

文章编号: 1673-1689(2010)04-0496-04

微生物酪氨酸解氨酶的研究进展

张峰^{1,2}, 曾化伟^{1,2}, 廖祥儒^{1,2}, 蔡宇杰^{1,2}, 童超^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 微生物转化生产次生代谢物质是重要的方式, 但已知的微生物中未发现次生代谢物质的前体物质肉桂酸 4 羟基化酶(C4H)和香豆酸, 这限制了微生物转化生产一些次生代谢产物。酪氨酸解氨酶(TAL)能跳过 C4H 将 L-酪氨酸(L-Tyr)转化为香豆酸, 为此对微生物来源的 TAL 的酶学性质、晶体结构、催化机制及 TAL 基因工程方面的研究进行了阐述, 发现了 TAL 研究中存在的问题并初步提出了解决思路。

关键词: 酪氨酸解氨酶; 基因工程; 次生代谢产物

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

A Review of Tyrosine Ammonia Lyase in Microorganism

ZHANG Feng^{1,2}, ZENG Hua-wei^{1,2}, LIAO Xiang-ru^{1,2}, CAI Yu-jie^{1,2}, TONG Chao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Production of secondary metabolites by microbial transformation is a very effective means. However, no C4H and coumaric acid are found in microorganism, this limited the large scale of production of secondary metabolites from phenylalanine metabolism pathway. L-tyrosine was catalysed to form p-coumaric acid by tyrosine ammonia lyase without C4H. Based on the advantage, zymologic feature crystal structure, catalytic mechanism and genetic engineering of TAL were reviewed in this manuscript.

Key words: tyrosine ammonia lyase, genetic engineering, secondary metabolites

次生代谢物质对医药、轻工、化工、农药等领域的发展具有不可替代的地位。其来源包括植物的次生代谢与化学合成。植物来源具有栽培周期长、产量不高、不可再生等缺点, 难以应用于工业化生产; 化学合成需要大量的能源, 成本高, 且造成环境污染。目前国内已报道了一些利用微生物转化生产用于医药、农药等的次生代谢物质如竹红菌素、

虾青素、白藜芦醇^[1-3]。微生物转化具有高效、高产、高强度、低成本, 且不受季节、气候、地域等自然条件的限制, 因此具有植物生产与化学合成不可比拟的优势, 极具开发潜力和应用价值。

在植物苯丙氨酸代谢途径中, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙氨酸代谢的第一步反应的酶与关键酶, PAL 通过非氧化脱氨将 L-苯丙氨酸(L-Phe)转

收稿日期: 2009-08-11

基金项目: 国家长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0532)。

作者简介: 张峰(1960-), 男, 浙江绍兴人, 高级工程师, 主要从事酶工程研究。Email: ZhangFeng9191@sina.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化为肉桂酸,再经肉桂酸-4-羟化酶(C4H)转化为香豆酸,再由4-香豆酰-CoA-联结酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)等催化形成黄酮类化合物,或者经芪合酶(STS)催化为白藜芦醇等芪合物(见图1)。

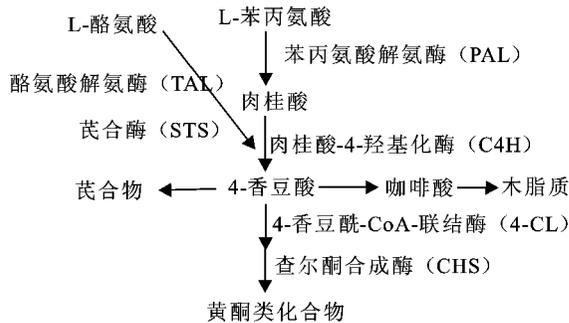


图1 植物苯丙氨酸代谢途径

Fig.1 Metaolic pathway of phenylalanine in plant

但目前已知的微生物中没有发现C4H和次生代谢物质的前体物质香豆酸^[4],限制了由苯丙氨酸代谢途径生物转化生成代谢物质。TAL能不经C4H进行非氧化脱氨,直接将L-酪氨酸(L-Tyr)转化为香豆酸,因此研究人员对TAL产生了极大的兴趣。目前发现的TAL同时也具有PAL活性,已知植物TAL对L-Tyr的亲合性都远低于L-Phe。近年来,在几种微生物中发现的TAL对L-Tyr有较高的亲合力,经海藻酸钙固定TAL基因重组的大肠杆菌,在125 L的生物反应器中以L-Tyr为底物进行转化,纯化到了12 kg的香豆酸^[5],这为该酶の利用于微生物转化提供例证。

1 酪氨酸解氨酶的生物资源

目前发现TAL存在于高粱、大麦、小麦、燕麦、水稻、玉米、甜甘蔗、欧芹等单子叶植物^[6-7]。早在1968年,Bandoni等^[8]报道了在担子菌中存在TAL的活性。近年来,报道了不同微生物来源的TAL的酶学性质。

2002年,Kyndt等^[9]首次在荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)分离到TAL基因,基因表达于重组大肠杆菌中。纯化的TAL与L-Tyr和L-Phe反应的最适pH值分别为8.5和9.4,与L-Tyr反应的转化量(K_{cat})、催化效率(K_{cat}/K_m)的值分别是L-Phe的2倍和150倍。

2006年,Kevin等^[10]克隆到来源于(*Rhodobacter sphaeroides*)的TAL基因,将该基因表达于大肠杆菌中,该酶与Kyndt等^[9]报道的*Rhodobacter capsulatus*TAL的氨基酸序列的同源性高达56%。经SDS-PAGE纯化后,该酶分子量为55 000,与L-Tyr反应的最适pH值为8.5~

9.0, K_{cat}/K_m 是其与L-Phe反应的273倍, K_{cat} 几乎相等。

2006年,Berner等^[11]克隆到放线菌(*Saccharothrix espanaensis*)的TAL基因,在大肠杆菌中表达并纯化。该酶以L-Tyr为底物,pH值低于8.5时反应速率下降,pH值8.5以上时仍具有较高的反应速率, K_m 接近于Kyndt等^[9]报道的*Rhodobacter capsulatus*TAL, K_{cat} 低于*Rhodobacter capsulatus*TAL。该酶以L-Tyr为底物的 K_{cat}/K_m 是与L-Phe为底物的750倍,这个值是目前已报道最高的。

2007年,Vannelli等^[12]从多种细菌和真核生物中分离出粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)的TAL,测定了该酶具有较高的胞内酶活力(0.0143 U/mg蛋白)和最低的PAL/TAL活性比系数(1.68)。克隆该基因并表达于大肠杆菌中,纯化该酶的相对分子质量为287 000。

2007年,Vannelli等^[13]测定9种真菌的以L-Tyr诱导的胞内TAL活性,其存在于丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)有最高的酶活性(0.179 U/mg蛋白),但具有最低的PAL/TAL活性比系数(0.8)。该酶纯化后研究表明,其相对分子质量为294 000的同源四聚体结构,亚基相对分子质量73 500,等电点为5.8,根据其N端和部分内部氨基酸序列,克隆了编码该酶的cDNA。cDNA序列分析表明,该序列于其他8种真菌的序列具有56%~62%的同源。

2007年,Xue等^[14]测定4种微生物的以L-Tyr诱导的胞内TAL活力,其中(*Phanerochaete chrysosporium*)具有较高的酶活力(1.25 U/g)。将TAL基因表达于大肠杆菌后用SDS-PAGE纯化,该酶相对分子质量为70 000,以L-Tyr为底物的 K_{cat}/K_m 略高于以L-Phe为底物的 K_{cat}/K_m ,PAL/TAL活性比系数为(0.7)。因该真菌能在较高温度下生长,据此推测该酶具有较好的热稳定性,研究表明在60℃高温下,3 h保持全酶的活力,4 h酶活力仍然可达72%。

2 酪氨酸解氨酶晶体结构研究

TAL与HAL、PAL都属于芳香族解氨酶家族。2006年,Louie等^[15]用x射线探测了*Rhodobacter sphaeroides*TAL(RsTAL)晶体的3级与4级结构,其与以前报道的恶臭假单胞菌HAL、欧芹和酵母PAL晶体结构类似。222对称

点形成了同源四聚寡体,同源四聚体包含4个活性位置。3个不同单体参与构成活性位置的空腔,每个单体主要被5个自上而下螺旋状束有机围绕。束的肽链N端区域带3,5-二氢-5-次甲基-4H-咪唑-4酮(MIO)辅酶,肽链另一端的C端部分构成了 α 螺旋外层,C端区域与中间的亚基相连并对同源四聚体起稳定作用和提供相连单体的活性空腔的外环。螺旋状束侧翼区连有凸出的发夹环,发夹环与第4和第5个螺旋束相连,侧翼区对单体与单体接口形成起作用。

RsTAL与恶臭假单胞菌HAL缺少嵌入到C端区域的附加区,欧芹和酵母PAL存在这个附加区,目前附加区的功能还不清楚。RsTAL与恶臭假单胞菌HAL、真核的欧芹和酵母PAL多肽链的主链残基分别有34%、29%、30%一致。RsTAL与恶臭假单胞菌HAL的结构较真核PAL有更高相似,这与主链残基表现一致。

3 酪氨酸解氨酶的反应机制

TAL与HAL、PAL都属于芳香族解氨酶家族,HAL和PAL的脱氨基催化反应有2种机制,一种被称为E1cB机制,底物的 α 氨基团与MIO的亚甲基碳直接发生亲核加成,另一种机制被称为Friedel-Crafts机制,富有电子的底物芳香环攻击引起了MIO的亚甲基碳电子的缺失^[16]。

2006年,Louie等^[15]用X射线没能观察到RsTAL晶体中的L-Tyr转换,通过对RsTAL与香豆酸、咖啡酸、肉桂酸形成的复合体结构进行研究得到了以L-Tyr为底物的交联模型。在MIO亚甲基键内,L-Tyr芳香碳环发生相当大平移,平移破坏 α 羧酸和羟基与TAL形成的相互作用,这是Friedel-Crafts机制。另一方面,虽然在模型中L-Tyr的 α 氨基远离MIO辅酶,但丙烯酸基适度的构象变化将决定 α 氨基攻击MIO亚甲基碳的位置。如果 α 氨基攻击MIO亚甲基碳,氧空腔的水介导质子化和新形成的Asn203侧链酰胺的相互作用可能稳定MIO羰基氧的负电荷。通过对TAL与AIP抑制剂形成的共价体进行观察,发现多肽链残基194到205的重排使Asn203明显接近MIO辅酶。但对突变体RsTALH89F与AIP抑制剂的共价体进行结晶学观察,不足以支持了 α 氨基的直接攻击MIO亚甲基碳。因此这个模型基本上支持了Friedel-Crafts机制,但对E1cB机制仍不能肯定。

4 酪氨酸解氨酶基因在次生代谢基因工程中的研究

目前已知的微生物中没有发现C4H和次生代谢的前体物质香豆酸^[1],这限制了微生物通过苯丙氨酸代谢途径产生次生代谢物质。为了开辟次生代谢产物崭新的来源,科研人员将TAL基因重组于微生物体内并成功获得了香豆酸、黄酮类、反式咖啡酸。

2007年,Vannelli等^[12]将来源于*Rhodotorula glutinis*PAL/TAL基因整合在缺少C4HP-450基因及P-450还原酶且能产L-Phe的大肠杆菌中,实现了由TAL途径将葡萄糖转化为香豆酸。2007年,Xue等^[10]将来源于*Rhodotorula glutinis*TAL基因在大肠杆菌中表达,TAL将L-Tyr转化为香豆酸,该酶催化效率很低,但没有发现催化效率更高的TAL。抗高温的酶能通过提高温度而具有更高催化效率,随后发现了具有抗高温的*Phanerochaete chrysosporium*TAL,实验证明随温度的升高能产更高的香豆酸。

2004年,Watts等^[17]将克隆于*Rhodobacter sphaeroides*PAL/TAL基因与4CL基因、CHS基因共同表达于大肠杆菌中,测得柚皮素的含量高达20.8mg/L。2005年,Jiang等^[18]首次将克隆于*Rhodospiridium toruloides*TAL基因与4CL、CHS基因共同表达于啤酒酵母中,测得柚皮素含量为7mg/L,生松素含量为0.8mg/L,另外还获得了根皮素、2',4',6'-三羟基二氢查耳酮。

2006年,Berner等^[11]将克隆于*Saccharothrix sp. anaensis*的TAL基因与EC、CoA基因在大肠杆菌中共同表达获得了反式咖啡酸。

5 问题与展望

虽然TAL酶存在于微生物中,TAL基因在微生物次生代谢基因工程研究中已经取得一定成果,但目前该酶应用于微生物转化仍纯在一些问题,如酶活性、催化效率还有待于提高。随着进一步对TAL微生物资源的挖掘,酶学性质、结构、催化机制的深入研究,经过酶的结构修饰(如KevinT等^[10]对RsTAL突变体的研究发现,TAL对L-Phe和L-Tyr为底物的选择,单一的取决于His89,PAL获得该残基位点后也具有TAL活性。)、基因重组、基因突变、酶的固定化、发酵工程的中游下游技术等的综合应用,TAL服务于微生物转化具有广阔的前景。

参考文献(References):

- [1] 梁晓辉, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 竹黄发酵菌丝与竹黄子座成分比较分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28: 705–708.
LIANG Xiaohui, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Analysis of the chemical compositions of *Shiraia* sp. SUPER-FH 168 fermented mycelia and the stromata of *Shiraia bambusicola*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28: 705–708–58. (in Chinese)
- [2] 胡建中, 巩继贤, 董庆霖, 等. 低氮促进红发夫酵母合成虾青素机理的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28: 91–96.
HU Jianzhong, GONG Jixian, DONG Qinglin, et al. The mechanism of low nitrogen promoting astaxanthin biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28: 91–96. (in Chinese)
- [3] 唐永红, 姚茂君, 曹庸, 等. 一株产白藜芦醇真菌的分离及培养[J]. 食品与发酵工业, 2009, 7, 33: 30–33.
TANG Yonghong, YAO Maojun, CAO Yong, et al. Study on the isolation and culture of a resveratrol producing fungus [J]. **Food and Fermentation industries**, 2007, 33: 30–33. (in Chinese)
- [4] Breinig S, Qi W, Sariaslani F, et al. DNA and amino acid sequences of a tyrosine-inducible tyrosine ammonia lyase from *Trichosporon cutaneum*[P]. 美国专利: P6951751, 2005.
- [5] Trotman R, Camp C, Ben-Bassat A, et al. Calcium alginate bead immobilization of cells containing tyrosine ammonia lyase activity for use in the production of *p*-hydroxycinnamic acid[J]. **Biotechnol Prog**, 2007, 23: 638–644.
- [6] Neish A. Formation of *m*- and *p*-coumaric acids by enzymatic desamination of the corresponding isomers of tyrosine[J]. **Phytochem**, 1961, 1: 1–24.
- [7] Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, et al. Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.)[J]. **Eur J Biochem**, 1994, 225: 491–499.
- [8] Bandoni R, Moore K, Subba Rao P, et al. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in some basidiomycetes [J]. **Phytochemistry**, 1968, 7: 205–207.
- [9] Kyndt J, Meyer T, Cusanovich M, et al. Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein[J]. **FEBS Lett**, 2002, 512: 240–244.
- [10] Watts K, Mijts B N, Lee P, et al. Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family[J]. **Chem Biol**, 2006, 13: 1317–1326.
- [11] Berner M, Krug D, Bihlmaier C, et al. Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*[J]. **J. Bacteriol**, 2006, 188: 2666–2673.
- [12] Vannelli T, Qi W, Sweigard J, et al. Production of *p*-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi[J]. **Metab Eng**, 2007, 9: 142–151.
- [13] Vannelli T, Xue Z, Breinig S, Qi W, et al. Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of *p*-hydroxycinnamic acid[J]. **Enzyme and Microbiol Technol**, 2007, 41: 413–422.
- [14] Xue Z, Michael M, Keith C, et al. Improved production of *p*-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme[J]. **Enzyme and Microbiol Technol**, 2007, 42: 58–64.
- [15] Louie G, Bowman M, Moffitt M, et al. Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine tyrosine ammonia-lyases[J]. **Chem Biol**, 2006, 13: 1327–1338.
- [16] Schroeder A, Kumaran S, Hicks L, et al. Contributions of conserved serine and tyrosine residues to catalysis, ligand binding, and cofactor processing in the active site of tyrosine ammonia lyase[J]. **Phytochem**, 2008, 69: 1496–1506.
- [17] Watts K, Lee P, Schmidt-Dannert C. Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. **Chembiochem**, 2004, 5: 500–507.
- [18] Jiang H, Wood K, Morgan J. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71: 2962–2969.

(责任编辑: 杨萌)