

色氨酸酶基因工程菌酶法合成 L-色氨酸

韦平和 吴梧桐 王 A(南京 210009 中国药科大学生物制药学院)

摘要 目的:以 L-丝氨酸和吲哚为底物,用色氨酸酶基因工程菌酶法合成 L-色氨酸。方法:以 IPTG 诱导工程菌色氨酸酶表达,将酶活最高时的工程菌游离细胞作为转化反应的酶源,通过纸层析分析并测定转化液中 L-色氨酸的含量。结果:100 ml 反应液(L-丝氨酸 3g,吲哚 3g)37℃反应 48h 可积累 L-色氨酸 4.9g, L-丝氨酸转化率为 84.2%,吲哚转化率为 93.6%。经分离纯化所得的 L-色氨酸晶体,在熔点、旋光性和红外吸收光谱等方面与标准品完全一致。结论:色氨酸酶基因工程菌能有效地催化 L-丝氨酸和吲哚合成 L-色氨酸,进一步证明了该酶在 L-色氨酸酶法合成中的可行性和有效性。

关键词 色氨酸酶基因工程菌;L-色氨酸;L-丝氨酸;转化

Enzymatica synthesis of L-Tryptophan by tryptophanase expressed in genetic genetic engineering strain

Wei Pinghe(Wei PH), Wu Wutong(Wu WT), Wang Min(Wang M)(School of Biological Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**L-Tryptophan was enzymatically synthesized by tryptophanase with the substrates of L-serine and indole in genetic engineering strain. **METHOD:**Tryptophanase was expressed in engineering strain which was induced by IPTG. The engineering strain free cells with the highest enzyme activity were used as enzyme source in the conversion reaction mixture. L-Tryptophan accumulated in the reaction mixture was analyzed and determined by paper chromatography. **RESULTS:**4.9g of L-Tryptophan was formed from 3g of L-serine and 3g of indole in 100ml reaction mixture shaken for 48h at 37℃. The conversion rate was 84.2% for L-serine and 93.6% for indole. After isolating and purifying, the crystals were identical to authentic L-Tryptophan, in respects of melting point, optical activity and IR-spectra. **CONCLUSION:** Tryptophanase expressed in genetic engineering strain could efficiently catalyze L-serine and indole to synthesize L-Tryptophan, and the feasibility and efficiency of tryptophanase in this enzymatic synthesis were confirmed.

KEY WORDS tryptophanase genetic engineering strain, L-tryptophan, L-serine, conversion

L-色氨酸是人体内的重要必需氨基酸,在医药上主要用于制造复方氨基酸营养输液,并可单独作为抗抑郁剂和催眠剂。色氨酸酶(EC4.1.99.1)是一种依赖磷酸吡哆醛的多功能酶,正常情况下催化 L-色氨酸降解生成丙酮酸、吲哚和氨,但在高浓度的丙酮酸和氨条件下它也能有效地催化丙酮酸、吲哚和氨合成 L-色氨酸^[1]。此外,在一定条件下色氨酸酶还能催化 L-丝氨酸和吲哚合成 L-色氨酸^[2,3]。本文根据这一反应原理,以 L-丝氨酸和吲哚为底物,利用色氨酸酶基因工程菌酶促合成 L-色氨酸,试图为工业化酶法生产 L-色氨酸提供可行、合理的工艺路线。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基 色氨酸酶基因工程菌株 WW-4(本室构建),E. coli BL21(DE3)(南京军区医学研究所

李光富先生惠赠),LB 培养基(1%胰化蛋白胨,0.5%酵母抽提物和 1%氯化钠)。

1.1.2 试剂 磷酸吡哆醛(PLP)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、还原型谷胱甘肽(GSH)和对二甲氨基苯甲醛(PDAB)分别购自 Sigma 公司、Promega 公司、中国新兴医药保健品开发公司和上海试剂三厂,L-丝氨酸、L-色氨酸(上海伯奥生物科技公司),吲哚(上海双喜香料助剂厂),其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 Beckman 高速冷冻离心机,DDHZ-300 多用途台式恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂),ZFQ85A 旋转蒸发器(上海医械专机厂),差示扫描量热仪(Mettler 公司),241 MC 旋光仪(PE 公司),IMPACT410 红外光谱仪(Nicolet 公司)。

1.2 方法

1.2.1 工程菌色氨酸酶的诱导表达 取一个单菌落

接种于 LB 培养基, 37℃ 培养过夜以获得饱和培养物, 将饱和培养物以 1% 接种于含 Amp(100μg/ml) 的 LB 培养基中, 37℃ 继续培养 2h 后, 添加 IPTG 至终浓度 1mmol/L 诱导表达色氨酸酶^[4]。

1.2.2 色氨酸酶的活力测定 按 Wood 等(1947)^[5]提出的酶活测定方法改进后进行。酶的一个活力单位定义为: 在一定反应条件下, 37℃、10min 催化形成 0.01 μmol 吲哚所需要的酶量。

1.2.3 L-色氨酸的酶法合成条件 在 100ml 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液中, 分别添加 3g L-丝氨酸、3g 吲哚、10mg PLP 以及由 300ml 培养液离心后收集的细菌沉淀, 调 pH8.8 后于 37℃ 摇床振荡反应 48h。

1.2.4 L-色氨酸的纸层析检测 将振荡一定时间后的反应液经适当稀释后以 12000r/min 离心 2min, 取上清液 10μl 进行纸层析检测(展开剂系统正丙醇-氨水-水 20:15:3), 用 5ml 0.1mol/L HCl 洗提色氨酸斑点, 于 280nm 处进行吸光度测定^[6]。

2 结果

2.1 不同诱导时间色氨酸酶的活力测定

经 IPTG 诱导 0.5、1、2、3 和 4h 的色氨酸酶工程菌 WW-4, 其活力测定结果见图 1。由图 1 可知: 诱导 1h 左右的色氨酸酶活力最高, 故选择诱导 1h 的细胞作为 L-色氨酸酶法合成的酶源。

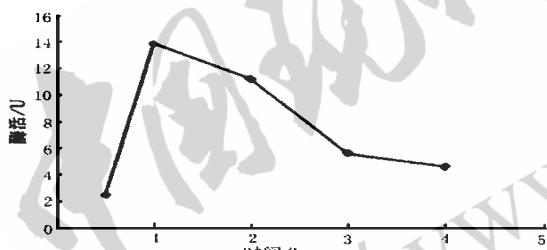


图 1 不同诱导时间色氨酸酶的活力变化

2.2 L-色氨酸的酶法合成

将由色氨酸酶工程菌催化并振荡 24h 的反应液离心后取上清液 10μl 进行纸层析检测, 其层析图谱见图 2。根据图 2 中色氨酸标准品的斑点位置和大小, 可初步认为宿主菌 BL21(DE3) 因含色氨酸酶活力太低, 反应液中几乎不产生 L-色氨酸, 而由色氨酸酶工程菌催化的反应液中产生了约为标准品 3 倍量以上的转化产物 L-色氨酸。100ml 反应体积(L-丝氨酸 3g, 吲哚 3g) 37℃ 反应 48h, 可积累 L-色氨酸 4.9g, L-丝氨酸转化率为 84.2%, 吲哚转化率为 93.6%, L-色氨酸随转化时间的浓度变化见图 3。

2.3 L-色氨酸的分离纯化

反应液中 L-色氨酸的分离纯化步骤如下: 将反应



图 2 L-色氨酸的纸层析图谱

A- 宿主菌; B- 色氨酸酶工程菌; C- 色氨酸标准品

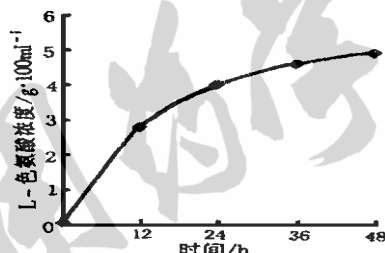


图 3 不同转化时间 L-色氨酸的浓度变化

液稀释 10 倍以溶解沉淀的色氨酸, 5000r/min 离心 15min, 弃细菌沉淀和残留吲哚, 收集上清液并用 2mol/L HCl 调 pH 至 6.5, 添加 1% 活性炭搅拌、脱色 20min (80℃) 后过滤, 滤液减压浓缩 (50℃) 得粗晶体, 水中重结晶 2 次, 真空抽滤, 烘干得白色片状 L-色氨酸晶体。

2.4 L-色氨酸产品的质量分析

2.4.1 熔点 差示扫描量热仪测定结果为 274.6℃, 与标准品 276.3℃ 相差 1.7℃, 见图 4。

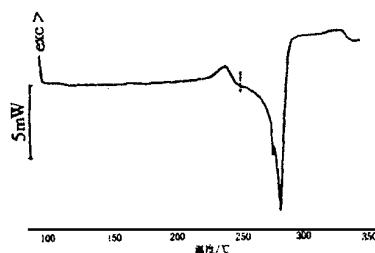


图 4 L-色氨酸产品的熔点测定

2.4.2 旋光度 PE-241 MC 测定结果为 $[\alpha]_D^{25} - 31.34$, 符合《中国药典》(1990 版附录) - 30 ~ - 33° 要求。

2.4.3 红外吸收图谱 与标准品图谱一致, 见图 5。

3 讨论

3.1 催化 L-丝氨酸和吲哚合成 L-色氨酸的酶, 除了色氨酸酶外还有色氨酸合成酶^[7]。在这一酶促反应中, 尽管色氨酸合成酶的动力学特征明显优于色氨酸酶, 但作为底物之一的吲哚对其抑制强烈, 而色氨酸酶对

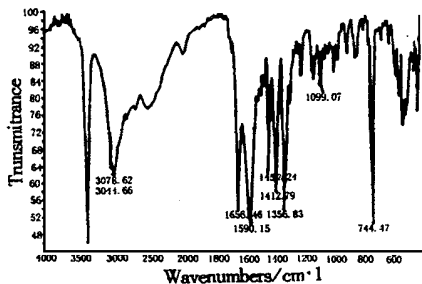


图 5 L-色氨酸产品的红外光谱

吲哚则具有良好的稳定性^[8]。因此,本文选择色氨酸酶催化 L-丝氨酸和吲哚合成 L-色氨酸,其研究结果进一步证明了该酶在 L-色氨酸酶法合成中的可行性和有效性。

3.2 色氨酸酶能有效地催化 L-丝氨酸和吲哚生成 L-色氨酸,但它在工业化应用上的主要困难是底物 L-丝氨酸价格几乎与 L-色氨酸相当,克服这一困难的重要途径是:以廉价的甘氨酸和甲醛为底物,先在丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)催化下生成 L-丝氨酸,再在色氨酸酶催化下,通过添加吲哚最终生成 L-色氨酸^[9]。本室已成功构建 SHMT 基因工程高产菌株^[10]。以甘氨酸为底物,通过 SHMT 和色氨酸酶两步酶法合成 L-色氨酸的有关工作正在进行之中。

3.3 Newton 等(1965)报道,色氨酸酶晶体在 55~65℃ 维持 10 min 失活率达 86%,在催化 L-色氨酸的合成反应中其最适 pH 为 8.8,故本文 L-色氨酸酶法合成条件选择反应温度 37℃,pH 8.8,但在特定转化反应体系及用游离细胞作为酶源的情况下,色氨酸酶的最适温度、pH 以及培养基成分、底物用量和转化时间等方面还需

进一步的优化和完善。

参考文献

- 1 Watanabe T, Snell E. Reversibility of the tryptophanase reaction: synthesis of tryptophan from indole, pyruvate and ammonia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(5): 1086.
- 2 Newton WA, Morina Y, Snell E. Properties of crystalline tryptophanase. *J Biol Chem*, 1965, 240(3): 1211.
- 3 Snell EE. Tryptophanase: structure, catalytic activities and mechanism of action. In *Advances in Enzymology* (A. Meister, Ed.), 1975, 42: 287.
- 4 金冬雁,黎孟枫译.分子克隆实验指南.第 2 版.北京:科学出版社,1995: 831.
- 5 Wood W, Gunsalus I, Umbreit W. Function of pyridoxal phosphate: resolution and purification of the tryptophanase enzyme of *E. coli*. *J Biol Chem*, 1947, 170: 313.
- 6 Nakazawa H, Enei H, Okumura S, et al. Synthesis of L-tryptophan from pyruvate, ammonia and indole. *Agr Biol Chem*, 1972, 36(13): 2523.
- 7 Adachi O, Miles EW. A rapid method of preparing crystalline β_2 subunit of tryptophan synthetase of *E. coli* in high yield. *J Biol Chem*, 1974, 249: 5430.
- 8 韦平和,吴梧桐.色氨酸生物工程研究进展.药物生物技术,1998,5(3): 180.
- 9 Hamilton BK, Hsiao HY, Swann WE, et al. Manufacture of L-amino acid with bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3(3): 64.
- 10 蔡宇阳,吴梧桐,史燕东. SHMT 基因工程菌的构建及高效表达. *生物工程学报*, 1996, 12(增刊): 28.