

赖氨酸 6-氨基转移酶合成条件的优化

颜 媛, 刘吉华, 余伯阳, 张 剑

(中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038)

[摘要] 以一株从土壤中分离、筛选到轮枝霉菌 (*Verticillium* sp.) 2-14 为起始菌株, 在摇瓶发酵水平上对其产赖氨酸 6-氨基转移酶的条件, 包括不同碳源、氮源、磷酸盐、表面活性剂等进行了优化, 并对基本无机盐离子进行了正交实验分析。结果表明, 该菌株产 LAT 最佳液体发酵培养基为: 0.2% L-赖氨酸, 3% 可溶性淀粉, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。通过考察菌株生长与产酶进程发现, 培养 52h 时酶活达到峰值 $1\,217\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 与优化前相比, 酶活力提高一倍。

[关键词] 赖氨酸 6-氨基转移酶, 优化, 发酵, L-哌可酸

[中图分类号] 00657 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)01-0075-04

Optimization of Lysine 6-aminotransferase Activity by Shake-Flask Fermentation

Yan Yuan, Liu Jihua, Yu Boyang, Zhang Jian

(Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract The optimal fermentation conditions for Lysine 6-aminotransferase (LAT) from *Verticillium* sp. in shake-flask cultivation were investigated including carbon source, nitrogen source, phosphate, and surfactant. Optimal inorganic salt was obtained by orthogonal experiment. The result showed that 0.2% L-Lys, 3% Amylin, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ could enhance the yield of LAT. After 52h culture LAT activity is one time stronger than before which reached its peak $1\,217\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words Lysine 6-aminotransferase, optimization, fermentation, L-PA

L-哌可酸 (L-pipecolic acid, L-PA) 是一种重要的刚性环状非蛋白质氨基酸, 它既可以限定多肽的构象, 还可作为不同化合物合成库中的多功能骨架, 所以广泛用于许多手性药物和生物活性物质的制备。如新型强效免疫抑制剂 FK506 免疫抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin) 以及抗肿瘤抗生素 Sandramycin 等都是以哌可酸或其衍生物为主要原料制得的。目前商业用 L-PA 主要通过化学合成消旋哌可酸然后进行手性拆分获得, 成本高且拆分困难。因此通过生物合成手段生产 L-PA 已成为国内外研究者关注的热点课题^[1-3]。

如图 1 所示, 赖氨酸 6-氨基转移酶 (Lysine 6-aminotransferase, LAT, EC2.6.1.36) 是将赖氨酸转化为 L-PA 关键酶, 该酶通过将赖氨酸 6 位的氨基转移形成醛基中间过渡体进而自动环合成为 1-脱氢-哌啶-6-羧酸 (ϵ -6-piperidine carboxylic acid, P6C)。P6C 可通过化学或还原酶催化还原生成 L-PA。目前国外学者已发现, *Flavobacterium lutescens* IFO3084^[3], *Streptomyces clavuligerus*^[4] 和 *Pichia guilliermondii*^[5] 等菌株能产生 LAT。培养基和发酵条件的优化是提高 LAT 酶活, 增加 L-PA 产量的重要途径之一, 而国内外对这方面的研究尚未见报道。本实验以轮枝霉 (*Verticillium* sp.) 为 LAT 酶生产菌, 对其产 LAT 酶的发酵条件进行了研究, 为国内生物合成 L-PA 的进一步研究奠定了基础。

收稿日期: 2007-03-28

基金项目: 中药资源研究开发生物技术平台的构建 (江苏省经贸委, 2005)

作者简介: 颜 媛 (1981), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药生物化学技术。E-mail: yanyuon@163.com

通讯联系人: 余伯阳 (1969), 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药生物化学。E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

(1)菌株与培养基: 菌株 2-14 本实验室分离保存, 鉴定轮枝霉 (*Verticillium* sp.).

斜面培养基, 种子培养基: 改良 PDA 培养基.

对照发酵培养基: 查氏 (CA) 培养基.

(2)试剂: α -酮戊二酸, 5-磷酸吡多醛, O-氨基苯甲醛购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 无菌提取液的制备

发酵液 4 000 r/min 离心 15 min 后, 用 0.85% NaCl 洗涤, 再以同样条件离心, 称取菌体湿重. 每 1 g 菌体悬浮于 4 mL 0.2 mol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 缓冲溶液 (pH 7.5), 在冰水浴中超声粉碎 15 s, 然后 15 000 r/min 离心 30 min 以除去细胞碎片. 上清液储存于 -80℃ 冰箱备用.

1.3 赖氨酸 6-氨基转移酶酶活力的测定

无细胞提取液 1 mL, 加入 L-Lys 40 μ mol, 40 μ mol α -酮戊二酸, 0.15 mol 5-磷酸吡多醛 (以 PBS (pH 7.5) 溶解), 混合液体积为 2 mL. 上述混合液 37℃, 220 r/min 振荡反应 60 min 后, 加入 1 mL 含 3% 三氯乙酸的无水乙醇, 停止反应, 12 000 r/min 离心 10 min 以分离沉淀的蛋白质.

取上清液 1 mL 加入 1.5 mL 4 mmol/L O-氨基苯甲醛 (以 0.2 mol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液配制). 混合液 37℃, 反应 60 min 显桔黄色, 于 465 nm 处比色. $E = 2800 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ [6].

酶活力单位 (U) 定义为, 在最适反应条件下, 以每 1 min 生成 1 μ mol 2-aminoadipate 6-semialdehyde 所需的酶量作为一个酶活力单位 [7].

1.4 培养方法

将斜面菌株接种在 40 mL 种子培养基的 150 mL 三角瓶中, 28℃ 180 r/min 振荡培养 48 h, 获得种子培养液. 将种子培养液 1 mL 放入盛有 40 mL 发酵培养基的 150 mL 三角瓶中, 28℃ 180 r/min 振荡培养. 在此基础上进行不同试验.

2 实验结果

2.1 碳源的初选

选用对照培养基中除碳源以外的成分, 采用葡萄糖, 蔗糖, 可溶性淀粉, 玉米粉, 甘油, 葵瓜子油, 糊精, 3% 为碳源, 在 pH = 6.7, 28℃ 培养, 48 h 后, 每 24 h 测定酶活. 在不加任何诱导剂的情况下, 只有以蔗糖, 甘油, 可溶性淀粉为碳源培养的菌株, 在 48 h 时能测到较低酶活性, 分别为 24 U L^{-1} , 43 U L^{-1} , 56 U L^{-1} , 其他酶活性均为 0. 结果提示, LAT 可能是诱导酶, 在缺少诱导剂的情况下, 不合成或者活性很低.

2.2 氮源的筛选

选用对照培养基中除氮源以外的成分, 采用不同无机或有机氮源 (质量浓度 0.2%), 在 pH = 6.7, 28℃ 培养, 每 12 h 测定酶活. 结果见表 1, 菌株在有机氮源培养基产 LAT 酶量明显高于无机氮源. 其中最佳氮源为 L-赖氨酸, 它是 LAT 的底物, 能很好地诱导酶的合成, 产酶量最高为 521 U L^{-1} .

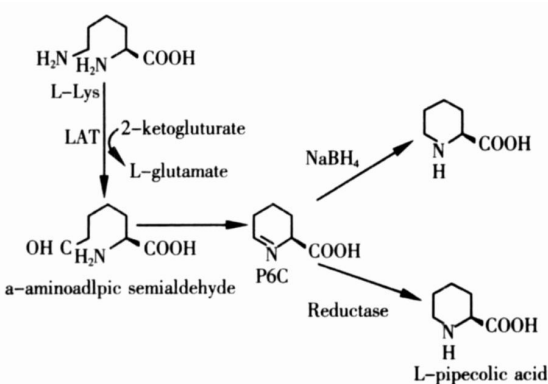


图 1 L-Lys 转化为 L-PA 的历程
Fig.1 Conversion of L-Lys to L-PA

表 1 不同氮源对酶活性的影响 (U L^{-1})

Table 1 Effect of nitrogen source on enzyme activity value					
时间 /h	24	36	48	60	72
氮源 Nitrogen					
蛋白胨 Peptone	130	0	51	19	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	70	0	0	0	0
胱氨酸 Cysteine	150	0	47	0	0
牛肉膏 beef extract	279	162	92	94	0
L-Tyr	246	320	94	223	0
NaNO ₃	48	0	0	0	0
黄豆粉 Soybean	169	0	0	31	19
L-Lys	46	220	521	280	47
酵母膏 yeast extract	198	32	263	0	0

2 3 碳源的复选

菌株以 0 2% L-赖氨酸为氮源, 选用蔗糖, 甘油, 可溶性淀粉, 每组作为碳源占 3%, 添加对照培养基中除碳源、氮源以外的成分, 在 pH = 6 7, 28 培养, 每 12 h 测定酶活, 结果见图 2 以可溶性淀粉为碳源时, 最高酶活 321 U L⁻¹明显优于甘油 124 U L⁻¹, 蔗糖 89 U L⁻¹

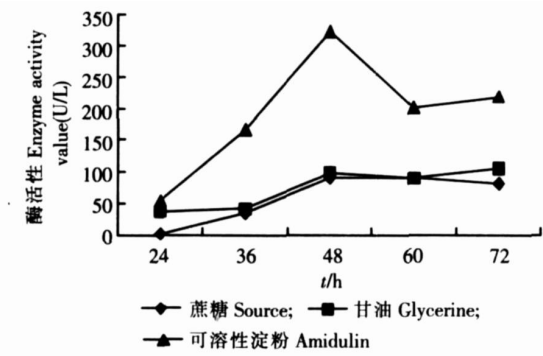


图 2 不同碳源发酵产酶历程
Fig.2 Screening of carbon source for the fermentation medium

2 4 基本无机盐离子

0 2% L-赖氨酸, 3% 可溶性淀粉, 0 1% KH₂PO₄, 加入不同浓度的 MgSO₄ 7H₂O, KCl, FeSO₄ 7H₂O, CaCl₂, pH = 6 7, 28 培养, 48 h后, 测定酶活性. 采用正交设计表 L₉(3⁴), 见表 2 考察基本无机盐离子对产酶的影响.

正交试验结果见表 3 分析可知, 4 因素对菌体合成 LAT 的影响顺序依次为 C> A> D> B, 极差 R 显示, C(FeSO₄ 7H₂O)对 LAT 的合成影响最大, LAT 活性随着 FeSO₄ 7H₂O 浓度增大而降低, A(MgSO₄ 7H₂O)在高水平上能够促进酶的合成. 因素 B(KCl), D(CaCl₂)对酶活性影响较小, 让它们保持在零水平. 因此最佳方案为 A₃B₁C₁D₁.

2 5 磷酸盐对酶活的影响

选用 0 2% L-赖氨酸, 3% 可溶性淀粉, 0 1% MgSO₄ 7H₂O, 分别取 KH₂PO₄ 浓度为 0 0 1%、0 2%、0 3%、0 4%、0 5% 在 pH = 6 7, 28 培养, 48 h后, 测定酶活性.

表 4 磷酸盐对酶活的影响

Table 4 Effect of phosphate on enzyme activity							
磷酸二氢钾	0	0 10	0 20	0 30	0 40	0 50	0 60
湿重 (g)	2 15	2 29	2 13	2 12	2 17	1 93	1 63
OD ₄₆₅	0 09	0 01	0 12	0 13	0 14	0 18	0 19
酶活性 (U L ⁻¹)	790	923	1 092	1 164	1 278	1 444	1 312

由表 2 可知磷酸盐浓度低于 0 4%, 增大其浓度能有效地促进酶的合成, 且并不影响菌体的生长, 当磷酸盐浓度超过 0 4% 时, 虽然酶活性有一定的提高, 但是菌体的生长受到明显抑制, 单位酶活也随之下降. 实验结果表明使用 0 5% 磷酸盐单位酶活性最高.

2 6 表面活性剂的影响

在 0 2% 赖氨酸、3% 可溶性淀粉、0 5% KH₂PO₄、0 1% MgSO₄ 7H₂O 培养基中, 分别在培养开始和培养 24h 后添加 0 2% 吐温 20、0 2% 吐温 80 和 0 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 培养 48h 后, 测定酶活性. 结果见表 5 发现吐温与 SDS 都不能提高菌株的酶活性.

表 2 因子水平表 L₉(3⁴) (%)

Table 2 Factor-level cade of orthogonal experin ent				
影响因子	A MgSO ₄ 7H ₂ O	B KCl	C FeSO ₄ 7H ₂ O	D CaCl ₂
1	0	0	0	0
2	0 05	0 05	0 01	0 05
3	0 1	0 1	0 02	0 1

表 3 L₉(3⁴)正交实验结果

Table 3 The result of L ₉ (3 ⁴) orthogonal array of inorganic salt					
编号	A MgSO ₄ 7H ₂ O	B KCl	C FeSO ₄ 7H ₂ O	D CaCl ₂	酶活性 (U L ⁻¹)
1	1	1	1	1	302
2	1	2	2	2	71
3	1	3	3	3	49
4	2	1	2	3	187
5	2	2	3	1	79
6	2	3	1	2	271
7	3	1	3	2	190
8	3	2	1	3	301
9	3	3	2	1	217
K1	141	226	293	200	
K2	184	150	158	111	
K3	236	178	106	111	
R	95	76	187	89	

表 5 表面活性剂对酶活性的影响
Table 5 Effect of surfactant on enzyme activity

表面活性剂	Tween- 80(0.2%)		Tween- 20(0.2%)		SDS (0.1%)		对照
	0h加入	24h加入	0h加入	24h加入	0h加入	24h加入	
酶活 (U L ⁻¹)	1 271	1 289	1 332	1 120	743	1 164	1 263

2.7 产 LAT 的发酵过程

0.2% L-赖氨酸、3% 可溶性淀粉、0.5% KH₂PO₄、0.1% MgSO₄·7H₂O, 培养菌株, 经 28℃, 180 r/min 培养. 第 36 h 开始每 8 h 取样, 测定 LAT 酶活性. 结果见图 2 对照培养基中 LAT 酶活性增加缓慢, 44 h 达到最大值 584 U L⁻¹. 优化后, 36 h~52 h LAT 酶活性显著增加, 于 52 h 时达到最大值 1 217 U L⁻¹, 随后逐渐降低.

3 讨论

本实验通过对包括不同碳源、氮源、磷酸盐、基本无机盐离子、表面活性剂在内的培养基成分的考察, 在摇瓶发酵水平对菌株 2-14 产赖氨酸 6-氨基转移酶的条件进行了优化. 结果表明, 在菌株 2-14 中, 赖氨酸 6-氨基转移酶可能是一种诱导酶, 在缺乏诱导剂的情况下, 活性较低. 在碳源的筛选时, 在不加任何诱导剂的情况下, 只有以蔗糖、甘油、可溶性淀粉为碳源培养的菌株在 48 h 能测到较低酶活性. 这可能是因为种子培养基中, 营养成分复杂, 具有能够诱导产生 LAT 的物质, 而发酵培养基中成分单一, 没有进一步诱导 LAT 合成的成分, 因而活性很快消失. L-赖氨酸是能诱导酶大量合成的氮源. 在本实验中, 磷酸盐能明显促进酶的合成, 但 KH₂PO₄ 浓度高于 0.4% 后抑制菌体的生长. 使用 0.5% 磷酸盐单位酶活性最高. 正交实验表明增加 FeSO₄·7H₂O 能明显抑制酶的形成, MgSO₄·7H₂O 能有效促进酶的合成. 最佳液体发酵培养基为: 0.2% L-赖氨酸, 3% 可溶性淀粉, 0.5% KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 通过对发酵培养基的优化, 菌株的产酶水平由原来的 585 U L⁻¹ 提高到 1 217 U L⁻¹, 酶活力提高 1 倍. 该菌生长比较迅速, 培养条件简单, 可进一步以部分因子、多元回归等方法进行培养条件优化, 以提高该菌株的产酶活力. 下一步可进行该菌株所产 LAT 酶酶学性质、蛋白结构, 以及该酶基因工程菌的构建等方面的探索, 以期为国内生物合成重要的医药中间体 L-PA 奠定基础.

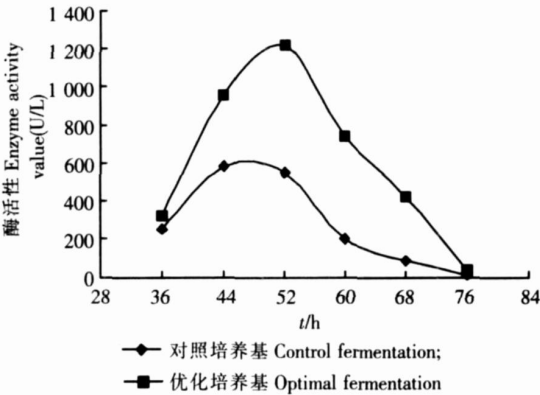


图 3 产酶历程
Fig.3 Time course of LAT

[参考文献]

[1] 李振东, 樊君, 张宗伟. 哌啶酸及其衍生物的研究进展 [J]. 化学通报, 2006, 69: 74-80.
[2] He M. Pipercolic acid in microbes biosynthetic routes and enzymes [J]. J Ind Microbiol Biotechnol 2006, 33(6): 401-407.
[3] Fujii T, Narita T, Ageton H, et al. Characterization of L-lysine 6-aminotransferase and its structure gene from flavobacterium Intescens IFO 3084 [J]. J Biochem, 2000, 128: 391-397.
[4] Patel R N, Banerjee A, Nanduri V B. Biocatalytic preparation of chiral synthon for a vasopeptidase inhibitor: enzymatic conversion of enzymatic conversion of N²-[N-Phenylmethoxy] carbonyl]-L-homocysteiny]-L-lysine(1->1)-disulfide to [4S-(4R,7R,10aJ)]-1-octahydro-5-oxo-4-[phenylmethoxy] carbonyl] amino]-7H-pyrido-[2,1-b][1,3]thiazepine-7-carboxylic acid methyl ester by a novel L-lysine-aminotransferase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27: 376-389.
[5] Schmidt H, Bode R, Bimbaum D A. Novel enzyme: L-lysine-pyruvate aminotransferase, catalyses the first step of lysine catabolism in Pichia guilliermondii [J]. FEMS Microbiology Letters 1988, 49: 203-206.
[6] Fujii T, Arikoku Y, Ageton H, et al. Biotransformation of L-Lysine to L-Pipercolic acid catalyzed by L-Lysine 6-aminotransferase and Pyrroline-5-carboxylate reductase [J]. Biotechnol Biochem, 2002, 66: 1981-1984.
[7] Martin J F, Campoy S, Naranjo L, et al. Lysine is catabolized to 2-aminoadipic acid in Penicillium chrysogenum by an α-amino transferase and to saccharopine by a lysine 2-ketoglutarate reductase: characterization of the α-amino transferase [J]. Mol Gen Genomics 2005, 274(3): 272-282.

[责任编辑: 顾晓天]