1828

生 物 工 程 学 报
Chinese Journal of Biotechnology
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
DOI: 10.13345/j.cjb.200032

曹旭东 等/随机-半理性组合突变改造 ω-转氨酶催化合成(R)-1-(1-萘基)乙胺

Sep. 25, 2020, 36(9): 1828−1837
©2020 Chin J Biotech, All rights reserved

·工业生物技术·

-　　　　　　　　　　ω-

(R)-1-(1-　　　)

曹旭东 [1,2]，韩瑞枝 [1,2]，方红辉 [1,2]，倪晔 [1,2]

1 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡　214122
2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡　214122

摘　要：(R)-1-(1-萘基)乙胺是合成拟钙剂药物盐酸西那卡塞的关键手性中间体，利用 ω-转氨酶不对称还原 1-萘乙酮合成(R)-1-(1-萘基)乙胺具有较好的应用前景。文中针对节杆菌属 Arthrobacter sp.来源的 ω-转氨酶，采用随机突变和半理性设计相结合的策略，获得了催化效率和热稳定性提高的突变酶 F225M、C281I 和 F225M/C281I。与 WT 相比，双突变体 F225M/C281I 的 k_{cat} 提高 85%，K_m 下降 56%，催化效率 k_{cat}/K_m 提高 3.42 倍。此外，F225M/C281I 催化 10 mmol/L 1-萘乙酮反应 24 h 的转化率提高了 22%。分子对接和分子动力学模拟结果表明，F225M/C281I 相比于 WT 增加了与底物 1-萘乙酮之间的 Pi-Pi 相互作用力，导致其催化效率的提高；而且突变酶 F225M/C281I 的 134–139 位点残基的均方根波动 (RMSF) 相比 WT 明显降低，与半衰期的略微提高相关。

　　　　：ω-转氨酶，随机突变，半理性设计，1-萘乙酮，(R)-1-(1-萘基)乙胺

Engineering ω-transaminase by random mutagenesis and semi-rational design for the synthesis of (R)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine

Xudong Cao[1,2], **Ruizhi Han**[1,2], **Honghui Fang**[1,2], **and Ye Ni**[1,2]

1 *School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China*
2 *Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China*

Abstract: (R)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine is a key chiral intermediate for the synthesis of calcimimetic drug cinacalcet

hydrochloride. ω-Transaminase has been considered to be potential for producing (R)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine by asymmetric reduction of 1-acetonaphthone. Here, ω-transaminase from *Arthrobacter* sp. was engineered by combinatorial strategies of random mutagenesis and semi-rational design. Variants F225M, C281I, F225M/C281I with improved catalytic efficiency and thermostability were obtained. Compared with WT, variant F225M/C281I showed 85% increased k_{cat}, 56% decreased K_m and 3.42-fold k_{cat}/K_m. Furthermore, 22% higher conversion rate was achieved by F225M/C281I at 10 mmol/L 1-acetonaphthone after 24 h. Based on molecular docking and molecular dynamics simulation, improved catalytic efficiency of F225M/C281I could be attributed to its increased Pi-Pi T-shaped interaction with substrate 1-acetonaphthone. Additionally, a slightly higher half-life of F225M/C281I was validated by its lower root-mean-square fluctuation (RMSF) value of loop 134–139 compared with WT.

Keywords: ω-transaminase, random mutation, semi-rational design, 1-acetonaphthone, (R)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine

　　(R)-1-(1-萘基)乙胺是一种重要的手性芳香族胺化合物，广泛应用于医药、化工、材料等领域[1]。(R)-1-(1-萘基)乙胺是重要的药物手性中间体，也是其他手性对映体的常用拆分剂和手性助剂，在手性医药工业领域具有重要用途[2]。例如，(R)-1-(1-萘基)乙胺既可用于制备拟钙剂盐酸西那卡塞[3]，又可用于拆分外消旋邻苯二甲酸单薄荷酯以制备 L-薄荷醇[4]。

　　迄今为止，用于催化合成手性胺的酶主要包括水解酶[5]、氨裂解酶[6]、单胺氧化酶[7]、胺脱氢酶[8]、还原胺化酶[9]、亚胺还原酶[10]、转氨酶[11]等。ω-转氨酶是一种 5′-磷酸吡哆醛 (PLP) 依赖性酶，可将氨基从供体分子转移到前手性酮上，生成相应的手性胺[12]。目前，ω-转氨酶已广泛用于合成许多药物分子，如抗糖尿病药物西他列汀。Merck 和 Codexis 公司通过蛋白质工程策略改造 (R) 选择性 ω-转氨酶 (ATA-117)，通过多轮定点饱和突变、组合突变及随机突变技术，开发出了一种适用于工业化应用的新酶 Rd11TA，其催化活性较野生型酶提高 28 000 倍以上，该酶可将前手性的西他列汀酮转化为西他列汀手性胺分子[13]。与以前的化学催化工艺相比，该生物催化工艺不仅减少了排废并消除了对重金属的需求，还使总产量提高了 10%，生产率提高了 53%[14]。

　　手性(R)-1-(1-萘基)乙胺的制备方法有很多，可分为两类。第一类是化学拆分法，即采用(D)-酒石酸作为拆分剂分离外消旋 1-(1-萘基)乙胺[15]。但此过程时间较长,产物的光学纯度低并且产生大量废物。第二类是生物催化法，其中包括动力学拆分外消旋胺和不对称合成手性胺。Matthew 等[16]将 S 型 ω-转氨酶 ATA113 与氨基酸氧化酶组合，动力学拆分手性 1-(1-萘基)乙胺，获得单一构型的(R)-1-(1-萘基)乙胺，但动力学拆分存在的问题是得率最高为 50%。而不对称合成法是直接合成手性产物的方法，这是合成手性药物最经济有效的方法。Marx 等[17]以 1-萘乙酮为底物，采用 Codexis 公司市售的转氨酶试剂盒催化制备(R)-1-(1-萘基)乙胺,底物浓度 20 mmol/L 时转化率为 98%,对映体过量 (ee) 值大于 99%，证明了转氨酶催化不对称合成 (R)-1-(1-萘基)乙胺的方法有着一定的应用前景。但随着底物 1-萘乙酮浓度的升高，转化率也显著降低，这严重限制了其工业化生产。

　　近年来对 ω-转氨酶进行蛋白质工程改造的策略主要有随机突变、半理性设计和理性设计的策略[18-21]。Yun 等[22]使用易错 PCR 技术构建突变文库，筛选出对 2-氨基庚烷、2-氨基-6-甲基庚烷及 2-氨基辛烷活力提高 1.7–2.0 倍的突变酶。Han 等[23]对酶活性中心附近的氨基酸残基进行丙氨酸扫描并定点饱和突变，获得了催化活性较野生型酶明显提高的突变酶 W58L。Daniel 等[24]通过结构分析、分子对接、分子动力学模拟、量子力学计算、计算机蛋白质结构稳定性研究协同进化网络分析和体外筛选的理性设计策略，得到的突变酶不对称合成(1S)-1-(1,1′-联苯-2-基)乙胺的反应速率提高

1 716 倍以上，并且 *ee* 值大于 99%。

本研究对节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.) 来源的 ω-转氨酶 ARTA[25] (WT) 进行随机突变和半理性设计相结合的突变策略，旨在获得催化效率和热稳定性提高的突变酶，以期能够催化 1-萘乙酮合成(*R*)-1-(1-萘基)乙胺，并为生物催化法制备 (*R*)-1-(1-萘基)乙胺的工业化应用提供潜在生物催化剂。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

菌株与质粒：表达质粒 pET28a、表达宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)、重组质粒 pET28a/ BmGDH 和 pET28a/LpLDH 为实验室前期构建保存。pET28a/ARTA 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

LB 培养基 (g/L)：酵母粉 5，蛋白胨 10，氯化钠 10。

酶、试剂、引物和 DNA 序列测定：限制性核酸内切酶和胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。引物合成和 DNA 测序由天霖生物科技有限公司完成。

1.2　易错 PCR 构建随机突变文库

以 pET28a/ARTA 为模板，使用引物 P1 和 P2 (表 1) 进行目的片段扩增。在 PCR 混合体系中加入 100 μmol/L MnCl$_2$ 用于控制突变概率[26]，使得每个基因有 1–3 个突变位点。将 PCR 产物进行回收纯化后，并与 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切得到的线性化 pET28a 载体连接，然后通过一步克隆法将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中。

1.3　高通量筛选方法

挑选单菌落接种至 96 深孔板中，每孔含 300 μL LB 培养基和 50 μg/mL 卡那霉素。37 ℃、120 r/min 孵育 12 h，取其中 50 μL 培养物接种至新的 96 深孔板中，每孔含有 600 μL LB 培养基和 50 μg/mL

卡那霉素。37 ℃、120 r/min 培养 2 h 后，加入终浓度为 0.2 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)，25 ℃、120 r/min 再培养 8 h 后，4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。

向收集细胞的 96 深孔板中加入 200 μL 溶菌酶溶液 (10 mmol/L 磷酸钠 (PBS) 缓冲液，pH 8.0，含有 750 mg/L 溶菌酶和 10 mg/L DNase)，37 ℃、120 r/min 振荡 1 h，4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min，上清即为酶液。

500 μL 反应体系包括：100 μL 酶液，2 mmol/L 1-萘乙酮，20 mmol/L 丙氨酸，0.15 mmol/L PLP，4 U/mL LpLDH 酶液，0.2 mmol/L NADH，2 U/mL BmGDH 酶液，2 mmol/L 葡萄糖，10 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 8.0)，5%乙醇助溶。

30 ℃、120 r/min 反应 12 h 后，4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min，取上清 100 μL 到酶标板中，并加入 100 μL 的 1 mmol/L 酚红后测定 OD_{560}，并计算出 ΔOD_{560} ($\Delta OD_{560}=OD_{560(WT)}-OD_{560(Mutant)}$)，由于 ΔOD_{560} 的数值间接表示为突变酶相比于 WT 活力的大小[27]，因此 $\triangle OD_{560}$ 越高即说明该突变酶酶活力越高。

1.4　半理性设计突变酶的构建

ω-转氨酶的催化过程与底物和辅酶 PLP 都存在一定的相互作用[28]，利用 Discovery Studio 软件 (BIOVIA，美国) 的虚拟氨基酸突变模块，以 PDB:3wwi (ω-转氨酶 ARTA 同源性大于 99%) 为模板进行虚拟氨基酸突变得到 ARTA-WT，并通过分子对接模块对接底物 1-萘乙酮，选择底物 1-萘乙酮周围 6 Å 范围及 PLP 周围 4 Å 范围内共同的氨基酸残基 Tyr67、Trp192、Gly224、Phe225，并对这 4 个位点进行丙氨酸扫描及定点饱和突变，设计定点突变引物如表 1 所示。

以重组质粒 pET28a/ARTA 为模板，采用全质粒 PCR 方法进行定点突变，经 *Dpn* I 消化 PCR 模板后，将构建的质粒转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)，挑选正确的突变体用于表达。

表 1　易错 PCR 及定点突变引物
Table 1　Primers for error-prone PCR and site-directed mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5′–3′)
P1	GTGCCGCGCGGCAGC<u>CATATG</u>ATGGCATTTAGTGCCGATACCA
P2	GTGGTGGTGGTGGTGC<u>TCGAG</u>TTAATACTGAACCGGGGTCAGC
Y67A-F	AGCGACGTGACC<u>GCA</u>ACCGTG
Y67A-R	ATGGAACACGGT<u>TGC</u>GGTCAC
W192A-F	AAGAACTTTCAGG<u>CA</u>GGTGAT
W192A-R	AATCAGATCACC<u>TGC</u>CTGAAA
G224A-F	GCCGAAGGCAGT<u>GCA</u>TTTAAC
G224A-R	AACCACGTTAAA<u>TGC</u>ACTGCC
F225A-F	GAAGGCAGTGGC<u>GCA</u>ACGTG
F225A-R	CACAACCACGTT<u>TGC</u>GCCACT
F225C-F	GAAGGCAGTGGC<u>TGT</u>AACGTG
F225C-R	CACAACCACGTT<u>ACA</u>GCCACT
F225D-F	GAAGGCAGTGGC<u>GAT</u>AACGTG
F225D-R	CACAACCACGTT<u>ATC</u>GCCACT
F225E-F	GAAGGCAGTGGC<u>GAA</u>AACGTG
F225E-R	CACAACCACGTT<u>TTC</u>GCCACT
F225G-F	GAAGGCAGTGGC<u>GGT</u>AACGTG
F225G-R	CACAACCACGTT<u>ACC</u>GCCACT
F225H-F	GAAGGCAGTGGC<u>CAT</u>AACGTG
F225H-R	CACAACCACGTT<u>ATG</u>GCCACT
F225I-F	GAAGGCAGTGGC<u>ATT</u>AACGTG
F225I-R	CACAACCACGTT<u>AAT</u>GCCACT
F225K-F	GAAGGCAGTGGC<u>AAA</u>AACGTG
F225K-R	CACAACCACGTT<u>TTT</u>GCCACT
F225L-F	GAAGGCAGTGGC<u>CTG</u>AACGTG
F225L-R	CACAACCACGTT<u>CAG</u>GCCACT
F225M-F	GAAGGCAGTGGC<u>ATG</u>AACGTG
F225M-R	CACAACCACGTT<u>CAT</u>GCCACT
F225N-F	GAAGGCAGTGGC<u>AAT</u>AACGTG
F225N-R	CACAACCACGTT<u>ATT</u>GCCACT
F225P-F	GAAGGCAGTGGC<u>CCG</u>AACGTG
F225P-R	CACAACCACGTT<u>CGG</u>GCCACT
F225Q-F	GAAGGCAGTGGC<u>CAG</u>AACGTG
F225Q-R	CACAACCACGTT<u>CTG</u>GCCACT
F225R-F	GAAGGCAGTGGC<u>CGT</u>AACGTG
F225R-R	CACAACCACGTT<u>ACG</u>GCCACT
F225S-F	GAAGGCAGTGGC<u>AGC</u>AACGTG
F225S-R	CACAACCACGTT<u>GCT</u>GCCACT
F225T-F	GAAGGCAGTGGC<u>ACC</u>AACGTG
F225T-R	CACAACCACGTT<u>GGT</u>GCCACT
F225V-F	GAAGGCAGTGGC<u>GTT</u>AACGTG
F225V-R	CACAACCACGTT<u>AAC</u>GCCACT
F225W-F	GAAGGCAGTGGC<u>TGG</u>AACGTG
F225W-R	CACAACCACGTT<u>CCA</u>GCCACT
F225Y-F	GAAGGCAGTGGC<u>TAT</u>AACGTG
F225Y-R	CACAACCACGTT<u>ATA</u>GCCACT

Underlined codons of P1 and P2 are restriction sites. The other underlined codons are amino acid codons after the mutation.

1.5　WT 与突变酶的表达与纯化

将重组大肠杆菌 BL21/pET28a/ARTA 接种到 40 mL LB 培养基中 (含 50 µg/mL 卡那霉素),并于 37 ℃、180 r/min 培养到至 OD_{600} 为 0.6–0.8,加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG,25 ℃、180 r/min 继续培养 10 h。将培养液于 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。

将收集的细胞溶解在结合缓冲液 (0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L 咪唑,20 mmol/L PBS 缓冲液、5%甘油,pH 7.4) 中,并通过超声处理破碎,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,通过 0.45 µm 过滤器过滤上清液,并用 10 倍柱体积平衡 Ni-NTA 亲和层析柱,取 10 mL 破碎的上清液上样,用 10 倍柱体积的结合缓冲液洗涤非特异性结合的蛋白质,用 15 倍柱体积的洗脱缓冲液 (0.5 mol/L NaCl,100 mmol/L 咪唑、100 mmol/L PBS 缓冲液,5%甘油,pH 7.4) 洗脱蛋白质。收集样品通过超滤管除去残留的咪唑,并用 PBS 缓冲液 (100 mmol/L,pH 7.0) 置换。通过 SDS-PAGE 分析鉴定蛋白质样品,使用 Bradford 方法测定蛋白浓度。

1.6　比活力的测定

酶活力单位 (mU) 定义为:30 ℃、pH 7.0 条件下,以 1-萘乙酮为底物,每分钟催化产生 1 nmol 的(*R*)-1-(1-萘基)乙胺所需的酶量。所有酶活性测定结果均为 3 次重复试验数据的平均值。

500 µL 反应体系中包括:0.2 mg/mL ARTA 酶液,2 mmol/L 1-萘乙酮,20 mmol/L 丙氨酸,0.15 mmol/L PLP,4 U/mL LpLDH 酶液,0.2 mmol/L NADH,2 U/mL BmGDH 酶液,2 mmol/L 葡萄糖,100 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0),5%乙醇助溶。

30 ℃、120 r/min 反应 30 min 后,煮沸 5 min 终止反应,通过 HPLC 测定底物 1-萘乙酮和产物 (*R*)-1-(1-萘基)乙胺的浓度。对于初始速率测量,反应转化率限制在小于 20%,并根据酶活力的定义及蛋白浓度计算出比活力。

HPLC 检测方法为:用 0.22 µm 过滤膜将反应

液过滤后进行HPLC测定，色谱柱为Diamonsil C18 (5 μm，250 mm×4.6 mm)，流动相为：乙腈∶水∶乙醇胺=70∶30∶0.05，流速为 1 mL/min，UV 检测波长为 210 nm。

1.7 酶学性质的测定

1.7.1 动力学参数的测定

将 1-萘乙酮浓度梯度设定在 0–40 mmol/L 的底物浓度范围内，同时固定丙氨酸浓度为 20 mmol/L，其他条件根据 1.6 中描述的方法测量纯化后的 WT 及突变酶的比活力，通过 Origin 以底物 1-萘乙酮浓度为横坐标、比活力为纵坐标作图计算动力学参数的 k_{cat}、K_m 和 k_{cat}/K_m 值。

1.7.2 温度对反应的影响

测定纯化后的 WT 及突变酶在 20–50 ℃ (20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、50 ℃) 下的比活力，分析 WT 及其突变酶的最适反应温度。

1.7.3 pH 对反应的影响

测定纯化后的WT及突变酶在不同pH值 (pH 5.0–9.0) 下的缓冲液中的比活力，分析 WT 及其突变酶的最适反应 pH。其中缓冲液分别为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0、5.5、6.0)、PBS 缓冲液 (pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.0、8.5、9.0)。

1.7.4 热稳定性测定

将纯化后的 WT 及突变酶分别在 30 ℃、40 ℃ 温度下保温不同时间后，测定其残余的比活力，分析 WT 及其突变酶的热稳定性。

1.8 酶催化 10 mmol/L 1-萘乙酮反应

1 mL 反应体系中包括：100 mU/mL WT 或突变酶液，10 mmol/L 1-萘乙酮，100 mmol/L 丙氨酸，0.5 mmol/L PLP，10 U/mL LpLDH 酶液，1 mmol/L NADH，5 U/mL BmGDH 酶液，10 mmol/L 葡萄糖，100 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0)，5%乙醇助溶。

30 ℃、120 r/min 反应 24 h，期间分别于 20 min、40 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 时取样检测转化率。通过 HPLC 测定不同时间样品的底物 1-萘乙酮和产物 (*R*)-1-(1-萘基)乙胺的浓度，并计算出反应转化率绘制反应进程。

1.9 分子对接与分子动力学分析

利用 Discovery Studio 软件的虚拟氨基酸突变模块，以 1.4 中 ARTA-WT 为模板进行虚拟氨基酸突变得到 ARTA-F225M/C281I。通过分子对接模块将 ARTA-WT 和 ARTA-F225M/C281I 分别对接底物 1-萘乙酮，分别分析野生型和 F225M/C281I 与 1-萘乙酮之间的相互作用力。通过分子动力学模拟模块对 ARTA-WT 和 ARTA-F225M/C281I 分别进行时长为 100 ns 的分子动力学模拟，并分析均方根偏移 (RMSD) 和均方根波动 (RMSF)。

2 结果与分析

2.1 随机突变提高 ω-转氨酶活力

采用易错 PCR 方法对 WT 进行随机突变，以 1-萘乙酮作为底物进行高通量筛选，最终从 10 000 个突变体中获得了一株催化活力提高的突变体，测序结果为 C281I。纯化后测得突变体 C281I 的比活力为 (8.78±0.25) mU/mg，相比于 WT 的比活力 ((5.59±0.14) mU/mg) 提高了约 57%。

2.2 半理性设计构建突变酶

对 Tyr67、Trp192、Gly224、Phe225 这 4 个位点进行丙氨酸扫描，相比于 WT，发现只有 F225A 的比活力有所提升，而 Y67A、W192A、G224A 的比活力下降明显 (图 1A)。因此，对 Phe225 进行定点饱和突变，获得 19 种突变酶。

对 WT 和 19 种突变酶进行酶活测定，结果表明，突变体 F225M 比活力最高 (图 1B)，为 (10.07±0.49) mU/mg，与 WT 相比提高了约 80%。将 F225M 与随机突变筛选到的 C281I 突变体进行组合突变得到突变体 F225M/C281I，其纯酶比活力为 (9.37±0.55) mU/mg，相比 WT 提高了 67%，因此选择突变体 F225M、C281I 和 F225M/C281I 为对象进行后续研究。

2.3　WT 与突变酶反应动力学分析

　　将纯化后的突变酶 F225M、C281I 和 F225M/C281I 进行酶反应动力学参数分析 (表 2)，与 WT 相比，突变体 F225M、C281I 和 F225M/C281I 的 k_{cat} 分别提高了 110%、55%和 85%，K_m 分别下降了 44%、49%和 56%，催化效率 k_{cat}/K_m 分别提高了 2.81 倍、2.08 倍和 3.42 倍。突变体 F225M、C281I 和 F225M/C281I 相比于 WT 均表现出较低的 K_m 值和较高的 k_{cat} 值，这表明突变体的催化效率提高归因于酶与底物亲和力的增强[29]。

　　如表 2 所示，与 WT 相比，突变体在 30 ℃ 和 40 ℃ 的半衰期虽有一定提高，但提升并不显著，其中提升最多的 F225M/C281I 在 30 ℃和 40 ℃的半衰期分别仅提高了 0.64 h 和 0.33 h。因此，分子改造并未对酶的热稳定性造成显著的影响，仍保持与野生酶相当的半衰期。

　　以上结果表明，获得的 3 个突变酶 (特别是 F225M/C281I) 对 1-萘乙酮底物亲和力以及催化效率均有提高，并保持与野生型相当的热稳定性。

2.4　反应温度及 pH 对 WT 和突变酶的影响

　　反应温度对 WT 与突变酶 F225M、C281I 和 F225M/C281I 的影响如图 2A 所示。WT 和突变酶的最适反应温度均为 30 ℃，在 20–30 ℃时，比活力随着反应温度升高而上升；在 30–50 ℃时，比活力随着反应温度升高而下降。其中在 30–35 ℃范围内，WT 和突变酶比活力均维持在最高比活力的 70%以上。

　　pH 对 WT 与突变酶反应的影响如图 2B 所示。WT 与突变酶 F225M、C281I 和 F225M/C281I 最适反应 pH 均为 7.0。在 pH 5.0–7.0 范围内时，WT 与突变酶比活力随着反应 pH 的增高而上升；当缓冲液在 pH 7.0–8.0 范围内，比活力随着反应 pH 的增高而下降。在 pH 6.5–7.5 范围内，WT 与突变酶比活力均维持在 70%以上。
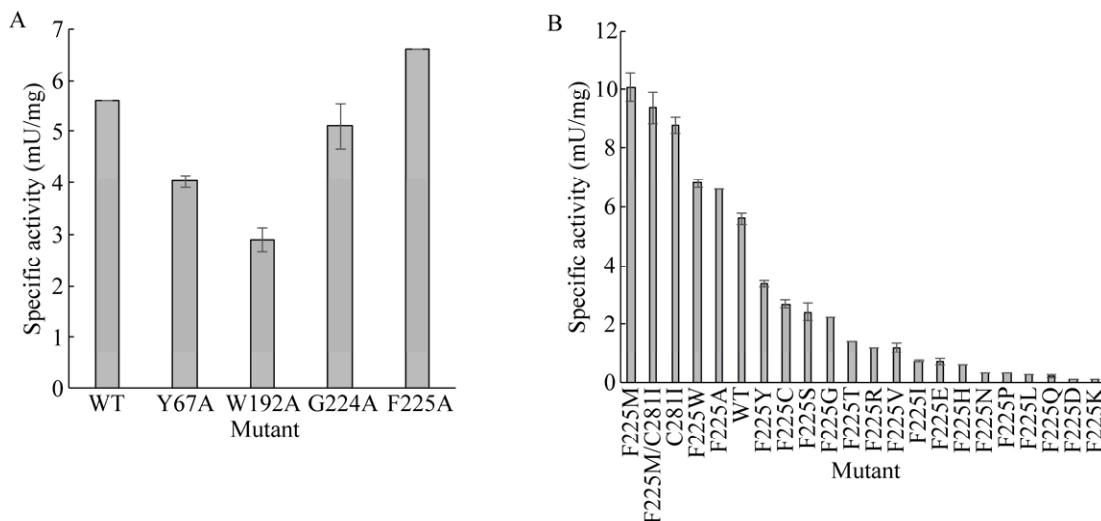

图 1　WT 及突变体酶比活力 (A：丙氨酸扫描；B：定点饱和突变与组合突变)
Fig. 1　Specific activities of WT and its mutants. (A) Alanine scanning. (B) Site-directed saturation mutagenesis of Phe225 and combinatorial mutation.

表 2　WT 及突变体酶学特性
Table 2　Enzymatic characterization of WT and its mutants

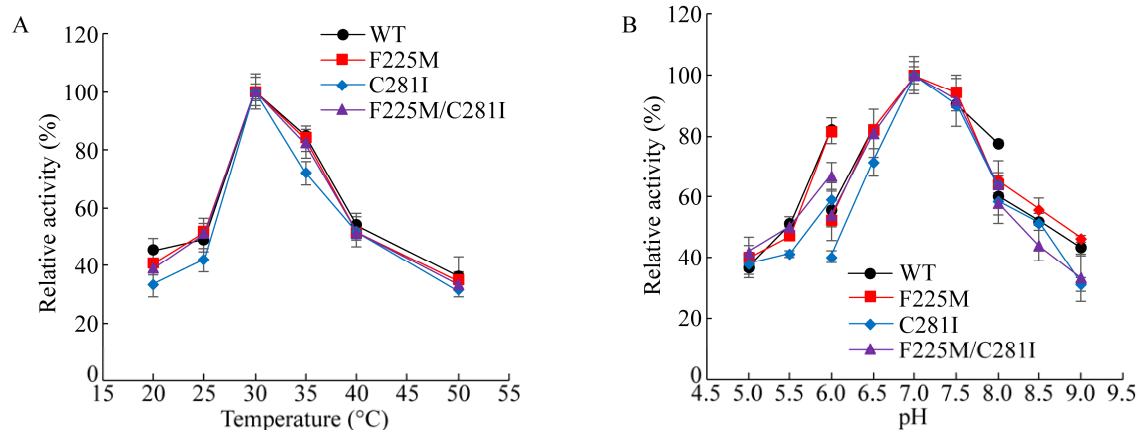| Name	k_{cat} (h^{-1})	K_m (mmol/L)	k_{cat}/K_m (L/(mol·min))	$t_{1/2}$ (h, 30 °C)	$t_{1/2}$ (h, 40 °C)
Wild type	11.13±1.02	2.53±0.30	110.65±8.69	42.67±0.52	9.59±0.09
F225M	23.41±0.82	1.40±0.18	421.19±32.81	42.59±0.34	9.74±0.05
C281I	17.33±0.64	1.28±0.11	339.43±15.11	43.01±0.35	9.88±0.08
F225M/C281I	20.63±0.27	1.10±0.07	488.95±20.09	43.31±0.57	9.92±0.12

图 2　WT 及突变体的最适反应温度 (A) 和最适反应 pH (B)

Fig. 2　Optimum reaction temperature (A) and pH (B) of WT and its mutants. Buffers include sodium citrate buffer (pH 5.0–6.0), PBS buffer (pH 6.0–8.0) and Gly-NaOH buffer (pH 8.0–9.0) were used.

2.5　酶催化 10 mmol/L 1-萘乙酮的反应进程

　　在 10 mmol/L 的 1-萘乙酮底物浓度下，采用 0.1 U/mL WT 和突变酶。如图 3 所示，在前 2 h 反应速率最快，从 2 h 开始反应开始变缓，到 12 h 反应基本趋于稳定。反应 24 h，突变酶的转化率均较 WT 有所提高，突变酶 F225M、C281I 和 F225M/C281I 的转化率分别为 76.79%±1.69%、69.81%±0.70%、78.87%±2.06%，其中突变酶 F225M/C281I 比 WT (64.41%±2.58%) 提高 22%。

2.6　突变体的结构模拟分析

　　为解析突变体催化效率与稳定性提高的机制，通过 Discovery Studio 进行分子对接和分子动力学模拟。首先模拟了突变体 F225M/C281I 突变位点的改变，并进行了与底物 1-萘乙酮的分子对接，作用力模拟分析表明 (图 4)，WT 与 1-萘乙酮 12 个氨基酸残基之间分别存在 9 个范德华力、1 个碳氢键和 2 个 Pi-烷基作用力。而突变体 F225M/C281I 与 1-萘乙酮之间除了存在 12 个范德华力、1 个传统氢键、1 个 Pi-烷基作用力，还存在着 2 个 Pi-Pi T 形相互作用力，并且与 1-萘乙酮之间存在相互作用力的氨基酸残基增加到 16 个。因此，相比于 WT，突变体 F225M/C281I 除了由于其亲和力增加了对底物 1-萘乙酮的结合之外，底物似乎在结合口袋中更加稳定了，更有利于催化反应的进行[30]。
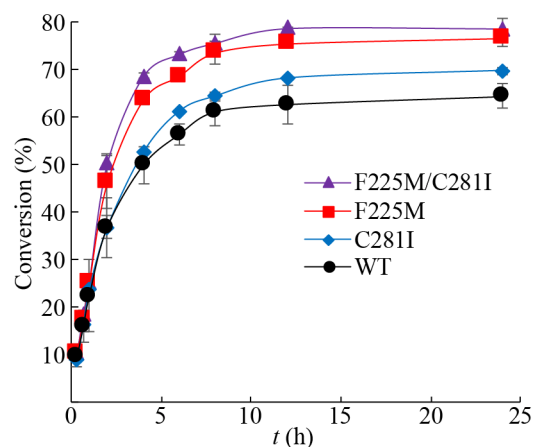

图 3　WT 及突变酶不对称还原 10 mmol/L 1-萘乙酮的反应进程

Fig. 3　Time course of asymmetric reduction catalyzed by WT and its mutants at 10 mmol/L 1-acetonaphthone.

模拟结果与实验测得酶促反应动力学参数 K_m 下降一致，进一步解释了突变体酶活力提高的原因。尽管 225 位点和 281 位点远离酶活性中心，不直接参与底物的结合和催化反应，但它们在催化过程中也会起较大的辅助作用，并在酶催化过程中对酶的构象变化起一定作用。

　　分子动力学模拟结果 (图 5) 表明，虽然突变酶 F225M/C281I 与 WT 的 RMSD 没有明显变化，但是突变酶 F225M/C281I 的 134–139 位点残基的 RMSF 比 WT 明显降低。RMSF 值通常反映分子动
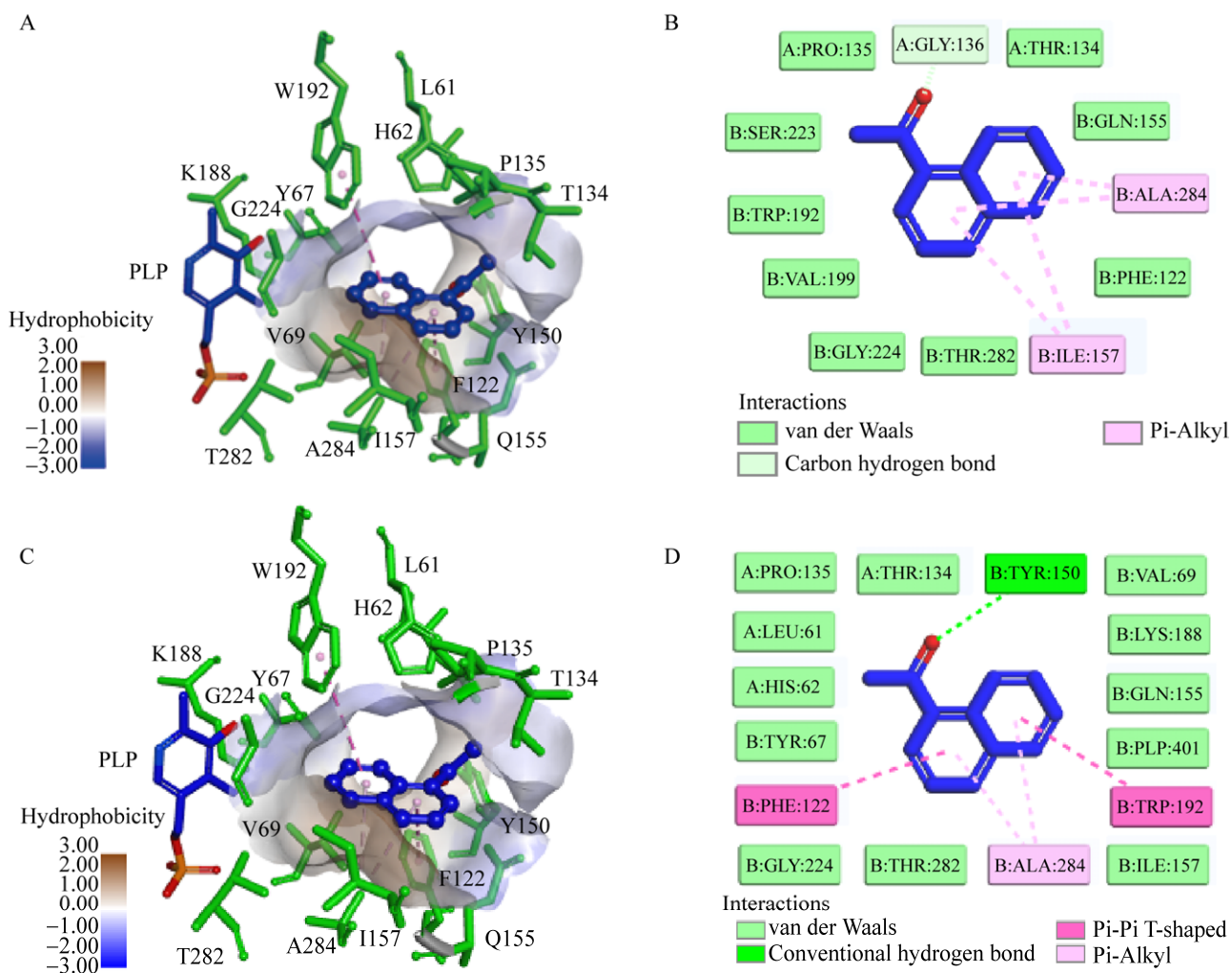
图 4　分子对接分析 WT (A、B) 及突变体 F225M/C281I (C、D) 与底物 1-萘乙酮之间的作用力

Fig. 4　Molecular docking analysis of interactions between WT, variant F225M/C281I and substrate 1-acetonaphthone. (A–B) 3D and 2D views of the interactions between WT and 1-acetonaphthone. (C–D) 3D and 2D views of the interactions between F225M/C281I and 1-acetonaphthone.
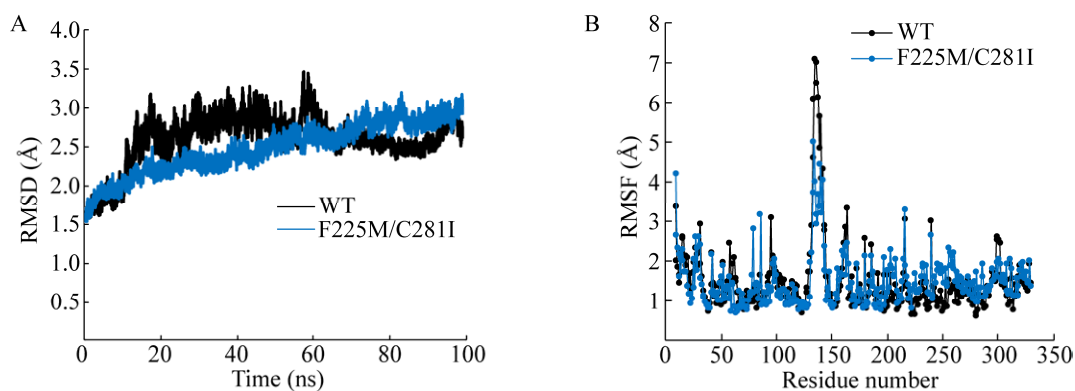

图 5　分子动力学模拟分析 WT 及突变酶 F225M/C281I

Fig. 5　Molecular dynamics simulation analysis of WT and variant F225M/C281I. (A) RMSD. (B) RMSF.

力学模拟过程中单个残基的波动，通过对 RMSF 数值高的氨基酸残基进行突变也是一种常见的提高蛋白质热稳定性的方法[31]。因此 RMSF 的降低与热稳定性呈正相关，在此猜想突变体 F225M/C281I 半衰期略微提高可能是由于 Met225 和 Ile281 影响了另一条链的 Loop 134–139 区的刚性。

3　结论

本研究采用随机突变和半理性设计相结合的策略，对来源于 *Arthrobacter* sp.的 ω-转氨酶进行蛋白质工程改造，筛选得到对 1-萘乙酮具有高催化效率的突变酶 F225M、C281I 和 F225M/C281I。其中 F225M/C281I 提升最为明显，与 WT 相比，其 k_{cat} 提高了 85%，K_m 下降了 56%，相应的催化效率 k_{cat}/K_m 提高了 3.42 倍。在底物 1-萘乙酮浓度提高至 10 mmol/L 时，F225M/C281I 反应 24 h 转化率为 78.87%±2.06%，较 WT 提高了 22%。通过 Discovery Studio 进行分子对接和分子动力学模拟，分析了突变体 F225M/C281I 相比于 WT 催化效率提高的原因是增加了与底物 1-萘乙酮之间的 Pi-Pi T 形相互作用力。突变体 F225M/C281I 的 loop 区 134–139 位点残基的均方根波动 RMSF 相比 WT 明显降低，与其半衰期略微提高相关。

REFERENCES

[1] Blaser H. Enantioselective catalysis in fine chemicals production. Chem Commun, 2003, (3): 293–296.

[2] Lu DQ, Xia FJ, Wang Q, et al. Preparation and drug application of chiral 1-(1-naphthyl)ethylamine. Mod Chem Ind, 2014, 34(5): 30–34 (in Chinese).
卢定强, 夏芙洁, 王琦, 等. 手性 1-(1-萘基)乙胺的制备及其药物应用最新进展. 现代化工, 2014, 34(5): 30–34.

[3] Thiel OR, Bernard C, Tormos W, et al. Practical synthesis of the calcimimetic agent, cinacalcet. Tetrahedron Lett, 2008, 49(1): 13–15.

[4] Dudas J, Hanika J. Design, scale up and safe piloting of thymol hydrogenation and menthol racemisation. Chem Eng Res Des, 2009, 87(1): 83–90.

[5] Paetzold J, Bäckvall JE. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of primary amines. J Am Chem Soc, 2005, 127(50): 17620–17621.

[6] He BB, Chen XL, Zheng YG, et al. Amine-lyases and their applications in preparation of pharmaceutical intermediates. Microbiol China, 2008, 35(7): 1113–1118 (in Chinese).
何碧波, 陈小龙, 郑裕国, 等. 胺基裂解酶及其在医药中间体生产中的应用. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1113–1118.

[7] Ghisleri D, Green AP, Pontini M, et al. Engineering an enantioselective amine oxidase for the synthesis of pharmaceutical building blocks and alkaloid natural products. J Am Chem Soc, 2013, 135(29): 10863–10869.

[8] Abrahamson MJ, Vázquez-Figueroa E, Woodall NB, et al. Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines. Angew Chem Int Ed, 2012, 51(16): 3969–3972.

[9] Aleku GA, France SP, Man H, et al. A reductive aminase from *Aspergillus oryzae*. Nat Chem, 2017, 9(10): 961–969.

[10] Mangas-Sanchez J, France SP, Montgomery SL, et al. Imine reductases (IREDs). Curr Opin Chem Biol, 2017, 37: 19–25.

[11] Mathew S, Yun H. ω-transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. ACS Catal, 2012, 2(6): 993–1001.

[12] Guo F, Berglund P. Transaminase biocatalysis: optimization and application. Green Chem, 2017, 19(2): 333–360.

[13] Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. Science, 2010, 329(5989): 305–309.

[14] Desai AA. Sitagliptin manufacture: a compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. Angew Chem Int Ed, 2011, 50(9): 1974–1976.

[15] Hu J, Dong J, Shi XX. Preparation of chiral naphthylethylamines by recycling resolution. Chin J Synth Chem, 2010, 18(1): 61–63 (in Chinese).
胡键, 董菁, 施小新. 用循环拆分法制备手性萘

乙胺. 合成化学, 2010, 18(1): 61–63.

[16] Truppo MD, Turner NJ, Rozzell JD. Efficient kinetic resolution of racemic amines using a transaminase in combination with an amino acid oxidase. Chem Commun, 2009, (16): 2127–2129.

[17] Marx L, Ríos-Lombardía N, Farnberger JF, et al. Chemoenzymatic approaches to the synthesis of the calcimimetic agent cinacalcet employing transaminases and ketoreductases. Adv Synth Catal, 2018, 360(11): 2157–2165.

[18] Gao XX, Wei PH. Advances in molecular modification of ω-transaminase. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1057–1068 (in Chinese).
高新星, 韦平和. ω-转氨酶分子改造研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1057–1068.

[19] Sharma A, Gupta G, Ahmad T, et al. Enzyme engineering: current trends and future perspectives. Food Rev Int, 2019, DOI: 10.1080/87559129.2019.1695835.

[20] Frey R, Hayashi T, Buller RM. Directed evolution of carbon–hydrogen bond activating enzymes. Curr Opin Biotechnol, 2019, 60: 29–38.

[21] Qu G, Zhu T, Jiang YY, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design. Chin J Biotech, 2019, 35(10): 1843–1856 (in Chinese).
曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程：从定向进化到计算设计. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1843–1856.

[22] Yun H, Hwang BY, Lee JH, et al. Use of enrichment culture for directed evolution of the *Vibrio fluvialis* JS17 ω-transaminase, which is resistant to product inhibition by aliphatic ketones. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8): 4220–4224.

[23] Han SW, Park ES, Dong JY, et al. Mechanism-guided engineering of ω-transaminase to accelerate reductive amination of ketones. Adv Synth Catal, 2015, 357(8): 1732–1740.

[24] Dourado DFAR, Pohle S, Carvalho ATP, et al. Rational design of a (S)-selective-transaminase for asymmetric synthesis of (1S)-1-(1, 1′-biphenyl-2-yl) ethanamine. ACS Catal, 2016, 6(11): 7749–7759.

[25] Iwasaki A, Yamada Y, Kizaki N, et al. Microbial synthesis of chiral amines by (*R*)-specific transamination with *Arthrobacter* sp. KNK168. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69(5): 499–505.

[26] Gong XM, Qin Z, Li FL, et al. Development of an engineered ketoreductase with simultaneously improved thermostability and activity for making a bulky atorvastatin precursor. ACS Catal, 2019, 9(1): 147–153.

[27] Truppo MD, Turner NJ. Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions. Org Biomol Chem, 2010, 8(6): 1280–1283.

[28] Mascarenhas R, Le HV, Clevenger KD, et al. Selective targeting by a mechanism-based inactivator against pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes: mechanisms of inactivation and alternative turnover. Biochemistry, 2017, 56(37): 4951–4961.

[29] Li AP, Ye LD, Yang XH, et al. Reconstruction of the catalytic pocket and enzyme-substrate interactions to enhance the catalytic efficiency of a short-chain dehydrogenase/reductase. Chem Cat Chem, 2016, 8(20): 3229–3233.

[30] Zheng GW, Liu YY, Chen Q, et al. Preparation of structurally diverse chiral alcohols by engineering ketoreductase *Cg*KR1. ACS Catal, 2017, 7(10): 7174–7181.

[31] Tian J, Wang P, Gao S, et al. Enhanced thermostability of methyl parathion hydrolase from *Ochrobactrum* sp. M231 by rational engineering of a glycine to proline mutation. FEBS J, 2010, 277(23): 4901–4908.

(本文责编 郝丽芳)