

重组大肠杆菌全细胞催化合成 4-羟基异亮氨酸

Umutumwa Eric Principe¹, 乔邳钠¹, 龙梦飞¹, 邵明龙¹,

徐美娟^{1,2}, 杨套伟¹, 张显¹, 饶志明^{*1}

(1. 江南大学 生物工程学院/工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学(如皋)食品生物技术研究, 江苏 南通 226500)

摘要: 4-羟基异亮氨酸(4-HIL)是一种很有前景的药物,它具有促进胰岛素分泌、改善外周组织对胰岛素的抵抗性和调节血脂异常等作用,而 L-异亮氨酸羟化酶(IDO)常用于 4-HIL 的生产。首先,克隆了苏云金芽孢杆菌来源的 L-异亮氨酸羟化酶,实现了其在 *E. coli* BL21(DE3)中的异源表达。其次,通过同源建模和蛋白质结构分析,本着将与底物氨基酸侧链结合的氨基酸残基从亲水性或长链疏水性结构突变成丙氨酸 Ala 的原则,对 I156 位点进行了定点突变,以增大底物结合口袋,扩宽底物通道进而提高 4-HIL 的产量。最后,对野生酶及突变酶的酶学性质、突变酶的羟基化反应体系进行研究,在最优催化条件下,分批补料转化底物进行 4-HIL 的生产。酶学性质结果显示,野生酶及突变酶 I156A 的最适温度均为 25 °C,最适 pH 均为 7.0;突变酶 I156A 比酶活比野生酶提高了 1.9 倍,L-Ile 转化率提高了 28%。羟基化反应体系的最优转化条件为: 20 mmol/L L-Ile, 20 mmol/L α -酮戊二酸, 8 mmol/L Fe^{2+} , 30 mmol/L 抗坏血酸和 HEPES (50 mmol/L, pH 7.0)缓冲液。在最优转化条件下,重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-ido^{I156A} 进行分批补料转化底物,时间间隔为 4 h, 32 h 后得到 77.3 mmol/L 4-HIL,底物最高转化率 98.35%。

关键词: L-异亮氨酸; L-异亮氨酸羟化酶; 4-羟基异亮氨酸; 定点突变; 酶学性质; 催化体系

中图分类号: Q 819 文章编号: 1673-1689(2021)04-0026-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.004

Whole-Cell Catalytic Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine Using Recombinant *Escherichia coli*

Umutumwa Eric Principe¹, QIAO Zhina¹, LONG Mengfei¹, SHAO Minglong¹, XU Meijuan^{1,2},
YANG Taowei¹, ZHANG Xian¹, RAO Zhiming^{*1}

(1. School of Biotechnology / Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangnan University (Rugao) Food Biotechnology Research Institute, Nantong 226500, China)

Abstract: 4-Hydroxyisoleucine (4-HIL) is a promising drug that promotes insulin secretion, improves peripheral tissue resistance to insulin, and regulates dyslipidemia. L-isoleucine hydroxylase (IDO) is commonly used in the production of 4-HIL. First, the L-isoleucine hydroxylase derived from

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770058, 31870066); 教育部重点研究项目(113033A); 江苏省自然科学基金项目(BK20181205); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-06)。

* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事应用微生物与代谢工程研究。E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Bacillus thuringiensis was cloned, and successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Secondly, the site-directed mutation of I156 locus was achieved through homology modeling and protein structure analysis based on the principle of changing the amino acid residue bound to the substrate side chain from the hydrophilic or long-chain hydrophobic structure to Ala. The mutation aimed at increasing the substrate binding pocket and widening the substrate channel to increase the yield of 4-HIL. Finally, the biochemical properties of wild-type and mutated enzymes were studied. The hydroxylation reaction system of mutated enzyme was studied. Under the optimal catalytic conditions, the substrate was fed in batches to produce 4-HIL. The results of enzymatic properties showed that the optimum temperature and pH of wild-type enzyme and mutated enzyme I156A were 25 °C and pH 7.0, and the I156A mutated enzyme activity was 1.9 times higher than that of the wild-type enzyme with 28% increased L-Ile conversion rate. The optimal conversion conditions for the hydroxylation reaction system were: 20 mmol/L L-Ile, 20 mmol/L α -ketoglutarate, 8 mmol/L Fe^{2+} , 30 mmol/L ascorbic acid, and HEPES (50 mmol/L, pH 7.0) buffer. Under the optimal transformation conditions, the recombinant *E. coli* BL21/pET28a-*ido*^{I156A} was fed in batches for a time interval of 4 h. After 32 h, 77.3 mmol/L 4-HIL was obtained, and the highest conversion rate of substrate was 98.35%.

Keywords: L-isoleucine, L-isoleucine hydroxylase, 4-hydroxyisoleucine, site-directed mutation, enzymatic properties, catalytic system

4-羟基异亮氨酸(4-HIL)是一种很有前景的药物,它具有促进胰岛素分泌、改善外周组织对胰岛素的抵抗性和调节血脂异常等作用^[1-9]。因此,目前针对 4-HIL 的研究也越来越多。

酶催化法进行(2S,3R,4S)-4-HIL 的合成是比较理想的方法^[10]。Kodera 等于 2009 年首次在苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)中发现了一种酶IDO,这种酶能特异地催化底物 L-Ile 生成(2S,3R,4S)-4-HIL^[11-14],该酶的发现为 4-HIL 的生物合成奠定了基础。此外,Smirnov 等通过对菌株进行代谢途径以及过表达羟化酶的方式实现了 L-Ile 向 4-HIL 的转化,其产率高达 82%^[13]。近年来,天津科技大学陈宁等通过代谢工程改造,在 L-Ile 高产菌株谷氨酸棒杆菌中实现了 4-HIL 的高产,产量高达 34.21 g/L^[15]。

IDO 属 Fe/ α KGDs 家族酶,L-Ile 羟基化生成 4-HIL 的反应过程中需要氧气及辅因子包括 Fe^{2+} 、 α -酮戊二酸(α -KG)和抗坏血酸^[16-18]。此外,该酶受 pH 影响较大,且存在底物抑制现象。因此,对此酶进行改造,并对比酶活提高的突变株的羟基化反应体系进行研究,将会为 4-HIL 的高效合成提供理论基础。

作者克隆了江南大学菌种库保藏的苏云金芽

孢杆菌的 *ido* 基因,通过同源建模和蛋白质结构分析,对该基因进行定点突变,构建了比酶活提高的突变型菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*ido*^{I156A},然后对其催化体系进行研究,并在最优条件下对突变株进行补料分批转化,最终得到 77.3 mmol/L 4-HIL,为高效合成 4-HIL 提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)以及质粒 pET28a 均由作者所在实验室保藏。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)由江南大学微生物菌种保藏中心保藏。

1.1.2 主要实验试剂 限制性内切酶(*Eco*R I、*Hind* III)、DL10000 DNA Marker、蛋白质 marker;购于大连宝生物公司;高保真酶、同源重组酶克隆试剂盒:购自南京诺维赞生物科技有限公司;2,4-二硝基氟苯、*N,N*-二甲基甲酰胺、L-异亮氨酸(2S,3R,4S)-4-HIL 标准品:购于阿拉丁公司;分析纯 α -酮戊二酸:购于麦克林公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物设计 PCR 扩增所用引物通过南京金唯智生物有限公司来合成,引物见表 1。

表 1 基因克隆及定点突变引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis and gene

引物名称	引物 DNA 序列(5'-3')
IDO-F	ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAAAATGAGTG GCTTTAGCA(EcoR I)
IDO-R	CTCGAGTGC GGCGCAAGCTTTTATTTTGTCTCCTT ATAAGAA(Hind III)
I156A-F	TCTTTTAGTTCACCTGCTTGTTACATAAAGAT
I156A-R	ATCTTTATGTAACCAAGCAGGTGAACATAAAAGA

注:引物 IDO-F 及 IDO-R 分别为 IDO 酶基因的上游引物和下游引物,引物 I156A-F 和 I156A-R 用来引入 IDO 酶对应的突变位点。下划线部分的核苷酸序列为引物上的限制性核酸内切酶酶切位点。

1.1.4 培养基及底物转化液的配制 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10;pH 7.0,固体培养基则加 1.5~2.0 g/dL 的琼脂粉,121 °C 灭菌 20 分钟。

1.2 野生型菌株与突变菌株的构建

1.2.1 突变点的选择 根据克隆得到的 L-异亮氨酸羟化酶基因表达后的氨基酸序列,利用 Swiss-Model 和 I-TASSER 网站进行 L-异亮氨酸羟化酶三维结构的构建。本着将与底物氨基酸侧链结合的氨基酸残基从亲水性或长链疏水性结构突变成 Ala 的原则,对该基因 I156 位点进行定点突变。

1.2.2 ido 基因及含突变点基因的克隆 根据 NCBI 上 *Bacillus thuringiensis* strain TUST1 的 ido (GenBank:KC884243.1) 序列设计引物(见表 1),以 IDO-F 和 IDO-R 为引物,以苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的基因组为模板进行 PCR 扩增 ido 基因。

采用重叠延伸定点突变的方式对 ido 基因进行突变。以 ido 基因的上游引物(IDO-F)和引入突变的下游引物(I156A-R)、ido 基因的下游引物(IDO-R)和引入突变的上游引物(I156A-F),分别进行 PCR 扩增,得到 2 段含 I156A 突变点的基因序列;然后以这 2 段序列互为模板,以 IDO-F 和 IDO-R 为引物,继续进行 PCR 扩增,则得到包含突变点的基因序列。PCR 条件为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 45 s,58 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-ido 和 *E. coli* BL21/pET28a-ido^{I156A} 的构建 分别将上面 PCR 得

到的产物进行胶回收,胶回收的产物与经 EcoR I 和 Hind III 双酶切线性化的 pET28a 载体通过同源重组的方式进行连接,然后将重组质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3),即可获得 *E. coli* BL21/pET28a-ido 野生型菌株和 *E. coli* BL21/pET28a-ido^{I156A} 突变型菌株。

1.3 野生菌株与突变菌株的诱导表达及分离纯化

将野生菌株与突变菌株先在 LB 固体培养基上进行活化,然后按 1% 的接种体积分数接种于 10 mL LB 液体培养基,培养基中加入终质量浓度为 50 µg/mL 的卡那霉素抗性,37 °C、180 r/min 振荡培养 10~12 h,之后再按 1% 的接种体积分数,转接到 50 mL 的 LB 培养基中,培养基中加入终质量浓度为 50 µg/mL 的卡那霉素抗性。最后按参考文献[10]对其进行诱导表达,SDS-PAGE 检测看酶的表达情况,其中对照为不含目的基因的、转化有 pET28a 的 *E. coli* BL21(DE3)。经 Ni-NTA 亲和层析柱对野生酶 IDO 及突变酶 I156A 进行纯化^[9],Bradford 法测定纯化的野生酶和突变酶的浓度,标准样品为牛血清蛋白。

1.4 酶活测定与产物 4-HIL 的检测

酶活测定体系:20 mmol/L L-Ile,20 mmol/L α-KG,1 mmol/L FeSO₄·7H₂O,5 mmol/L 抗坏血酸,pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES,2 mg/mL 纯酶。

1 个酶活力单位是指在 25 °C 条件下,单位时间催化 L-Ile 反应生成 1 µmol 产物 4-HIL 所需的酶量。比酶活定义为每毫克蛋白质所具有的酶活,单位为 U/mg。

产物 4-HIL 的 HPLC 检测方法为^[20],转化液经衍生化处理后,用 C18 柱反相高效液相色谱测定;洗针用体积分数 10% 甲醇;后进行自动进样,氨基酸洗脱方法为:T=33 °C,λ=360 nm,进样 20 µL,时间为 30 min,流量为 1 mL/min。

1.5 野生酶与突变酶酶学性质的测定

1.5.1 最适反应温度 1 mL 反应体系内加入 20 mmol/L L-异亮氨酸、20 mmol/L α-KG、1 mmol/L FeSO₄·7H₂O、5 mmol/L 抗坏血酸和 900 µL pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液,然后分别加入 100 µL 的野生酶与突变酶,迅速放入不同温度的水浴锅中进行反应,30 分钟后,沸水浴 5 min 终止反应,离心取上清液,HPLC 测定酶活。

1.5.2 最适反应 pH 值 同样采用 1 mL 的反应体系,保持反应温度为 25 °C,将反应的缓冲液更换成

不同 pH 值的柠檬酸钠-柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0~5.0)、PBS 缓冲液 (pH 6.0~8.0) 和 Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0~10.0), pH 值的反应梯度为 1, 然后分别加入野生酶与突变酶反应 30 min, 沸水浴 5 min 终止反应, 离心取上清液, HPLC 测定酶活。

1.5.3 温度稳定性 将野生酶与突变酶放在不同的温度 (30~50 °C) 下, 热处理不同时间, 然后在 25 °C、pH 7.0 的条件反应 30 min, HPLC 法下测残余酶活, 以保温前的酶活为 100%, 测定热处理不同时间后野生酶及突变酶在不同温度下的残余酶活。

1.6 野生酶与突变酶比酶活比较

在 1 mL 的反应体系中加入 20 mmol/L L-异亮氨酸、20 mmol/L α -KG、1 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 mmol/L 抗坏血酸和 pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液, 然后分别加入 100 μL 2 mg/mL 的野生酶与突变酶, 25 °C 反应 30 分钟后, 沸水浴 5 min 终止反应, 离心取上清液, HPLC 测定酶活。

1.7 野生酶与突变酶的结构分析

利用 Swiss-Model 和 I-TASSER 网站同源建模获得 L-异亮氨酸羟化酶的结构模型, 利用 Pymol 软件对 L-异亮氨酸羟化酶可能的底物结合位点进行分析^[21], 本着将与底物氨基酸侧链结合的氨基酸残基从亲水性或长链疏水性结构突变成 Ala 的原则, 对 I156 位点进行了定点突变。最后, 通过 Discover Studio 4.0 进行底物 L-Ile 和 L-异亮氨酸羟化酶的分子对接^[22], 并利用 VMD 软件对对接结果进行分析^[23]。

1.8 突变菌株催化体系研究

1.8.1 底物 L-Ile 浓度对 4-HIL 产生的影响 设置不同底物浓度 10~60 mmol/L, 分别加入 20 mmol/L α -KG、1 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 mmol/L 抗坏血酸和 pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液, 25 °C、pH 7.0 条件下反应 30 min。HPLC 检测 4-HIL 产量。

1.8.2 α -KG 浓度对 4-HIL 产生的影响 设置不同 α -KG 浓度为 10~50 mmol/L, 分别加入 20 mmol/L L-Ile、1 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 mmol/L 抗坏血酸和 pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液, 25 °C、pH 7.0 条件下反应 30 min。HPLC 检测 4-HIL 产量。

1.8.3 Fe^{2+} 浓度对 4-HIL 产生的影响 设置 Fe^{2+} 浓度分别为 0.5、1.5、2.5、3.5、5.0、6.5、8.0 mmol/L 和 10.0 mmol/L, 分别加入 20 mmol/L L-Ile、20 mmol/L α -KG、5 mmol/L 抗坏血酸和 pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液, 25 °C、pH 7.0 条件下反应 30 min。

HPLC 检测 4-HIL 产量。

1.8.4 抗坏血酸浓度对 4-HIL 产生的影响 设置不同抗坏血酸浓度为 10~50 mmol/L, 分别加入 20 mmol/L L-Ile、20 mmol/L α -KG、8 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液, 25 °C、pH 7.0 条件下反应 30 min。HPLC 检测 4-HIL 产量。

1.8.5 不同转化液对 4-HIL 产生的影响 在 L-Ile、 α -KG、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸浓度均为最优的情况下, 分别研究了 H_2O 、pH 7.0 的 50 mmol/L Bis-Tris 缓冲液、pH 7.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液、pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液和 pH 7.0 的 50 mmol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液共 5 种转化液对 4-HIL 的产生有无影响; 在 25 °C、pH 7.0 条件下反应 30 min。HPLC 检测 4-HIL 产量。

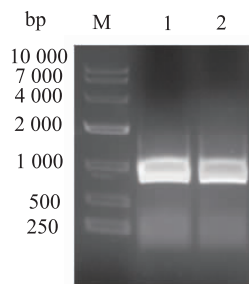
1.9 野生菌与突变体分批补料生产 4-HIL

在 50 mL 体系中, 分别加入 20 mmol/L L-Ile、20 mmol/L α -KG、8 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30 mmol/L 抗坏血酸、pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 以及相同量的野生酶与突变酶 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 大约为 50 左右破细胞所得粗酶液), 每隔 4 小时投加底物一次, 在投加底物前后均取样, HPLC 检测 4-HIL 产量。

2 结果与分析

2.1 重组菌的克隆及表达

2.1.1 野生型菌株与突变菌株的构建情况 以提取的苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的基因组为模板, 按 1.2 中方法进行 PCR 扩增, 将所得 PCR 产物进行核酸电泳, 跑胶结果见图 1, *ido* 基因及含点突变的基因大小均为 723 bp 左右。

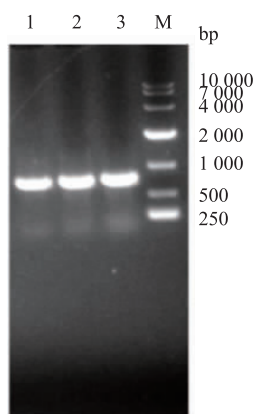


M: DNA marker; 1: *ido* 基因; 2: 突变基因。

图 1 *ido* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *ido* gene and mutated gene

将胶回收的 PCR 产物与经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切线性化的 pET28a 质粒进行同源重组酶切连接,然后将连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂卡那霉素抗性平板,37 °C 培养 8~12 h。挑取平板上的转化子,进行菌落 PCR 验证(见图 2),验证为阳性的转化子送往测序机构进行测序。测序如正确,则野生型菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*ido* 和突变型菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*ido*^{I156A} 构建成功。根据测序结果分析,*ido* 基因的序列和 NCBI 上 *Bacillus thuringiensis* strain TUST1 的 *ido* 基因序列相似度为 97.65%,将苏云金芽孢杆菌的 *ido* 基因和研究较为清晰的 *Bacillus thuringiensis* 2-e-2 的 *ido* 序列进行对比分析,发现该基因的核苷酸和氨基酸序列相似度分别为 98.06% 和 98.75%。



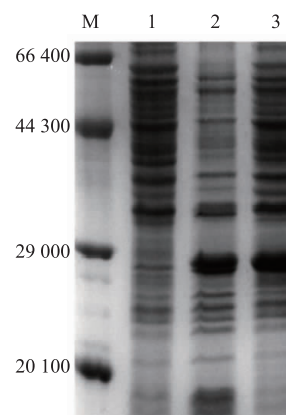
M: D10000 DNA marker; 1: 野生菌转化子菌落 PCR 产物; 2-3: 突变菌转化子菌落 PCR 产物。

图 2 菌落 PCR 验证

Fig. 2 Colony PCR verification

2.1.2 野生酶和突变酶的诱导表达及纯化 将构建好的野生型菌株和突变型菌株先进行划线活化 12~24 h,然后接种在含 10 mL LB 液体培养基的小瓶,最后转接种至含 50 mL LB 液体培养基的大瓶,37 °C、180 r/min 培养大约 2~3 h,待菌体的 OD_{600 nm} 大约为 0.6 左右时,添加 IPTG 进行诱导(IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L),最后,在 25 °C、180 r/min 条件下诱导 20 h 左右。

将诱导完的野生型菌株和突变型菌株进行离心收集菌体,进行细胞破碎,离心获得细胞破碎上清液,然后进行 SDS-PAGE 电泳看蛋白质的表达情况(见图 3),结果显示,野生酶和突变酶均有表达,大小为 27 900 左右。

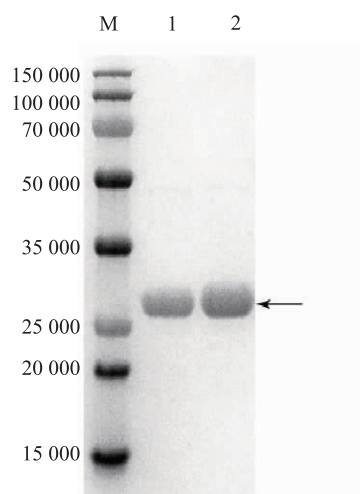


M: 蛋白质 Marker; 1: *E. coli* BL21/pET28a 空对照; 2: *E. coli* BL21/pET28a-*ido* 上清液; 3: *E. coli* BL21/pET28a-*ido*^{I156A} 上清液。

图 3 IDO 蛋白质的表达

Fig. 3 IDO protein expression

将细胞破碎液的上清液进行纯化,将纯化后的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳分析,其结果见图 4。



M: 蛋白质 Marker; 1: 野生酶纯化蛋白质样品; 2: I156A 突变酶纯化蛋白质样品。

图 4 SDS-PAGE 分析野生酶和 I156A 突变酶的纯化

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified wild-type enzyme and the mutated enzyme I156A

2.2 L-异亮氨酸羟化酶的催化功能验证

采用 2,4-二硝基氟苯对 L-Ile 和 (2S,3R,4S)-4-HIL 标准品及转化液进行衍生化处理,通过 HPLC 法对其进行分析。L-Ile 标准品、(2S,3R,4S)-4-HIL 标准品和转化液的 HPLC 分析结果分别见图 5(a)~(c)。

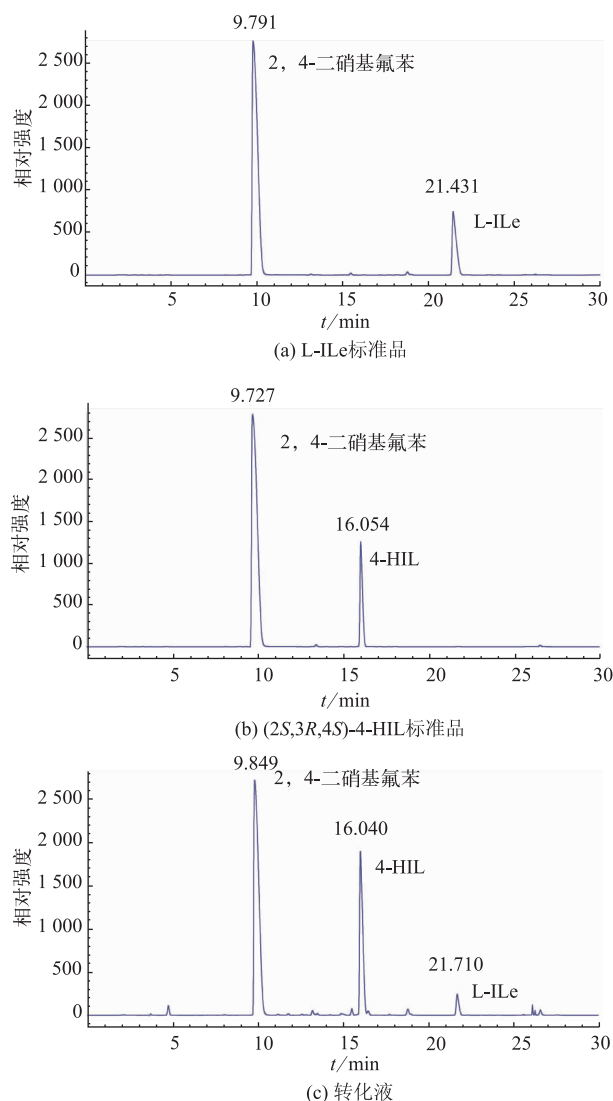


图 5 L-Ile, (2S,3R,4S)-4-HIL 标准品及转化液的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of L-Ile, (2S,3R,4S)-4-HIL standards and conversion solutions

2.3 野生酶与突变酶的部分酶学性质比较分析

2.3.1 野生酶与突变酶的最适反应温度和最适 pH 测定 将野生酶和 I156A 突变酶分别置于不同的温度下,测定它们在不同温度下的酶活,见图 6(a),野生酶和突变酶的最适反应温度并没有发生明显变化,都为 25 °C 左右。当温度高于 25 °C 时,野生酶相对酶活下降速度比突变酶快。

将野生酶和 I156A 突变酶分别置于不同的 pH 中,测定它们在不同 pH 下的酶活,如图 6(b)所示,重组酶和突变酶的最适反应 pH 并没有发生明显变化,都为 7.0。

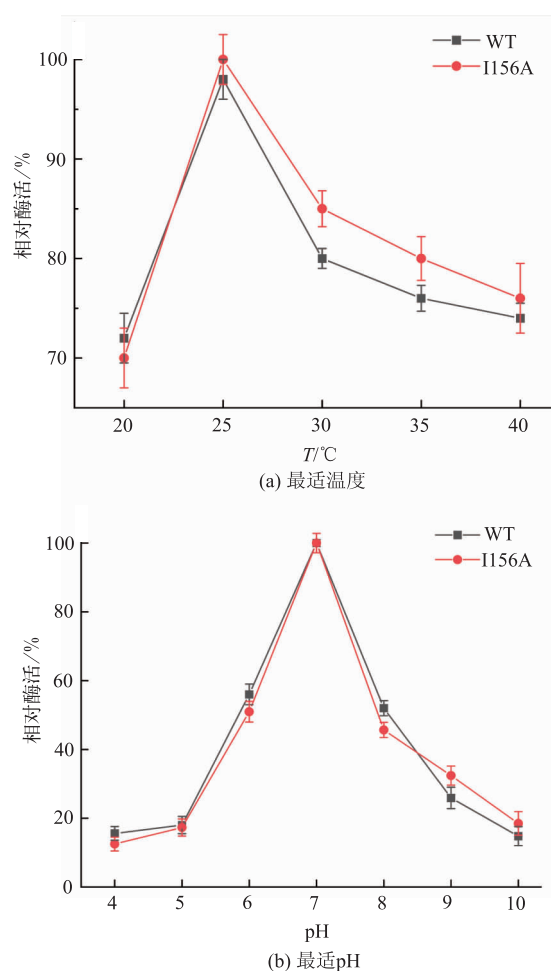


图 6 野生酶和 I156A 突变酶的最适温度和最适 pH

Fig. 6 Optimum temperature and pH for wild-type enzyme and the mutated enzyme I156A

2.3.2 野生酶与突变酶温度稳定性测定 将野生酶与突变酶分别在 30、35、40 °C 和 50 °C 下放置不同时长,然后与未进行热处理的酶一起测酶活,结果见图 7。从图 7(a)可知,野生酶在 30、35 °C 和 40 °C 下处理 8 h,仍保持 80% 以上的比酶活;而在 50 °C 下热处理 2 h,IDO 基本丧失活性。而从图 7(b)可知,突变体的温度稳定性与野生酶基本无区别,也就是说,突变酶 I156A 的热稳定性并没有得到改善。

2.4 野生酶与突变酶比酶活比较分析

在酶量相同的情况下,比较野生酶及突变酶的酶活并计算其比酶活。如图 8,野生酶的比酶活为 0.84 U/mg,突变酶的比酶活是野生酶的 1.9 倍,为 1.58 U/mg。

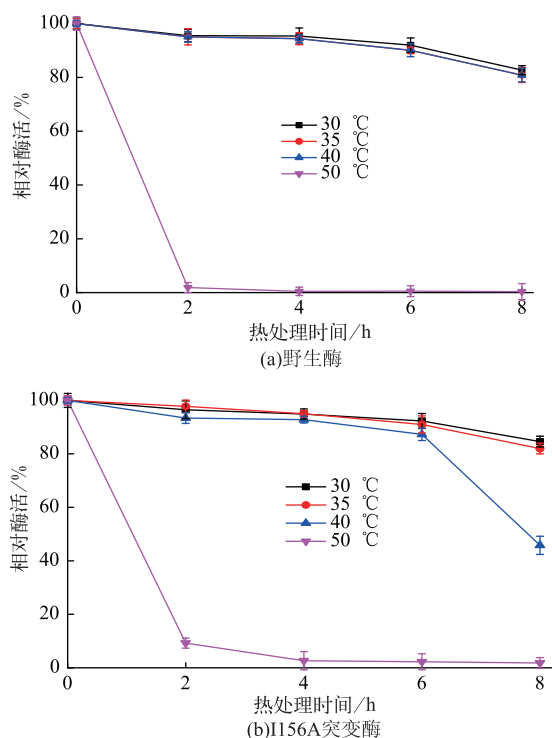


图 7 野生酶和 I156A 突变酶的热稳定性

Fig. 7 Thermal stability of wild-type enzyme and the mutated enzyme I156A

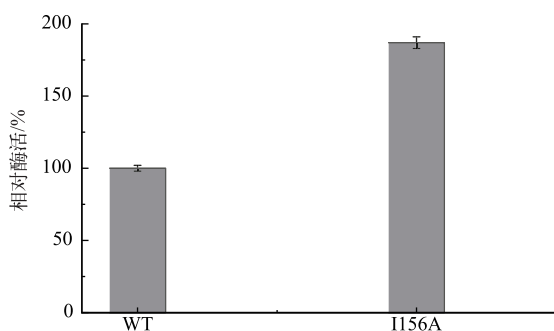


图 8 野生酶和 I156A 突变酶的比酶活

Fig. 8 The specific activity of wild-type enzyme and the mutated enzyme I156A

2.5 野生酶及突变酶结构解析结果

L-异亮氨酸羟化酶属 Fe^{2+} 和 $\alpha\text{-KG}$ 依赖型酶, 因此, 将 L-异亮氨酸羟化酶与 $\text{Fe}/\alpha\text{KGDs}$ 家族典型酶 TauD (1GY9) 进行结构对比, 对底物结合位点进行预测, 推测其底物结合位点可能是 H139、Y81、P155 和 D162。因此, 选取 P155 位点对底物 L-Ile 进行分子对接。

从对接结果来看 (见图 9), 第 156 位的异亮氨酸(I)突变成丙氨酸(A)后, 底物 L-Ile 的结合口袋

变大了, 拓宽了底物通道。

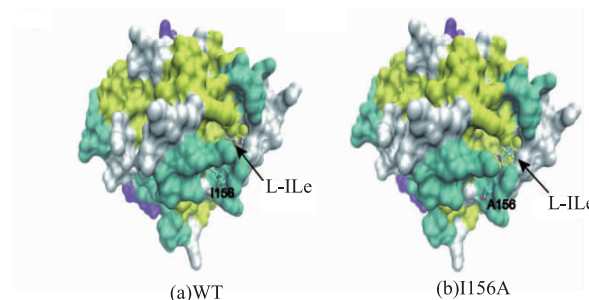


图 9 野生酶与 I156A 突变酶与底物 L-Ile 的分子对接
Fig. 9 Molecular docking of wild-type enzyme and I156A mutated enzyme with substrate L-Ile

2.6 突变株羟基化反应催化体系的研究

2.6.1 底物 L-Ile 浓度对 4-HIL 产量的影响 从图 10 可知, 在 L-Ile 浓度为 20~50 mmol/L 时, 4-HIL 产量变化不大, 且在 L-Ile 浓度为 20 mmol/L 时, 转化率最高, 为 87.5%, 此时 4-HIL 产量为 10.1 mmol/L; 当 L-Ile 浓度为 60 mmol/L 时, 转化率下降为 53.6%, 此时 4-HIL 产量仅为 7.41 mmol/L。

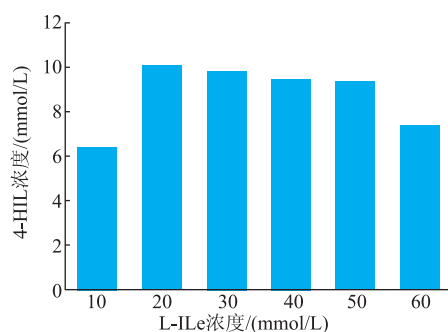


图 10 L-Ile 浓度对 4-HIL 产量的影响

Fig. 10 Effect of L-Ile concentration on 4-HIL production

2.6.2 $\alpha\text{-KG}$ 浓度对 4-HIL 产量的影响 IDO 羟基化反应需要 $\alpha\text{-KG}$ 的参与, 其羟基化反应与 $\alpha\text{-KG}$ 氧化脱羧反应相耦联, 因此反应体系中 $\alpha\text{-KG}$ 浓度会影响 IDO 的酶活及 4-羟基异亮氨酸的合成^[8,13,24]。

如图 11 所示, $\alpha\text{-KG}$ 浓度在 10~20 mmol/L 时, 4-HIL 产量随着 $\alpha\text{-KG}$ 浓度的升高而升高, 当 $\alpha\text{-KG}$ 浓度为 20 mmol/L 时, 4-HIL 产量达到最大, 为 12.92 mmol/L。当 $\alpha\text{-KG}$ 浓度高于 20 mmol/L 时, 4-HIL 产量下降, 特别是 $\alpha\text{-KG}$ 浓度为 50 mmol/L 时, 4-HIL 产量仅为 5.44 mmol/L。可能是因为高浓度的 $\alpha\text{-KG}$ 抑制了 IDO 的羟基化反应, 使整个反应趋向于 $\alpha\text{-KG}$ 氧化脱羧, 生成了副产物琥珀酸, 而

琥珀酸的过量积累不利于 4-HIL 的产生。

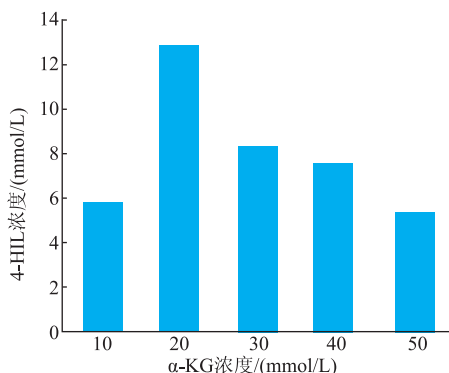


图 11 α -KG 浓度对 4-HIL 产量的影响

Fig. 11 Effect of α -KG concentration on 4-HIL production

2.6.3 Fe^{2+} 浓度对 4-HIL 产量的影响 在 L-Ile 羟基化生成 4-HIL 的反应过程中, Fe^{2+} 会与 α -KG 的 C1 位的羧基和 C2 位的羰基结合进而形成八面配位体复合物, 在 α -KG 氧化脱羧的同时, Fe^{2+} 会被氧化生成高价铁-超氧复合体 (Fe(IV)=O), 而 Fe(IV)=O 是 L-Ile 羟基化生成 4-HIL 过程中的关键复合体, 因此, 酶促反应体系中 Fe^{2+} 的含量会影响 Fe(IV)=O 的形成和 4-HIL 的产生^[8]。由图 12 可知, 4-HIL 的产量随着 Fe^{2+} 浓度的升高而升高, 当 Fe^{2+} 浓度为 8 mmol/L 时, 4-HIL 产量最高, 为 13.5 mmol/L; 当 Fe^{2+} 浓度升高至 10 mmol/L 时, 4-HIL 产量下降为 5.32 mmol/L。

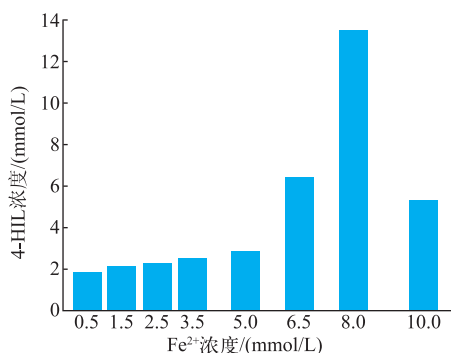


图 12 Fe^{2+} 浓度对 4-HIL 产量的影响

Fig. 12 Effect of Fe^{2+} concentration on 4-HIL production

2.6.4 抗坏血酸浓度对 4-HIL 产量的影响 在 L-Ile 羟基化生成 4-HIL 的反应过程中, 不光要有适当浓度的 Fe^{2+} , 同时也必须要有充足的氧气。如图 13, 抗坏血酸浓度在 10~30 mmol/L 时, 4-HIL 的产量随着抗坏血酸浓度的升高而升高, 且在抗坏血酸浓度为 30 mmol/L 时, 4-HIL 产量达到最高, 为 13.9 mmol/L。

这可能是因为抗坏血酸浓度在 10~30 mmol/L 时, 能够将被氧化的 Fe^{2+} 还原, 且在抗坏血酸浓度为 30 mmol/L 时, Fe^{2+} 浓度也为最适浓度, 4-HIL 产量最高; 当抗坏血酸浓度高于 30 mmol/L 时, 一方面抗坏血酸将被氧化的 Fe^{2+} 还原导致 Fe^{2+} 浓度过高, 影响 Fe(IV)=O 的形成; 另一方面, 抗坏血酸会消耗氧气进而影响反应体系的氧化性, 因此, 4-HIL 产量降低。

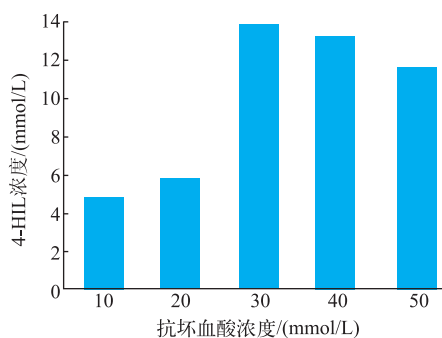


图 13 抗坏血酸浓度对 4-HIL 产量的影响

Fig. 13 Effect of ascorbic acid concentration on 4-HIL production

2.6.5 不同转化缓冲液对 4-HIL 产量的影响 在 L-Ile 羟基化生成 4-HIL 的反应过程中, Fe^{2+} 和整个反应体系的 pH 会对 4-HIL 的产生有影响, 因此, 需分析不同转化液对 4-HIL 产量有无影响, 结果见图 14。由图可知, pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液更适合 4-HIL 的生产, 产量高达 14.8 mmol/L。这可能是因为 HEPES 缓冲液具有很好的缓冲能力, 能够将反应体系的 pH 较长时间维持在 7.0 左右。

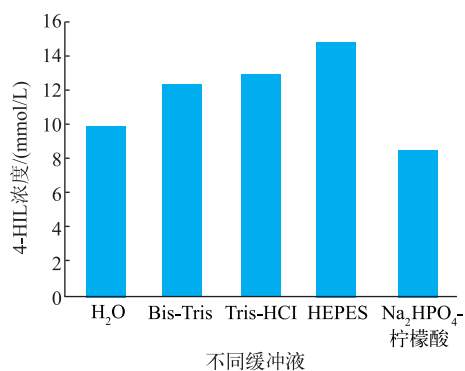


图 14 不同转化缓冲液对 4-HIL 产量的影响

Fig. 14 Effect of different transformation buffers on 4-HIL production

2.7 野生型菌株和突变型菌株粗酶液分批转化结果

从图 15 可知,在转化的前 8 h,野生型菌株与突变株 4-HIL 产量相近,野生型菌株 4-HIL 产量为 24.6 mmol/L,突变株 4-HIL 产量为 28.4 mmol/L;但 8 h 以后,野生型菌株转化 L-Ile 生成 4-HIL 的能力下降,而突变株转化能力虽有下降但仍较野生型高。最后,转化 32 h 后,野生型菌株 4-HIL 产量仅为 54.2 mmol/L,而 I156A 突变株 4-HIL 产量达到 77.3 mmol/L,为野生型菌株的 1.43 倍。突变株 4-HIL 产量提高的可能原因是,由于突变,底物口袋变大,拓宽了底物通道。对于野生型菌株来说,酶结构底物口袋很快达到饱和状态,即使再投加底物,酶已不能继续进行催化;但突变后,底物口袋可以容纳更多的底物,因此,4-HIL 产量较野生型高。

3 结 语

4-HIL 的药理作用较为广泛,主要包括降血糖、降血脂、改善外周组织对胰岛素的抵抗性等,是一种非常具有前景的药物。作者从苏云金芽孢杆菌中克隆 L-异亮氨酸羟化酶 (IDO),在大肠杆菌 BL21 (DE3)中进行了异源表达。通过 Ni-NTA 亲和柱对表达产物进行分离纯化得到纯酶,并对其部分酶学性质进行研究。然后通过同源建模和蛋白结构分析,本着将与底物氨基酸侧链结合的氨基酸残基从亲水性或长链疏水性结构突变成 Ala 的原则,对该基因 I156 位点进行定点突变。突变酶 I156A 比酶活性比野生酶提高了 1.9 倍。最后以突变体重组菌 I156A 出发,考察羟基化反应体系中,底物 L-Ile 浓度、 α -酮戊二酸浓度、 Fe^{2+} 浓度、抗坏血酸浓度以及转化液对 4-HIL 产生的影响。确定了最终转化体系为:20 mmol/L L-异亮氨酸、20 mmol/L α -KG、

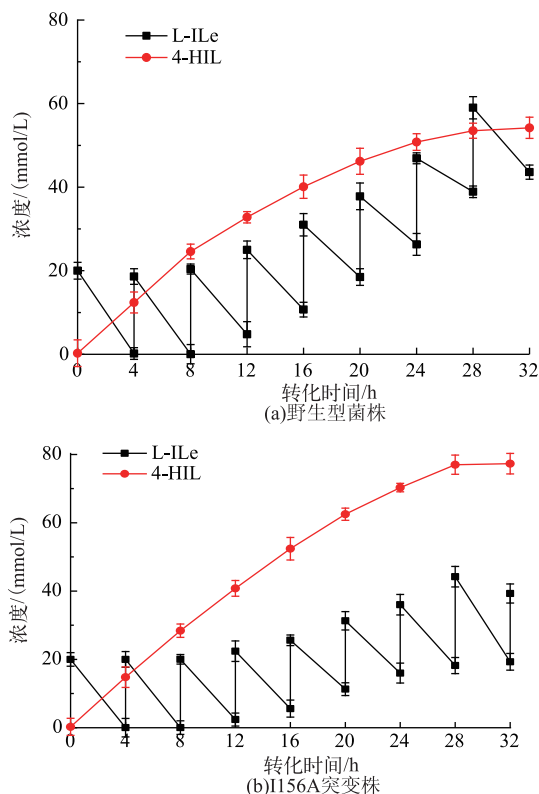


图 15 野生型菌株和 I156A 突变株的分批转化

Fig. 15 Batch conversion of wild-type stain and the mutated strain I156A

8 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30 mmol/L 抗坏血酸和 pH 7.0 的 50 mmol/L HEPES 缓冲液。在最优转化体系条件下结合分批补料的方式,转化 32 h,可以产生 77.3 mmol/L 4-HIL。

此外,在研究不同转化液对 4-HIL 产量的影响时,发现用纯水作为转化液,依然可以转化底物 L-Ile 生成 4-HIL,可以降低生产成本。

参考文献:

- [1] KANDHARE A D, BODHANKAR S L, MOHAN V, et al. Effect of glycosides based standardized fenugreek seed extract in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats; decisive role of Bax, Nrf2, NF- κ B, Muc5ac, TNF- α and IL-1 β [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 237: 151-165.
- [2] SAKR S A, MAHRAN H A, ABO-EL-YAZID S M. Effect of fenugreek seeds extract on cyclophosphamide-induced histomorphometrical, ultrastructural and biochemical changes in testes of albino mice [J]. *Toxicology & Industrial Health*, 2012, 28(3): 276-288.
- [3] BIN-HAFEEZ B, HAQUE R, PARVEZ S, et al. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) extract in mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2003, 3(2): 0-265.
- [4] ABOUBAKR H A, NAUERTZ A, LUONG N T, et al. *In vitro* antiviral activity of clove and ginger aqueous extracts against feline

- calicivirus, a surrogate for human norovirus[J]. **Journal of Food Protection**, 2016, 79(6):1001.
- [5] MUKTHAMBA P, SRINIVASAN K. Hypolipidemic influence of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and garlic (*Allium sativum*) in experimental myocardial infarction[J]. **Food & Function**, 2015, 6(9):3117-3125
- [6] BECKER P M, WIDJAJA-GREEFKES H C A, VAN WIKSELAAR P G. Inhibition of binding of the AB5-type enterotoxins LT-I and cholera toxin to ganglioside GM1 by galactose-rich dietary components[J]. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2010, 7(3):225-233.
- [7] PETIT P, SAUVAIRE Y, PONSIN G, et al. Effects of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in the rat; metabolic-endocrine correlates[J]. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 1993, 45(2):369-374.
- [8] 孙登岳. 疏水性氨基酸的羟基化研究进展[J]. **生物工程学报**, 2018, 34(7):1046-1056.
- [9] PANDA S, TAHILIANI P, KAR A. Inhibition of triiodothyronine production by fenugreek seed extract in mice and rats[J]. **Pharmacological Research**, 1999, 40(5):405-409.
- [10] 张成林, 刘远, 薛宁, 等. 苏云金芽孢杆菌重组 L- 异亮氨酸羟化酶的酶学性质及其在 4- 羟基异亮氨酸合成中的应用[J]. **微生物学报**, 2014, 54(8):889-896.
- [11] KODERA T, SMIRNOV S V, SAMSONOVA N N, et al. A novel L-isoleucine hydroxylating enzyme, L-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine[J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 2009, 390(3):506-510.
- [12] HIBI M, KAWASHIMA T, KODERA T, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* L-isoleucine dioxygenase for production of useful amino acids[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, 77(19):6926-6930.
- [13] SMIRNOV S V, KODERA T, SAMSONOVA N N, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2010, 88(3):719-726.
- [14] OGAWA J, KODERA T, SMIRNOV S V, et al. A novel L-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 89(6):1929-1938.
- [15] ZHANG C L, LI Y J, MA J, et al. High production of 4-hydroxyisoleucine in *Corynebacterium glutamicum* by multistep metabolic engineering[J]. **Metabolic Engineering**, 2018, 49:287-298.
- [16] HAEFELE C, BONFILS C, SAUVAIRE Y. Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum*, involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis[J]. **Phytochemistry**, 1997, 44(4):563-566.
- [17] FOWDEN L, PRATT H M, SMITH A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*[J]. **Phytochemistry**, 1973, 12(7):1707-1711.
- [18] 文方, 裴尧, 穆晓清, 等. α -酮戊二酸依赖型双加氧酶催化特性及反应耦联辅因子对其催化羟基化反应的影响[J]. **微生物学通报**, 2017, 44(3):505-512.
- [19] CROWE J, MASONE B S, RIBBE J. One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin[J]. **Molecular Biotechnology**, 1995, 4(3):247-258.
- [20] 李东, 孙家义. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定 18 种氨基酸[J]. **化学分析计量**, 2004, 13(1):18-20.
- [21] 张显, 龙水清, 饶志明, 等. 定点突变提高枯草芽孢杆菌 L- 天冬酰胺酶的活力及稳定性[J]. **食品与生物技术学报**, 2015, 34(11):1128-1134.
- [22] ZHANG J, XU M, GE X, et al. Reengineering of the feedback-inhibition enzyme N-acetyl-L-glutamate kinase to enhance L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2016, 44(2):1-13.
- [23] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: visual molecular dynamics[J]. **Journal of Molecular Graphics**, 1996, 14(1):33-38.
- [24] HAUSINGER, ROBERT P. Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes[J]. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 2004, 39(1):21-68.