

过量表达甲酸脱氢酶提高大肠杆菌合成 L-2-氨基丁酸的效率

李 莹¹, 史红玲^{1,2}, 王 喆¹, 冉璐妮¹, 薛 闯², 唐存多^{1*}

(1. 南阳师范学院 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 河南 南阳 473061; 2. 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 为了实现 L-2-氨基丁酸 (L-ABA) 的高效生物合成, 借助 pACYCDuet-1 和 pET28a 共表达系统, 构建了携带 L-苏氨酸脱氨酶 (L-TD)、L-亮氨酸脱氢酶 (L-L-DH) 和不同活性甲酸脱氢酶 (FDH) 编码基因的重组大肠杆菌, 分别命名为: *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 和 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M。经诱导表达后, L-苏氨酸脱氨酶和 L-亮氨酸脱氢酶在两个重组大肠杆菌中的表达水平基本一致, 而后的甲酸脱氢酶活表达水平为(342.00±9.40) IU/mL, 显著高于前者的(196.00±6.20) IU/mL。在 50 mL 反应体系中, 200 mmol/L L-苏氨酸经 220 r/min、30 °C 下反应 6 h 时, 前者 L-ABA 得率为 71%, 后者为 85%。结果表明, 提高甲酸脱氢酶的表达水平可以显著提高 L-ABA 的合成效率。此外, 优化反应温度后, 在 35 °C 下反应 6 h 时, L-ABA 的得率可达 90%。

关键词: L-2-氨基丁酸; L-苏氨酸; 共表达; 微生物细胞工厂; 全细胞催化; 生物工程

中图分类号: TQ922 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 05-1048-07

Increase of L-2-aminobutyric acid yield via formate dehydrogenase overexpression in *Escherichia coli*

LI Ying¹, SHI Hongling^{1,2}, WANG Zhe¹, RAN Luni¹, XUE Chuang², TANG Cunduo^{1*}

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China; 2. School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract: In order to achieve the efficient biosynthesis of L-2-aminobutyric acid (L-ABA), two recombinant *Escherichia coli* strains carrying L-threonine deaminase (L-TD), L-leucine dehydrogenase (L-L-DH) and different formate dehydrogenases (FDH) encoding genes were established by using a dual plasmid co-expression system of pACYCDuet-1 and pET28a, and named *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* and *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M, respectively. After induction, the expression levels of L-threonine deaminase and L-leucine dehydrogenase in the two recombinant *E. coli* strains were basically the same, while that of formate dehydrogenase in the latter was (342.00±9.40) IU/mL, significantly higher than (196.00±6.20) IU/mL expressed in the former strain. In a 50 mL reaction system with 200 mmol/L L-threonine reacted at 220 r/min and 30 °C for 6 h, the yield of L-ABA was 71% in the former and 85% in the latter. The results showed that formate dehydrogenase overexpression could significantly improve the synthesis efficiency of L-ABA. Moreover, the yield of L-ABA reached 90% when catalyzed at 220 r/min and the optimized temperature of 35 °C for 6 h.

Key words: L-2-aminobutyric acid; L-threonine; co-expression; microbial cell factory; whole cell catalysis; biological engineering

收稿日期: 2022-08-30; 定用日期: 2022-11-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220812

基金项目: 国家自然科学基金(31900916); 河南省青年人才托举工程项目(2021HYTP036); 河南省高校科技创新人才(21HASTIT041)

作者简介: 李 莹(1997—), 女, 硕士生, E-mail: 2983753362@qq.com。联系人: 唐存多(1987—), 男, 副教授, E-mail: tcd530@126.com。

L-2-氨基丁酸(L-ABA)是一种重要的非天然氨基酸,作为重要的药物中间体可用于左乙拉西坦等抗癫痫药物的合成^[1-3]。目前,常用的L-ABA合成工艺有化学合成和生物合成两类。

传统化学合成易形成外消旋体,不利于产物纯化,环境污染严重,因而不宜进行工业化生产。生物合成法主要有生物发酵法、转氨酶法和氨基酸脱氢酶法^[4-5]。生物发酵法主要是对产L-苏氨酸的大肠杆菌进行改造,改造后的菌株能在含质量浓度为30 g/L的葡萄糖培养基中合成质量浓度为5.4 g/L的L-ABA,糖酸转化率有待进一步提高^[6]。转氨酶法是以2-酮丁酸为底物,L-天冬氨酸为氨基供体进行合成,会产生大量的L-丙氨酸副产物,不利于后续的分离。传统氨基酸脱氢酶法受限于氨基酸脱氢酶活性较低,对底物转化率不高,且底物2-酮丁酸本身也不稳定,这会增加底物和酶的消耗,进而增加L-ABA的生产成本^[7-8]。后来,通过逐步引入L-苏氨酸脱氢酶(L-TD)能将廉价的L-苏氨酸转化成2-酮丁酸,然后通过L-亮氨酸脱氢酶(L-L-DH)和甲酸脱氢酶(FDH)进行L-ABA的生物合成,大大提高了合成效率,L-ABA的产率达到了97.3%^[6]。本课题组在前期研究工作中,获得了一系列高活性的L-亮氨酸脱氢酶^[9]和甲酸脱氢酶^[10],前期研究为L-ABA的生物合成及实现L-苏氨酸的转产增值奠定了坚实的基础。本研究拟采用图1所示的合成路线,通过构建含双质粒的重组菌,实现L-苏氨酸脱氢酶、L-亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶3种酶共表达,以实现3酶级联协同催化L-苏氨酸合成L-ABA,进而采用全细胞催化的方法高效合成L-ABA。由于在羰基不对称胺化还原过程中需要消耗还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),因此,该反应偶联了甲酸脱氢酶介导的辅酶再生系统^[11]。此外,已有研究报道强化NADH的再生能力能够显著提高L-苯甘氨酸合成的效率^[10]。

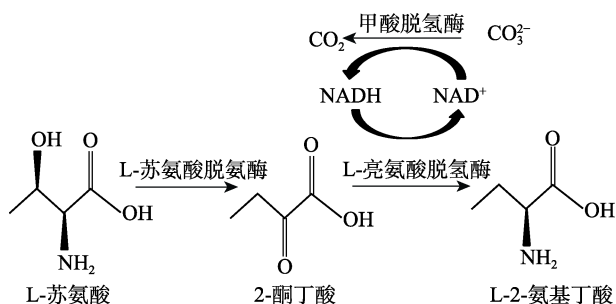


图1 以L-苏氨酸为底物合成L-ABA的路线示意图

Fig. 1 Schematic diagram of synthesis route of L-ABA from L-threonine as substrate

因此,本研究试图借助强化甲酸脱氢酶的表达来调节辅酶再生能力,并考察不同甲酸脱氢酶对

L-ABA生物合成效率的影响。本研究有望实现L-ABA低成本、高效率的生物合成,为L-苏氨酸的转产增值奠定坚实的理论基础。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

L-苏氨酸(HPLC纯度≥99%),北京索莱宝科技有限公司;L-ABA(HPLC纯度99%)、2,4-二硝基氟苯(HPLC纯度98%),上海麦克林生化科技股份有限公司;乙腈、甲醇,色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;辅酶NAD⁺(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸),分析纯,深圳邦泰生物工程有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

FreeZone®冷冻干燥机,美国Labconco公司;DYY-6C型核酸电泳仪,北京市六一仪器厂;Power Pac HC型蛋白电泳仪,美国Bio-Rad公司;EC 2006型高效液相色谱(HPLC)系统,大连依利特分析仪器有限公司;Hypersil C₁₈柱,美国Thermo Scientific公司。

1.1.1 菌株和质粒

Escherichia coli BL21 (DE3)、携带高活性甲酸脱氢酶CbFDH和CbFDH^M基因的重组大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-CbFDH和*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-CbFDH^M菌株由本课题组构建和保藏^[10,12]。其中,与CbFDH相比,CbFDH^M含有S23C/E53V/E202D/E325Q/L184V/K328V共6个位点的突变。重组大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-EsLeuDH^[13]由许建和教授馈赠,表达质粒pACYCDuet-1由本课题组保藏。

1.1.2 培养基

LB培养基:液体培养基添加(均为质量浓度)10 g/L蛋白胨、10 g/L氯化钠和5 g/L酵母提取物,固体培养基则需额外添加20 g/L琼脂粉,自然pH,121 °C灭菌20 min,用于大肠杆菌的培养。

1.2 方法

1.2.1 重组菌的构建

从National Center for Biotechnology Information (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索到一个大肠杆菌来源的L-苏氨酸脱氢酶EcTD(GenBank: NP_418220.1),其对应基因的序列号为: NC_000913.3:3955331-3956875。根据此序列设计扩增EcTD的特异性引物EcTD-F: CGGGATCCGATGGCTGACTCGCAACCC(含BamH I酶切位点)和EcTD-R: CCCAAGCTTCTAACCCGCCAAAAGAAC(含Hind III酶切位点),并委托苏州弘讯生物技术有限公司进行合成。以*E. coli* BL21 (DE3)的基因组DNA为模板,利用特异性引物EcTD-F和EcTD-R进行聚合酶链式反应(PCR)扩增EcTD的编码基

因, 然后按图 2 所示的流程分别获得 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*-*EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 和 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*-*EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M 重组菌。将上述重组菌在无抗 LB 培养基上连续培养 10 次, 然后接种至同时含卡拉霉素和氯霉素的 LB 培养基上培养, 观察生长情况, 以双重抗性筛选方法来考察重组菌携带质粒的遗传稳定性^[14]。

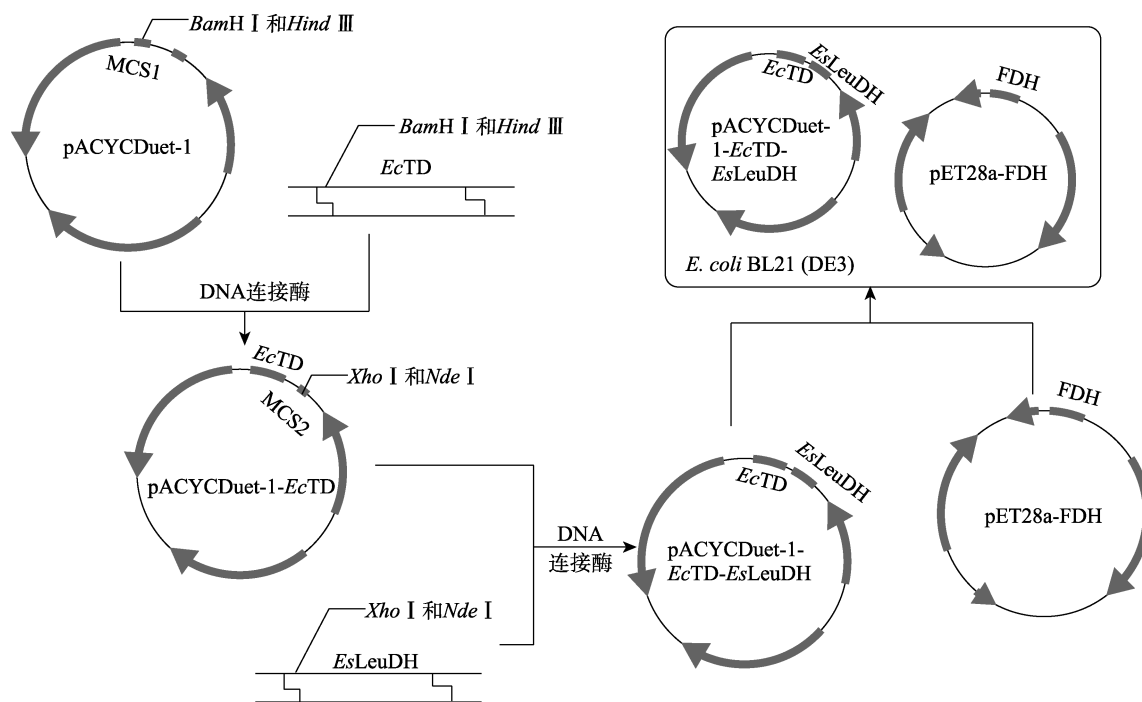
1.2.2 重组大肠杆菌诱导方法

为了降低包涵体的产生, 提高可溶性表达效率, 本研究采取低温诱导的策略对上述重组大肠杆菌进行诱导表达。分别将 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*-*EsLeuDH*、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*-*EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*-*EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M、*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*CbFDH*、*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*EsLeuDH* 单菌落接种到试管 LB 液体培养基中, 培养 12~14 h 后, 按体积分数 2% 接种量

转接至 100 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀=0.6 左右 (其中, OD₆₀₀ 是指在波长 600 nm 处的吸光度), 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 后进行 16 °C 低温诱导。收集诱导后的菌体, 一部分用 10 mL 100 mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) 重悬后进行超声破碎, 然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析^[15]。另一部分采用冻干机在 -40 °C 下进行重组大肠杆菌的菌体冻干, 将获得的冻干的重组大肠杆菌用于全细胞催化 L-苏氨酸合成 L-2-氨基丁酸。

1.2.3 酶活测定方法

取上清液参照文献[16-17]测定各重组酶的酶活。以 L-苏氨酸为底物构建体系测定 *EcTD* 的酶活, 酶活定义为 1 min 内生成 1 μmol 2-酮丁酸所需的酶量为 1 IU。以 2-酮丁酸为底物测定 *EsLeuDH* 的酶活, 酶活定义为在 1 min 内消耗 1 μmol 辅酶 NADH 所需的酶量为 1 IU。以甲酸钠为底物测定 *CbFDH* 的酶活, 酶活定义为 1 min 内生成 1 μmol NADH 所需的酶量为 1 IU。



注: MCS1 和 MCS2 分别为表达质粒 pACYCDuet-1 的克隆位点 1 和克隆位点 2; *EcTD* 为 L-苏氨酸脱氨酶; *BamH* I、*Hind* III、*Xho* I 和 *Nde* I 为 4 种不同的限制性内切酶

图 2 构建重组质粒及重组大肠杆菌的示意图

Fig. 2 Schematic diagram of constructing recombinant plasmids and recombinant *E. coli* strains

1.2.4 重组大肠杆菌全细胞转化 L-苏氨酸合成 L-ABA

在 250 mL 三角瓶中构建 50 mL 反应体系, 体系包括: 200 mmol/L L-苏氨酸、200 mmol/L 甲酸铵、0.75 mmol/L 辅酶 NAD⁺、50 mg 冻干的重组大肠杆菌和适量的玻璃珠, 并于 30 °C、220 r/min 条件下振荡反应 12 h, 期间间隔 2 h 取 1 mL 转化液并高速

离心, 将上清液稀释适当倍数后用 0.22 μm 有机系滤膜进行过滤, 用 HPLC 检测转化液中 L-ABA 的含量, 并绘制 L-ABA 得率与时间的关系曲线。

1.2.5 不同温度对合成 L-ABA 的影响

为了考察不同温度下全细胞催化 L-苏氨酸合成 L-ABA 的合成效率, 结合实际生产中较易达到的温

度范围, 参照 1.2.4 节反应体系, 测定了 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*-*EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH^M* 细胞在 25、30 和 35 °C 下合成 L-ABA 的情况, 并绘制不同温度下 L-ABA 得率与时间的关系曲线。

1.2.6 底物和产物的检测

对底物 L-苏氨酸、产物 L-ABA 进行普通 C₁₈ 柱的 HPLC 分析, 通过柱前衍生测定^[4,17], HPLC 色谱柱为 Thermo Hypersil C18 柱, 检测波长为 360 nm, 室温, 流动相 A [V(去离子水): V(乙腈)=1:1] 与流动相 B (pH=6.4 的 0.05 mol/L 乙酸钠水溶液), 按照表 1 的洗脱梯度进行梯度洗脱, 设定流速为 1 mL/min。用超纯水将 L-ABA 标准品配成 1、3、5、7、9 mmol/L 溶液, 进行柱前衍生化反应, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后, 取 10 μL 进行 HPLC 分析, 将各个浓度 L-ABA 的峰面积与各个浓度进行线性拟合获得回归方程及相关系数。待检样品产物按照同样的色谱条件进行柱前衍生 HPLC 分析, 可以由回归方程结合所测峰面积计算出相应的样品浓度。

表 1 HPLC 洗脱梯度
Table 1 HPLC elution gradients

序号	时间/min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%
1	0	16	84
2	0	16	84
3	2.4	30	70
4	4.2	34	66
5	7.2	43	57
6	13.3	55	45
7	15.0	55	45
8	20.4	98	2
9	21.3	16	84
10	30.0	16	84

在上述分析条件下, L-ABA 标准品的保留时间约为 16.37 min, 将与不同浓度 (x , mmol/L) 的 L-ABA 标准品相对应的峰面积 (y) 进行线性拟合, 获得标准曲线, 得出 L-ABA 浓度相应的回归方程为 $y=760.05x-743.22$, 相关系数 (R^2) 为 0.9907, 该结果表明, 在上述 HPLC 分析条件及 L-ABA 浓度范围下, L-ABA 浓度与其相应的峰面积呈现出良好的线性关系, 因此, 利用此法可以得到 L-ABA 得率。同样条件下对底物 L-苏氨酸进行 HPLC 分析, 得到 L-苏氨酸的保留时间约为 12.49 min。由此可见, L-苏氨酸的保留时间比 L-ABA 的保留时间约短 4 min, 结果表明, 在该色谱条件下能够实现 L-苏氨酸与 L-ABA 的良好分离, 该色谱方法能够用于催化产物的分析鉴定。

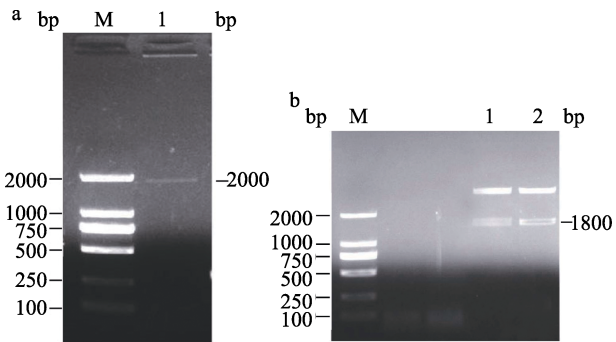
1.2.7 数据统计及图表绘制方法

本文中的图片均用 Adobe Photoshop CS 8.0 软件进行处理, 借助 Origin 9 完成数据分析及处理。

2 结果与讨论

2.1 重组大肠杆菌的构建

按照重组菌的构建方法将质粒 pACYCDuet-1 与 *EcTD* 编码基因的 PCR 扩增产物同时进行双酶切, 将酶切后的 *EcTD* 和 pACYCDuet-1 连接并热激转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞, 在含氯霉素的 LB 平板上筛选获得重组菌。挑取重组菌用通用引物进行 PCR 检测, 结果如图 3a 所示, 检测片段大小约 2000 bp, 与预期相符。进一步提取质粒进行双酶切验证, 结果如图 3b 所示, 表明双酶切后能够释放出与目的片段长度一致的片段, 约为 1800 bp。将经 PCR 检测和双酶切验证的重组菌送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。结果表明, 编码 *EcTD* 的序列及该序列在表达载体上的插入位置与预期的结果相符, 表明已成功构建 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD* 重组菌。



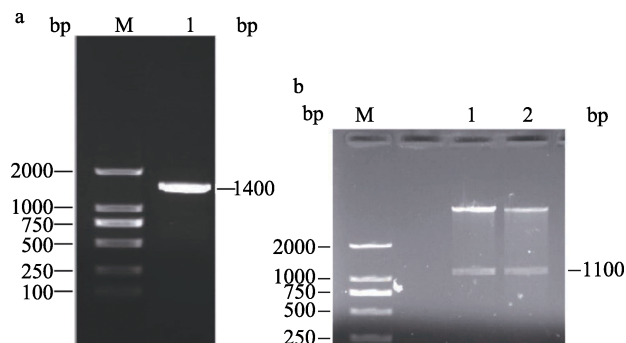
注: M 为 DNA 标记; 图 3a 中 1 为重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD* 的菌液 PCR 检测泳道; 图 3b 图中 1、2 分别为重组质粒 pACYCDuet-1-*EcTD* 的双酶切验证泳道

图 3 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD* 重组菌的菌液 PCR 检测 (a) 及双酶切验证 (b)

Fig. 3 PCR detection (a) and double enzyme digestion verification (b) of *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD* recombinant strain

同样, 将重组质粒 pACYCDuet-1-*EcTD* 和 *EsLeuDH* 基因的 PCR 扩增产物同时进行双酶切, 将酶切后的 *EsLeuDH* 和 pACYCDuet-1-*EcTD* 连接并热激转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞, 同样在含氯霉素的 LB 平板上筛选获得重组菌。挑取阳性重组菌用通用引物进行 PCR 检测, 结果如图 4a 所示, 片段大小约 1400 bp, 与预期相符。进一步提取质粒进行双酶切验证, 结果如图 4b 所示, 双酶切后能够释放出与 *EsLeuDH* 长度一致的目的片段, 大小约为 1100 bp。将经 PCR 检测和酶切验证的重组菌送至生工

生物工程(上海)股份有限公司进行测序,结果表明, *EsLeuDH* 的序列及其在载体上的插入位置与预期一致,表明已成功构建 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH* 重组菌。



注: M 为 DNA 标记;图 4a 中 1 为重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH* 的菌液 PCR 检测泳道;图 4b 图中 1、2 分别为重组质粒 pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH* 的双酶切验证泳道

图 4 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH* 重组菌的菌液 PCR 检测 (a) 及双酶切验证 (b)

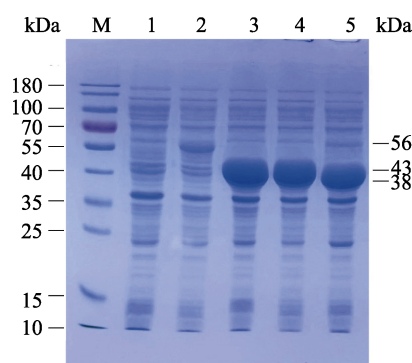
Fig. 4 PCR detection (a) and double enzyme digestion verification (b) of *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*

最后,分别将 pET28a-*CbFDH* 质粒和 pET28a-*CbFDH^M*质粒与 pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH* 质粒同时转化至 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞,经卡拉霉素和氯霉素双抗性筛选,获得 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 和 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH^M*重组菌。重组菌生长状况良好,表明该重组菌能够用于后续的全细胞催化研究。

2.2 重组大肠杆菌的诱导表达及鉴定

分别将 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1、*E.*

coli BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*、*E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH^M*、*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*CbFDH*、*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*EsLeuDH* 重组菌按照 1.2.2 节方法进行诱导表达,将诱导离心后的菌液经重悬破碎后进行 SDS-PAGE 及酶活分析。SDS-PAGE 的结果如图 5 所示。由图 5 可见, *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 的裂解上清液在 56 和 38~43 kDa 处有明显的特异性条带,理论上分别与 *EcTD*、*EsLeuDH* 和 *CbFDH* 的相对分子质量一致,表明 3 个目标酶均已成功实现表达。



注: M 为蛋白标记;1 为 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1;2 为 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD*;3 为 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*;4 为 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*;5 为 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH^M*

图 5 重组大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis for the expression products of recombinant *E. coli* strains

各重组菌的酶活测定结果如表 2 所示。

表 2 各重组菌的酶活分析
Table 2 Enzyme activity analysis of each recombinant

重组菌	L-TD/(IU/mL)	L-LDH/(IU/mL)	FDH/(IU/mL)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pACYCDuet-1	246.00 ± 7.40	—	—
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pACYCDuet-1- <i>EcTD</i>	5046.00 ± 16.20	—	—
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pACYCDuet-1- <i>EcTD-EsLeuDH</i>	4985.00 ± 12.50	182.00 ± 5.30	—
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET28a- <i>CbFDH</i>	265.00 ± 7.80	—	212.00 ± 6.70
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET28a- <i>EsLeuDH</i>	258.00 ± 6.98	226.00 ± 6.50	—
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pACYCDuet-1- <i>EcTD-EsLeuDH</i> : pET28a- <i>CbFDH</i>	4680.00 ± 10.60	174.00 ± 4.60	196.00 ± 6.20
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pACYCDuet-1- <i>EcTD-EsLeuDH</i> : pET28a- <i>CbFDH^M</i>	4635.40 ± 9.70	182.00 ± 5.50	342.00 ± 9.40

注: “—” 表示没有显示出该酶的酶活。

由表 2 可知,在 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 的细胞裂解液中同时检测到了 *EcTD*、*EsLeuDH* 和

CbFDH 的活性,其分别为 (4680.00±10.60)、(174.00±4.60)和(196.00±6.20) IU/mL,3 种酶共表达时的酶活略低于它们单独表达时的酶活。同时也发现,

L-苏氨酸脱氨酶在大肠杆菌中存在一定量的本底表达,但其表达水平远远低于重组质粒的诱导表达水平。另外, *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M 中的甲酸脱氢酶酶活达到了(342.00±9.40) IU/mL,显著高于 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 的表达水平 [(196.00±6.20) IU/mL]。结合前期报道的结果, *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M 中甲酸脱氢酶酶活水平的显著提高主要归因于 *CbFDH*^M 比酶活的提高^[10]。酶活测定结果更进一步表明,构建双质粒共表达系统成功构建了能实现 *EcTD*、*EsLeuDH* 和 *CbFDH* 3 个目标酶同时表达的微生物细胞工厂,且具有催化 L-苏氨酸合成 L-ABA 的潜力。

此外,为了进一步比较这些重组酶的酶学特性,进而初步探索各重组大肠杆菌合成 L-ABA 效率差异的机制,本文基于课题组前期的研究及已报道的文献进行了总结对比,结果如表 3 所示。

表 3 各重组酶的代表性酶学特性

Table 3 Representative enzymatic characteristics of each recombinant enzyme

酶	K_m /(mmol/L)	K_{cat}/s^{-1}	K_{cat}/K_m [(L/(s·mmol))]	参考文献
<i>EcTD</i>	3.54	2.49	0.70	[16]
<i>EsLeuDH</i>	0.91	0.30	0.32	[18]
<i>CbFDH</i>	52.40	3.20	0.06	[10,12]
<i>CbFDH</i> ^M	40.10	9.60	0.24	[10,12]

注: K_m 为酶促反应速度达到最大反应速度一半时所对应的底物浓度,是酶的特征常数之一, mmol/L; K_{cat} 为催化常数 (s^{-1}), 又叫做转换数 (TN 值, mmol/L), K_{cat} 越大, 表示酶的催化效率越高; K_{cat}/K_m 为酶专一性常数或对不同底物的优先权的一种衡量 [(L/(s·mmol))], 当两种底物以相同浓度竞争同一种酶的活性部位时, 其转变成产物的速率比是与它们的 K_{cat}/K_m 相等。

由表 3 可知, *CbFDH*^M 的催化常数显著高于 *CbFDH* 的催化常数, 因此, 在相同蛋白表达水平的情况下, *CbFDH*^M 也能表现出更高的催化活性, 体现出更强的辅酶再生能力, 在合成 L-ABA 的过程中也会更具潜力。

2.3 重组大肠杆菌全细胞催化 L-苏氨酸合成 L-ABA

2.3.1 不同甲酸脱氢酶对 L-ABA 合成的影响

按照全细胞催化法进行 L-苏氨酸的生物转化。对 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 和 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M 的催化产物取样, 经离心后进行 HPLC 分析, 结果见图 6。

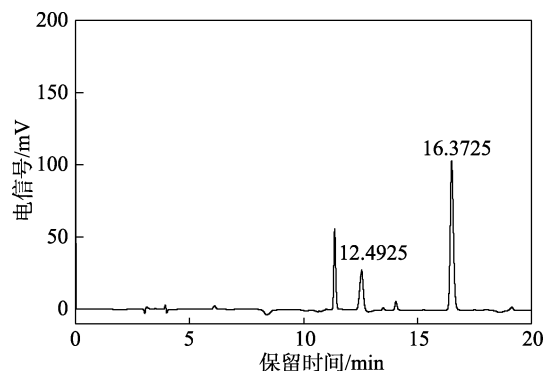


图 6 反应产物的 HPLC 谱图

Fig. 6 HPLC spectrum of reaction product

在 16.3725 和 12.4925 min 处明显有特征峰存在, 这与相同 HPLC 分析条件下 L-ABA 和 L-苏氨酸的保留时间一致, 且前者的峰面积明显大于后者, 表明在该催化条件下, 实现了对 L-苏氨酸的大部分转化。而 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1 的催化产物仅在 12.4925 min 处有明显的特征峰, 表明该重组菌没有将 L-苏氨酸转化成 L-ABA 的能力。

按 1.2.4 节实验方法, 在不同时间取样分析、计算各时间节点产物的得率, 结果如图 7 所示。

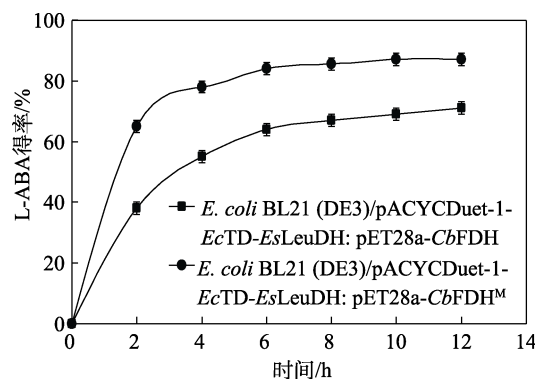


图 7 不同甲酸脱氢酶对 L-ABA 得率的影响

Fig. 7 Effect of different formate dehydrogenases on L-ABA yield

由图 7 可知, 当时间为 6 h 时, 反应基本达到平衡状态, L-ABA 得率基本不再随时间的变化而变化。此外, 携带更高活性甲酸脱氢酶的重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M 的催化活性明显高于 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*。反应 6 h 时, 前者的得率为 85%, 而后者的得率仅为 71%, 强化后的重组大肠杆菌较未强化的得率提高 14%, 表明通过增强甲酸脱氢酶的表达水平, 可显著提高 NADH 的再生能力, 进而能显著提高 L-ABA 的合成效率。

2.3.2 不同温度对 L-ABA 合成的影响

为了进一步提高 L-ABA 的合成效率, 按 1.2.5 节实验方法考察了反应温度对 L-ABA 得率的影响,

结果如图 8 所示。

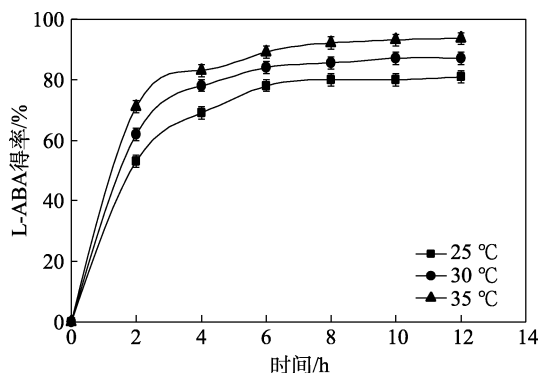


图 8 不同反应温度对 L-ABA 得率的影响

Fig. 8 Effect of different reaction temperatures on L-ABA yield

由于在实际生产中, 25~35 °C 的温度范围相对较为温和, 较易达到, 因此, 本研究所考察的温度为 25、30 和 35 °C。由图 8 可见, 在这 3 个温度下, 温度越高, L-ABA 得率也越高, 这也符合一般酶促反应的规律。在 35 °C 下反应 6 h 时, L-ABA 的得率达到 90%, 时空产率可以达到 3.09 g/(L·h)。

上述这些结果充分验证了前期提出的强化甲酸脱氢酶的表达水平能显著提高 L-ABA 合成效率的假设。值得思考的是, 与前人报道的 L-ABA 的时空产率 [5.02 g/(L·h)]、得率 (95%) 相比^[18], 本研究中甲酸脱氢酶的表达水平虽已显著提高, 但 L-ABA 的得率和时空产率仍然偏低。经分析比较, 这可能归因于本研究所构建的重组菌所产 L-亮氨酸脱氢酶的活性仍然不够, 在本研究中 L-亮氨酸脱氢酶的表达水平还不及甲酸脱氢酶的水平, 因此, 在下一步研究中仍需对 L-亮氨酸脱氢酶的表达水平进行深度强化。此外, 通过反应进程曲线可以明显看出, 催化反应在前 2 h 比较迅速, 后期产物增长比较缓慢, 且难以达到前人报道的 99% 的转化率^[6,19]。经过对比分析, 本研究反应所用的转速明显低于前人设定的 600 r/min^[19], 尽管已经添加了一定量的玻璃珠, 一定程度上可以提高传质效果, 但随着反应的进行, 胞外 L-苏氨酸的浓度逐渐降低, 底物可能会难以进入胞内, 而胞外 L-ABA 又不断积累, 产物会更难以从胞内释放出来, 这可能会大大限制后续反应的催化效率。

另外, 本研究还发现, 大肠杆菌中 L-苏氨酸脱氢酶的本底水平较高, 为 (246.00±7.40) IU/mL, 在本研究的反应路线中, L-苏氨酸脱氢酶不是限速酶。相反, L-苏氨酸脱氢酶的过量表达可能还会降低其他两个关键酶的表达, 进而影响 L-ABA 总体合成效率。因此, 在下一步的研究中, 可以考虑将克隆 L-苏氨酸脱氢酶的多克隆位点换成 L-亮氨酸脱氢酶, 提高关键酶的表达效率, 或者过表达 L-苏氨酸转运蛋

白, 以提高底物的跨膜效率, 进而进一步提高 L-ABA 的合成效率, 降低其合成成本, 以实现其工业化生产。

3 结论

(1) 成功构建了 2 个能够同时表达 L-苏氨酸脱氢酶、L-亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶 3 种酶的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH* 和 *E. coli* BL21 (DE3)/pACYCDuet-1-*EcTD-EsLeuDH*: pET28a-*CbFDH*^M。两种重组菌均能成功同时表达 L-苏氨酸脱氢酶、L-亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶, 且后者的甲酸脱氢酶酶活表达水平显著高于前者。

(2) 两种重组菌在 50 mL 反应体系中, 200 mmol/L L-苏氨酸经 220 r/min、30 °C 下反应 6 h 时, L-ABA 的得率分别为 71% 和 85%, 表明通过强化甲酸脱氢酶的表达水平能够显著提高 L-ABA 的合成效率。

(3) 对反应温度进行优化后, L-ABA 的得率可以达到 90%, 时空产率可以达到 3.09 g/(L·h)。

(4) 尽管本研究实现了 L-ABA 的生物合成, 但与前人报道的 L-ABA 的时空产率 [5.02 g/(L·h)]、得率 (95%) 相比, 仍然偏低。本研究也发现, 该反应的限速酶应该是 L-亮氨酸脱氢酶, 下一步的研究中应继续强化 L-亮氨酸脱氢酶的表达, 同时对 L-苏氨酸脱氢酶的表达可以适当减弱。

参考文献:

- [1] RAONI S B G, EMERSON T D S, VINICIUS N D S M. An environmentally friendly, scalable and highly efficient synthesis of (S,S)-ethambutol, a first line drug against tuberculosis[J]. *Letters in Organic Chemistry*, 2015, 12(7): 478-481.
- [2] BAI G Y (白国义), CHEN L G (陈立功), XING P (邢鹏), *et al.* Synthesis of ethambutol[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2004, 21(12): 943-945.
- [3] SHIN J S, KIM B G. Transaminase-catalyzed asymmetric/letric synthesis of L-2-aminobutyric acid from achiral reactants[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(10): 1595-1599.
- [4] LI J Q (李建强). Study on L-2-aminobutyric acid production by recombinant *Escherichia coli*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (浙江工业大学), 2019.
- [5] KE C R, YANG X W, RAO H X, *et al.* Whole-cell conversion of L-glutamic acid into gamma-L-2-aminobutyric acid by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5: 591.
- [6] FU Y (付妍), ZHANG J X (张君轩), FU X R (付雪蓉), *et al.* Production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine catalyzed by three enzyme cascade[J]. *Journal of Biological Engineering (生物工程学报)*, 2020, 36(4): 782-791.
- [7] GALKIN A, KULAKOVA L, YOSHIMURA T, *et al.* Synthesis of optically active aminoacids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4651-4656.
- [8] TAO R S, JIANG Y, ZHU F Y, *et al.* A one-pot system for production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine by L-threonine deaminase and a NADH-regeneration system based on L-leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(4): 835-841.

(下转第 1072 页)