

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(8):889–896; 4 August 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.006

苏云金芽孢杆菌重组 L-异亮氨酸羟化酶的酶学性质及其在 4-羟基异亮氨酸合成中的应用

张成林^{1,2,3#}, 刘远^{1,2,3#}, 薛宁^{3,4}, 王鑫鑫³, 谢希贤^{1,2,3}, 徐庆阳^{1,2,3}, 陈宁^{1,2,3*}

¹ 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津 300457

² 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室, 天津 300457

³ 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

⁴ 天津市南开中学, 天津 300100

摘要:【目的】克隆并表达来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) TCCC 11826 的 L-异亮氨酸羟化酶 (L-isoleucine-4-hydroxylase, IDO), 测定重组 IDO 酶学特性并构建用于 4-羟基异亮氨酸 (4-Hydroxyisoleucine, 4-HIL) 微生物转化的重组菌株, 以考察该酶在 4-HIL 合成中的潜在应用价值。【方法】以 *B. thuringiensis* TCCC 11826 基因组为模板 PCR 扩增 *ido* 基因并构建该基因过表达菌株 BL-IDO; 采用 Ni-NTA 亲和层析法分离纯化重组 IDO 后检测其酶学特性; 构建重组菌株 W3110-IDO 进行 4-HIL 的微生物转化。【结果】克隆 *B. thuringiensis* TCCC 11826 的 *ido* 基因, 测序结果显示该基因含 723 个核苷酸, 编码 240 个氨基酸, 与已报道的 *B. thuringiensis* 2-e-2 的 *ido* 基因相似度分别为 97.47% 和 97.91%。此 IDO 含有 His¹-X-Asp/Glu-Xn-His² 基序, 属于 Fe²⁺ 和 α -酮戊二酸依赖型羟化酶家族; 酶学实验表明该酶能够特异性地催化 L-异亮氨酸生成 (2S, 3R, 4S) 4-HIL, 其 K_m 和 V_{max} 分别为 0.18 mmol/L 和 2.10 μ mol/min/mg, 最适反应温度和 pH 分别为 35℃ 和 7.0, 该酶于 35℃ 条件下放置 5 h 后仍具有 85.1% 的活性; 在 *Escherichia coli* W3110 中过表达重组 IDO, 在未经优化条件下 4-HIL 最高转化率达 89.28%。【结论】获得 IDO 编码基因序列 (Accession No. KC884243) 并首次较为系统地研究了其酶学特性, 该酶反应条件温和且具有较高的活性及稳定性, 在酶法或微生物转化法合成 4-HIL 中有较广泛的应用价值。本研究可为 4-HIL 及其它氨基酸衍生物的生物制造技术奠定理论基础。

关键词: 4-羟基异亮氨酸, L-异亮氨酸羟化酶, 酶学性质, 苏云金芽孢杆菌, 微生物转化

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 08-0889-08

4-羟基异亮氨酸 (4-Hydroxyisoleucine, 4-HIL) 是一种主要存在于胡芦巴属植物种子中的 L-异亮

氨酸羟化物 (图 1)^[1]。研究表明 4-HIL 具有葡萄糖浓度依赖的促进胰岛素分泌的活性以及促进肌细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (31300069); 天津市科技支撑计划重点项目 (12ZCZDSY01900)

* 通信作者。Tel: +86-22-60601251; Fax: +86-22-60602298; E-mail: ningch@tust.edu.cn

作者简介: #共同第一作者。张成林 (1982–), 男, 天津人, 讲师, 博士, 研究方向为代谢工程, E-mail: zcl@tust.edu.cn; 刘远 (1989–), 男, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为代谢工程, E-mail: liuyuan1989@126.com

收稿日期: 2013-12-18; **修回日期:** 2014-03-28

对血糖吸收、加速脂肪代谢、降血脂和保护肝功能的作用^[2-10]。因此,作为有效预防和治疗糖尿病及肥胖症的理想药物,4-HIL 具有广泛的应用前景和市场需求。

目前报道的 4-HIL 生产方法包括提取法、化学合成法以及酶法,但仅提取法用于工业化生产^[11-14]。研究表明此方法获得的 4-HIL 构型较多,但仅 (2S, 3R, 4S)-4-HIL 具有上述生物学活性,从而使得该方法存在提取率低(仅为 0.091% - 0.6%)、分离纯化困难、原材料需求量大和成本高等不足^[1, 4, 11]。因此采用特异性 L-异亮氨酸羟化酶(L-isoleucine-4-hydroxylase, IDO)催化合成(2S, 3R, 4S)-4-HIL 是较为理想的方法。尽管 Haefelé 等(1997)在葫芦巴种子破碎液中发现能够将 L-异亮氨酸(L-isoleucine, L-Ile)转化为(2S, 3R, 4S)-4-HIL 的活性组分,但至今未见后续研究报道^[15]。Kodera 等(2009)首次报道了在苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)中发现能特异地催化 L-Ile 和 α -酮戊二酸分别生成(2S, 3R, 4S)-4-HIL 和琥珀酸的 IDO^[16-19],该酶的发现为 4-HIL 的生物合成奠定了基础。

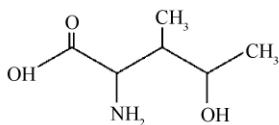


图 1. 4-HIL 结构图^[1]

Figure 1. Structure of 4-HIL^[1].

明确 IDO 的酶学特性是实现 4-HIL 生物合成的必要前提。本研究从 *B. thuringiensis* TCCC 11826 中克隆出 1 个 IDO 编码基因 *ido*,该基因含 723 个核苷酸,编码 240 个氨基酸。通过 IDO 蛋白表达及纯化并在明确其酶学性质的基础上,将该基因于 *E. coli* W3110 中表达实现了 4-HIL 的微生物转化。本研究可为 4-HIL 的生物制造技术奠定理论基础,同时将为其它氨基酸衍生物的生产技术改进提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* W3110 以及质粒 pXMJ19 和 pET-

42a 均由本实验室保藏。苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* TCCC 11826 由天津科技大学微生物菌种保藏管理中心保藏。

1.1.2 培养基:LB 培养基参照文献[20]。基本培养基为葡萄糖 0.2% (W/V), NH_4Cl 1 g/L, Na_2HPO_4 12.8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, pH 7.0 - 7.4, 115℃ 蒸汽高压灭菌 20 min。苏云金芽孢杆菌培养基参照文献[21]。

1.1.3 主要试剂:限制性内切酶购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;T4 DNA 连接酶和 TaKaRa Ex Taq® 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;Ni-NTA 树脂购于上海申能博彩生物公司;(2S, 3R, 4S)-4-HIL 标准品购于美国 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 目的基因的 PCR 扩增

根据 NCBI 中报道的 *B. thuringiensis* 2-e-2 的 *ido* (Accession No. HM358019.1) 序列采用 Primer5.0 软件设计引物(表 1)并委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成。以 *B. thuringiensis* TCCC 11826 基因组 DNA 为模板,分别利用引物 IDO-1 和 IDO-2 以及 IDO-3 和 IDO-4、TaKaRa Ex Taq® 试剂盒扩增其 *ido* 基因。PCR 条件为:94℃ 5 min, 1 个循环;94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 10 min, 1 个循环。反应体系为 100 μL 。取 10 μL PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 表达载体的构建

PCR 扩增产物回收后,分别经 *Nde* I 和 *Xho* I 以及 *Sal* I 和 *Eco*R I 进行双酶切,并连接至经相同酶切的表达载体 pET-42a 和 pXMJ19,获得重组质粒 pET-IDO 和 pXMJ-IDO。然后将上述重组质粒分别转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 获得重组菌株 BL-IDO 和 BX-IDO,将 pXMJ-IDO 转化至 *E. coli* W3110 获得重组菌株 W3110-IDO。

1.4 IDO 的诱导表达及分离纯化

将 BL-IDO 种子培养物接种至 2 L 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,按参考文献[21]的方法对其诱导表达并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测,对照为不含目的基因、未经 IPTG 诱导的转化有 pET42a 的 *E. coli* BL21 (DE3)。按 Ni-NAT 树脂说明书收集重组蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定重组蛋白浓度。

表 1. 引物
Table 1. Primers

primers	sequence (5'→3')
IDO-1	CCG CATATG AAAAATGAGTGGCTTTAGCATAG (<i>Nde</i> I)
IDO-2	CCG CTCGAG TTTTGTCTCCTTATAAGAAAATGTTACTA (<i>Xho</i> I)
IDO-3	CCG GTCGAC AAGGAAGCTAGATATGAAAATGAGTGGCTTTAGCATAG (<i>Sal</i> I)
IDO-4	CCG GAATTC TATTTTGTCTCCTTATAAGAAAATGTTACTA (<i>EcoR</i> I)

1.5 IDO 活性检测

粗酶液和重组 IDO 的活力测定分别参照文献 [17] 和 [22]。将 L-Ile 浓度设定为 0-10 mmol/L，采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法分析重组 IDO 的 K_m 和 V_{max} 值。分别设定不同温度和 pH 梯度测定重组 IDO 的最适温度和 pH，分别于 25、35 和 45℃ 将重组 IDO 处理不同时间以测定其热稳定性。

1.6 4-HIL 的检测

按照参考文献 [18] 的方法采用 HPLC-MS 法对 4-HIL 进行定性和定量分析。

1.7 4-HIL 的微生物转化

将 W3110-IDO 种子培养物接种至 100 mL 含 30 μg/mL 氯霉素和 500 mmol/L L-Ile 及 α-酮戊二酸的基本培养基中，于 35℃ 220 r/min 振荡培养 4 h 后，加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG，继续振荡培养。每 4 h 取培养物 0.5 mL 测定其生物量（以 OD_{600} 表示）以及 4-HIL 含量。

2 结果

2.1 ido 的克隆及表达载体构建

以 *B. thuringiensis* TCCC 11826 基因组 DNA 为模板，分别利用引物 IDO-1 和 IDO-2 以及 IDO-3 和 IDO-4 扩增后进行琼脂糖电泳，获得分子量约为 730 bp 的目的片段，与预期分子量 (723 bp) 相符。

目的片段经回收并酶切后分别连接至经相同酶切的表达载体 pET-42a 和 pXMJ19，获得重组质粒 pET-IDO 和 pXMJ-IDO，将其分别转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中获得重组菌株 BL-IDO 和 BX-IDO。提取重组质粒 pET-IDO 和 pXMJ-IDO 并分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 以及 *Sal* I 和 *EcoR* I 酶切验证，结果如图 2 所示，经酶切后分别获得分子量约为 730 bp 的目的片段以及与其载体大小一致的片段，证明 *ido* 基因已成功连接至表达载体上。

将验证为阳性的重组质粒测序，结果表明本研究获得的 *ido* 基因共含 723 个核苷酸，编码 240 个氨

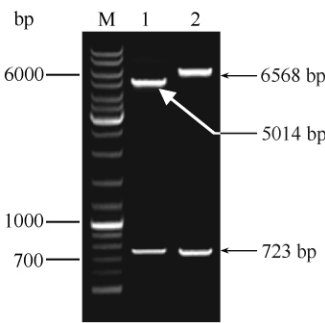


图 2. 重组质粒 BL-IDO 和 W3110-IDO 的酶切电泳图谱
Figure 2. Identification of recombinant plasmids digested by restricted endonuclease. M. Marker; lane 1. pET-IDO digested by *Nde* I and *Xho* I ; lane 2. pXMJ-IDO digested by *Sal* I and *EcoR* I .

基酸,GenBank 登陆号为 KC884243。经比对得知，该基因的核苷酸和氨基酸序列与已报道的 *B. thuringiensis* 2-e-2 的 *ido* 基因相似度分别为 97.47% (704/723) 和 97.91% (235/240)，暗示该酶的酶学特性可能与 *B. thuringiensis* 2-e-2 的 IDO 存在差异^[16]。

2.2 IDO 的表达及纯化

将 BL-IDO 种子培养物接种至 LB 液体培养基中，采用 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h，收集部分菌体并超声破碎后进行 SDS-PAGE。经考马斯亮蓝染色后结果如图 3 所示，BL-IDO 菌体破碎液及其上清和沉淀液中均出现一条分子量约 29.0 kDa 的条带，与 IDO 理论分子量 28.92 kDa (含 6 × His 标签) 一致，表明该蛋白成功可溶性表达且表达量较高。

将剩余菌体破碎液离心后取上清液并采用 Ni-NTA 亲和层析法分离纯化重组 IDO，经透析、浓缩、SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色后出现分子量约为 29 kDa 的单一一条带（图 3），经测定其浓度为 3 mg/mL，表明该蛋白纯化效果理想，可用于后续酶学实验。

2.3 重组 IDO 的催化反应产物分析

采用 2,4-二硝基氟苯对 (2S, 3R, 4S) 4-HIL 标准品及重组 IDO 的催化反应产物衍生化后，利用 HPLC-MS 对其分析，结果如图 4 所示。经衍生化的

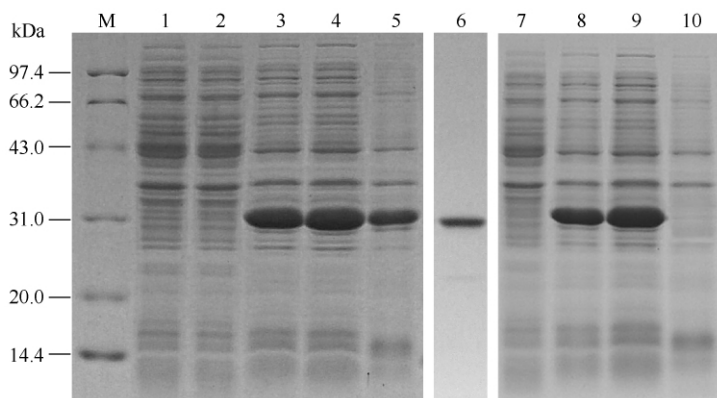


图 3. 重组 IDO 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 3. SDS-PAGE analysis of recombinant IDO expressed in *E. coli* BL21 (DE3). M. Marker; lane 1, 7: total cell lysate of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-42a; lane 2: total cell lysate of BL-IDO without IPTG induction; lane 3: total cell lysate of BL-IDO induced by IPTG; lane 4: soluble fraction of BL-IDO induced by IPTG; lane 5: insoluble fraction of BL-IDO induced by IPTG; lane 6: purified recombinant IDO; lane 8: total cell lysate of BX-IDO induced by IPTG; lane 9: soluble fraction of BX-IDO induced by IPTG; lane 10: insoluble fraction of BX-IDO induced by IPTG.

标准品及重组 IDO 催化反应产物均出现保留时间分别为 13.5 min 和 21.6 min 的色谱峰 (图 4-A、B), 此外后者还出现一个保留时间为 23.8 min 的色谱峰。分别对上述色谱峰进行质谱分析, 结果表明保留时间为 21.6 min 色谱峰的质核比为 311.9 (图 4-C、D), 经鉴定为 4-HIL 与 2, 4-二硝基氟苯反应后生成的 2, 4-二硝基苯基-4-羟基异亮氨酸 (其分子量为 313.3), 故证明重组 IDO 的催化反应产物为 (2S, 3R, 4S)-4-HIL。保留时间分别为 13.5 min 和 23.8 min 的色谱峰经质谱鉴定分别为剩余的 2, 4-二硝基氟苯和 L-Ile (结果未显示)。

2.4 重组 IDO 酶学特性分析

2.4.1 重组 IDO 的酶活性分析: 测定不同 L-Ile 浓度下 IDO 酶促反应速度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法绘制曲线并获得方程 $1/V = 85.86/[S] + 0.48$, 经计算该酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 0.18 mmol/L 和 2.10 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 与已报道的 *B. thuringiensis* 2-e-2 的 IDO 存在一定差异 (其 K_m 和 V_{max} 分别 0.27 mmol/L 和 1.13 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$)^[16, 22], 表明本研究获得的 IDO 与底物的亲和度和催化效率均高于后者。

2.4.2 重组 IDO 最适反应温度: 分别测定不同温度下重组 IDO 相对活性, 结果如图 5-A 所示。IDO 活性随温度的升高而升高, 当温度达到 35℃ 时其活性最高, 随着温度的继续升高其活性迅速降低, 当温度高于 60℃ 时活性完全丧失。

2.4.3 IDO 最适 pH: 在最适温度 (35℃) 条件下测定不同 pH 对重组 IDO 活性的影响, 结果如图 5-B

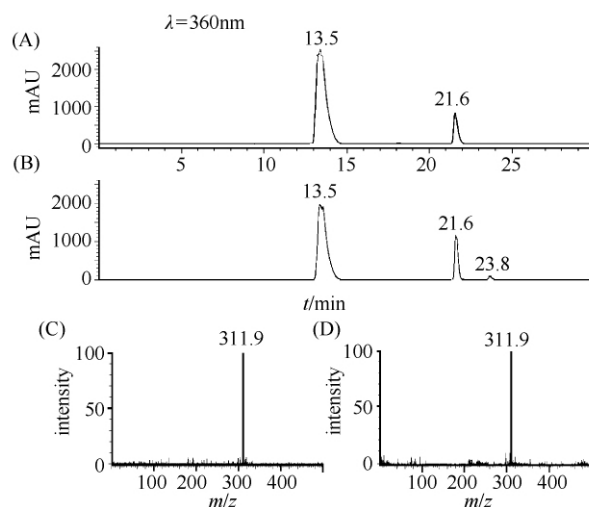


图 4. (2S, 3R, 4S)-4-HIL 标准品及重组 IDO 的反应产物 HPLC 和 MS 图谱

Figure 4. HPLC and Mass spectrometry map of (2S, 3R, 4S)-4-HIL standard and product catalyzed by IDO. A and B: HPLC map of (2S, 3R, 4S)-4-HIL standard and product catalyzed by IDO, respectively; C and D: mass spectrometry map of (2S, 3R, 4S)-4-HIL standard and product catalyzed by IDO, respectively.

所示。pH 7.0 时 IDO 活性最高, 当 pH 高于或低于 7.0 时, 随着 pH 的偏离, 其活性急剧下降。

2.4.4 IDO 热稳定性: 分别将重组 IDO 于 25、35 和 45℃ 放置不同时间以测定其热稳定性, 结果如图 6 所示。在前 8 h 内, IDO 在最适温度 35℃ 下保持较高活性; 随着时间的增加, 3 个温度下重组 IDO 残留活性均呈现下降趋势, 但 25℃ 和 35℃ 条件下酶活性下降缓慢, 于 35℃ 条件下处理 5 h 后仍具有 85.1% 的活性。而 45℃ 条件下活性下降最显著, 在

该温度下放置 5 h 后其活性几乎完全丧失。表明重组 IDO 在常温条件下比较稳定,且随着热处理时间的延长,温度越低其热稳定性越好。

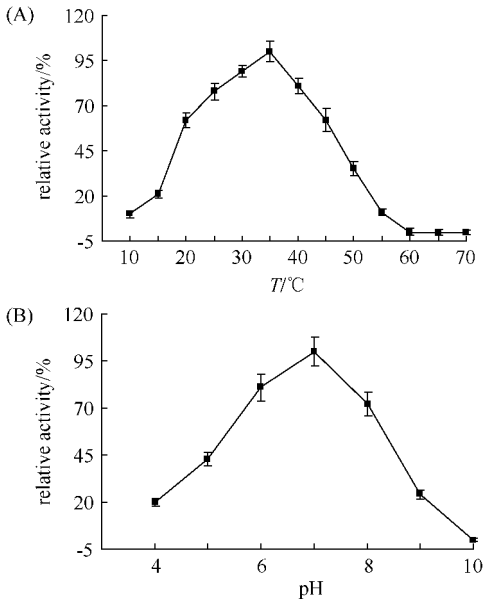


图 5. 温度和 pH 对重组 IDO 活性的影响
Figure 5. Effect of temperature (A) and pH (B) on recombinant IDO activity.

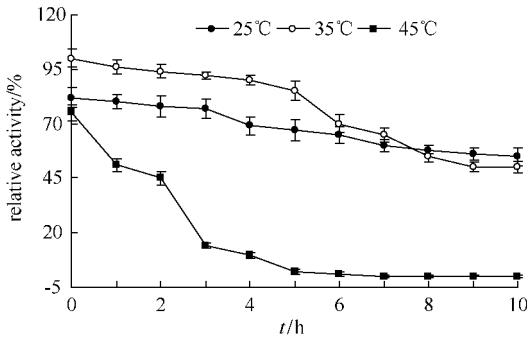


图 6. 重组 IDO 的热稳定性
Figure 6. Thermal stability of recombinant IDO.

2.5 4-HIL 的微生物转化

为了保证重组 IDO 蛋白的可溶性表达,采用转录强度较 pET-42a 低但拷贝数较高的 pXMJ-IDO (含 tac 启动子)于 *E. coli* BL21 (DE3) 中过表达,结果表明重组菌株 BX-IDO 可表达出可溶性重组酶且表达量与 BL-IDO 相近(图 3)。因 *E. coli* W3110 常作为选育工业生产菌的出发菌株,所以采用含重组质粒 pXMJ-IDO 的 W3110-IDO 进行 4-HIL 的微生物转化实验。

收集经 IPTG 诱导的 W3110-IDO,超声破碎并离心后进行 SDS-PAGE,取上清液测定 IDO 比活力,分

别取以未经 IPTG 诱导的含质粒 pXMJ19 的 W3110 为对照。结果如图 7 所示,W3110-IDO 菌体破碎液及其上清液中均出现一条分子量约 28.00 kDa 的条带,与 IDO 理论分子量 27.96 kDa 一致。结果还表明,W3110-IDO 与 BX-IDO 中重组酶的表达量无明显差异。酶活性实验表明对照菌株中未检测到 IDO 酶活性,而 W3110-IDO 中该酶比活力达 8.91 ± 0.15 nmol/(min·mg 总蛋白)。由此可见,在 W3110-IDO 中成功表达出可溶且有酶活性的重组 IDO。

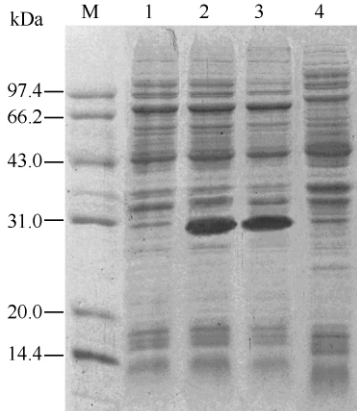


图 7. W3110-IDO 的 SDS-PAGE 电泳图谱
Figure 7. SDS-PAGE analysis of IDO expressed in W3110-IDO. M. Marker; lane 1: total cell lysate of *E. coli* W3110 harboring pXMJ19; lane 2: total cell lysate of W3110-IDO induced by IPTG; lane 3: soluble fraction of W3110-IDO induced by IPTG; lane 4: insoluble fraction of W3110-IDO induced by IPTG.

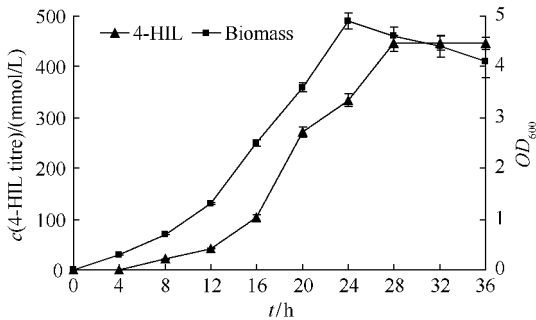


图 8. 4-HIL 的发酵过程曲线
Figure 8. Curve of 4-HIL fermentation process.

将已活化的 W3110-IDO 培养物分别接种至培养基中振荡培养 4 h 后,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 继续振荡培养,每 4 h 取样测定菌体生物量及 4-HIL 浓度,结果如图 8 所示。经 IPTG 诱导 4 h 后即有少量的 4-HIL 合成,随着 W3110-IDO 生物量的增加,4-HIL 产量逐渐提高。经 36 h 培养,最高转化率达到 89.28% (28 h,44.64 mmol/50.00 mmol)。

3 讨论

4-HIL 具有其它治疗糖尿病药物不可比拟的生物学活性,然而目前的生产技术因提取率低、分离纯化困难和有效成分少等不足而制约其生产和应用^[2-5]。IDO 的发现使得 4-HIL 的高效生物合成成为可能。

本研究从苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* TCCC 11826 克隆出的 *ido* 基因的核苷酸和氨基酸序列与已报道的 *B. thuringiensis* 2-e-2 *ido* 存在一定的差异,这可能是造成在相同条件下该酶与 L-Ile 的亲度和催化效率均高于后者的主要原因。氨基酸序列分析结果表明,该酶亦含有 Fe^{2+} 和 α -酮戊二酸依赖型羟化酶家族特有的 His¹-X-Asp/Glu-Xn-His² 基序,故属于该家族^[23]。

经鉴定该酶同样能够特异地催化 L-Ile 生成 (2S, 3R, 4S) 4-HIL,暗示可对其开发利用进行 4-HIL 的生物合成,但系统研究 IDO 的酶学性质是必要前提。本研究对获得的 IDO 进行了较为系统的酶学特性研究,发现其最适反应条件 (35℃ 和 pH 7.0) 适于大肠杆菌的生长。因此在此基础上将 *ido* 基因于 *E. coli* W3110 中过表达。摇瓶发酵实验表明,重组菌株 W3110-IDO 能够将 89.28% 的 L-Ile 转化为 4-HIL,高于同等条件下已报道的 *B. thuringiensis* 2-e-2 IDO (82.00%)^[19]。由此可见本研究所获得的 IDO 更适合于 4-HIL 的大肠杆菌转化。

Smirnov 等^[22] 采用生物信息学方法检索出 117 个 IDO 同源序列并根据其基序特征分为 6 组,然后从每组中各选取了 1 个酶进行酶学性质研究,发现选取的 6 个酶均具有 L-氨基酸羟化酶活性,但仅来源于菠萝泛菌 (*Pantoea ananatis*) AJ13355 的 L-氨基酸羟化酶 (Accession No. BAK13117.1, 与 TCCC 11826 IDO 氨基酸序列相似性为 32.26%) 具有催化 L-Ile 生成 (2S, 3R, 4S) 4-HIL 的活性,而其亲和度和催化效率较 *B. thuringiensis* TCCC 11826 和 2-e-2 的 IDO 低 [该酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 5.10 mmol/L 和 0.80 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]。

本研究以常用表达系统 pET-42a 和 *E. coli* BL21 (DE3) 过表达 *ido* 基因以用于重组 IDO 的收集,但起初形成大量包涵体,经优化条件后方获得部分可溶性的重组蛋白,可能由于 pET-42a 的 T7 启动

子强度过大,使得 *ido* 基因转录和表达量过高引起重组蛋白的错误折叠。将转录强度较 pET-42a 低的表达载体 pXMJ-IDO (含 tac 启动子) 于 *E. coli* BL21 (DE3) 中可表达出可溶性且浓度相近的重组酶。由于 *E. coli* W3110 常作为选育工业生产菌的出发菌株,而且采用重组质粒 pXMJ-IDO 于 *E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* W3110 中的表达量 (图 3 和图 7) 及重组菌的 4-HIL 转化率未见明显差异 (分别为 90.15% 和 89.28%,结果未显示),所以采用重组质粒 pXMJ19-IDO 和 *E. coli* W3110 作为 *ido* 基因表达系统进行 4-HIL 的微生物转化。

虽然本研究实现了 4-HIL 的生物合成,但其转化效率仍有大幅度提高的空间。增加 4-HIL 的积累一方面取决于 IDO 的活性。众所周知,酶的活性由其自身酶学性质及表达量决定,因此今后的工作将集中于对 *ido* 的筛选和定向进化,以期获得活性更高、稳定性更好的突变体。同时将 *ido* 克隆到不同拷贝数载体上或整合到宿主基因组上,获得最适于 4-HIL 积累的 IDO 表达方式。另一方面,4-HIL 的过量合成还取决于宿主对底物的摄取和 4-HIL 的输出速率。有研究表明,大肠杆菌中 L-Ile 的摄取主要依赖载体蛋白 LivJ^[24],但 4-HIL 的输出是否需要载体,目前还未见研究报道。因此在后续研究中可增加 *livJ* 的表达量以达到增加 L-Ile 的摄取从而提高 4-HIL 产量的目的。在上述研究基础上最终获得适用于 4-HIL 工业化生产的菌株。

氨基酸及其衍生物的开发应用一直是国际生物技术领域的热点。近年来,应用微生物制造技术来改进氨基酸衍生物的生产方式也倍受关注。本研究可为 4-HIL 的微生物制造技术奠定理论基础同时将为其它氨基酸衍生物的生产技术改进提供借鉴,促进氨基酸衍生物的开发。

参考文献

- [1] Fowden L, Pratt HM, Smith A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry*, 1973, 12 (7) : 1707-1711.
- [2] Al-Habori M, Raman A. Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. *Phytotherapy Research*, 1998, 12 (4) : 233-242.
- [3] Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, Gross R, Roye M, Leconte A, Gomis R, Ribes G. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes*, 1998, 47

- (2) : 206-210.
- [4] Broca C, Manteghetti M, Gross R, Baissac Y, Jacob M, Petit P, Sauvaire Y, Ribes G. 4-Hydroxyisoleucine: effects of synthetic and natural analogues on insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 390 (3) : 339-345.
 - [5] Broca C, Breil V, Cruciani-Guglielmacci C, Manteghetti M, Rouault C, Derouet M, Rizkalla S, Pau B, Petit P, Ribes G, Ktorza A, Gross R, Reach G, Taouis M. Insulinotropic agent ID-1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2004, 287 (3) : 463-471.
 - [6] Broca C, Gross R, Petit P, Sauvaire Y, Manteghetti M, Tournier M, Masiello P, Gomis R, Ribes G. 4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 1999, 277 (4) : 617-623.
 - [7] Narender T, Puri A, Shweta, Khaliq T, Saxena R, Bhatia G, Chandra R. 4-hydroxyisoleucine an unusual amino acid as antidyslipidemic and antihyperglycemic agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16 (2) : 293-296.
 - [8] Haeri MR, Limaki HK, White CJ, White KN. Non-insulin dependent anti-diabetic activity of (2S, 3R, 4S) -4-hydroxyisoleucine of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *Phytomedicine*, 2012, 19 (7) : 571-574.
 - [9] Jaiswal N, Maurya CK, Venkateswarlu K, Sukanya P, Srivastava AK, Narender T, Tamrakar AK. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *European Journal of Nutrition*, 2012, 51 (7) : 893-898.
 - [10] Haeri MR, Izaddoost M, Ardekani MR, Nobar MR, White KN. The effect of fenugreek 4-hydroxyisoleucine on liver function biomarkers and glucose in diabetic and fructose-fed rats. *Phytotherapy Research*, 2009, 23 (1) : 61-64.
 - [11] Wang Q, Quazzani J, Sasaki NA, Potier P. A practical synthesis of (2S, 3R, 4S) -4-hydroxyisoleucine, a potent insulinotropic α -amino acid from fenugreek. *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, 5 : 834-839.
 - [12] Aouadi K, Jeanneau E, Msaddek M, Praly JP. 1, 3-Dipolar cycloaddition of a chiral nitron to (*E*)-1, 4-dichloro-2-butene: a new efficient synthesis of (2S, 3S, 4R) -4-hydroxyisoleucine. *Tetrahedron Letters*, 2012, 53 (23) : 2817-2821.
 - [13] Smirnov SV, Samsonova NN, Novikova AE, Matrosov NG, Rushkevich NY, Kodera T, Ogawa J, Yamanaka H, Shimizu S. A novel strategy for enzymatic synthesis of 4-hydroxyisoleucine: identification of an enzyme possessing HMKP (4-hydroxy-3-methyl-2-keto-pentanoate) aldolase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 273 (1) : 70-77.
 - [14] Ogawa J, Yamanaka H, Mano J, Doi Y, Horinouchi N, Kodera T, Nio N, Smirnov SV, Samsonova NN, Kozlov YI, Shimizu S. Synthesis of 4-hydroxyisoleucine by the aldolase-transaminase coupling reaction and basic characterization of the aldolase from *Arthrobacter simplex* AKU 626. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71 (7) : 1607-1615.
 - [15] Haefel C, Bonfils C, Sauvaire Y. Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis. *Phytochemistry*, 1997, 44 (4) : 563-566.
 - [16] Kodera T, Smirnov SV, Samsonova NN, Kozlov YI, Koyama R, Hibi M, Ogawa J, Yokozeki K, Shimizu S. A novel L-isoleucine hydroxylating enzyme, L-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2S, 3R, 4S) -4-hydroxyisoleucine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390 (3) : 506-510.
 - [17] Ogawa J, Kodera T, Smirnov SV, Hibi M, Samsonova NN, Koyama R, Yamanaka H, Mano J, Kawashima T, Yokozeki K, Shimizu S. A novel L-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2S, 3R, 4S) -4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89 (6) : 1929-1938.
 - [18] Hibi M, Kawashima T, Kodera T, Smirnov SV, Sokolov PM, Sugiyama M, Shimizu S, Yokozeki K, Ogawa J. Characterization of *Bacillus thuringiensis* L-isoleucine dioxygenase for production of useful amino acids. *Applied Environmental Microbiology*, 2011, 77 (19) : 6926-6930.
 - [19] Smirnov SV, Kodera T, Samsonova NN, Kotlyarova VA, Rushkevich NY, Kivero AD, Sokolov PM, Hibi M, Ogawa J, Shimizu S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S, 3R, 4S) -4-hydroxyisoleucine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88 (3) : 719-726.
 - [20] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 2-137.

- [21] 宋存江, 刘方, 路福平, 主编. 天津市微生物菌种目录. 北京: 化学工业出版社. 2011: 45; 206.
- [22] Smirnov SV, Sokolov PM, Kodera T, Sugiyama M, Hibi M, Shimizu S, Yokozeki K, Ogawa J. A novel family of bacterial dioxygenases that catalyse the hydroxylation of free L-amino acids. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 331 (2) : 97-104.
- [23] Hausinger RP. FeII/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 39 (1) : 21-68.
- [24] Park JH, Oh JE, Lee KH, Kim JY, Lee SY. Rational design of *Escherichia coli* for L-isoleucine production. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1 (11) : 532-540.

Characterization of recombinant L-isoleucine-4-hydroxylase from *Bacillus thuringiensis* and its application in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis

Chenglin Zhang^{1, 2, 3*}, Yuan Liu^{1, 2, 3*}, Ning Xue^{3, 4}, Xinxin Wang³, Xixian Xie^{1, 2, 3}, Qingyang Xu^{1, 2, 3}, Ning Chen^{1, 2, 3*}

¹ National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, Tianjin 300457, China

³ College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

⁴ Tianjin Nankai High School, Tianjin 300100, China

Abstract: [Objective] L-isoleucine-4-hydroxylase (IDO) encoding gene *ido* from *Bacillus thuringiensis* TCCC 11826 was cloned and expressed, followed by enzyme characterization. In addition, recombinant strain was tested for its 4-Hydroxyisoleucine (4-HIL) biotransformation. [Methods] *Ido* gene was amplified from *B. thuringiensis* TCCC 11826 genomic DNA and expressed in BL-IDO. Recombinant IDO was extracted, purified and characterized. Recombinant strain used for biotransformation of 4-HIL was constructed. [Results] Composed of 723 nucleotides encoding 240 amino acids (sharing 97.47% and 97.91% identities with that of *B. thuringiensis* 2-e-2), *ido* gene was cloned from *B. thuringiensis* TCCC 11826. The recombinant IDO contained a His¹-X-Asp/Glu-Xn-His² motif that is specific for Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and catalyzed L-isoleucine to 4-HIL. Normal hyperbolic kinetics was observed with L-Ile in the reaction by recombinant IDO. Lineweaver-Burk treatment of the data yielded apparent K_m and the V_{max} was 0.18 mmol/L and 2.10 μ mol/min/mg, respectively. The optimum temperature and pH for the recombinant IDO was 35°C and 7.0 respectively; moreover, the relative activity of the enzyme remain 85.10% after 5 h incubation at 35°C. In all, recombinant strain harboring *ido* transformed 89.28% of L-isoleucine to 4-HIL. [Conclusion] In this study, an *ido* (Accession No. KC884243) with novel sequence was isolated and enzymatic characteristics of recombinant IDO was systematically analyzed. In addition, we successfully achieved the biotransformation of 4-HIL from L-isoleucine. This work will lay theoretical foundation and practical basis on the microbial manufacture technology of 4-HIL and other amino acid derivatives. This work will lay theoretical foundation and practical basis on the microbial manufacture technology of 4-HIL and other amino acid derivatives.

Keywords: 4-Hydroxyisoleucine, L-isoleucine-4-hydroxylase, enzymatic characteristics, *Bacillus thuringiensis*, microbial transformation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300069) and by the Key Science and Technology Support Program of Tianjin (12ZCZDSY01900)

*Those authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel: +86-22-60601251; Fax: +86-22-60602298; E-mail: ningch@tust.edu.cn

Received: 18 December 2013/Revised: 28 March 2014