

# 产 $\beta$ -苯丙氨酸变位酶基因工程菌的构建 及其发酵条件优化

Construction of recombinant *E. coli.* of producing  $\beta$ -phenylalanine  
aminomutase and optimization of fermentation conditions

葛 飞 唐 尧 朱龙宝 李艺雯 段振超 马琪森 陶玉贵

GE Fei TANG Yao ZHU Long-bao LI Yi-wen DUAN Zhen-chao MA Qi-sen TAO Yu-gui

(安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000)

(College of Biology and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

**摘要:**构建  $\beta$ -苯丙氨酸变位酶基因表达重组质粒 pET-28a-pam, 并转化大肠杆菌 BL21, 获得  $\beta$ -苯丙氨酸变位酶基因重组菌。考察培养基初始 pH、摇床转速、种龄、发酵时间以及装液量 5 个因素对  $\beta$ -苯丙氨酸变位酶基因工程菌产酶活性的影响, 确定较佳发酵条件为: 培养基初始 pH 7.0、摇床转速 200 r/min、发酵时间 24 h、装液量 50 mL/500 mL、种龄 10 h。采用 Box-Behnken 试验设计, 选择了种龄、初始 pH、发酵时间 3 个对  $\beta$ -苯丙氨酸变位酶活力影响较大的因素进行响应面优化。优化结果为: 在种龄 12.8 h、初始 pH 6.7、发酵时间 25.2 h 条件下, PAM 活力达到 11.15 U/mL, 比优化前酶活 4.87 U/mL 提高了 128.9%。

**关键词:** 重组大肠杆菌; 产酶条件;  $\beta$ -苯丙氨酸变位酶; 发酵

**Abstract:** The genetic engineering strain with recombinant plasmid pET-28a-pam was expressed in *E. coli* BL21. The fermentation conditions of initial pH, shaking speed, inoculation time and fermentation time were optimized with the PAM activity by using single factor. The results showed that the optimal fermentation conditions were initial pH 7.0, 200 r/min, the tenth hour broth and liquid volume 50 mL/500 mL, fermented for 24 h. Furthermore, the three factors were optimized by Box-Behnken design, and the results showed that inoculation time, initial pH and fermentation time are main affecting factors and their optimal levels are 12.8 h, 6.7 and 25.2 h. Under the optimal conditions, the activity of PAM reached 11.15 U/mL, improved by 128.9% compared with that under initial

culture conditions.

**Keywords:** Recombinant *E. coli.*; Enzyme production conditions;  $\beta$ -phenylalanine aminomutase; fermentation

$\beta$ -苯丙氨酸氨基变位酶 ( $\beta$ -Phenylalanine aminomutase, PAM) 属于 MIO-依赖氨基变位酶 (MIO-dependent aminomutase), 由于其特殊的催化特性可以在没有辅酶因子的情况下催化  $\alpha$ -苯丙氨酸转化为  $\beta$ -苯丙氨酸<sup>[1-2]</sup>。 $\beta$ -苯丙氨酸可以作为食品添加剂改善食品香味, 脱氢降解以后还可作为蜜饯的食品添加剂, 改善蜜饯的口感风味, 也可作为食品无公害环保防腐剂。另外,  $\beta$ -苯丙氨酸还是目前最有效的抗癌药物紫杉醇 (Taxol) 合成中的重要前体物质之一, 自然界中仅在植物红豆杉 (Taxus L.) 中发现含有 PAM<sup>[3-4]</sup>。目前生产  $\beta$ -氨基酸的主要方法是化学拆分法和手性辅助剂合成法等<sup>[5-6]</sup>。这些方法合成过程复杂, 生产成本高昂, 产品需要多次结晶才能使用, 且在生产过程中还会产生有毒有害的副产物, 不能满足实际需求, 利用分子生物学方法构建工程菌是未来高效、快速、安全生产的趋势<sup>[7-8]</sup>。目前中国对 PAM 的报道鲜有提及, 国外研究主要集中在  $\beta$ -苯丙氨酸变位酶 (PAM) 生产  $\beta$ -苯丙氨酸的方法方面, Szymanski W 等<sup>[9]</sup>利用 PAM 催化得到了  $\alpha$ -苯丙氨酸与  $\beta$ -苯丙氨酸的 1:1 的混合物。Wu 等<sup>[10]</sup>使用 PAM 的几种突变型酶进行比较, 选择出了其中较高催化率的酶并研究探讨了其催化机制。虽然有利用 PAM 催化生产  $\beta$ -苯丙氨酸的验证以及机制原理研究, 但未见利用重组大肠杆菌生产 PAM 并优化其发酵条件。因此构建 PAM 基因重组菌, 并利用重组大肠杆菌生产 PAM, 优化其产酶条件具有一定的理论和实践意义。本研究拟构建 PAM 重组大肠杆菌, 研究不同发酵条件对  $\beta$ -苯丙氨酸重组菌产酶的影响, 并采用响应面法对发酵条件进行优化, 以提高 PAM 重组菌的产量, 利用分子生物学手段和优化发酵条件得到一种

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (编号: 31671797); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2016A801); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201510363072)

**作者简介:** 葛飞 (1978—), 男, 安徽工程大学副教授, 博士。

E-mail: gerrylin@126.com

**收稿日期:** 2016-12-17

新型、环保、高效的 $\beta$ -苯丙氨酸的生产方式。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21、质粒 pET28a: 本实验室保藏;

DH5 $\alpha$ -pam: 苏州金唯智生物科技有限公司;

限制性内切酶 *EcoR* I、*Nde* I、Prime STAR DNA 聚合酶:  $2.0 \times 10^4$  units/mL, NEB 公司;

SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、磁珠法 DNA 胶回收试剂盒、dNTP Mixture(每种 8  $\mu$ mol): 生工生物工程(上海)技术有限公司;

T4 DNA 连接酶:  $4.0 \times 10^5$  units/mL, 生工生物工程(上海)技术有限公司;

胰蛋白胨、酵母提取物: 生物试剂, 国药集团化学试剂有限公司;

葡氯化钴、氯化铜、氯化锰、乙二胺四乙酸、硼酸、乙酸锌、双氨基甲烷、十六烷基三甲基溴化胺: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

卡那霉素、 $\alpha$ -苯丙氨酸、 $\beta$ -苯丙氨酸: 生物试剂, 生工生物工程(上海)技术有限公司。

### 1.2 主要仪器设备

组合式全温度震荡培养箱: QHZ-123B 型, 太仓市华美生化仪器厂;

数显恒温水浴锅: HH-6 型, 金坛市杰瑞尔电器有限公司;

无菌操作台: YJ-1450 型, 苏州工业园区三兴净化技术有限公司;

紫外可见分光光度计: JH-723 型, 上海菁华科技仪器有限公司;

台式低速离心机: L550 型, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

电子天平: YP-1002 型, 上海佑科仪器仪表有限公司;

数显 pH 计: PHSJ-3F 型, 上海精密科学仪器有限公司;

立式压力蒸汽灭菌锅: LDZX-50KBS 型, 上海申安医疗器械厂;

医用数控超声波清洗器: JK-2200 型, 合肥金尼克机械制造有限公司。

### 1.3 重组菌的构建

1.3.1 重组质粒 pET-28a-pam 的构建 依据 NCBI 所公布(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY724735.1>; GenBank 编号: AY724735.1)的 paPAM 基因序列以及 Lei 等<sup>[11]</sup>的研究成果设计上下游引物, 上游引物 p1: 5-GGAATTCATATGATGGGGTTTGCCTGGAATCGCGTTCTCACG-3'; 下游引物 p2: 5-CGGAATTCCTAGACGCCGTTGGCGACCCATTGGTTGG-3'。在 LB 培养基中隔夜培养 DH5 $\alpha$ -pam, 利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取其中质粒。使用 50  $\mu$ L 体系在 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min、94  $^{\circ}$ C 变性 1 min、58  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min 条件下对其进行 25 个循环

的 PCR 扩增, 50  $\mu$ L 体系为: 模板 2  $\mu$ L、Primerup 1  $\mu$ L、Primerdown 1  $\mu$ L、5 $\times$ PSBuffer 10  $\mu$ L、Prime STAR 0.5  $\mu$ L、dNTPMixture 4  $\mu$ L, 利用无菌水补充到 50  $\mu$ L。PCR 产物回收后使用 *EcoR* I/*Nde* I 在 37  $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中进行双酶切 4 h, 双酶切体系为: 回收产物 40  $\mu$ L、*EcoR* I 0.5  $\mu$ L、*Nde* I 0.5  $\mu$ L、100 $\times$ H Buffer 5  $\mu$ L, 利用无菌水补充到 50  $\mu$ L。电泳后使用磁珠法 DNA 胶回收试剂盒回收纯化含有目的基因的片段, 将纯化产物与 pET28 载体在 -16  $^{\circ}$ C 条件下进行连接, 体系为: 纯化产物 7  $\mu$ L、pET-28 1.5  $\mu$ L、10 $\times$ Buffer 1  $\mu$ L、T4 DNA Ligase 0.5  $\mu$ L。

1.3.2 PAM 重组菌的构建 使用氯化钙法制作 BL21 感受态细胞, 利用构建出的表达载体 pET-28a-pam 和 BL21 感受态细胞进行 KCM 法转化, 得到重组大肠杆菌。

### 1.4 培养基配制

种子培养基: 酵母提取物 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、葡萄糖 1 g/L、卡那霉素 0.5 g/L, pH 7.0; 发酵培养基: 磷酸二氢钾 13 g/L、葡萄糖 20 g/L、硫酸镁 1.3 g/L、柠檬酸 1.7 g/L、氯化锰 1.5 g/L、氯化铜 1.5 g/L、硼酸 3 g/L、高锰酸钠 2.5 g/L、乙酸锌 13 g/L、乙二胺四乙酸 8.4 mg/L、氯化钴 2.5 mg/L, pH 7.0。

### 1.5 培养方法

将菌种过夜活化后取 1 mL 放入 50 mL 种子培养基中, 使用 500 mL 三角烧瓶进行摇床振荡培养 12 h, 培养条件为 200 r/min、30  $^{\circ}$ C。以 10% 的接种量将种子培养基接入到 100 mL 的发酵培养基中, 使用 500 mL 的三角烧瓶在 200 r/min、30  $^{\circ}$ C 的条件下进行培养。16 h 后于 42  $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h, 30  $^{\circ}$ C 继续培养, 直到可以检测出酶活。

### 1.6 酶活测定

1.6.1  $\beta$ -苯丙氨酸标准曲线的绘制 详细绘制方法见文献[12~13]。分别取浓度为 480  $\mu$ g/mL 和 620  $\mu$ g/mL 的  $\beta$ -苯丙氨酸标准液 5 mL 加入到 10 mL 比色皿中, 再分别加入 1 mL 的茚三酮试剂使其充分混合均匀。使用数显恒温水浴锅在 90  $^{\circ}$ C 下水浴 25 min, 冷却至室温。利用 723 型紫外可见分光光度计测量其在 570 nm 下的光吸光度, 以标准液的光吸度和浓度作标准曲线。

1.6.2 测定方法 取 5 mL 菌种培养液 4 000 r/min 离心 10 min, 生理盐水清洗, 再次离心, 用 10 mL 的 25 mmol/L Tris-HCl 溶液彻底悬浮细胞。取 1 mL 的悬浮液, 用 0.5 g/L 的十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)于 30  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min。冲洗沉淀, 并加入 50 mmol/L  $\alpha$ -苯丙氨酸溶液 2.5 mL 和 25 mmol/L Tris-HCl 2 mL, 40  $^{\circ}$ C 条件下反应 10 min, 以 0.2 mL 6 mol/L HCl 溶液终止反应。离心后使用 723 紫外可见分光光度计测定其在 570 nm 下的吸光度。利用式(1)计算酶活:

$$U = \frac{C \times V}{M_{tw} \times T}, \quad (1)$$

式中:

$U$ ——酶活单位, U/mL;

$V$ ——反应体积, mL;

$M_w$ —— $\beta$ -苯丙氨酸的分子质量;

$C$ —— $\beta$ -苯丙氨酸的浓度, mg/L;

$T$ ——反应时间, min。

## 1.7 单因素试验设计

**1.7.1 初始 pH 的确定** 以 1.4 中发酵培养基配方, 在 30 °C、接种量 10%、种龄 12 h、摇床转速 200 r/min 条件下, 分别以初始 pH 值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 振荡培养 16 h。按 1.6 的方法检测 PAM 酶活, 考察初始 pH 对 PAM 酶活的影响。

**1.7.2 种龄的确定** 以 1.4 中发酵培养基配方, 在 30 °C、接种量 10%、初始 pH 7.0、摇床转速 200 r/min 条件下, 分别接种种龄为 8、10、12、14、16 h 的种子培养液于 100 mL 发酵培养基中振荡培养 16 h。按 1.6 的方法检测 PAM 酶活, 考察不同种龄培养液对 PAM 酶活的影响。

**1.7.3 发酵时间的确定** 以 1.4 中发酵培养基配方, 在 30 °C、接种量 10%、种龄 12 h、摇床转速 200 r/min、初始 pH 7.0 条件下, 分别于 100 mL 发酵培养基中培养 20、22、24、26、28 h。按 1.6 的方法检测 PAM 酶活, 考察发酵时间对 PAM 酶活的影响。

**1.7.4 装液量的确定** 以 1.4 中发酵培养基配方, 在 30 °C、接种量 10%、初始 pH 7.0、摇床转速 200 r/min、初始 pH 7.0 条件下, 分别于 25、50、75、100、125 mL 培养基中培养 16 h。按 1.6 的方法检测 PAM 酶活, 考察装液量对 PAM 酶活的影响。

**1.7.5 摇床转速的确定** 以 1.4 中发酵培养基配方, 在 30 °C、接种量 10%、初始 pH 7.0 条件下, 分别于 100 mL 发酵培养基中在 160、180、200、220、240 r/min 摇床速度下培养 16 h。按 1.6 的方法检测 PAM 酶活, 考察摇床转速对 PAM 酶活的影响。

根据单因素试验结果, 分析各个因素对产 PAM 的较佳条件。选择对 PAM 产酶影响较大的 3 个因素, 利用 Design Expert 软件设计三因素三水平的 Box-Behnken 试验, 对种龄、初始 pH、发酵时间 3 个发酵条件进行进一步优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 PAM 重组菌的构建

将构建菌株在 37 °C 条件下培养 1 h, 然后涂布于抗性平板筛选阳性重组子。利用 PCR 进一步验证重组子, 提取重组菌的质粒(结构示意图见图 1), PCR 扩增后使用 *EcoR* I/*Nde* I 进行双酶切。得到目的条带大小约为 2 100 bp(见图 2), 与预期相符合, 测序与 NCBI 所公布的 paPAM 基因序列相符。证明成功构建了含有目的基因的重组大肠杆菌。

### 2.2 单因素对重组菌产酶活的影响

**2.2.1 初始 pH 对 PAM 酶活性的影响** 由图 3 可知, 初始 pH 低于 6.5 时, PAM 的活性明显较低, 可能与低 pH 值会影响菌株寿命和 PAM 酶活有关。在 pH 为 6.5~7.0 时, PAM 酶活较高, pH 为 7.0 时酶活最高达到 5.77 U/mL; 当 pH 超过 7.0 后, 酶活呈下降趋势, 说明过高 pH 也会抑制 PAM 酶活。

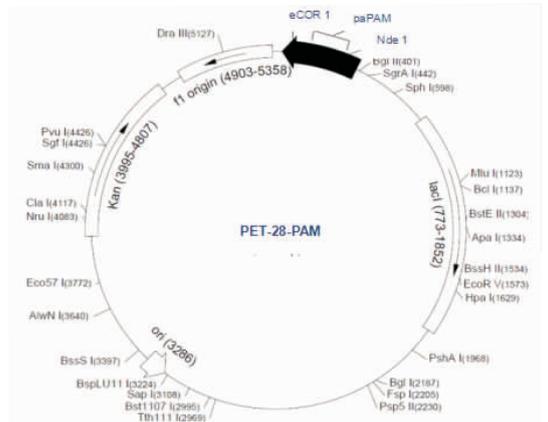
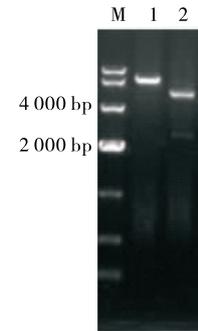


图 1 pET-28a-pam 结构示意图

Figure 1 pET-28a-pam Structure diagram



M. DL10000 marker 1. pET-28a-pam 2. pET-28a-pam digested with *EcoR* I/*Mde* I

图 2 重组质粒 pET-28a-pam 双酶切电泳图

Figure 2 Double-enzyme cleavage of the recombinant plasmid pET-28a-pam

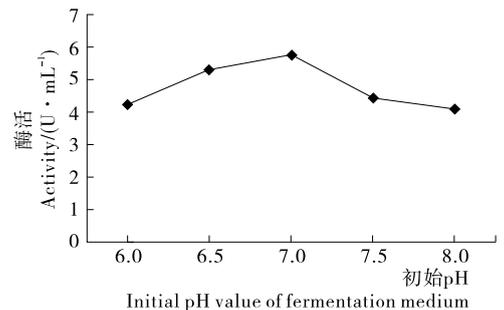


图 3 初始 pH 值对 PAM 酶活性的影响

Figure 3 Effects of initial pH value of fermentation medium on PAM activity

**2.2.2 种龄对 PAM 酶活性的影响** 由图 4 可知, 接种种龄小于 10 h 时的种子液, PAM 酶活性呈递增趋势。种龄 10 h 的发酵液 PAM 酶活达到最大值 (5.36 U/mL), 种龄超过 10 h 后, 酶活呈现下降趋势。小于 10 h 的种子活力不够, 生长速度较慢。10 h 之后的种子开始老化, 活力受到代谢副产物的影响进而导致酶活下降。

**2.2.3 发酵时间对 PAM 活性的影响** 由图 5 可知, 发酵时间在 20~24 h 时, PAM 酶活逐步增大, 在发酵时间为 24 h 时, PAM 酶活达到最大值 (5.47 U/mL)。发酵时间超过

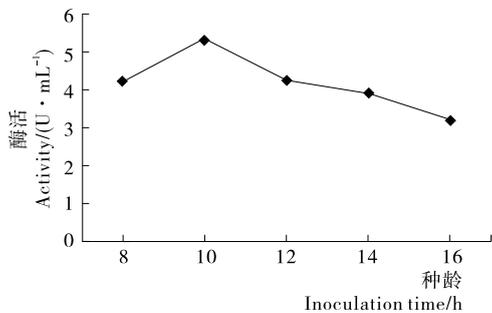


图4 种龄对PAM酶活性的影响

Figure 4 Effects of inoculation time on PAM activity

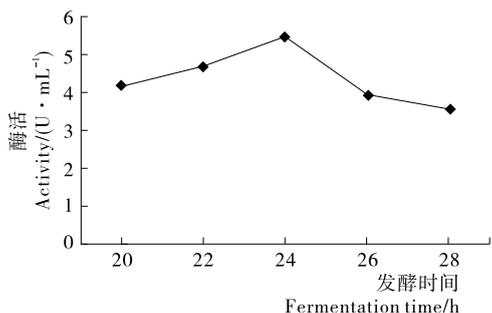


图5 发酵时间对PAM酶活性的影响

Figure 5 Effects of fermentation time on PAM activity

24 h后,PAM酶活快速下降,可能与菌株培养时间过长,菌体老化,发酵后期大量生成其它发酵产物有关。

2.2.4 装液量对PAM活性的影响 由图6可知,在500 mL三角瓶中装入50 mL培养基进行培养时,发酵液中PAM酶活最高,为5.62 U/mL,装液量在50~100 mL时,PAM酶活缓慢递减,然后趋于稳定。这是由于装液量逐步增大时摇瓶内的溶解氧含量下降,较低的氧浓度影响了菌体生长和代谢产物积累,致使PAM酶活下降。

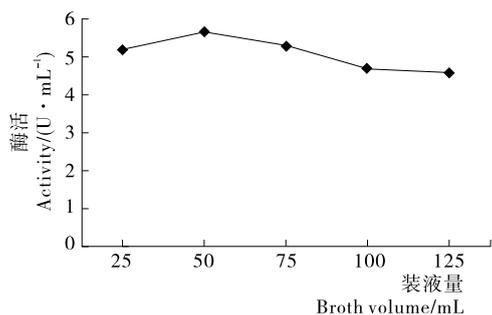


图6 装液量对PAM酶活性的影响

Figure 6 Effects of broth volume on PAM activity

2.2.5 摇床转速对PAM活性的影响 由图7可知,摇床转速为200 r/min时,PAM酶活最大,为5.56 U/mL,大于或小于200 r/min时都会导致酶活下降。这是由于转速过低会导致溶解氧不足,菌株生长、代谢受到抑制;而转速过高会使菌株过快消耗培养基中的营养成分,初级代谢产物积累过快,影响PAM酶活性。

### 2.3 Box-behken 试验分析

根据单因素的试验结果,选取对PAM酶活影响较大的

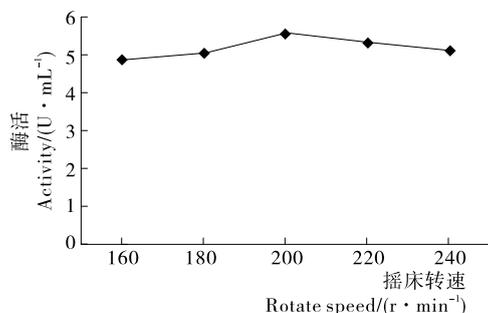


图7 摇床转速对PAM酶活性的影响

Figure 7 Effects of rotate speed on PAM activity

种龄、初始 pH 以及发酵时间作为优化对象。利用 Design Expert 软件设计出三因素三水平的方案,设计的试验因素和水平见表1。

以 Y(PAM 活性)为响应值,利用 Design Expert 软件分析表2中的试验结果,可以得到  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  的三元二次回归方程:

$$Y = 10.27 + 0.423 \ 112X_1 + 0.172 \ 37X_2 - 0.041X_3 - 0.636 \ 78X_1^2 - 0.379X_1 X_2 + 0.164X_1 X_3 - 1.321 \ 7X_2^2 + 0.665 \ 8X_2 X_3 - 1.151X_3^2 \quad (2)$$

表1 中心组合试验三因素三水平表

Table 1 Three main fermentation conditions and their three levels of optimization test based on central composition design principle

水平	$X_1$ 种龄/h	$X_2$ 初始 pH	$X_3$ 发酵时间/h
-1	8	6.5	22
0	10	7.0	24
1	12	7.5	26

表2 Box-Behnken 试验设计及结果表

Table 2 Design and results of Box-Behnken

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	酶活/(U · mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	0	8.63
2	-1	1	0	9.34
3	1	-1	0	9.56
4	1	1	0	8.41
5	0	-1	-1	9.41
6	0	-1	1	7.23
7	0	1	-1	8.94
8	0	1	1	8.17
9	-1	0	-1	7.98
10	1	0	-1	8.69
11	-1	0	1	8.77
12	1	0	1	10.13
13	0	0	0	10.23
14	0	0	0	10.88
15	0	0	0	10.61
16	-1	1	0	9.34
17	0	0	0	10.33

由表 3 可知,回归方程具有高度显著性,相关系数  $R = 91.23\% (>90\%)$ ,因此可以利用回归方程解释各个因素对于 Y(响应值)的影响。由表 3 还可知,  $X_2^2$  与  $X_3^2$  具有显著性,但是 3 个因素之间的交互项不显著。因此对于重组 PAM 的活力具有较大影响的条件是初始 pH 和发酵时间。失拟项 P 值为  $0.081 2 > 0.05$ ,说明无失拟因素存在。

2.4 响应面分析

使用 Design Expert 软件进行响应面分析,可以得到种龄、初始 pH、发酵时间 3 个因素两两之间影响的关系。由图 8~10 可知,每一个响应面都存在极值,即每一个影响因素对于 PAM 重组菌均存在一个最优条件;且等高线接近圆形,证明 3 个因素之间的交互作用不显著。

经软件计算,所选 3 个影响 PAM 产酶活性因素的最优组合为种龄 12.8 h、初始 pH 6.7、发酵时间 25.2 h。上述 3 个数值均可以在实际操作中进行验证。

2.5 实验验证结果

在所得的最优组合条件种龄 12.8 h、初始 pH 6.7、发酵时间 25.2 h 条件下,重复进行 3 次实验,PAM 酶活平均值为 11.15 U/mL,与预测值误差为 6.4%,误差值在 10% 以内,证明了利用响应面法优化重组菌产酶条件的准确性。在优化后发酵条件下,进行工程菌培养 PAM 酶活可达 11.15 U/mL,比优化前提高了 128.9%。

表 3 参数估计及方差分析表<sup>†</sup>

Table 3 Parameter estimates and analysis of regression equation obtained

来源	自由度	SS	MS	F	Pr>F	显著性
$X_1$	1	1.237 2	1.237 2	0.936 6	0.352 1	
$X_2$	1	0.241 2	0.241 2	0.173 9	0.641 3	
$X_3$	1	0.036 6	0.036 6	0.031 4	0.825 8	
$X_1^2$	1	1.578 3	1.578 3	1.149 7	0.316 4	
$X_1 X_2$	1	0.298 8	0.298 8	0.213 5	0.597 1	
$X_1 X_3$	1	0.119 7	0.119 7	0.078 6	0.721 9	
$X_2^2$	1	5.827 4	5.827 4	4.199 5	0.088 9	*
$X_2 X_3$	1	1.423 1	1.423 1	0.921 1	0.289 4	
$X_3^2$	1	9.013 6	9.013 6	6.843 1	0.049 8	*
失拟项	3	3.264 2	1.763 7	2.015 6	0.081 2	
回归	9	17.950 0	1.885 4	1.442 9	0.403 5	
残差误差	5	6.825 3	1.401 8			
总离差	14	22.986 7				

<sup>†</sup> P<0.01,回归模型极显著;P<0.05,回归模型显著。

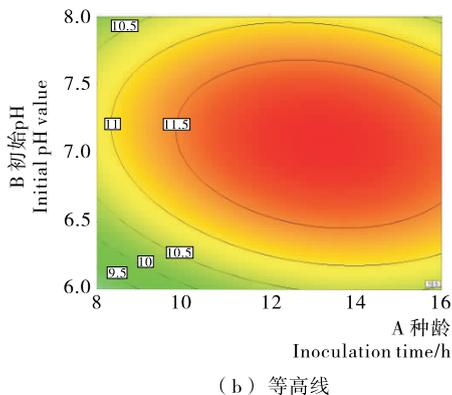
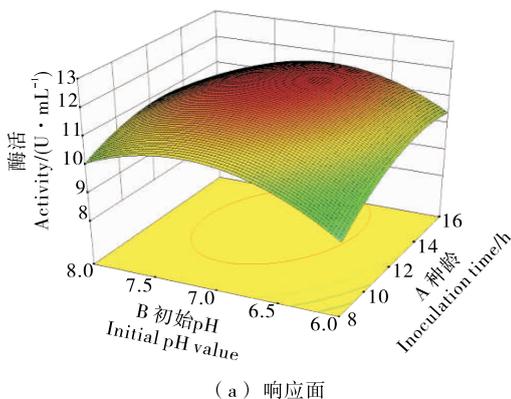


图 8 种龄(A)和初始 pH(B)交互影响 PAM 酶活性的响应面图

Figure 8 RSD figure of inoculation time (A) and initial pH value(B) interacting on PAM activity

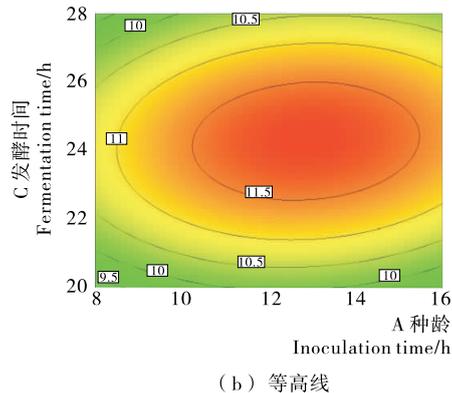
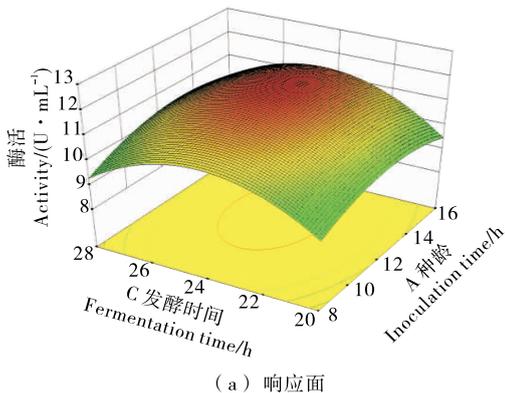


图 9 种龄(A)和发酵时间(C)交互影响 PAM 酶活性的响应面图

Figure 9 RSD figure of inoculation time(A) and fermentation time(C) interacting on PAM activity

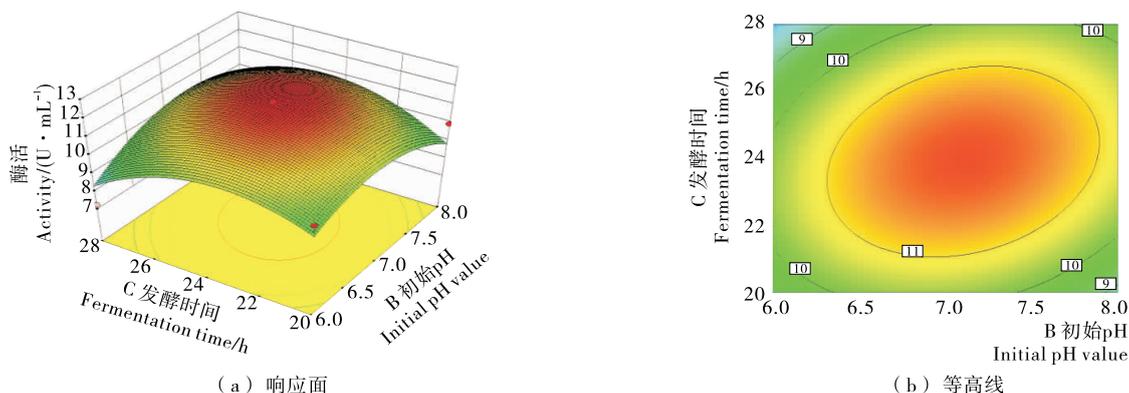


图 10 初始 pH(B)和发酵时间(C)交互影响 PAM 酶活性的响应面图

Figure 10 RSD figure of initial pH value(B) and fermentation time(C) interacting on PAM activity

### 3 结论

目前  $\beta$ -苯丙氨酸的主要生产方法为化学合成法,其技术也相对成熟,但是生物酶法具有安全、清洁、高效的特点有着巨大的优势,利用生物酶法制备  $\beta$ -氨基酸也被越来越多地关注。一些学者<sup>[11-14]</sup>在研究变位酶催化的机制,得到了关于 PAM 的催化机理以及催化特点,但仍然缺乏在生产、生活中利用 PAM 进行实际应用的研究,对  $\beta$ -苯丙氨酸日益增长的需求也未得到较好解决。

本试验利用分子生物学手段构建出产 PAM 重组大肠杆菌,并对 PAM 重组菌的产酶条件优化,确定了重组菌较佳单因素试验条件,即初始 pH 7.0、种龄 10 h、发酵时间 24 h、装液量 50 mL、摇床转速 200 r/min。在此基础上,利用响应面法得到了 3 个较主要影响因素的最佳组合为种龄 12.8 h、初始 pH 6.7、发酵时间 25.2 h,进一步促进菌株发酵液中 PAM 酶活提高,为 PAM 在实际生产中的应用提供了试验数据。然而,利用重组菌获得 PAM 还存在着产量低,菌株稳定性不高等问题,各种条件的优化也还在进一步探索之中,利用工程菌产酶优化的方法、PAM 的催化条件都尚需深入研究。

#### 参考文献

[1] WANG Kang, HOU Qin-qin, LIU Yong-jun. Insight into the mechanism of aminomutase reaction: A case study of phenylalanine aminomutase by computational approach[J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2013, 46(46C): 65-73.

[2] CALABRESE J C, JORDAN D B, BOODHOO A, et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. [J]. Biochemistry, 2004, 43 (43): 11 403-11 416.

[3] WALKER K D, KLETTKE K, AKIYAMA T, et al. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(52): 53 947-53 954.

[4] 周华, 朱祺, 杨艳芳, 等. 红豆杉分子生物学研究进展[J]. 植物生理学报, 2014(4): 373-381.

[5] DUURSMA A, MINNAARD A, FERINGA J, et al. Conversion of 1,4 adducts into versatile chiral building blocks[J] J. Am.

Chem. Soc., 2003, 125: 3 700-3 701.

[6] HOOK D F, GESSIER F, NOTI C, et al. Probing the proteolytic stability of beta-peptides containing alpha-fluoro- and alpha-hydroxy-beta-amino acids [J]. Chembiochem, 2004, 5 (5): 691-706.

[7] 曾伟川, 许瑞安, 曾庆友.  $\beta$ -氨基酸合成研究进展[J]. 合成化学, 2013, 21(5): 634-644.

[8] 李秀娟, 尹玲, 李秀珍, 等. 植酸酶毕赤酵母基因工程菌发酵条件的优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 11-13, 27.

[9] SZYMANSKI W, WU Bian, WEINER B, et al. Phenylalanine Aminomutase-Catalyzed Addition of Ammonia to Substituted Cinnamic Acids: a Route to Enantiopure  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amino Acids [J]. Journal of Organic Chemistry, 2009, 74(23): 9 152-9 157.

[10] WU Bian, SZYMANSKI W, WYBENGA G G, et al. Mechanism-inspired engineering of phenylalanine aminomutase for enhanced  $\beta$ -regioselective asymmetric amination of cinnamates. [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(2): 482-486.

[11] LEI Feng, WANNINAYAKE U, STROM S, et al. Mechanistic, mutational, and structural evaluation of a Taxus phenylalanine aminomutase[J]. Biochemistry, 2011, 50(14): 2 919-2 930.

[12] 韩秋敏. 比色法测定  $\beta$ -苯丙氨酸含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35): 15 294-15 296.

[13] 牛广财, 闫公听, 朱丹, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定沙棘酒中总多酚含量的工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 80-83, 142.

[14] RATNAYAKE N D, WANNINAYAKE U, GEIGE H, et al. Stereochemistry and mechanism of a microbial phenylalanine aminomutase[J]. J. Am. Chem. Soc., 2011, 133: 8 531-8 533.