DOI:10.12441/spyswjs.20221220001 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0119-08

固定化吡哆醇激酶催化合成磷酸吡哆醇的研究

侯学雯[1,2] 李梦磊[1,2] 叶 蕾[1,2] 邱 敏[1,2] 张坤晓[1,2*]

(1. 江苏海洋大学药学院,江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室,江苏 连云港 222005)

摘要:【目的】利用镍螯合琼脂糖亲和层析介质(Ni-NTA)与组氨酸(His)标记的蛋白质特异性结合的原理,将Ni-NTA与His标记的大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)来源的吡哆醇激酶(*Ec*pdxK)固定化,形成一种固定化式反应器,并研究吡哆醇(PN)转化为磷酸吡哆醇(PNP)的最适反应条件。**【方法】**采用单因素分析方法探讨温度、pH、金属离子浓度和回收次数等对该催化反应的影响。**【结果】**固定化*Ec*pdxK的最适反应温度为55 ℃,最适反应pH为5.0,最适Mg^{2+}浓度为30 mmol/L。该固定化酶在最适反应条件下,10 min内可将99%的PN转化为PNP。在采用固定化酶填充床反应器时,*Ec*pdxK反应液柱留时间为10 min,持续反应12 h后其转化效率仍高达93%。**【结论】**固定化*Ec*pdxK具有良好的温度耐受性、pH耐受性及操作稳定性,该固定化*Ec*pdxK催化合成PNP的工艺操作简单、成本较低,具有工业化应用潜力。

关键词:吡哆醇激酶;固定化;镍螯合琼脂糖亲和层析介质;磷酸吡哆醇

Immobilized Pyridoxine Kinase Catalyzes Synthesis of Pyridoxine Phosphate

HOU Xuewen[1,2] *LI Menglei*[1,2] *YE Lei*[1,2] *QIU Min*[1,2] *ZHANG Kunxiao*[1,2*]

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: [**Objective**] According to the principle of specific binding of nickel-chelated agarose affinity chromatography medium (Ni-NTA) to histidine (His) -tagged proteins, the histidine-tagged *Escherichia coli* (*E. coli*)-derived pyridoxine kinase (*Ec*pdxK) was immobilized with the Ni-NTA to form an immobilized reactor, and the optimal reaction conditions for the conversion of pyridoxine (PN) to pyridoxine phosphate (PNP) were investigated. [**Method**] The effects of temperature, pH, metal ion concentration, and recycling times on this catalytic reaction were investigated by one-way analysis of variance. [**Result**] The optimal reaction conditions of the immobilized *Ec*pdxK were 55 ℃, pH 5.0, and 30 mmol/L Mg^{2+}, under which the immobilized *Ec*pdxK was able to convert 99% of PN into PNP within 10 min. In the immobilized *Ec*pdxK-packed bed reactor, the column retention time of the *Ec*pdxK reaction liquid was 10 min, and the conversion efficiency was still as high as 93% after 12 h of continuous reaction. [**Conclusion**] The immobilized *Ec*pdxK has good temperature tolerance, pH tolerance, and operational stability, and the immobilized *Ec*pdxK-catalyzed synthesis of PNP is a simple and cost-effective process with the potential for industrial application.

Keywords: pyridoxine kinase; immobilization; nickel-chelated agarose affinity chromatography medium; pyridoxine phosphate

---

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31601191)。

通信作者:张坤晓(1982—),男,博士,讲师,硕士研究生导师,主要从事生物医药诊断、合成生物学和药物活性物质筛选等研究。E-mail:2015000022@jou.edu.cn

收稿日期:2022-12-20 **修回日期:**2023-01-09

维生素 B_6 是对水溶性维生素（吡哆醛（PL）、吡哆胺（PM）、PN）及其磷酸酯（磷酸吡哆醛（PLP）、磷酸吡哆胺（PMP）、PNP）的统称[1]。PLP 是维生素 B_6 的生物活性形式，它作为维生素 B_6 的衍生物是诸多保健品的成分之一。PLP 在医药上也有多种用途，是合成 β-羰基酰胺类药物的前体，在临床上还可用于治疗迟发性运动障碍和帕金森综合征等[2-3]。此外，PLP 是 160 多种酶的辅助因子[4-5]，作为辅酶参与很多催化反应，包括转氨反应、α-脱羧反应、β-脱羧反应、γ-消除反应以及羟醛反应等，可广泛应用于诸多领域。

目前，主要是用化学合成法制备 PLP[6-7]，但化学合成法存在步骤烦琐、产率低、资源消耗多、废水污染等问题，而采用微生物酶转化技术合成 PLP 可解决这些问题，并能降低其生产成本。目前已经有较多关于采用微生物转化技术生产 PLP 的研究，大部分是利用各类菌株体内本身的代谢路径进行[8]，或加以改造后直接通过发酵来制备 PLP[9]。PLP 在生物体内的合成主要有 2 条途径，分别为 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸（DXP）依赖途径和 DXP 不依赖途径[10]。其中 DXP 依赖途径较复杂，涉及 2 个分支和 7 个酶促反应，该途径仅存在于大肠杆菌和少数细菌中[11]；而 DXP 不依赖途径较简单，只涉及一种酶复合体，该途径主要存在于一些自养生物中[12]。此外，一些生物（人类、大肠杆菌等）中还存在一条 PLP 补救路径，该路径主要以 PN 为底物，经吡哆醇激酶转变为 PNP，然后经吡哆醇 4-氧化酶氧化为 PLP，其中也包括 PL 和 PM 到 PLP 的转化[12]。目前，通过菌株内的代谢路径生产 PLP 的得率仍处于较低水平，表明通过微生物酶法来合成 PLP 的方法仍需进一步优化。

在微生物酶法催化过程中，常使用固定化法将目标酶固定在载体上，形成不易流失的生物反应器[13-15]。通过固定化方法对酶进行回收和再利用，在工业生产过程中能提高酶的稳定性，也能降低生产成本[16-17]。固定化酶的制备方法有很多种，传统的固定化方法包括吸附法、共价结合法、包埋法和交联法。但近年来，固定化金属螯合层析（immobilized metal affinity chromatography，IMAC）作为定向固定的方法之一受到了广泛的关注[18-21]。该技术能在标记蛋白质和金属之间形成特异性极强的相互作用，较常见的方法是将带有 His 标签的融合蛋白固定在 Ni^{2+} 螯合支架上。该固定化方法可保留较高的酶活力，同时还可达到一步纯化的效果，满足工业生产时经济简便的需求。目前关于吡哆醇激酶固定化研究工作的报道较少。

作者根据 PLP 的补救路径，通过体外酶催化方式，以 PN 为底物成功合成中间体 PNP，且用 Ni-TNA 与带有 His 标记的吡哆醇激酶固定化后，形成了一种填充床酶式生物反应器，可用于 PM 的连续流动酶催化反应，最后优化了固定化吡哆醇激酶的最适催化条件并测定了 PN 转化率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

重组大肠杆菌 Top10/pBAD/His A，携带重组质粒/pBAD/His A，该质粒包含 *Ec*pdxK 的编码基因 *pdxK*（Genebank 编号：WP_075699813.1），由作者所在实验室通过无缝克隆构建，见图 1。PCR 的上下游引物、目的基因 *pdxK* 的合成及基因测序均由通用生物（安徽）股份有限公司合成。

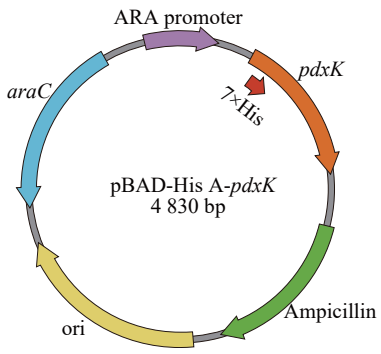


图 1 *Ec*pdxK 的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid map of *Ec*pdxK

1.1.2 主要试剂与仪器

Ni-NTA：江苏千纯生物科技有限公司；酵母粉和蛋白胨：赛默飞世尔科技（中国）有限公司；其他试剂：国药集团化学试剂有限公司。

高效液相（HPLC）检测器：DGU-20A3R 型，日本岛津仪器有限公司；高压细胞破碎仪：AH-BASIC 型，上海多宁生物科技有限公司；微量分光光度计：NanoDrop Light 型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *Ec*pdxK 的构建、诱导表达和纯化

在 NCBI 库中找到 *pdxK* 基因的序列，由通用

生物（安徽）股份有限公司优化合成，以合成后的*pdxK*基因和载体质粒pBAD为模板设计无缝克隆引物：F（5′-AACAGGAGGAATTAACCATGCATCATCATCATCACC-3′）；R（5′-TCCGCCAAAACAGCCAAGCTTATGCTTCGGCCAGC-3′）。上述目的基因经PCR扩增后，将载体质粒pBAD和经PCR扩增后得到的目的基因进行克隆连接，得到重组质粒pBAD-His A-*pdxK*，然后将此重组质粒在42 ℃下热激60 s，再冰浴5 min，从而将其转化至TOP10感受态细胞中。挑取PCR扩增结果合格的阳性克隆菌落，于37 ℃、220 r/min条件下培养6 h后进行基因测序，将测序结果合格的菌落保存在含体积分数25%甘油的保菌管中。取10 μL −20 ℃保存的菌株接种至10 mL的LB培养基中，于37 ℃、200 r/min下培养14 h，然后将种子培养液转移至含500 mL发酵培养液的2 L三角瓶中，于37 ℃、200 r/min条件下继续培养，待发酵培养液的OD_{600}值为0.6~0.8时，加入质量分数0.2%的*L*-阿拉伯糖，于28 ℃、200 r/min继续诱导培养12 h。诱导结束后，8 000 r/min离心5 min，收集菌体，加入PBS缓冲液（20 mmol/L，pH 6.0）重悬菌体，利用高压细胞破碎仪对重悬液进行破碎，20 000 r/min离心30 min后保留上清液，用His Trap HP层析柱纯化，然后用PBS缓冲液（20 mmol/L，pH 6.0）透析过夜，通过微量分光光度计测定蛋白质质量浓度。分别收集诱导前后的样品，加入SDS-PAGE上样缓冲液进行SDS-PAGE检测（分离胶质量浓度为12.5 g/dL），以此确定目的蛋白质是否成功表达。

1.2.2 酶的固定化方法

将Ni-NTA填装至12 mL重力层析柱内，加入固定化缓冲液（20 mmol/L的PBS缓冲液）并与*Ec*pdxK粗酶液混合，于4 ℃振荡孵育1 h，使酶和载体能更好结合。孵育结束后，收集流穿液体，利用SDS-PAGE检测载酶量。使用含有20 mmol/L咪唑、1 mol/L的NaCl溶液冲洗载体上的其他杂蛋白质及核酸物质，再用固定化缓冲液洗涤3次，洗脱与Ni-NTA结合不牢固的目标蛋白质，固定化酶置于4 ℃保存。

1.2.3 *Ec*pdxK的金属激活离子检测

以10 mmol/L的PN、12 mmol/L的三磷酸腺苷（ATP）作为反应底物，再加入10 mmol/L的不同二价金属离子和PBS缓冲液（20 mmol/L，pH 6.0），加入适量酶液后将所有反应体系置于60 ℃摇床内，低速振荡10 min，加入盐酸进行失活反应，取上清液，通过HPLC检测底物的转化效率。

1.2.4 游离酶及固定化酶催化合成PNP的条件测定

1）游离酶及固定化酶最适反应温度的测定：以100 mmol/L的PN、120 mmol/L的ATP作为反应底物，加入30 mmol/L的$MgCl_2$，以PBS（20 mmol/L，pH 6.0）为缓冲液，加入适量酶液，将反应体系置于不同温度的摇床内，低速振荡10 min，取上清液进行稀释，用HPLC检测底物的转化效率。

2）游离酶及固定化酶最适反应pH的测定：底物浓度与最适温度测定试验一致，分别用20 mmol/L的柠檬酸盐、PBS、Tris-HCl为缓冲液，调节反应体系的pH。将反应体系置于55 ℃摇床内，低速振荡10 min，取上清液进行稀释，用HPLC检测底物的转化效率。

3）游离酶及固定化酶最适反应Mg^{2+}浓度的测定：底物浓度与最适温度测定试验一致，加入不同浓度的$MgCl_2$，以PBS（20 mmol/L，pH 6.0）为缓冲液，将反应体系置于55 ℃摇床中，低速振荡10 min，取上清液进行稀释，用HPLC检测底物的转化效率。

1.2.5 游离酶及固定化酶的温度稳定性及pH稳定性测定

1）游离酶及固定化酶温度稳定性测定：将游离酶和固定化酶在不同温度下孵育2 h，以100 mmol/L的PN、120 mmol/L的ATP作为反应底物，再加入30 mmol/L的$MgCl_2$，以PBS（20 mmol/L，pH 6.0）为缓冲液，在55 ℃下反应10 min测定其相对酶活力。

2）游离酶及固定化酶pH稳定性测定：将游离酶和固定化酶在不同pH的20 mmol/L柠檬酸盐（4.0、5.0）、PBS（5.0、6.0、7.0、8.0）和Tris-HCl（8.0、9.0）缓冲液中孵育24 h，在55 ℃下反应10 min测定其相对酶活力。

1.2.6 固定化酶填充床反应器的搭建及操作稳定性分析

作者自制了一个小型固定化酶填充床反应器，见图2。将底物储罐置于恒温槽内，底物储罐通过管路与恒流泵相接，恒流泵将底物以恒速持续泵入处于恒温槽内的柱反应器，反应液流出后进入产物收集罐。其中柱反应器体积为10 mL，

用 Ni-NTA 填充，*Ec*pdxK 通过恒流泵挂载到柱反应器中。底物储罐中的溶液为：1 L PBS 缓冲液（20 mmol/L，pH 6.0）配制的反应液，含有 100 mmol/L 的 PN、120 mmol /L 的 ATP 和 30 mmol/L $MgCl_2$。在 55 ℃下，恒流泵将底物储液以 1 mL/min 的流量持续流经柱反应器，并单独收集不同时间流出的反应液，稀释后用 HPLC 监测底物的转化效率，以测定其操作稳定性。

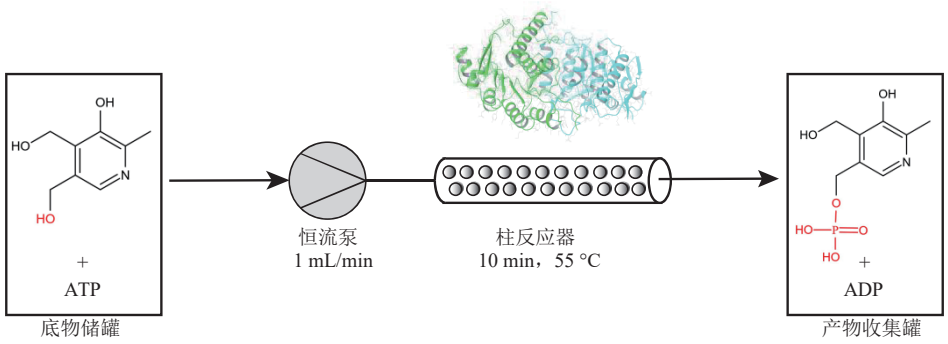


图 2　固定化酶填充床反应器示意图

Fig. 2　Schematic diagram of immobilized enzyme-packed bed reactor

1.2.7　PN、PNP 浓度的检测及 PN 转化率的计算

用 HPLC 检测 PN 和 PNP 的出峰时间及浓度，色谱条件为：Ultimate XB-C18（4.6 mm×250 mm×5 μm），流动相组成为 *V*（甲醇）：*V*（KH_2PO_4）=5∶95，用磷酸将 pH 调至 3.0，流量 1 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 5 μL，检测波长 210 nm。按公式（1）计算 PN、PNP 的浓度，按公式（2）计算 PN 转化率。

$$M_1=\frac{A_1\times M_2}{A_2} \quad (1)$$

式中：

M_1——PN 或 PNP 的浓度，mol/L；

A_1——PN 或 PNP 的峰面积；

M_2——PN 或 PNP 标准品的浓度，mol/L；

A_2——PN 或 PNP 标准品的峰面积。

$$Q=\frac{M_0-M_3}{M_0}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

Q——PN 转化率，%；

M_0——反应开始时底物中 PN 的浓度，mol/L；

M_3——反应一段时间后混合物中 PN 的浓度，mol/L。

2　结果与讨论

2.1　*Ec*pdxK 的表征鉴定

利用 1.2.1 中构建的含有 *Ec*pdxK 质粒的表达菌株验证 *Ec*pdxK 的表达情况。结果表明，在 *L*-阿拉伯糖诱导前后，*Ec*pdxK 在相对分子质量约 32 000 处有明显的条带差异，诱导后在 *E. coli* Top10 宿主菌株中有显著表达，见图 3（a）。*Ec*pdxK 比酶活为 0.2 U/mL，经 Ni 柱纯化后的单一条带大小与预期目标蛋白质基本一致，表明 *Ec*pdxK 成功表达。经检测，纯化后的 *Ec*pdxK 比酶活为 25.3 U/g。

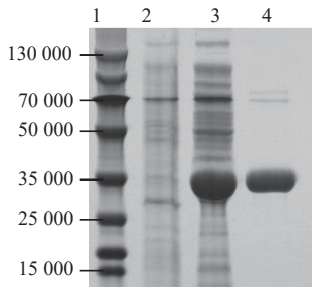
2.2　酶的固定化及效果分析

接下来利用 Ni-NTA 测试 *Ec*pdxK 的固定化效果，SDS-PAGE 检测结果见图 3（b）。在相对分子质量 32 000 处，固定化前粗酶液中 *Ec*pdxK 的条带较为清晰，而固定化后的流穿液中，此条带明显变浅，说明粗酶液中的 *Ec*pdxK 与固定化载体结合效果较好，且结合呈过饱和状态。用 1 mmol/L 咪唑溶液洗脱载体上挂载的 *Ec*pdxK，其质量浓度为 3.5 mg/mL，共固定了 21 mg 的 *Ec*pdxK，且固定后 *Ec*pdxK 比酶活为 23.8 U/g，见表 1。结果表明，固定化的 *Ec*pdxK 依然保持较高的比酶活，因此可以确定固定化条件：载体量 1 mL，加酶量 20 mL，4 ℃固定化 1 h，固定化环境 pH 与酶缓冲液 pH 相同，固定化酶的质量浓度可达 42 mg/mL，固定化酶的比酶活为 47.6 U/mL。

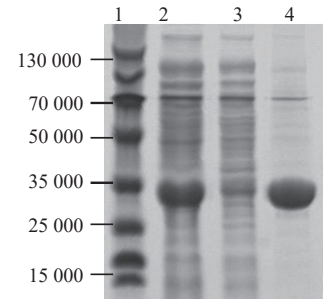
2.3　金属离子及离子浓度对 *Ec*pdxK 的影响

2.3.1　金属离子对 *Ec*pdxK 比酶活的影响

已有研究表明，金属离子对 *Ec*pdxK 有明显的激活作用[22-23]，所以作者优先选用 PBS 作为反应缓冲液，并用不同类型的二价金属离子探究其对 *Ec*pdxK 的影响。由图 4（a）可知，Mn^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+} 和 Co^{2+} 都能明显提升 *Ec*pdxK 比酶活，而 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 虽然有提升作用但效果不佳。其中 Mg^{2+} 对



1—标准蛋白质(BL713A)；2—诱导前；
3—*Ec*pdxK粗酶液；4—*Ec*pdxK纯酶液。
(a) *Ec*pdxK的SDS-PAGE分析



1—标准蛋白质(BL713A)；2—*Ec*pdxK粗酶液；
3—固定化*Ec*pdxK的流穿液；
4—1 mol/L咪唑的*Ec*pdxK洗脱液。
(b) *Ec*pdxK固定化效果

图 3　*Ec*pdxK 的表征鉴定及固定化检测

Fig. 3　Characterization and immobilization assay of *Ec*pdxK

表 1　Ni^{2+}-NTA 载体对 *Ec*pdxK 的影响

Table 1　Effect of Ni^{2+}-NTA carrier on *Ec*pdxK

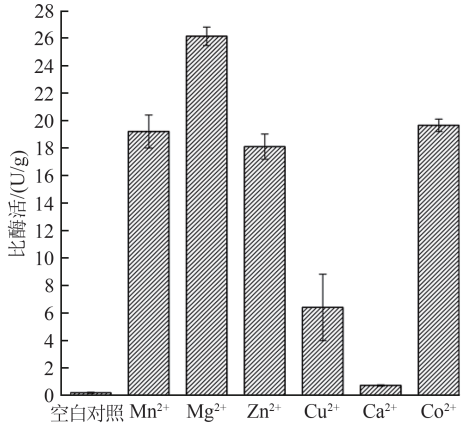
状态	载体	比酶活/(U/g)
游离酶		25.3
固定化酶	Ni^{2+}-NTA	23.8

*Ec*pdxK 的激活效果最佳，所以选择在后续反应中添加 Mg^{2+} 作为金属激活离子。

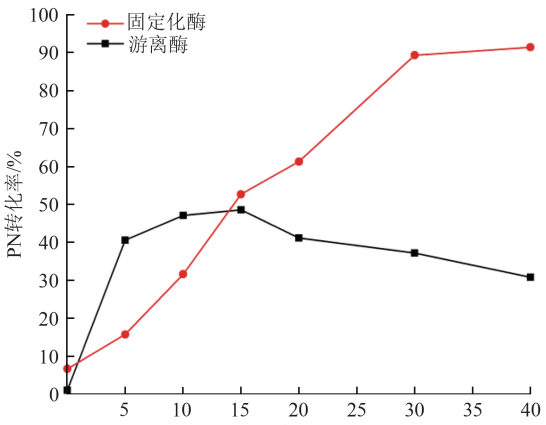
2.3.2　Mg^{2+} 浓度对 *Ec*pdxK 催化合成 PNP 的影响

由 2.3.1 的结果可知，Mg^{2+} 对 *Ec*pdxK 具有最佳激活效果，因此将其作为金属激活离子添加在反应体系中，但还需要研究 Mg^{2+} 对 *Ec*pdxK 的饱和浓度以及是否存在抑制作用。因此，按照 1.2.3 中的方法测定了 0、5、15、20、30、40 mmol/L 的 Mg^{2+} 对 *Ec*pdxK 催化合成 PNP 的影响。

如图 4（b）所示，对游离酶来说，15~20 mmol/L 的 Mg^{2+} 对 *Ec*pdxK 的激活作用已达饱和，且当 Mg^{2+} 浓度高于 15 mmol/L 后对 *Ec*pdxK 有抑制作用，而对于固定化的 *Ec*pdxK，Mg^{2+} 浓度达到 30~40 mmol/L 时激活作用才达饱和。因此，选用 30 mmol/L 作为固定化 *Ec*pdxK 的最佳金属离子使用浓度。



(a) 金属离子对*Ec*pdxK比酶活的影响



(b) Mg^{2+}浓度对*Ec*pdxK催化反应的影响

图 4　金属离子及离子浓度对 *Ec*pdxK 的影响

Fig. 4　Effects of metal ions and ion concentration on *Ec*pdxK

2.4　温度对 *Ec*pdxK 的影响

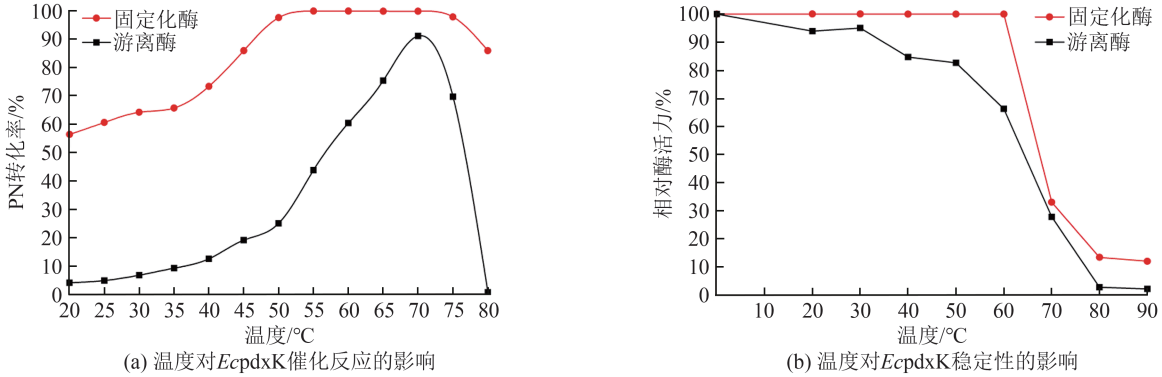
2.4.1　*Ec*pdxK 的最适反应温度

温度对酶活力的影响比较直接，较高的温度一般会加快酶促反应效率，但也会破坏酶分子空间构象的稳定性，继而导致酶活力降低甚至消失。将酶固定在载体上后，可能会在一定程度上改变温度对酶的影响。不同温度对固定化酶和游离酶的影响见图 5(a)。结果表明，当温度为 70 ℃时，PN 转化率最高；当温度高于 70 ℃时，固定化酶和游离酶的活性都开始降低，但固定化酶在所有温度条件下的 PN 转化率都高于游离酶，所以游离酶的最适反应温度为 70 ℃。固定化酶则有较广泛的

选择空间，在 55~70 ℃的 PN 转化率都达到了 99%。

2.4.2 *Ec*pdxK 的温度稳定性

验证了不同温度下游离酶和固定化酶的相对酶活力变化，见图 5(b)。固定化酶在 20~60 ℃下孵育 2 h 后，其相对酶活力几乎不变，而游离酶在 40 ℃孵育 2 h 后的相对酶活力约 84%，在 70 ℃孵育 2 h 后固定化酶和游离酶的相对酶活力都明显下降，固定化酶的热稳定性明显优于游离酶。根据 PN 转化率变化和酶稳定性结果，确定后续固定化 *Ec*pdxK 的最佳温度为 55 ℃。



(a) 温度对*Ec*pdxK催化反应的影响　(b) 温度对*Ec*pdxK稳定性的影响

图 5　温度对 *Ec*pdxK 的影响

Fig. 5　Effect of temperature on *Ec*pdxK

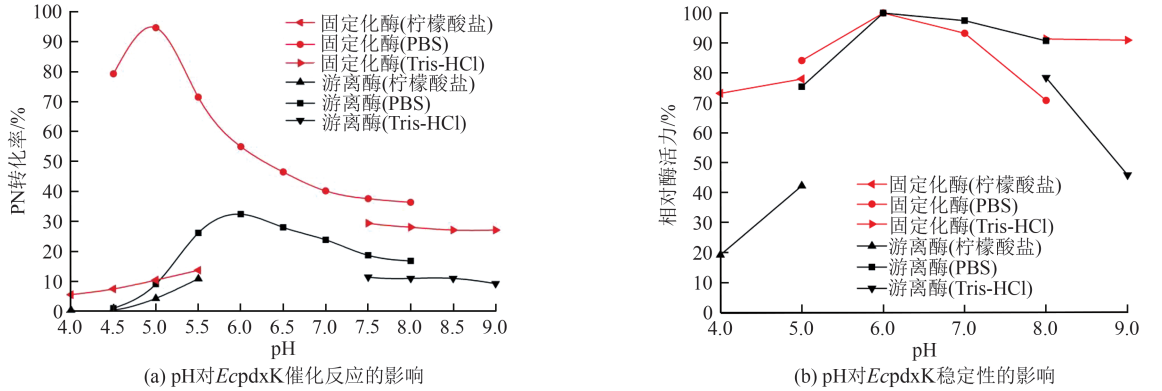
2.5　pH 对 *Ec*pdxK 的影响

2.5.1 *Ec*pdxK 的最适反应 pH

通常酶都有特定的最适 pH，而 pH 对酶活力的影响机制很复杂，所以无法明确 Ni-NTA 载体与酶的结合是否会影响酶的最适 pH。因此，作者探究了不同 pH 缓冲液(柠檬酸盐、PBS 和 Tris-HCl)中固定化酶和游离酶的转化效率。由图 6(a)可知，在不同的缓冲液中 *Ec*pdxK 的活性不同。在 PBS 缓冲液中，PN 转化率最高，且当 pH 为 6.0 时游离酶的活性最高，而固定化酶在 pH 为 5.0 时活性最高，与游离酶相比，固定化酶在不同 pH 下的 PN 转化率都高于游离酶，表明固定化的 *Ec*pdxK 具有更好的 pH 适应性。

2.5.2 *Ec*pdxK 的 pH 稳定性

根据 1.2.5 的方法，考察了不同 pH 条件下游离酶和固定化酶的相对酶活力变化。由图 6(b)可知，当 pH 为 6.0 时，游离酶及固定化酶都保持了最大相对酶活力，所以 *Ec*pdxK 的最适储存 pH 为 6.0。此外，固定化酶在低 pH 缓冲液中的耐受性高于游离酶，而在中性及碱性的 PBS 缓冲液中的耐受性低于游离酶，但在碱性的 Tris-HCl 缓冲液中，固定化酶的耐受性仍高于游离酶，这可能是由于 PBS 在碱性环境中的缓冲能力较差。因此，固定化酶相较于游离酶的耐碱性随着缓冲液的不同而改变。*Ec*pdxK 的 pH 稳定性测试结果也与 2.5.1 中的结果相对应，固定化 *Ec*pdxK 相较游离酶的耐酸性更强。底物及产物溶于水后皆呈酸性，且底物



(a) pH对*Ec*pdxK催化反应的影响　(b) pH对*Ec*pdxK稳定性的影响

图 6　pH 对 *Ec*pdxK 的影响

Fig. 6　Effect of pH on *Ec*pdxK

和产物在酸性环境中更稳定。对*Ec*pdxK而言，固定化后其最适反应pH有所下降，反而更加有利于其催化反应。

2.6　固定化酶填充床反应器及其操作稳定性

按1.2.6的方法对固定化酶填充床反应器进行了操作稳定性试验。由图7可知，固定化酶填装的填充床反应器在最开始的20 min内活力下降较快，随后在连续反应的12 h内，PN转化率呈缓慢的下降趋势，保持了相对稳定且较高的活性，最终PN转化率仍能达到93%。12 h的反应时间相当于进行了72次循环反应，因此认为固定化*Ec*pdxK具有较好的重复利用率，且固定化*Ec*pdxK填装的填充床反应器也具有良好的操作稳定性，经长时间使用后固定化酶仍能维持较高的活性，具有较好的实用价值及应用潜力。

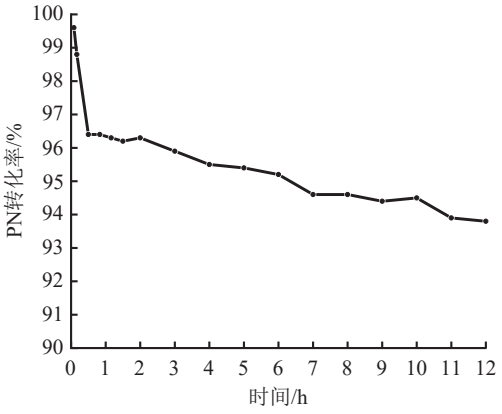


图7　固定化酶的操作稳定性

Fig. 7　Operational stability of the immobilized enzymes

3　结论

用Ni-NTA作为固定化载体，通过表达源自*E. coli*的*Ec*pdxK，利用其与His上带有咪唑环的氨基交联形成特异性结合重组蛋白。相对其他载体，该研究选用的Ni-NTA能同时达到一步纯化和固定的目的。作者研究了不同的温度和pH对其活性的影响，结果表明，Ni-NTA对游离*Ec*pdxK的实际载量约为42 mg/mL，固定化酶的最适反应温度为55 ℃，最适反应pH为5.0，固定化酶在酸性环境中的稳定性更佳，但其对于Mg^{2+}的需求量也更高。该研究将固定化酶填装成固定化酶填充床反应器，结果显示其经长时间使用后仍能维持较高的活性，具有良好的操作稳定性。

该固定化载体Ni-NTA可以利用硫酸镍实现Ni^{2+}的再生，达到固定化载体回收利用的目的，进一步降低了酶的使用成本。综上，作者利用Ni-NTA固定*Ec*pdxK，对其催化PN的反应进行了系列研究，为固定化*Ec*pdxK在催化合成PNP的潜在工业化应用提供了理论依据，为绿色、低能耗的生物合成生产方式提供参考。未来还需进一步探究合适的固定化酶填充床反应器及反应条件，以实现固定化酶催化合成PNP的自动化和连续化操作。

参考文献

[1] ROSENBERG I H. A history of the isolation and identification of vitamin B_6[J]. Annals of Nutrition & Metabolism，2012，61(3)：236-238.

[2] ADELUFOSI A O，ABAYOMI O，OJO T M F. Pyridoxal 5 phosphate for neuroleptic-induced tardive dyskinesia[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews，2015(4)：CD010501.

[3] WARREN N，O'GORMAN C，LEHN A，et al. Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease：a systematic review of published cases[J]. Journal of Neurology，Neurosurgery & Psychiatry，2017，88(12)：1060-1064.

[4] SALVO M L，SAFO M K，CONTESTABILE R. Biomedical aspects of pyridoxal 5'-phosphate availability [J]. Frontiers in Bioscience，2012，4(3)：897-913.

[5] UELAND P M，MCCANN A，MIDTTUN Ø，et al. Inflammation，vitamin B_6 and related pathways [J]. Molecular Aspects of Medicine，2017，53：10-27.

[6] 蔡琦，张玮琪，陈礼伟，等. 5'-磷酸吡哆醛的合成研究[J]. 广东化工，2018，45(18)：30-31.
CAI Q，ZHANG W Q，CHEN L W，et al. Study on the synthesis of 5'-pyridoxal phosphate[J]. Guangdong Chemical Industry，2018，45(18)：30-31.(in Chinese)

[7] 宣良明，胡旭，冯权武，等. 磷酸吡哆醛的合成工艺[J]. 武汉工程大学学报，2020，42(4)：355-359.
XUAN L M，HU X，FENG Q W，et al. Synthesis process of pyridoxal phosphate[J]. Journal of Wuhan Institute of Technology，2020，42(4)：355-359.(in Chinese)

[8] 江爱兵，王开梅，张凤，等. 产磷酸吡哆醛转移酶微生物菌株的筛选[J]. 湖北农业科学，2010，49(10)：2439-2441.
JIANG A B，WANG K M，ZHANG F，et al. Isolation of microorganism producing pyridoxal phosphokinases[J]. Hubei Agricultural Sciences，2010，49(10)：2439-2441.(in Chinese)

[9] HE M，MA J，CHEN Q W，et al. Engineered production of pyridoxal 5'-phosphate in *Escherichia coli* BL21 [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology，2022，52(5)：498-507.

[10] FITZPATRICK T B，AMRHEIN N，KAPPES B，et al. Two independent routes of *de novo* vitamin B_6 biosynthesis：

not that different after all[J]. Biochemical Journal, 2007, 407(1): 1-13.

[11] FITZPATRICK T B, MOCCAND C, ROUX C. Vitamin B_6 biosynthesis: charting the mechanistic landscape[J]. ChemBioChem, 2010, 11(9): 1185-1193.

[12] ROSENBERG J, ISCHEBECK T, COMMICHAU F M. Vitamin B_6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(1): 31-40.

[13] SIRISHA V L, JAIN A, JAIN A. Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2016, 79: 179-211.

[14] BOLIVAR J M, WOODLEY J M, FERNANDEZ-LAFUENTE R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization[J]. Chemical Society reviews, 2022, 51(15): 6251-6290.

[15] 刘伟华, 姜子涛, 李荣. 微波法高效制备固定化胰蛋白酶[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(5): 86-93.
LIU W H, JIANG Z T, LI R. High-efficient preparation of immobilized trypsin with microwave[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(5): 86-93.(in Chinese)

[16] SHELDON R A, BASSO A, BRADY D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy[J]. Chemical Society Reviews, 2021, 50(10): 5850-5862.

[17] TARAN S A, VEREVKINA K N, FEOFANOV S A, et al. Enzymatic transglycosylation of natural and modified nucleosides by immobilized thermostable nucleoside phosphorylases from *Geobacillus stearothermophilus* [J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry , 2009, 35: 822-829.

[18] CHEUNG R C F, WONG J H, NG T B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2012, 96: 1411-1420.

[19] 张轩月, 程咏梅, 宋志新, 等. Ni^{2+}螯合的琼脂糖凝胶载体用于重组酶 SUMO-Hep I-His 的固定化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(8): 824-829.
ZHANG X Y, CHENG Y M, SONG Z X, et al. Immobilization of an sumo-heparinase I-his fusion enzyme on Ni^{2+} chelating agarose gel carrier [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(8): 824-829.(in Chinese)

[20] ARCO J D, JORDAAN J, MORAL-DARDÉ V, et al. Sustainable production of nucleoside analogues by a high-efficient purine 2'-deoxyribosyltransferase immobilized onto Ni^{2+} chelate magnetic microparticles[J]. Bioresource Technology, 2019, 289: 121772.

[21] TWAHIR U, MOLINA L, OZAROWSKI A, et al. Immobilization of *Bacillus subtilis* oxalate decarboxylase on a Zn-IMAC resin[J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2015, 4: 98-103.

[22] MCCORMICK D B, CHEN H Y. Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme[J]. The Journal of Nutrition, 1999, 129(2): 325-327.

[23] SAFO M K, MUSAYEV F N, SALVO M L, et al. Crystal structure of pyridoxal kinase from the *Escherichia coli pdxK* gene: implications for the classification of pyridoxal kinases[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(12): 4542-4552.

（责任编辑：闫林红）

《食品与机械》

中国食品科学技术学会会刊

中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊

中文核心期刊

更专业 前沿观点 基础研究 安全与检测

更实用 食品装备与智能制造 贮运与保鲜 营养与活性 开发应用

月 刊 国内邮发代号：42-83 每期 20 元

海外发行代号：M03355 每期 12 美元

地 址：长沙市天心区万家丽南路二段 960 号长沙理工大学

电 话：0731-85258200 邮编：410114

网址：http://ifoodmm.com E-mail：foodmm@ifoodmm.com