



徐瑞敏,邵化,李晨飞,等.烟草肠杆菌芳香族氨基酸转氨酶的结构预测、克隆表达及酶学性质研究[J].轻工学报,2025,40(2):100-107.  
XU R M,SHAO H,LI C F,et al. Structural prediction, cloning, expression and enzymatic property of aromatic amino acid transaminase from *Enterobacter tabaci*[J]. Journal of Light Industry,2025,40(2):100-107.  
DOI:10.12187/2025.02.011

# 烟草肠杆菌芳香族氨基酸转氨酶的结构预测、克隆表达及酶学性质研究

徐瑞敏,邵化,李晨飞,单明明,魏涛

郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001

**摘要:**为提升芳香族氨基酸转氨酶(AAT)在合成生长素、促进作物生长方面的潜在应用价值,采用生物信息学方法对烟草肠杆菌 $\beta 7$ (*Enterobacter tabaci* strain  $\beta 7$ ) AAT 的结构进行分析和预测,利用大肠杆菌对该酶进行异源克隆表达和纯化,并测定重组 AAT 的酶学性质。结果表明:AAT 含有 396 个氨基酸,该酶活性中心关键氨基酸残基为 Lys246;由大肠杆菌异源表达的重组 AAT 的分子质量约为 43 kDa,其最适底物为色氨酸,最适反应温度为 50 °C、pH 值为 8.0;重组 AAT 对乙醇具有较好的耐受性,且  $\text{Cu}^{2+}$  对该酶活性有一定的促进作用。该研究结果可为烟草肠杆菌 AAT 的酶分子改造和高产生生长素工程菌的构建提供理论基础。

**关键词:**烟草肠杆菌;芳香族氨基酸转氨酶;生长素;结构预测;克隆表达;酶学性质

**中图分类号:**TS41;Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2025)02-0100-08

## 0 引言

生长素(Auxin)是植物体内非常重要的一类激素,其化学本质是吲哚乙酸(Indoleacetic Acid, IAA),具有促进细胞分裂和细胞伸长生长的功能,其在植物体多种生长发育(如顶端优势、开花、叶序发育、根发生和发育等)过程中发挥重要的调节作用<sup>[1]</sup>。施加外源生长素是促进陆生植物繁殖(如小麦分蘖、水稻灌浆、苹果催熟、向日葵生长、姜根茎形成、芝麻荚膜开裂等)的有效手段之一,目前已广泛应用于多种农作物的种植中。

烟草肠杆菌(*Enterobacter tabaci*)是肠杆菌属中

的一种革兰氏阴性菌,其在补加色氨酸的培养基中可大量合成生长素<sup>[2-3]</sup>。近年来,多项研究<sup>[4]</sup>表明烟草肠杆菌发酵液对番茄种子和幼苗具有较好的促生长效果。随着环境保护要求的不断增强,植物根际促生菌(Plant Growth-promoting Rhizobacteria, PGPR)菌剂的应用将会成为农业可持续发展的重要研究方向。烟草肠杆菌作为一种 PGPR,在促进作物生长和提高产量方面具有潜在的应用价值<sup>[5-6]</sup>。

微生物主要通过四条途径完成从色氨酸到生长素的合成,分别为吲哚丙酮酸(Indole-3-Pyruvic Acid, IPA)途径、吲哚乙酰胺(Indole-3-Acetamide,

收稿日期:2024-03-07;修回日期:2024-04-18;出版日期:2025-04-15

基金项目:中原科技创新人才项目(224200510017);河南省重点研发专项项目(231111111700)

作者简介:徐瑞敏(1996—),女,河南省周口市人,郑州轻工业大学硕士研究生,主要研究方向为酶资源挖掘与改造。E-mail:1448304969@qq.com

通信作者:魏涛(1980—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术。E-mail:weit8008@zzuli.edu.cn

IAM) 途径、吲哚乙腈途径 (Indole-3-Acetonitrile, IAN) 和色胺途径 (Tryptamine, TAM), 其中 IPA 途径被认为是植物和微生物生长素生物合成的主要途径<sup>[7]</sup>。芳香族氨基酸转氨酶 (Aromatic Amino Acid Transaminase, AAT) 是 IPA 途径中的关键酶, 负责催化 IPA 途径中第一步的反应, 调控植物体内激素和多种次生代谢产物 (如生长素、生育酚、类黄酮和木质素等) 的合成<sup>[8-12]</sup>。

杨旭等<sup>[13]</sup>从云南文山筛选获得一株产生生长素的烟草肠杆菌  $\beta 7$  (*E. tabaci* strain  $\beta 7$ ), 在最优条件下, 其发酵液中 IAA 质量浓度高达 276.96 mg/mL, 但未对 IAA 生成关键酶 AAT 的结构和酶学性质进行深入研究。基于此, 本研究拟采用生物信息学方法对 *E. tabaci* strain  $\beta 7$  中生长素合成关键酶 AAT 的结构进行分析和预测, 利用大肠杆菌对其进行异源克隆表达获得重组 AAT, 并对重组 AAT 的酶学性质进行测定, 以期对 AAT 的分子改造和高产生生长素工程菌的构建提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

主要材料:烟草肠杆菌  $\beta 7$ , 由郑州轻工业大学食品与生物工程学院实验室保藏;大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞, 购自上海生工生物工程股份有限公司。

主要试剂:异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG)、卡那霉素 (Kanamycin)、Ni-NTA 亲和层析柱、二硫苏糖醇 (DTT)、吐温-20 (Tween-20)、Triton X-100, 上海生工生物工程股份有限公司;吲哚-3-丙酮酸、20 种 L-基本氨基酸 (甘氨酸 (Gly)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr)、天冬氨酸 (Asp)、天冬酰胺 (Asn)、谷氨酸 (Glu)、赖氨酸 (Lys)、谷氨酰胺 (Gln)、甲硫氨酸 (Met)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、半胱氨酸 (Cys)、脯氨酸 (Pro)、组氨酸 (His)、精氨酸 (Arg)), 美国 Sigma 公司;十二烷基硫酸钠 (SDS)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、硫酸铜、氯化钙、氯化镁、氯化锌、氯化亚铁、氯化钾、氯化锰, 均为分析纯, 上海国药集

团化学试剂有限公司。

主要培养基:LB 液体培养基 (酵母粉 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、氯化钠 10.0 g/L, 121 °C 灭菌 20 min 制得);LB 固体培养基 (酵母粉 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、氯化钠 10.0 g/L、琼脂粉 15.0 g/L, 121 °C 灭菌 20 min 制得)。

主要仪器:UV-1500 型紫外可见分光光度计, 中国美析仪器有限公司;HH-8B 型磁力搅拌水浴锅, 湖南前沿科技有限公司;ZWYR-200 D 型恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司;LHS-450SC 型恒温培养箱, 上海捷呈实验仪器有限公司;PHS-3E 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司;5412R 型超低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 烟草肠杆菌 AAT 序列分析和结构预测

利用 NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 获得蛋白结构数据库 (RCSB PDB, <https://www.rcsb.org>) 中与烟草肠杆菌  $\beta 7$ AAT 相似的蛋白结构和序列数据;利用 Bioedit 对 AAT 的序列进行比对, 并用在线工具 ESPript 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript>) 进行修饰;利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 对蛋白质三级结构进行同源建模;利用 SAVES v6.0 在线服务器 (<https://saves.mbi.ucla.edu>) 对蛋白三级结构模型进行评估。

1.2.2 重组 AAT 的表达与纯化

根据 pET-28a 表达载体多克隆位点特征设计引物, 将 AAT 基因插入载体中 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点之间得到重组质粒。重组 AAT 的 C 端设计成含组氨酸标签, 便于纯化。引物序列设计和合成均由上海生工生物工程股份有限公司完成。

利用化学氯化钙法<sup>[14]</sup>进行重组质粒转化。首先, 将 1  $\mu$ L 重组质粒加入到 50  $\mu$ L 大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞中, 轻轻混匀后冰浴 30 min; 然后, 将混合液置于 42 °C 水浴锅中热激 90 s 后, 再冰浴 2 min; 最后, 加入 500  $\mu$ L LB 液体培养基, 置于 37 °C 摇床 (160 r/min) 培养 1 h。取 50  $\mu$ L 培养液均匀涂布于含卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 固体培养基上, 于 37 °C 恒温培养箱倒置培养 10 h。

将上述步骤获得的阳性克隆子接种至 30 mL LB 液体培养基中,于 37 ℃ 恒温摇床 (160 r/min) 培养 10 h 进行活化。将活化后的菌种按体积分数 2% 的接种比例转接于 300 mL 含卡拉霉素的 LB 培养液中继续培养。当  $OD_{600}$  为 0.6~0.8 时,加入 IPTG (终浓度为 0.2 mmol/L),并置于 30 ℃ 恒温摇床培养 7 h 后,于 4 ℃、6000 r/min 条件下离心 20 min,收获菌体。

将菌体置于缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl, pH 值为 7.9) 中,于冰上超声破碎 10 min。将细胞破碎液于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min,保留上清液,即得粗酶液。利用 Ni-NTA 亲和层析柱对粗酶液进行纯化,上样后,分别用 30 mmol/L、60 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 咪唑缓冲液 (含 20 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.4) 进行洗脱,每种咪唑缓冲液洗脱时收集 2 管洗脱液,每管洗脱液 1 mL,于 4 ℃ 保存备用。收集的各组分利用 SDS-PAGE 进行分析<sup>[15]</sup>,所获得的纯化重组 AAT 用考马斯亮蓝法测定浓度<sup>[16]</sup>。

### 1.2.3 重组 AAT 酶学性质分析

1) 基本酶学性质分析。

i) 最适底物利用谷氨酸脱氢酶偶联法进行测定<sup>[17]</sup>。反应体系为:磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 值为 8.0)、L-基本氨基酸 (3 mmol/L)、 $\alpha$ -酮戊二酸 (3 mmol/L)、还原型辅酶 I (NADH, 7 mg/mL)、谷氨酸脱氢酶 (300 U)。将反应体系置于 35 ℃ 条件下孵育 3 min,然后加入纯化的重组 AAT (40  $\mu$ L),反应 20 min 后置于冰上终止反应,并测定  $OD_{340}$ 。酶活单位 (U) 定义为:1 min 催化生成 1  $\mu$ mol 谷氨酸所需的酶量。根据 AAT 对不同氨基酸底物的催化活性确定其底物特异性。

ii) 最适反应 pH 值、温度和温度稳定性利用比色法进行测定<sup>[18]</sup>。反应体系为:L-色氨酸 (10 mmol/L)、磷酸吡哆醛 (PLP, 10  $\mu$ mol/L)、纯化的重组 AAT (1  $\mu$ mol/L) 和磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 值为 8.0)。将反应体系置于 35 ℃ 条件下孵育 3 min,然后加入  $\alpha$ -酮戊二酸 (终浓度为 3 mmol/L) 开始反应,20 min 后冰浴终止反应。加入 1 mL 显色剂 (Salkowski) 避光孵育 10 min 后测定  $OD_{530}$ 。酶活单位 (U) 定义为:1 min 催化生成 1  $\mu$ mol 吡啶-

3-丙酮酸所需的酶量。

最适反应 pH 值测定时,所用缓冲液为:磷酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH 值为 6.0~8.0)、Tris-HCl 缓冲液 (100 mmol/L, pH 值为 8.0~8.5)、Gly-NaOH 缓冲液 (100 mmol/L, pH 值为 9.0~10.5)。用不同 pH 值的缓冲液配制反应体系,测定重组 AAT 的活性随 pH 值变化的曲线。

最适反应温度测定时,用重组 AAT 最适 pH 值所对应的缓冲液和最适底物配制反应体系,将反应体系分别置于 40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃、65 ℃、70 ℃ 水浴锅中预热 10 min,加入重组 AAT 反应 20 min 后终止反应。加入显色剂 (Salkowski) 避光孵育 10 min 后测定  $OD_{530}$ 。

温度稳定性测定时,将重组 AAT 酶液分别置于 40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃、65 ℃、70 ℃ 水浴锅中,然后每隔 20 min 在最适反应温度和 pH 值条件下测定重组 AAT 热处理后的残余活力。将最适反应温度下的相对酶活定义为 100%。

iii) 重组 AAT 动力学参数测定。在最适反应温度和 pH 值条件下,测定不同最适底物浓度时重组 AAT 的相对酶活,利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,计算 AAT 动力学常数  $K_m$  和  $K_{cat}$ 。底物浓度分别为:1 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L、12 mmol/L、14 mmol/L、16 mmol/L、18 mmol/L、20 mmol/L。

2) 重组 AAT 与底物的分子对接。通过 SWISS-MODEL 在线软件建模获得 AAT 三维模型,并用 AutoDock tools 软件进行加氢加电荷,再利用 Chemdraw 软件绘制用于对接的 20 种氨基酸配体分子,最后利用 AutoDock tools 软件进行分子对接,对接盒子的中心坐标  $X$ 、 $Y$ 、 $Z$  分别为 (-0.139, -4.750, 8.528),盒子大小设置为 76 Å×74 Å×72 Å,对接完成后统计结合自由能。

3) 有机溶剂、表面活性剂和金属离子对重组 AAT 活性的影响。预先将重组 AAT 在不含有底物的反应体系中,用 10% (体积分数) 的有机溶剂 (甲醇、乙醇、丙三醇、正丁醇、异丙醇、正己烷)、终浓度为 5 mol/L 的金属离子 ( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ )、1% (体积分数) 的表面活性剂 (吐温-20,

Triton X-100 和 SDS)、EDTA (5 mmol/L) 或 DTT (5 mmol/L)室温处理 60 min, 然后加入最适底物, 在最适反应温度和 pH 值条件下,测定残余酶活。

2 结果与分析

2.1 烟草肠杆菌 AAT 序列分析与结构预测结果

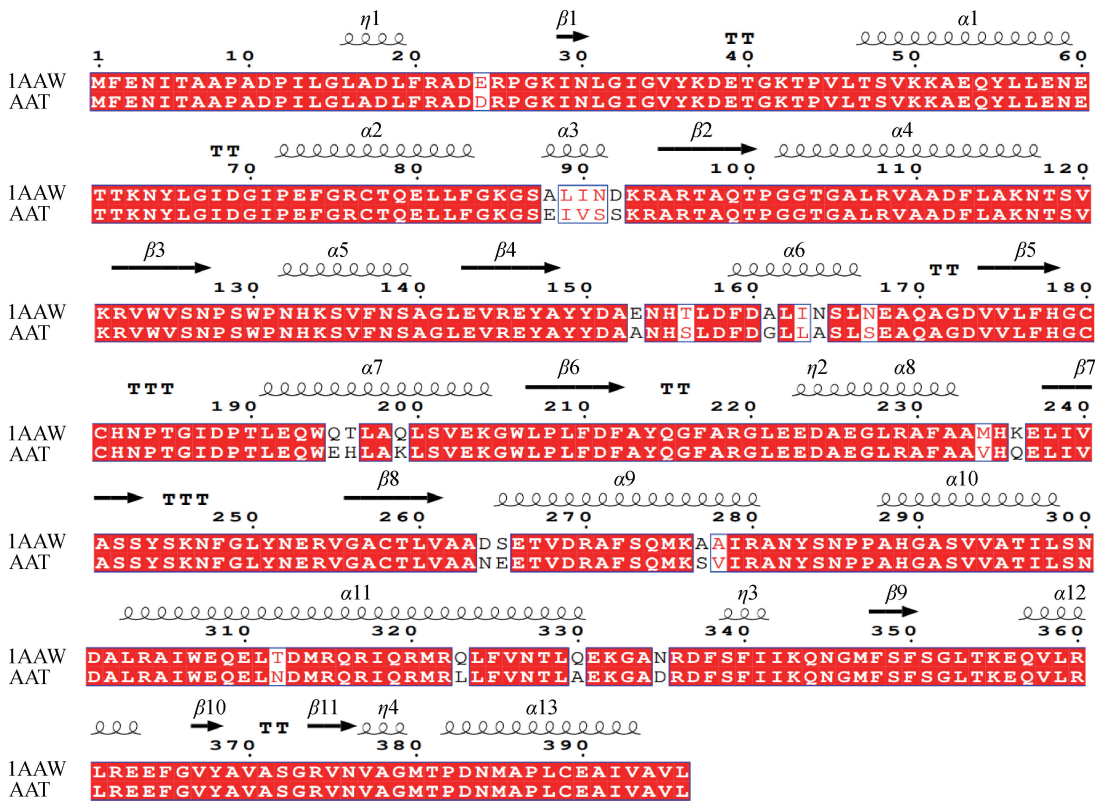
2.1.1 烟草肠杆菌 AAT 序列分析 烟草肠杆菌  $\beta 7$ AAT 的基因序列全长 1191 bp, 编码的蛋白质含有 396 个氨基酸。通过 NCBI Blast 分析发现, 该 AAT 与大肠杆菌氨基转移酶(PDB ID:1AAW)相似性最高, 序列一致性(Sequence Identity)达 93.69%。因此, 烟草肠杆菌 AAT 与大肠杆菌氨基转移酶具有相似的二级结构。烟草肠杆菌和大肠杆菌的 AAT 序列比对结果如图 1 所示。由图 1 可知, 烟草肠杆菌 AAT 的二级结构含有 13 段  $\alpha$ -螺旋(占比 43.18%)和 11 段  $\beta$  折叠(占比 8.59%), 其余为无规则卷曲结构(占比 48.23%)。

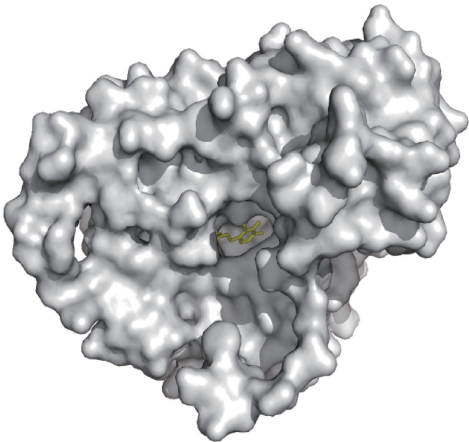
2.1.2 烟草肠杆菌 AAT 三级结构预测 由于大肠杆菌氨基转移酶与烟草肠杆菌 AAT 具有高度相似性, 因而可将其作为同源建模模板, 用于构建烟草

肠杆菌 AAT 三级结构模型。烟草肠杆菌 AAT 的三级结构和活性中心预测结果如图 2 所示, 其中, 红色为 Lys246, 是酶的催化中心; 黄色为 Tyr214、Ser245、Ser243、Arg254、Thr104、Trp130、Asn183、Gly102 和 Gly103, 参与酶与底物的结合, 形成底物结合口袋。由图 2 可知, 烟草肠杆菌 AAT 三级结构中有 91.4% 的氨基酸位于最适区域, 6.3% 的氨基酸位于其他允许区域, 1.1% 位于一般允许区域, 仅有 1.1% 位于不允许区域, 说明该蛋白的三级结构模型比较合理。整体上, 烟草肠杆菌 AAT 似球形蛋白, 底物结合口袋位于酶分子内部(见图 2a))。通过对转氨酶催化机制的分析得知, 氨基酸转氨酶的活性中心由赖氨酸起催化作用<sup>[19]</sup>, 推测烟草肠杆菌 AAT 的酶活性中心可能由 Lys246 及其附近的 Tyr214、Ser245、Ser243、Arg254、Thr104、Trp130 和 Asn183 氨基酸残基共同组成(见图 2b)), 其中 Arg254 和 Asn183 可能参与稳定底物中的羧基, Trp130 可能参与稳定辅因子 PLP 中的吡哆醛环。

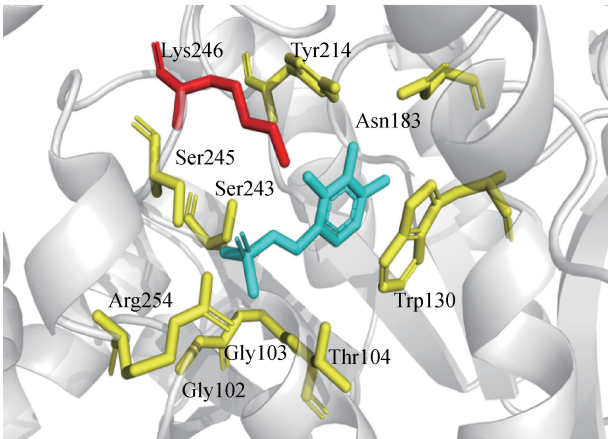
2.2 重组 AAT 的表达及纯化

纯化重组 AAT 的 SDS-PAGE 图如图 3 所示, 其





a)烟草肠杆菌AAT的三级结构模型



b)烟草肠杆菌AAT的活性中心

图 2 烟草肠杆菌 AAT 的三级结构和活性中心预测结果

Fig. 2 The prediction of tertiary structure and active center of AAT from *E. tabaci*

中 M 为 Marker,泳道 1 为全蛋白(细胞破碎液),泳道 2 为粗酶液,泳道 3—10 为 Ni-NTA 亲和层析柱纯化的酶。由图 3 可知,烟草肠杆菌 AAT 可在大肠杆菌 BL21 菌株中表达,且可溶性表达成分较高,分子质量大小约为 43 kDa。此外,从图 3 还可以看出,利用 200 mmol/L 的咪唑缓冲液能收集得到较多、较纯的重组 AAT。

2.3 重组 AAT 的酶学性质

2.3.1 重组 AAT 的基本酶学性质 重组 AAT 的底物特异性和酶学性质如图 4 所示。由图 4a)可知,在以 α-酮戊二酸作为氨基受体的条件下,重组 AAT 对 20 种氨基酸都能发挥氨基转移作用,对色氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬氨酸和组氨酸表现出较高的转氨酶活性,对其他氨基酸则表现出较低的转氨酶活性,

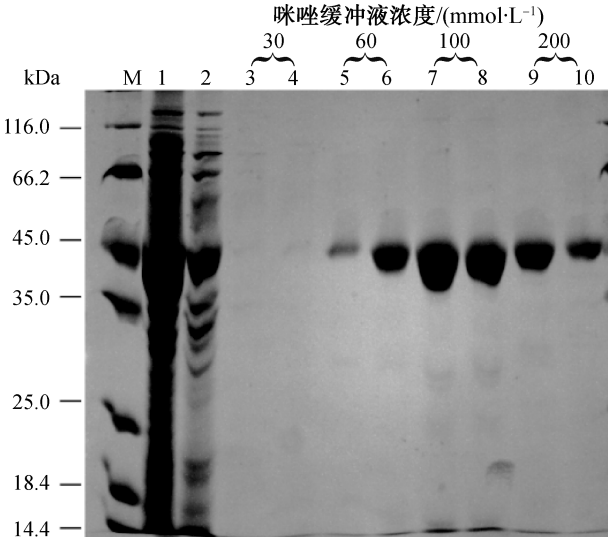


图 3 纯化重组 AAT 的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE of purified recombinant AAT

其中,对色氨酸的转氨酶活性最高(713.3 U/mg),对脯氨酸的转氨酶活性最低(3.4 U/mg)。

由图 4b)可知,当缓冲液 pH 值为 6.0~7.5 时,酶活性变化不大,为最大酶活的 60%左右;当缓冲液 pH 值为 8.0 时,重组 AAT 表现出最大的酶活性;当缓冲液 pH 值为 8.5~9.5 时,酶活性快速下降至最大酶活的 50%左右;当缓冲液 pH 值为 10.5 时,酶活性仅为最大酶活的 8%。上述数据表明,烟草肠杆菌 AAT 对 pH 值的变化较敏感,最适反应 pH 值为 8.0。

由图 4c)可知,当反应温度从 40 ℃逐步提高至 50 ℃时,酶活性逐渐增大;当反应温度为 50 ℃时,重组 AAT 表现出最大的酶活性;当反应温度高于 50 ℃后,酶活性急剧下降,反应温度为 55 ℃时,酶活性为最大酶活的 30%左右,当反应温度为 70 ℃时,酶活性仅为最大酶活的 15%左右。

由图 4d)可知,重组 AAT 在 40~50 ℃条件下处理 40 min 后,残余相对酶活为 50%左右,而在 60~70 ℃条件下处理 20 min 后,残余相对酶活下降至 20%以下。

上述结果表明,反应温度对烟草肠杆菌 AAT 的活性影响较大,尽管最适反应温度为 50 ℃,但重组 AAT 在该温度下稳定性不佳,20 min 后损失了约 32%的相对酶活。

此外,根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,测得烟草肠杆菌重组 AAT 对色氨酸的  $K_m$  值为 4.42 mmol/L、 $K_{cat}$  值为 20.58 s<sup>-1</sup>。该酶的  $K_{cat}/K_m$  为 4.66 L/(mmol·s),酶的催化效率还有提升空间,后续可对酶

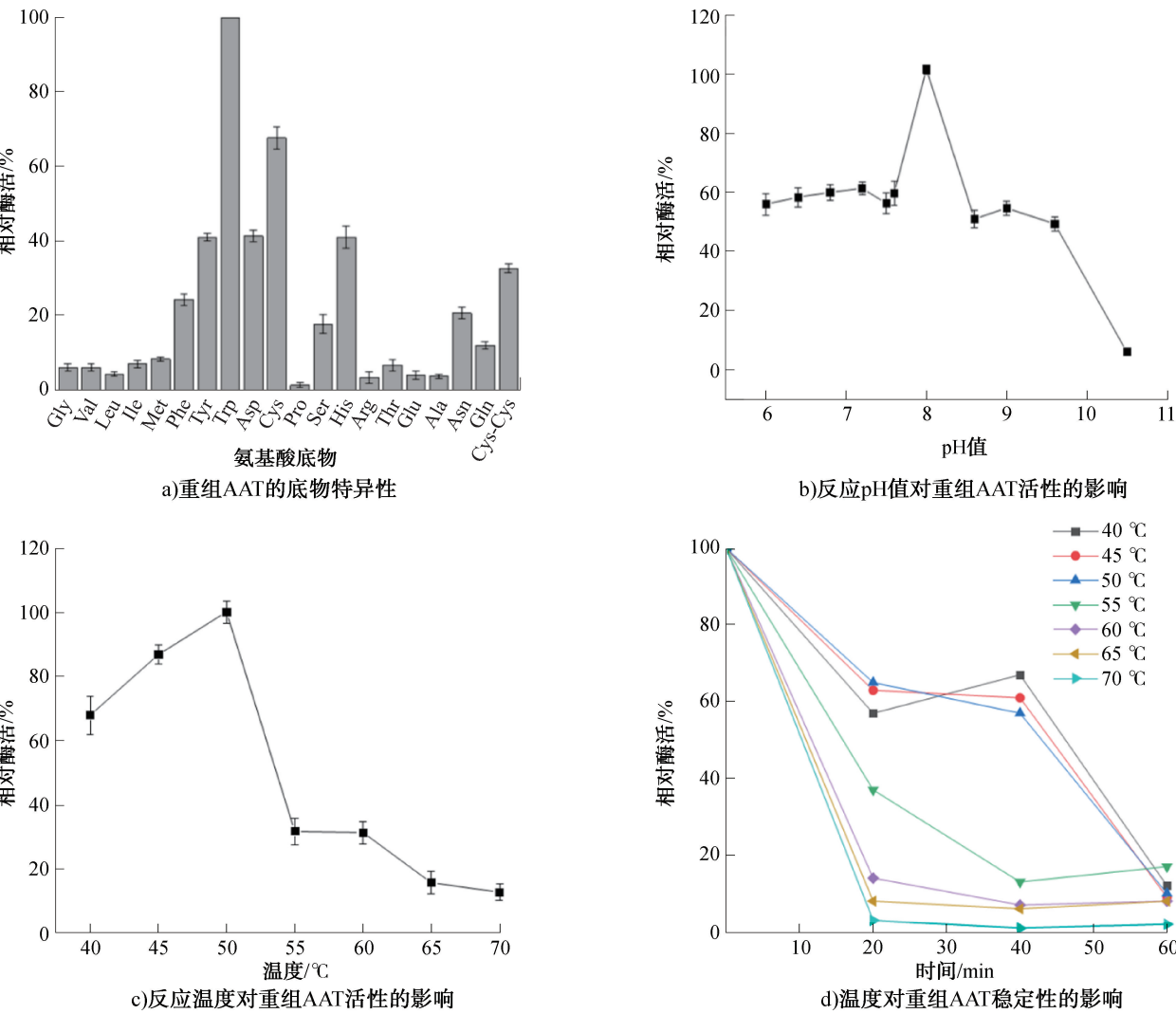


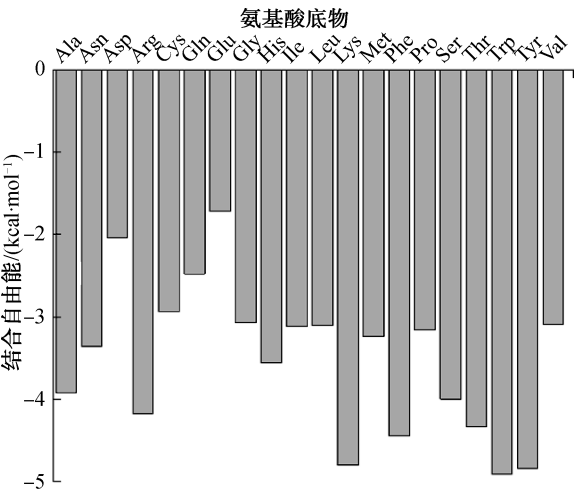
图4 重组AAT的底物特异性和酶学性质  
Fig. 4 Substrate specificity and enzymatic properties of recombinant AAT

分子进行改造以进一步提高该酶的催化效率。

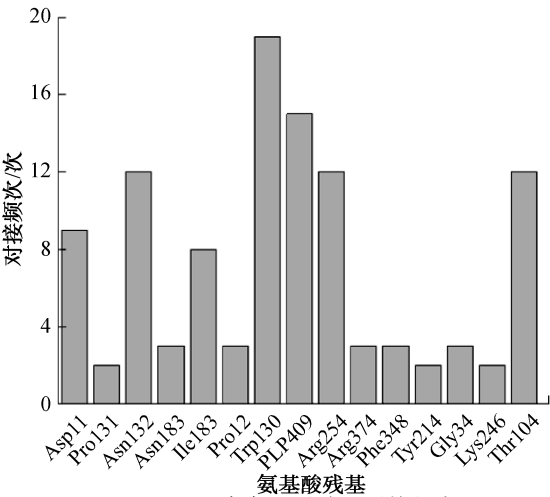
**2.3.2 重组AAT与20种氨基酸分子对接模拟结果** 重组AAT与氨基酸的分子对接结果如图5所示。由图5a)可知,当色氨酸作为底物时,其结合自由能最低为-4.91 kcal/mol,与脱氢酶偶联反应测定结果一致。不同氨基酸残基位点与底物对接频次显示(图5b)), Trp130、Arg254、Asn132、Thr104参与对接次数较多,可能参与酶活性中心的构成。

**2.3.3 有机溶剂、表面活性剂和金属离子对重组AAT活性的影响** 有机溶剂、表面活性剂和金属离子对重组AAT活性的影响见表1。由表1可知,在有机溶剂中,乙醇对酶活性有显著的促进作用,相对酶活为135%;甲醇、丙三醇、正丁醇、异丙醇、正

己烷对酶活性有显著抑制作用,其中,甲醇对重组AAT的抑制作用最大,相对酶活仅为3.7%。在表面活性剂中,tween-20对重组AAT活性的影响不大,但SDS和Triton X-100对重组AAT活性有显著的抑制作用(处理后的相对酶活分别为40.3%和59.0%)。EDTA对重组AAT的活性抑制作用较小,说明该酶不属于金属酶,对金属离子无依赖作用。DTT对重组AAT的活性抑制作用也较小,DTT一般用于破坏蛋白质分子中的二硫键,该结果说明烟草肠杆菌AAT中二硫键的破坏对酶活性影响不大。在多种金属离子中,Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Fe<sup>2+</sup>均对重组AAT的活性表现出不同程度的抑制作用,相对酶活低于30%,但Cu<sup>2+</sup>对重组AAT的活性表现出一定的增强作用,相对酶活为109.7%左右。



a)AAT与氨基酸分子对接结合自由能



b)AAT与氨基酸残基对接频次

图 5 重组 AAT 与氨基酸分子对接结果  
Fig. 5 Molecular docking results of recombinant AAT with amino acids

| 表 1 有机溶剂、表面活性剂和金属离子对重组 AAT 活性的影响                                                                  |             |                  |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|-------------|
| Table 1 Effects of organic reagents, detergents and metal ions on the activity of recombinant AAT |             |                  |             |
| 化学试剂                                                                                              | 相对酶活/%      | 化学试剂             | 相对酶活/%      |
| 甲醇                                                                                                | 3.7 ± 1.5   | EDTA             | 84.7 ± 2.5  |
| 乙醇                                                                                                | 135.0 ± 5.0 | DTT              | 89.7 ± 2.5  |
| 丙三醇                                                                                               | 23.4 ± 2.1  | Cu <sup>2+</sup> | 109.7 ± 2.5 |
| 正丁醇                                                                                               | 53.3 ± 2.1  | Ca <sup>2+</sup> | 84.7 ± 2.5  |
| 异丙醇                                                                                               | 12.7 ± 2.5  | Mg <sup>2+</sup> | 12.0 ± 1.0  |
| 正己烷                                                                                               | 47.3 ± 2.5  | Zn <sup>2+</sup> | 27.3 ± 1.5  |
| Tween-20                                                                                          | 101.3 ± 4.1 | Fe <sup>2+</sup> | 19.7 ± 1.5  |
| Triton X-100                                                                                      | 59.0 ± 3.6  | K <sup>+</sup>   | 70.3 ± 2.5  |
| SDS                                                                                               | 40.3 ± 2.5  | Mn <sup>2+</sup> | 57.3 ± 2.5  |

3 结论

本文对烟草肠杆菌  $\beta 7$  的 AAT 进行了序列分析、同源建模、异源表达和酶学性质表征。结果表明,烟草肠杆菌 AAT 与大肠杆菌氨基转移酶(PDB, 1AAW)具有较高的相似性,烟草肠杆菌 AAT 含有 396 个氨基酸,其酶活性中心关键残基是 Lys246。异源表达的重组 AAT 约为 43 kDa,其最适底物为色氨酸(酶活达 713.3 U/mg),最适反应温度为 50 ℃,最适反应 pH 值为 8.0。此外,烟草肠杆菌 AAT 对乙醇的耐受性良好,且 Cu<sup>2+</sup>可提高其催化活性。后续研究可对烟草肠杆菌的 AAT 酶活性和烟草肠杆菌的代谢工程进行改造,以进一步增强该菌的 IAA 合成能力,为促进植物生长提供更好的根际促生菌资源。

参考文献:

[1] 贾利霞,齐艳华. 生长素代谢、运输及信号转导调控水稻粒型研究进展[J]. 植物学报,2022,57(3):263-275.

[2] 黄申,刘丹阳,张增辉,等. 肠杆菌和不动杆菌混菌发酵提升山东烟叶品质机制研究[J]. 轻工学报,2023,38(1):45-53.

[3] KUMAR G P, SEN S K, KANTI M T. Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015,4(3): 296-303.

[4] 王威, THINZAR T, 张亚, 等. 一株烟草肠杆菌 (*Enterobacter tabaci*) S4 菌株的鉴定及其效果测定[J]. 农业资源与环境学报,2020,37(3):407-412.

[5] 周亚男,韩小斌,魏可可,等. 烟草根际可培养微生物多样性及防病促生菌的筛选[J]. 微生物学通报, 2021,48(12):4649-4663.

[6] EMAMI S, ALIKHANI H A, POURBABAEI A A, et al. Assessment of the potential of indole-3-acetic acid producing bacteria to manage chemical fertilizers application [J]. International Journal of Environmental Research,2019,13(4):603-611.

[7] 朱夜琳. 大肠杆菌中吲哚丙酮酸的代谢工程研究[D]. 合肥:中国科学技术大学,2017.

[8] KOGA J,SYONO K, ICHIKAWA T, et al. Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae* [J]. Biochimica et Biophysica Acta,1994,1209(2):241-247.

[9] STEPANOVA A N, ROBERTSON-HOYT J, YUN J, et al.

TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development [J]. Cell, 2008, 133 (1):177-191.

[10] TAO Y, FERRER J L, LJUNG K, et al. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants [J]. Cell, 2008, 133 (1): 164-176.

[11] DUCA D, LORV J, PATTEN C L, et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014, 106(1):85-125.

[12] 黄泰. 色氨酸代谢产物吲哚-3-丙酮酸通过芳香烃受体通路调节 Th17 细胞/Treg 细胞平衡缓解类风湿关节炎[D]. 合肥:安徽医科大学, 2023.

[13] 杨旭, 李晨飞, 张志平, 等. 烟草肠杆菌 (*Enterobacter tabaci*) $\beta$ 7 发酵优化及菌剂制备[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(17):97-102.

[14] 杨何宝, 郭世奇, 尹守亮, 等. 利用强启动子对纤维二糖酶基因在里氏木霉中进行异源表达[J]. 纤维素科学与技术, 2022, 30(4):39-48, 67.

[15] 徐亚军, 李珂, 刘珂珂, 等. 大豆根瘤内生菌全细胞可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11):159-165.

[16] 宋凤艳, 周超君. 蜂蜜中蛋白质及氨基酸含量的测定[J]. 现代食品, 2016, 22(20):108-110.

[17] NADEEM M S, KHAN J A, ANWAR F. Molecular cloning, *E. coli* expression and characterization of thermostable alanine aminotransferase from *Pyrococcus abyssi* [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2023, 55(2):871-880.

[18] KOPER K, HATAYA S, HALL A G, et al. Biochemical characterization of plant aromatic aminotransferases [J]. Methods in Enzymology, 2023, 680:35-83.

[19] 鞠文君. 转氨酶 yhxA 的可溶表达及其催化性能的改造[D]. 长春:吉林大学, 2019.

Structural prediction, cloning, expression and enzymatic property of aromatic amino acid transaminase from *Enterobacter tabaci*

XU Ruimin, SHAO Hua, LI Chenfei, SHAN Mingming, WEI Tao

College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** To enhance the potential application of aromatic amino acid transaminase (AAT) in the synthesis of auxin (IAA) and promotion of crop growth, bioinformatics methods were applied to analyze and predict the structure of AAT from *Enterobacter tabaci* strain  $\beta$ 7. Then, this AAT was cloned, expressed and purified in *Escherichia coli*, and the enzymatic properties of recombinant AAT were determined. The bioinformatics analysis results revealed that the length of this AAT protein is composed of 396 amino acids. The key residue in the active center of this AAT was Lys246. The molecular weight of the recombinant AAT expressed in *E. coli* was approximately 43 kDa. The optimal substrate for recombinant AAT was tryptophan, at a temperature of 50 °C and a pH value of 8.0. Cu<sup>2+</sup> had a certain activating effect on enzyme activity, and recombinant AAT showed good tolerance to the organic solvent ethanol. These results provided a theoretical basis for the AAT enzyme modification and the construction of high-yield auxin engineering bacteria.

**Key words:** *Enterobacter tabaci*; aromatic amino acid transaminase; auxin; structural prediction; cloning and expression; enzymatic property

[责任编辑:吴晓亭]