyl (*R*)-*N*-(2,6-dimethylphenyl) alaninate, a key intermediate for (*R*)-Metalaxyl. *Journal of Biotechnology*, 2005, 120(2): 174–182.
- [10] Park OJ, Lee SH, Park TY, Chung WG, Lee SW. Development of a scalable process for a key intermediate of (*R*)-metalaxyl by enzymatic kinetic resolution. *Organic Process Research & Development*, 2006, 10(3): 588–591.
- [11] Zhou XY. Enzyme technology. Beijing: Petroleum Industry Press, 1995: 287–291. (in Chinese)  
周晓云. 酶技术. 北京: 石油工业出版社, 1995: 287–291.

# Cloning and expression of an esterase gene from a new strain capable of enantioselective hydrolyzing methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate

Yanan Lu, Zhaohui Zhang<sup>\*</sup>, Likun Zhang, Yuele Lu

College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

**Abstract:** [Objective] We screened and identified a strain capable of enantioselectively hydrolyzing methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate (MAP), a key intermediate for the synthesis of metalaxyl, followed by cloning and expressing the esterase in *E. coli*. [Methods] We used MAP as the sole carbon source in the medium inoculated with an active sludge specimen to enrich the target microorganism. The strain with the highest hydrolysis activity and enantioselectivity was identified by 16S rRNA sequence analysis, morphological observation and physiological and biochemical properties. From the gene library of the strain, the DNA sequence fragment containing the target gene was found. By DNA sequence analysis and PCR amplification, the esterase gene was obtained. It was ligated with plasmids pET28a (+), then transformed into *E. coli* BL21Gold (DE3) plysS. [Results] We isolated a gram-negative bacterial strain capable of enantioselective hydrolyzing MAP. It was identified as *Achromobacter denitrificans*. From its gene library, the esterase gene named EHest was found. The recombinant EHest-pET28a(+)-BL21Gold (DE3) plysS was constructed. The recombinant expressed esterase (EHest) capable of catalyzing enantioselective hydrolysis of methyl (R,S)-N-(2,6-dimethylphenyl) alaninate. Its size was 27 kDa. The expression activity was 27.1 times as high as that in the original strain. Hydrolysis of MAP (5% M/V) by EHest for 1 h at 37 °C, the substrate conversion was 29.5% and  $ee_p$  of the product acid (major in R configuration) was 85.1%. The optimum pH was 9.0 and temperature 50 °C. [Conclusions] A new isolate *Achromobacter denitrificans* 1104 capable of enantioselective hydrolyzing MAP was found and identified.

**Keywords:** *Achromobacter denitrificans*, methyl (R, S)-N-(2, 6-dimethylphenyl) alaninate, enantioselective hydrolysis, esterase gene, cloning and expression, metalaxyl

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21447005)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-576-88320571; E-mail: zzh@zjut.edu.cn

Received: 16 November 2015; Revised: 11 January 2016; Published online: 2 February 2016