



Pseudomonas putida KT2440 低特异性 L-苏氨酸醛缩酶的表达、酶学性质及温度稳定性提高

李利宏, 张荣珍*, 周丽仙, 柳志永, 旋凯昂, 饶俊超, 徐岩

江南大学生物工程学院教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】从 *Pseudomonas putida* KT2440 基因组中, 钓取低特异性 L-苏氨酸醛缩酶基因(*ltaE*), 构建重组大肠杆菌。研究目标酶的酶学性质, 和关键氨基酸位点突变对酶活和温度稳定性的影响。【方法】以 *P. putida* KT2440 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出 *ltaE* 基因, 构建重组表达质粒 pET28a-KT2440 并转化 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 获得重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-KT2440, 利用 Ni²⁺柱亲和层析纯化低特异性 L-苏氨酸醛缩酶(LTA), 对关键氨基酸位点 Thr206 和 Lys207 实施定点突变。【结果】SDS-PAGE 结果表明 LTA 在大肠杆菌中获得高效表达, 分子量为 40 kDa 左右, 与理论值大小相符。Ni²⁺柱亲和层析纯化 LTA, 获得单一条带。利用双酶耦联法测得 LTA 酶活为 5577.3 U/mg, 最适反应温度为 50 °C, 最适 pH 为 8.0。在温度低于 45 °C, pH 5.0–9.0 时, 重组酶较稳定。LTA 酶的 K_m 和 k_{cat} 值为 23.95 mmol/L 和 19216.6 s⁻¹。Mg²⁺、Ca²⁺金属离子对 LTA 有明显的促进作用, 而 Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺等对酶有明显的抑制作用。该酶在叔丁基甲基醚溶剂中具有良好的耐受性, 在叔丁基甲基醚中保存 1 h 后仍保留 90% 以上的酶活。Thr206Ser 突变明显提高了酶对温度的稳定性。Lys207 对酶催化功能是必需的, 该位点突变对酶活都是致死的。【结论】克隆并表达 *P. putida* KT2440 的 LTA 酶, 研究了酶学性质, 通过定点改造提高了酶的温度稳定性, 筛选获得一种酶耐受性好的有机溶剂, 为 LTA 酶在有机溶剂中高效稳定催化 β-羟基-α-氨基酸奠定了较坚实的研究基础。

关键词: 恶臭假单胞菌, 低特异性 L-苏氨酸醛缩酶, 酶学性质, 致死突变, 温度稳定性

苏氨酸醛缩酶(TA)(EC 4.1.2.5)能够以磷酸吡哆醛(PLP)为辅因子, 催化甘氨酸与各种芳香族和脂肪族醛发生醛醇缩合反应, 产生含有两个手性

立体中心的 β-羟基-α-氨基酸^[1-3]。β-羟基-α-氨基酸是许多药物的有效成分的重要前体, 广泛应用于制药及精细化工行业, 具有非常高的应用价值^[4-6],

基金项目: 国家自然科学基金(31370100); 江苏省六大人才高峰高层次人才资助项目(2015-SWYY-010); 高等学校学科创新引智计划资助(111-2-06)

*通信作者。Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-12-05; 修回日期: 2019-03-15; 网络出版日期: 2019-04-04

如4-羟基-L-苏氨酸是依赖PLP酶抑制剂Rizobitoxine的前体而且参与维生素B₆的合成^[7], L-苏-3, 4-二羟基苯基丝氨酸是治疗帕金森病的重要药物^[8-9]。

苏氨酸醛缩酶广泛存在于植物、脊椎动物、几种细菌和真菌^[10]。基于其对苏氨酸的 α -碳原子的裂解反应的立体特异性, 可以分为两类: LTA和DTA^[11]。LTA作用于L-苏氨酸或L-别-苏氨酸。基于其对苏氨酸的 β -碳原子的立体特异性进一步分为3组: (a) L-allo-TA 特异于L-别-苏氨酸; (b) L-TA 仅作用于L-苏氨酸; (c) 低特异性LTA既可以作用于L-苏氨酸又可以作用于L-别-异苏氨酸^[12-13]。这3种L-苏氨酸醛缩酶具有高度相似的一级结构, 但在立体专一性上却存在明显的差异^[7]。

LTA 能够以甘氨酸和醛类为底物一步酶法合成 β -羟基- α -氨基酸^[14], 因而备受关注, 研究者试图拓展该酶在合成中的应用, 促进化学与酶工程的结合^[15]。Liu 等克隆了 *Escherichia coli* GS245

中的低特异性LTA基因, 并对酶的生化特征和生理作用进行了研究^[16]。鉴于低特异性LTA在合成 β -羟基- α -氨基酸上的重要性, 本研究从 *P. putida* KT2440 基因组中钓取了低特异性L-苏氨酸醛缩酶基因(*ltaE*), 于 *E. coli* BL21 (DE3)菌株中高效表达, 通过分子改造发现 Thr206Ser 突变明显提高了酶对温度的稳定性, Lys207 是酶活性的重要氨基酸。并成功筛选到一种酶耐受性较好的有机溶剂, 为低特异性苏氨酸醛缩酶酶的分子改造提供了典范, 特别是为后续的有机相催化合成手性氨基酸衍生物奠定了较坚实的研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 表1为本研究中使用的菌株和质粒。

表1. 菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids

| Strains and plasmids | Application | Source |
|--------------------------------------|--|------------|
| Strains | | |
| <i>E. coli</i> JM109 | Host for cloning target gene | This lab |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | Host for target gene expression | This lab |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-KT2440 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pET-KT2440 | This study |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-K207A | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pET-K207A | This study |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-K207R | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pET-K207R | This study |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-K207S | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pET-K207S | This study |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-K207T | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pET-K207T | This study |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-T206S | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pET-T206S | This study |
| Plasmids | | |
| pMD19-T | The plasmid for target gene cloning | This lab |
| pET-28a | The plasmid for target gene expression | This lab |
| pET-KT2440 | pET-28a containing KT2440 | This study |
| pET-K207A | pET-28a containing K207A | This study |
| pET-K207R | pET-28a containing K207R | This study |
| pET-K207S | pET-28a containing K207S | This study |
| pET-K207T | pET-28a containing K207T | This study |
| pET-T206S | pET-28a containing T206S | This study |

1.1.2 主要试剂和仪器: Primerstar、T4 DNA Ligase、限制性核酸内切酶、IPTG 均购于 TaKaRa 生物有限公司。质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购于 OMEGA BIO-TEK。DNA Marker 购于天根生化科技有限公司。引物由无锡天霖生物科技有限公司合成。乙醇脱氢酶购于 Sigma-Aldrich 公司, 辅酶 NADH 购于上海索来宝公司, 其余试剂均为国产分析纯。酶标仪购于美国 Thermo 公司; 超声破碎仪 VCX750 购于美国 Sonic 公司; AKTA 蛋白纯化仪和镍离子亲和层析柱购于美国 GE 公司。

1.2 重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-His-KT2440 的构建

采用 PCR 的方法, 利用表 2 中的引物 KT2440_F 和 KT2440_R, 以 *P. putida* KT2440 基因组为模板, 扩增出 *ltaE* 基因。将其连接到表达载体 pET-28a 上, 并转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 的感受态中, 经过酶切和 DNA 测序验证, 获得重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-His-KT2440。

1.3 菌体的培养及蛋白表达

将重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-His-KT2440 接种到含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 8 h 后, 转接到 1 L 相同培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 向培养基中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 14 h 后, 收集菌体。菌体超声破碎离心后的上清液用于 SDS-PAGE 分析, 检测目标蛋白

LTA 的表达。

1.4 蛋白纯化

称取 10 g 湿菌体 *E. coli* BL21/pET-KT2440, 重悬于 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 于冰浴中超声破碎细胞(工作 2 s, 间隔 3 s, 工作时间 20 min), 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 12000 \times g 离心 30 min, 收集上清液作为粗酶液。利用镍离子亲和层析柱纯化, 对低特异性 LTA 进行纯化^[17]。纯酶液超滤脱盐后用于酶活力测定。

1.5 酶活力的测定

采用 NADH 偶联测定法: 用酵母乙醇脱氢酶 (ADH) 测量苏氨酸醛缩酶活性^[18]。苏氨酸醛缩酶裂解苏氨酸产生甘氨酸和乙醛, 通过酵母乙醇脱氢酶的作用, 释放的乙醛被还原成乙醇, 同时将 NADH 氧化成 NAD^+ , 引起 340 nm 处吸光值的变化。LTA 酶活测定: 总反应体积 250 μL , 分别加入终浓度为 0.1 mol/L 的 HEPES-NaOH (pH 8.0)、0.5 mmol/L 的 NADH、50 mmol/L 的 L-苏氨酸、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 PLP 和 ADH (0.1 mg), 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 min, 加入适量纯酶液后开始扫描 340 nm 处吸光值的变化。以牛血清白蛋白 BSA 为标准品。酶活力定义为: 在上述条件下, 每分钟催化生成 1 μmol 的 NAD^+ 的酶量定义为一个酶活单位。酶活力和比活分别按照公式(1)和公式(2)计算。

$$\text{酶活(U)} = \text{EW} \times V \times 10^3 / (6220 \times 0.3) \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{比活(U/mg)} = \text{酶活(U)} / \text{蛋白量(mg)} \quad \text{公式(2)}$$

表 2. 构建表达体系所需的引物

Table 2. Primers used in construction of expression system

| Primers | Sequence (5'→3') |
|----------|---|
| KT2440_F | <u>ATCGGATCC</u> ATGACAGACAAGAGCCAACAATTCGC (<i>Bam</i> H I) |
| KT2440_R | ACTCTCGAGTCAGCCACCA <u>ATGATCGTGCGG</u> (<i>Xho</i> I) |

The restriction endonuclease sites are underlined.

其中,EW: 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化;
V: 反应液的体积(mL); 6220: 摩尔消光系数
[L/(mol×cm)]; 0.3: 光程距离(cm)。

1.6 酶的最适反应温度及温度稳定性

将除酶之外测定酶活的其他物质置于 20–60 °C (间隔 5 °C)下保温 3 min, 即刻加入纯酶, 1.5 条件下测定酶活, 以确定酶的最适反应温度。取等量酶液分别置于 20–60 °C (温度梯度 5 °C)条件下放置 1 h, 1.5 条件下测定其残余酶活力, 相同含量的酶液放置在 4 °C 条件下 1 h 作为空白对照, 以此测定酶热稳定性。

1.7 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

配置不同 pH 值(pH 4.0–9.0, 间隔 1.0)的缓冲液、底物 L-苏氨酸、辅酶 NADH 溶液、辅因子 PLP 溶液, 按照 1.5 中方法测定 LTA 在各个 pH 条件下的酶活力, 以确定酶的最适反应 pH。所需的 pH 缓冲液如下: 0.1 mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0–5.0); 0.1 mol/L 的磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(pH 5.0–7.0); 0.1 mol/L 的 HEPES-NaOH 缓冲液(pH 7.0–9.0)。取等量酶分别置于以上各 pH 值缓冲液中, 4 °C 冰箱静置 24 h, 按 1.5 条件测定残余酶活力, 以得到酶对不同 pH 的耐受性。

1.8 LTA 动力学参数的测定

用 0.1 mol/L 的 HEPES-NaOH 缓冲液(pH 8.0)配置不同浓度的 L-苏氨酸(0.1–100 mol/L), 将底物和辅酶在 50 °C 金属浴保温 2 min。根据 1.5 中酶活测定的反应体系, 测定在不同 L-苏氨酸浓度下的最初反应速率, 然后利用非线性模拟法计算出酶对 L-苏氨酸的 K_m 值、 k_{cat} 值及 k_{cat}/K_m 值。

1.9 LTA 对有机溶剂的耐受性

取电泳纯的 LTA 溶液按 1:1 的体积比分别加

入一系列有机溶剂(无水乙醇、叔丁基甲基醚、二甲基亚砷、四氢呋喃、乙腈), 在 30 °C、100 r/min 摇床中振荡 1 h, 按照 1.5 条件测定残余酶活力, 以考察酶对各种有机溶剂的耐受能力。在最适条件下检测酶活, 以添加等量 0.1 mol/L 的 HEPES-NaOH 缓冲液(pH 8.0)的酶活为 100% 计算酶活的变化。

1.10 二价金属离子对 LTA 的影响

按照 1.5 酶活测定体系, 以 0.1 mol/L 的 HEPES-NaOH 缓冲液配置不同金属离子母液, 按需添加至稀释后的酶液中, 考察了 1 mmol/L 金属离子(Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+})对 LTA 酶活的影响。在最适条件下检测酶活以未添加金属离子的酶活为 100% 计算酶活的变化。

1.11 LTA 关键氨基酸位点的突变

采用全质粒 PCR 来引入突变的方法, 利用表 3 中的引物 K207A_F 和 K207A_R、K207R_F 和 K207R_R、K207S_F 和 K207S_R、K207T_F 和 K207T_R、T206S_F 和 T206S_R, 以重组质粒为模板通过高保真酶 Primerstar 扩增质粒全长, *Dpn* I 酶消化 PCR 产物去除模板后转化 *E. coli* BL21 (DE3)感受态, 挑选重组子测序确定正确的突变菌株。突变菌株在 1.3 条件下诱导表达, 在 1.5 条件下测定酶活性。

1.12 圆二色谱测定突变酶的变性温度

使用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)将纯化的蛋白稀释至 0.1 mg/mL, 加入 1 mm 比色皿中, 以 1 °C/min 的速度将样品从 20 °C 加热至 80 °C, 监测波长 209 nm 下蛋白结构随温度的升高解螺旋情况, 确定蛋白质变性温度。变性温度(T_m)的定义为二级结构迅速展开时的最大斜率所对应的温度。

表 3. 构建突变酶基因的引物

Table 3. Primers used in construction of mutants

| Primers | Sequence (5'→3') |
|---------|--|
| K207A_F | ATGTGCTGTGCTTTGGCGGCACCC <u>GCGAAC</u> |
| K207A_R | GCTTCGCCCACCGCCATGCCGTT <u>CGCGGT</u> |
| K207R_F | GTGCTTTGGCGGCACCC <u>AGGAAC</u> |
| K207R_R | ACCGCCATGCCGTT <u>CCTTGGTG</u> |
| K207S_F | ATGTGCTGTGCTTTGGCGGCACCC <u>TCGAAC</u> |
| K207S_R | GCTTCGCCCACCGCCATGCCGTT <u>CGAGGT</u> |
| K207T_F | ATGTGCTGTGCTTTGGCGGCACCC <u>ACGAAC</u> |
| K207T_R | CGCCCACCGCCATGCCGTT <u>CGTGGT</u> |
| T206S_F | ATGTGCTGTGCTTTGGCGGC <u>TCCAAG</u> |
| T206S_R | CGCCCACCGC CATGCCGTT <u>TTGGAGCC</u> |

The mutant sites are underlined.

2 结果和分析

2.1 LTA 的蛋白表达、纯化及酶活测定

重组质粒 pET-KT2440 转入 *E. coli* BL21 (DE3), 经酶切和测序验证后, 获得重组菌 *E. coli* BL21/pET-His-KT2440。超声破碎离心后的上清即粗酶液经 SDS-PAGE 检测, LTA 在大肠杆菌中有明显的表达条带, 大小为 40 kDa 左右(图 1 中第 2 泳道), 与 LTA 理论大小符合, 表明 LTA 蛋白在大肠杆菌中可溶性表达。用 Ni^{2+} 柱亲和层析的方法对 N 端带有 6×Histine 标签的粗酶液进行纯化(图 1

中第 3 泳道), 并进行脱盐处理后, 分离纯化后的 LTA 比酶活为 5577.3 U/mg, 与同类酶相比较, 在酶活性方面具有较强的优势^[16]。

2.2 LTA 的最适反应温度和温度稳定性

LTA 酶的最适反应温度结果如图 2-A 所示, 在 50 °C 条件下酶活性最高。LTA 在低于 45 °C 下温浴 1 h 后, 残余酶活力仍能保持在 80% 以上; 在 50 °C 时, 温浴 1 h 后残余酶活力剩余 30% (图 2-B)。据报道, 来源于 *Aeromonas Jandaei* DK-39

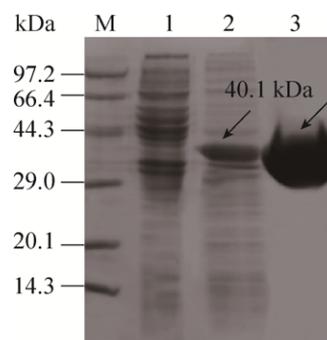


图 1. LTA 蛋白表达与纯化 SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE analysis of LTA expression and purification. M: Protein molecular weight markers; lane 1: The cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3)/pET-KT2440; lane 2: The cell-free extracts of *E. coli* BL21(DE3)/pET-KT2440 induced with 0.5 mmol/L IPTG; lane 3: The purified LTA.

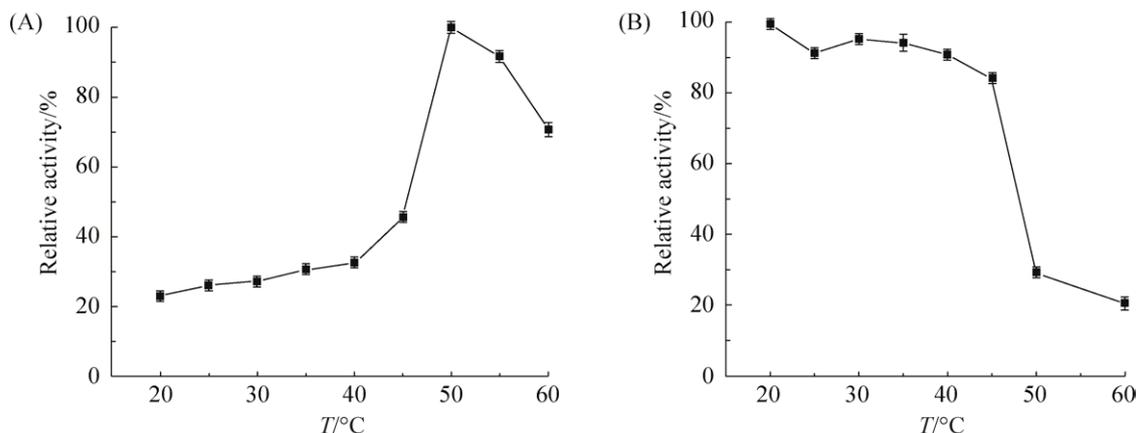


图 2. LTA 最适温度(A)及温度稳定性(B)

Figure 2. Effects of temperature on activity (A) and stability (B) of LTA. The data presented are the average values from triplicate measurements.

的 LTA 在 50 °C 下温浴 15 min 后残余酶活力剩余 15%，来源于 *Pseudomonas* sp. NCIMB10558 中 LTA 在 50 °C 下温浴 15 min 后残余酶活力剩余 10%^[7]。与同类酶相比较，该 LTA 酶具有较好的温度稳定性。

2.3 LTA 的最适反应 pH 和 pH 稳定性

pH 的改变能影响酶活性中心上必需基团的解离程度，同时也影响底物和辅因子的解离程度，从而影响酶分子与底物的结合和催化^[2]。LTA 酶的最适反应 pH 结果如图 3-A 所示，LTA 在碱性条件下酶催化活性更高，这是由于碱性条件下，底物提供质子给酶催化中心的能力更强^[12]。LTA 酶的 pH 稳定性结果如图 3-B 所示，LTA 置于 pH 4.0–9.0 缓冲液中，4 °C 低温下存放 24 h 后，在 pH 5.0 和 9.0 之间较稳定，但在 pH 6.0 下酶活性明显降低。进行等电点分析后，发现其 pI 为 5.88，在 pH 6.0 附近，猜测可能由于等电点的原因使得其 pH 稳定性降低。

2.4 LTA 动力学参数的测定

按照 1.8 中的方法，通过酶标仪测定 L-苏氨

酸的逆醛醇反应的酶活性。数据用 Origin 9.0 作图非线性拟合方程(图 4)，结果表明 LTA 裂解 L-苏氨酸的 K_m 值是 23.95 mmol/L, k_{cat} 值是 19216.6 s⁻¹, k_{cat}/K_m 值是 802.36 s⁻¹·mmol/L。

2.5 LTA 的有机溶剂耐受性

如图 5 所示，在不同有机溶剂中保存 1 h 后，LTA 在叔丁基甲基醚(TBME)中保留了 90% 的酶活性，在无水乙醇(EtOH)、二甲基亚砜(DMSO)、四氢呋喃(TF)、乙腈(CH₃CN)中剩余不到 20% 的酶的活性，这表明 LTA 在叔丁基甲基醚中耐受性较好。LTA 酶催化甘氨酸与各种芳香族和脂肪族醛发生醇醛缩合反应，但是底物醛在水溶液中溶解性低，严重影响了酶的催化效率；另外有机溶剂在一定程度上能改良或者提升酶的立体选择性^[10]。LTA 在 TBME 中良好的耐受性为后续建立水-有机溶剂两相体系生物催化手性氨基酸衍生物奠定了较好的前期基础。

2.6 二价金属离子对 LTA 的影响

如图 6 所示，Mg²⁺、Ca²⁺对 LTA 酶活有明显的促进作用，Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺对 LTA 有明

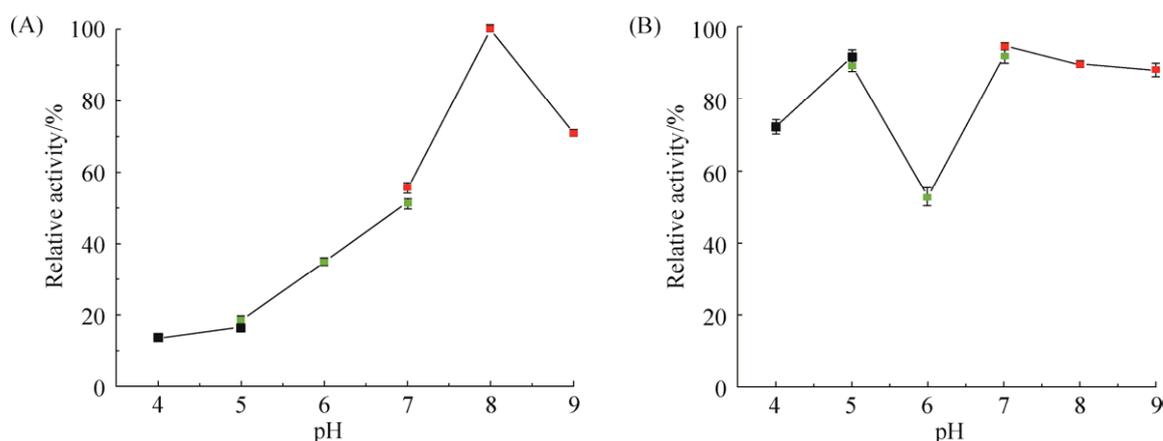


图 3. LTA 最适 pH (A)及 pH 稳定性(B)

Figure 3. Effects of pH on the activity and stability of LTA. The data presented are the average values from triplicate measurements.

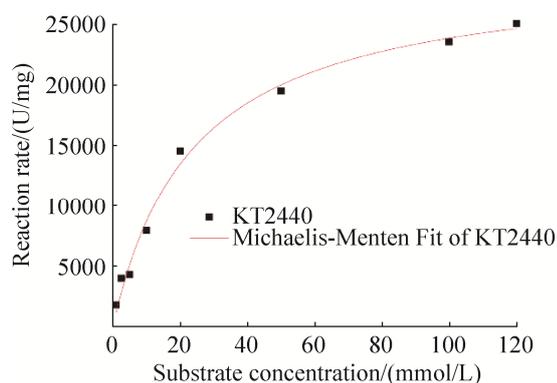


图 4. 非线性拟合 KT2440 的米氏方程

Figure 4. Nonlinear curve fit Michaelis-Menten Equation of KT2440.

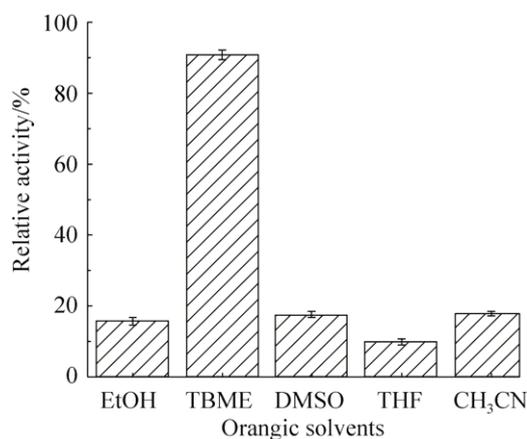


图 5. 有机溶剂对 LTA 的影响

Figure 5. Effects of organic solvents on the LTA activity. The data presented are the average values from triplicate measurements.

显的抑制作用, 而 Mn^{2+} 对酶活稍有促进作用, Co^{2+} 对酶活稍有抑制作用。研究表明来源于 *Arthrobacter* sp. DK-38 的 D 型苏氨酸醛缩酶需加入二价金属离子如 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 等作为激活剂以体现其最适酶活性^[19], 而本研究中的 LTA 不需要加入任何二价金属离子就能直接显示其酶活。二价金属离子的激活作用可能是其能促进与赖氨酸残基和底物 β -羟基- α -氨基酸形成醛亚胺有关^[7], 另外, 二价金属离子在酶的热稳定性中也可能起重要作用^[20]。

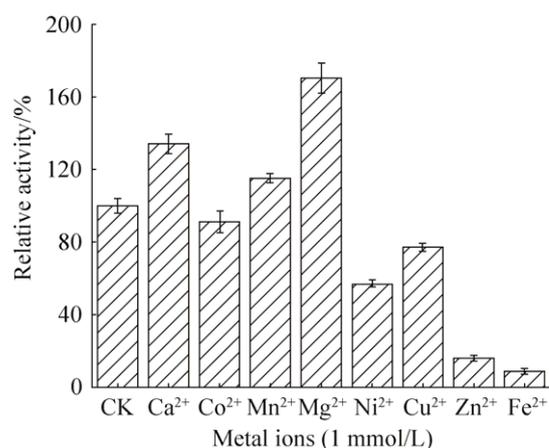


图 6. 金属离子对 LTA 的影响

Figure 6. Effects of metal ions on the LTA activity. The data presented are the average values from triplicate measurements.

2.7 Thr206 和 Lys207 定点突变

对不同来源的苏氨酸醛缩酶的氨基酸序列和二级结构进行比对分析(图 7), 发现 Thr206 在嗜热性菌存在, 很可能与酶的温度稳定性相关, 而 Lys207 位于保守区域, 并与催化中心相邻, 因而选择这两个位点进行突变。通过全质粒 PCR 引入突变 T206S、K207A、K207R、K207S 和 K207T, 这些突变不影响蛋白在大肠杆菌中的表达。酶活测定结果表明 Lys207 突变酶对 L-苏氨酸裂解活性丧失或者几近失活, 酶活仅为野生型的 0.3%–4.8% (表 4), 说明 Lys207 对酶活性有很大的影响。通过对与 LTA 相似性为 43.14% 的苯基丝氨酸醛缩酶的晶体结构(PDB ID:1V72)分析表明, Lys207 能够与磷酸吡哆醛(PLP)结合形成希夫碱(图 8), 其催化机制为辅因子 PLP 与赖氨酸的 ϵ -氨基形成内部醛亚胺, 在苏氨酸的进攻下, PLP 和苏氨酸的 α -氨基形成外部醛亚胺, 随后裂解产生乙醛和 PLP-甘氨酸醌类复合物, 甘氨酸的 α -碳原子质子化后, 释放出甘氨酸, 并且 PLP 与活性位点赖氨酸残基

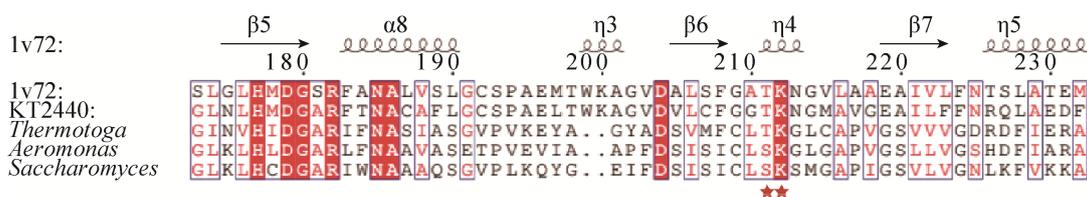


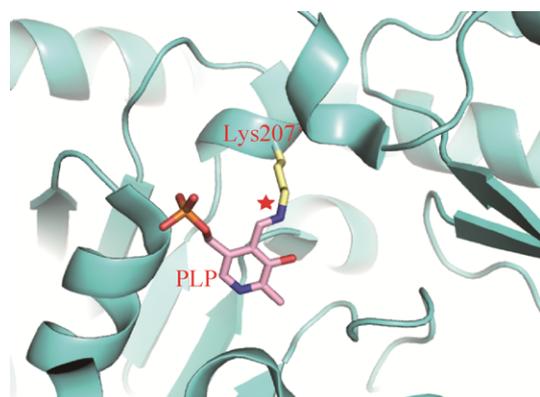
图 7. 不同来源的部分 LTA 氨基酸序列和结构比对

Figure 7. Sequence and structure alignment of LTA from different sources.

表 4. 突变酶的酶活测定

Table 4. Effects of site mutagenesis on activity of LTA

| LTA | Specific activity/(U/mg) | Relative activity/% |
|-----------|--------------------------|---------------------|
| Wild type | 5577.3 | 100 |
| K207A | 16.2 | 0.3 |
| K207R | 128.3 | 2.3 |
| K207S | 267.7 | 4.8 |
| K207T | 200.8 | 3.6 |
| T206S | 5532.7 | 99.2 |

图 8. K207 是 *P. putida* LTA 的催化活性位点Figure 8. K207 is an active site of *P. putida* LTA.

再生内部醛亚胺。赖氨酸突变成其他的氨基酸后导致不能与 PLP 结合,使得酶的催化效率大大降低甚至没有活性^[21]。而 T206S 对酶活大小几乎没有影响(表 4)。圆二色谱可以用于探究蛋白质的热变性曲线,随着温度的升高,蛋白质内部的 α -螺旋会逐渐解螺旋,根据蛋白质的解螺旋速度可以作出变性曲线,从而确定蛋白的变性温度,即 T_m

值,蛋白变性温度是蛋白质的二级结构解螺旋速率达到最大时所对应的温度,即变性曲线最大斜率处所对应的温度。通过计算曲线的最大斜率,KT2440 野生型的变性温度为 49.2 °C,而 T206S 突变酶的变性温度为 53.7 °C,相比于野生型 LTA 酶,变性温度提高了 4.5 °C,说明该位点与酶的温度稳定性密切相关(图 9)。

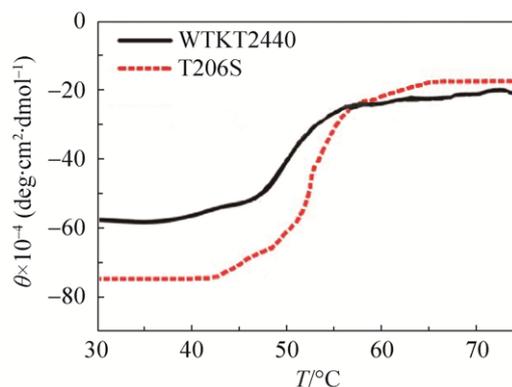


图 9. 圆二色谱分析 KT2440 和 T206S 的变性温度

Figure 9. Circular dichroism analysis of denaturation temperature for KT2440 and T206S.

3 讨论

苏氨酸醛缩酶以甘氨酸作为供体以醛类作为受体催化可逆的醛醇缩合反应。在高价值化学产品的工业生产中具有巨大潜力,它具有接受多种芳香族和脂肪族醛作为受体的能力,因此该酶已经广泛用于合成 β -羟基- α -氨基酸^[22]。此外,苏氨

酸醛缩酶以非磷酸化的化合物作为底物, 不同于其他醛缩酶需要制备繁琐的磷酸化的底物, 因此在缩短反应路线、避免保护步骤、减少化学废料和实现高效率转化方面有巨大优势, 被认为是合成化学中有潜力的催化剂^[23]。然而由于该酶对非天然底物的低活性、温度稳定性较差等因素, 在手性合成化学中受到了限制。同时由于大多数醛类底物在水相中溶解度较差, 因而有必要首先筛选到一种合适的有机溶剂, 提高酶在溶剂中的稳定性, 从而为实施有机相催化合成反应奠定前期基础。另外, 酶还没有进化到对底物有足够高的活性, 为了提高苏氨酸醛缩酶在合成化学中的应用, 有必要筛选优质的酶, 进一步改善酶的性质, 特别是提高酶的温度稳定性。

本研究钓取了 *P. putida* KT2440 的 *ltaE* 基因, 于 *E. coli* BL21(DE3) 菌株中进行高效表达与纯化。其他多种来源的醛缩酶需要加入二价金属离子如 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 等作为激活剂以体现其最适酶活性^[19], 而本研究中的 LTA 不需要加入任何二价金属离子就能具有较高的酶活。酶学性质研究表明该酶的最适反应温度为 50 °C, 最适 pH 值为 8.0。LTA 酶在 40–50 °C、pH 7.0–9.0 条件下, 同时在叔丁基甲基醚溶剂中能保持相对 90% 以上的酶活性。K207 位点是保持 LTA 催化活性的关键氨基酸, 该位点在不同来源的 LTA 结构域中极其保守, 其位点突变对酶活几乎都是致死的。T206 在不同来源的微生物中, 差异较大, 在不同来源的菌中, 该位点多为 Ser。因而尝试将该位点突变为 Ser, 突变酶 T206S 使得酶的变性温度提高了 4.5 °C, 表明 T206 与温度稳定性密切相关, 由于 T206 是重要氨基酸位点, 后续研究中需要进行饱和突变以研究其温度稳定性。本研究为重组 LTA 稳定催化合成手性氨基酸衍生物提供了理论依据。后续

的研究将进一步理性设计定点突变, 提高酶的温度稳定性和有机溶剂的耐受性, 构建水-有机相两相手性高效催化体系。

参 考 文 献

- [1] Fesko K. Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(6): 2579–2590.
- [2] Remesh SG, Ghatge MS, Ahmed MH, Musayev FN, Gandhi A, Chowdhury N, Di Salvo ML, Kellogg GE, Contestabile R, Schirch V, Safo MK. Molecular basis of *E. coli* L-threonine aldolase catalytic inactivation at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2015, 1854(4): 278–283.
- [3] Barnard-Britson S, Chi XL, Nonaka K, Spork AP, Tibrewal N, Goswami A, Pahari P, Ducho C, Rohr J, Van Lanen SG. Amalgamation of nucleosides and amino acids in antibiotic biosynthesis: discovery of an L-Threonine: Uridine-5'-aldehyde transaldolase. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(45): 18514–18517.
- [4] Beaudoin SF, Hanna MP, Ghiviriga I, Stewart JD. Progress in using threonine aldolases for preparative synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 119: 1–9.
- [5] Chen JF, Gong X, Li JY, Li YK, Ma JG, Hou CK, Zhao GQ, Yuan WC, Zhao BG. Carbonyl catalysis enables a biomimetic asymmetric mannich reaction. *Science*, 2018, 360(6396): 1438–1442.
- [6] Zheng Y, Deng L. Catalytic asymmetric direct aldol reaction of α -alkyl azlactones and aliphatic aldehydes. *Chemical Science*, 2015, 6(11): 6510–6514.
- [7] Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 10(1/3): 107–115.
- [8] Liu JQ, Odani M, Yasuoka T, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylooxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(1): 44–51.
- [9] Baik SH, Yoshioka H, Yukawa H, Harayama S. Synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) with

- thermostabilized low-specific L-threonine aldolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(5): 721–727.
- [10] Steinreiber J, Fesko K, Reisinger C, Schürmann M, Van Assema F, Wolberg M, Mink D, Griengl H. Threonine aldolases - an emerging tool for organic synthesis. *Tetrahedron*, 2007, 63(4): 918–926.
- [11] Fesko K, Strohmeier GA, Breinbauer R. Expanding the threonine aldolase toolbox for the asymmetric synthesis of tertiary α -amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9651–9661.
- [12] Fesko K, Suplatov D, Švedas V. Bioinformatic analysis of the fold type I PLP-dependent enzymes reveals determinants of reaction specificity in L-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei*. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(6): 1013–1028.
- [13] Di Salvo ML, Remesh SG, Vivoli M, Ghatge MS, Paiardini A, D'aguanno S, Safo MK, Contestabile R. On the catalytic mechanism and stereospecificity of *Escherichia coli* L-threonine aldolase. *The FEBS Journal*, 2014, 281(1): 129–145.
- [14] Blesl J, Trobe M, Anderl F, Breinbauer R, Strohmeier GA, Fesko K. Application of threonine aldolases for the asymmetric synthesis of α -quaternary α -amino acids. *ChemCatChem*, 2018, 10(16): 3453–3458.
- [15] Contestabile R, Paiardini A, Pascarella S, Di Salvo ML, D'aguanno S, Bossa F. L-Threonine aldolase, serine hydroxymethyltransferase and fungal alanine racemase - A subgroup of strictly related enzymes specialized for different functions. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(24): 6508–6525.
- [16] Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 255(1): 220–226.
- [17] Zhang RZ, Zhu GY, Zhang WC, Cao S, Ou XJ, Li XM, Bartlam M, Xu Y, Zhang XC, Rao ZH. Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Science*, 2008, 17(8): 1412–1423.
- [18] Qin HM, Imai FL, Miyakawa T, Kataoka M, Kitamura N, Urano N, Mori K, Kawabata H, Okai M, Ohtsuka J, Hou F, Nagata K, Shimizu S, Tanokura M. L-*allo*-Threonine aldolase with an H128Y/S292R mutation from *Aeromonas jandaei* DK-39 reveals the structural basis of changes in substrate stereoselectivity. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 2014, 70: 1695–1703.
- [19] Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. A novel metal-activated pyridoxal enzyme with a unique primary structure, low specificity D-threonine aldolase from *Arthrobacter* sp. strain DK-38 Molecular cloning and cofactor characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(27): 16678–16685.
- [20] Liu JQ, Ito S, Dairi T, Itoh N, Shimizu S, Yamada H. Low-specificity L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558: purification, characterization and its application to β -hydroxy- α -amino acid synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49(6): 702–708.
- [21] Xue YP, Cao CH, Zheng YG. Enzymatic asymmetric synthesis of chiral amino acids. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(4): 1516–1561.
- [22] Wieteska L, Ionov M, Szemraj J, Feller C, Kolinski A, Gront D. Improving thermal stability of thermophilic L-threonine aldolase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Biotechnology*, 2015, 199: 69–76.
- [23] Gupta P, Mahajan N. Biocatalytic approaches towards the stereoselective synthesis of vicinal amino alcohols. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42(15): 12296–12327.

Expression, characterization and thermostability improvement of low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas putida* KT2440

Lihong Li, Rongzhen Zhang^{*}, Lixian Zhou, Zhiyong Liu, Kaiang Xuan, Junchao Rao, Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biological, Ministry of Education, School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To construct a recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-KT2440, a low-specificity L-threonine aldolase gene (*ltaE*) was cloned from the genome of *Pseudomonas putida* KT2440. The enzyme characterization and the effects of key amino acid mutations on the enzyme activity and thermo-stability were investigated. [Methods] The *ltaE* gene was amplified by PCR with the genome of *P. putida* KT2440 as template. The recombinant plasmid pET28a-KT2440 was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The low-specificity L-threonine aldolase (LTA) was purified by Ni²⁺ affinity chromatography and then was characterized. The key amino acids Thr206 and lys207 were mutated by site-directed mutagenesis. [Results] SDS-PAGE analysis showed that LTA were highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) with a molecular weight of about 40 kDa, consistent with the theoretical value. A single band was observed through Ni²⁺ affinity chromatography. LTA had a specific activity of 5577 U/mg by two coupled-enzyme assay method. The optimal temperature and pH were 50 °C and 8.0, respectively, and was stable below 40 °C and pH between 5.0 and 9.0. LTA exhibited K_m and k_{cat} values of 23.95 mmol/L and 19216.6 s⁻¹ under the optimal conditions. Mg²⁺ and Ca²⁺ obviously stimulated enzyme activity, whereas Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Fe²⁺ obviously inhibited it. LTA enzyme presented good resistance in tert-butyl methyl ether. The residual activity was retained over 90% after pre-incubation of the enzyme in TBME for 1 h. Site-directed mutation indicated that Thr206Ser significantly increased the thermal stability. Lys207 is essential for enzymatic function. Any mutation of K207 was lethal for enzyme activity. [Conclusion] The thermostability was improved by site-directed mutation. The work provides a solid foundation for the efficient and stable biosynthesis of β -hydroxy- α -amino acids by LTA.

Keywords: *Pseudomonas putida*, low-specificity L-threonine aldolase, characterization, lethal mutation, thermal stability

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370100), by the Program for Advanced Talents Within Six Industries of Jiangsu Province (2015-SWYY-010) and by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 5 December 2018; Revised: 15 March 2019; Published online: 4 April 2019