文章编号:1008-1542(2015)06-0633-06 doi:10.7535/hbkd.2015yx06013

苯丙氨酸解氨酶印迹交联酶聚体的制备及部分催化性能研究

崔建东[1,2],刘容麟[1,2]

(1.河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018;2.河北省发酵工程技术研究中心,河北石家庄 050018)

摘 要:苯丙氨酸解氨酶(PAL)是酶法生产*L*-苯丙氨酸的关键酶,目前主要利用红酵母PAL进行转化,但红酵母PAL稳定性较差,妨碍了其工业化的应用。该研究将交联酶聚体和印迹酶的制备方法相结合,制备出新型固定化酶-苯丙氨酸解氨酶印迹交联酶聚体,筛选出最优的底物印迹分子,并考察了该固定化酶的部分特性。结果表明,反式肉桂酸是制备印迹PAL交联酶聚体的最适底物,所制备印迹交联酶聚体的最适催化温度和pH值分别是50 ℃和10.5,并表现出较好的重复使用性,连续催化9个批次后,仍保持了32%的酶活保留率。

关键词:酶工程;苯丙氨酸解氨酶;交联酶聚体技术;印迹酶;固定化酶

中图分类号:Q814.2 **文献标志码**:A

Preparation of bioimprinting cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase and it's partial properties

CUI Jiandong[1,2], LIU Ronglin[1,2]

(1. School of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. Research Center for Fermentation Engineering of Hebei, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is a key enzyme for production of *L*-phenylalanine. Currently, PAL is mainly obtained from *Rhodotorula* PAL However, *Rhodotorula* PAL exhibits poor stability, which limits its industrial application. In this study, bioimprinting cross-linked enzyme aggregates of PAL (PAL-*i*CLEAs) is developed by combining cross-linked enzyme aggregates technology and imprinted enzyme method. The most optimal imprinting molecule substrate is screened. Moreover, some characteristics of the PAL-*i*CLEAs are examined. The results show that the most suitable substrates for preparing PAL-*i*CLEAs is tran-cinnamic acid. The optimal temperature and pH was 50 ℃ and 10.5, respectively. In addition, PAL-*i*CLEAs shows good reusability, the recovery of PAL activity still remained 32% after reusing 9 times.

Keywords: enzyme engineering; phenylalanine ammonia lyase (PAL); cross-linked enzyme aggregates; imprinted enzyme; immobilized enzyme

收稿日期:2015-01-05;修回日期:2015-06-11;责任编辑:王海云

基金项目:国家自然科学基金(21072041);河北省自然科学基金(B2014208054)

作者简介:崔建东(1974—),男,山东菏泽人,教授,博士,主要从事生物催化与微生物资源开发方面的研究。

E-mail:cjd7cn@163.com

崔建东,刘容麟.苯丙氨酸解氨酶印迹交联酶聚体的制备及部分催化性能研究[J].河北科技大学学报,2015,36(6):633-638.

CUI Jiandong, LIU Ronglin. Preparation of bioimprinting cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase and it's partial properties[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2015, 36(6): 633-638.

苯丙氨酸解氨酶(PAL)存在于多种植物和少数微生物中[1]，是一种诱导酶，它具有抗肿瘤的作用[2]，是多种抗癌药物的重要中间体，另外，该酶还可以被用来诊断和治疗苯丙酮尿症患者，*L*-苯丙氨酸、*L*-Try(酪氨酸)或某些结构类似物可诱导其合成[3]。目前，该酶最主要的用途是转化反式肉桂酸生成 *L*-苯丙氨酸。*L*-苯丙氨酸作为生产肾上腺素和甲状腺素的原料被广泛使用[4]。*L*-苯丙氨酸也是合成甜味剂阿斯巴甜的重要成分，阿斯巴甜的热销导致 *L*-苯丙氨酸的市场需求急剧增加[1]。但在 PAL 转化生成 *L*-苯丙氨酸过程中，PAL 活力低、稳定性差，且使用过程不易回收，导致其催化效率低下。

交联酶聚体(cross-linked enzyme aggregates，CLEAs)是一种崭新的无载体的酶固定化技术，交联酶聚体有许多优点：无需完全纯化、制备成本低、时间短等[5]。交联酶聚体制备过程主要包括沉淀和交联 2 个步骤。通过加入盐类、水溶性有机溶剂或非离子型聚合物等将酶蛋白物理沉降下来。加入交联剂戊二醛等，使酶与酶之间发生交联，得到非水溶性的交联酶聚体，这种交联酶聚体将酶的结构特性和催化特性保留下来[6]。该技术制备简单，成本低廉，所制备的固定化酶操作和储存稳定性强，是一种极具开发前景的酶固定化方法[7]。

近年来，随着交联酶聚体技术的不断发展，很多学者将印迹酶技术与之结合起来，制备出了印迹交联酶聚体，制备流程见图 1。CABIROL 等[8]运用此技术制备了腈水解酶印迹酶交联酶聚体。采用的印迹分子 2-丁酮溶于水，能够与腈水解酶的活性中心结合，而且在后期处理过程中容易除去。研究表明，当用硫酸铵和叔丁醇分别作沉淀剂时，得到的交联酶聚体的酶活分别比不加印迹分子时提高了 8%和 44%。叔丁醇在“锁定”酶-底物复合物的构象时能够起到一定的辅助作用。在转化 2-丁酮的反应过程中发现，印迹酶的转化率均高于非印迹交联酶。

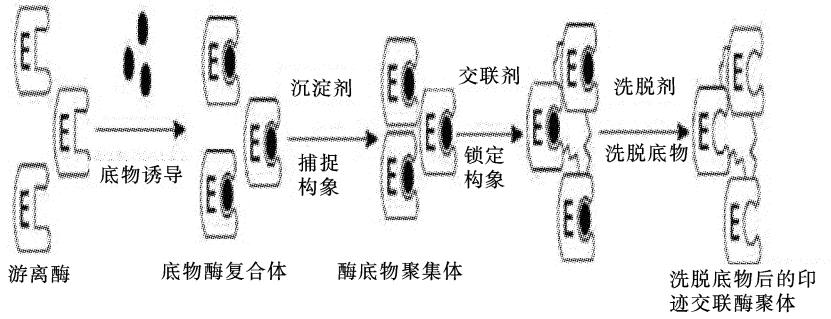

图 1 印迹交联酶聚体的制备方法

Fig. 1 General scheme for preparation of bioimprinting cross-linked enzyme aggregates

LÓPEZ-SERRANO 等[9]用不同沉淀剂及印迹分子制备了 7 种脂肪酶的 CLEAs。印迹分子的存在使脂肪酶的酶活性构象被诱导出来，此构象再经过后续的沉淀交联固定下来，最后将印迹分子除去，就得到了具有较高酶活力的 CLEAs。ALANKAR 等[10]通过交联印迹法，对葡萄糖氧化酶进行印迹交联，使其 K_m 由 22 mmol/L 降为 12 mmol/L，显著提高了酶与底物的亲和力。de WINTER 等[11]通过生物印迹交联法以 α-葡糖基甘油为印迹分子，改进蔗糖磷酸化酶，使其催化速率提高了 1 倍。

本研究利用印迹交联酶聚体技术制备出 PAL 印迹交联酶聚体(PAL-*i*CLEAs)，并研究了 PAL-*i*CLEAs 的部分催化性能，为改善 PAL 的催化活力和稳定性提供新的方法和途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)：CICC32913，中国工业微生物菌种保藏管理中心提供；*L*-苯丙氨酸和 50%(质量分数)戊二醛：北京百灵威科技有限公司提供；其他试剂均为市售分析纯。

752 型紫外分光光度计：上海光谱仪器有限公司提供；DF-Ⅱ集热式磁力加热搅拌器：金坛市金南仪器制造有限公司提供；FD-27 冷冻干燥机：北京德天佑科技发展有限公司提供；TGL-16C 型离心机：上海安亭科学仪器厂提供；HC-3018 型高速离心机：安徽中科中佳科学仪器有限公司提供；VORTEX-5 型涡旋振荡器：海门市其林贝尔仪器制造有限公司提供；85-1B 磁力搅拌器：巩义市予华仪器有限责任公司提供。

1.2　实验方法

1.2.1　培养基与基本试剂的配制

1)种子培养基

葡萄糖：5 g/L，酵母粉：10 g/L，蛋白胨：10 g/L，氯化钠：5 g/L，磷酸二氢钾：1 g/L，pH 值：5.5。

2)发酵培养基

葡萄糖：1 g/L；蛋白胨：35 g/L；磷酸氢二铵：1.5 g/L；氯化钠：5 g/L；磷酸二氢钾：0.25 g/L；初始 pH 值：5。

1.2.2　酶活的测定

一个酶活力单位定义为每分钟催化 *L*-苯丙氨酸生成 1 μmol 反式肉桂酸所需的酶量。以紫外分光光度法测定 PAL 的酶活[12]。

1.2.3　PAL 的提取

将培养后的胶红酵母利用微珠涡流法进行细胞破碎提取 PAL 粗酶液[12]。

1.2.4　印迹交联酶聚体的制备

交联酶聚体制备：在 5 mL 酶液(0.86 U/mL)中加入 1.215 g $(NH_4)_2SO_4$，使 $(NH_4)_2SO_4$ 的饱和度为 40%，沉淀 1 h，加入 50 μL 质量分数为 10%的戊二醛水溶液，在 150 r/min 气浴恒温振荡器上室温振荡交联 1 h，离心弃上清，将沉淀用 pH 值为 8.8、浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 吹打洗涤、离心 3 次后再加入 pH 值为 8.8、浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 吹打使其均匀悬浮，放冰箱备用[13]。

印迹交联酶聚体(*i*CLEAs)制备：在 5 mL 酶液(0.86 U/mL)中加入 100 μL 印迹底物溶液(1 g/L)，在气浴恒温振荡器上振荡印迹 30 min，加入 1.215 g $(NH_4)_2SO_4$，使 $(NH_4)_2SO_4$ 的饱和度为 40%，沉淀 1 h，再加入 50 μL 质量分数为 10%的戊二醛水溶液，在 150 r/min 气浴恒温振荡器上室温振荡交联 1 h，离心弃上清，将沉淀用 pH 值为 8.8、浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 吹打洗涤、离心 3 次，最后加入 5 mL pH 值为 8.8、浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 吹打均匀，放冰箱备用。

1.2.5　利用高效液相色谱法测定 *L*-苯丙氨酸含量的色谱条件

流动相：0.02 mol/L 的醋酸铵溶液与甲醇的体积比为 65∶35；流速为 1 mL/min；柱温为 30 ℃；进样量为10 μL；测定用紫外光，波长为 259 nm。*L*-苯丙氨酸的标准曲线如图 2 所示。

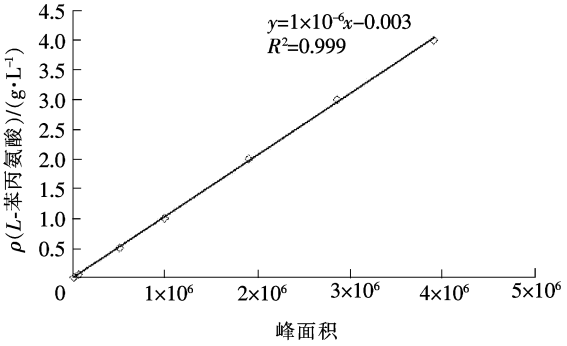

图 2　*L*-苯丙氨酸标准曲线

Fig. 2　Standard curve of *L*-phenylalanine

1.3　实验设计

1.3.1　最适印迹底物的筛选

用 5 mL 酶液(0.86 U/mL)作为印迹交联对象。用不同印迹底物(1 g/L)制备的印迹交联酶聚体(肉桂酸-*i*CLEAs，4-硝基肉桂酸-*i*CLEAs，4-氟肉桂酸-*i*CLEAs，香豆酸-*i*CLEAs)和 CLEAs 转化反式肉桂酸(10，15，20，25 g/L)。转化反应时间分别是 3，6，9 h，离心、滤膜过滤后，上清用高效液相色谱测定 *L*-苯丙氨酸的含量。

1.3.2　部分催化性能的考察

1)最适温度的考察

考察 *i*CLEAs 在 30，35，40，45，50 ℃转化生成 *L*-苯丙氨酸的能力，分别在转化 3，6，9 h 时用高效液相色谱测定转化液中 *L*-苯丙氨酸含量。

2)最适 pH 值的考察

考察 *i*CLEAs 在 pH 值分别为 7.7，10.5，12.2 的 15 g/L 反式肉桂酸为底物时转化生成 *L*-苯丙氨酸的能力，用高效液相色谱测定转化液中 *L*-苯丙氨酸含量。

3)反式肉桂酸-*i*CLEAs 转化合成 *L*-苯丙氨酸重复使用率的考察

考察 *i*CLEAs 的重复使用效率。即在 pH 值为 10.5 时以 15 g/L 的反式肉桂酸为底物，30 ℃转化 3 h，离心后，用高效液相测定上清中 *L*-苯丙氨酸的含量。沉淀 *i*CLEAs 用蒸馏水冲洗 3 次后重新悬浮于反式肉

桂酸转化液中进行第2次转化反应，连续重复10次。转化液的配制[12]：740 mg反式肉桂酸溶解到45 mL氨水(0.28 mol/L)中，用硫酸调pH值为10，去离子水定容到100 mL。

2 结果与分析

2.1 最适印迹底物的筛选

图3—图5为游离酶，CLEAs，反式肉桂酸-*i*CLEAs(简称为肉-*i*CLEAs)，4-硝基肉桂酸-*i*CLEAs(简称为硝-*i*CLEAs)，香豆酸-*i*CLEAs(简称为香-*i*CLEAs)，4-氟肉桂酸-*i*CLEAs(简称为氟-*i*CLEAs)分别催化反式肉桂酸转化3，6，9 h后生成*L*-苯丙氨酸的量的比较。

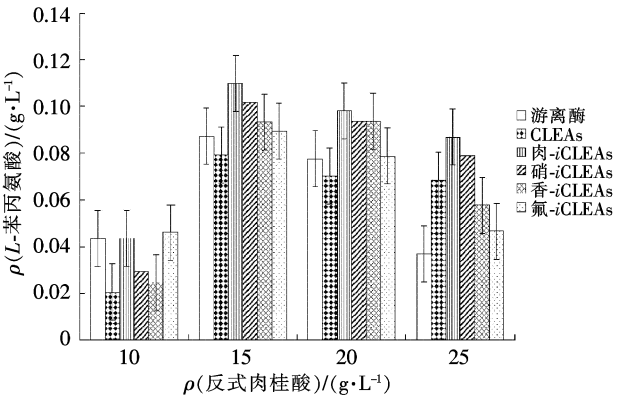

图3 3 h后*L*-苯丙氨酸的生成量

Fig. 3 Production of *L*-phenylalanine after 3 h

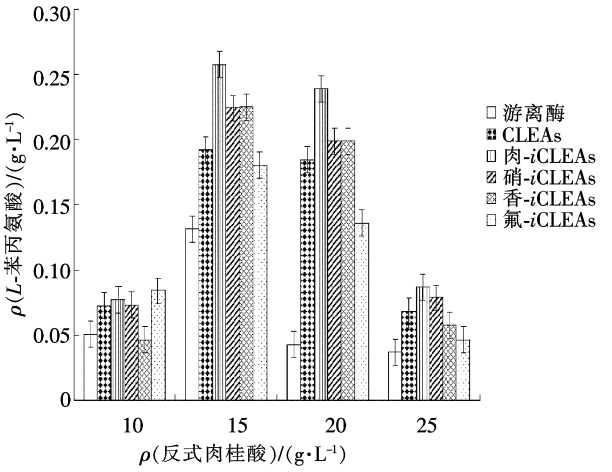

图4 6 h后*L*-苯丙氨酸的生成量

Fig. 4 Production of *L*-phenylalanine after 6 h

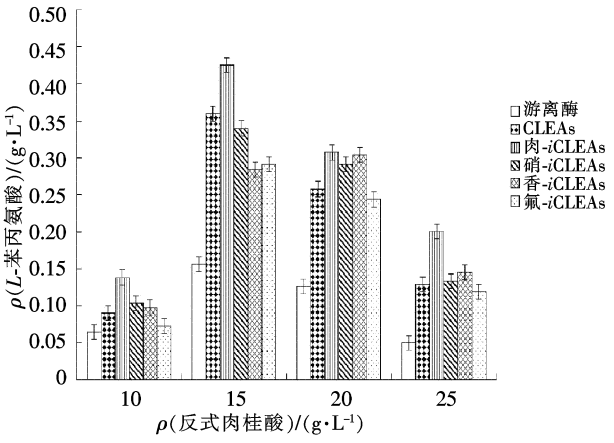

图5 9 h后*L*-苯丙氨酸生成量

Fig. 5 Production of *L*-phenylalanine after 9 h

结果表明，底物浓度对PAL酶转化反式肉桂酸有较大的影响，当底物质量浓度是10 g/L时，由于底物量过小，导致生成的*L*-苯丙氨酸不多，当底物质量浓度增加到15 g/L时，苯丙氨酸解氨酶转化能力最高。而随着底物浓度的不断增大，游离酶、CLEAs和*i*CLEAs的PAL转化能力都在下降，这可能是由于在高浓度底物条件下，PAL酶活受到底物抑制造成的[13-14]。但相比游离酶，CLEAs和*i*CLEAs都表现出较好的解除高浓度底物抑制的能力。在不同印迹底物制备的*i*CLEAs中，反式肉桂酸作为印迹底物制备的*i*CLEAs表现出最高的合成*L*-苯丙氨酸的能力，同时也表现出最强的耐受高浓度底物抑制的能力。连续转化9 h后，转化生成的*L*-苯丙氨酸是游离酶的2倍。这表明，用反式肉桂酸作为印迹分子能诱导出PAL酶的活性构象，并利用随后的沉淀交联将该构象“固定”下来，使底物反式肉桂酸更容易进入PAL的催化中心，导致催化效率提高。

2.2　反式肉桂酸-*i*CLEAs 的部分性质

2.2.1　最适催化温度

实验结果如图 6 所示，游离酶、*i*CLEAs 和 CLEAs 的最适催化温度都是 50 ℃，有文献报道 PAL 游离酶和 CLEAs 的最适反应温度是 50 ℃[15-16]，表明交联固定化和印迹并没有改变 PAL 的最适反应温度。但在 60 ℃条件下，CLEAs 和 *i*CLEAs 却表现出比游离酶更高的酶活，这可能是固定化和印迹增强了酶的热稳定性，导致催化温度适应范围有所扩宽。

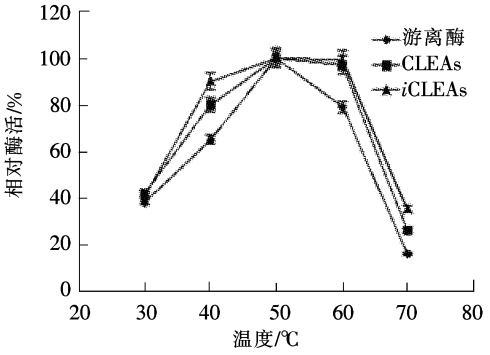

图 6　最适反应温度

Fig. 6　Optimal temperature

2.2.2　最适 pH 值

实验结果见图 7。图中表明，游离酶和 *i*CLEAs 最适催化 pH 值在 10.5 左右，而 CLEAs 的最适 pH 值在 9 左右，表明印迹交联固定化没有导致 PAL 的最适 pH 值发生偏移。这可能是由于印迹交联后存在于 *i*CLEAs 中的大部分 PAL 活性结构与游离 PAL 的相一致，围绕在活性中心周围的酸性或碱性氨基酸侧链基团并没有发生急剧的变化。

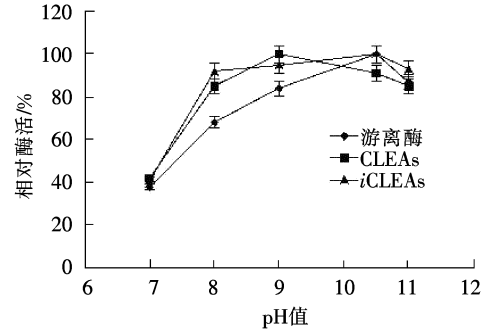

图 7　最适 pH 值

Fig. 7　Optimal pH

2.2.3　*i*CLEAs 的重复使用率

结果如图 8 所示，连续转化 9 个批次后，反式肉桂酸-*i*CLEAs 酶活回收率仍然保持初始酶活的 32%，说明所制备的 *i*CLEAs 具有很好的重复使用性。但不足之处是每次反应结束时，需要离心，离心之后印迹交联酶聚体会在试管底部聚集成不易散开的块状沉淀，一方面反复离心会造成酶的丢失，另一方面，由于离心剪切力的作用会使一些印迹交联酶聚体破裂或者凝集成团块，不但容易使酶损失，而且形成的团块不容易再次分散在转化液中，导致传质限制，降低催化效率。因此，如果能克服以上两方面问题，该技术将更有益于工业化的应用。

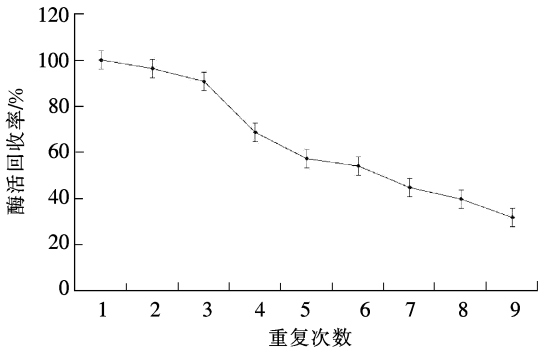

图 8　*i*CLEAs 的重复使用率

Fig. 8　Reusability of *i*CLEAs

3　结　论

本研究利用印迹交联酶聚体技术制备出了新型苯丙氨酸解氨酶印迹交联酶聚体，筛选出最适印迹底物，并考察了其部分催化性能。所制备新型固定化酶-印迹交联酶聚体不但克服了高浓度底物对 PAL 酶的底物抑制作用，而且有很好的重复使用性，具有很好的工业应用前景。

参考文献/References：

[1]　张思，张亚楠，崔建东. 交联酶聚体制备的研究进展[J]. 中国酿造，2010，18(8)：8-12.
ZHANG Si, ZHANG Yanan, CUI Jiandong. Research progress of cross-linked enzyme aggregates[J]. China Brewing, 2010, 18(8): 8-12.

[2]　GÁMEZ A, SARKISSIAN C N, WANG L, et al. Development of pegylated forms of recombinant *Rhodosporidium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria [J]. Molecular Therapy, 2005, 11(6): 986-989.

[3]　王晓华，张冬云，严慧敏. 苯丙氨酸解氨酶脂质体的制备及其抗白血病细胞增殖作用的初探[J]. 肿瘤防治研究，2003，30(5)：367-369.
WANG Xiaohua, ZHANG Dongyun, YAN Huimin. The preparation of liposome of phenylalanine ammonia lyase and its cytotoxic activi-

ty assay on leukemia cells[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2003, 30(5): 367-369.

[4] JANSSEN M H, van LANGEN L M, PEREIRA S R, et al. Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 78(4): 425-432.

[5] 王梦凡. 新型交联酶聚体技术及其在蛋白组学与生物催化中的应用[D]. 天津:天津大学,2011.
WANG Mengfan. The Improved Cross-Linked Enzyme Aggregates and Its Application in Proteomics and Biocatalysis [D]. Tianjin: Tianjin University, 2011.

[6] HORMIGO D, GARCIA-HIDALGO J, ACEBAL C, et al. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of recombinant poly-3-hydroxybutyrate depolymerase from Streptomyces exfoliatus [J]. Bioresoure Technology,2012, 115: 177-182.

[7] 张思. 粘红酵母苯丙氨酸解氨酶交联酶聚体的制备[D]. 石家庄:河北科技大学, 2012.
ZHANG Si. The Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates of Phenylalanine Ammonia Lyase from Rhodotorula Mucilaginosa [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2012.

[8] CABIROL F L, TAN P L, TAY B, et al. Linum usitatissimum hydroxynitrile lyase cross-linked enzyme aggregates: A recyclable enantioselective catalyst [J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2008, 350(14): 2329-2338.

[9] LÓPEZ-SERRANO P, CAO L, van RANTWIJK F, et al. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(16): 1379-1383.

[10] ALANKAR V, ALEXANDER B, ANJA M, et al. Altering glucose oxidase to oxidize *D*-galactose through crosslinking of imprinted protein [J]. ChemBioChem, 2004, 5(1): 132-135.

[11] de WINTER K, SOETAERT W, DESMET T. An imprinted cross-linked enzyme aggregate (*i*CLEA) of sucrose phosphorylase: Combining improved stability with altered specificity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(9): 11332-11341.

[12] CUI J D, ZHANG S, SUN L M. Cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase: Novel biocatalysts for synthesis of *L*-phenylalanine[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(4): 835-844.

[13] 李连连,崔建东. 以大孔硅胶为载体的苯丙氨酸解氨酶交联酶聚体的制备及性质研究[J]. 食品工业科技,2014,35(11): 160-165.
LI Lianlian, CUI Jiandong. Preparation and properties of cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase in the aminated macroporous silica gel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(11): 160-165.

[14] 王艳秋,王涛,史艳景. 室温下水凝胶合成的新型方法及测试研究[J]. 河北科技大学学报,2014,35(5):454-459.
WANG Yanqiu, WANG Tao, SHI Yanjing. New methods of instant gelation stimulated by water at room temperature and test research [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2014, 35(5): 454-459.

[15] 赵海艳,王贝贝,李献锐,等. 基于还原氧化石墨烯/普鲁士蓝-壳聚糖钠米复合物的高灵敏葡萄糖生物传感器研究[J]. 河北科技大学学报,2014,35(3):237-241.
ZHAO Haiyan, WANG Beibei, LI Xianrui, et al. Study of high sensitive glucose biosensor based on reduced graphene oxide/prussian blue-chitosan nanocomposite[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2014, 35(3): 237-241.

[16] CUI Jiandong, LI Lianlian, BIAN Hongjie. Immobilization of cross-linked phenylalanine ammonia lyase aggregates in microporous silica gel[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80581.