

表达磷酸转移酶工程菌整细胞 催化肌苷 5'-位磷酸化的工艺条件研究

李文峰¹, 郑明英¹, 蔡友华¹, 严杰能¹, 陆最青¹, 张达², 张翀², 梁伟凡², 邢新会²

(1. 广东肇庆星湖生物科技股份有限公司, 广东肇庆 526060) (2. 清华大学化工系, 北京 100084)

摘要: 本文利用构建的表达产气肠杆菌酸性磷酸转移酶 *phoC* 基因的 *E. coli* BL21, 对其整细胞催化肌苷 5'-位磷酸化的工艺条件进行了研究。研究结果表明在整细胞 PHOC 酶活、肌苷和焦磷酸浓度分别为 45 U、100 mM 和 120 mM 时, 反应 6 h 肌苷转化率达到 63.36%。为进一步提高转化率, 研究了 3 种表面活性剂对整细胞肌苷转化率的影响, 在 Trion-x-100 浓度为 0.3% 时, 肌苷转化率提高到 74.59%。该研究为酶催化肌苷 5'-位磷酸化的工业化进程提供了技术支持。

关键词: 磷酸转移酶; 肌苷; 产气肠杆菌; 整细胞; 表面活性剂

文章编号: 1673-9078(2012)7-810-813

Study on the Reaction Conditions of the Enzymatic 5'-Phosphorylation of Inosine using Whole Cells of Engineered *E. coli* with Expression of Phosphotransferase

LI Wen-feng¹, ZHENG Ming-ying¹, CAI You-hua¹, YAN Jie-neng¹, LU Zui-qing¹
ZHANG Da², ZHANG Chong², LIANG Wei-fan², XING Xin-hui²

(1. Star Lake Bioscience Co, Inc, Zhao Qing, Guangdong 526060, China)

(2. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In this paper, the enzymatic phosphorylation of inosine in the 5'-position to produce inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) with whole cells was studied, using the engineered *E. coli* BL21 with the expression of acid phosphotransferase (PHOC) *phoC* gene originated *E. aerogenes* IAM 1183. A maximum conversion rate of 63.36% was obtained after 6 h of enzymatic reaction at 30 °C in 100 mM inosine and 120 mM pyrophosphate (ppi) with PHOC activity of 45 U in a 150 mL reaction system. To further improve the conversion rate, the effects of three surfactants on the conversion rate were studied, and the conversion rate of inosine was increased to 74.59% at the addition of 0.3% Trion-x-100. This study provided basic data for the industrial application of the PHOC in production of 5'-IMP.

Key words: phosphotransferase; inosine; *Enterobacter aerogenes* IAM 1183; whole cells; surfactant

核苷酸常被用作食品添加剂和药物中间体而受到广泛关注, 其中 5'-肌苷酸钠(5'-IMP) 和 5'-鸟苷酸钠(5'-GMP)具有强烈独特的鲜味, 是新一代鸡精调味品的主要原料, 而 3'-肌苷酸钠和 2'-肌苷酸钠鲜味则基本没有鲜味^[1]。当前, 以肌苷和鸟苷为原料加上合适磷酸供体, 采用化学法和酶法催化都可以获得 5'-肌苷酸和 5'-鸟苷酸, 然而由于酶法具有催化条件温和、专一性较强、对环境友好、特异性高等特点^[2-5], 而受到国内外科人员和产业界的广泛关注, 发展迅速。如

收稿日期: 2012-05-18

基金项目: 国基自然科学基金重点项目 (20836004)

作者简介: 李文峰 (1964-), 男, 工程师, 主要从事发酵工程方面的研究

通讯作者: 邢新会, 教授, 从事生物化工领域研究

果能够充分利用酸性磷酸酶这一催化特性^[6], 可以开发出高效生产呈味核苷酸的酶工程技术。目前, 日本味之素公司已采用酶催化技术生产呈味核苷酸。

已有的研究发现 *Enteric Bacteria* 属的几个种 *providencia stuartii*, *Escherichia blattae* 和 *Klebsiella planticola* 的酸性磷酸酶具有选择性磷酸转移活性^[7-9]。本文前期在宿主 *E. coli* BL21 成功表达了 *Enterobacter aerogenes* IAM 1183 磷酸转移酶基因 *phoC*, 构建了产 PHOC 工程菌, 本文以肌苷转化率为指标, 对工程菌整细胞催化肌苷产肌苷酸工艺进行了研究, 并考察了表面活性剂硼酸, Trion-x-100 以及 DMSO 对肌苷转化率的影响。该研究将为磷酸转移酶催化肌苷生产 5'-IMP 的工业应用提供工艺基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和药品

仪器：FLC-3型超净工作台，生物反应器（LAMBDA），高效液相色谱（HPLC SHIMADZU 10A 系统），KUBOTA 3700型冷冻离心机，QL-901型涡旋振荡器，520Aplus型pH电极。

药品：肌苷和肌苷酸纯品(纯度为99%)由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司提供； $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 购于上海生工生物工程有限公司；Yeast extract 和Tryptone购于OXOID Ltd；SDS、CTAB、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)等药品皆为分析纯，均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌种和培养基

菌种：E. coli BL21为本实验室保存。

培养基(LB)：Tryptone 1%、NaCl 1%、Yeast extract 0.15% (pH 7.0)；固体LB培养基：在LB里加1.5%琼脂粉。

1.3 整细胞的制备和反应体系

整细胞的制备：将活化的 E. coli BL21 按 1% 接种到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min 培养 16 h，之后 12000 r/min 离心 5 min，去上清，菌体备用。

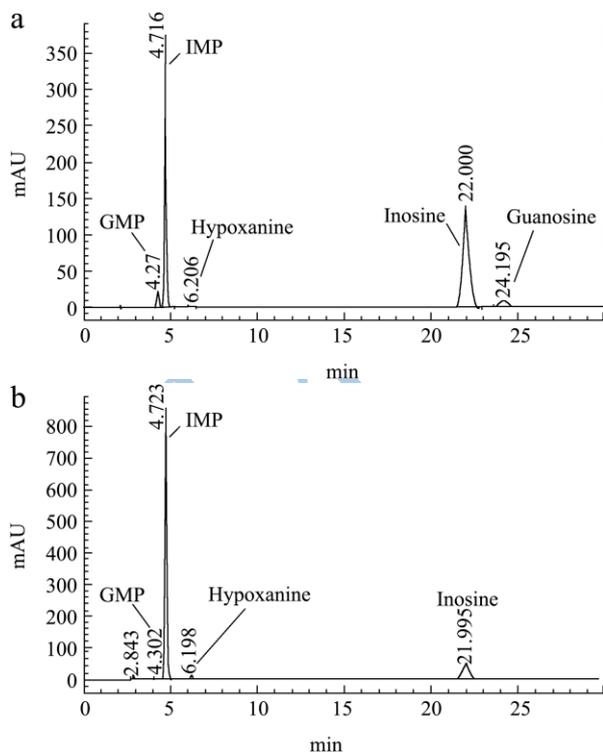


图1 混标 (a) 和酶反应液 (b) 的高效液相图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standards and reaction mixture by whole cell

基础的反应体系：100 mM ppi，80 mM 肌苷以及 pH 为 4.2 的 100 mM 醋酸钠缓冲液，反应条件为 150

r/min，30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 分析方法

利用高效液相色谱^[10,11] (SHIMADZU 10A 系列，日本) 测定肌苷和肌苷酸，具体条件如下：流动相为 0.5% 的磷酸二氢钾缓冲液，流速 1 mL/min，检测波长 245 nm，柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 1 μL ，色谱柱：XDB-C18 (4.6 \times 250 mm \times 5 μm)。图 1(a) 为 GMP、IMP、次黄嘌呤、肌苷和鸟苷的混标，在该方法下能很好地分离。图 1 (b) 为酶反应液的色谱图，由图可知反应液中含有少量肌苷水解的次黄嘌呤、微量的鸟苷酸以及还没有转化的肌苷，其余均为 IMP。单位磷酸酶的活性 (1U) 定义为：在基础的反应体系里每分钟生成 1 μmol 5'-IMP 所需要的酶量。

2 结果与分析

2.1 酶活添加量对转化率的影响

在 80 mM 肌苷、100 mM PPI 和 100 mM 醋酸钠的 150 mL 反应体系中，pH 为 4.2 的、振频 8 HZ，30 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下分别加入酶活单位为 15 U、30 U、45 U 和 60 U，考察其对肌苷转化率的影响，结果如图 2 所示：

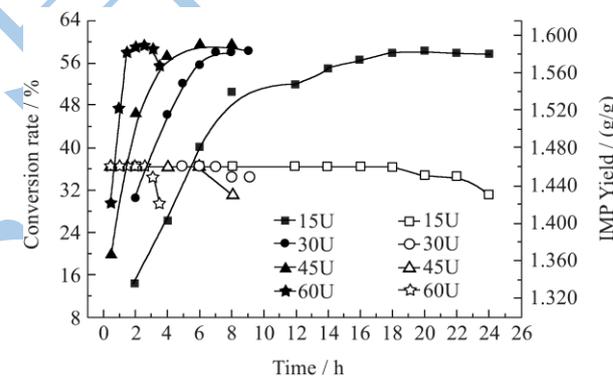


图2 酶添加量对肌苷转化率的影响

Fig.2 The effects of enzyme dosage on the inosine conversion rate

由图 2 可知，在几个不同酶单位添加量下，对肌苷转化率的影响不大，其最高的肌苷转化率都在 58.15% 左右，但是其催化效率则有较大区别，肌苷酸得率则基本没有变化，在 1.43~1.46 g/g 之间波动，酶活单位越高，肌苷酸和肌苷则有少量的水解。综合反应周期需要，在后续的实验，按 150 mL 体系中添加 45 U 的酶活单位进行催化实验。

2.2 肌苷浓度对转化率的影响

构建 150 mL 含酶活为 45 U，100 mM ppi，pH 为 4.2 的 100 mM 醋酸钠缓冲液作为反应体系，8 HZ 振频，30 $^{\circ}\text{C}$ 下，分别考察肌苷浓度分别为 70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、120 mM，考察其对肌苷转化率的影响，结果如图 3 所示：

由图3可知,在肌苷浓度为100 mM以下,肌苷最高转化率均在57~60%之间,而当肌苷浓度为120 mM时,则明显观察到底物抑制,其最高转化率为52.42%。在肌苷浓度120 mM时,产肌苷酸的量还是最高,在不考虑反应体系液体重复使用的前提下,综合转化率和产肌苷酸的量,在后续的反应体系中,肌苷的浓度定为100 mM进行催化实验。

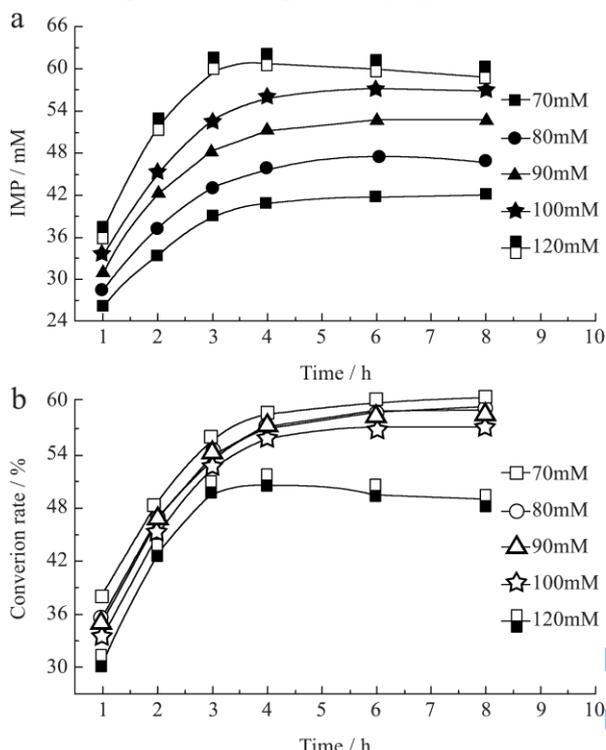


图3 肌苷浓度对肌苷转化率和肌苷酸产量的影响

Fig.3 The effect of inosine concentration on the inosine conversion rate and IMP production

2.3 焦磷酸浓度对转化率的影响

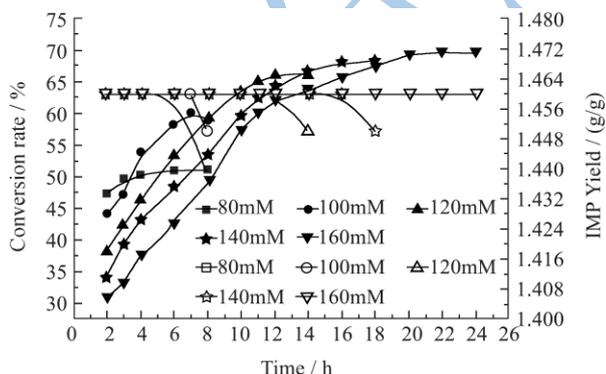


图4 无机焦磷酸浓度对肌苷转化的影响

Fig.4 The effect of ppi concentration on the inosine conversion rate

在酶活单位45 U、80 mM肌苷、100 mM PPI和100 mM醋酸钠的150 mL反应体系中,pH为4.2的、振频8 HZ,30 °C的条件下分别加入焦磷酸浓度分别为80 mM、100 mM、120 mM、140 mM和160 mM,

考察其对肌苷转化率的影响,结果如图4所示。

由图4可知,无机焦磷酸对肌苷转化率有较大影响,随着无机焦磷酸浓度的提高,肌苷催化效率明显降低,肌苷转化率提高缓慢,然而在一定的范围内,无机焦磷酸浓度的提高,有利于催化反应的进行,肌苷转化率也随着提高。肌苷酸得率则基本没有变化在1.43~1.46 g/g之间波动,综合催化效率和转化效率考虑,在后续的实验,无机焦磷酸浓度定为120 mM。

2.4 表面活性剂对转化率的影响

表面活性剂具有增溶、改性、弱化细胞壁和提高细胞膜通透性的作用,有可能促进肌苷向细胞内的传递及细胞中合成的肌苷酸向胞外的传递,进而提高肌苷的转化率。在含有不同表面活性剂的100 mM肌苷,120 mM ppi和100 mM醋酸钠的5 mL反应体系中加入酶活单位1.5 U,30 °C、pH 4.2、80 rpm旋转摇床下,反应6 h分别考察表面活性剂二甲基亚砜(DMSO)、Trion-X-100以及硼酸浓度在0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%和0.8%条件下考察其对肌苷转化率的影响,结果如图5所示:

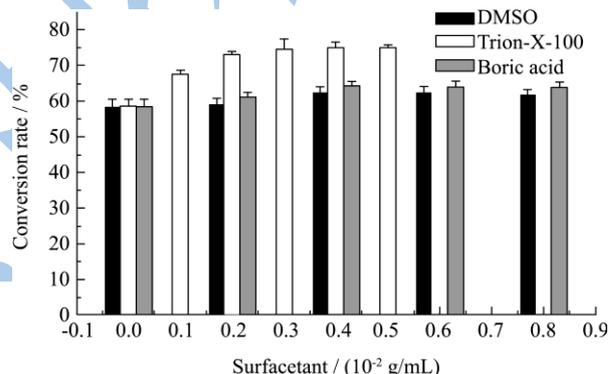


图5 三种表面活性剂对肌苷转化率的影响

Fig.5 The effect of three surfactants on the inosine conversion rate

由图5可知,三种表面活性剂对肌苷转化率都有一定的提高,在Trion-X-100添加量为0.3%时,与对照相比,肌苷转化率提高了18.29%,肌苷转化率达到74.95%。DMSO和硼酸对肌苷转化率则只是略有提高。由此,在后续的生产中如果不考虑菌体的反复利用,可以添加0.3%的Trion-X-100,将有利于肌苷催化效率和肌苷转化率的提高。

3 结论

3.1 综合肌苷转化效率和肌苷转化率为指标,最适酶催化工艺为:在150 mL反应体系中,肌苷浓度为100 mM,无机焦磷酸浓度为120 mM以及酶添加单位为45 U,在该条件下反应4 h,肌苷转化率为63.36%。

3.2 在最适的酶催化体系中,考察了DMSO、

Trion-X-100 以及硼酸对肌苷转化率的影响, 结果表明 Trion-X-100 的浓度为 0.3% 时, 肌苷转化率提高了 17.81%, 达到 74.95%。表明改变底物和产物的跨细胞传递速度对于提高肌苷的转化率具有重要的意义。

3.3 为进一步提高肌苷转化率, 需要进一步筛选合适、价廉的表面活性剂, 结合磷酸化酶基因改造, 建立最佳的酶催化体系, 推动我国呈味核苷酸的酶法生产技术发展。

参考文献

- [1] 周秀琴. 呈味核苷酸促进调料工业新发展[J]. 发酵科技通讯, 2010, 39(1): 53-56
- [2] Asano Y, Mihara Y, Yamada H. A new enzymatic method of selective phosphorylation of nucleosides [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1999, 6: 271-277
- [3] 崔桂友. 呈味核苷酸及其在食品调味中的应用[J]. *中国调味品*, 2001, 10: 25-32
- [4] 宋勇波, 蔡显鹏, 储炬, 等. 肌苷合成关键酶活性与肌苷积累之间的关系[J]. *微生物学报*, 2003, 3: 361-365
- [5] Kuninaka A. Studies on taste of ribonucleic acid derivative [J]. *J Agric Chem Soc Jpn*, 1960, 34: 489 (in Japanese)
- [6] ZHANG Chong, XING Xinhui, LOU Kai. Rapid detection of a gfp-marked *Enterobacter aerogenes* under anaerobic conditions by aerobic fluorescence recovery [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249: 211 - 218
- [7] Mihara Y, Utagawa T, Yamada H, Asano Y. Acid phosphatase/phosphotransferases from enteric bacteria [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 1: 50-54
- [8] Pompei R A, Ingianni G, Foddis G, et al. Patterns of phosphatase activity among enterobacterial species [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 174-178
- [9] Pompei R A, Ingianni G, Foddis G, et al. Use of a novel phosphatase test for simplified identification of species of the tribe proteaceae [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28: 1214-1218
- [10] 赵洪新, 杨程, 卢元, 等. 以产气肠杆菌催化肌苷 5'-位磷酸化的特性[J]. *清华大学学报(自然科学版)*, 2008, 48(12): 2124-21245
- [11] 赵洪新, 来奇恒, 杨程, 等. 产气肠杆菌磷酸酶基因克隆表达及其特性[J]. *化工学报*, 2008, 58(8): 2072-2076