

摘要

L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 能够特异性催化 L-天冬氨酸脱羧生产 β -丙氨酸, 是生物合成 β -丙氨酸、泛酸、肌肽等化合物的关键酶。其中, β -丙氨酸是多种医药合成的重要砌块, 在食品、饲料、化妆品等领域也有着广泛的应用, 是 12 种最具潜力的三碳化合物之一。酶法合成 β -丙氨酸因其更加绿色、高效、可持续, 是目前 β -丙氨酸合成的主流方法。目前普遍使用的是谷氨酸棒杆菌和枯草芽孢杆菌来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶, 但这两种来源的酶合成 β -丙氨酸或其下游产物的瓶颈是较低的酶活。为解决这一问题, 本研究对 L-天冬氨酸 α -脱羧酶进行基因挖掘与分子改造, 并通过半理性设计提升新酶的催化性能, 建立全细胞催化合成 β -丙氨酸的工艺, 具体研究结果如下:

(1) 挖掘出新的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶, 其酶学性质优于现使用的酶。结合已有的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶序列信息, 选择能够形成丙酮酰基的枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶为探针, 基于 Uniprot 蛋白数据库进行 BLAST 分析, 确定了 6 种不同来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶基因, 分别进行了全细胞催化活性、纯酶活性比较及酶学性质测定。挖掘出来源于杰氏棒状杆菌的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶, 野生酶催化活性高于正在使用的其他来源的酶。其酶活为 $9.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 是 6 种 L-天冬氨酸 α -脱羧酶中活性最高的, 对底物的亲和力也是最好的, K_M 值为 $3.6 \pm 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对活性最高的杰氏棒杆菌来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶进行分子改造, 进一步提高了其催化效率。

(2) 通过基于结构的半理性设计, 成功对杰氏棒杆菌来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶进行了功能进化, 提升了酶活力和稳定性。利用 AlphaFold2 预测了杰氏棒杆菌来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的蛋白结构并与底物进行了分子对接。通过序列保守性分析和 Rosetta 中的结合自由能模块对结合口袋 $5 \text{ \AA}$ 范围内的氨基酸残基进行虚拟突变, 选择突变后解折叠自由能 ($\Delta\Delta G$) 降低的非保守位点进行 CAST 饱和突变。通过全细胞催化体系初步筛选以及酶纯化后的复筛, 获得了 4 个活性提升的突变体, 分别为 R3K、C26V、I88M、Y90F。对 4 个突变体的位点进行组合后, 形成的组合突变体 I88M-Y90F-C26V-R3K 酶活为 $25.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较野生型的 $9.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 提高了 2.6 倍。动力学分析结果表明, 突变体 K_M 值为 $2.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 较野生型的 $3.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低, 表明突变体对底物的亲和力更强。突变体的 T_m 值为 82°C , 其稳定性较野生型有所提高。

(3) 利用分子动力学模拟 (MD) 对突变前后的三维结构变化进行了解析。结果显示, 突变体整体的均方根偏差 (RMSD) 值较野生型略微下降, 突变体相较于野生型具有更高的稳定性。通过分析酶分子突变前后底物口袋的构象发现, 88 位异亮氨酸突变为甲硫氨酸, 末端甲基的取向发生改变, 由朝向 Lys9 变为朝向外侧; 90 位酪氨酸突变为苯丙氨酸后, 苯环对位上没有了羟基取代, Gly24、Lys9 距离底物 L-天冬氨酸的相对位置更加接近, Lys9 的氨基与底物 L-天冬氨酸的 α 羧基距离由 $2.8 \text{ \AA}$ 缩短至 $2.2 \text{ \AA}$, 其与 L-

天冬氨酸 α 羧基的结合更加紧密,有利于催化脱羧反应的进行;26 位突变为缬氨酸后有利于酶的正确折叠;3 号位点与活性中心有着较强的动态耦合,3 号位点发生扰动时会传递给活性中心。

(4) 初步建立了突变体在大肠杆菌中的高密度发酵和全细胞催化工艺。在 5 L 发酵罐中对 I88M-Y90F-C26V-R3K 突变体进行发酵实验,当菌体密度达到 $OD_{600}=60$ 后间隔两小时添加诱导剂 IPTG, IPTG 终浓度为 $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 发酵 26 h 左右菌体量达到 $OD_{600}=120$, 最高酶活为 $2853.87 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以 $OD_{600}=40$ 进行全细胞催化, 12 h 即可完全转化 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物, β -丙氨酸产量达到 $87.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 摩尔转化率达到 98.3%。

关键词: L-天冬氨酸 α -脱羧酶; 半理性设计; 全细胞催化

Abstract

L-aspartate α -decarboxylase (PanD) specifically catalyzes the decarboxylation of L-aspartate to produce β -alanine and is a key enzyme in the biosynthesis of β -alanine, pantothenic acid, carnosine and other compounds. Among them, β -alanine is an important building block for the synthesis of a variety of pharmaceuticals, and also has a wide range of applications in food, feed and cosmetics, and is one of the 12 most promising three-carbon compounds. Enzymatic synthesis of β -alanine is currently the mainstream method for β -alanine synthesis due to its greener, more efficient and sustainable nature. PanD enzymes of *Corynebacterium glutamicum* and *Bacillus subtilis*168 origin are commonly used, but the bottleneck for the synthesis of β -alanine or its downstream products by these two sources is the lower enzyme activity. To solve this problem, this study carried out gene mining and molecular modification of PanD, and enhanced the catalytic performance of the new enzyme through semi-rational design to establish a whole-cell catalytic synthesis of β -alanine, with the following results:

(1) In this study, a new L-aspartic acid α -decarboxylase was discovered, whose enzymatic properties were superior to those of existing enzymes. Combined with the available sequence information of L-aspartate α -decarboxylase (PanD), L-aspartate α -decarboxylase from *B. subtilis* 168 and *C. glutamicum* origins, which are capable of forming acetyl groups, were selected as probes, and six L-aspartate α -decarboxylase genes from different sources were identified by BLAST analysis based on the Uniprot protein database. Whole-cell catalytic activity comparison, pure enzyme activity and enzymatic properties were performed, respectively. L-aspartate α -decarboxylase (PanD) derived from *Corynebacterium jeikeium* was mined and the wild enzyme catalytic activity was higher than that of the other sources being used. The activity of PanD enzyme from *C. jeikeium* was $9.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, which was the highest among the 6 PanDs, and its affinity for substrate was the best, K_M value was $3.6 \pm 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The catalytic efficiency of PanD enzymes derived from *C. jeikeium* was further improved by molecular modification.

(2) In this study, the function evolution of L-aspartate α -decarboxylase derived from *C. jeikeium* was successfully achieved by structure-based semi-rational design, and the activity and stability of the enzyme were improved. AlphaFold2 was used to predict the protein structure of L-aspartate α -decarboxylase derived from *C. jeikeium* and perform molecular docking with the substrate. Amino acid residues in the binding pocket 5 Å range were virtual mutated by sequence conservation analysis and binding free energy module in Rosetta, and non-conserved sites with reduced free energy ($\Delta\Delta G$) after mutation were selected for CAST saturation

mutation. After preliminary screening by whole cell catalytic system and re-screening after enzyme purification, four mutants with improved activity were obtained, namely R3K, C26V, I88M and Y90F. The enzyme activity of the combined mutant I88M-Y90F-C26V-R3K was $25.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, which was 2.6 times higher than that of the wild type ($9.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). Kinetic analysis showed that the K_M value of the mutant was $2.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was significantly lower than that of the wild type ($3.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), indicating that the mutant had a stronger affinity for the substrate. The T_m value of the mutant was 82°C , and its stability was improved compared with that of the wild type.

(3) In this study, molecular dynamics simulation (MD) was used to analyze the the three dimensional structural changes before and after the mutation. The results showed that the RMSD value of the mutant was slightly lower than that of the wild type, and the mutant had higher stability than the wild type. By analyzing the conformation of the substrate pocket before and after the enzyme mutation, it was found that isoleucine at 88 was changed to methionine, and the orientation of the terminal methyl group changed from Lys9 orientation to laterally orientation. After the mutation of tyrosine at position 90 to phenylalanine, there is no hydroxyl substitution on the benzene ring para-site, and the relative position of Gly24 and Lys9 is closer to the substrate L-aspartic acid. The distance between the amino group of Lys9 and the α -carboxylic group of L-aspartic acid is shortened from $2.8 \text{ \AA}$ to $2.2 \text{ \AA}$, and the binding with the α -carboxylic group of L-aspartic acid is closer. It is beneficial to catalyze decarboxylation. The mutation of site 26 to valine is beneficial to the correct folding of enzyme. There is a strong dynamic coupling between site 3 and the active center, and the disturbance at site 3 will be transmitted to the active center.

(4) In this study, a high-density fermentation and whole-cell catalytic process of mutants in *E. coli* was established. The I88M-Y90F-C26V-R3K mutant was fermented in a 5 L fermenter, and the inducer IPTG was added at an interval of two hours after the bacterial density reached $\text{OD}_{600}=60$, and the final concentration of IPTG was $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The fermentation volume reached $\text{OD}_{600}=120$ at about 26 h, and the maximum enzyme activity was $2853.87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Whole-cell catalysis with $\text{OD}_{600}=40$ resulted in the complete conversion of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ substrate in 12 h. The yield of β -alanine reached $87.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with a molar conversion rate of 98.3%.

Key words: L-aspartate α -decarboxylase; Semi-rational design; Whole cell catalysis.

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	V
第一章 绪论.....	1
1.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD)	1
1.1.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的简介	1
1.1.2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的成熟机制	1
1.1.3 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的催化原理	2
1.1.4 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的挖掘和应用	2
1.1.5 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的分子改造研究进展	4
1.2 β -丙氨酸.....	4
1.2.1 β -丙氨酸的简介	4
1.2.2 β -丙氨酸的主要应用	5
1.2.3 β -丙氨酸合成方法的概述	5
1.3 酶的分子改造	7
1.3.1 定向进化	8
1.3.2 半理性设计	9
1.3.3 理性设计	10
1.4 突变位点的选择	11
1.4.1 保守但不同的位点 (CbD)	11
1.4.2 共进化残基	11
1.4.3 活性位点残基	11
1.4.4 底物通道位点	12
1.4.5 柔性位点	12
1.4.6 与活性中心偶联的远端位点	12
1.5 本课题的立题和主要研究内容	12
1.5.1 课题立意	12
1.5.2 课题主要研究内容	13
第二章 材料与方法.....	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 菌株与质粒	14
2.1.2 主要仪器与设备	14
2.1.3 主要试剂及材料	15

2.1.4 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 基因的获取.....	16
2.1.5 主要培养基的配置.....	16
2.1.6 主要试剂的配置.....	17
2.2 pET28a-PanD 质粒的构建.....	18
2.2.1 引物设计.....	18
2.2.2 目的基因与载体骨架的连接.....	19
2.2.3 大肠杆菌感受态的制备及化学转化.....	19
2.2.4 阳性转化子的鉴定.....	19
2.3 pET28a-PanD 的异源表达及纯化.....	19
2.3.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的诱导表达.....	19
2.3.2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的纯化.....	20
2.3.3 蛋白浓度的测定.....	20
2.3.4 SDS-PAGE 蛋白样品的制备.....	20
2.4 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 酶学性质的测定.....	21
2.4.1 L-天冬氨酸和 β -丙氨酸的检测.....	21
2.4.2 纯酶酶活测定方法.....	21
2.4.3 最适温度的测定.....	21
2.4.4 温度稳定性测定.....	21
2.4.5 最适 pH 测定.....	21
2.4.6 pH 稳定性测定.....	22
2.4.7 底物抑制测定.....	22
2.4.8 动力学常数测定.....	22
2.4.9 熔融温度 (T_m) 的测定.....	22
2.5 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的分子改造.....	22
2.5.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的改造策略.....	22
2.5.2 突变体文库的构建方法.....	22
2.5.3 突变体文库的初筛与复筛方法.....	23
2.6 分子动力学模拟方法.....	23
2.7 5 L 发酵罐培养条件的选择.....	24
2.7.1 种子培养.....	24
2.7.2 5 L 发酵罐的准备及培养策略.....	24
2.7.3 指数流加策略.....	24
第三章 结果与讨论.....	25
3.1 高活性 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的挖掘、克隆与表达.....	25
3.1.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的挖掘.....	25

3.1.2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的诱导表达及纯化.....	28
3.1.3 不同来源 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 全细胞催化效率比较.....	29
3.1.4 不同来源 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 纯酶酶活比较.....	30
3.1.5 不同来源 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 动力学常数测定和比较..	31
3.2 杰氏棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的改造.....	31
3.2.1 杰氏棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 蛋白结构的预测.....	31
3.2.2 杰氏棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 序列的保守性分析.....	32
3.2.3 杰氏棒杆菌 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 与底物的分子对接.....	33
3.2.4 底物结合口袋附近氨基酸位点的虚拟突变.....	34
3.2.5 虚拟突变结果的验证.....	35
3.2.6 突变位点的组合.....	36
3.2.7 Arg3 位点的突变与筛选.....	36
3.3 最佳突变体的酶学性质.....	37
3.3.1 最适温度及温度稳定性的表征.....	37
3.3.2 最适 pH 及 pH 稳定性的表征.....	38
3.3.3 底物抑制测定.....	39
3.3.4 动力学常数测定.....	39
3.3.5 熔融温度 (T_m) 的表征.....	40
3.4 突变体的动力学模拟.....	41
3.4.1 突变体的结构建模.....	41
3.4.2 野生型及突变体均方根偏差 (RMSD) 分析.....	42
3.4.3 野生型及突变体均方根浮动 (RMSF) 分析.....	43
3.5 重组菌的发酵及全细胞催化.....	45
3.5.1 重组菌的发酵.....	45
3.5.2 全细胞催化最佳底物浓度的确定.....	45
3.5.3 全细胞催化生产 β -丙氨酸.....	46
主要结论与展望.....	47
主要结论.....	47
展望.....	47
致 谢.....	48
参考文献.....	49
附录 A: 作者在攻读硕士学位期间发表的成果.....	56

第一章 绪论

1.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD)

1.1.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的简介

目前报道的 PanD 主要有两种,一种是磷酸吡哆醛依赖型的 PanD (PLP-PanD),该类 PanD 催化过程依赖于辅因子,多来源于昆虫等真核生物,这类酶与谷氨酸脱羧酶有很高的序列相似性,具有较宽的底物谱;另一种是丙酮酰依赖型的 PanD (PYR-PanD),无需外源添加辅因子,能够在生物体内成熟裂解成具有活性的 α 亚基和 β 亚基,专一性强,多来源于细菌古细菌等原核生物,目前大肠杆菌 K12(*Escherichia coli* K12)^[1]、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)^[2]、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[3]、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*) 以及嗜热菌 (*Thermus thermophilus*) 来源的 PanD 已有晶体结构相关的数据,它们的晶体结构具有很大的相似性,均为同源四聚体。

1.1.2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的成熟机制

丙酮酰依赖型 PanD 催化 L-天冬氨酸时,无需外源添加辅因子磷酸吡哆醛,这依赖于其独特的成熟机制。PanD 转录翻译后,首先以无活性的原酶形式存在,也叫 π 蛋白,随后经过自裂解形成有活性的蛋白。目前报道的成熟机制主要有两类^[4],第一类在成熟过程中需要辅酶 PanM 或 PanZ 的调控,大肠杆菌的 PanD 纯化后经过孵育能够加速其成熟,获得一定程度的活性,但是延长孵育时间其活性还是较体内相差很多,这是因为生物体内存在关键基因 *yhhK* (PanZ、PanM)^[5],能够促进 PanD 在体内的成熟, PanD 是否能够完全裂解取决于 PanZ 的含量,这直接影响了该酶的催化效率^[6]。第二类不依赖于 PanM,能够自裂解成熟,谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌来源 PanD 都属于这一类。这两类成熟机制都是发生在 Gly24-Ser25 之间, Ser25 的羟基攻击 Gly25 羰基形成酯基,释放伯胺,随后酯键断裂,形成 C 端带羟基的 β 亚基以及 N 端带有丙酮酰基的 α 亚基,如图 1-1 所示。Albert 等人^[7]对大肠杆菌原酶结构解析发现, PanD 的自剪切加工方式与已报道的丙酮酰依赖型的组氨酸脱羧酶^[8]以及人类 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶^[9]的裂解机制十分相似。裂解形成 α 亚基和 β 亚基是该酶发挥催化活性的前提,影响到酶催化效率,所以无需 PanM,能够自裂解成熟的 PanD 具有更好的应用价值。

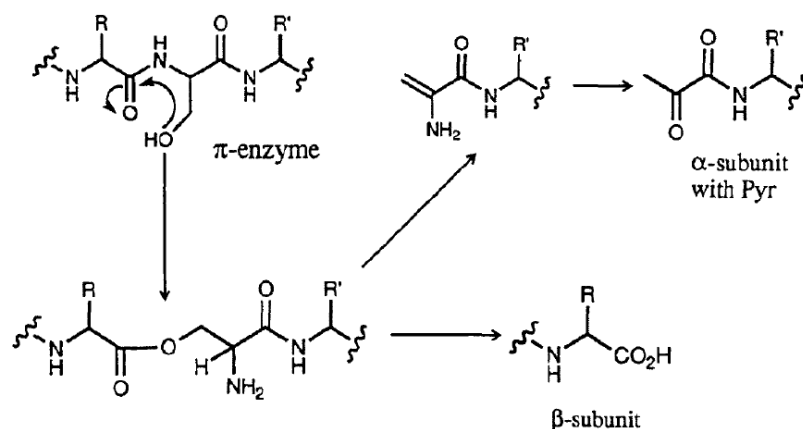


图 1-1 PanD 的自剪切机制

Fig. 1-1 Self-cleavage mechanism of PanD

1.1.3 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的催化原理

丙酮酰依赖型 PanD 成熟后形成的丙酮酰基团是催化反应的结合位点，该脱羧反应以 L-天冬氨酸和丙酮酰基团之间形成的 Schiff 碱中间体为前提，随后中间体脱去 α 羧基，形成烯醇式结构，Tyr58 的苯环向烯醇式结构提供质子^[10]，又形成酶-产物 Schiff 碱中间体，最后酶-产物 Schiff 碱中间体通过水解释放 β -丙氨酸，丙酮酰基团得以再生，具体反应机理如图 1-2 所示。该催化反应过程中，Gly72、Ala73、Ala74 等保守氨基酸为底物提供了疏水环境。Tyr58 的酚羟基提供质子是最为关键的一步，当质子提供错位，酶与底物复合物无法重新形成^[11]，这就是该酶存在的不可逆的机理性失活^[12]。

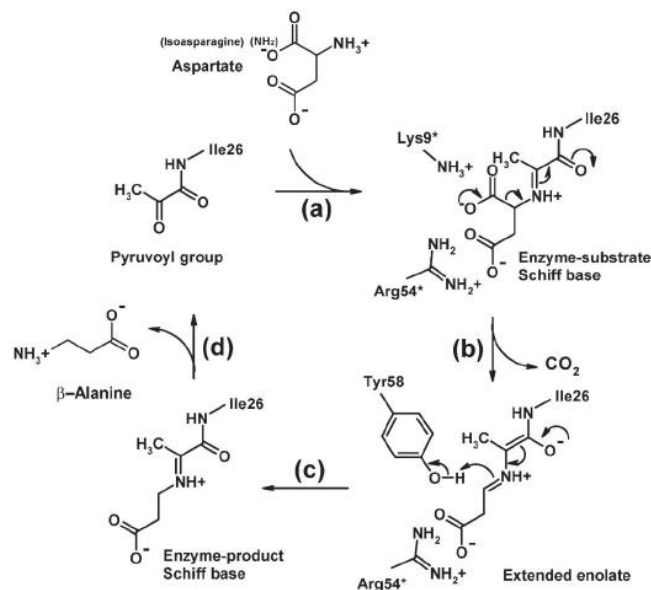


图 1-2 PanD 的反应机理

Fig. 1-2 The reaction mechanism of PanD

1.1.4 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的挖掘和应用

国外对细菌来源 PanD 的研究起步较早，最早可以追溯到 1975 年，Manuel 等人^[13]

发现只有外源添加 β -丙氨酸和泛酸, PanD 基因受损的丙氨酸营养缺陷型菌株才能正常生长。1979 年 Williamson 等人^[14]完成了大肠杆菌 PanD 的首次分离纯化以及酶学性质的鉴定,该酶的最适温度为 55°C,最适 pH 为 7.0~7.5, K_M 值为 0.16。自此便揭开了 PanD 基因研究的序幕,越来越多来源的 PanD 被挖掘出来。Dusch 等人^[15]对谷氨酸棒杆菌来源的 PanD 进行了异源表达,成功检测到 L-天冬氨酸转化为 β -丙氨酸,该酶的酶活为 $2.073 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, 高于大肠杆菌来源。Chopra 等人^[16]对结核分歧杆菌来源的 PanD 进行了异源表达,并首次对 PanD 进行了结晶,表征了其三维结构,该酶的最适温度为 37°C,最适 pH 为 7.0,比酶活为 $126 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 。随后 Kwon 等人^[6]对幽门螺杆菌来源的 PanD 进行了异源表达,以 CH_3ONa 为沉淀剂成功对其进行了结晶。

21 世纪初国内才开始关注 PanD, 2006 年,楼坚等人^[17]对藤黄八叠球菌进行紫外诱变获得了能够合成 β -丙氨酸的突变体,发酵生产 β -丙氨酸产量为 $0.649 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 2007 年高丽娟等人^[18]表达了大肠杆菌来源的 PanD 并进行了筛选,获得了高表达的 PanD 菌株,经过发酵工艺优化,最终 β -丙氨酸产量为 $4.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,摩尔转化率为 32%; 2013 年范海洋等人^[19]克隆了大肠杆菌基因组上的 PanD 基因并在大肠杆菌 DE3 中进行了表达,发现该酶在 pH 6.0~9.0, 温度 15~37°C 下,酶活能够保持稳定,对 L-天冬氨酸的转化率为 $12 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 。

早期对 PanD 的研究局限于大肠杆菌来源,但是该来源 PanD 需要经过 50°C 孵育 12~24 h 才具有活性并且活性低、稳定性差,不适合工业化生产。基于这一点,研究者开始转向挖掘鉴定其他来源的 PanD 基因,希望能找到性能优良、具有工业应用潜力的 PanD 基因。2008 年,张潇潇等人^[20]在大肠杆菌中异源表达了顿齿棒杆菌来源的 PanD,经过分离纯化后最终 β -丙氨酸的产量为 $76.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 赵连真等人^[21]实现了谷氨酸棒杆菌来源 PanD 在大肠杆菌中的异源表达,建立了高效率的酶转化方法,通过分批加入底物,转化率达到 97.8%。邓思颖等人^[22]克隆了枯草芽孢杆菌来源的 PanD 基因,并将其与大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌来源的 PanD 进行了比较,枯草芽孢杆菌来源 PanD 活性更高、稳定性更强,比酶活为 $8.4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、8 h β -丙氨酸产量为 $2.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。陈夏林等人^[23]鉴定了 44 种不同来源的 PanD 基因,其中单核增生李斯特菌和杰氏棒杆菌来源 PanD 具有较高的酶活,分别为 $8.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $11.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 在 30~50°C 具有较高的稳定性,24 h 转化率可达 67.7% 和 82.2%。范雪萍等人^[24]对前期从土壤中分离得到的特基拉芽孢杆菌来源 PanD 进行分批补料发酵,酶活可达 $1109.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 10 h 转化率可达 99.2%。

目前对于真核生物以及古菌来源的 PanD 研究较少,这类 PanD 需要辅酶 PLP 才能够发挥催化能力。Graham Richardson 等人^[25]在大肠杆菌中异源表达了埃及伊蚊来源的 PanD 基因,该酶能特异性催化 L-天冬氨酸,但不能催化谷氨酸; Irina Borodina 等人^[26]设计代谢途径从头合成 3-羟基丙酸,由于 PanD 基因是其中的限速步骤,将赤拟谷盗、大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌来源的 PanD 基因整合到酿酒酵母基因组中,发现赤拟谷盗来源 PanD 基因能够提高 3-羟基丙酸的产量,进一步推测,赤拟谷盗来源 PanD 催化生产 β -丙氨酸活性更高。莫芹等人^[27]异源表达了古菌詹氏甲烷球菌来源的 PanD 基因并测

定了其酶学性质, 该酶的酶活为 $6.87 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 最适温度和最适 pH 分别为 80°C 和 8.0。也有研究学者尝试将细菌来源和昆虫来源的 PanD 进行共表达, Wang 等人^[28]就将枯草芽孢杆菌来源和赤拟谷盗来源的 PanD 进行了共表达, 通过全细胞催化反应, β -丙氨酸的最终产量为 $271.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 转化率为 92.4%。

1.1.5 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的分子改造研究进展

对于 PanD 基因的挖掘并不能从根本上改变其催化活性低、稳定性差的问题, 越来越多的学者开始通过分子改造提高其催化能力及稳定性。沈艳等人^[29]以谷氨酸棒杆菌来源 PanD 为模板, 根据已报道的晶体结构数据以及序列同源比对, 通过 Discovery Studio 软件进行理性设计, 定点突变结果显示: Ile5Met、Lys9Ser 以及缺失突变 ΔG65 均丧失活性; Ile86Trp 提高了酶与底物的亲和力, K_M 由 $73.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低到 $59.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Asp19Asn 提高了酶的温度稳定性; Lys9Arg 改变了该酶的催化功能, 仍能催化 L-天冬氨酸, 只是由原本的 α 脱羧变为 β 脱羧。Pei 等人^[30]比较了大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌以及枯草芽孢杆菌来源的 PanD 基因的比酶活和热稳定性, 最终选择了比酶活、热稳定性均是最高枯草芽孢杆菌来源 PanD 为模板, 采用易错 PCR 对其进行分子改造, 建立了基于荧光的高通量筛选方法, 筛选出两株性能提高的突变体 V68I 和 I88M, 比酶活提升 18%~22%, 催化稳定性提升 29%~64%, 最佳突变体 I88M 8h 可转化 50% 的 L-天冬氨酸。张腾辉等人^[31]同样选择了枯草芽孢杆菌来源的 PanD 基因, 通过同源建模以及序列相似性分析进行理性设计, 选择活性中心附近的 Tyr58、Ile60、Glu56、Asn41 和 Lys63 进行定点突变, 突变结果显示: E56S 催化活性提升 1.55 倍, 催化稳定性也有一定的提高, 经 5 L 发酵罐培养、全细胞催化, β -丙氨酸的最终产量为 $215.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 摩尔转化率为 94%。莫芹等人^[32]通过假定蛋白质文库, 选择杰氏棒杆菌来源的 PanD, 通过饱和突变、基于比色的筛选方法, 最终筛选到突变体 A74G 和 R3K, 稳定性分别提高了 22% 和 66%。

也有部分学者对真核生物来源的 PanD 进行分子改造, Liu 等人^[33]对赤拟谷盗来源的 PanD 进行改造, 根据嗜热菌进化信息, 构建了 23 个点突变, 筛选到突变体 G369A, 该突变体具有更高的热稳定性, 经全细胞催化, β -丙氨酸的最高产量为 $162 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 陈虹等人^[34]同样以赤拟谷盗来源 PanD 为模板, 通过易错 PCR 筛选到组合突变体 R38H-K305S, 比酶活提高 2.45 倍, 以分批补料的方式添加 L-天冬氨酸, 最终 β -丙氨酸的产量为 $170.53 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 摩尔转化率为 95.45%; 张雷等人^[35]根据序列共识突变和解折叠自由能变化, 通过 Consensus Finder 和 PoPMuSiC 软件确定了 28 个拟候选位点, 在单点突变的基础上进行迭代饱和突变, 最佳突变体 R87P-V105L-S278A-A452E 在 45°C 的半衰期较野生型提高 4 倍。基于此来源的 PanD, Wang 等人^[36]构建了突变体 K221R, Ye 等人^[37]构建了突变体 K49R, 催化活性较原始酶分别提高了 20.3%、80%。

1.2 β -丙氨酸

1.2.1 β -丙氨酸的简介

β -丙氨酸，又叫 3-氨基丙酸、 β 氨基丙酸，是自然界中唯一存在的 β 型氨基酸。分子式为 $C_3H_7NO_2$ ，与 L-丙氨酸互为同分异构体。其相对分子质量为 89.09，无色晶体，易溶于水，在水中溶解度为 55 g/100 mL，微溶于甲醇和乙醇，不溶于其他有机试剂，熔点为 202°C，在常温下较为稳定。最早在 1972 年，由 Rose 等人^[38]在喂食尿嘧啶(Uracil)家蝇的代谢物中发现。

1.2.2 β -丙氨酸的主要应用

β -丙氨酸是一种非蛋白氨基酸，也是非必须氨基酸，但是其具有丰富的功能性，广泛存在于肉类食品中。在人体中， β -丙氨酸主要用于合成肌肽，肌肽是存在于人体骨骼肌中的二肽，具有抗氧化和抗糖化的作用。除此以外， β -丙氨酸及其衍生物在医药、食品、化工等领域也有着广泛的应用。

在生物医药领域， β -丙氨酸可用来合成维生素 B5（泛酸）以及泛酸钙。前者是乙酰辅酶 A 以及酰基载体蛋白的前体，能够参与机体中碳水化合物、脂肪、蛋白质等物质代谢，同时也能参与抗体合成。后者在临床上可用于治疗吸收不良综合征、局限性肠炎等^[39]，也可用于类风湿、周围神经炎的辅助治疗，市场需求巨大，供不应求。 β -丙氨酸可用于合成肌肽（也叫 β 丙氨酰-L 组氨酸），肌肽能够起到清除自由基、保护线粒体^[40]、抗糖基化反应^[41]的作用，也能够激活端粒酶，延缓端粒缩短^[42]，恢复衰老细胞活力，因而其广泛应用于高端化妆品中，被称为“抗糖基化卫士”。此外，研究表明肌肽可以增强免疫力，对糖尿病并发症^[43]、心脏病^[44]具有预防作用。因其能够与铜和锌螯合，对阿尔兹海默症也有一定的预防作用^[45]。 β -丙氨酸可用于合成帕米磷酸二钠，该药物属于骨吸收抑制剂，临床上常用于治疗骨质疏松^[46]、恶性肿瘤骨转移以及并发的高钙血症^[47]。 β -丙氨酸也可用于合成巴柳氮，对溃疡性结肠炎有很好的治疗作用^[48]。

在食品领域， β -丙氨酸由于其特殊的鲜甜味以及营养强化作用，常被用做食品添加剂或调味剂。 β -丙氨酸赋予食品美味的同时，缓和食品中咸酸苦辣等刺激性味道。其与鱼露复配使用时，能够显著提高鱼露氨基酸态氮含量，提高鱼露的味道与口感。 β -丙氨酸也可以作为宠物的诱食剂，常用于部分高品质宠物干粮、湿粮，不仅能让宠物更爱吃，也让宠物吃得更健康。当下流行 0 糖 0 卡健康饮食，而 β -丙氨酸就是一种减糖方案，其甜度是蔗糖的 1.2 倍，但不会引起糖尿病、龋齿等疾病。除此以外， β -丙氨酸也可以作为运动员的营养补充剂，补充 β -丙氨酸后，机体内肌肽浓度升高，能够缓解因高强度运动带来的肌肉酸痛，提高肌肉耐力^[49,50]。

在化工等领域， β -丙氨酸高聚体能够净化污水^[51]； β -丙氨酸是丙烯酰胺、丙烯腈等含氮化合物合成的中间体^[52]； β -丙氨酸能够增强壳聚糖/聚 γ -谷氨酸水凝胶的交联从而能够应用于伤口敷料^[53]，此外，电镀过程加入 β -丙氨酸可以起到延缓腐蚀的作用，铅中毒后补充 β -丙氨酸可以解毒。

1.2.3 β -丙氨酸合成方法的概述

目前合成 β -丙氨酸主要有化学合成法和生物合成法。化学合成法是最早合成 β -丙氨酸主要的方法，根据合成所用的原料不同，又分为以下几种：

(1) 丙烯酸法，顾名思义，以丙烯酸、丙烯酸盐为原料，通过与氨水进行氨化反应得到 β -丙氨酸，但该方法的反应条件较为苛刻，需要高温高压。该法目前报道的最高转化率为 96%^[54]，纯度为 99.61%^[55]。

(2) 丙烯腈法，该法有两种不同的途径，一种是通过丙烯腈氨化得到 β -丙氨酸，同样需要高温高压的条件，另一种途径是通过氨化水解，丙烯腈先与氨水氨化生成 β -氨基丙腈， β -氨基丙腈再经过水解生成 β -丙氨酸。该法目前报道的最高转化率为 95%，纯度为 99.5%^[56]。

(3) 琥珀酰亚胺法，该方法原料是琥珀酰亚胺，工业上一般很少使用，受制于昂贵的原料成本、复杂的合成工艺、严格的合成条件。

总而言之，虽然化学法合成 β -丙氨酸转化率以及纯度能够达到 95% 以上，但是该方法对反应条件的要求都比较严格，需要高温高压或者强酸强碱^[57]，耗能大，这与绿色低碳发展的理念背道而驰。相反，生物合成法反应条件温和，环保，有望取代化学合成法。

生物合成法是目前研究的热点，该法的生产成本低、绿色环保，主要有微生物发酵法和酶催化法。

(1) 微生物发酵法，该法主要是利用代谢工程、合成生物学等工程化手段对宿主菌进行系统改造，改变原有代谢流，使代谢流更多的流向合成目标产物 β -丙氨酸的方向。该方法的优势在于所用底物较为便宜，通常是以葡萄糖、甘油、半乳糖作为底物，具有较大的商业价值且绿色环保，但是该法普遍存在发酵周期长、副产物多、产量低、产物难以提纯的问题。该法常用的基因工程菌为大肠杆菌 *E.coli*^[58] 和谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum*^[59]。该法根据是否需要氧气，又分为好氧代谢途径和厌氧代谢途径。①好氧代谢途径分为三羧酸循环的氧化分支途径以及乙醛酸循环途径，由于氧气的存在，工程菌长势好，代谢快，产量高，但是代谢路径较为复杂，中间产物多。Miao 等人^[60]以脂肪酸为原料，构建了乙醛酸-TCA 途径合成 β -丙氨酸，催化 49 h，产量达 72.05 g·L⁻¹。②厌氧代谢主要是三羧酸循环的还原分支途径，该途径代谢路径短，理论产量高，但是该途径菌株生长较慢。

(2) 酶催化法，根据催化所用酶的不同，该法又分为腈水解法（腈水解酶催化）、天冬氨酸酶法以及 PanD 法（L-天冬氨酸 α -脱羧酶催化）。①腈水解法以 β -氨基丙腈为底物进行水解反应生成 β -丙氨酸。国外最早发现该酶并对其进行了研究，如及川利洋等利用 *Adyrhizobium japonicum* USDA110 来源的腈水解酶转化 β -氨基丙腈，1 h 转化 1% 的 β -氨基丙腈生成 3.6 g·L⁻¹ 的 β -丙氨酸。国内目前报道的来自 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 的腈水解酶的拥有最高的转化率，为 76%。该方法主要存在的问题是过高的底物抑制，转化过程中副产物多，不利于后期产物的提纯。②天冬氨酸酶法：以丙烯酸为

底物，氨水作为氨基供体，通过天冬氨酸酶进行催化加氨，该法是目前生产 β -丙氨酸常用的方法，由 Wu 等人^[61]重新设计 YM55-1 天冬氨酸酶发现，重新设计后的该酶能够催化氨不对成加成取代丙烯酸， β 区域选择性达 99%，但该法也存在天冬氨酸酶活性低的问题。③PanD 法，该法以 L-天冬氨酸为底物，通过 PanD 酶催化 L-天冬氨酸脱去 α 羧基从而生成 β -丙氨酸，如图 1-3。PanD 酶是生物合成法中最为关键的酶，微生物发酵法也同样受制于 PanD 酶。该酶最早在 1975 年由 Manuel 等人^[13]发现并将其命名为 PanD；2007 年国内学者高丽娟等人^[18]表达了大肠来源的 PanD 并进行了上罐发酵，最终 β -丙氨酸产量为 $4.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

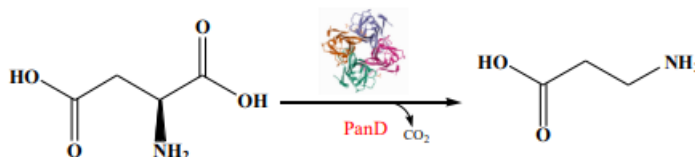


图 1-3 PanD 的催化脱羧反应

Fig. 1-3 Catalytic decarboxylation of PanD

根据催化所用酶的数量，又有双酶偶联法、三酶偶联法，该类方法通常以马来酸、富马酸为底物，串联马来酸异构酶、L-天冬氨酸酶，进行一锅法合成 β -丙氨酸，该法虽然能够降低原料成本，但存在多酶催化不协同、产物难以分离纯化的问题。

1.3 酶的分子改造

传统化学合成加剧了生态恶化、环境污染的问题，对能源也造成了极大的浪费，酶作为天然的生物催化剂，具有反应条件温和、高度专一性、可生物降解等优势，广泛应用于食品、饲料、造纸、纺织、材料、精细化学品等多个行业，是生物制造产业的“芯片”。近年来，研究者通过基因挖掘、宏基因组方法挖掘了越来越多有价值的生物酶，有些酶显示出对立体化学和区域选择性的完美控制，有些酶则显示出广泛的特异性，任何一个特征都可能对工业和合成应用具有吸引力。然而，很少有酶能够在工业上方便且经济上有利的条件下自然催化所需的反应。稳定性差、催化能力差、底物普适性差等问题制约着酶的大规模应用，而对天然酶进行改造，能够改善上述问题，使酶能够更好的在工业环境下发挥作用。根据突变体文库的构建方法，酶分子改造主要有以下策略三种策略：定向进化（非理性设计）、半理性设计和理性设计，具体改造策略如图 1-4。

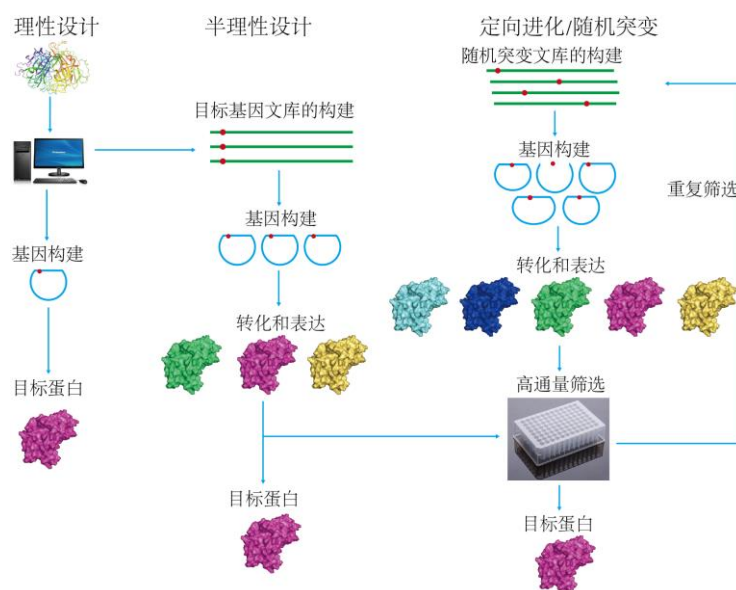


图 1-4 酶的分子改造策略

Fig. 1-4 Molecular modification strategies for enzymes

1.3.1 定向进化

定向进化即非理性设计，也叫“代替自然选择的上帝之手”，适用于对蛋白质的结构与功能不了解的情况，通过在实验室中模拟自然进化的过程，对目标基因进行连续不断的随机突变，在较短的时间内完成自然进化可能需要上万年的时间过程，从而筛选出具有特定表型或特定功能的酶，该观点在 1978 年由 Michael Smith 首次提出^[62]。由于每个氨基酸都可以有 19 个替代，准备一个全面的文库来覆盖蛋白质的整个突变空间不现实，随机突变可以对整个基因序列进行最佳稀疏采样，以确定与所需蛋白质特性密切相关的热点。定向进化可用于提高酶的热稳定性，也可用于提高酶的催化活性、立体选择性等。酶的定向进化主要有以下三步：随机突变或基因重组构建突变体库；对突变体库进行筛选，获得功能提高的突变体；以突变体为起点进行迭代定向进化。目前定向进化突变体文库的构建主要有以下几种方法：

(1) 易错 PCR

易错 PCR 最早由 Leung 等人^[63]提出，至今仍是最常用的体外随机突变方法。易错 PCR 主要通过在复制目标基因的同时引入具有更高突变率的随机突变(每个 bp 10^{-4})来模拟自然发生的不完美的 DNA 复制过程。该技术通过改变 PCR 反应体系实现，扩增产物的错配率越高，转化子随机突变率也就越高，通常是在非标准条件下使用低保真度 DNA 聚合酶（如 Taq 和突变酶聚合酶）在 PCR 扩增过程中产生点突变。增加体系中 Mg^{2+} 浓度、补充 Mn^{2+} 、使用不平衡的 dNTP 浓度或延长 PCR 周期都可降低碱基配对的保真度，从而产生不同的点突变或多点突变。该方法的难点在于随机突变体文库巨大耗时耗力且依赖于高通量高分辨率的筛选方法。研究者基于易错 PCR 技术，已成功筛选出催化活性提高、热稳定性提高的酶。Su 等人^[64]通过易错 PCR 技术构建海藻糖合成酶突变体文库，经过两轮的迭代易错 PCR，筛选出活性提高 2.4 倍的突变体；Feng 等人^[65]

利用易错 PCR 技术对 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶进行热稳定性改造, 经过两轮筛选, 获得的突变体在 60°C 的半衰期是野生型的 9.47 倍。

(2) DNA 改组

DNA 改组最早由 Stemme 等人^[66]开发, 用于体外突变文库的构建。该方法可用于同源基因间的重组, 也可用于非同源基因间的重组。非同源重组由于不同 DNA 的序列相似度低, 重组后的蛋白可能在结构方面不稳定, 而同源重组利用亲本基因重组, 能够将优良性状进行整合获得优良的突变体。同源重组在定向进化中发挥着关键作用, 在重组有益突变的同时去除有害突变, 迭代同源重组可以产生很多随机突变无法产生的序列, 它提供了“功能多样性”^[67], 有助于提高酶活性^[68]、稳定性^[69], 甚至可用于同时设计单个蛋白质的多种优良特性^[70], 这是易错 PCR 等随机突变技术难以实现的, 但是该方法存在亲本链污染、重组文库多样性低的问题。Liu 等人^[71]使用 DNA 改组对 GH11 木聚糖酶进行定向进化, 获得了三株比活和催化效率提高的菌株。也有研究者将易错 PCR 与 DNA 改组结合, Luo 等人^[72]通过这种方法实现了磷酸三酯酶活性 25 倍的提高。

(3) 基于 CRISPR 的定向进化 (CDE)

体外突变是强大的, 但包括基因多样化、转染、筛选和分离的迭代周期是耗时耗力的。完整活细胞中的突变可以避免重复的克隆和转化/转染步骤, 并且可以同时突变多个目标残基。如果所需的表型能够与细胞生长相联系或以高通量的方式进行筛选, 理论上, 体内突变可以在实验室中加速自然进化。CRISPR/Cas 技术主要用于体内定向进化, 能够在原核、真核细胞体内, 实现对基因的插入、删除和替换, 基于此技术发展了一系列高效的定向进化工具。来源于化脓性链球菌的 CRISPR/Cas9 系统需要识别 PAM 序列, 因而可以限制靶向的位点^[73]。对不同靶点设计不同的 sgRNA^[74], 将 sgRNA 与 Cas9 组装并结合到靶向 3' 处的 PAM 序列, sgRNA 引导 Cas 蛋白切割 DNA 产生双键断裂, 激活 DNA 的修复机制, 能够实现对目标基因的突变。依据 CRISPR/Cas9 系统的原理, 目前开发了许多将 dCas9 或 nCas9 与胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶融合的碱基编辑工具^[75], 该工具作用时不会产生双键断裂, 融合蛋白在 sgRNA 的引导下结合到靶标 DNA 上进行碱基的替换^[76]。胞嘧啶碱基编辑器 (CBE) 能够实现 C-G 碱基对到 T-A 碱基对的替换, 腺嘌呤碱基编辑器 (ABE) 可以实现 T-A 碱基对到 C-G 碱基对的替换。CDE 已成为定向进化的有力工具, 研究者通过 EvolvR^[77]、CRISPR-X^[78]、CasPER^[79]已成功实现了多种基因的定向进化。Liu 等人^[80]构建了 141 条 sgRNA, 通过碱基编辑系统对水稻内源性乙酰辅酶 A 羧化酶进行改造, 成功获得了具有除草剂抗性的突变体。

1.3.2 半理性设计

定向进化实验通常是劳动密集型的, 定向进化的效率受制于突变文库的数量和质量。半理性设计可以减少库的大小并简化实验筛选, 可以看作是定向进化与理性设计的结合, 兼顾两者的优点。半理性设计是在已知明确的蛋白结构与功能或使用生物信息学工具、计算机模拟预测对蛋白质的结构、序列与功能有一定了解的情况下, 对关键位点 (活性

中心位点、底物结合位点)进行饱和突变或选取特定密码子突变的技术^[81],从而创建更小但更有效的文库以减少对高通量筛选方法的依赖并增加获得改进突变体的可能性,应用非常广泛^[82]。根据模型使用的信息将计算工具分类为基于序列的计算工具、基于结构的计算工具。基于序列的计算需要对目的蛋白及同源蛋白进行多序列比对来预测突变的影响,该方法仅需要了解目标蛋白的序列信息,计算成本相对较低,FOLDEF^[83]、PANTHER^[84]、PoPMuSiC 2.1^[85]等均可实现。基于结构的计算工具,如 CAVER 3.0^[86]、CASTp^[87],需要输入蛋白质的 3D 结构。这些工具通过分析原子间接触、表面特征、底物相互作用和许多其他物理性质来进行预测。将预测的位点与定向进化的手段结合,如迭代饱和突变 (ISM)、组合活性中心饱和突变 (CAST)、三密码子饱和突变 (TCSM),能够更加高效的获取目标突变体。Wang 等人^[88]基于序列与结构对木聚糖酶 XynLC9 进行半理性设计,采用 NDT 密码子对 Tyr5 和 Gln7 进行迭代饱和突变,对 Trp6、Asn8 进行单点饱和突变,对正向突变体进行有效组合后,筛选到双点突变体,以榉木聚糖为底物时,催化效率提高 47%。Huang 等人^[89]在对酮还原酶 P2-D12 与底物的晶体结构解析的基础上,选取活性位点附近 10 个氨基酸,将其突变为特定氨基酸,并进行三轮迭代,得到了能够提高对映选择性的突变体。

1.3.3 理性设计

最初的理性设计是以已知的蛋白质的结构与功能为基础,经过计算设计或是深度学习,将蛋白质的某个位点突变为某一特定氨基酸,从而提高酶某一方面(活性、稳定性、耐受性)的特性。Yang 等人^[90]对 ω 转氨酶进行催化活性改造,通过结晶获得蛋白质晶体结构后,使用量子动力学(QM)解析脱氨反应的催化机制以及催化过程中能量的变化。基于该酶的限速过渡态进行理性设计,采用 Rosetta 对底物活性中心 4 Å 内的关键氨基酸残基进行虚拟突变,以 Rosetta 能量函数评估约束的惩罚分数、底物与活性位点的亲和力和力作为标准,确定了 14 突变位点,经过实验验证均能够提升活性,其中最佳突变体 k_{cat}/K_M 提高了 1660 倍。随着对蛋白质序列、结构与功能之间的关系不断解析,理性设计正步入从头设计蛋白质的时代,从头设计能够制造出自然界中不存在,但具有特定催化功能的蛋白质^[91]。目前,在自然界的蛋白支架上锚定金属离子成功设计了人工金属酶^[92],对家族酶进行序列计算拼接实现了人工酶支架设计^[93]。David Baker 等人^[94]通过深度学习实现了蛋白支架、催化中心结合模式的重新设计,设计出两种新型的具有高度热稳定性的荧光素酶。虽然理性设计针对性更强,突变的工作量更小,但也存在着诸多缺点,需要对蛋白质准确的结构与催化反应机制足够了解,对于未被解析的酶需要先结晶确定其结构,且大部分的理性设计往往集中在活性中心和催化口袋附近,忽视了一些其他可能影响结构的部位。对于从头设计,由于设计的精度不够、对过渡态信息了解不够,设计出的许多酶活性过低,仍然需要经过分子改造才能进一步应用于工业生产。

1.4 突变位点的选择

随机突变产生的突变文库中, 高达 60~70%的突变是负向的, 30~40%是中性的, 只有不到 5%的正向突变^[95], 定向进化产生的突变体文库非常巨大, 缺乏高通量筛选方法, 无异于大海捞针。蛋白质结构数据的不断丰富以及 AlphaFold2 蛋白预测的高精度, 将使定向进化更加容易。以蛋白质结构或序列为导向能够产生“智能”的突变体库, 增加获得活性提升突变体的可能性^[96]。“智能”的突变体文库产生的前提是合适的突变位点, 经过统计, 突变热点大致分为两类: 基于序列的热点, 包括在多个序列比对中保守但在目标蛋白序列中不同的位点 (CbD) 和共进化残基, 以及基于蛋白立体结构的热点, 包括活性位点残基、底物通道位点、柔性位点、与活性中心耦合的远端位点。

1.4.1 保守但不同的位点 (CbD)

目前 UniProt 蛋白质数据库中的序列已经超过 1.77 亿条, 这使得大量的序列比对成为可能。进行同源多序列比对能够识别在序列库中保守但在目标蛋白序列中不同的位点, 将该位点突变为相同的保守氨基酸。如果存在功能相同, 但活性更好的同源酶时, 可以比较两种酶的催化区域寻找突变的位点, 在特定位置出现频率最高的氨基酸比相同位置的其他残基对蛋白功能的贡献更大。以 CbD 为突变位点, 已成功实现了酶活性、稳定性对映选择性的提升。Gomez-Fernandez 等人^[97]通过多序列比对进行共识设计, 提高了漆酶的热稳定性。

1.4.2 共进化残基

进化过程中, 在三级结构中相互接近的残基对经常共同进化以维持其结构。当一个变成带正电的残基时, 另一个变成带负电的残基。这些残基保持了整体结构功能完整性, 同时能够微调蛋白质的功能, 包括催化活性、底物选择性和对异常环境条件的耐受性, 这些残基称为共进化残基。共进化残基对蛋白质的稳定性和折叠非常重要。以共进化残基作为酶改造的热点有可能将新功能引入蛋白质, 或在稳定性方面产生变化。Wang 等人^[98]采用进化耦合饱和诱变 (ECSM) 对普鲁兰酶进行改造, 通过计算残基对的协方差来识别饱和突变残基。选择了 7 对残基作为进化突变热点, 这些残基均不位于或靠近活性位点, 经突变和筛选得到的性能最好的四突变体 K631V-Q597K-D541I-D473E 的 k_{cat} 和 $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 分别比野生型酶提高了 3.0 倍和 6.3 倍, 说明共进化分析可以识别影响酶活性的远端位点。

1.4.3 活性位点残基

活性位点是反应中心, 它与底物结合, 缓和过渡态的形成, 然后释放产物^[99]。活性位点是由结合底物的氨基酸残基和催化底物反应的残基组成。对活性位点残基的突变往往会极大地改变酶的性质。虽然大多数突变都会导致酶失活。但有时, 突变体能够提高催化活性或赋予特定的催化活性, 拓宽底物范围, 改变立体特异性、区域选择性、对映

选择性、热稳定性等。Wang 等人^[100]对赖氨酸羟化酶活性口袋的 6 个残基进行饱和突变，获得活性提高 4.16 倍的突变体。

1.4.4 底物通道位点

在有些酶中（如脱氢酶），活性位点通常深埋在蛋白质的核心。对于这类酶，底物必须穿过蛋白体才能到达活性位点。蛋白质核心内的活性位点通过一个或多个通道与蛋白质表面连接^[101]。底物需要经历进入底物通道，到达活性中心并结合的过程。这就要求底物不仅需要与活性中心具有不错的互补性，也需要与底物通道之间有一定的互补能力。目前，对底物通道残基改造已成功实现了酶活性、稳定性、对映选择性的提升。Prakinec K 等人^[102]对黄素依赖型卤化酶进行底物通道工程改造，提高了卤化酶的催化效率。

1.4.5 柔性位点

高柔性的位点常位于表面的 loop 环上。柔性位点能够决定蛋白质功能，如蛋白质-蛋白质相互作用、配体结合、变构调节和信号转导。柔性区域与其他氨基酸的接触次数相对较少，柔性区域的较大热波动可能会使蛋白质的疏水核心暴露于水环境中，从而破坏蛋白质构象，而刚性结构很大程度能够提高热稳定性。以高柔性区域为目标区域，Li 等人^[103]对黑曲霉来源的木聚糖酶进行改造，提高了其热稳定性。

1.4.6 与活性中心偶联的远端位点

自然界倾向于利用最小的扰动以及最大的响应（通过异构）来改变关键功能位点的动态。远端突变与功能相关，一些突变提高了热稳定性和蛋白质表达，而另一些则通过调节构象改变对配体或底物的结合亲和力从而提高催化效率。Maria-Solano 等人^[104]通过耦合 MD 模拟的互相关方法对色氨酸合酶远端位点进行计算设计，增强了该酶的活性。

1.5 本课题的立题和主要研究内容

1.5.1 课题立意

丙酮酰依赖型 L-天冬氨酸 α -脱羧酶（PanD）能够专一的催化 L-天冬氨酸，无需外源添加辅因子，可用于手性拆分 D、L 型天冬氨酸混合物，也可用于酶法直接合成 β -丙氨酸，微生物发酵法从头合成 β -丙氨酸。

L-天冬氨酸 α -脱羧酶催化反应过程条件温和，工艺简单方便、绿色低碳且产物易于分离纯化。其在众多生物法合成 β -丙氨酸的酶中，是比较关键的一种酶。无论是以天冬氨酸为底物进行 α 脱羧，还是通过代谢工程从头合成 β -丙氨酸，均需要 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的参与，但 L-天冬氨酸 α -脱羧酶主要存在酶活性低、催化失活的现象，大大限制了其应用。L-天冬氨酸 α -脱羧酶对于 β -丙氨酸及其下游产物泛酸（维生素 B5）、肌肽的合成尤为关键。目前泛酸的合成也正在向绿色生物合成方向发展，主要以代谢工程为主，无法越过 L-天冬氨酸 α -脱羧酶直接生产泛酸，已有研究通过点突变提高了 L-天冬氨酸 α -脱羧酶的活性，但提升效果不明显，寻找初始活性高的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶，对其进

行分子改造进一步提升活性，强化 L-天冬氨酸 α -脱羧酶催化 L-天冬氨酸合成 β -丙氨酸的能力，对于提高泛酸等 β -丙氨酸下游产物的产量具有重大意义。

1.5.2 课题主要研究内容

针对 PanD 酶活低的问题，本研究挖掘不同来源的 L-天冬氨酸 α -脱羧酶，比较其催化 L-天冬氨酸的活性，基于半理性设计寻找提高杰氏棒杆菌来源 L-天冬氨酸 α -脱羧酶催化活性的位点，测试野生型及突变体全细胞催化 β -丙氨酸的效率，具体内容如下：

- (1) L-天冬氨酸 α -脱羧酶的挖掘以及催化活性、酶活的比较、动力学常数的表征；
- (2) 针对催化活性和稳定性，对杰氏棒杆菌来源 L-天冬氨酸 α -脱羧酶进行半理性设计；对突变体进行酶学性质的表征，包括最适反应温度及温度稳定性、最适 pH 及 pH 稳定性、熔融温度、最大底物抑制浓度以及 K_M 和 k_{cat} ；
- (3) 通过分子动力学模拟以及突变前后酶-底物复合结构的变化分析活性提高的因素；
- (4) 测定高密度发酵菌体催化 L-天冬氨酸的转化率以及 β -丙氨酸的产量。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与质粒

本研究所使用的主要菌株和质粒如表 2-1 所示。

表 2-1 主要菌株与质粒

Table 2-1 Strains and plasmids used in this experiment

菌株与质粒	简介	来源
<i>E.coil</i> JM109	克隆宿主	实验室保藏
<i>E.coil</i> BL21(DE3)	表达宿主	实验室保藏
pET-24a(+)空载	含 Kana 抗性、His-Tag	实验室保藏
pET-28a(+)空载	含 Kana 抗性、His-Tag	实验室保藏
pET-28a-CorGlu	Kana 抗性、C 端 His-Tag	实验室保藏
pET-28a-BacSub	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-CorJei	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-LisMon	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-StaAur	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-BacThe	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-CorJei	Kana 抗性、Strep-Tag	本实验构建
pET-28a-CorJei-I88M-Y90F	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-CorJei-I88M-Y90F-C26V	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建
pET-28a-CorJei-I88M-Y90F-R3K	Kana 抗性、C 端 His-Tag	本实验构建

2.1.2 主要仪器与设备

本研究主要使用的仪器与设备如表 2-2 所示。

表 2-2 主要仪器与设备

Table 2-2 The main instruments and equipment used in this experiment

仪器名称	仪器厂家
超低温冷冻冰箱	American New Brunswick Scientific 公司
SW-CJ-1D（1G）净化工作台	苏州净化设备有限公司
BXP-65 电热恒温培养箱	上海博讯实业医疗设备厂
YXQ-LB-75SII 立式压力蒸汽灭菌器	上海博讯实业医疗设备厂
ZQZY-CS8ES 组合式全温震荡培养箱	上海知楚有限公司

续表 2-2 主要仪器与设备

Table 2-2 The main instruments and equipment used in this experiment

仪器名称	仪器厂家
超声波破碎仪（手持、大型）	SONICS 公司、MATERIALS 公司
Purifier AKTA avant 蛋白纯化仪	美国通用电气医疗器械公司
pH 计	METTLER TOLEDO 中国有限公司
XPR204S/AC 电子天平	METTLER TOLEDO 中国有限公司
磁力搅拌器	德国艾卡公司
台式离心机、超速离心机	Hitachi 日立公司
高效液相色谱仪	Hitachi 日立公司
TU-100C 恒温金属浴	上海一恒科学仪器有限公司
T100™ PCR 仪	Bio-Rad 公司
Gel Doc XR+凝胶成像仪	Bio-Rad 公司
Winpact Catalogue 5L 发酵罐	Major Science
UV-18000PC 紫外可见光度计	上海精密仪器仪表有限公司
DiKMA Diamonsil C18(2)色谱柱	迪马科技有限公司
多功能酶标仪	美国伯腾仪器有限公司
Nano DSC	沃特世科技（上海）有限公司

2.1.3 主要试剂及材料

本研究主要使用的试剂和材料如表 2-3 所示。

表 2-3 主要试剂及生产厂商

Table 2-3 The reagents and manufacturers used in this experiment

试剂名称	生产厂商
L-天冬氨酸钠	生工生物工程（上海）股份有限公司
β -丙氨酸	Sigma-Aldrich 公司
酵母提取物	OXOID 公司
蛋白胨	OXOID 公司
2× MultiF Seamless Assembly Mix 组装酶	爱博泰克生物技术公司
Quick Cut DpnI	宝日医生物技术（北京）有限公司
PrimeSTAR Max DNA Polymerase	宝日医生物技术（北京）有限公司
DL10,000 DNA Marker	宝日医生物技术（北京）有限公司
TureColor 双色预染蛋白 Marker	生工生物工程（上海）股份有限公司
5×蛋白上样缓冲液	生工生物工程（上海）股份有限公司
异丙基- β -D-硫代半乳糖苷（IPTG）	生工生物工程（上海）股份有限公司

续表 2-3 主要试剂及生产厂商

Table 2-3 The reagents and manufacturers used in this experiment

试剂名称	生产厂商
硫酸卡那霉素	生工生物工程（上海）股份有限公司
Takara Bradford Protein Assay Kit	宝日医生物技术（北京）有限公司
异硫氰酸苯酯（PITC）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
高纯度质粒小提试剂盒	康为世纪生物科技股份有限公司
快速 DNA 产物纯化试剂盒	康为世纪生物科技股份有限公司
快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	康为世纪生物科技股份有限公司
Goldview 核酸染料	翌圣生物科技（上海）股份有限公司
高效感受态细胞制备试剂盒	生工生物工程（上海）股份有限公司
乙腈（色谱纯）	国药集团化学试剂有限公司
甲醇（色谱纯）	国药集团化学试剂有限公司
无水乙酸钠	国药集团化学试剂有限公司
正己烷	上海泰坦科技股份有限公司
三乙胺（色谱纯）	上海泰坦科技股份有限公司
琼脂糖	北京伊诺凯科技有限公司
硅胶预制板	国药集团化学试剂有限公司
Tris-HCl/SDS 缓冲液（pH 8.8）、（pH 6.8）	生工生物工程（上海）股份有限公司
30%Arc-Bis（29:1）	生工生物工程（上海）股份有限公司

2.1.4 L-天冬氨酸 α -脱羧酶（PanD）基因的获取

本研究所使用的 PanD 基因以及简写如表 2-4 所示。

表 2-4 PanD 的来源及缩写

Table 2-4 The PanD gene and its origin used in this experiment

NCBI gene ID	基因来源	本研究中所使用的缩写
69620590	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	CorGlu
939033	<i>Bacillus subtilis</i> 168	BacSub
3432856	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	CorJei
985787	<i>Listeria Monocytogenes</i>	LisMon
69589099	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	BacThe
56749215	<i>Staphylococcus aureus</i>	StaAur

通过 NCBI 查询目的基因碱基序列后交由安升达生物科技有限公司合成，基因序列经过大肠杆菌密码子优化后合成在载体 pUC-GW-Amp 上。

2.1.5 主要培养基的配置

(1) LB 液体培养基: 称取 5 g 酵母粉, 10 g 蛋白胨, 10 g 氯化钠, 定容至 1 L。

(2) LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基的基础上添加琼脂粉, 添加量为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.6 主要试剂的配置

(1) 50×TAE: 称取 242 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 37.2 g 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA- Na_2), 加入约 500 mL 去离子水, 充分溶解后加入 57.1 mL 冰醋酸溶液, 定容至 1 L。

(2) 核酸胶: 50×TAE 稀释为 1×TAE, 加入 0.8% 的琼脂糖, 加热充分溶解后使用。

(3) 10%过硫酸铵: 称取 1 g 过硫酸铵, 用 10 mL 去离子水溶解, 4℃保存。

(4) SDS-PAGE 蛋白胶: 15%分离胶: 以 5 mL 为例, 加入 1.2 mL 去离子水, 1.5 mL 30%Arc-Bis (29:1), 1.25 mL Tris-HCl/SDS 缓冲液 (pH 8.8), 0.05 mL 10%过硫酸铵, 0.003 mL TEMED, 充分混匀后加入蛋白胶板中, 上端留 2 cm 左右加入浓缩胶; 5%浓缩胶: 以 2 mL 为例, 加入 1.17 mL 去离子水, 0.33 mL 30%Arc-Bis (29:1), 0.5 mL Tris-HCl/SDS 缓冲液 (pH 6.8), 0.02 mL 10%过硫酸铵, 0.002 mL TEMED, 充分混匀后加满蛋白胶板, 立即插入 10 孔梳子, 等待凝固。

(5) 蛋白胶染色液: 称取 2.5 g 考马斯亮蓝 R250, 量取 550 mL 甲醇, 100 mL 冰醋酸溶液, 超纯水定容至 1 L。

(6) 蛋白胶脱色液: 量取 100 mL 甲醇, 100 mL 冰醋酸, 超纯水定容至 1 L。

(7) 卡那霉素母液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$): 称取硫酸卡那霉素 5 g, 用无菌水定容至 100 mL, 经过无菌滤膜分装后置于-20℃冰箱中保存。

(8) IPTG 母液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 2.4 g 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷, 使用无菌水定容至 100 mL, 经过无菌滤膜分装后置于-20℃冰箱中保存。

(9) 展开剂: 称取 30 g 十二烷基硫酸钠 (SDS), 量取 81 mL 去离子水, 173 mL 正丁醇, 30.3 mL 正己烷, 混合后充分溶解。

(10) 显色剂: 称取 1 g 茚三酮, 使用无水乙醇定容至 100 mL。

(11) 衍生试剂: 三乙胺-乙腈: 量取 192 mL 色谱纯乙腈, 28 mL 色谱纯三乙胺混匀; PITC-乙腈: 取 166 mL 色谱纯乙腈, 向其中加入 2 mL 异硫脲酸苯酯, 混匀后备用。

(12) L-天冬氨酸钠溶液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 1.73 g L-天冬氨酸钠固体, 使用去离子水定容至 100 mL, 经过无菌滤膜分装后置于-20℃冰箱中保存。

(13) β-丙氨酸溶液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 0.89 g β-丙氨酸固体, 使用去离子水定容至 100 mL, 经过无菌滤膜分装后置于-20℃冰箱中保存。

(14) 蛋白纯化所需溶液: 硫酸镍: 称取 $26.28 \text{ g NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 使用去离子水定容至 1 L; 8 倍磷酸盐: 称取 28.57 g 二水合磷酸二氢钠, 233.8 g 十二水合磷酸氢二钠, 12.52 g 氯化钠, 先加入 800 mL 超纯水, 使用氢氧化钠调节 pH 至 7.4, 继续加水定容至 1 L; $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑: 称取 136.16 g 咪唑, 先加入 800 mL 超纯水, 使用稀盐酸调节 pH 至 7.4, 继续加水定容至 1 L。结合缓冲液、洗脱缓冲液使用 8 倍磷酸盐以及 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2-5 蛋白纯化缓冲液

1 L	8 倍磷酸盐	2 mol·L ⁻¹ 咪唑
结合缓冲液 (Binding buffer)	125 mL	10 mL
洗脱缓冲液 (Washing buffer)	125 mL	250 mL

2.2 pET28a-PanD 质粒的构建

引物设计采用 SnapGene 软件，将目的基因插入到 pET28a 载体 RBS 后并在 C 端融合 His-Tag。设计引物克隆 pET28a 载体以及 pUC 载体上的目的基因，如表 2-6 所示。

Table 2-6 Primers used in target gene cloning

PCR 反应体系为 50 μL ，按照质粒模板 1 μL ，上游引物 1 μL ，下游引物 1 μL ，PrimeSTAR Max 高保真酶 25 μL ，无菌水 22 μL 添加。具体 PCR 反应的条件及循环数如表 2-7 所示。

表 2-7 PCR 反应条件

Table 2-7 PCR reaction condition

温度	时间	循环数
98°C	1 min	-
98°C	10 s	-
55°C	15 s	30 次
72°C	目的基因: 30 s, 骨架: 1.5 min	-
72°C	5 min	-

2.2.2 目的基因与载体骨架的连接

目的基因以及载体骨架经过 0.8%的琼脂糖凝胶电泳验证后，加入 5 μL Quick Cut Buffer，1 μL DpnI，42°C消化 1 h。消化完成后，使用快速 DNA 产物纯化试剂盒进行纯化。经纯化的目的基因与载体骨架的连接采用 In-Fusion 无缝克隆，按照目的基因:载体骨架为 1:3 混合，加入 MultiF Seamless Assembly Mix 组装酶，50°C反应 30 min，即可转化宿主大肠杆菌。

2.2.3 大肠杆菌感受态的制备及化学转化

感受态细胞的制备方法参考高效感受态细胞制备试剂盒说明书。取出保存在-80°C冰箱的 *E. coli* JM109 感受态细胞置于冰盒中，向其中加入 10 μL 经组装的 PCR 产物并混匀，置于冰盒中孵育 30 min，随后放入 42°C金属浴中热激 1.5 min 取出后继续冰浴 3~5 min，加入 800 μL LB 培养基，37°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 复苏 30~45 min 后，3000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min，弃去上层 700 μL 培养基，余下 100 μL 吹打均匀，涂布于含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的平板上，放入 37°C恒温培养箱培养 12 h。

2.2.4 阳性转化子的鉴定

挑取平板单克隆，接种于含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的试管中，放入 37°C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中培养 10~12 h，吸取 2 mL 菌液提取质粒，质粒的提取参考康为世纪高纯度质粒小提试剂盒说明书。吸取 10 μL 质粒送至安升达公司进行测序，测序结果比对正确的即为阳性转化子。

2.3 pET28a-PanD 的异源表达及纯化

2.3.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 的诱导表达

将构建好的质粒转化表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3)，挑取单克隆接种于 5 mL LB 培

培养基（含有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素）中，置于 37°C 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中培养 12 h 取出，作为种子液。按 1%（体积分数）接种量接种于含有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 100 mL LB 培养基中， 37°C 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时，加入终浓度为 $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG， 25°C 诱导表达 16~18 h 左右。

2.3.2 L-天冬氨酸 α -脱羧酶（PanD）的纯化

PanD 的纯化步骤如下：

（1）使用立式冷冻离心机在 4°C 、 $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下收集 2.3.1 经过诱导表达的细胞；

（2）加入 10 mL Binding Buffer 重悬细胞，将重悬后的细胞倒入破碎杯，置于冰上破碎 20 min，破 3 s，停 7 s，直至破清，将破碎液 4°C 、 $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min，离心后的上清用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤备用；

（3）对 1 mL His Trap HP 纯化柱进行充镍，连接纯化柱，使用 Binding Buffer 冲洗 10 mL 平衡柱子；

（4）将过滤后的蛋白以 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度流过纯化柱，用 Binding Buffer 冲洗管路中未挂柱的蛋白，直至 UV 曲线再次平衡；

（5）使用 Washing Buffer 进行线性洗脱，浓度从 0~100%，冲洗 17 个柱体积，期间观察到 UV 曲线快速上升时，手动收集蛋白；

（6）将收集到的蛋白放入 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐（pH 7.0）缓冲液中， 4°C 过夜透析除去咪唑。

2.3.3 蛋白浓度的测定

利用 Brandford 法测定纯酶浓度，标准样品购于 Takara，其母液浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，稀释成 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用，标准样品的稀释如表 2-8 所示。将纯化后的蛋白稀释至标准曲线线性范围内，利用酶标仪测定 OD_{595} 下的吸光值。以吸光值为横坐标，浓度为纵坐标，进行拟合，根据拟合曲线即可计算出纯酶浓度。

表 2-8 蛋白浓度标准曲线

Table 2-8 Standard curve of protein concentration

浓度梯度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0	20	40	60	80	100
$1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标品 (μL)	0	20	40	60	80	100
ddH ₂ O (μL)	100	80	60	40	20	0

2.3.4 SDS-PAGE 蛋白样品的制备

吸取 100 μL 上述经滤膜过滤的细胞破碎液以及纯化后的纯酶，加入 25 μL 5 $\times$ 蛋白质上样缓冲液混匀， 100°C 金属浴煮沸 15 min，保存在 -20°C 冰箱备用。

2.4 L-天冬氨酸 α -脱羧酶 (PanD) 酶学性质的测定

2.4.1 L-天冬氨酸和 β -丙氨酸的检测

由于 L-天冬氨酸和 β -丙氨酸没有紫外吸收, 需要异硫氰酸苯酯 (PITC) 衍生后才能使用 HPLC 紫外检测器进行检测。异硫氰酸苯酯 (PITC) 能够与 L-天冬氨酸和 β -丙氨酸反应生成带苯环的 PTC-氨基酸衍生物, 该衍生物可在 UV 值 254 nm 处检测到。

具体衍生方法和条件为: 取 500 μL 适当稀释后的反应液于 2 mL 离心管中, 向离心管中加入 250 μL 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三乙胺-乙腈溶液以及 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PITC-乙腈溶液, 震荡混匀后避光反应 50 min, 反应结束后, 加入 700 μL 正己烷进行终止, 充分震荡混匀。待离心管中溶液分层后, 使用 1 mL 注射器吸取下层溶液, 使用 0.22 μm 有机滤头过滤至液相小瓶中备用。

具体检测条件为: 色谱柱为 DiKMA Diamonsil C18(2) (5 μm 4.6 mm $\times$ 250 mm); 流动相 A 为 97% (体积分数), pH 7.0 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠-乙腈溶液, 流动相 B 溶液为 80% (体积分数) 乙腈水溶液, 均需使用 0.45 μm 有机滤膜抽滤并进行脱气处理; 液相检测条件为: 检测波长 254 nm, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱程序为: 0~30 min, A 溶液由 95% 下降至 70%; 35~40 min, A 溶液由 70% 上升至 95%; 40~42 min, A 溶液浓度保持不变。

2.4.2 纯酶酶活测定方法

纯酶反应体系为 1 mL, 使用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液对加 L-天冬氨酸钠母液进行稀释, 稀释至终浓度为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴预热 10 min, 加入 0.1 mg 的纯酶, 反应 10 min 后, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中灭活处理 15 min。

比酶活定义: 在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 条件下, 每分钟转化底物 L-天冬氨酸钠生成 1 μmol β -丙氨酸所需要的酶量定义为一个酶活单位 U ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)。

2.4.3 最适温度的测定

将 0.1 mg 重组酶分别置于 30、37、40、45、55、60、65、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中预热 5 min, 然后与同样预热过 5 min 的 pH 7.0 的 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物 L-天冬氨酸钠反应 10 min, 测定酶活, 分析酶的最适反应温度。

2.4.4 温度稳定性测定

将 0.1 mg 重组酶液置于 30、37、40、50、55、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 置于冰上冷却 5 min。加入终浓度 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物 L-天冬氨酸钠, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 条件下反应 10 min 测定残余酶活。将最高酶活定义为 100%, 分析温度对酶稳定性的影响。

2.4.5 最适 pH 测定

将 0.1 mg 重组酶置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴预热 5 min, 预热后分别加至 pH 3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0 的缓冲液中, 缓冲液中含有 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物 L-天冬

氨酸钠，反应 10 min，测定酶活性，分析酶的最适反应 pH。

2.4.6 pH 稳定性测定

将 0.1 mg 重组酶液置于 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲液中，孵育 5 h 后，加入终浓度 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 底物 L-天冬氨酸钠，于 37°C ，pH 7.0 条件下反应 10 min 测定残余酶活。将最高酶活定义为 100%，分析 pH 对酶稳定性的影响。

2.4.7 底物抑制测定

在终浓度 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纯酶液中，分别加入终浓度（1、2、5、10、20、50、80、100、200、400、600 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）L-天冬氨酸钠，于 37°C ，pH 7.0 条件下，反应 10 min，测定不同浓度底物下酶活的变化。

2.4.8 动力学常数测定

在终浓度 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纯酶液中，分别加入终浓度（1、2、5、10、20、50、80、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）L-天冬氨酸钠，于 37°C ，pH 7.0 条件下，反应 5 min，随后 100°C 、15 min 终止反应，按照 2.4.1 的方法检测 β -丙氨酸产量，测定初始反应速率。采用 GraphPad Prism9 软件中的非线性拟合模型 Michaelis-Menten 对数据进行拟合，得到 K_M 和 $V_{\max}$ 值，进而计算 k_{cat} 和 k_{cat}/K_M 值。

2.4.9 熔融温度（ T_m ）的测定

杰氏棒杆菌来源 PanD 的 T_m 值通过 Nano DSC 测定。具体测定步骤如下：

（1）将超纯水、透析液进行脱气处理，先用超纯水润洗参比池和样品池，再用透析液润洗并充满参比池和样品池，设置温度扫描区间 $30 \sim 130^\circ\text{C}$ ，压力 3 atm，升温速度 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ，重复 3 次；

（2）使用超纯水润洗样品池，将纯酶加入样品池，设置温度扫描区间 $30 \sim 130^\circ\text{C}$ ，压力 3 atm，升温速度 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ，重复 3 次；

（3）使用 Nano 自带分析软件处理数据，使用 Two-State Scaled 模型拟合，即可得到 T_m 值。

2.5 L-天冬氨酸 α -脱羧酶（PanD）的分子改造

2.5.1 L-天冬氨酸 α -脱羧酶（PanD）的改造策略

使用 AlphaFold2 对杰氏棒杆菌来源 PanD 进行结构预测，预测的模型通过 Maestro 软件进行半柔性对接，利用 Rosetta_ddg 对底物活性口袋周围的氨基酸进行虚拟饱和突变，选择底物结合口袋 $5 \text{ \AA}$ 范围内结合自由能降低的非保守位点进行饱和突变。

2.5.2 突变体文库的构建方法

突变引物采用 NNK 简并密码子，引物如表 2-9 所示，通过高保真聚合酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 进行全质粒 PCR，具体反应条件参照 2.2.1。采用 DpnI 酶于 37°C

对 PCR 产物进行酶切以消化野生型模板，随后转化克隆宿主菌 *E. coli* JM109，涂布于平板上，待平板上长出菌落后，悉数洗下平板上的菌落，提取混合质粒，即为突变体文库。

表 2-9 突变体文库构建所用引物

Table 2-9 Primers for mutant library construction

引物名称	引物序列 (5'→3')
26-i-F	CTGCATTATGTGGGCAGCANNKACCATTGATGCGGATCTG
26-i-R	GCTGCCCACATAATGCAG
49-i-F	AACAGATTGATATTGTGGATNNKGATAACGGCAACCGCCTGACC
49-i-R	ATCCACAATATCAATCTGTTCGCCTTCC
55-56-i-F	ATATTGATAACGGCAACCGCANNKNNKACCTATGCGATTACCGGCG
55-56-i-R	GCGGTTGCCGTTATCAATATCCAC
88-90-i-F	GGGCGATCTGGTGATTATCANNKGGCANNKGCGCAGTATAGCGAAGAAG
88-90-i-R	GATAATCACCAGATCGCCCGGGCTAATC

2.5.3 突变体文库的初筛与复筛方法

将混合质粒导入表达宿主菌 (DE3)，涂布于平板上。挑取平板上的单菌落，接种于 96 孔板中，培养一段时间后，转接至另一 96 孔板中，约 2~3 h 后，加入终浓度为 0.3 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导，继续培养 12 h 取出，离心去上清后，加入 500 μL，浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的 L-天冬氨酸钠溶液，放入 37℃ 摇床反应 30 min 后取出，再次离心，上清即为全细胞反应液。

初筛方法：突变体的初筛采用薄层层析，根据 L-天冬氨酸和 β-丙氨酸在固定相和流动相中的溶解度不同，迁移的距离也不同，从而达到分离的目的，筛选突变体时用来定性非常方便。在距离薄板下端边缘 1.5 cm 处划线，样品间隔 1 cm，点样 1 μL，先点上底物 L-天冬氨酸钠和产物 β-丙氨酸，再依次点上全细胞反应液，置于层析缸中，加入展开剂，展开剂没过薄板下端边缘 1 cm 左右，层析约 3 h。取出薄板，用吹风机吹干表面的展开剂后均匀地喷上茚三酮-乙醇溶液进行显色，再使用吹风机吹至出现蓝紫色斑点，即可进行观察定性。将具有正向效果的菌株送至安升达生物技术公司测序，确定突变的位点及氨基酸。

复筛方法：对初筛有正向效果的位点进行纯化，测定纯酶酶活。

2.6 分子动力学模拟方法

本研究所有分子动力学模拟使用 Charmm 36 force field 和 NAMD 3.0.0 软件。杰氏棒杆菌来源 PanD 野生酶以及突变体 (I88M-Y90F-C26V-R3K) 的结构通过 AlphaFold2 建模获得，使用 Charmm 36 力场模拟野生型和突变体在 300 K、50 ns 下的分子状态，利用 VMD 软件分析野生型以及突变体的运动状态。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/247006150003006046>