

· 工业生物技术 ·

酶法生产 1,4-环己烷二甲胺

韩业挺¹, 何志震¹, 魏婉清^{2,3}, 宋伟¹, 刘立明^{2,3}, 朱萌⁴, 吴静^{1*}

1 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

4 无锡阿科力科技有限公司, 江苏 无锡 214122

韩业挺, 何志震, 魏婉清, 宋伟, 刘立明, 朱萌, 吴静. 酶法生产 1,4-环己烷二甲胺[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1882-1894.

HAN Yeting, HE Zhizhen, WEI Wanqing, SONG Wei, LIU Liming, ZHU Meng, WU Jing. Enzymatic production of 1,4-cyclohexanedimethylamine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1882-1894.

摘要: 1,4-环己烷二甲胺(1,4-cyclohexanedimethylamine, 1,4-BAC)作为重要的生物基材料单体, 被广泛应用于有机合成、医药、化工和材料等多个领域。目前主要采用化学法合成, 存在金属催化剂价格昂贵、反应条件苛刻和安全隐患等问题, 亟须寻找更环保的合成替代方法。本研究利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的转氨酶(transaminase, *EcTA*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)来源的谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, *ScGlu-DH*)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)来源的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, *CbFDH*)成功构建了双菌三酶级联转化 1,4-环己烷二甲胺生成 1,4-环己烷二甲胺的路径。基于结构指导下的蛋白质工程改造, 获得了有益突变体 *EcTA*^{F91Y}, 其比酶活和 k_{cat}/K_m 较野生型分别提升了 2.2 倍和 1.9 倍。通过重组菌株的构建和反应条件的优化, 在最优条件下 40 g/L 底物可生成(27.4±0.9) g/L 产物, 摩尔转化率为 67.5%±2.1%。

关键词: 1,4-环己烷二甲胺; 三酶级联; 蛋白质工程改造; 全细胞转化; 1,4-环己烷二甲胺

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102700); 国家自然科学基金(22178146); 国家特支计划青年拔尖人才; 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP123011)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102700), the National Natural Science Foundation of China (22178146), the Top Young Talents of the National Special Support Plan, and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (JUSRP123011).

*Corresponding author. E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-09-02; Accepted: 2023-11-14

Enzymatic production of 1,4-cyclohexanedimethylamine

HAN Yeting¹, HE Zhizhen¹, WEI Wanqing^{2,3}, SONG Wei¹, LIU Liming^{2,3}, ZHU Meng⁴,
WU Jing^{1*}

1 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

4 Wuxi Acryl Technology Co., Ltd., Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 1,4-cyclohexanedimethylamine (1,4-BAC) is an important monomer for bio-based materials, it finds wide applications in various fields including organic synthesis, medicine, chemical industry, and materials. At present, its synthesis primarily relies on chemical method, which suffer from issues such as expensive metal catalyst, harsh reaction conditions, and safety risks. Therefore, it is necessary to explore greener alternatives for its synthesis. In this study, a two-bacterium three-enzyme cascade conversion pathway was successfully developed to convert 1,4-cyclohexanedicarboxaldehyde to 1,4-cyclohexanedimethylamine. This pathway used *Escherichia coli* derived aminotransferase (*EcTA*), *Saccharomyces cerevisiae* derived glutamate dehydrogenase (*ScGlu-DH*), and *Candida boidinii* derived formate dehydrogenase (*CbFDH*). Through structure-guided protein engineering, a beneficial mutant, *EcTA*^{F91Y}, was obtained, exhibiting a 2.2-fold increase in specific activity and a 1.9-fold increase in k_{cat}/K_m compared to that of the wild type. By constructing recombinant strains and optimizing reaction conditions, it was found that under the optimal conditions, a substrate concentration of 40 g/L could produce (27.4±0.9) g/L of the product, corresponding to a molar conversion rate of 67.5%±2.1%.

Keywords: 1,4-cyclohexanedimethylamine; tri-enzyme cascade; protein engineering; whole-cell catalyst; 1,4-cyclohexanedicarboxaldehyde

1,4-环己烷二甲胺(1,4-cyclohexanedimethylamine, 1,4-BAC)^[1]作为重要的生物基材料单体, 被广泛应用于有机合成、医药、化工和材料等多个领域。目前主要采用化学法合成 1,4-环己烷二甲胺, 主要包括苯二甲腈法^[2-4]和环己烷二甲醇氨化法^[5-6]。苯二甲腈法以苯二甲腈为原料经过两步加氢反应制得环己烷二甲胺, 虽然技术较为成熟、产能占据绝对优势, 但是反应条件苛刻、设备投资大、操作安全要求高且后续分离精制收率低。环己烷二甲醇氨化法以环己烷二甲醇为原料通过临氢氨化反应制备环己烷二甲胺, 虽然生产效率高, 但不可避免地会伴生约

6%的仲胺和高聚物副产物, 分离成本高, 微量的杂质对下游的聚合等应用也会造成严重影响, 此外反应过程中需要的季铵碱助剂四甲基氢氧化铵为剧毒, 有一定安全生产的风险^[7]。因此, 需要寻找更安全、环保的合成方法替代。

生物酶法具有反应条件温和、操作步骤简单、环境污染小和产品安全性高等优点, 因而具有潜在的工业应用价值。但是, 目前尚未有关于酶法生产 1,4-环己烷二甲胺的报道。本研究通过利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的转氨酶 (transaminase, *EcTA*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)来源的谷氨酸脱氢酶

(glutamate dehydrogenase, ScGlu-DH)和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)来源的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, CbFDH)构建了催化1,4-环己烷二甲胺生产1,4-环己烷二甲胺的双菌三酶级联路径。通过转氨酶的蛋白质工程改造、共表达菌株的构建和反应体系的优化提高级联路径的催化效率,从而提高1,4-环己烷二甲胺的产量和摩尔转化率。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究使用的质粒 pET28a、pACYCDuet、pRSFDuet 和 pCDFDuet 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、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司;1,4-环己烷二甲胺购自上海毕得医药科技股份有限公司;1,4-环己烷二甲胺标品购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)、硫酸卡那霉素(kanamycin, Kan)和氯霉素(chloromycetin,

Cm)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 *EcTA*、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 的目的基因,采用限制性内切酶双酶切目的条带,然后与经过同样双酶切的表达载体 pET28a 连接获得重组质粒,将构建完成的质粒导入 *E. coli* BL21(DE3)后获得基因工程菌株。

构建共表达菌株时,将大肠杆菌 *E. coli* 基因组中克隆编码转氨酶的基因 *patA* 连接于质粒 pET28a,构建重组质粒 pET28a-*EcpatA*;将博伊丁假丝酵母 *C. boidinii* 基因组中克隆编码甲酸脱氢酶基因 *fdh* 连接于质粒 pACYCDuet-1,构建重组质粒 pACYCDuet-*Cbfdh*,将酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因组中克隆编码谷氨酸脱氢酶的基因 *GDH1* 连接于质粒 pACYCDuet-*Cbfdh*,构建重组质粒 pACYCDuet-*Cbfdh-ScGDH1*,将 pET28a-*EcpatA* 和 pACYCDuet-*Cbfdh-ScGDH1* 分别导入 2 株 *E. coli* BL21(DE3)细胞中,用含有对应抗性的平板筛选出阳性克隆,得到表达 *EcTA* 的菌株 BL21-*EcTA*,共表达 *ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 的菌株 BL21-pACYC-*ScGlu-DH-CbFDH*。

表 1 本研究所使用的菌种

Table 1 Strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Sources
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21- <i>SmTA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pET28a- <i>SmSm-b20379</i>)	This study
BL21- <i>RpTA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pET28a- <i>RpgabT</i>)	This study
BL21- <i>EcTA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pET28a- <i>EcpatA</i>)	This study
BL21- <i>ScGlu-DH</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pET28a- <i>ScGDH1</i>)	This study
BL21- <i>CbFDH</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pET28a- <i>Cbfdh</i>)	This study
BL21-pACYC- <i>ScGlu-DH-CbFDH</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pACYCDuet- <i>ScGDH1-Cbfdh</i>)	This study
BL21-pRSF- <i>ScGlu-DH-CbFDH</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pRSFDuet- <i>ScGDH1-Cbfdh</i>)	This study
BL21-pCDF- <i>ScGlu-DH-CbFDH</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (pCDFDuet- <i>ScGDH1-Cbfdh</i>)	This study

1.2.2 培养基及培养方法

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

TB 培养基(g/L): 甘油 4、胰蛋白胨 12、酵母粉 24、KH₂PO₄ 2.31 和 K₂HPO₄ 12.54, 用于重组菌株发酵培养。

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, 根据重组菌选择添加不同种类不同浓度的抗生素, 37 °C、200 r/min 培养 OD₆₀₀ 至 0.6 时, 添加 100 mg/L 的 IPTG

于 25 °C 下诱导 12–14 h。

1.2.3 饱和突变文库的建立及高通量筛选方法的确定

定点饱和突变: 以野生型的 *EcTA* 基因的重组质粒 pET28a-*EcpatA* 为模板, 通过聚合酶 KOD-Plus-Neo 及表 2 所示突变引物对重组质粒进行全质粒 PCR。通过消化酶 *Dpn* I 对 PCR 产物进行消化处理。将消化产物转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 培养后将菌液涂布于含 Kan 抗性的固体 LB 平板上, 并于 37 °C 培养箱培养 12 h, 挑取单菌落进行 96 孔板培养。

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
pET28a- <i>ScGlu</i> -DH-F	CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAGCGAACCGGAATTCAGCAGGCGTAC	51
pET28a- <i>ScGlu</i> -DH-R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTAGAAAACATCACCCCTGATCGAAC	51
pET28a- <i>CbFDH</i> -F	CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATGATG	50
pET28a- <i>CbFDH</i> -R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTATTTCTTATCGTGTTTACCGTAG	51
pET28a- <i>EcTA</i> -F	CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAACCGTCTGCCGTCTAGCGCAAGCGC	50
pET28a- <i>EcTA</i> -R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTAAGCTTCTTCTACAGAAACACG	50
pET28a-SAV2585-F	CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTCTGCGCTGCCGCAGGAACGTCGTGTTG	52
pET28a-SAV2585-R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTAAATACGGCTGAACGCCTGTTTCG	51
pET28a-SM5064-F	CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAATGACCGTCCGAACCTCTCTGCACG	50
pET28a-SM5064-R	CAAGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTAGCCAACGTGGCCCTGCGCACGC	51
pACYC- <i>ScGlu</i> -DH-F	CATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCATGAACCGTCTGCCGTCTAGCGCAAG	52
pACYC- <i>ScGlu</i> -DH-R	CATTATGCGGCCGCAAGCTTGTCGACTTAAGCTTCTTCTACAGAAACACGC	51
pACYC- <i>CbFDH</i> -F	AGTATAAGAAGGAGATATACATATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATGATG	50
pACYC- <i>CbFDH</i> -R	CAGCGGTTTCTTTACCAGACTCGAGTTATTTCTTATCGTGTTTACCGTAG	50
<i>EcTA</i> -F91X-F	TTGCCTGGGTGGCENKGGCATTTC AACG	29
<i>EcTA</i> -F91X-R	CGTTGAAAATGCCMNNGCCACCCAGGCAA	29
<i>EcTA</i> -Q119*X-F	GCCGCTGCACAGCENKGAACCTGCTGGACC	29
<i>EcTA</i> -Q119*X-R	GGTCCAGCAGTTCMNNGCTGTGCAGCGGC	29
<i>EcTA</i> -F180X-F	GACCTCCGGTGCGNKCACGGTAAAAGCC	29
<i>EcTA</i> -F180X-R	GGCTTTTACCGTGMNNCGCACCCGAGGGTC	29
<i>EcTA</i> -E243X-F	ACCTATCCAGGGTNNKGGCGGTGTGATTC	29
<i>EcTA</i> -E243X-R	GAATCACACCCGCMNNACCCTGGATAGGT	29
<i>EcTA</i> -F327*X-F	GTTGATAACCCGNNKCTCCACACCACTA	29
<i>EcTA</i> -F327*X-R	TAGTGGTGTGGAGMNNCGGGTTATCGAAC	29
<i>EcTA</i> -T332*X-F	TCTCCACACCACTNNKTTCGGCGGTAACC	29
<i>EcTA</i> -T332*X-R	GGTTACCGCCGAAMNNAGTGGTGTGGAGA	29
<i>EcTA</i> -L419X-F	GGTTGCGGGCACCNKAACAACGCTAAAA	29
<i>EcTA</i> -L419X-R	TTTTAGCGTTGTTMNNGGTGCCCGCAACC	29

高通量筛选方法：将 96 孔板离心收集菌体，用于随后的全细胞催化反应，30 °C 反应 24 h 后离心取上清。取上清液与茚三酮溶液各加 100 μ L 至酶标条中，40 °C 反应 10 min。根据反应所生成物质的蓝紫色深浅，在 570 nm 波长下进行比色就可以测定产物 1,4-环己烷二甲胺的相对含量(在一定浓度范围内，显色溶液的吸光度与 1,4-环己烷二甲胺的含量成正比)。

1.2.4 高效液相色谱法 OPA 在线衍生检测 1,4-环己烷二甲胺

高效液相色谱 HPLC 法测定 1,4-环己烷二甲胺：使用邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA) 柱前衍生反相 HPLC^[8-9]来测定转化液中产物 1,4-环己烷二甲胺的产量。使用戴安高效液相色谱仪：Agilent ZORBAX SB-aq 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)，流动相 A：0.01 mol/L KH₂PO₄，KOH 调 pH 至 5.3，有机膜抽滤后超声脱气 15 min；流动相 B 为流动相 A、乙腈、甲醇按体积比 1:5:3 进行混合，用醋酸调 pH 至 5.3。采用表 3 所示的梯度洗脱程序进行洗脱；柱温 35 °C，流速 1 mL/min，进样量为 10 μ L，色谱保留时间 23 min，检测波长为 338 nm。

1.2.5 分子动力学模拟

1) 对接方法

从 PDB 数据库中获得 *EcTA* 的初始结构，晶体结构(PDB: 4UOX)^[10]。基于 H⁺⁺^[11]的 pKa

计算并考虑局部氢键网络，在 pH 7.5 的反应条件下确定了带电残基的质子化状态。His28、His45、His117、His181 和 His288 被指定为去质子化组氨酸(histidine imidazole deprotonated, HID)，His16、His98 和 His209 被指定为质子化在 ϵ -氮上的组氨酸(histidine imidazole protonated at the epsilon nitrogen, HIE)，His329 在 A 链被指定为 HID、在 B 链被指定为 HIE。Asp 和 Glu 残基被去质子化，Lys 和 Arg 残基被质子化。首先，使用 GaussView 软件^[12]构建 1,4-环己烷二甲胺与磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP) 形成的外醛亚胺(1a)的三维结构。随后，采用 Gaussian16 软件^[13]在 B3LYP/6-31G (d)水平下对外醛亚胺的三维结构进行优化。其次，通过 AutoDock 4.2 和 AutoDockTools-1.5.6^[14]软件将优化后的结构对接到 *EcTA* 的活性中心。对接方法用于刚性受体构象，共进行了 100 次独立对接。最后，选择合理的对接结果作为分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟的初始结构。

2) MD 模拟

以 *EcTA* 与 1a 的对接结构作为 MD 模拟的起始构象。1a 的电荷采用 HF/6-31G (d)计算，由 Amber 16 软件^[15]中的 Antechamber 模块实现的约束静电势协议拟合^[16]。每个体系最初用 Na⁺离子中和整个体系的电荷，并选择 TIP3P 水模型使其溶解到每侧的缓冲距离为 10 Å 的八面体水盒中。接下来，通过简短的 MD 模拟进行一系列优化，在此期间对蛋白质骨架重原子的约束逐渐缩小[力常数为 10、2、0.1 和 0 kcal/(mol \cdot Å²)]；并且系统在 50 ps 内从 -273 °C 逐渐升温到 30 °C，其中对蛋白质骨架重原子施加 10 kcal/(mol \cdot Å²)的约束。最后在 30 °C 温度和 101 325 Pa 压强的条件下进行了长达 100 ns 的非限制的 MD 模拟。使用 Berendsen 恒温法^[17]将温度稳定在 37 °C。采用粒子网格 Ewald (PME)

表 3 1,4-环己烷二甲胺梯度洗脱表

Table 3 1,4-cyclohexanedimethylamine gradient elution program

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	80	20
5	65	35
10	35	65
15	30	70
20	50	50
23	80	20

方法^[18]处理远程静电相互作用, PME 和 van der Waals (vdW)相互作用均应用 12 Å 截断。采用周期性的边界条件通过 SHAKE 算法^[19]对氢采用了 2 fs 的时间步长。原子位置每 2 ps 存储一次, 以便进一步分析。每个系统都检查了稳定性(结构、能量和温度波动)和收敛性[结构的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)]。最后将 EcTA 与 1a MD 平衡后的结构作为 EcTA^{F91Y}-1a 复合物的初始结构, 并进行非限制性的动力学模拟。

2 结果与分析

2.1 1,4-环己烷二甲醛合成 1,4-环己烷二甲胺的级联反应设计和体外构建

1,4-环己烷二甲醛在转氨酶催化下, 以谷氨酸为氨基供体合成 1,4-环己烷二甲胺(图 1)。为了促进谷氨酸的再生, 引入 NADH 依赖的谷氨酸脱氢酶^[20-21], 以游离的铵根离子为供体, 将 α -酮戊二酸还原为谷氨酸; 此外, 引入甲酸脱

氢酶^[22-24]用以构建 NADH 循环。

有研究发现苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)^[25]、阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)^[26]和 *E. coli*^[10]来源的转氨酶对己二醛有催化活性^[27]。本研究的底物是 1,4-环己烷二甲醛, 与己二醛的结构类似, 因此选取这 3 种转氨酶用于后续研究。将 3 种酶基因克隆表达于 *E. coli* BL21 中, 构建获得重组菌株 BL21-*SmTA*、BL21-*RpTA* 和 BL21-*EcTA*。摇瓶发酵 14 h 收集湿菌体冷冻干燥, 测定不同来源的转氨酶催化 1,4-环己烷二甲醛生成 1,4-环己烷二甲胺的产量。BL21-*SmTA*、BL21-*RpTA* 和 BL21-*EcTA* 的冻干细胞催化生成 1,4-环己烷二甲胺的产量分别为(0.77±0.08)、(0.02±0.01) 和 (3.01±0.11) g/L, 因此选择 BL21-*EcTA* 用于转氨反应(图 2A)。为了使得谷氨酸再生, 偶联来源于 *S. cerevisiae* 的谷氨酸脱氢酶 (*S. cerevisiae* glutamate dehydrogenase, ScGlu-DH)将 α -酮戊二酸高效转化为谷氨酸并

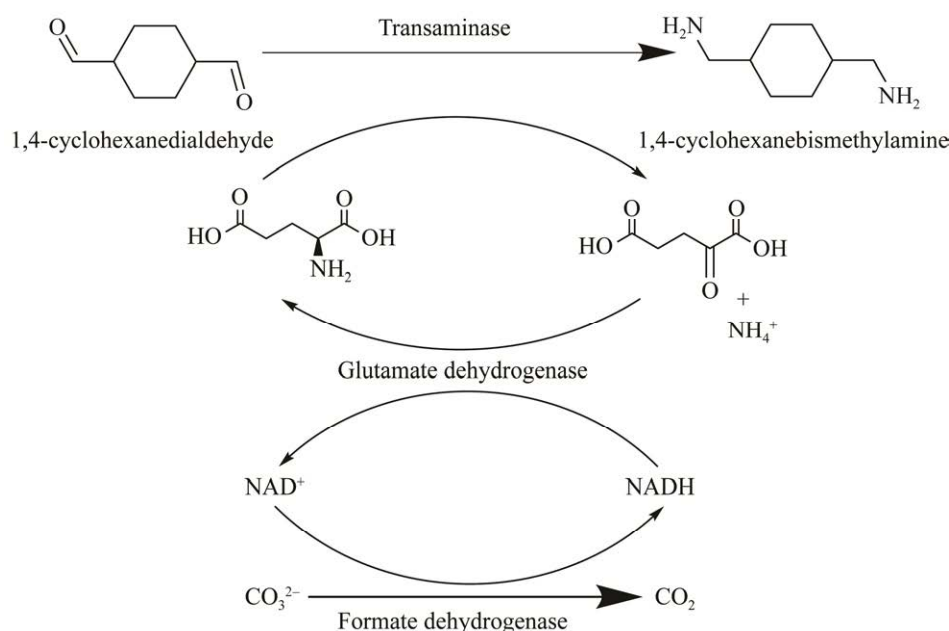


图 1 1,4-环己烷二甲醛合成 1,4-环己烷二甲胺的路径设计

Figure 1 Diagram showing the design of cascade biosynthesis of 1,4-cyclohexanedimethylamine from 1,4-cyclohexanedicarboxaldehyde.

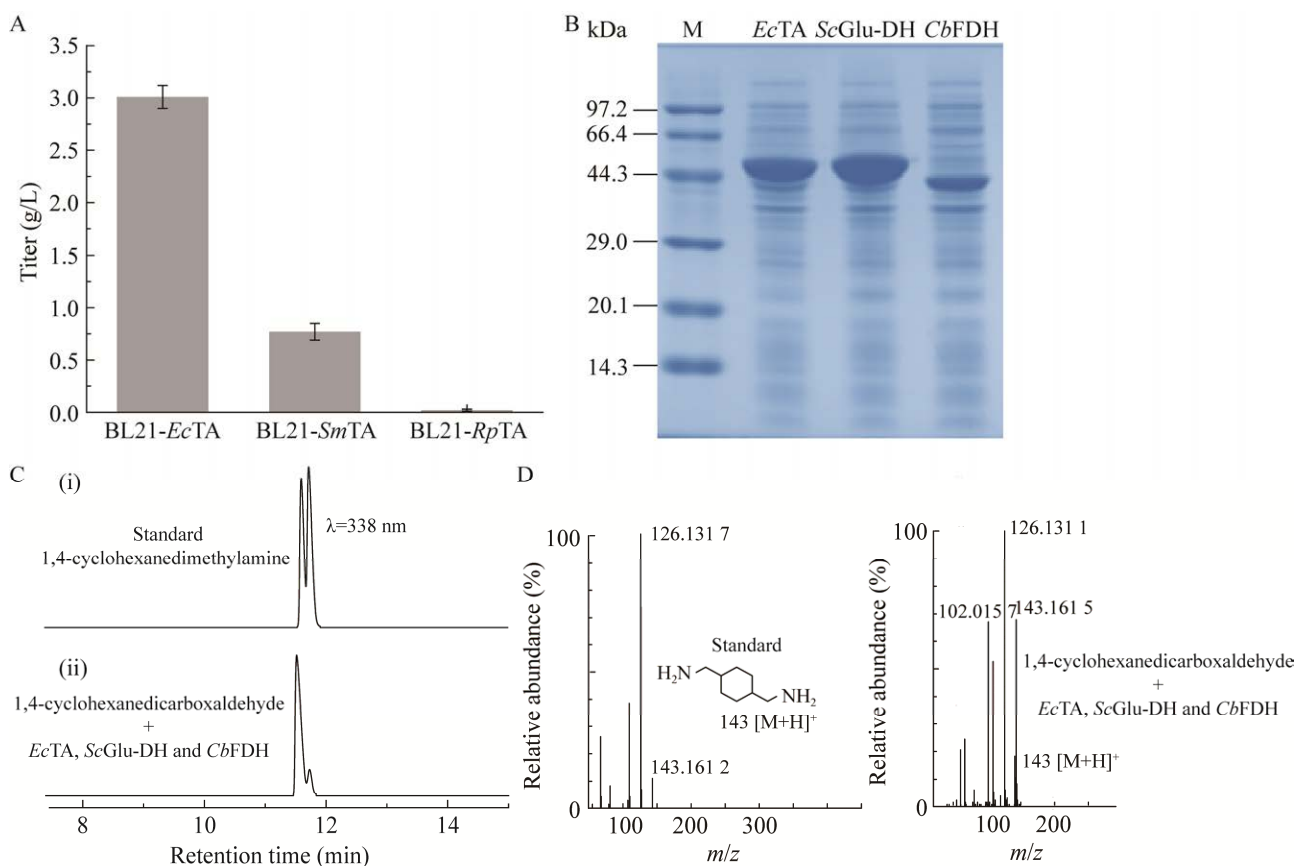


图2 级联路径的体外构建和验证

Figure 2 Construction and validation of cascade pathway *in vitro*. A: Three aminotransferases from different sources catalyze the production of 1,4-cyclohexanedimethylamine from 1,4-cyclohexanedicarboxaldehyde. B: The SDS-PAGE analysis of *EcTA*, *ScGlu-DH* and *CbFDH*. C: Analysis of the products with HPLC. D: Analysis of the products with LC-MS.

偶联具有广泛工业应用潜力的 *C. boidinii* 来源的甲酸脱氢酶(*C. boidinii* formate dehydrogenase, *CbFDH*)^[22]来构建 NADH 循环。

为了验证设计路径的可行性,将纯化后的 *EcTA*、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 添加到 5 mL 的体外转化体系中,并添加 10 mmol/L 1,4-环己烷二甲醛,采用高效液相色谱(HPLC)和液相色谱质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)鉴定生成的 1,4-环己烷二甲胺。1,4-环己烷二甲胺分子量为 142.24 g/mol,使用阳离子质谱检测分子量为 143.16 g/mol (图 2C、2D),证明了目标产物 1,4-环己烷二甲胺的生成。因

此,采用 *EcTA*、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 构建的级联路径能够催化 1,4-环己烷二甲醛生成 1,4-环己烷二甲胺,但仅检测到 2.6 mmol/L 1,4-环己烷二甲胺,转化率为 25.5%。测得 *EcTA*、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 的比酶活分别为 4.50、10.62 和 13.27 U/mg,其中 *EcTA* 在级联路径中的比酶活最低,因此对 *EcTA* 进行蛋白质工程改造提高酶活,有望提高 1,4-环己烷二甲胺的产量。

2.2 *EcTA* 的蛋白质工程改造和性能提升的机制解析

为了提高 *EcTA* 的酶活,采用基于结构指

导下的蛋白质工程改造。*EcTA* 为同源二聚体, 活性中心位于亚基界面(图 3A), 将 1,4-环己烷二甲醛与 PLP 形成的外醛亚胺(1a)对接到 *EcTA* 晶体结构的活性中心, 通过分子动力学(MD)模拟获得稳定构象。1a 位于由残基 F91、Q119*、F180、E243、F327*、T332*和 L419 构成的结合口袋中(*表示来自相邻亚基的残基)(图 3B)。将与 *EcTA* (PDB: 4UOX)^[10] 的结构相似性排名前 3 位的如来自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) 的乙酰鸟氨酸转氨酶 AcOAT (PDB: 1VEF)、智人(*Homo sapiens*)的鸟氨酸转氨酶 OAT (PDB:

2OAT)^[28]和 *E. coli* 的 γ 氨基丁酸转氨酶 GABA-AT (PDB: 1SFF)^[29] 的序列进行比对, 从而确定 F91、Q119*、F180、F327*和 L419 为非保守残基(图 4)。对 1a 结合口袋中非保守残基(F91、Q119*、F180、F327*和 L419)进行了单点饱和突变。使用茚三酮显色法对突变体进行高通量筛选, 结果显示仅在 F91 位的饱和突变中存在有益突变体, 经检测该有益突变体为 F91Y。在 100 mmol/L HEPES 溶液中(pH 7.5), 加入 10 mmol/L 1,4-环己烷二甲醛、5 μ mol/L 纯化的 *EcTA* 的野生型和突变体, 室温反应 3 min 后,

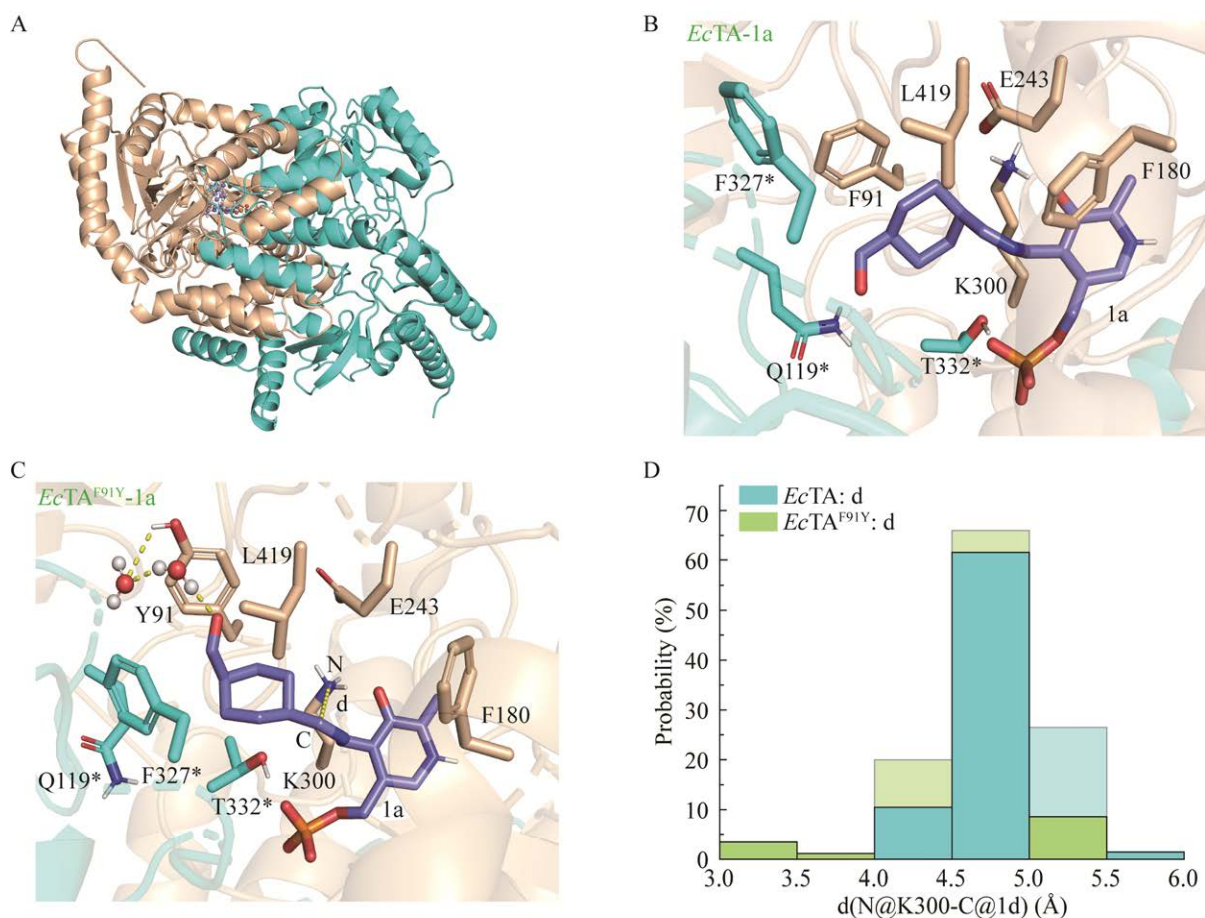


图 3 *EcTA* 的蛋白质工程改造和性能提升的机制解析

Figure 3 Protein engineering and analysis of the underpinning mechanism of *EcTA*. A: Homodimer structure of *EcTA*. B–C: Representative MD snapshots of the *EcTA*-1a and *EcTA*^{F91Y}-1a complexes. D: The distribution of the distance between 1a carbon and K300 side chain amine nitrogen.

取适量转化液经离心过滤处理后,进行 OPA 柱前衍生 HPLC 检测。*EcTA*^{F91Y} 催化生成 1,4-环己烷二甲胺的产量为(7.8±0.4) mmol/L,是野生型产量(2.6±0.2) mmol/L 的 3 倍。*EcTA* 的野生型以及突变体的比酶活和动力学参数如表 4 所示,*EcTA*^{F91Y} 的比酶活是野生型的 3.2 倍,*EcTA*^{F91Y} 的 K_m 与野生型基本相同,但 k_{cat} 是野

生型的 2.8 倍, k_{cat}/K_m 的值是野生型的 2.9 倍。

为了解析突变体 *EcTA*^{F91Y} 性能提升的原因,将 1a 对接到突变体 *EcTA*^{F91Y} 的活性中心,通过 MD 模拟获得动力学稳定的构象(图 3C)。统计催化残基 K300 的侧链氨基 N 原子与 1a 中 C 原子之间的距离,突变体 *EcTA*^{F91Y} 中两原子之间的距离小于 4 Å 的构象占总构象的 4.5%,

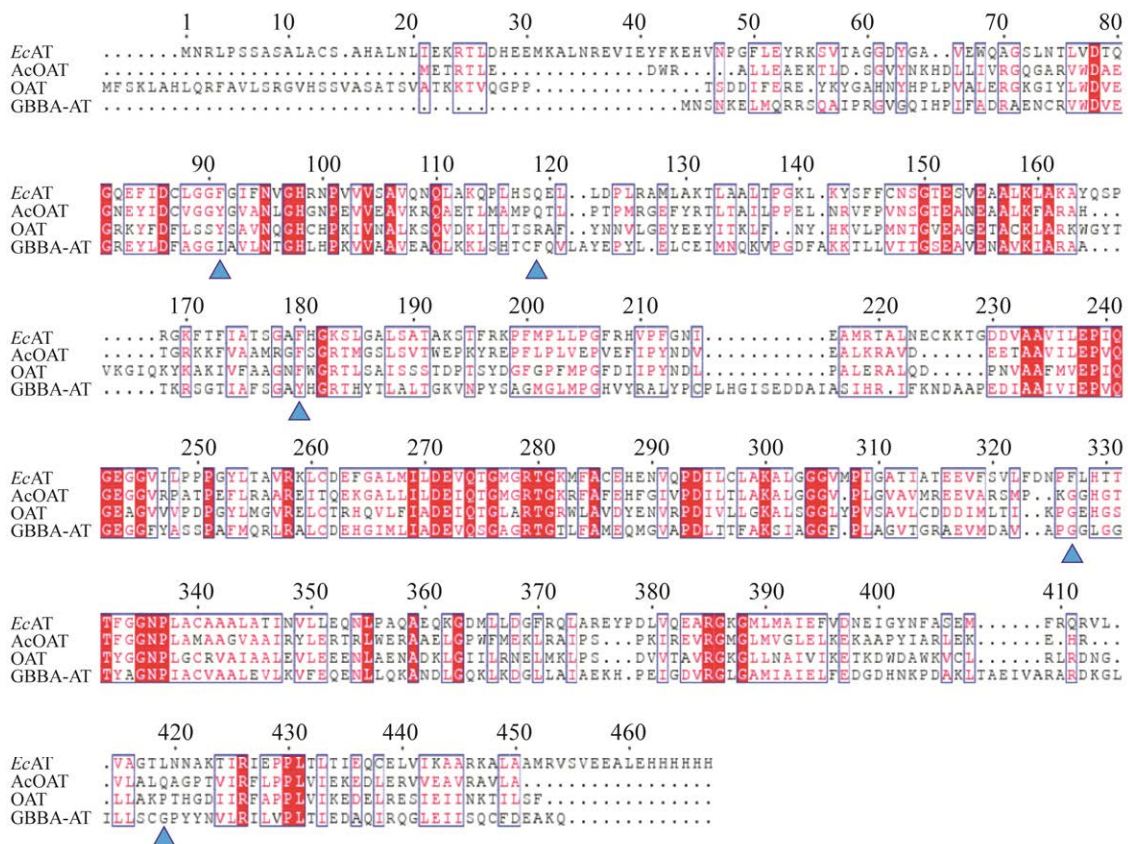


图 4 *EcTA* (PDB: 4UOX)、*AcOAT* (PDB: 1VEF)、*OAT* (PDB: 2OAT)和 *GABA-AT* (PDB: 1SFF)的序列比对 蓝色三角形表示结合口袋中的非保守氨基酸

Figure 4 Sequence alignment of *EcTA* (PDB: 4UOX), *AcOAT* (PDB: 1VEF), *OAT* (PDB: 2OAT) and *GABA-AT* (PDB: 1SFF). The blue triangle indicates the non-conserved amino acids in the binding pocket.

表 4 *EcTA* 及其突变体的比酶活和动力学参数

Table 4 The specific activities and kinetic constants of *EcTA* and its variant

Enzyme	Specific activity (U/mg protein)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/(L·min))
<i>EcTA</i>	4.50±0.14 (1)	5.04±0.55 (1)	238.25±15.12 (1)	47.27±3.00 (1)
<i>EcTA</i> ^{F91Y}	14.41±0.25 (3.2)	4.98±0.36 (1)	668.48±32.92 (2.8)	134.23±6.61 (2.9)

Numbers in parentheses indicate the fold relationship between various parameters of mutant and wild type.

高于野生型的 0.03%。此外,突变体中 2 个原子之间的距离在统计的时间范围内整体小于 *EcTA* 中两原子之间的距离(图 3D),说明相较于野生型, *EcTA*^{F91Y} 更接近催化残基 K300,更容易发生反应。此外,与野生型相比,1a 的末端醛基与 Y91 的侧链酚羟基形成了水介导的氢键网络(图 3B、3C),从而起到稳定 1a 的作用。因此,相比于野生型, *EcTA*^{F91Y} 缩短了 1a 与催化残基 K300 的距离,且能更好地稳定外醛亚胺 1a,从而使 k_{cat} 提高。

2.3 三酶级联菌株的构建及优化

级联路径由 *EcTA*^{F91Y}、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 3 个酶组成,若采用单菌表达单酶的混菌体系进行转化,则使得转化体系的黏度变大,降低传质效率;若采用单菌表达三酶的方式进行转化,则会增加大肠杆菌的负荷,从而影响蛋白的表达。因此,本研究在 2 株大肠杆菌中表达 3 个酶,使

用全细胞转化 1,4-环己烷二甲醛生成 1,4-环己烷二甲胺。考虑到 *EcTA*^{F91Y}、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 的比酶活分别为 14.41、10.62 和 13.27 U/mg,将 *EcTA*^{F91Y} 构建在 pET28a 质粒中,将 *ScGlu-DH* 和 *Cb-FDH* 构建在不同拷贝数的质粒中(pACYCDuet-1、pCDFDuet-1 和 pRSFDuet-1),与之对应的拷贝数为 10、20 和 100。因此构建了 pET28a-*EcTA*^{F91Y} 单基因表达载体以及 pACYC-*ScGlu-DH-CbFDH*、pCDF-*ScGlu-DH-CbFDH* 和 pRSF-*ScGlu-DH-CbFDH* 共 3 种多基因表达载体,分别导入 2 株感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3)中,成功得到了表达 *EcTA*^{F91Y} 的菌株和 3 株共表达 *ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 的工程菌株。经全细胞 SDS-PAGE 验证,表明 *EcTA*^{F91Y}、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 在大肠杆菌中均实现了可溶性表达(图 5A)。在反应体系中加入 10 g/L 1,4-环己烷二甲醛、30 g/L BL21-*EcTA*^{F91Y} 全细胞和

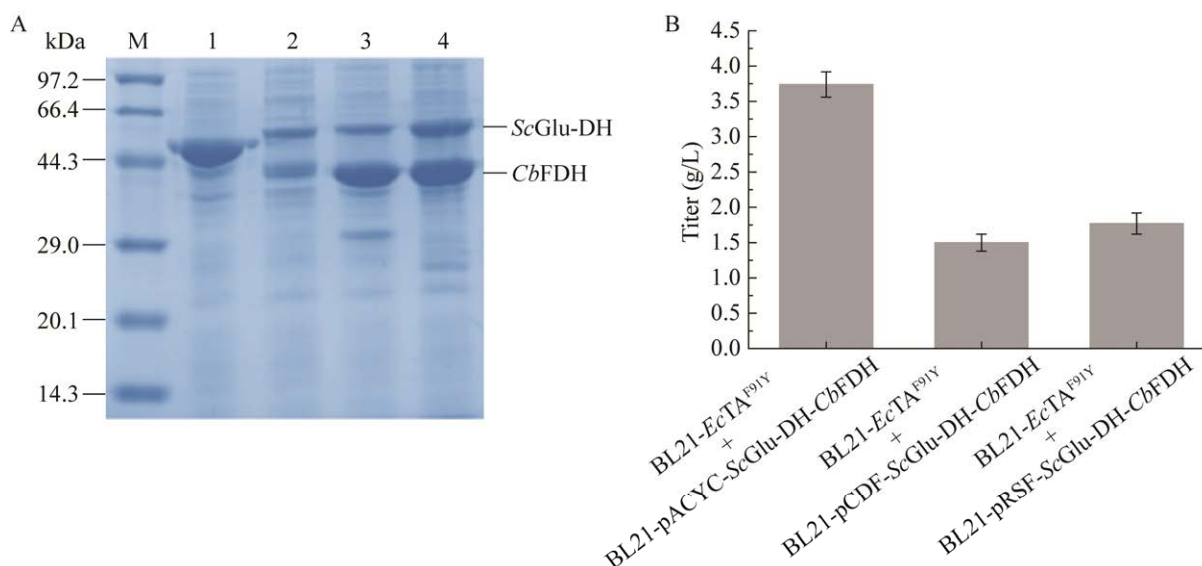


图 5 重组菌株的构建与转化效果评价

Figure 5 Evaluation of the construction of recombinant strains and bioconversion. A: The soluble expressions of *ScGlu-DH* and *CbFDH* on pACYCDuet-1, pCDFDuet-1 and pRSFDuet-1 as well as *EcTA*^{F91Y} on pET28a were detected by SDS-PAGE. Lane M: Protein Marker; Lane 1-4: *EcTA*^{F91Y} on pET28a, *ScGlu-DH* as well as *CbFDH* on pCDFDuet-1, pRSFDuet-1 and pACYCDuet-1. B: The production of 1,4-cyclohexanedimethylamine from 1,4-cyclohexanedicarboxaldehyde using different recombinant strains.

30 g/L BL21-ScGlu-DH-CbFDH 全细胞, 并加入 20 mmol/L 谷氨酸、200 mmol/L 甲酸铵、2 mmol/L NAD^+ 和 0.5 mmol/L PLP, 在 pH 7.5、30 °C 和 200 r/min 条件下反应 24 h, 结果如图 5B 所示。其中, BL21-*EcTA*^{F91Y} 和 BL21-pACYC-ScGlu-DH-CbFDH 催化生成 1,4-环己烷二甲胺的产量最高为(3.74±0.18) g/L, 表明该双菌三酶反应系统构建成功, 并且成功转化 1,4-环己烷二甲胺生成 1,4-环己烷二甲胺。

为了进一步提高 1,4-环己烷二甲胺的产量, 考察了反应 pH、温度和谷氨酸的浓度对全细胞催化的影响。在 10 g/L 1,4-环己烷二甲

醛、20 mmol/L 谷氨酸、200 mmol/L 甲酸铵、2 mmol/L NAD^+ 和 0.5 mmol/L PLP 的条件下, 当 pH、温度和谷氨酸浓度分别为 7.5、30 °C 和 80 mmol/L 时, 1,4-环己烷二甲胺的产量最高为(7.52±0.15) g/L (图 6A、6C)。为了提高反应体系中的底物浓度, 按上述谷氨酸浓度(mmol/L): 底物浓度(g/L)=8:1 的最优比例, 研究了当底物浓度升高时 1,4-环己烷二甲胺的产量。结果发现在 40 g/L 底物和 320 mmol/L 谷氨酸的条件下, 1,4-环己烷二甲胺的产量最高, 为(27.4±0.9) g/L, 摩尔转化率为 67.5%±2.1% (图 6D)。

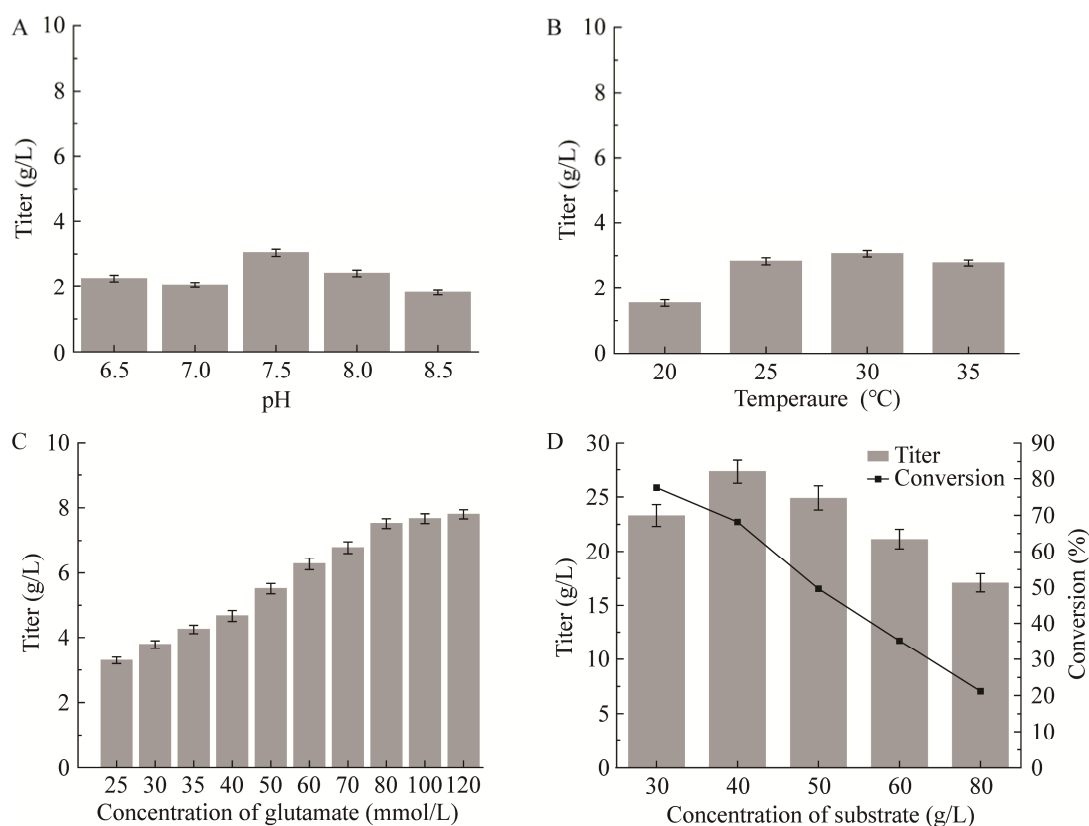


图 6 全细胞催化反应条件的优化

Figure 6 Optimization of reaction conditions for whole cell biocatalysis. A: Effect of reaction pH on 1,4-cyclohexanedimethylamine production. B: Effect of temperature on 1,4-cyclohexanedimethylamine production. C: Effect of amine donor concentration on 1,4-cyclohexanedimethylamine production. D: Effect of substrate concentration on 1,4-cyclohexanedimethylamine production.

3 结论

本研究利用 *EcTA*^{F91Y}、*ScGlu-DH* 和 *CbFDH* 成功构建了双菌三酶级联转化 1,4-环己烷二甲胺生成 1,4-环己烷二甲胺的路径。通过 *EcTA* 的蛋白质工程改造、共表达菌株的构建以及反应体系的优化, 当底物浓度为 40 g/L 时, 在 30 °C 和 pH 7.5 的条件下反应 24 h, 1,4-环己烷二甲胺产量达到 (27.4±0.9) g/L, 摩尔转化率达 67.5%±2.1%, 为后续酶法规模化生产 1,4-环己烷二甲胺奠定了一定的理论基础。

REFERENCES

- [1] SHOICHI K, SUSUMU N. Production of bis(aminomethyl)cyclohexane: JP07229177[P]. 1996-06-04.
- [2] BUTTE WA Jr. Hydrogenation of terephthalnitrile: US19760724504[P]. 1978-01-24.
- [3] TAKAGAWA MAKOTO. Process for producing bisaminomethylcyclohexane: DE69219059[P]. 1993-04-28.
- [4] TL·兰肯, HP·克莱恩. 通过环己烷二甲醇的直接胺化生产环己烷二甲胺: CN101959848B[P]. 2016-03-09. RENKEN TL, KLEIN HP. Cyclohexanedimethanamine by direct amination of cyclohexanedimethanol: CN101959848B[P]. 2016-03-09 (in Chinese).
- [5] 任树杰, 张聪颖, 龚亚军, 李海龙, 刘帅, 王勤隆, 陈杰, 尚永华, 黎源. 一种制备环己烷二甲胺的方法: CN201911098026.3[P]. 2022-08-05. REN SJ, ZHANG CY, GONG YJ, LI HL, LIU S, WANG QL, CHEN J, SHANG YH, LI Y. A method for preparing cyclohexane dimethylamine: CN201911098026.3[P]. 2022-08-05 (in Chinese).
- [6] RENKEN TERRY L, KLEIN HOWARD P. Cyclohexanedimethanamine by direct amination of cyclohexanedimethanol: CA2715499C[P]. 2016-05-24.
- [7] 杨延米. 间苯二甲胺选择加氢制备 1,3-环己二甲胺钌基催化体系研究[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2020. YANG YM. Study on ruthenium-based catalytic system for selective hydrogenation m-phenyldimethylamine to 1,3-cyclohexamethylamine[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2020 (in Chinese).
- [8] ALLEN SA, REDNOUR S, SHEPARD S, POND BB. A simple and sensitive high-performance liquid chromatography-electrochemical detection assay for the quantitative determination of monoamines and respective metabolites in six discrete brain regions of mice[J]. Biomedical Chromatography, 2017, 31(11): e3998.
- [9] DAVIS TP, GEHRKE CW, GEHRKE CW Jr, CUNNINGHAM TD, KUO KC, GERHARDT KO, JOHNSON HD, WILLIAMS CH. High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in biological materials as o-phthalaldehyde derivatives[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1979, 162(3): 293-310.
- [10] CHA HJ, JEONG JH, ROJVIRIYA C, KIM YG. Structure of putrescine aminotransferase from *Escherichia coli* provides insights into the substrate specificity among class III aminotransferases[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113212.
- [11] GORDON JC, MYERS JB, FOLTA T, SHOJA V, HEATH LS, ONUFRIEV A. H++: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Web server issue): W368-W371.
- [12] ROY DENNINGTON TK, JOHN MILLAM, SEMICHEM INC. Gaussview, version 6.1.1[Z]. Shawnee Mission, KS. 2019.
- [13] FRISCH MJ, TRUCKS GW, SCHLEGEL HB. Gaussian 16 Rev. C.01[Z]. Wallingford, CT. 2016.
- [14] MORRIS GM, GOODSSELL DS, HALLIDAY RS, HUEY R, HART WE, BELEW RK, OLSON AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function[J]. Journal of Computational Chemistry, 1998, 19(14): 1639-1662.
- [15] CASE DA, BERRYMAN JT, CASE HM, AKTULGA K. Amber 16[M]. University of California, San Francisco, 2016.
- [16] JAKALIAN A, JACK DB, BAYLY CI. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation[J]. Journal of Computational Chemistry, 2002, 23(16): 1623-1641.
- [17] ESLAMI H, MOJAHEDI F, MOGHADASI J. Molecular dynamics simulation with weak coupling to heat and material baths[J]. The Journal of Chemical Physics, 2010, 133(8): 084105.
- [18] DARDEN T, YORK D, PEDERSEN L. Particle mesh Ewald-an N.log(N) method for Ewald sums in large systems[J]. The Journal of Chemical Physics, 1993, 98(12): 10089-10092.

- [19] GONNET P. P-SHAKE: a quadratically convergent SHAKE in $O(n^2)$ [J]. *Journal of Computational Physics*, 2007, 220(2): 740-750.
- [20] MOYE WS, AMURO N, RAO JK, ZALKIN H. Nucleotide sequence of yeast GDH1 encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(14): 8502-8508.
- [21] YIN XJ, LIU YY, MENG LJ, ZHOU HS, WU JP, YANG LR. Semi-rational hinge engineering: modulating the conformational transformation of glutamate dehydrogenase for enhanced reductive amination activity towards non-natural substrates[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2020, 10(10): 3376-3386.
- [22] HUMMEL W, GROEGER H. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 191: 22-31.
- [23] VRTIS JM, WHITE AK, METCALF WW, van der DONK WA. Phosphite dehydrogenase: a versatile cofactor-regeneration enzyme[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2002, 41(17): 3257-3259.
- [24] WANG XD, SABA T, YIU HHP, HOWE RF, ANDERSON JA, SHI JF. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterogeneous pathways[J]. *Chem*, 2017, 2(5): 621-654.
- [25] FINAN TM, WEIDNER S, WONG K, BUHRMESTER J, CHAIN P, VORHÖLTER FJ, HERNANDEZ-LUCAS I, BECKER A, COWIE A, GOUZY J, GOLDING B, PÜHLER A. The complete sequence of the 1 683 kb pSymB megaplasmid from the N_2 -fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(17): 9889-9894.
- [26] OMURA S, IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, TAKAHASHI C, SHINOSE M, TAKAHASHI Y, HORIKAWA H, NAKAZAWA H, OSONOE T, KIKUCHI H, SHIBA T, SAKAKI Y, HATTORI M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(21): 12215-12220.
- [27] FEDORCHUK TP, KHUSNUTDINOVA AN, EVDOKIMOVA E, FLICK R, Di LEO R, STOGIOS P, SAVCHENKO A, YAKUNIN AF. One-pot biocatalytic transformation of adipic acid to 6-aminocaproic acid and 1,6-hexamethylenediamine using carboxylic acid reductases and transaminases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(2): 1038-1048.
- [28] STORICI P, CAPITANI G, MÜLLER R, SCHIRMER T, JANSONIUS JN. Crystal structure of human ornithine aminotransferase complexed with the highly specific and potent inhibitor 5-fluoromethylornithine[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285(1): 297-309.
- [29] LIU WS, PETERSON PE, CARTER RJ, ZHOU XZ, LANGSTON JA, FISHER AJ, TONEY MD. Crystal structures of unbound and aminooxyacetate-bound *Escherichia coli* γ -aminobutyrate aminotransferase[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(34): 10896-10905.

(本文责编 郝丽芳)