

• 工业生物技术 •

亮氨酸脱氢酶 C 端 Loop 区域的理性设计及多酶级联高效合成 L-2-氨基丁酸

陈佳杰, 徐美娟, 杨套伟, 张显, 邵明龙, 李华钟, 饶志明

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

陈佳杰, 徐美娟, 杨套伟, 等. 亮氨酸脱氢酶 C 端 Loop 区域的理性设计及多酶级联高效合成 L-2-氨基丁酸. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4254-4265.

Chen JJ, Xu MJ, Yang TW, et al. Rational design of the C-terminal Loop region of leucine dehydrogenase and cascade biosynthesis L-2-aminobutyric acid. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4254-4265.

摘要: 亮氨酸脱氢酶 (Leucine dehydrogenase, LDH) 是制备 L-2-氨基丁酸的关键限速酶, 针对该酶的 Loop 区域进行改造以提高关键酶的酶活及稳定性从而高效合成 L-2-氨基丁酸。通过亮氨酸脱氢酶的分子动力学模拟分析均方根涨落 (Root mean square fluctuation, RMSF) 值, 对其波动非常明显的 Loop 区域合理设计以得到比酶活提高的截短突变体 EsLDH_{D2}, 其比酶活为野生型的 123.2%; 此外, 由于 L-2-氨基丁酸制备过程中苏氨酸脱氢酶催化 L-苏氨酸制备 2-酮丁酸的速率过快导致多酶催化不平衡, 因此双拷贝亮氨酸脱氢酶及甲酸脱氢酶以平衡多酶催化速率, 构建多酶级联催化的单细胞 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM, 其摩尔转化率相较于 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RO 提高 74.6%; 对菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 的全细胞转化条件进行优化, 其最适 pH、温度、底物浓度分别为 7.5、35 °C 和 80 g/L, 此时摩尔转化率大于 99%; 在 1 L 转化体系和最适转化条件下分批加入 L-苏氨酸 80 g 和 40 g, L-2-氨基丁酸的产量达 97.2 g。总之, 该策略为 L-2-氨基丁酸的制备提供了绿色、高效的合成方法, 具有工业化制备药物前体的巨大潜力。

关键词: 亮氨酸脱氢酶, L-2-氨基丁酸, Loop 区域, 多酶级联催化, 全细胞转化

Received: January 20, 2021; **Accepted:** March 19, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900300), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31770058, 32070035), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20181205), Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region, China (No. 2019BCH01002), National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering, China (No. LITE2018-06) and the 111 Project, China (No. 111-2-06).

Corresponding authors: Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Huazhong Li. Tel: +86-510-85913650; E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900300), 国家自然科学基金 (Nos. 31770058, 32070035), 江苏省自然科学基金 (No. BK20181205), 宁夏回族自治区重点研究开发计划 (No. 2019BCH01002), 国家轻工业技术与工程一流学科计划 (No. LITE2018-06) 和 111 项目 (No. 111-2-06) 资助。

Rational design of the C-terminal Loop region of leucine dehydrogenase and cascade biosynthesis L-2-aminobutyric acid

Jiajie Chen, Meijuan Xu, Taowei Yang, Xian Zhang, Minglong Shao, Huazhong Li, and Zhiming Rao

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

Abstract: Leucine dehydrogenase (LDH) is the key rate-limiting enzyme in the production of L-2-aminobutyric acid (L-2-ABA). In this study, we modified the C-terminal Loop region of this enzyme to improve the specific enzyme activity and stability for efficient synthesis of L-2-ABA. Using molecular dynamics simulation of LDH, we analyzed the change of root mean square fluctuation (RMSF), rationally designed the Loop region with greatly fluctuated RMSF, and obtained a mutant EsLDH_{D2} with a specific enzyme activity 23.2% higher than that of the wild type. Since the rate of the threonine deaminase-catalyzed reaction converting L-threonine into 2-ketobutyrate was so fast, the multi-enzyme cascade catalysis system became unbalanced. Therefore, the LDH and the formate dehydrogenase were double copied in a new construct *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM. Compared with *E. coli* BL21/pACYCDuet-RO, the molar conversion rate of L-2-ABA increased by 74.6%. The whole cell biotransformation conditions were optimized and the optimal pH, temperature and substrate concentration were 7.5, 35 °C and 80 g/L, respectively. Under these conditions, the molar conversion rate was higher than 99%. Finally, 80 g and 40 g L-threonine were consecutively fed into a 1 L reaction mixture under the optimal conversion conditions, producing 97.9 g L-2-ABA. Thus, this strategy provides a green and efficient synthesis of L-2-ABA, and has great industrial application potential.

Keywords: leucine dehydrogenase, L-2-aminobutyric acid, Loop region, multi-enzyme cascade catalysis, whole cell transformation

L-2-氨基丁酸 (L-2-aminobutyric acid, L-2-ABA) 是一种非天然手性氨基酸, 用于抑制人类神经信息的传递, 促进脑细胞代谢^[1], 因此被广泛用作手性药物的前体。它可以通过酰胺化制备 (S)-2-氨基丁酰胺, 是制备抗癫痫药物左乙拉西坦和布瓦西坦的关键前体^[2]; 也可以通过还原 L-2-ABA 制备 (S)-2-氨基丁醇, 是抗结核药物乙胺丁醇的关键手性中间体^[3]。目前, L-2-ABA 主要是通过化学法或生物法制备。传统的化学制备因成本高、能耗高、污染严重、光学纯度低等缺点失去了竞争力^[4]。因此, L-2-ABA 的生物制备已成为当今的研究热点, 主要用于合成的生物催化剂包括氨基酰化酶^[5]、氨基酸氧化酶^[6]、腈水解酶^[7]、转氨酶^[8]、脱氢酶^[9]等, 其中利用氨基酸脱氢酶催化 α -酮酸的不对称还原胺化最具

工业前景, 除应用最广泛的大肠杆菌外, Weber 等^[10]利用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 作为全细胞生物催化剂, 通过外源添加 L-苏氨酸将 L-2-氨基丁酸产量提高至 1.7 mg/L。近些年来, 以 L-苏氨酸为底物, 苏氨酸脱氨酶 (Threonine deaminase, TD)、亮氨酸脱氢酶 (Leucine dehydrogenase, LDH)、甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase, FDH) 一锅法转化制备 L-2-ABA, 收率为 97.3%^[11]。然而, 上述方法需要构建两种单基因单独表达或双基因共表达的生物催化剂, 并严格配比不同重组酶所需添加的酶量、操作烦琐, 增加了生产成本和工艺要求。因此, 亟需构建多酶级联催化的单细胞以实现同一宿主的多酶共表达。

亮氨酸脱氢酶 (EC1.4.1.9) 以烟酰胺腺嘌呤

二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 为辅因子催化 α -酮酸的还原胺化且产物分离提取简单、纯度高、适合大规模的工业化生产, 因此被广泛用于非天然氨基酸的制备, 例如, L-叔亮氨酸^[12]、L-2-ABA^[13]、(S)-1-环丙基-2-甲基乙胺^[14]等。在最近的研究中, 来源于芽孢杆菌 *Bacillus*^[15]、嗜冷芽孢八叠球菌 *Sporosarcina psychrophila*^[16]、西伯利亚杆菌 *Exiguobacterium sibiricum*^[12]、*Alcanivorax dieselolei*^[17]及 *Laceyella sacchari*^[18]的 LDHs 已经被克隆表达并且酶学性质也已被鉴定, 表现出潜在的工业价值, 例如来源于 *Exiguobacterium sibiricum* 的 LDH 在 α -酮酸的还原胺化中表现出较高的活性且在 60 °C 下的半衰期较长。很多研究显示利用蛋白质工程技术对氨基酸脱氢酶进行分子改造, 但 LDH 作为被广泛工业化应用的关键限速酶, 其改造进展相对较少。Zhu 等^[19]使用高通量筛选 LDH 文库, 其中突变体 A43V 增加了底物结合口袋的疏水性; Xu 等^[20]应用一种半理性设计改造 LDH, 定点饱和突变得得到一株 k_{cat}/K_m 提高了 44.5 倍的 Q358N 突变株。因此, 作为 L-2-ABA 生产中的关键和限速酶, 理性设计改造 LDH 提高其催化活性、构建多酶级联催化的单细胞是本研究的重中之重。

本研究将来源于 *E. sibiricum* 的亮氨酸脱氢酶与底物 2-酮丁酸 (2-ketobutyric acid, 2-OBA) 对接, 再利用分子动力学模拟软件计算分析, 发现该酶的均方根涨落 (Root mean square fluctuation, RMSF) 值在 361–373 位氨基酸之间有剧烈波动, 因此对该 Loop 区域合理设计、适当截短该区域的长度, 获得了一株比酶活及稳定性均得到改善的突变株, 并将其运用至 L-2-ABA 的生物制备中; 此外, 由于 L-2-ABA 制备过程中苏氨酸脱氢酶催化 L-苏氨酸制备 2-OBA 的速率过快导致 2-OBA 积累, 使得 LDH 酶活在高浓度 2-OBA 存在下被严重抑制, 同时 FDH 提供再生的辅因子 NADH 不能满足反应的需要, 使得多酶催化更加不平衡, 因此双拷贝 LDH 及 FDH 可以平衡多酶催化速率, 构建多酶级联催化的单细胞 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM (图 1)。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 及表达质粒 pET28a (+) 由本实验室保藏; 重组质粒 pET28a-*Esldh* 由本研究构建。本研究使用的引物见表 1。

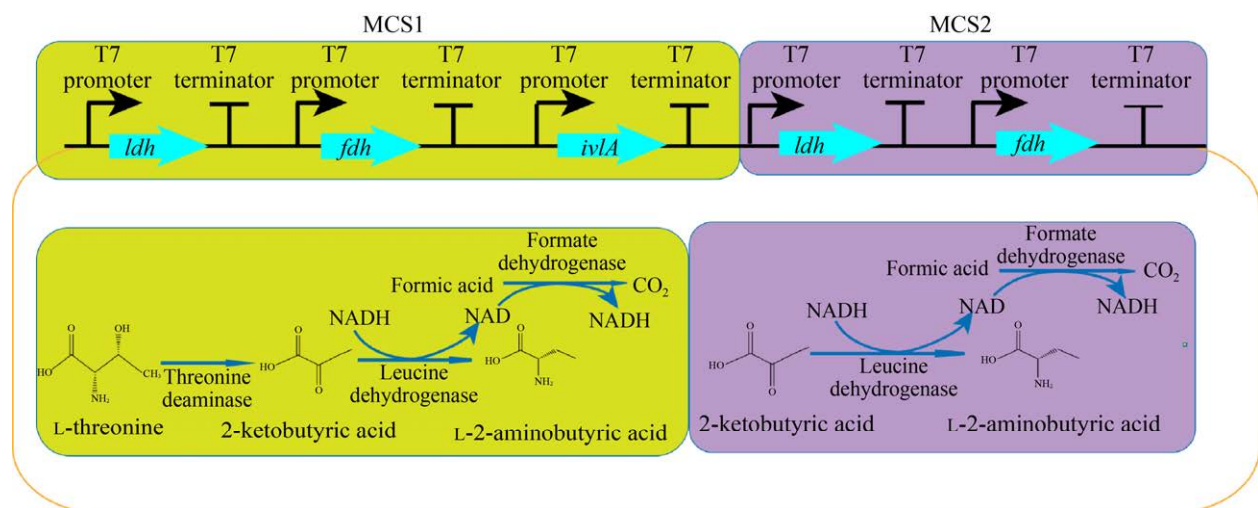


图 1 多酶级联表达制备 L-2-氨基丁酸的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparing L-2-aminobutyric acid by multi-enzyme cascade biosynthesis.

表 1 本研究所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
DF	AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGTGGAAACCAATGTGGAAG
D1 R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAACTGCGGGCGCTACC
D2 R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTACAGAACTGACTGCGGGC
D3 R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAAATGTTCTTATCGCGACGCAGA
ES F	ATCACCACAGCCAGGATCCAATGGTGGAAACCAATGTGGAAG
ES-FDH R	AATCCCCTATAGTGAGTCGTATTATTACAGAACTGACTGCGGGC
ES-FDH F	CCCGCAGTCAGTTTCTGTAATAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG
FDH-TD R	CCCTATAGTGAGTCGTATTATTATTCTTATCGTGTTCACCGTAAGCTTT
FDH-TD F	GTAAACACGATAAGAAATAATAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG
TD R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTCTAACCCGCCAAAAGAACCT
pACYCDuet-MCS1 F	<u>AAGCTT</u> GCGGCCGATAA
pACYCDuet-MCS1 R	TGGATCCTGGCTGTGGTG
pACYCDuet-MCS2 F	<u>CTCGAGT</u> CTGGTAAAGAAACCG
pACYCDuet-MCS2 R	<u>GGTACCG</u> ACGTCAGCGATC

Restriction sites are shown in underlined parts.

ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit、2×Phanta[®] Max Master Mix、DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; *Bam*H I 和 *Hind* III 等限制性内切核酸酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司; L-2-ABA、2-OBA、氯霉素、卡那霉素等购自上海阿拉丁生化科技有限公司。

1.2 培养基

LB 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0); 发酵 TY 培养基 (酵母提取物 8 g/L, 胰蛋白胨 12 g/L, K₃PO₄ 4 g/L, NaCl 3 g/L, 一水合柠檬酸 2.1 g/L, 柠檬酸铁铵 0.3 g/L, 甘油 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, pH 7.0), 补料培养基 (甘油 400 g/L, 酵母提取物 50 g/L, 胰蛋白胨 25 g/L) 用于 5 L 发酵罐发酵。

1.3 突变体的构建

使用表 1 引物、以 pET28a-*Esl*dh 质粒为模板扩增片段, 将其连接到表达载体 pET28a 上, 并将重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 经过测序及单双酶切验证构建突变体 *E. coli*/pET28a-*Esl*dh_{Dx}。

1.4 蛋白的表达与纯化

将重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*Esl*dh_{Dx} 接种到含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养 10–12 h 后, 转接、培养至 OD₆₀₀ 为 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG), 于 25 °C 诱导培养后, 4 °C、8 000 r/min 离心收集菌体, 用 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤菌体, 菌悬液冰浴超声破碎, 4 °C、8 000 r/min 离心取上清用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[21]。

利用镍离子亲和层析柱纯化^[22]。通过观察紫外吸收峰收集洗脱液, SDS-PAGE 分析, 其余纯酶用于下一步酶活测定及酶学性质研究, 以牛血清白蛋白 BSA 为标准品、Bradford 法测定蛋白浓度^[23]。

1.5 酶活力的测定

使用分光光度计监测 340 nm 处的吸光度差值, LDH 酶活测定体系: 0.9 mol/L NH₄Cl-NH₃·H₂O 缓冲液 (pH 9.0), 10 mmol/L 2-OBA, 0.3 mmol/L NADH 和适量纯酶^[24]。酶活力定义为: 在上述条

件下,每分钟消耗 1 μmol NADH 所需要的酶量定义为一个酶活单位 (1 U)。

1.6 酶学性质的研究

酶的最适反应 pH 及温度: 改变缓冲液的 pH (Tris-HCl, pH 6.0–7.0; $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0–10.0, 每组间隔 1), 测定最适 pH; 在不同温度 (30 $^\circ\text{C}$ 、35 $^\circ\text{C}$ 、40 $^\circ\text{C}$ 、45 $^\circ\text{C}$ 、50 $^\circ\text{C}$ 、55 $^\circ\text{C}$ 、60 $^\circ\text{C}$ 、70 $^\circ\text{C}$) 下测定最适温度, 以最高酶活定义为 100%。

温度稳定性研究: 将纯酶放置于不同温度的缓冲液 (30 $^\circ\text{C}$ 、35 $^\circ\text{C}$ 、40 $^\circ\text{C}$ 、45 $^\circ\text{C}$ 、50 $^\circ\text{C}$ 、55 $^\circ\text{C}$ 、60 $^\circ\text{C}$) 中, 每隔一段时间测定酶活。以 0 h 相对酶活定义为 100%。

动力学参数研究: 改变底物浓度 (分别为 0.5、1、2、4、6、8 mmol/L), 测定酶活力。以 Hill 方程 $V=V_{\max}(S_n)/(K_n+S_n)$ 进行线性拟合。

1.7 分子动力学模拟

SWISS-MODEL Workspace 用于预测三维结构模型^[24]。所有蛋白的 MD 模拟均使用 GROMACS 和 GROMOS96 43A1 AMBER force field^[25]。使用 AUTODOCK Vina 将底物 2-OBA 分子对接至蛋白质结构中^[26]。通过将该蛋白置于十二面体中添加抗衡离子, 并使能量最小化, 在确定温度及压力的环境下平衡 NVT 体系并进行模拟, 模拟时长 30 ns, 步长 2 fs, 水分子模型为 spc216, 溶剂模型为显式。

1.8 多酶级联单细胞的构建

以质粒 pET28a-*Esl dh*、pET28a-*ilvA*、pET28a-*fdh* 为模板扩增均包含 T7 启动子的 *Esl dh*、*ilvA*、*fdh* 基因, 使用重叠延伸 PCR 构建多酶级联的重组菌株。先将 *Esl dh*-*fdh*-*ilvA* 的大片段融合、扩增、与表达质粒 pACYCDuet 的第一个多克隆位点连接以获得重组质粒 pACYCDuet-*Esl dh*-*fdh*-*ilvA*, pACYCDuet-*Esl dh*_{D2}-*fdh*-*ilvA*。将

得到的重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 得到重组菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RO 和 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RT。将融合后的片段 *Esl dh*_{D2}-*fdh* 扩增, 连接到构建好的重组质粒的第二个多克隆位点处, 最终得到重组菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM (图 2)。

1.9 全细胞转化制备 L-2-ABA 条件优化

发酵培养重组菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM, 离心、收集菌体用于全细胞转化。转化体系为 200 mL, 包括 L-苏氨酸、甲酸铵、菌体及 PB 缓冲液 (100 mmol/L)。

转化初始 pH 的优化: 控制反应温度为 30 $^\circ\text{C}$, L-苏氨酸 100 g/L、甲酸铵 60 g/L, 菌体 *OD*₆₀₀ 为 60, 初始 pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的条件下进行全细胞转化反应, 并以不控制 pH 的转化条件作为对照。

转化温度优化: 控制初始反应 pH 7.5, 反应温度分别为 25 $^\circ\text{C}$ 、30 $^\circ\text{C}$ 、35 $^\circ\text{C}$ 、40 $^\circ\text{C}$ 、45 $^\circ\text{C}$ 、50 $^\circ\text{C}$ 的条件下进行全细胞转化反应。

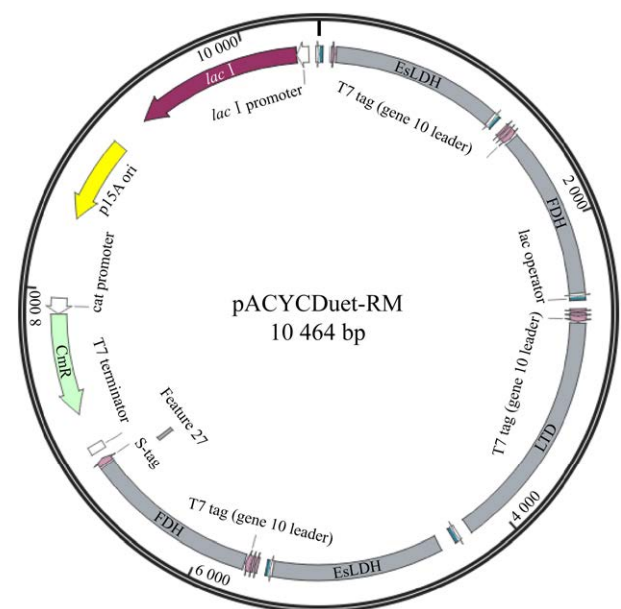


图 2 pACYCDuet-RM 质粒的图谱

Fig. 2 Map of the plasmid pACYCDuet-RM.

底物浓度的优化: 控制反应温度 35 °C, 初始 pH 7.5, 分别设置 L-苏氨酸浓度为 40 g/L、60 g/L、80 g/L、100 g/L、120 g/L 进行全细胞转化。

1.10 HPLC 分析方法

底物 L-苏氨酸和产物 L-2-ABA 的浓度通过安捷伦 LC1260 型号的高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 系统进行测定, 其检测方法是通过对 OPA FMOC 在线衍生化来测定, HPLC 色谱条件为: C18 色谱柱, 流速为 1 mL/min, 柱温 40 °C, 波长 338 nm 的紫外检测器下检测, 流动相为盐相与有机相梯度洗脱, 具体方法参考文献[10]。

中间产物 2-OBA 属于有机酸, 利用安捷伦 LC1260 型号的高效液相色谱系统来测定。其 HPLC 色谱条件为: Aminex HPX-87H 有机酸分析柱, 流速为 0.5 mL/min, 柱温 35 °C, 波长 210 nm 处的紫外检测器下检测, 流动相为 0.272% 的稀硫酸水溶液。

2 结果与分析

2.1 亮氨酸脱氢酶截短区域的选择及其突变体的构建

对于 EsLDH 蛋白, 通过分子动力学模拟对接底物小分子之后分析 RMSF 的变化, 找到 EsLDH 最灵活的区域, 该区域可能导致蛋白质分子不稳定。如图 3 所示, 在氨基酸 361–374 位之间即 Loop 区域中观察到最大的波动, 其中氨基酸 361–364 位的 RMSF 值剧烈升高, 364–370 位的 RMSF 值剧烈减低, 370–374 位的 RMSF 值又急剧上升, 表明该区域及其不稳定。因此, 删除 Loop 区域与 RMSF 值相关的氨基酸包括 361–374 位、364–374 位、370–374 位将其命名为 EsLDH_{D1}、EsLDH_{D2}、EsLDH_{D3}。

将 PCR 产物导入 *E. coli* BL21(DE3) 宿主中, 涂布于抗性平板。挑选转化子培养提取质粒进行单、双酶切验证, 验证结果如图 4 所示,

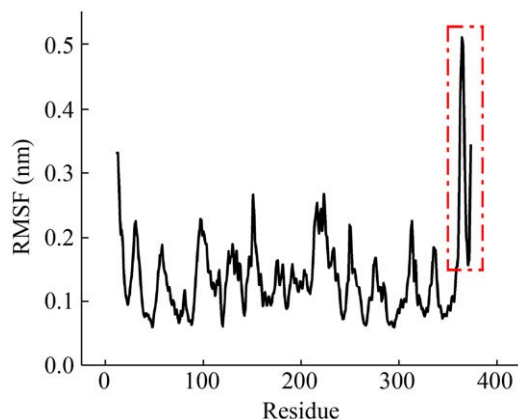


图 3 野生型 EsLDH 的 RMSF 值

Fig. 3 The RMSF value of the wild-type EsLDH. The part framed by the red dashed line indicates the area where the RMSF value fluctuates the most.

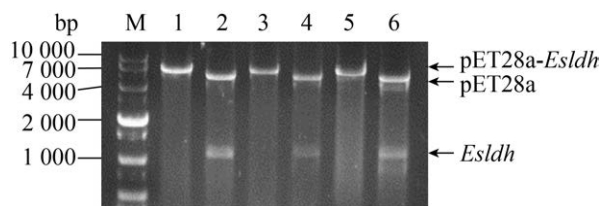


图 4 截短突变体的构建

Fig. 4 Construction of truncated mutants. Single and double restriction digestion verification of plasmid pET28a-Esldh gene. M: DL10 000 marker; lane 1–2: Esldh_{D1}; lane 3–4: Esldh_{D2}; lane 5–6: Esldh_{D3}.

在 1 000–2 000 bp 之间有明亮条带, 符合 Esldh 长度大小, 在 4 000–7 000 bp 之间有明亮条带, 符合 pET28a 和 pET28a-Esldh 线性化后的长度大小, 证明基因已成功导入 *E. coli* BL21 中。将验证成功的突变株测序。

2.2 野生型及突变体的蛋白表达及纯化

将野生型 EsLDH 及截短突变体 EsLDH_{D1}、EsLDH_{D2}、EsLDH_{D3} 发酵培养、超声波破碎取上清。

通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化酶蛋白, SDS-PAGE 检测纯化结果。如图 5 所示, 所有酶蛋白均在 44.3 kDa 左右有单一且清晰的条带, 与理论分子量一致。

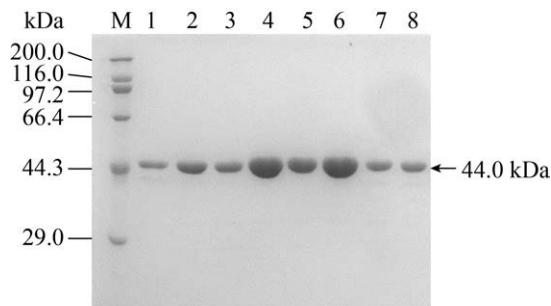


图5 野生型 EsLDH 及突变体的纯化

Fig. 5 Purification of the wild-type EsLDH and its mutants. M: protein marker; lane 1–2: EsLDH_{D1}; lane 3–4: EsLDH_{D2}; lane 5–6: EsLDH_{D3}; lane 7–8: EsLDH.

2.3 比酶活的测定及酶学性质的分析

2.3.1 野生型 EsLDH 与突变体的相对比酶活

以野生型为对照,取同等蛋白浓度的纯酶测定其相对比酶活,结果如图6所示,以野生型蛋白 EsLDH 的比酶活为100%,截短突变体 D2 的相对比酶活较高(123.2%),其余截短突变体的比酶活均有所降低,分别为39.9%和74.8%。这个结果说明截短 Loop 处的氨基酸确实可以大幅影响酶活力,而且364–374位氨基酸的截短则显著提高了比酶活。对该突变体做进一步的酶学性质的研究。

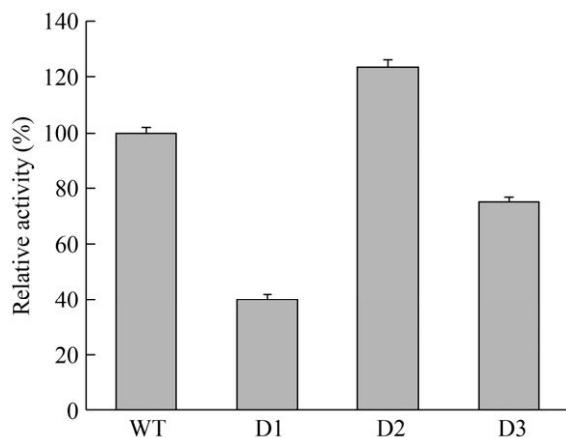


图6 野生型 EsLDH 及突变体的相对比酶活

Fig. 6 Relative enzyme activity of the wild-type EsLDH and its mutants. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

2.3.2 野生型 EsLDH 与突变体的最适温度和 pH

由图7A可知,突变体 EsLDH_{D2} 与野生型的最适温度为55 °C。在30–55 °C的范围内,酶活力随温度升高而升高,而在55 °C之后酶活力开始降低,当温度超过60 °C时,催化活性显著下降。由图7B可知,突变体 EsLDH_{D2} 与野生型的最适 pH 为9.0,而且在中性和碱性条件下的相对催化活性明显高于野生型。当缓冲环境为碱性时酶活力普遍偏高说明该酶偏好碱性环境。

2.3.3 野生型 EsLDH 与突变体的热稳定性

图7C是在不同温度下孵育12 h后,野生型和突变体 EsLDH_{D2} 的相对酶活力。随着孵育温度的不断升高,残余酶活不断降低。当突变体在30–55 °C孵育12 h后的残余相对酶活均明显高于野生型,但6 °C的相对酶活仅为18.7%。当相对酶活力下降至最初状态的一半时的时间即为酶的半衰期。由图7D可知,野生型在最适温度下的半衰期为8 h,突变体 EsLDH_{D2} 的半衰期较野生型提高了2.4 h,为10.4 h。目前推测截短相关的 Loop 区域有利于比酶活的提高,同时也提高了热稳定性。

2.3.4 野生型 EsLDH 与突变体的动力学参数

以2-OBA为底物测量野生型 LDH 及其突变体的动力学参数(表2)。结果表明,EsLDH_{D2} 的 K_m 值比野生型低近8.2倍, k_{cat}/K_m 值比野生型高4倍,说明 EsLDH_{D2} 显著提高了对于底物2-OBA的亲合力和催化效率。

2.4 分子动力学模拟

根据网站预测(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>),EsLDH 的4个活性中心分别为G51、K77、K89和D124。根据预测的LDH的2-OBA结合通道,使用AUTODOCK Vina将底物2-OBA分子对接到蛋白质结构中,关键活性位点及所需截短的区域均在图8A中显示。使用GROMACS进行分子动力学模拟。RMSD的结果表明,突变体的结构相较于野生型更稳定;RMSF值与野生型

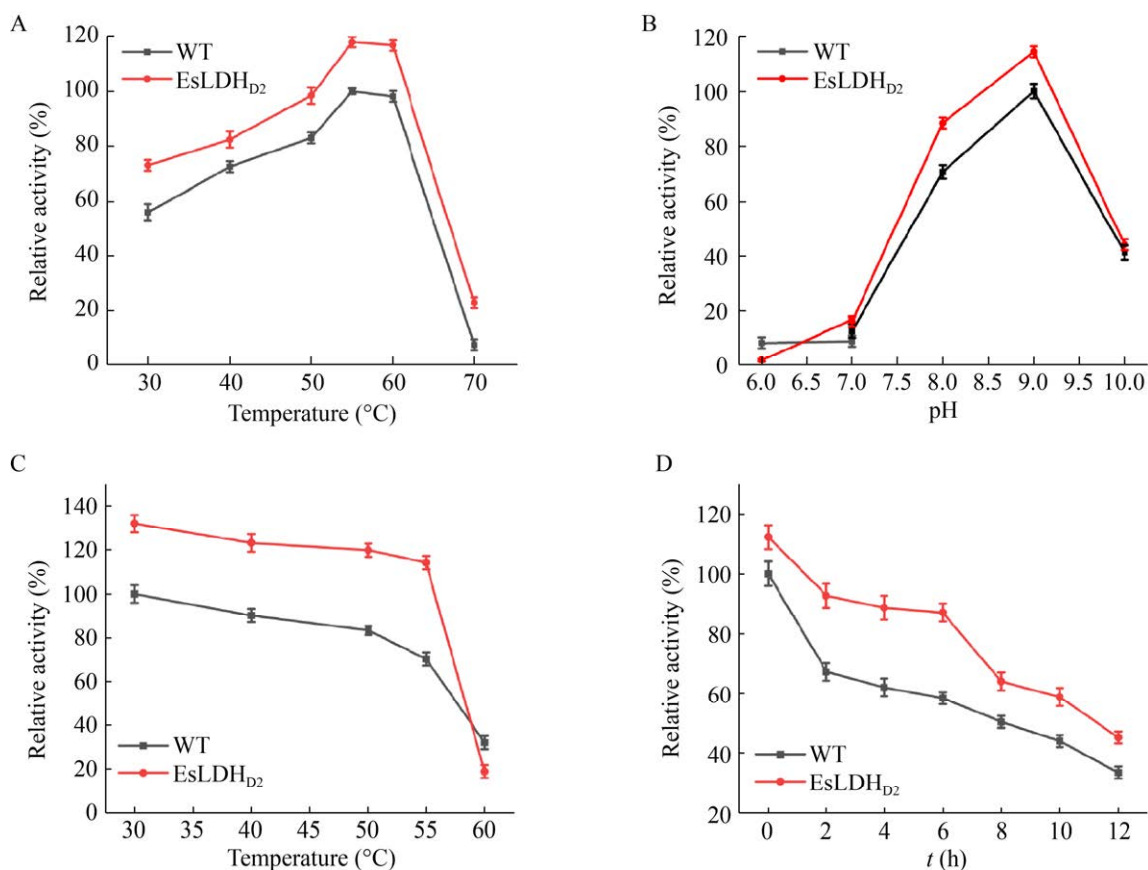


图 7 野生型 EsLDH 及突变体的酶学性质研究

Fig. 7 Enzymatic properties of the wild-type EsLDH and its mutants. (A) The optimal temperature. (B) The optimal pH. (C) Residual activity after incubated for 12 h at different temperatures. (D) Residual activity incubated at 60 °C. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

表 2 野生型及突变体的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the wild-type LDH and its mutant

	WT	EsLDH _{D2}
K_m (mmol/L)	0.905±0.090	0.110±0.029
k_{cat} (s ⁻¹)	0.296±0.024	0.147±0.027
k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	0.327	1.336

无较大差异；回旋半径 R_g 定义为旋转系统中轴到最大惯性点的距离，其显著降低表明截短后蛋白构象的紧密性更好，这很好地解释了截短后突变体的热稳定性显著提高的现象 (图 8B)。有文献显示，删除暴露的 Loop 区域可以提高稳定性且 Loop 的长度和稳定性之间呈现负相关，通过缩短

环的长度来增加稳定性^[25-26]。除此之外，我们推测 C 端 Loop 区域的截短导致底物进入结合通道的空间变大，底物更易结合导致酶活提高。通过 MMPBSA 方法计算了底物与蛋白之间的结合自由能，野生型体系的结合自由能为 -3.45 kcal/mol，突变后体系的结合自由能为 -6.28 kcal/mol，这充分显示了突变后的蛋白与底物的结合更强，佐证了我们的推测。

2.5 多酶级联重组菌株的构建

考虑到 2-OBA 和 NADH 相对比较昂贵，因此在 *E. coli* BL21(DE3) 中共表达了来自 *E. coli* 的 TD 和来自博伊丁氏假丝酵母 *Candida boidinii*

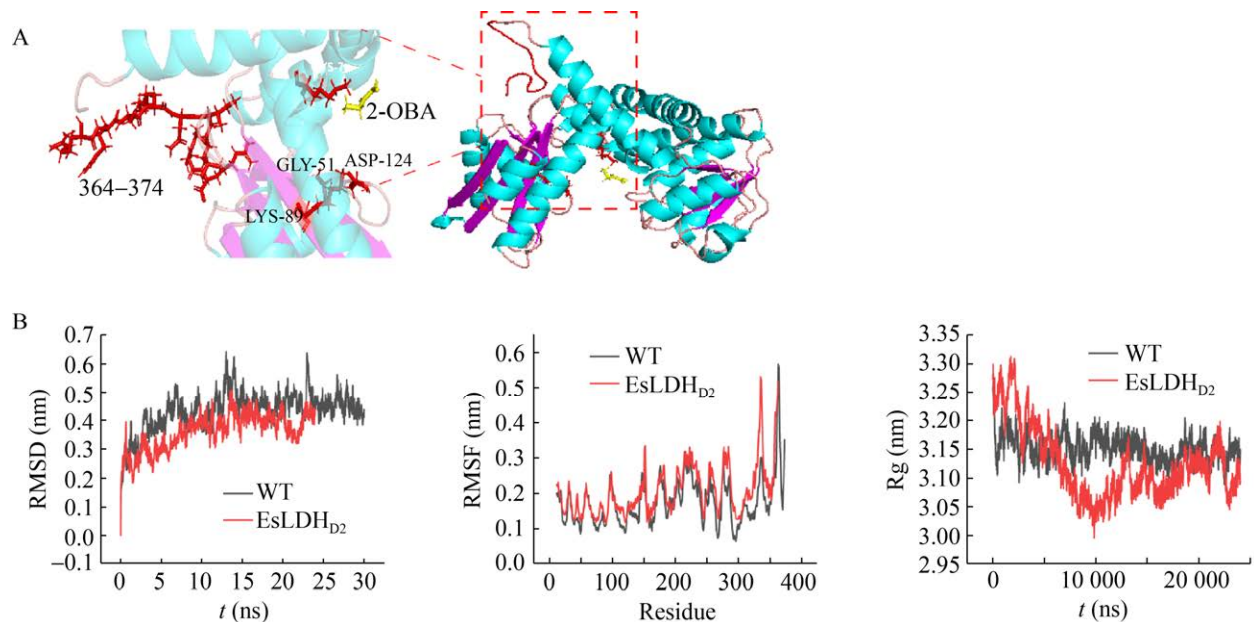


图 8 EsLDH 的三维结构模拟及分子动力学模拟分析参数变化

Fig. 8 Three-dimensional structure simulation of the EsLDH and molecular dynamics simulation analysis of parameter changes. (A) Three-dimensional structure simulation of EsLDH and partial enlargement of key areas. EsLDH (right) was shown in different colors, with helices in blue, sheets in purple, and Loops in magenta. A partial enlarged view of key sites was shown on the left, with substrate in yellow, active centers and the truncated Loop areas by red sticks. (B) Analysis of EsLDH and its mutant D2 after docking 2-OBA by molecular dynamics simulation about RMSD, RMSF and Rg between wild type and its mutant.

的 FDH 以构建多酶级联的单细胞。但是，第一次转化的结果并不理想，因为 TD 转化 L-苏氨酸的速度更快，导致中间产物 2-OBA 的积累限制了 L-2-ABA 的制备。因此我们旨在通过双拷贝 LDH 和 FDH 调节从 2-OBA 到 L-2-ABA 的转化；同时在实际的多表达系统中，基因插入位置不同，表达也不同^[27]，因此，将 *ivlA* 基因插入 *Esldh* 和 *fdh* 之后以削弱 TD 的表达。将构建好的重组菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RO、*E. coli* BL21/pACYCDuet-RT、*E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 分别发酵培养、破碎获得粗酶，测定粗酶中 TD、LDH、FDH 的酶活；同时将 3 株菌发酵培养、收集菌体用于全细胞转化制备 L-2-ABA，HPLC 测定 L-2-ABA 及 2-OBA 的浓度。由表 3 可知，菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 相较于原始菌和另两株重组菌具有明显的优越性，摩尔转化率相较于 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RO、*E. coli* BL21/

pACYCDuet-RT 各提高了 74.6%和 39.0%。

2.6 多酶级联重组菌株全细胞制备 L-2-ABA 条件优化

由图 9A 可知，控制全细胞转化温度为 30 ℃、底物 L-苏氨酸的浓度为 100 g/L、等摩尔的辅底物甲酸铵、转化 OD_{600} 为 60，制备 L-2-ABA 的最适 pH 为 7.5，此时重组菌 *E. coli*/pACYCDuet-RM 转化产物的产量达到最大值且中间产物 2-OBA 的积累量少于 10 g/L，此时产量为 59.3 g/L，产率达 70%。由图 9B 可知，控制转化 pH 为 7.5，在其他转化条件不变的情况下，制备 L-2-ABA 的最适温度为 35 ℃，此时重组菌 *E. coli*/pACYCDuet-RM 转化产物的产量达到最大值 68.4 g/L，中间产物 2-OBA 的积累量为 13 g/L，此时产率达 80.5%。由图 9C 可知，控制转化 pH 为 7.5、转化温度为 35 ℃，在其他转化条件不变的情况下改变全细胞转化的底物 L-苏氨酸的浓度，其最适底物浓度为

表 3 不同重组菌株的参数比较

Table 3 Comparison of parameters of different recombinant strains

Strains	TD (U/mL)	LDH (U/mL)	FDH (U/mL)	L-2-ABA (g/L)	2-OBA (g/L)	Molar conversion rate (%)
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet	4.6±0.5	1.7±0.2	n/a	n/a	0.2	n/a
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet-RO	62.0±6.4	39.1±5.4	0.4±0.2	33.5	43.3	39.4
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet-RT	57.8±5.1	48.8±6.1	0.4±0.2	42.1	39.8	49.5
<i>E. coli</i> BL21/pACYCDuet-RM	56.2±8.2	70.4±5.7	0.7±0.1	58.5	12.5	68.8

n/a means not detected.

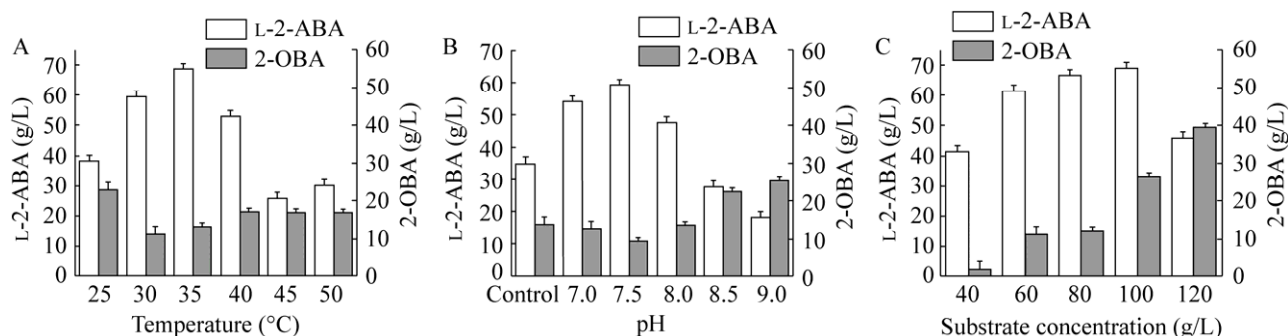


图 9 全细胞转化条件优化

Fig. 9 Optimization of the whole cell biotransformation. (A) The optimal temperature. (B) The optimal pH. (C) The optimal substrate concentration. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

80 g/L, 此时重组菌 *E. coli*/pACYCDuet-RM 转化产物的产量达到最大值 66.4 g/L, 此时产率接近 100%。

2.7 5 L 发酵罐全细胞制备 L-2-ABA

将重组菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 在 5 L 发酵罐中培养, 将溶氧电极偶联搅拌速度和通气量, 在 *OD* 增长至对数生长期时加入 IPTG 诱导, 当 *OD* 不再增加时收集细胞进行全细胞转化。在最适条件下转化, 120 g L-苏氨酸制备了 97.9 g 的 L-2-ABA, 其摩尔转化率为 96%, 且底物转化率大于 99% (图 10)。

迄今为止, L-2-ABA 主要是由一锅法制备, 最高产量是在 30 L 的转化系统中生产了 29.2 mol L-2-ABA, 产率为 97.3%。然而, 该催化系统需要严格配比两种以上的菌体量且需要添加辅因子, 这增加了工艺的复杂性和生产成本^[28]。然而, 并没太多通过单细胞制备 L-2-ABA 的尝试, 并且最

新报道的产量仅达到 68.5 g/L^[29]。在我们的研究中, 单细胞 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 产量达 97.9 g/L, 为 L-2-ABA 工业化的进一步应用奠定了理论和实验基础。

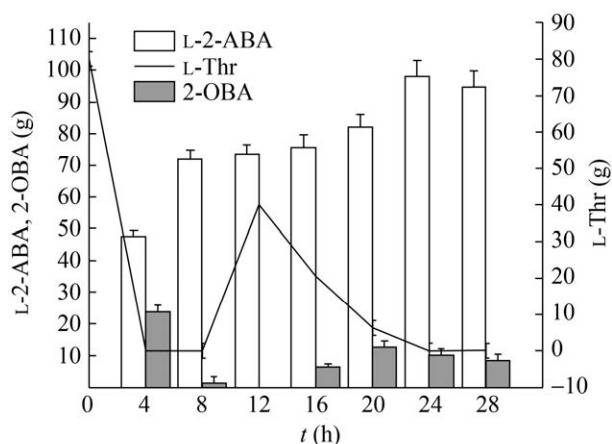


图 10 5 L 发酵罐全细胞转化制备 L-2-ABA

Fig. 10 Whole-cell biotransformation in 5 L fermenter for the production of L-2-ABA. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

3 讨论

本文通过同源建模得到 LDH 的三维结构并对接底物 2-OBA, GROMACS 模拟分析 RMSF 值, 通过截短 RMSF 值剧烈波动的 Loop 区域、测定比酶活, 发现截短突变体 EsLDH_{D2} 的比酶活提高了 23.2% 且热稳定性也得到改善, 其半衰期较野生型提高了 2.4 h (为 10.4 h), 推测回旋半径 Rg 的显著降低使截短后蛋白构象的紧密性更好, 导致稳定性改善且 C 端 Loop 区域的截短导致底物进入结合通道的空间变大, 底物更易结合, 酶活提高。除此之外, 由于涉及多酶级联催化导致中间产物 2-OBA 积累限制了 L-2-ABA 的制备。因此本文旨在通过双拷贝 LDH 和 FDH 以加快从 2-OBA 到 L-2-ABA 的转化从而实现多酶催化的平衡。结果显示, 双拷贝菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 相较于原始菌和另两株重组菌具有明显的优越性, 摩尔转化率相较于 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RO 提高了 74.6%。

酶法催化需要额外添加辅因子增加了工业成本且易失活, 而全细胞催化更稳定、胞内存在的辅因子足以满足辅酶循环所需, 同时省去了酶法催化所需的破碎细胞的过程, 经济效益更高。所以为了契合实际的工业生产, 本研究对菌株 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 全细胞转化合成 L-2-氨基丁酸的反应条件也进行了优化。结果表明, 在温度 35 °C、pH 7.5、底物浓度 80 g/L 的最适条件下, 摩尔转化率大于 99%; 在最适底物浓度以下其转化率也基本大于 99%, 但随着底物浓度的增加, 中间产物不断积累, 转化率持续下降。5 L 发酵罐发酵培养 *E. coli* BL21/pACYCDuet-RM 且在最适条件下转化, 120 g L-苏氨酸得到 97.9 g L-2-ABA, 其摩尔转化率为 96%, 且底物转化率大于 99%。综上所述, 文中所构建的突变株及其相关研究结果为 L-2-氨基丁酸的工业化应用进一步奠定了理论和实验基础。

REFERENCES

- [1] Wang Y, Li GS, Qiao P, et al. Increased productivity of L-2-aminobutyric acid and total turnover number of NAD⁺/NADH in a one-pot system through enhanced thermostability of L-threonine deaminase. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(11): 1551-1559.
- [2] Zhang K, Li H, Cho K, et al. Expanding metabolism for total biosynthesis of the nonnatural amino acid L-homoalanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6234-6239.
- [3] Nugent W, Feaster J. Practical synthesis of methyl Z-2-(N-acetylamino) but-2-enoate. An intermediate to D- and L-2-aminobutyric acid. *Synth Commun*, 1998, 29(34): 1617-1623.
- [4] Mathew S, Bea H, Nadarajan S, et al. Production of chiral β -amino acids using ω -transaminase from *Burkholderia graminis*. *J Biotechnol*, 2015, 196/197(3): 1-8.
- [5] 奚强, 丁友友, 林丫丫. 2-氨基丁酸的酶拆分. *武汉工程大学学报*, 2009, 29(3): 26-29.
Xi Q, Ding YY, Lin YY. Enzymatic resolution of 2-aminobutyric acid. *J Wuhan Inst Technol*, 2009, 29(3): 26-29 (in Chinese).
- [6] 徐红梅, 夏仕文, 何从林. 固定化 D-氨基酸氧化酶催化 DL-氨基酸去消旋化制备非天然 L-氨基酸. *分子催化*, 2012, 26(2): 192-196.
Xu HM, Xia SW, He CL. Immobilized D-amino acid oxidase catalyzed deracemization of DL-amino acid to prepare unnatural L-amino acid. *Mol Catal*, 2012, 26(2): 192-196 (in Chinese).
- [7] 周海岩, 张旺, 徐建妙, 等. 点饱和突变提高腈水解酶不对称合成 L-2-氨基丁酸的酶活. *工业微生物*, 2015, 45(6): 1-8.
Zhou HY, Zhang W, Xu JM, et al. Site-saturation mutations to increase the enzymatic activity of nitrilase for asymmetric synthesis of L-2-aminobutyric acid. *Ind Microbiol*, 2015, 45(6): 1-8 (in Chinese).
- [8] Shin JS, Kim BG. Transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of L-2-aminobutyric acid from achiral reactants. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(10): 1595-1599.
- [9] Galkin A, Kulakova L, Yoshimura T, et al. Synthesis of optically active amino acids from α -keto acids with *Escherichia coli* cell expressing heterologous genes. *Appl Environ Microbiol*, 1997,

- 63(12): 4651-4656.
- [10] Weber N, Hatsch A, Labagnere L, et al. Production of (S)-2-aminobutyric acid and (S)-2-aminobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 51.
- [11] Tao R, Jiang Y, Zhu F, 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.
- [12] Li J, Pan J, Zhang J, et al. Stereoselective synthesis of L-tert-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2014, 105: 11-17.
- [13] Xu G, Jiang Y, Tao R, et al. A recyclable biotransformation system for L-2-aminobutyric acid production based on immobilized enzyme technology. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(1): 123-129.
- [14] Parker W, Hanson R, Goldberg S, et al. Preparation of (S)-1-cyclopropyl-2-methoxyethanamine by a chemoenzymatic route using leucine dehydrogenase. *Org Process Res Dev*, 2012, 16: 464-469.
- [15] Zink MW, Sanwal B. The distribution and substrate specificity of L-leucine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 1962, 99(1): 72-77.
- [16] Zhao Y, Wakamatsu T, Doi K, et al. A psychrophilic leucine dehydrogenase from *Sporosarcina psychrophila*: purification, characterization, gene sequencing and crystal structure analysis. *J Mol Catal B: Enzym*, 2012, 83: 65-72.
- [17] Jiang W, Sun D, Lu J, et al. A cold-adapted leucine dehydrogenase from marine bacterium *Alcanivorax dieselolei*: characterization and L-tert-leucine production. *Eng Life Sci*, 2015, 16(3): 283-289.
- [18] Zhu W, Li Y, Jia H, et al. Expression, purification and characterization of a thermostable leucine dehydrogenase from the halophilic thermophile *Laceyella sacchari*. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(5): 855-861.
- [19] Zhu L, Wu Z, Jin JM, et al. Directed evolution of leucine dehydrogenase for improved efficiency of L-tert-leucine synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(13): 5805-5813.
- [20] Xu JM, Fu FT, Hu HF, et al. A high-throughput screening method for amino acid dehydrogenase. *Anal Biochem*, 2015, 495: 29-31.
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [22] Crowe J, Masone B, Ribbe J. One-step purification of recombinant proteins with the 6×His tag and Ni-NTA resin. *Mol Biotechnol*, 1995, 4(3): 247-258.
- [23] Bradford MF. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-258.
- [24] Zhou J, Wang Y, Chen J, et al. Rational engineering of bacillus cereus leucine dehydrogenase towards α -keto acid reduction for improving unnatural amino acid production. *Biotechnol J*, 2018, 14(3): 1800253.
- [25] Thompson MJ, Eisenberg D. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J Mol Biol*, 1999, 290(2): 595-604.
- [26] 谢东芳, 吕常江, 方卉, 等. 删除 Loop 区域表面不稳定氨基酸提高 (R)- ω -转氨酶热稳定性. *生物工程学报*, 33(12): 1923-1933.
- Xie DF, Lv CJ, Fang H, et al. Deleting the unstable amino acid on the surface of the Loop region improves the thermostability of (R)- ω -transaminase. *Chin J Biotech*, 33(12): 1923-1933 (in Chinese).
- [27] Tan S, Kern RC, Selleck W. The pST44 polycistronic expression system for producing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2005, 40(2): 385-395.
- [28] 张利坤, 肖延铭, 杨卫华, 等. 亮氨酸脱氢酶偶联 NADH 再生体系合成 L-2-氨基丁酸. *生物工程学报*, 2020, 36(5): 992-1001.
- Zhang LK, Xiao YM, Yang WH, et al. Synthesis of L-2-aminobutyric acid with leucine dehydrogenase coupling with NADH regeneration system. *Chin J Biotech*, 2020, 36(5): 992-1001 (in Chinese).
- [29] 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*, 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*, 36(4): 782-791 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)