DOI:10.12441/spyswjs.20240320002 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0085-09

N-乙酰-反式-4-羟脯氨酸的酰基转移酶法催化合成

魏川翔[1] 陈柯如[1] 胡 芸[1] 孙 超[2] 薛儒康[2] 孙付保[1*] 程景方[2]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 可莱尼化妆品科技有限公司,浙江 杭州 310051)

摘要:【目的】建立*N*-乙酰-反式-4-羟脯氨酸(*N*-acetyl-*trans*-4-hydroxyproline,*N*-ATHOP)的生物合成工艺过程。**【方法】**利用大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)BL21(DE3)作为表达宿主,异源表达耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)来源的酰基转移酶(MsAcT),并结合半理性设计得到能催化合成*N*-ATHOP的突变体MsAcT(S11C)。**【结果】**突变体MsAcT(S11C)的最适反应条件为:pH为6.9、反应温度为49 ℃、反式-4-羟脯氨酸(*trans*-4-hydroxyproline,THOP)初始浓度为315.5 mmol/L、乙酸乙烯酯体积分数为10%。在此条件下,MsAcT(S11C)催化12 h后合成的*N*-ATHOP产量达4.71 g/L,对应转化率为10.95%。**【结论】**突变体MsAcT(S11C)成功实现由THOP到*N*-ATHOP的微生物酶法生物合成。

关键词:耻垢分枝杆菌;酰基转移酶;羟脯氨酸;*N*-乙酰化;生物合成

Synthesis of *N*-Acetyl-*trans*-4-hydroxyproline Catalyzed by Acyltransferase

WEI Chuanxiang[1] *CHEN Keru*[1] *HU Yun*[1] *SUN Chao*[2] *XUE Rukang*[2]
SUN Fubao[1*] *CHENG Jingfang*[2]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Coco Brownie Cosmetics Technology Co., Ltd., Hangzhou 310051, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to establish the biosynthesis process of *N*-acetyl-*trans*-4-hydroxyproline (*N*-ATHOP). [**Method**] *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) was selected as the host to heterologously express the acyltransferase (MsAcT) derived from *Mycobacterium smegmatis*. A semi-rational design was employed to construct the mutant MsAcT(S11C) capable of catalyzing the synthesis of *N*-ATHOP. [**Result**] The catalytic reaction conditions of the mutant MsAcT(S11C) were optimized as pH 6.9, reaction temperature 49 ℃, initial *trans*-4-hydroxyproline (THOP) concentration of 315.5 mmol/L, and vinyl acetate volume fraction of 10%. Under the optimized conditions, the yield of *N*-ATHOP synthesized under the catalysis of MsAcT(S11C) reached 4.71 g/L, with a conversion rate of 10.95% after 12 h of reaction. [**Conclusion**] The mutant MsAcT(S11C) successfully achieved microbial enzymatic biosynthesis from THOP to *N*-ATHOP.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*; acyltransferase; hydroxyproline; *N*-acetylation; biosynthesis

乙酰羟脯氨酸是一种脯氨酸衍生物,其前体物质脯氨酸及羟脯氨酸在自然界中广泛分布于动物胶原组织以及植物组织中,但天然的乙酰羟脯氨酸则相对少见。在生物医药方面,乙酰羟脯氨酸即奥沙西罗(oxaceprol),具有解热镇痛、消炎抗风湿的作用[1],且不会引发胃肠道出血等副作用[2-3];其通过抑制病程中白细胞浸润和结缔组织变化的独特机制,呈现出更好的肠道耐受性和安全性[4-5]。因此,乙酰羟脯氨酸作为一种新型非甾体抗炎药极具市场前景[1]。在保湿护肤方面,乙酰羟脯氨酸比其前体物质羟脯氨酸更能通过维持胞间脂质中烃链的堆积而起到保湿护肤的作用[6-7]。

通信作者:孙付保(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事高活性蛋白肽、氨基酸的绿色生物制造技术研究。E-mail:fubaosun@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-03-20 **修回日期:**2024-05-16

目前，乙酰羟脯氨酸产品主要通过化学法合成，即通过添加活化剂活化羧酸并与胺类物质直接脱水偶联而成[8-9]。已有研究发现，来源于酵母*Mpr1*基因编码的*N*-酰基转移酶可实现*N*-乙酰-顺式-4-羟基-*L*-脯氨酸的生物酶法合成，通过在*E. coli*中异源表达*Mpr1*基因合成*N*-酰基转移酶，将顺式-4-羟脯氨酸转化为*N*-乙酰-顺式-4-羟基-*L*-脯氨酸[1,10]。但截至目前，国内外尚未公开报道过微生物酶法催化THOP合成*N*-ATHOP的相关研究。

生物机体内的肽链酰胺键通常是由α/β水解酶（α/β hydrolase，ABH）超家族中某些ATP依赖性酶催化形成[11]，故推测乙酰羟脯氨酸生物合成的关键在于从ABH超家族中寻找一种适宜的酰基转移酶来催化THOP与乙酰基供体形成酰胺键。尽管ABH超家族中不少酶可用于体外催化酰胺键的形成，但大多数酶要求在无水的有机相环境中进行催化反应，因为在水环境中，酰胺化反应会与水解反应形成竞争[12-14]。上述*N*-酰基转移酶Mpr1虽然在体内活性物质乙酰化过程和抗活性氧氧化胁迫方面表现出良好的效果[15]，但由于底物立体结构的专一性，其不能将THOP转化为*N*-ATHOP。2007年，美国学者从*Mycobacterium smegmatis*中分离出一种新型的酰基转移酶MsAcT，与催化水解反应相比，该酶在水相中更倾向于催化酯交换反应，有望成为一种在水相环境中高效催化酰胺类反应的酰基转移酶[16]。2018年，Contente等[17]进一步研究发现，该酰基转移酶MsAcT的底物适用性很强，可在水相中一步法催化多种*N*-酰胺类的生物合成，其中乙酸乙烯酯为最佳酰基供体；以乙酰胺作为酰基供体时，在磷酸缓冲液（100 mmol/L、pH 8.0、25 ℃）中催化苯乙胺反应60 min时，*N*-乙酰化转化率达60%；与常见的*N*-酰基转移酶依赖辅因子不同，其结构中独特的疏水通道使得其能够在水相环境中完成转酰胺反应，甚至可以直接在发酵液中实现原位酰胺化等合成反应。2020年，Contente等[18]发现将MsAcT活性位点中第11位丝氨酸（Ser）突变为半胱氨酸（Cys）后可进一步扩大MsAcT催化的底物范围，突变体MsAcT（S11C）可以催化某些原本无法催化的反应，例如该突变体可将硫醇和仲胺分别催化合成硫酯和叔酰胺；该突变体以乙酸乙烯酯为酰基供体催化吡咯烷（四氢吡咯）反应24 h后，生成的叔酰胺转化率可达99%。

作者拟围绕*N*-ATHOP的生物合成，开展酰基转移酶MsAcT异源表达及催化特性的研究。利用*E. coli*异源表达*Mycobacterium smegmatis*来源的酰基转移酶MsAcT并验证其催化合成*N*-ATHOP的可能性；对该酰基转移酶进行定点突变以强化*N*-ATHOP合成，并结合单因素试验和响应面试验优化*N*-ATHOP催化合成条件，初步建立微生物酶法合成*N*-ATHOP的工艺过程，为酰基转移酶MsAcT后续催化合成其他酰胺类化合物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

克隆宿主菌*E. coli* JM109、表达宿主菌*E. coli* BL21（DE3）、质粒pET-22b（+）：作者所在实验室保存；*Mycobacterium smegmatis*来源的*MsAcT*基因：天霖生物科技（上海）有限公司；酵母提取物、胰蛋白胨、NaCl、KH_2PO_4、K_2HPO_4、Na_2HPO_4、氨苄青霉素钠、IPTG：生工生物工程（上海）股份有限公司；葡萄糖、NH_4Cl、$MgSO_4·7H_2O$、乙酸钠、乙酸、盐酸、三羟甲基氨基甲烷、乙酸对硝基苯酯、对硝基苯酚、乙酸乙酯、乙酸乙烯酯、乙酸异丙酯、乙酸异丙烯酯、乙酸异戊酯、甲醇、乙腈：国药集团化学试剂有限公司；咪唑：上海麦克林生化科技有限公司；Bradford反应液、标准相对分子质量DNA及蛋白质Marker：宝生物工程（大连）有限公司；高保真酶、一步法无缝克隆试剂盒：江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

LB培养基：胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g，加水定容至1 000 mL，pH调至7.0。

LB固体培养基：胰蛋白胨1.0 g、酵母提取物0.5 g、NaCl 1.0 g、琼脂粉1.2 g，加水定容至100 mL，pH调至7.0。

ZYBM9培养基：胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 5 g、葡萄糖4 g、KH_2PO_4 3 g、NH_4Cl 1 g、Na_2HPO_4 6 g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.246 g，定容至1 000 mL。

1.2 仪器与设备

镍柱：Ni-NTA Agarose型，凯杰生物工程（深圳）有限公司；C18色谱柱：Dikma Spursil（250 mm×4.6 mm×5.0 μm）型，北京迪科马科技有限公司；高

效液相色谱（HPLC）仪：Agilent 1260 Infinity II型，安捷伦科技（中国）有限公司；三重四极杆液质联用仪：TSQ quantum Ultra EMR型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；多功能酶标仪：MAX-190型，美国MOLECULAR DEVICES公司；蛋白质电泳仪：JY53-8A型，美国Bio-Rad公司；PCR循环仪：TC-512型，美国Bio-Techne公司；核酸电泳仪：JY-SPCT型，美国Bio-Rad公司；分子杂交仪：LF-III型，无锡久平仪器有限公司；超声波粉碎仪：JY92-IIN型，宁波新芝生物科技股份有限公司；凝胶成像仪：JY04S-3C型，北京君意东方电泳设备有限公司；紫外分光光度计：UV-3200型，上海精密仪器仪表有限公司；立式压力蒸汽灭菌器：9005A/T型，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

1.3　方法

1.3.1　携带*MsAcT*基因及其突变体基因的表达质粒的构建

将作者所在实验室已有的pET-22b(+)质粒和合成的*MsAcT*基因作为模板，通过PCR扩增技术，利用设计的特异性引物（见表1）分别扩增野生型*MsAcT*基因、突变体MsAcT（S11C）的编码基因及表达载体片段，下文中用*MsAcT*（*S11C*）表示突变体MsAcT（S11C）的编码基因。利用一步法无缝克隆试剂盒孵育连接，将连接产物转入克隆宿主菌*E. coli* JM109，利用含氨苄青霉素的抗性平板筛选重组转化子并测序，得到含表达质粒的*E. coli* JM109/pET-22b(+)-*MsAcT*和*E. coli* JM109/pET-22b(+)-*MsAcT*（*S11C*）。

表1　本研究中使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称	引物序列（5′—3′）	长度/bp
pET-22b(+)-F	CACCACCACCACCACCACTG AGATCCGG	28
pET-22b(+)-R	GGCCATCGCCGGCTGGGC	18
MsAcT-F	GGCGATGGCCATGGCCAAAC GCATCTTATGTT	32
MsAcT-R	GGTGGTGGTGGTGTAAAAGT GAGCGAACTTGCTCCG	36
S11C-F	TTTCGGAGACTGCCTGACTT GGGGATGGGTTCC	33
S11C-R	TCAGGCAGTCTCCGAAACAT AAGATGCGTTTG	32

1.3.2　MsAcT和MsAcT（S11C）重组工程菌的构建

将重组表达质粒pET-22b(+)-*MsAcT*和pET-22b(+)-*MsAcT*（*S11C*）转化至表达宿主菌*E. coli* BL21（DE3）后，使用LB固体培养基（含50 μg/mL氨苄青霉素）培养，筛选出转化成功的重组工程菌。

1.3.3　MsAcT和MsAcT（S11C）重组工程菌的培养以及酰基转移酶的表达与纯化

挑取大小合适的单菌落，在5 mL LB培养基中以220 r/min培养10 h，以体积分数1%接种至50 mL ZYBM9培养基中，培养至OD_{600}值为0.8~1.0时，添加终浓度为1 mmol/L的IPTG，20 ℃下诱导培养16 h[19]。于8 000 r/min离心5 min收集菌体，并用结合缓冲液（50 mmol/L NaH_2PO_4、300 mmol/L NaCl，pH 8.0）洗涤2次后，用结合缓冲液重悬菌体，利用超声波粉碎仪破碎细胞。于12 000 r/min离心30 min去除菌体碎片。取上清液过0.22 μm膜后，使用Ni-NTA Agarose型镍柱纯化蛋白质。用10~20倍柱体积的洗涤液（50 mmol/L NaH_2PO_4、300 mmol/L NaCl、2 mmol/L咪唑，pH 8.0）冲洗非结合蛋白质，接取2~3倍柱体积的洗脱液（50 mmol/L NaH_2PO_4、300 mmol/L NaCl、400 mmol/L咪唑，pH 8.0）。将收集到的蛋白质纯化液置于4 ℃过夜透析除去咪唑（透析缓冲液为100 mmol/L、pH 7.0的磷酸盐缓冲液），利用Bradford法测定蛋白质质量浓度，采用12 g/dL的SDS-PAGE蛋白胶，通过SDS-PAGE对蛋白质纯化液进行电泳检测。

1.3.4　MsAcT和MsAcT（S11C）的酶活力测定

在含有10 mmol/L乙酸对硝基苯酯的100 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）中，添加20 μg MsAcT或MsAcT（S11C），30 ℃孵育15 min，测定产物对硝基苯酚的生成量，定义在该条件下1 min转化生成1 μmol对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活力单位（U）。

1.3.5　MsAcT和MsAcT（S11C）催化THOP的*N*-乙酰化反应

在含有250 mmol/L THOP和体积分数10%乙酸乙酯的100 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）中，添加最终质量浓度为1 mg/mL的MsAcT或MsAcT（S11C），45 ℃反应12 h后，取样添加4倍体积甲醇混匀。反应液于−20 ℃静置3～4 h，于12 000 r/min离心5 min

后吸取上清液用于液相色谱-质谱法(LC-MS)及HPLC法检测。液相色谱冲洗策略:使用Dikma Spursil C18色谱柱,流动相使用含体积分数0.1%磷酸的体积分数2%甲醇-水溶液,流量0.8 mL/min,冲洗15 min。

1.3.6 *N*-ATHOP转化条件优化

1)反应温度:在含有初始浓度为250 mmol/L的THOP及体积分数10%乙酸乙酯的100 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中,添加MsAcT(S11C)直至终质量浓度为1 mg/mL,分别于35、40、45、50、60 ℃反应12 h,终止反应后检测*N*-ATHOP的产量。

2)pH:在含有初始浓度为250 mmol/L的THOP及体积分数10%乙酸乙酯的100 mmol/L不同缓冲液(pH分别为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)中,添加MsAcT(S11C)直至终质量浓度为1 mg/mL,45 ℃反应12 h,终止反应后检测*N*-ATHOP的产量。

3)THOP初始浓度:分别在含有初始浓度为100、200、250、300、400 mmol/L的THOP及体积分数10%乙酸乙酯的100 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中,添加MsAcT(S11C)直至终质量浓度为1 mg/mL,45 ℃反应12 h,终止反应后检测*N*-ATHOP的产量。

4)酰基供体种类:分别在含有初始体积分数为10%的乙酸乙酯、乙酸乙烯酯、乙酸异丙酯、乙酸异丙烯酯、乙酸异戊酯、乙酸对硝基苯酯和250 mmol/L THOP的100 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中,添加MsAcT(S11C)直至终质量浓度为1 mg/mL,45 ℃反应12 h,终止反应后检测*N*-ATHOP的产量。

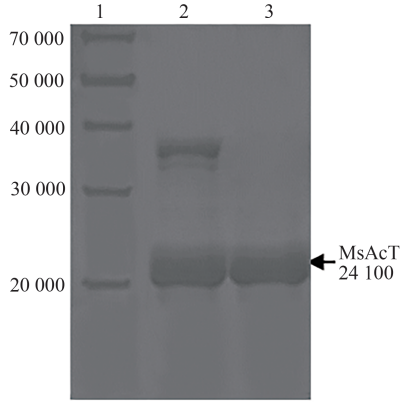
5)酰基供体体积分数:分别在含有初始体积分数为2%、5%、10%、15%、20%的最适酰基供体和250 mmol/L THOP的100 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中,添加MsAcT(S11C)直至终质量浓度为1 mg/mL,45 ℃反应12 h,终止反应后检测*N*-ATHOP的产量。

6)响应面优化试验:根据单因素试验结果,在最佳酰基供体体积分数条件下,选取THOP初始浓度、反应温度和pH这3个因素,每个因素分别设置高低2个水平(-1,1),以THOP合成*N*-ATHOP的产量为响应值进行优化试验。

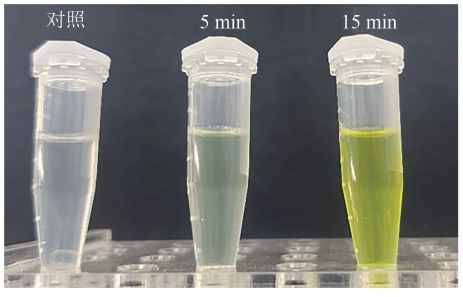
2 结果与讨论

2.1 酰基转移酶MsAcT的异源表达及催化*N*-乙酰化反应

将商业合成的目的基因通过同源重组技术连接至pET-22b(+)质粒上后获得重组质粒pET-22b(+)-*MsAcT*。将该重组质粒转入*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,通过含氨苄青霉素的抗性平板筛选而获得重组工程菌*E. coli* BL21(DE3)/pET-22b(+)-*MsAcT*。利用该重组工程菌进行摇瓶诱导表达后收集菌体,经破壁和离心去除细胞碎片后获得酰基转移酶MsAcT粗酶液,并通过镍柱制得纯酶液,SDS-PAGE分析结果如图1(a)所示。MsAcT蛋白质条带所处位置与预期基本一致,蛋白质相对分子



1—蛋白质Marker;
2—MsAcT粗酶液;3—MsAcT纯酶液。
(a) SDS-PAGE结果



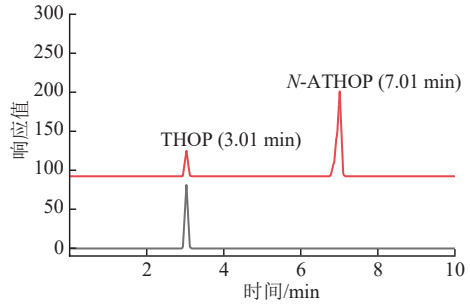
(b) 酶活力测定外观图

图1 酰基转移酶MsAcT的异源表达及酶活力测定

Fig. 1 Heterologous expression and enzyme activity assay of the acyltransferase MsAcT

质量为24 100。按照1.3.4所述方法以乙酸对硝基苯酯为底物进行酶活力测定，纯化后的MsAcT的酶活力分析结果如图1(b)所示，产物对硝基苯酚呈黄色，通过酶标仪测定其在405 nm下的吸光度，从而测得MsAcT的酶活力为150 U/mg。该结果表明已在*E. coli*中成功异源表达出酰基转移酶MsAcT。

接着以酰基转移酶MsAcT催化THOP合成*N*-ATHOP，目标产物使用HPLC和LC-MS进行定性分析检测，结果如图2所示。标准品THOP和*N*-ATHOP的出峰时间分别为3.01、7.01 min，但反应液样品通过HPLC分析仅可以检测到底物THOP，并未能在7 min左右显示*N*-ATHOP的特征峰。HPLC图谱初步表明，MsAcT可能未催化底物THOP生成*N*-ATHOP。



上方数据线为标准品；下方数据线为酶催化反应产物。

图2　THOP和*N*-ATHOP的HPLC分析

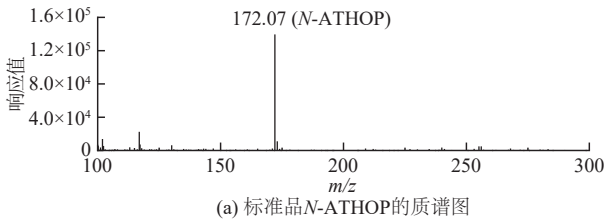
Fig. 2　HPLC analysis of THOP and *N*-ATHOP

进一步采用LC-MS进行分析，结果如图3(a)~(b)所示。*N*-ATHOP标准品的特征峰在*m/z*为172.07的位置，但在MsAcT催化反应的样品中，只有*m/z*为130.01的位置出现底物THOP特征峰，说明LC-MS定性检测也未能在反应液中检测到*N*-ATHOP。结合上述HPLC结果可知，目前表达的酰基转移酶MsAcT未能催化底物THOP合成*N*-ATHOP。

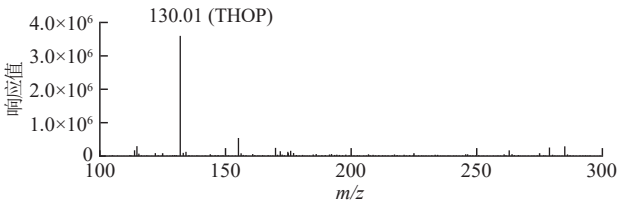
2.2　酰基转移酶MsAcT的定点突变及催化合成*N*-ATHOP

根据Contente等[18]的研究，对酰基转移酶MsAcT进行定点突变，以期实现*N*-ATHOP的微生物酶法催化合成。通过将*MsAcT*基因中编码第11位Ser的密码子TCC定点突变为编码Cys的密码子TGC，并将其整合到质粒pET-22b(+)的相同位置上获得重组质粒pET-22b(+)-*MsAcT*(*S11C*)，按前述方法在*E. coli*中进行异源表达并制得粗酶液。测定酶活力时发现突变体MsAcT(S11C)的酶活力为100 U/mg。

该粗酶液通过镍柱纯化后用于催化合成*N*-ATHOP，反应液同样采用HPLC和LC-MS进行定性分析，结果见图4~5。如图4所示，参照



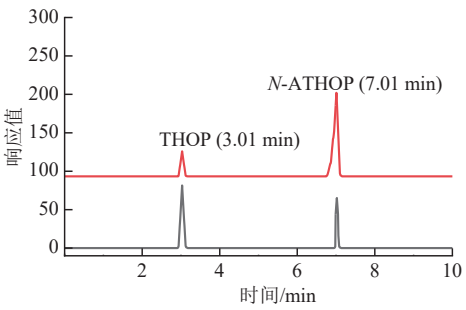
(a) 标准品*N*-ATHOP的质谱图



(b) MsAcT催化反应样品的质谱图

图3　MsAcT催化*N*-乙酰化反应的质谱分析

Fig. 3　Mass spectrometry analysis of the *N*-acetylation reaction catalyzed by MsAcT



上方数据线为标准品；下方数据线为酶催化反应产物。

图4　MsAcT(S11C)催化*N*-乙酰化反应产物的HPLC分析

Fig. 4　HPLC analysis of products from the *N*-acetylation reaction catalyzed by MsAcT(S11C)

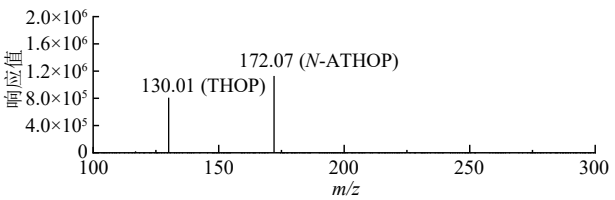


图5　MsAcT(S11C)催化*N*-乙酰化反应的质谱分析

Fig. 5　Mass spectrometry analysis of the *N*-acetylation reaction catalyzed by MsAcT(S11C)

标准品 THOP 及 *N*-ATHOP 的 HPLC 分析图谱，酰基转移酶 MsAcT（S11C）催化的反应液在 7 min 左右出现与 *N*-ATHOP 标准品相似的特征峰，据此可初步判断酶催化反应生成了 *N*-ATHOP。同时，如图 3（a）和图 5 所示，LC-MS 的定性分析结果进一步表明了酶反应液中有 *N*-ATHOP 存在，证明突变体 MsAcT（S11C）能催化乙酸乙酯中的乙酰基转移至底物 THOP 的氮原子上，从而合成 *N*-ATHOP。结合 Contente 等[18]对 MsAcT 突变体的研究，将酰基转移酶 MsAcT 活性位点的 Ser 替换为 Cys，可能将酰基-*O*-酶中间体转变为更易受到亲核攻击的酰基-*S*-酶中间体（酰基-*S*-半胱氨酸-酶）；与此同时，相比于酰基和氧原子之间的共价键，酰基和硫原子之间的共价键更易断裂，从而使得底物 THOP 能够发生乙酰化反应。

2.3 MsAcT（S11C）催化合成条件优化

2.3.1 单因素试验

由图 6（a）~（b）可知，反应温度和 pH 对产物 *N*-ATHOP 的合成具有明显影响。当反应温度较低时，*N*-ATHOP 产量随着反应温度的增加而提升；在 45 ℃时，*N*-ATHOP 产量达到 3.14 g/L，对应转化率为 7.27%；反应温度继续升高会导致 *N*-ATHOP 产量明显下降。因此，选择 45 ℃作为最适反应温度。此外，当 pH 较低时，产物的合成也随着 pH 的提升而提升；在 pH 为 7.0 时，*N*-ATHOP 产量达到 3.14 g/L，对应转化率为 7.27%；进一步提高 pH，*N*-ATHOP 产量呈下降趋势。因此，选择 pH 7.0 作为最适 pH。由图 6（c）可知，当 THOP 初始浓度较低时，产物的合成随着 THOP 初始浓度的增加而提升；当 THOP 初始浓度为 250 mmol/L 时，*N*-ATHOP 产量达到 3.34 g/L，对应转化率为 7.75%；进一步增加 THOP 初始浓度，转化率明显下降。因此，最终选择 THOP 初始浓度为 250 mmol/L。由图 6（d）可知，相比于其他酰基供体，乙酸乙烯酯的酰基供给能力相对更强，有助于 *N*-ATHOP 的合成；当酰基供体为体积分数 10% 的乙酸乙烯酯时，*N*-ATHOP 产量最高，达到 4.30 g/L，对应转化率为 9.94%。因此，确定乙酸乙烯酯作为 MsAcT（S11C）催化合成 *N*-ATHOP 的最适酰基供体。由图 6（e）可知，当乙酸乙烯酯体积分数较低时，产物 *N*-ATHOP 的产量随着乙酸乙烯酯的增加而提

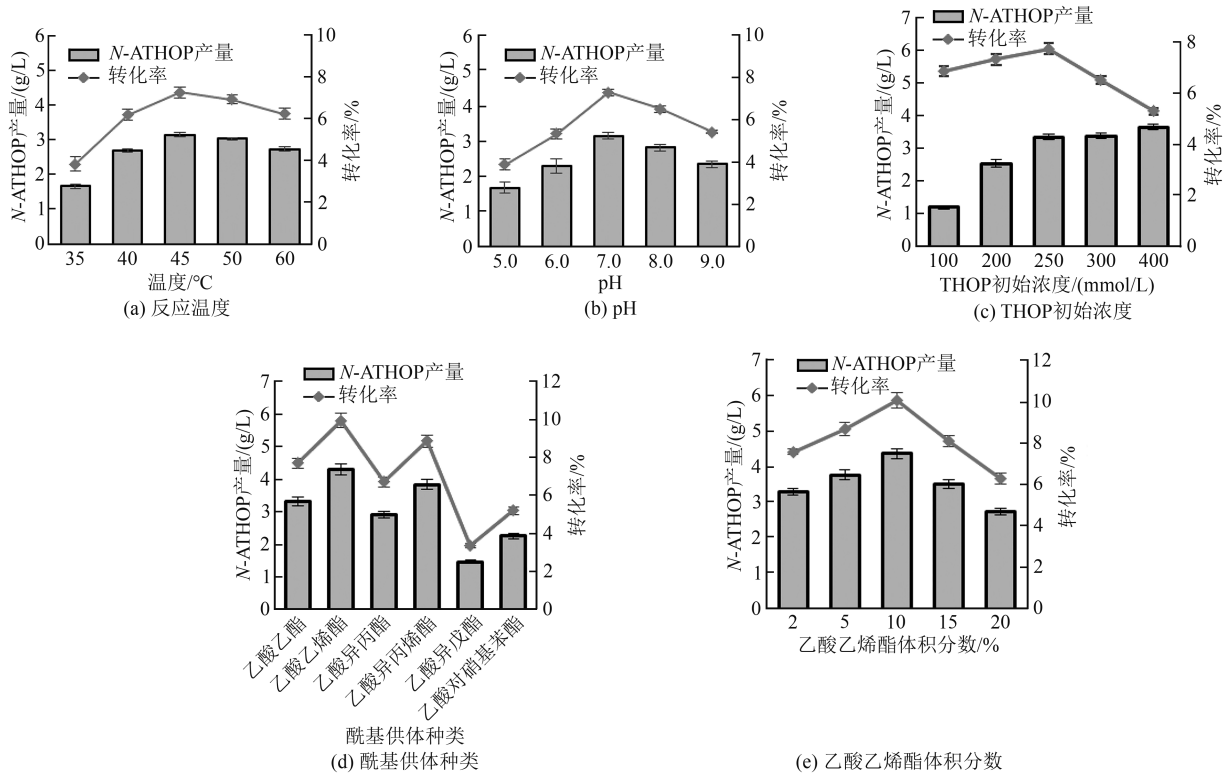


图 6 MsAcT（S11C）催化合成 *N*-ATHOP 的单因素试验

Fig. 6 Single-factor experiment on the synthesis of *N*-ATHOP catalyzed by MsAcT（S11C）

升；当乙酸乙烯酯体积分数为10%时，*N*-ATHOP产量达到4.37 g/L，对应转化率为10.09%；继续增大乙酸乙烯酯体积分数，产物*N*-ATHOP的产量下降。因此，确定乙酸乙烯酯最适体积分数为10%。综上，MsAcT（S11C）催化底物THOP合成*N*-ATHOP的反应适宜条件为：反应温度45 ℃、pH 7.0、THOP初始浓度250 mmol/L、乙酸乙烯酯体积分数10%。在该条件下，*N*-ATHOP产量达到4.37 g/L，对应转化率为10.09%。

2.3.2　响应面优化试验

基于单因素试验并结合Plackett-Burman试验显著性分析，以*N*-ATHOP产量（*Y*）为响应值，进一步考察THOP初始浓度（*A*）、反应温度（*B*）和pH（*C*）3个因素的相互作用对*N*-ATHOP产量的影响。响应面试验设计及结果见表2。经响应面回归和方差分析，可得回归方程 $Y=-37.969\ 94+0.023\ 33A+0.866\ 62B+4.972\ 81C+0.000\ 10AB+0.000\ 15AC+0.002\ 54BC-0.000\ 05A^2-0.009\ 29B^2-0.364\ 44C^2$。

由表3可知，模型$P<0.000\ 1$，差异极显著；失拟项$P>0.05$，差异不显著；决定系数$R^2=0.999\ 1$，表明该模型拟合度较好；校正决定系数$R^2_{Adj}=0.997\ 9$，说明模型的可行性较高，可用于酰基转移酶MsAcT（S11C）催化合成*N*-ATHOP的预测。

表2　响应面试验设计及结果

Table 2　Response surface experiment design and results

试验号	THOP初始浓度/（mmol/L）	反应温度/℃	pH	产量/（g/L）
1	250	60	9.0	1.97
2	250	35	9.0	1.23
3	100	45	9.0	1.00
4	250	45	7.0	4.36
5	250	60	5.0	1.79
6	100	45	5.0	0.92
7	250	45	7.0	4.36
8	400	60	7.0	3.59
9	400	35	7.0	2.46
10	250	45	7.0	4.37
11	400	45	9.0	2.96
12	400	45	5.0	2.70
13	250	45	7.0	4.37
14	100	60	7.0	1.22
15	250	45	7.0	4.38
16	100	35	7.0	0.84
17	250	35	5.0	1.35

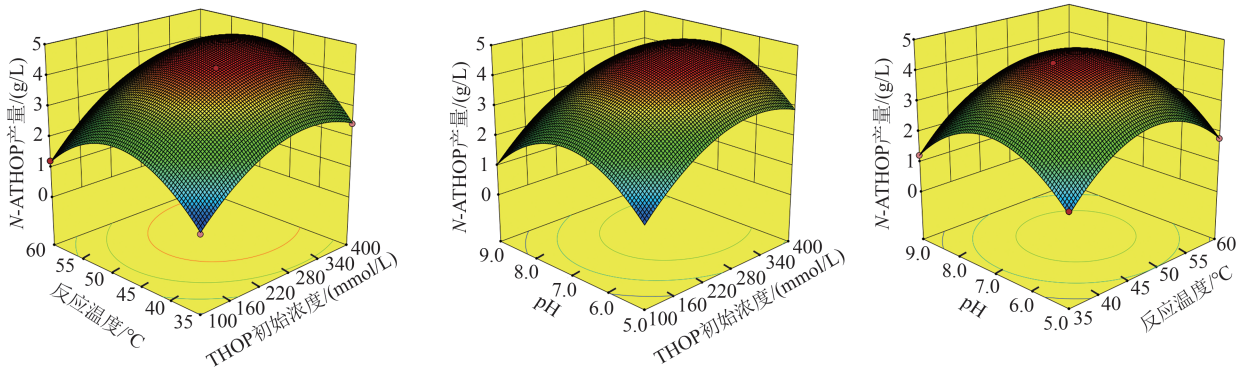
表3　响应面试验结果方差分析

Table 3　Variance analysis of response surface experiment results

来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	31.637 2	9	3.515 2	830.63	<0.000 1	***
A	7.618 7	1	7.618 7	1 800.26	<0.000 1	***
B	0.911 9	1	0.911 9	215.49	<0.000 1	***
C	0.024 3	1	0.024 3	5.76	0.047 4	**
AB	0.146 2	1	0.146 2	34.55	0.000 6	**
AC	0.007 7	1	0.007 7	1.83	0.218 2	
BC	0.016 4	1	0.016 4	3.88	0.089 6	
A^2	4.348 5	1	4.348 5	1 027.52	<0.000 1	***
B^2	8.008 6	1	8.008 6	1 892.39	<0.000 1	***
C^2	8.947 4	1	8.947 4	2 114.22	<0.000 1	***
残差	0.003 5	7	0.004 2			
失拟项	0.002 5	3	0.002 5	3.36	0.136 1	
纯误差	0.000 3	4	0.000 1			
总和	31.666 8	16				
R^2	0.999 1					
R^2_{Adj}	0.997 9					

注：“**”代表差异非常显著（$P<0.01$）；“***”代表差异极显著（$P<0.000\ 1$）。

根据上述模型，绘制不同因素相互作用对*N*-ATHOP产量影响的响应面，结果如图7所示。一次项*A*、*B*，二次项A^2、B^2、C^2影响极显著（$P<0.000\ 1$）；一次项*C*和交互项*AB*影响非常显著（$P<0.01$）。各因素对MsAcT（S11C）催化合成*N*-ATHOP的影响大小顺序为：THOP初始浓度>反应温度>pH。对回归方程进行求解可以得到*N*-ATHOP产量的最大值。当THOP初始浓度为315.44 mmol/L、反应温度为49 ℃、pH为6.87时，预测的*N*-ATHOP产量为4.75 g/L，较单因素试验结果提高了8.7%。根据实际试验条件，调整THOP初始浓度为315.5 mmol/L、反应温度为49 ℃、pH为6.9。在此条件下进行3组平行试验进行验证，最终得到*N*-ATHOP产量平均值为4.71 g/L，对应转化率为10.95%，与模型预测结果基本一致。



(a) THOP初始浓度与反应温度交互作用的响应面图　(b) THOP初始浓度与pH交互作用的响应面图　(c) 反应温度与pH交互作用的响应面图

图7　各因素交互作用的响应面图

Fig. 7　Response surface diagrams of the interactions between various factors

3　结论

围绕*E. coli*异源表达的*Mycobacterium smegmatis*来源的酰基转移酶MsAcT及其突变体MsAcT（S11C），成功实现了由THOP到*N*-ATHOP的微生物酶法生物合成。突变体MsAcT（S11C）在最佳条件（反应温度49 ℃、pH 6.9、乙酸乙烯酯体积分数10%、THOP初始浓度315.5 mmol/L）下反应12 h的*N*-ATHOP产量达4.71 g/L，对应转化率为10.95%。突变体MsAcT（S11C）可催化合成*N*-ATHOP，但其催化效率不足，故后续可采用蛋白质工程策略，利用分子模拟等方式对该突变体的结构进行更深入的设计与改造，以提高其催化效率。

参考文献

[1] BACH T M H, HARA R, KINO K, et al. Microbial production of *N*-acetyl *cis*-4-hydroxy-*L*-proline by coexpression of the *Rhizobium L*-proline *cis*-4-hydroxylase and the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 247-257.

[2] CZUB M P, HANDING K B, VENKATARAMANY B S, et al. Albumin-based transport of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in mammalian blood plasma [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 63(13): 6847-6862.

[3] RICCIOTTI E, FITZGERALD G A. Prostaglandins and inflammation [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2011, 31(5): 986-1000.

[4] HERRMANN G, STEEGER D, KLASSER M, et al. Oxaceprol is a well-tolerated therapy for osteoarthritis with efficacy equivalent to diclofenac[J]. Clinical Rheumatology, 2000, 19(2): 99-104.

[5] KRÜGER K, KLASSER M, MÖSSINGER J, et al. Oxaceprol: a randomised, placebo-controlled clinical study in osteoarthritis with a non-conventional non-steroidal anti-inflammatory drug [J]. Clinical and Experimental Rheumatology, 2007, 25(1): 29-34.

[6] OHNARI H, SEKIYA M, NARU E, et al. Amino acids and their *N*-acetylated derivatives maintain the skin's barrier function [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2021, 69(7): 652-660.

[7] DAMIEN F, BONCHEVA M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier

efficiency of human skin *in vivo*[J]. The Journal of Investigative Dermatology,2010,130(2):611-614.

[8] VALEUR E, BRADLEY M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents[J]. Chemical Society Reviews,2009,38(2):606-631.

[9] DUNETZ J R, MAGANO J, WEISENBURGER G A. Large-scale applications of amide coupling reagents for the synthesis of pharmaceuticals[J]. Organic Process Research & Development,2016,20(2):140-177.

[10] MAI-HOA B T, HIBI T, NASUNO R, et al. Production of *N*-acetyl *cis*-4-hydroxy-*L*-proline by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2012,114(2):160-165.

[11] SCHMEING T M, RAMAKRISHNAN V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation[J]. Nature, 2009, 461(7268):1234-1242.

[12] VAN RANTWIJK F, SHELDON R A. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases[J]. Tetrahedron,2004,60(3):501-519.

[13] BUSTO E, GOTOR-FERNÁNDEZ V, GOTOR V. Enantioselective synthesis of 4-(dimethylamino)pyridines through a chemical oxidation-enzymatic reduction sequence. Application in asymmetric catalysis[J]. Advanced Synthesis & Catalysis,2006,348(18):2626-2632.

[14] DORR B M, FUERST D E. Enzymatic amidation for industrial applications[J]. Current Opinion in Chemical Biology,2018,43:127-133.

[15] 吉得宁,宿玲恰,吴敬,等. 共表达*N*-乙酰转移酶和磷脂酶重组菌的构建及发酵优化[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(8):853-860.
JI D N, SU L Q, WU J, et al. Construction of co-expressed *N*-acetyltransferase and phospholipase gene in recombinant strain and optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2018,37(8):853-860.(in Chinese)

[16] MATHEWS I, SOLTIS M, SALDAJENO M, et al. Structure of a novel enzyme that catalyzes acyl transfer to alcohols in aqueous conditions[J]. Biochemistry, 2007, 46(31):8969-8979.

[17] CONTENTE M L, PINTO A, MOLINARI F, et al. Biocatalytic *N*-acylation of amines in water using an acyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*[J]. Advanced Synthesis & Catalysis,2018,360(24):4814-4819.

[18] CONTENTE M L, ROURA-PADROSA D, MOLINARI F, et al. A strategic Ser/Cys exchange in the catalytic triad unlocks an acyltransferase-mediated synthesis of thioesters and tertiary amides[J]. Nature Catalysis, 2020,3:1020-1026.

[19] 刘宁,徐建中. 改造乙酰羟酸合成酶提高*L*-亮氨酸产量[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(9):45-55.
LIU N, XU J Z. Improvement of *L*-leucine production by modifying acetohydroxy acid synthase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(9): 45-55.(in Chinese)

（责任编辑：周玥）