

• 生物技术与方法 •

三酶级联催化 L-苏氨酸生产 L-2-氨基丁酸

付妍^{1,2}, 张君轩^{1,2}, 付雪蓉^{1,2}, 解雨晨^{1,2}, 任泓宇^{1,2}, 刘佳¹, 陈修来¹, 刘立明^{1,2,3}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

付妍, 张君轩, 付雪蓉, 等. 三酶级联催化 L-苏氨酸生产 L-2-氨基丁酸. 生物工程学报, 2020, 36(4): 782–791.

Fu Y, Zhang JX, Fu XR, et al. Production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine using a trienzyme cascade. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 782–791.

摘要: L-2-氨基丁酸 (L-ABA) 是一种重要的化工原材料和手性医药中间体, 为了实现 L-ABA 的高效生产, 本研究在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中分别表达大肠杆菌来源的苏氨酸脱氨酶 (Threonine deaminase, TD)、苏云金芽孢杆菌来源的亮氨酸脱氢酶 (Leucine dehydrogenase, LDH) 和博伊丁假丝酵母来源的甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase, FDH), 构建体外级联酶催化反应实现 L-苏氨酸向 L-ABA 的转化, 体系中 TD、LDH 和 FDH 添加最适比例为 1:1:0.2。为了简化生产工艺, 将 3 种酶在一株菌 *E. coli* 3FT+L 中共表达并实现上述配比, 在 30 L 发酵罐中用 *E. coli* 3FT+L 全细胞转化 12 h, L-ABA 的产量为 68.5 g/L, 底物 L-苏氨酸的摩尔转化率达到 99.0%。该工艺路线绿色高效, 为未来大规模生产 L-ABA 提供借鉴。

关键词: L-2-氨基丁酸, 三酶级联, 共表达重组菌, 全细胞转化, L-苏氨酸

Production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine using a trienzyme cascade

Yan Fu^{1,2}, Junxuan Zhang^{1,2}, Xuerong Fu^{1,2}, Yuchen Xie^{1,2}, Hongyu Ren^{1,2}, Jia Liu¹, Xiulai Chen¹, and Liming Liu^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-2-aminobutyric acid (L-ABA) is an important chemical raw material and chiral pharmaceutical intermediate. The aim of this study was to develop an efficient method for L-ABA production from L-threonine using a trienzyme cascade route with Threonine deaminase (TD) from *Escherichia coli*, Leucine dehydrogenase (LDH) from *Bacillus thuringiensis* and

Received: June 14, 2019; **Accepted:** June 24, 2019

Supported by: The Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province (No. BE2018623), The Key Field R & D Program of Guangdong Province (No. 2019B020218001), The National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-08).

Corresponding authors: Liming Liu. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn

江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2018623), 广东省重点领域研发计划 (No. 2019B020218001), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-08) 资助。

Formate dehydrogenase (FDH) from *Candida boidinii*. In order to simplify the production process, the activity ratio of TD, LDH and FDH was 1:1:0.2 after combining different activity ratios in the system *in vitro*. The above ratio was achieved in the recombinant strain *E. coli* 3FT+L. Moreover, the transformation conditions were optimized. Finally, we achieved L-ABA production of 68.5 g/L with a conversion rate of 99.0% for 12 h in a 30-L bioreactor by whole-cell catalyst. The environmentally safe and efficient process route represents a promising strategy for large-scale L-ABA production in the future.

Keywords: L-2-aminobutyric acid, trienzyme cascade, co-expressed recombinant bacteria, whole-cell catalyst, L-threonine

L-2-氨基丁酸 (L-ABA) 作为一种非天然氨基酸和重要的医药中间体, 广泛应用于药物合成领域, 如抑菌抗结核药物盐酸乙胺丁醇^[1-2]、新型抗癫痫药物左乙拉西坦和布瓦西坦^[3]等。L-ABA 合成方法包括化学法和生物法。化学法主要采用酮丁酸还原法^[4]、脱硫反应法^[5]、卤代氨解法^[6-7]、化学拆分法^[8], 但缺点是易形成消旋体, 不利于手性化合物的合成, 且反应条件严苛、环境污染严重、不易进行工业化生产。生物法因反应条件温和、立体选择性高和绿色环保等特点而广受关注, 其中生物发酵法是对生产 L-苏氨酸的大肠杆菌 *Escherichia coli* 进行代谢改造, 在含有 30 g/L 葡萄糖的培养基中合成 5.4 g/L 的 L-ABA^[9]。另一方法是生物酶催化法, 包括脲水解酶法、转氨酶法和氨基酸脱氢酶法等。脲水解酶法是以 DL-氨基丁脲为底物, 直接水解 L-氨基丁脲获得 L-ABA, 或通过脲水合酶结合 L-氨基酸酰胺酶将 L-氨基丁脲转化成 L-ABA^[10]。转氨酶法是以 2-酮丁酸 (2-OBA) 及提供氨基供体的 L-天冬氨酸或 L-谷氨酸等为底物, 通过氨基转移酶或者氨基酸脱氢酶制备 L-ABA, 这一方法缺点是副产物草酰乙酸容易脱羧得到丙酮酸, 进而生成副产物 L-丙氨酸, 不利于后续分离纯化^[11-12]。L-氨基酸脱氢酶法是借助于中间型高温放线菌 *Thermoactinomyces intermedius* 的亮氨酸脱氢酶 (LDH) 将 2-OBA 转化为 36 g/L L-ABA, 产率达到 88%^[12]。但由于 2-OBA 成本高且不稳定, 因此, 研究人员利用苏氨酸脱氢酶(TD) 将较为廉价的 L-苏氨酸转化为生产 2-OBA, 在此基础上通过过量表达 LDH 和

辅酶 NADH 再生用酶甲酸脱氢酶 (FDH), 高效制备 L-ABA。如 Tao 等^[13]在 *E. coli* BL21 (DE3) 中分别过表达 TD、LDH、FDH, 转化体系中需要同时添加 3 种湿菌体, 采用“一锅法”在 30 L 转化体系中将 30 mol L-苏氨酸转化为 29.2 mol L-ABA, 产率为 97.3%。

脱氢酶法具有底物成本低廉和反应不可逆等优点, 但是上述研究的催化体系中通常需要添加多种酶液, 并进行酶活优化配比^[12-13], 增加了工艺的复杂性和生产成本, 若将 TD、LDH 和 FDH 这 3 种酶在单一细胞中表达, 可以简化生产工艺便于对反应条件进行精确调整和优化。本研究利用 TD、LDH 和 FDH 构建了体外催化 L-苏氨酸生产 L-ABA 的级联路径, 在 *E. coli* BL21 中对 3 种酶共表达方式进行优化, 构建了重组菌株 *E. coli* 3FT+L, 实现三酶的协调稳定表达, 并对转化体系进行优化, 最终实现了 L-ABA 的高效生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究使用的质粒 pET28a、pETDuet、pRSFDuet 均购自 Novagen 公司, 使用的菌株见表 1。

1.1.2 实验试剂

分子生物学工具酶、SDS-PAGE Protein Marker、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒等分子生物学试剂购自 TaKaRa 有限公司; 2-OBA 和 L-ABA 标准品购自 Sigma 公司; 异丙基-β-D-硫代

半乳糖 (IPTG)、硫酸卡那霉素 (Kan)、氨苄青霉素 (Amp) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其余常规试剂购自国药集团。

1.2 方法

1.2.1 重组菌株的构建

使用特异性引物分别从不同微生物中克隆编码 TD、LDH 和 FDH 的目的基因, 限制内切酶双酶切目的条带, 然后连接于同样双酶切的表达载体 pET28a 获得重组质粒, 将构建完成质粒导入 *E. coli* BL21 (DE3) 后获得基因工程菌株。

构建共表达菌株时, 从苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 基因组中克隆编码 LDH 的基因 *leuB*, 连接于高拷贝质粒 pRSFDuet, 构建重组质粒 pRSFDuet-*BtleuB*; 将博伊丁假丝酵母 *Candida boidinii* 来源的 *fdh* 基因连接于 pETDuet, 构建重组质粒 pETDuet-*Cbfdh*, 从 *E. coli* K12 基因组中克隆编码 TD 的基因 *ilvA* 连接于质粒 pETDuet-*fdh*, 构建重组质粒 pETDuet-*fdh-EcilvA*, 将上述两种重组质粒导入 *E. coli* BL21 (DE3), 在含有 Amp 和 Kan 的平板上筛选阳性克隆, 得到双质粒共表达菌株 *E. coli* FT+L。

E. coli FT+L 菌株中重复表达 *fdh* 基因, 即在 pETDuet-*fdh-EcilvA* 质粒上分别通过一步克隆试剂盒连接不同个数的 *fdh* 基因构建质粒 pETDuet-2*fdh-EcilvA*、pETDuet-3*fdh-EcilvA* 和 pETDuet-4*fdh-EcilvA*。

1.2.2 培养基与培养方法

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 用于质粒的构建、扩增和种子液的培养。

TB 培养基: 甘油 4 g/L, 胰蛋白胨 12 g/L, 酵母粉 24 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L, 用于重组菌株发酵培养。

补料培养基: 甘油 500 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 g/L。

种子培养条件: 从斜面保藏培养基中接一环

菌种至 25 mL LB 培养基中, 根据重组菌选择压力添加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 或 Amp, 37 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。

摇瓶培养与诱导条件: 取 1 mL 的种子培养液接种于 25 mL TB 培养基中, 根据重组菌选择压力添加 100 mg/L Kan 或 Amp, 37 °C、200 r/min 培养 OD_{600} 至 0.6 时, 添加 100 mg/L 的 IPTG 于 25 °C 下诱导 8–12 h。

发酵罐培养与诱导条件: 将种子液按照 5% 接种量转接于发酵罐, 初始发酵温度 37 °C、500 r/min 下培养至 OD_{600} 为 12–14 时, 溶氧突然上升, 此时开始流加补料培养基, 通过补料控制溶氧水平在 30%–40%, 当 OD_{600} 在 25 左右时, 添加 5 g/L 的乳糖于 25 °C 下诱导, 总发酵周期 24 h, 发酵结束后发酵液经 4 °C 离心收集菌体。

1.2.3 共表达重组菌转化条件

250 mL 摇瓶转化条件优化: 转速为 200 r/min, 温度为 30 °C, 根据不同条件添加不同酶活 TD、LDH、FDH, 不同浓度的 L-苏氨酸, 甲酸铵与苏氨酸摩尔浓度比为 1 : 1, NAD^+ 30 mg/L, 使用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 定容至 20 mL。

30 L 发酵罐全细胞转化条件: 搅拌转速 400 r/min, 通气量 15 L/min, 温度 37 °C, 用 4 mol/L NaOH 溶液控制 pH 8.0, 湿菌体 20 g/L, L-苏氨酸 80 g/L, 甲酸铵与苏氨酸摩尔浓度比为 1 : 1, NAD^+ 为 30 mg/L, 反应体积为 15 L。

1.2.4 酶活测定

单酶表达重组菌株使用冻干菌体或纯酶检测酶活。共表达菌株超声破碎细胞, 离心取上清液检测粗酶液酶活。TD、LDH、FDH 的酶活性测定参考文献报道^[14-16]。

1.2.5 检测方法

高效液相色谱法检测 L-Thr、2-OBA 和 L-ABA 浓度^[13-14]。

表 1 本文所用的菌株

Table 1 Strains used in this work

Strains	Relevant characteristics	References
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB (rB ⁻ mB ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen
BL21-BsTD	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>BsilvA</i>)	This study
BL21-CgTD	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>CgilvA</i>)	This study
BL21-EcTD	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>EcilvA</i>)	This study
BL21-BtLDH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>BtleuB</i>)	This study
BL21-BsLDH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>BsleuB</i>)	This study
BL21-BILDH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>Blldh</i>)	This study
BL21-MtLDH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>MtleuB</i>)	This study
BL21-TiLDH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>Tildh</i>)	This study
BL21-CbFDH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)(pET28a- <i>Cbfdh</i>)	This study
<i>E. coli</i> FT+L	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pRSFDuet- <i>BtleuB</i> +pETDuet- <i>fdh-EcivA</i>)	This study
<i>E. coli</i> 2FT+L	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pRSFDuet- <i>BtleuB</i> +pETDuet- <i>fdh-fdh-EcivA</i>)	This study
<i>E. coli</i> 3FT+L	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pRSFDuet- <i>BtleuB</i> +pETDuet- <i>fdh-fdh-fdh-EcivA</i>)	This study
<i>E. coli</i> 4FT+L	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pRSFDuet- <i>BtleuB</i> +pETDuet- <i>fdh-fdh-fdh-fdh-EcivA</i>)	This study

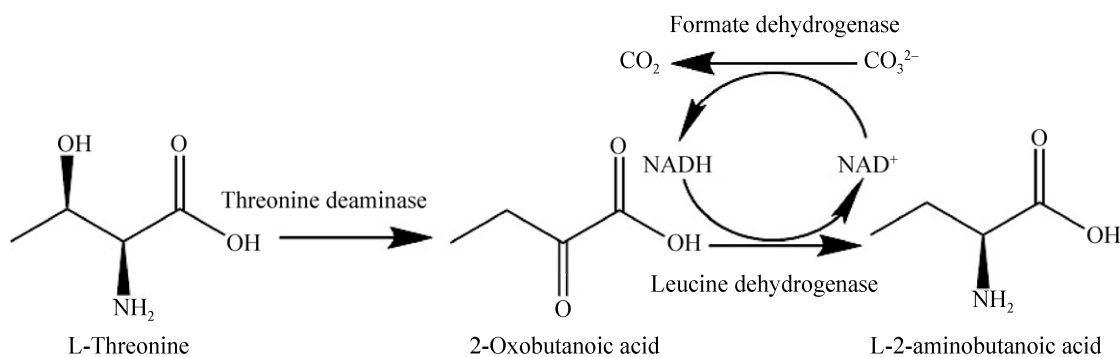
2 结果与分析

2.1 L-苏氨酸合成 L-ABA 的级联反应设计与体外构建

如图 1 所示, L-苏氨酸转化生产 L-ABA 的反应分为两步: 第一步是利用 L-苏氨酸脱氨酶 (L-threonine deaminase, TD, EC 4.3.1.19) 将 L-苏氨酸脱去羟基和氨基转化为 2-OBA; 第二步反应利用亮氨酸脱氢酶 (Leucine dehydrogenase, LDH, EC1.4.1.9) 将 2-OBA 的羰基不对称还原为氨基生成 L-ABA。由于第二步是氧化还原反应, 需要辅酶 NADH 参与, 因此在设计级联反应时需

要偶联辅酶再生系统。

通过 Brenda 数据库(<https://www.brenda-enzymes.org/>), 选取来源于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 和 *E. coli* K12 的 TD, 因其具有较高的比酶活^[17], 将 3 种酶基因克隆表达于 *E. coli* BL21 中, 构建获得重组菌株 BL21-BsTD、BL21-CgTD 和 BL21-EcTD。摇瓶发酵 14 h 收集湿菌体冷冻干燥, 测定不同来源的 TD 对 L-苏氨酸活性, BL21-BsTD、BL21-CgTD 和 BL21-EcTD 的冻干细胞对 L-苏氨酸的比活力分别为 2.04、3.21 U/mg、15.8 U/mg, 因此选择来源于 *E. coli* 的 EcTD 用

图 1 L-苏氨酸合成 L-ABA 级联反应的设计^[13]Fig. 1 Cascade catalyzed for synthesis L-ABA from L-Thr^[13].

于第一步转化反应。采用类似的策略,将来源于 *B. thuringiensis*、*B. subtilis*、地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*、热醋穆尔氏菌 *Moorella thermoacetica*、*T. intermedius* 的亮氨酸脱氢酶 LDH^[12,18],分别克隆表达于 *E. coli* BL21 构建重组菌株 BL21-BtLDH、BL21-BsLDH、BL21-BiLDH、BL21-MtLDH、BL21-TiLDH。摇瓶发酵 14 h 收集湿菌体冷冻干燥,测定不同菌株的 LDH 对 2-OBA 的酶活,其中 BL21-BsLDH 和 BL21-BiLDH 对 2-OBA 无催化活性,BL21-BtLDH、BL21-MtLDH 和 BL21-TiLDH 的冻干细胞对 2-OBA 比活力分别为 1.56、0.28、1.01 U/mg,因此选择 *B. thuringiensis* 来源的 BtLDH 用于第二步转化。由于 *C. boidinii* 来源的 CbFDH 具有广泛的工业应用潜力^[19-20],

因此在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达 *C. boidinii* 来源 *fdh* 构建重组菌 BL21-CbFDH,比活力为 1.38 U/mg。

使用镍柱将 *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 进行蛋白质纯化(图 2A),将纯化所获得的纯酶添加到 5 mL 的体外转化体系中,添加 10 g/L 底物 L-苏氨酸,采用 LC-MS 结构鉴定转化液中是否催化合成了 L-ABA,对转化液中产物进行检测,L-ABA 分子量为 103.1,使用阴离子色谱检测分子量为 102.05(图 2B),证明获得目标产物 L-ABA,说明采用 *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 级联催化 L-苏氨酸生成 L-ABA 是可行的。为了获得更高的转化率,对体外转化体系的 3 种酶的浓度及其配比进行优化。L-苏氨酸浓度为 50 g/L,固定 *EcTD* 酶活为 12 U/mL,优化 *EcTD* 与 *BtLDH* 酶活比例,

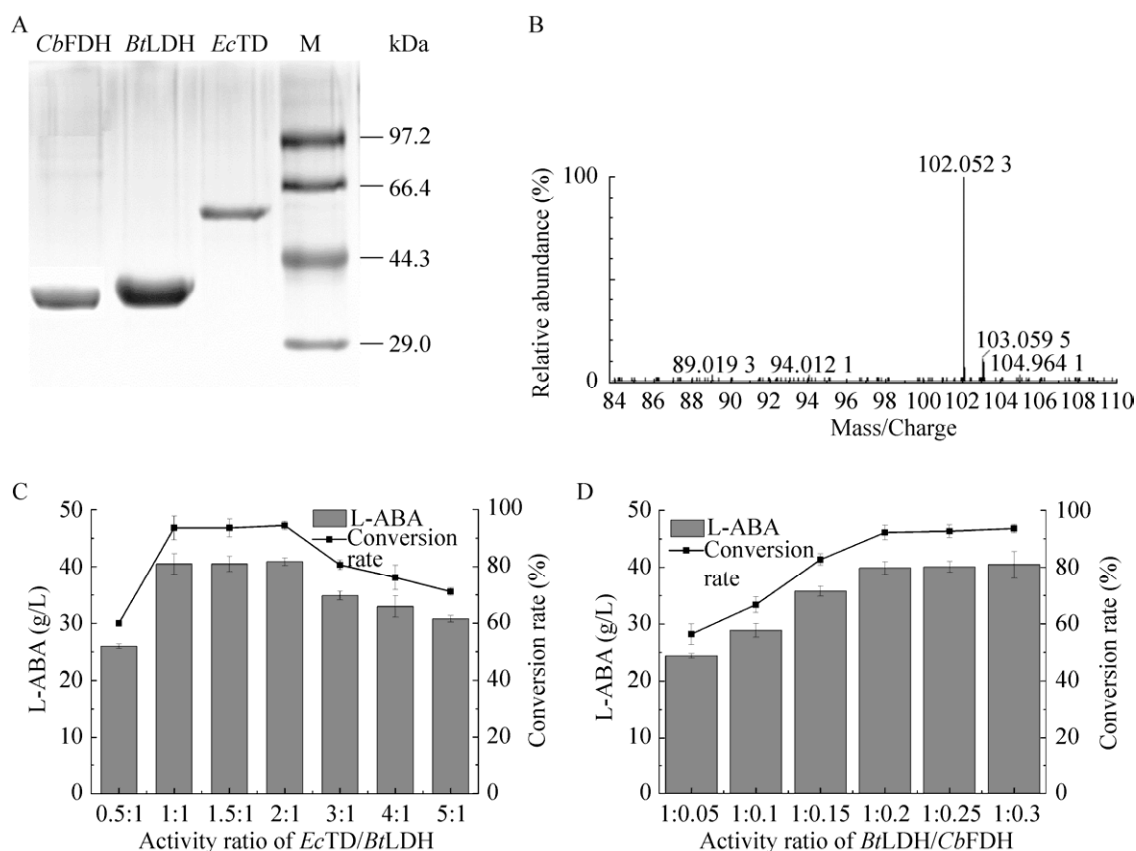


图 2 体外催化 TD、LDH 和 FDH 酶活比例优化

Fig. 2 Optimization of activity ratio of *EcTD*/*BtLDH* and *BtLDH*/*CbFDH* *in vitro*. (A) SDS-PAGE analysis of purified protein. (B) Analysis of the product with LC-MS. (C) Effect of different activity ratios of *EcTD*/*BtLDH* on L-ABA production. (D) Effect of different activity ratios of *BtLDH*/*CbFDH* on L-ABA production.

结果如图 2C 所示, 在 *EcTD* 与 *BtLDH* 酶活比为 1.0 : 1–2.0 : 1 时, L-ABA 产量 ((40.7±0.2) g/L) 和摩尔转化率 (94.0%±0.5%) 达到较高水平。固定 *EcTD* 与 *BtLDH* 酶活比为 1 : 1 (固定 LDH 酶活为 12 U/mL), 体系中添加 *BtLDH* 与 *CbFDH* 酶活比为 1 : 0.05–1 : 0.3, 结果如图 2D 所示。当酶活比例为 1 : 0.2–1 : 0.3 时, L-ABA 产量达到 40.0 g/L 以上, 当低于该比例时, L-ABA 产量和摩尔转化率均下降, 说明体系中 FDH 酶活至少达到 LDH 的 20% 及以上, 才能够保证提供充足的辅酶 NADH。因此确定 *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 最佳比例为 1 : 1 : 0.2, 此时酶添加量最低且能够保证 L-苏氨酸高效转化。

2.2 三酶级联菌株的构建与优化

为了进一步简化工艺, 将 *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 在 *E. coli* BL21(DE3)中共表达, 使用 pRSFDuet 质粒连接 *BtleuB*, 质粒 pETDuet 将 *fdh* 与 *EcilvA* 串联表达, 构建重组菌株 *E. coli* FT+L, 菌体破碎后进行蛋白电泳验证, 结果如图 3A 所示。*EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 理论蛋白分子量分别为 56.2、39.8、40.4 kDa, 目的蛋白条带大小符合预期, 由于 *BtLDH* 和 *CbFDH* 蛋白分子量相近, 出现重叠条带。对重组菌 *E. coli* FT+L 的催化性能进行评价, 在 20 mL 体系中添加 L-苏氨酸 10–

50 g/L, 底物与湿菌体质量比为 2.5 : 1。当 L-苏氨酸浓度从 10 增加至 50 g/L 时, 摩尔转化率从 95.0%降至 45.2%, 而中间产物 2-OBA 浓度从 0.43 g/L 上升至 25.8 g/L (图 3B)。其原因是 3 种酶的酶活不均衡导致 2-OBA 无法持续转化为 L-ABA, 进一步测定湿细胞中 3 种酶的酶活, 在 *E. coli* FT+L 湿细胞中, *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 酶活分别为 1508.8、885.0、117.1 U/g, 酶活比为 1.7 : 1 : 0.13, 与体外最佳比例为 1 : 1 : 0.2 不符, *CbFDH* 酶活偏低导致 NADH 再生效率低下, 转化通路不平衡, 导致中间产物出现积累, 因此对 *E. coli* FT+L 进行表达水平优化。

重复表达目标基因可以显著提高目标酶的酶活^[21–22], 在 *E. coli* FT+L 中重复表达 *fdh* 基因 2–4 次获得重组菌株 *E. coli* 2FT+L、*E. coli* 3FT+L 和 *E. coli* 4FT+L, 蛋白电泳图谱如图 4 所示, 表达的目的蛋白条带大小与理论值一致, 菌株构建成功。检测 *E. coli* FT+L、*E. coli* 2FT+L、*E. coli* 3FT+L 和 *E. coli* 4FT+L 湿菌体中 *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 酶活, 结果如图 5A 所示。随着 *fdh* 重复次数的增加, *CbFDH* 酶活从 117.1 U/g 分别上升至 164.6、179.0、191.9 U/g, *EcTD* 酶活从 1508.8 U/g 分别下降至 1158.0、855.9、706.3 U/g, *BtLDH* 酶活呈略微下降的趋势。结果显示,

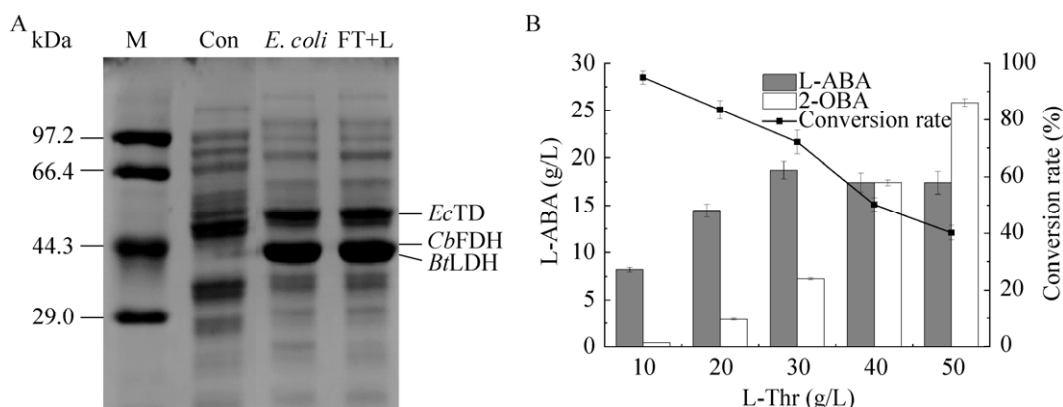


图 3 重组菌株 *E. coli* FT+L 的构建与转化效果评价

Fig. 3 Construction of *E. coli* FT+L. (A) SDS-PAGE analysis of strain *E. coli* FT+L from cell-free extracts. (B) Effect of substrate concentration on L-ABA production by strain *E. coli* FT+L.

E. coli 3FT+L 中 *EcTD*、*BtLDH* 和 *CbFDH* 酶活比接近 1 : 1 : 0.2。以 *E. coli* 3FT+L 为催化剂, L-ABA 产量达到 42.4 g/L, 摩尔转化率达到 98.0%, 质量转化率为 84.8%, 未检测到 L-Thr 积累, 2-OBA 残留仅 0.23 g/L(图 5B), 表明反应体系中辅酶 NADH 供应正常, 3 种酶实现均衡协调表达。

2.3 5 L 发酵罐上 *E. coli* 3FT+L 生产 L-ABA 条件优化

为了进一步提高 L-ABA 的生产效率, 5 L 发酵罐上对转化条件进行优化。固定湿菌体质量为 25 g/L, 不同 L-苏氨酸浓度(70–90 g/L)对 L-ABA 生产的影响如图 6A 所示。当苏氨酸浓度达到 80 g/L

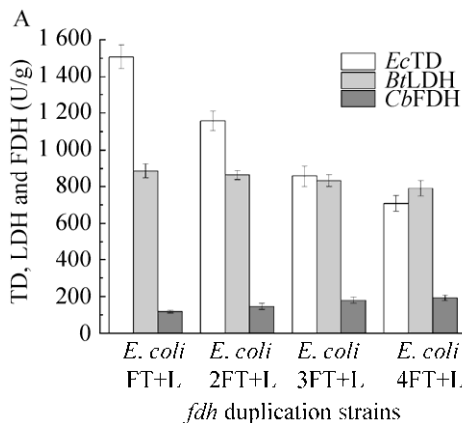


图 5 *fdh* 基因重复表达菌株酶活检测与转化效果评价

Fig. 5 Optimization of co-expressed strain in the activity ratio of *EcTD*/*BtLDH*/*CbFDH* *in vivo*. (A) The assay of enzymes activity in recombinant strains with *fdh* gene duplicated for different copies. (B) Effect of different *fdh* copies on L-ABA production.

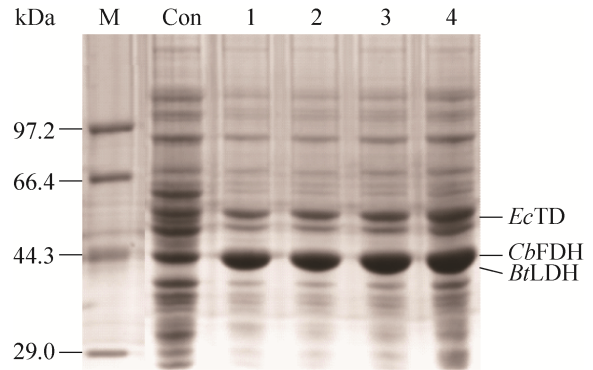


图 4 *fdh* 重复表达菌株的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant strains with *fdh* gene duplicated for different copies. Lane M: marker; lane Con: control *E. coli* BL21 (DE3); lane 1–4: recombination strain *E. coli* FT+L, *E. coli* 2FT+L, *E. coli* 3FT+L, *E. coli* 4FT+L.

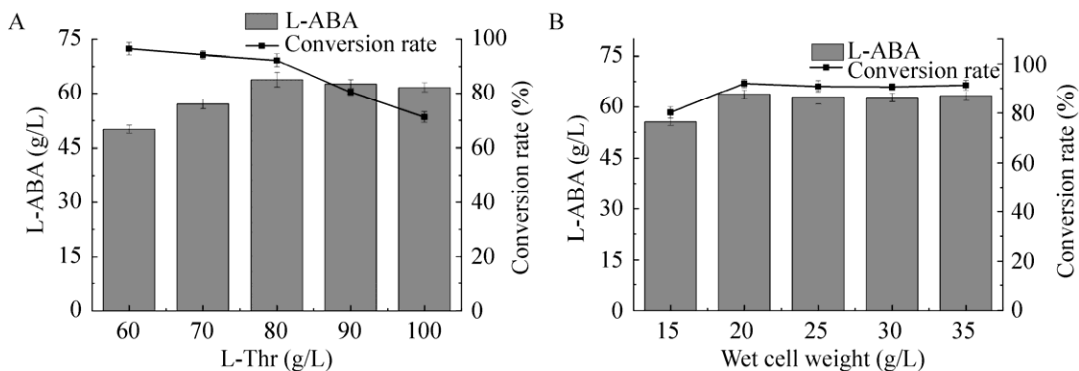
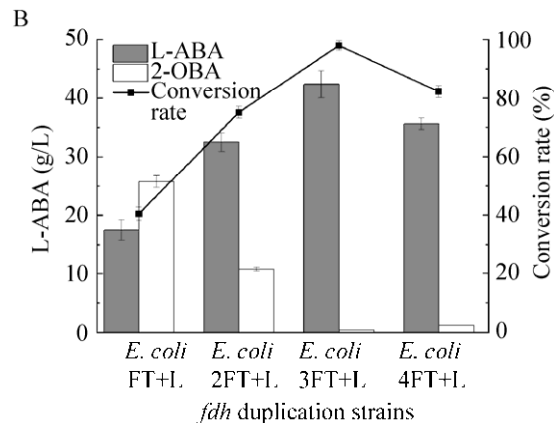


图 6 L-苏氨酸和菌体浓度对 L-ABA 产量及转化率的影响

Fig. 6 Effect of mass ratio of L-Thr (A) and wet cell weight (B) on L-ABA production.

时, L-ABA 产量达到最高为 62.6 g/L, 摩尔转化率为 90.4%, 继续增加 L-苏氨酸的浓度, L-ABA 产量不再增加。在此基础上, 固定 L-苏氨酸浓度为 80 g/L, 不同湿菌体浓度 (15–35 g/L) 对 L-ABA 生产的影响如图 6B 所示。当添加湿菌体为 20 g/L 时, L-ABA 产量达到 63.7 g/L, 摩尔转化率为 92.0%, 继续增加湿菌体质量, L-ABA 产量也不增加。

考察不同温度对 *E. coli* 3FT+L 全细胞级联催化性能的影响, 在 *E. coli* 3FT+L 湿菌体 20 g/L、L-苏氨酸 80 g/L 时, 研究不同转化温度 (25–45 °C) 对 L-ABA 生产的影响, 当转化最适温度为 37 °C, 16 h 时摩尔转化率达到 96.5%; 当转化温度低于 37 °C, 转化周期延长至 22 h 以上; 当转化温度为 45 °C 时, 摩尔转化率只能达到 88.2% (图 7A)。于是在 37 °C 下考察不同 pH 对全细胞转化生产 L-ABA 的影响, 在 pH 7.0–8.5 范围内, L-ABA 摩

尔转化率均能达到 95.0% 以上, 在最适 pH 为 8.0 时转化周期最短为 14 h, L-ABA 摩尔转化率达到 98.2% (图 7B)。

2.4 30 L 发酵罐规模化生产 L-ABA

在 30 L 发酵罐上采用分批补料的方式培养 *E. coli* 3FT+L, 随着菌体浓度不断增加, 酶活不断提高, 发酵 24 h 湿菌体浓度达到 105.9 g/L, 此时发酵液中 *Ec*TD、*Bi*LDH 和 *Cb*FDH 的酶活分别达到 114.7、101.0、22.3 U/mL (图 8A), *Ec*TD、*Bi*LDH 和 *Cb*FDH 酶活比为 1 : 1 : 0.2。

30 L 发酵罐中转化体积为 15 L, *E. coli* 3FT+L 湿菌体 20 g/L, L-苏氨酸 80 g/L, 温度 37 °C, 使用 NaOH 调节 pH 为 8.0, 随着转化时间的增加, L-ABA 逐渐积累, 当 12 h 时 L-ABA 产量最高达到 68.5 g/L, 摩尔转化率达到 99.0%, 质量转化率达到 85.6%, L-ABA 生产速率为 5.71 g/(L·h) (图 8B)。

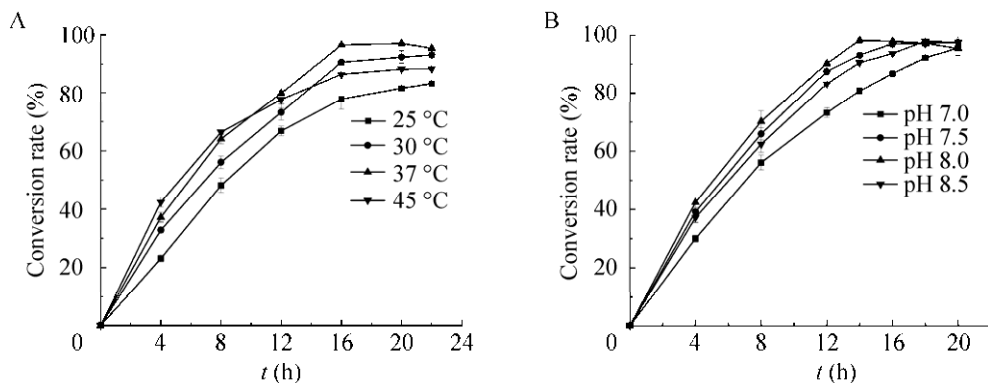


图 7 温度和 pH 对转化反应的影响

Fig. 7 Effect of reaction temperature (A) and pH (B) on the whole-cell catalyst.

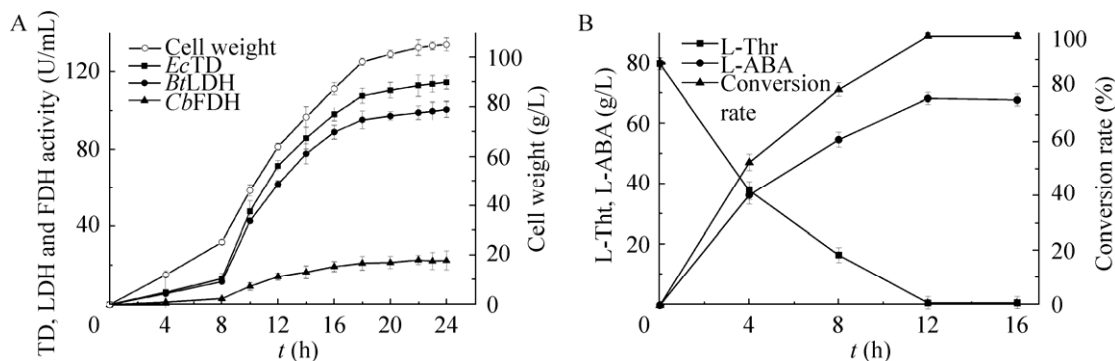


图 8 *E. coli* 3FT+L 高密度发酵与转化生产 L-ABA

Fig. 8 High density fermentation process of *E. coli* 3FT+L (A) and whole-cell catalyst production of L-ABA (B).

3 结论

利用 TD、LDH 和 FDH 三酶级联转化 L-苏氨酸生产 L-ABA, 目前存在辅因子 NADH 再生用酶的效率较低、多酶催化的转化速率协同性差、需要培养多种基因工程菌使成本高等问题。针对上述问题, 本研究开发了一种高效简约制备 L-ABA 工艺路线, 采用一次性投料, 转化体系中添加单一细胞 *E. coli* 3FT+L 20 g/L, 转化 12 h, L-ABA 产量达到 68.5 g/L, 摩尔转化率达 99.0%, 为后续酶法规模化生产 L-ABA 奠定一定的理论基础。

REFERENCES

- [1] Goncalves RSB, da Silva ET, de Souza N, et al. An environmentally friendly, scalable and highly efficient synthesis of (S, S)-ethambutol, a first line drug against tuberculosis. *Lett Org Chem*, 2015, 12(7): 478–481.
- [2] Bai GY, Chen LG, Xing P, et al. Synthesis of ethambutol. *Fine Chem*, 2004, 21(12): 943–945, 949 (in Chinese).
白国义, 陈立功, 邢鹏, 等. 乙胺丁醇的合成. *精细化工*, 2004, 21(12): 943–945, 949.
- [3] Shin JS, Kim BG. Transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of L-2-aminobutyric acid from achiral reactants. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(10): 1595–1599.
- [4] Fujii C, Yasui M, Ishimathu Y. Process for production of (+)-2-amino-1-butanol: US, 3979457, 1976-09-07.
- [5] Zhou XB, Xu GY, Zhou Y, et al. Synthesis of anticonvulsant drug levetiracetam. *Fine Chem Intermed*, 2005, 35(2): 27–28 (in Chinese).
周先波, 徐广宇, 周伊, 等. 抗癫痫治疗药物左乙拉西坦的合成研究. *精细化工中间体*, 2005, 35(2): 27–28.
- [6] Yin XQ, Sun F, Ge SX. Development of synthesis of α -aminobutyric acid. *Fine Chem Intermed*, 2010, 40(1): 12–14 (in Chinese).
尹先清, 孙芳, 葛胜祥. α -氨基丁酸化学合成研究进展. *精细化工中间体*, 2010, 40(1): 12–14.
- [7] Jeffery EA, Meisters A. Electrochemical synthesis of amino acids by reductive amination of keto acids. I. Reduction at mercury electrodes. *Aust J Chem*, 1978, 31(1): 73–78.
- [8] Synoradzki L, Ruškowski P, Bernaś U. Tartaric acid and its *O*-acyl derivatives. Part 1. Synthesis of tartaric acid and *O*-acyl tartaric acids and anhydrides. *Org Prep Proced Int*, 2005, 37(1): 37–63.
- [9] Zhang KC, Li H, Cho KM, et al. Expanding metabolism for total biosynthesis of the nonnatural amino acid L-homoalanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6234–6239.
- [10] Fotheringham IG, Grinter N, Pantaleone DP, et al. Engineering of a novel biochemical pathway for the biosynthesis of L-2-aminobutyric acid in *Escherichia coli* K12. *Bioorgan Med Chem*, 1999, 7(10): 2209–2213.
- [11] Li T, Kootstra AB, Fotheringham IG. Nonproteinogenic α -amino acid preparation using equilibrium shifted transamination. *Orga Proc Res Dev*, 2002, 6(4): 533–538.
- [12] Galkin A, Kulakova L, Yoshimura T, et al. Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4651–4656.
- [13] Tao RS, Jiang Y, Zhu FY, 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. *Biotechnol Lett*, 2013, 36(4): 835–841.
- [14] Umbarger HE, Brown B. Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine

- deaminases. *J Bacteriol*, 1957, 73(1): 105–112.
- [15] Ansorge MB, Kula MR. Production of recombinant L-leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in pilot scale using the runaway replication system *E. coli* [piet98]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68(5): 557–562.
- [16] Berríos-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 217–229.
- [17] Yu XF, Li Y, Wang XY. Molecular evolution of threonine dehydratase in bacteria. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e80750.
- [18] Song W, Wang JH, Wu J, et al. Asymmetric assembly of high-value α -functionalized organic acids using a biocatalytic chiral-group-resetting process. *Nat Commun*, 2018, 9: 3818.
- [19] Zhang C, Xing XH. Research progress in cofactor regeneration systems. *Chin J Biotech*, 2004, 20(6): 811–816 (in Chinese).
张翀, 邢新会. 辅酶再生体系的研究进展. *生物工程学报*, 2004, 20(6): 811–816.
- [20] Zhao HM, van der Donk WA. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(6): 583–589.
- [21] Hepworth LJ, France SP, Hussain S, et al. Enzyme cascades in whole cells for the synthesis of chiral cyclic amines. *ACS Catal*, 2017, 7(4): 2920–2925.
- [22] Qian YY, Liu J, Song W, et al. Production of β -alanine from fumaric acid using a dual-enzyme cascade. *ChemCatChem*, 2018, 10(21): 4984–4991.

(本文责编 郝丽芳)