

# 色氨酸合成酶基因工程菌合成 S-甲基-L-半胱氨酸

徐礼生<sup>1,2</sup>, 高贵珍<sup>1</sup>, 曹稳根<sup>1</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 张兴桃<sup>1</sup>, 焦庆才<sup>2</sup>, 鲍妮娜<sup>1</sup>, 宋曼<sup>1</sup>

(1. 宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

**摘要:** 通过密码子优化设计构建色氨酸合成酶基因工程菌, 单因素以及响应面法研究色氨酸合成酶基因工程菌制备 S-甲基-L-半胱氨酸。结果表明, 温度 39 °C、pH 8.5、L-丝氨酸浓度 360 mmol/L, 反应平衡时间 20 h, S-甲基-L-半胱氨酸的质量浓度为 40.49 g/L。

**关键词:** 色氨酸合成酶; S-甲基-L-半胱氨酸; L-丝氨酸; 甲硫醇

**中图分类号:** Q 814.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)06—0655—06

## Enzymatic Synthesis of S-methyl-L-cysteine Catalyzed by Tryptophan Synthase Genetically Engineered Microorganism

XU Lisheng<sup>1,2</sup>, GAO Guizhen<sup>1</sup>, CAO Wengen<sup>1</sup>, ZHAO Liang<sup>1</sup>,  
ZHANG Xingtao<sup>1</sup>, JIAO Qingcai<sup>2</sup>, BAO Nina<sup>1</sup>, SONG Man<sup>1</sup>

(1. Department of Life and Food Science, Suzhou University, Suzhou 234000, China; 2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Tryptophan synthase genetically engineered microorganism was constructed by codon optimization in *Escherichia coli*. Preparation of S-methyl-L-cysteine from L-serine and methanliol catalyzed by tryptophan synthase genetically engineered microorganism was investigated by response surface methodology and single-factor experiments. The optimal temperature and pH value were 39 °C and 8.5 respectively. The optimal substrate concentration of L-serine was 360 mmol/L. Under the optimal conditions of tryptophan synthase genetically engineered microorganism, the content of S-methyl-L-cysteine was 40.49 g/L after 20 h.

**Keywords:** tryptophan synthase, S-methyl-L-cysteine, L-serine, methanliol

氨基酸是生物体生命不可或缺的重要组成部分, L-半胱氨酸衍生物 S-甲基-L-半胱氨酸是一种非蛋白质氨基酸, 它在生物成分分析中具有一定作用<sup>[1]</sup>, S-甲基-L-半胱氨酸能够有效预防神经退化性

疾病帕金森综合症<sup>[2]</sup>, 是一种重要药物中间体, 可用于肽氧化<sup>[3-4]</sup>。

化学合成法通过 L-半胱氨酸添加甲基化试剂磷酸三甲酯、二甲基碳酸酯进行制备<sup>[5-7]</sup>, 化学合成

收稿日期: 2015-09-15

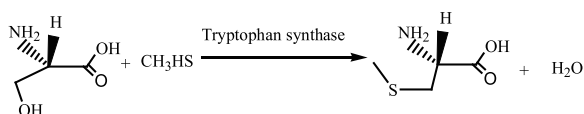
基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2017A440); 安徽省质量工程项目(2015zjjh034、2015ckjh108、2016jyxm1038); 宿州学院学术带头人项目(2018XJXS02)、宿州市科技计划项目(SZ2017GG18)。

作者简介: 徐礼生(1980—), 男, 安徽安庆人, 理学博士, 副教授, 主要从事微生物与生化学方面研究。E-mail: xulisheng111@163.com

引用本文: 徐礼生, 高贵珍, 曹稳根, 等. 色氨酸合成酶基因工程菌合成 S-甲基-L-半胱氨酸[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 655-660.

法存在污染严重、反应收率低等缺点。生物酶合成法用于有机化合物制备<sup>[8-15]</sup>,通过定点突变等方式基因改造提高酶活性<sup>[16-20]</sup>,微生物代谢工程改造提高酶活性<sup>[21-24]</sup>。

作者通过 L-丝氨酸与甲硫醇制备 S-甲基-L-半胱氨酸(见下式)。优化色氨酸合成酶基因工程菌酶法制备 S-甲基-L-半胱氨酸反应条件,为生物法合成 S-甲基-L-半胱氨酸提供了一种新思路。



## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与仪器

蛋白胨、吐温 80、甲硫醇和酵母提取物:上海国药化学试剂公司产品;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(纯度大于 98%),角蛋白水解氨基酸液:淮北市新旗氨基酸有限公司产品;色氨酸合成酶基因:上海生工生物工程股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

LB 液体培养基(g/L):酵母提取物 5,氯化钠 5,蛋白胨 10;调节 pH 7.0。

LC-20AT 岛津高效液相色谱仪:日本岛津公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 构建** 优化大肠杆菌来源色氨酸合成酶基因<sup>[25]</sup>,色氨酸合成酶菌按文献<sup>[26]</sup>进行构建。

**1.2.2 发酵** 菌种来源于作者所在实验室<sup>[27]</sup>,菌种先进行活化,种子液体积分数为 2.5%(以 LB 培养基体积为基准)加入 250 mL 的摇瓶进行发酵,37 ℃、摇床 170 r/min、DM206 种子液发酵 4 h,加入 0.4 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷,28 ℃发酵 12 h,发酵后离心,无菌超纯水对基因工程菌菌体进行洗涤,冰箱保存备用(4 ℃)。

**1.2.3 反应** L-丝氨酸反应底物浓度 1.0 mol/L,底物甲硫醇浓度 1.2 mol/L,调节 pH 至 8.0,温度 37 ℃,加入离心所得湿菌体 0.05 g,吐温 80 质量浓度 0.2 g/mL,摇床恒温条件下振荡频率设为 180 r/min,S-甲基-L-半胱氨酸质量浓度通过 HPLC 测定。

S-甲基-L-半胱氨酸产率 =

$$\frac{\text{S-甲基-L-半胱氨酸实际生成浓度}}{\text{S-甲基-L-半胱氨酸理论生成浓度}} \times 100\%$$

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 蛋白质表达

克隆的 *trpBA* 基因片段全长为 2 000 bp,见图 1。蛋白质相对分子质量为 45 000 和 30 000,见图 2。色氨酸合成酶具有 ααββ 亚基结构异质四聚体,其 α、β 亚基分别由 *trpA* 和 *trpB* 基因编码,图 2 工程菌蛋白 SDS-PAGE 分析结果表明,蛋白质表达与色氨酸合成酶蛋白一致。

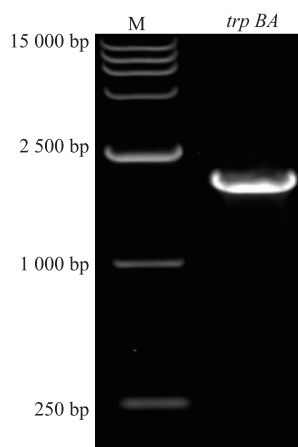


图 1 工程菌质粒双酶切产物琼脂凝胶电泳

Fig. 1 Engineered microorganism plasmid agarose gel electrophoresis

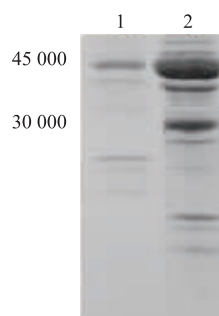


图 2 工程菌蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Engineered microorganism protein SDS-PAGE analysis

### 2.2 pH 对色氨酸合成酶基因工程菌反应的影响

pH 通过改变酶空间构象、氨基酸残基微环境而影响酶活性,pH 影响酶与底物之间的结合状态使酶活性发生改变,基因工程菌色氨酸合成酶的活性中心相关基团解离形态随着 pH 的变化而变化,从而影响酶与底物 L-色氨酸以及甲硫醇的结合,合

成S-甲基-L-半胱氨酸需要在合适的pH反应介质中进行。改变反应体系pH,测得L-丝氨酸转化率与pH关系,见图3。当反应液pH为8时,底物甲硫醇、L-丝氨酸与色氨酸合成酶结合位点比较合适。

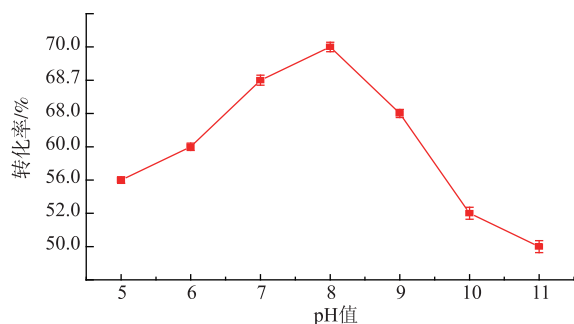


图3 pH对色氨酸合成酶基因工程菌反应转化率的影响  
Fig. 3 Effects of pH on conversion rate of tryptophan synthase genetically engineered microorganism

### 2.3 温度对色氨酸合成酶基因工程菌反应的影响

反应温度对酶的热稳定性及其转化率有一定的影响。研究了反应温度对色氨酸合成酶基因工程菌转化率的影响,见图4。可以看出,在一定范围内随着温度升高(25~37℃),转化率逐渐提高;在37~55℃时,色氨酸合成酶转化率逐渐减小。

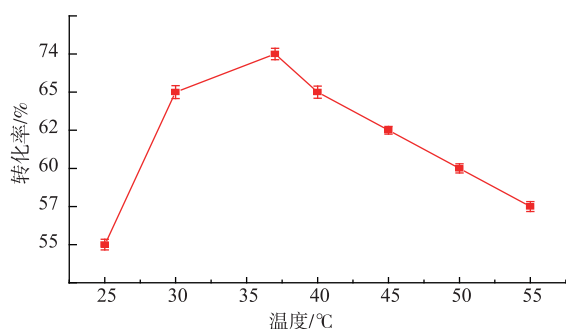


图4 温度对反应转化率影响  
Fig. 4 Effects of temperature on conversion rate of tryptophan synthase genetically engineered microorganism

### 2.4 底物浓度对色氨酸合成酶基因工程菌反应的影响

底物浓度会影响色氨酸合成酶基因工程菌酶促反应结果,当底物L-丝氨酸浓度处在低水平时,色氨酸合成酶基因工程菌酶活随着底物浓度增加而提高;而底物L-丝氨酸浓度过高时,对色氨酸合成酶会发生底物抑制作用,结果见图5。L-丝氨酸最适合浓度为300 mmol/L。

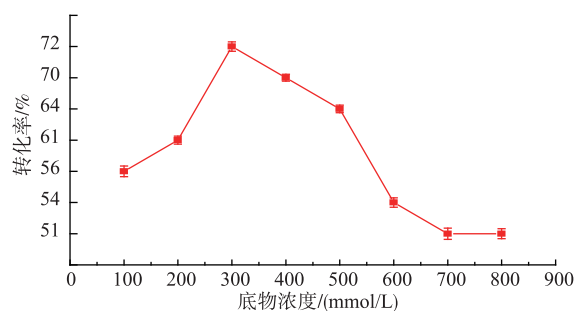


图5 底物浓度对色氨酸合成酶基因工程菌反应转化率的影响  
Fig. 5 Effect of substrate concentration on conversion rate of tryptophan synthase genetically engineered microorganism

### 2.5 底物摩尔比影响

研究了底物摩尔比对色氨酸合成酶基因工程菌酶促反应的影响,见图6。可以看出,甲硫醇/L-丝氨酸摩尔比为1:1时酶活恒定,最佳甲硫醇/L-丝氨酸摩尔比为1:1。

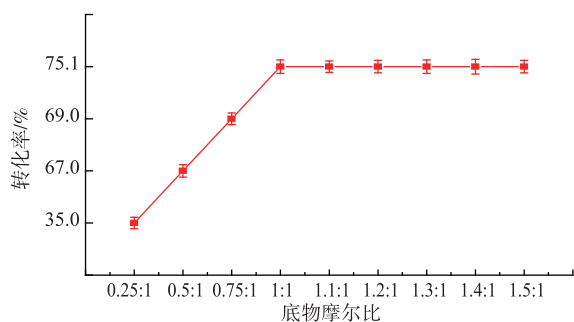


图6 底物摩尔比对色氨酸合成酶基因工程菌反应转化率的影响  
Fig. 6 Effect of the substrates molar ratio on conversion rate of tryptophan synthase genetically engineered microorganism

### 2.6 响应面法优化S-甲基-L-半胱氨酸制备

S-甲基-L-半胱氨酸合成过程中,反应温度、pH和底物浓度的影响较大,采用中心组合设计方法,以反应pH(A)、温度(B)和底物浓度(C)为自变量,S-甲基-L-半胱氨酸转化率( $R_1$ )为响应值设计实验,见表1-2。

利用Design expert 8.05b软件对重组色氨酸合成酶基因工程菌酶促反应实验结果进行方差分析,结果见表3( $P$ 值 $<0.05$ ,显著)。由表3可以看出,S-甲基-L-半胱氨酸反应中的 $AB$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 为显著影响因素。图7-9为各因素间响应曲面图。利用Design expert 8.05b软件预测,反应温度、pH和L-丝氨酸

底物浓度分别为 39 °C、8.5 和 360 mmol/L 时 S-甲基-L-半胱氨酸转化率为 82.4%。按照预测结果进行验证, 重复 4 次实验平均转化率为 83.2%。S-甲基-L-半胱氨酸制备过程中会产生少量副产物, 经过检测主要是 L-丝氨酸在基因工程菌整细胞催化反应条件下产生少量的丙酮酸。

表 1 中心组合实验因素水平编码

Table 1 Factor levels coding of center combination experiment

	水平编码			
	-1	+1	-a	+a
A pH	6	11	5.92	11.56
B 温度/°C	25	55	24.45	55.09
C 底物浓度/(mmol/L)	200	600	200.35	600.44

表 2 手性药物 S-甲基-L-半胱氨酸合成条件设计及结果

Table 2 Box-Behnken RSM design and results of S-methyl-L-cysteine

实验序号	A	B	C	S-甲基-L-半胱氨酸/%
1	6.00	25.00	600	35
2	11.00	25.00	600	25
3	11.00	25.00	200	35
4	6.00	25.00	200	40
5	8.50	65.23	400	38
6	6.00	55.00	200	28
7	4.30	40.00	400	30
8	11.00	55.00	200	35
9	8.50	14.77	400	41
10	6.00	55.00	600	21
11	12.70	40.00	400	30
12	8.50	40.00	736.36	66
13	11.00	55.00	600.00	55
14	8.50	40.00	63.64	81
15	8.50	40.00	400	88

表 3 中心组合实验结果方差分析表

Table 3 Variance analysis of L-5-hydroxytryptophan Box-Behnken RSM design

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 >F	
模型	10 302.98	9	1 144.78	10.90	0.000 4	显著
A	49.50	1	49.50	0.47	0.507 9	显著
B	0.080	1	0.080	0.0007	0.978 5	
C	54.28	1	54.28	0.52	0.488 6	

续表 3

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 >F	
AB	392.00	1	392.00	3.73	0.032 1	显著
AC	60.50	1	60.50	0.58	0.465 3	
BC	98.00	1	98.00	0.93	0.356 8	
A <sup>2</sup>	6 186.87	1	6 186.87	58.92	0.000 1	显著
B <sup>2</sup>	4 343.61	1	4 343.61	41.37	0.000 1	显著
C <sup>2</sup>	410.97	1	410.97	3.91	0.076 1	
残差	1 049.97	10	105.00			
失拟	639.14	5	127.83			
纯误差	410.83	5	82.17			
总变异	11 352.95	19				

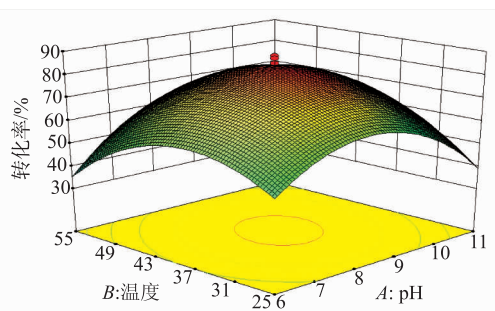


图 7 反应温度与 pH 交互作用对 S-甲基-L-半胱氨酸转化率的响应面(L-丝氨酸底物浓度为 360 mmol/L)

Fig. 7 Response surface plot of S-methyl-L-cysteine bioconversion rate interaction between pH and temperature (substrate concentration of L-serine was 360 mmol/L)

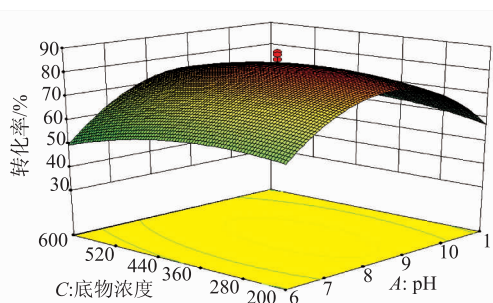


图 8 底物浓度与 pH 交互作用对 S-甲基-L-半胱氨酸转化率的响应面(39 °C)

Fig. 8 Response surface plot of S-methyl-L-cysteine bioconversion rate interaction between substrate concentration and pH(39 °C)

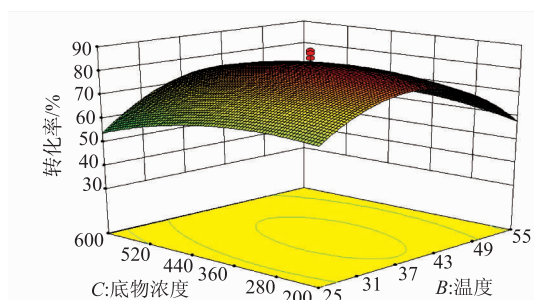


图9 反应温度与底物浓度交互作用对S-甲基-L-半胱氨酸转化率的响应面(pH 8.5)

Fig. 9 Response surface plot of S-methyl-L-cysteine bioconversion rate interaction between substrate concentration and temperature (pH 8.5)

### 2.7 制备

0.18 mol L-丝氨酸和 0.18 mol 甲硫醇 (pH 8.5), 反应体系 500 mL, 4 g 菌体, 39 °C 反应 20 h。L-丝氨酸的转化率达到 83.2%, S-甲基-L-半胱氨酸的质量浓度为 40.49 g/L。结束反应, 离心去除菌体, 精制烘干得 S-甲基-L-半胱氨酸 15.6 g, 纯度为 99%, 收率为 77.2%。熔点 240 °C (decomp),  $[\alpha]_D^{20} = -27.5 \sim -33.5^\circ (c=2, H_2O)$ 。南京大学化学分析测试中心利用红外光谱仪检测了本试验制备样品, 产品的红外光谱图与标准品 S-甲基-L-半胱氨酸的谱图相同。由图 10 可知, 制备样品图谱中 3 000  $cm^{-1}$  的

吸收峰明显变宽, 说明在半胱氨酸的分子上加上了甲基基团, 2 500~3 200  $cm^{-1}$  处宽而强的吸收峰, 表明甲基与巯基反应生成 S-甲基, 该化合物为 S-甲基-L-半胱氨酸。

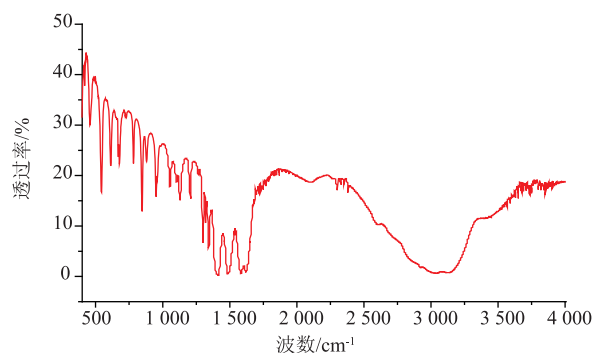


图 10 产品的红外图谱

Fig. 10 Infrared spectrum of the product

## 3 结语

以甲硫醇和 L-丝氨酸为底物, 利用色氨酸合成酶基因工程菌催化合成 S-甲基-L-半胱氨酸, 最佳反应条件如下: 反应温度 39 °C, pH 8.5, 角蛋白氨基酸水解液中 L-丝氨酸浓度 360 mmol/L, 反应平衡时间 20 h, S-甲基-L-半胱氨酸的质量浓度为 40.49 g/L。

## 参考文献:

- [1] CHIN H W, LINDSAY R C. Mechanisms of formation of volatile sulfur compound following the action of cysteine sulfoxide lyases[J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(7): 1529-1536.
- [2] WASSEF R, HAENOLD R, HANSEL A, et al. Methionine sulfoxide reductase A and a dietary supplement S-methyl-L-cysteine prevent Parkinson's-like symptoms[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2007, 27(47): 12808-12816.
- [3] MIMOTO T, KISANUKI S, TAKAHASHI O, et al. Process for producing peptide derivatives and salts thereof[P]. US Patent: 5644028, 1997-01-01.
- [4] JONAS F, RONNY L. Use of thioethers as antioxidant for peptides and proteins and compositions containing the thioethers[P]. WO Patent: 9714430, 1997-01-01.
- [5] CALLEMAN C J, EHRENBERG L, OSTERMAN G S, et al. Formation of s-alkylcysteines as artifacts in acid protein hydrolysis, in the absence and in the present of 2-mercaptoethanol[J]. *Acta Chem*, 1979, B33(7): 488-494.
- [6] ALLEGRININ P, BARRECA G, ROSSI E. Process for the preparation of S-alkylcysteines[P]. US Patent: 6147257, 2000-11-14.
- [7] MA Chengjun, YAO Fei, ZHANG Guanyong. Synthesis of S-methyl-L-cysteine[J]. *Chemical World*, 2003, 7(1): 370-372. (in Chinese)
- [8] GAO Hongxia, FENG Biao, ZHANG Xiaoming, et al. Study on the preparation of lauroyl glucose esters[J]. *Journal of Food Science And Biotechnology*, 2009, 28(1): 33-37. (in Chinese)
- [9] KAREL H, IGOR Z, GIOVANNA P, et al. Engineered L-serine hydroxymethyltransferase from *Streptococcus thermophilus* for the synthesis of  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dialkyl- $\alpha$ -amino acids[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 3013-3017.

- [10] WILLEM P D, DAPHNE E G, MARCO W F. Enzyme-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2,5-dicarboxylic acid[J]. **Angew Chem Int Ed**, 2014, 53:6515-6518.
- [11] MARK D C, ARTHUR J R. Laccase-catalyzed synthesis of 2,3-ethylenedithio-1,4-quinones[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2015, 119:85-89.
- [12] ANDRE J, DORTE R. A two-step biocatalytic cascade in micro-aqueous medium; using whole cells to obtain high concentrations of a vicinal diol[J]. **Green Chem**, 2014, 16:3472-3482.
- [13] ZHOU G X, CHEN G Y, YAN B B. Two-step biocatalytic process using lipase and whole cell catalysts for biodiesel production from unrefined jatropha oil[J]. **Biotechnol Lett**, 2015, 37:1959-1963.
- [14] WILLEM P D, CLAUDIA B, MARCO W F. Structure-based enzyme tailoring of 5-hydroxymethylfurfural oxidase[J]. **ACS Catal**, 2015, 5:1833-1839.
- [15] SUN Ping, YANG Huijuan, WANG Yaqi, et al. Lipase-catalyzed synthesis and emulsification of dextrin ester[J]. **Journal of Food Science And Biotechnology**, 2013, 32(1):9-14. (in Chinese)
- [16] JAMES T P, CATHERINE B P, JARED C L. Directed evolution of rebh for site-selective halogenation of large biologically active molecules[J]. **Angew Chem Int Ed**, 2015, 54:4226-4230.
- [17] KAREL H, IGOR Z, GIOVANNA P. Engineered L-serine hydroxymethyltransferase from streptococcus thermophilus for the synthesis of  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dialkyl- $\alpha$ -amino acids[J]. **Angew Chem Int Ed**, 2015, 54:3013-3017.
- [18] MARIA E S L, FAHMI H. Quantum chemistry as a tool in asymmetric biocatalysis: limonene epoxide hydrolase test case[J]. **Angew Chem Int Ed**, 2013, 52:4563-4567.
- [19] FABIO P, SARAH L L, NICHOLAS J W, et al. Synthesis of d- and l-phenylalanine derivatives by phenylalanine ammonia lyases: a multienzymatic cascade process[J]. **Angew Chem Int Ed**, 2015, 54:4608-4611.
- [20] YLVA W, MARIA S H, JAN E B. Combinatorial library based engineering of candida antarctica lipase a for enantioselective transacylation of sec-alcohols in organic solvent[J]. **Angew Chem Int Ed**, 2015, 54:4284-4288.
- [21] QIN J F, ZHOU Y J, in Anastasia Krivoruchko. et al. Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables high-level production of L-ornithine[J]. **Nat Commun**, 2015, 6:8224-8235.
- [22] BECKER J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production - the heartbeat of industrial strain development[J]. **Curr Opin Biotechnol**, 2012, 23:718-726.
- [23] QIAN Z G, XIA X X, LEE S Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2009, 104:651-662.
- [24] AVALOS J L, FINK G R, STEPHANOPOULOS G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols[J]. **Nat Biotechnol**, 2013, 31:335-341.
- [25] BORNSCHEUER U T, POHL M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design[J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2001, 5(2):137-143.
- [26] SAMBROOK J, LASELL D W. Molecular Cloning[M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [27] XU L S, WANG Z Y, LIU J Z, et al. Effects of polyhydroxy compounds on enzymatic synthesis of L-tryptophan catalyzed by tryptophan synthase[J]. **Catalysis Letters**, 2012, 142(2):282-286.