

表达细胞色素 b562 及分子改造 L-氨基酸脱氨酶 提高全细胞转化法合成丙酮酸效率

习朝文^{1,2}, 刘延峰^{1,2}, 李江华^{*1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}, 刘龙^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 丙酮酸广泛用于制药、农业化学和化学工业。通过两种策略提高生物转化合成丙酮酸效率。首先,通过表达细胞色素 b562 提高黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)合成的效率,使反应时间由 27 h 减少到 21 h,生产率提高了 28.5%。其次,通过饱和突变技术对 L-氨基酸脱氨酶(pm1)进行定向进化提高其催化能力,三突变体 E418A / V438I / L278I 催化合成丙酮酸产量为 25.58 g/L,相比对照菌株提高了 44.60%。结果表明,运用饱和突变技术和表达 pm1 伴侣蛋白(细胞色素 b562)分别提高 pm1 催化能力与 FAD 合成效率能有效提高全细胞转化法合成丙酮酸的效率。

关键字: L-氨基酸脱氨酶;饱和突变;丙酮酸;全细胞转化

中图分类号:Q819 文章编号:1673-1689(2021)04-0017-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.003

Improvement of the Efficiency of Pyruvate Production by *Escherichia coli* Whole-Cell Biocatalyst through Expression of Cytochrome b562 and Protein Engineering

XI Chaowen^{1,2}, LIU Yanfeng^{1,2}, LI Jianghua^{*1,2}, DU Guochen^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, LIU Long^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Pyruvate is widely used in pharmaceutical, agrochemical and chemical industries. Two strategies were used to improve the efficiency of bioconversion to pyruvate. First, the efficiency of adenine dinucleotide (FAD) synthesis was improved by expressing cytochrome b562, reducing the reaction time from 27 h to 21 h and increasing the productivity by 28.5%. Secondly, the directional evolution of L-amino acid deaminase (pm1) was achieved by site-saturation mutagenesis to improve its catalytic ability, and the yield of pyruvate in the triple mutant E418A/V438I/L278I was 25.58 g/L, which was 44.60% higher than that of the control strain. All the results showed that the efficiency of pyruvate produced by *E. coli* whole-cell biocatalyst could be effectively increased by the improvement of pm1 catalytic ability and FAD synthesis efficiency using site-saturation mutagenesis

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31622001)。

* 通信作者: 李江华(1966—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事发酵工程与生物催化方面的研究。

E-mail: lijiahua@jiangnan.edu.cn

and expressing pm1 chaperone (cytochrome b562).

Keywords: L-amino acid deaminase, site-saturation mutagenesis, pyruvate, whole-cell biocatalyst

丙酮酸是一种有广泛应用的有机物中间体^[1],在医药、农业、食品及化工方面有重要用途^[2-4]。目前,市场上丙酮酸主要由化工法和发酵法合成。在化工合成中,丙酮酸主要由酒石酸脱水和脱羧基合成。对于微生物发酵法,丙酮酸主要由2大类微生物(光滑球属酵母和大肠杆菌)合成^[5]。目前,发酵法在合成丙酮酸过程中占主导地位,但是该方法的缺点是底物对丙酮酸的转化率比较低。本研究中,作者采用了一种新的用于合成丙酮酸的生物转化法。在之前的研究中,作者已用生物转化法合成了酮戊二酸、酮异己酸、苯丙氨酸和酮异戊酸等多种酮酸^[6-10]。

该生物转化法中,L-氨基酸脱氨酶(pm1)发挥关键作用。pm1是一种依赖于黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的膜蛋白,能催化L-型氨基酸生成对应的酮酸及氨^[11-13],其反应机理见图1。在之前的工作中,作者已经构建好表达pm1的大肠杆菌菌株,其能催化丙氨酸生成丙酮酸,产量为14.57 g/L^[14]。本研究中,作者通过2种策略进一步提高丙酮酸的合成效率。其一是通过表达细胞色素b562(cybC,14 100)来提高FAD在催化过程中的合成效率,该细胞色素能将H原子由FADH₂通过电子传递链传递给氧气^[15-16]。其二是通过饱和突变技术对pm1定向进化提高其催化能力。

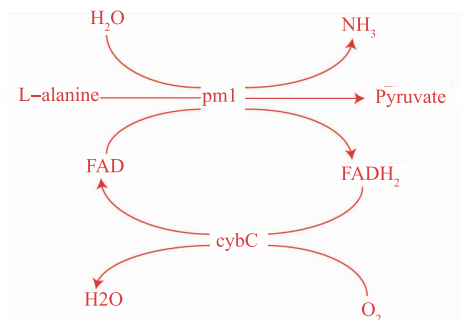


图1 L-氨基酸脱氨酶催化丙氨酸生成丙酮酸反应机理图
Fig. 1 Reaction mechanism diagram for pyruvate production from L-alanine by L-amino acid

1 材料与方法

1.1 相关试剂

Prime STAR HS DNA polymerase, 2×Taq PCR

mix, SanPrep 柱式质粒小提试剂盒, Ezup 柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒, DNA纯化试剂盒和细菌感受态制备试剂盒:均购自TAKARA公司(中国大连);丙酮酸钠标样和FAD分析试剂盒:购自Sigma-Aldrich有限公司;限制性内切酶Nde I和Xho I, T4-DNA连接酶:购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;IPTG和氨苄青霉素:购自生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 菌株和培养基

作者所用菌株和质粒均在表1中列出。种子培养基为液体LB, 配方为:10 g/L蛋白胨, 5 g/L酵母提取物, 10 g/L氯化钠。发酵培养基为TB, 配方为:12 g/L蛋白胨, 24 g/L酵母提取物, 5 g/L甘油, 17 mmol/L磷酸二氢钾, 72 mmol/L磷酸氢二钾。LB固体培养基:10 g/L蛋白胨, 5 g/L酵母提取物, 10 g/L氯化钠, 20 g/L琼脂粉, 100 μg/mL氨苄青霉素。

1.3 重组质粒的构建及表达

cybC的基因序列扩增自大肠杆菌基因组, pm1的基因序列扩增自质粒(pET20b(+)-pm1), 所用引物在表2中列出。PCR产物通过1 g/dL琼脂糖核酸电泳分离, 之后通过DNA纯化试剂盒进行纯化。cybC的基因片段和pm1的基因片段通过融合PCR进行融合, 融合PCR产物纯化步骤同上。纯化后的融合片段和空质粒pET20b(+)分别用限制性内切酶Nde I和Xho I于37℃处理3 h, 之后酶切产物通过DNA纯化试剂盒进行纯化, 最后用T4-DNA连接酶进行连接, 连接24 h后转化至大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中。涂布于LB固体平板, 挑选单菌落进行菌落PCR验证和测序验证。

将保存在甘油管中的菌液按1%的接种体积分数接种到液体LB培养基中进行种子培养, 培养条件为:250 mL三角瓶装液量为25 mL, 37℃, 12 h, 100 μg/mL氨苄青霉素。将种子液转接到TB培养基中进行发酵培养, 培养条件:250 mL三角瓶装液量25 mL, 100 μg/mL氨苄青霉, OD_{600nm}值为2.0时, 加入终浓度0.04 mmol/L IPTG开始诱导, 同时将温度降低至25℃, 诱导12 h。菌体通过离心收集(7 000 g, 4℃, 10 min), 最终用0.2 mol/L磷酸钠缓冲液(pH 7.0)

表 1 研究中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	相关说明	来源
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) -pET-20b (+)-pm1	过表达 pm1 的重组大肠杆菌 BL21(DE3),以 pET-20b(+)为载体	作者所在实验室
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) -pET-20b (+)-pm1-cybC <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pET-20b (+)	过表达 pm1 的基因及 <i>cybC</i> 基因的重组大肠杆菌 BL21(DE3),以 pET-20b(+)为载体	作者所在实验室 Invitrogen, Carlsbad, CA Invitrogen

表 2 本研究中所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	碱基序列 (5'-3')	退火温度/℃	限制性酶切位点
pm1-cybC-UF	CGGGGATCCGATGAACATTTC AAGGAGAAAAG	67	<i>Nde</i> I
pm1-cybC-UR	TTTTACGCATTAGTATATCTCCTTCTTATTATTACTTCTTAAAACGATCC	67	/
pm1-cybC-DF	TTTAAGAAGTAATAATAAGAAGGAGATATACTAATGCGTAAAAGCCTGTTAGCT ATTC	69	/
pm1-cybC-DR	CCGCTCGAGTTAACGATACTTCTGCTGATAGGCCG	69	<i>Xho</i> I
L278-F	CTCAATGTATATNNKTCACAACAACGTGTCT	62	/
L278-R	ACGTTGTTGTGAMNNATATACATTGAGCGTT	62	/
E341-F	TTAGGTGGCGGANNKTTACCGTTGGAATTC	66	/
E341-R	TTCCAACGGTAAMNNTCCGCCACCTAATAAG	66	/
E418-F	CCAACATTGATNNKTTACCTATCATTCTG	60	/
E418-R	AATGATAGGTAAMNNATCAAATGTTGGACTC	60	/
V438-F	AACACGGCAACANNKTGGCGGTATGACCGAAG	70	/
V438-R	GGTCATACCCAMNNTGTTGCCGTGTTAATC	70	/
L278I-F	CTCAATGTATATTTCTCACAACAACGTGTCT	62	/
L278I-R	ACGTTGTTGTGAGAAATATACATTGAGCGTT	62	/
E418A-F	CAACATTTGATGCGTTACCTATCATTTTC	60	/
E418A-R	AATGATAGGTAACGCATCAAATGTTGGAC	60	/
V438I-F	AACACGGCAACAATTTGGCGGTATGACCGAAG	70	/
V438I-R	GGTCATACCCCAAATTTGTTGCCGTGTTAATC	70	/

注:酶切位点和突变位点已用下划线标出。

悬浮,并于 4℃条件下保存。细胞干重 DCW(g/L)和 OD_{600 nm} 值由如下公式(1)进行换算^[17]:

$$DCW(g/L) = 0.444 \times OD_{600 nm} - 0.021 \quad (1)$$

1.4 SDS-PAGE 分析蛋白质表达情况

cybC 表达情况通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析。样品处理步骤为:用去离子水将细胞稀释至 5 g/L,30 μL 样品与 10 μL 缓冲液(NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4×))混合,之后进行热处理(100℃、15 min)。最后进行凝胶电泳,上样量 10 μL。结束后用考马斯亮蓝染色,用水洗脱。

1.5 表达细胞色素对催化合成丙酮酸的影响

为研究表达细胞色素对催化合成丙酮酸的影响,

我们对大肠杆菌 BL21(DE3)-pET20b(+)-pm1 和大肠杆菌 BL21(DE3)-pET20b(+)-pm1-cybC 分别进行发酵培养,诱导时间为 6、8、10、12 h 及 14 h。发酵结束后收集细胞进行催化反应,催化反应按照 1.6 中优化结果进行。

1.6 pH 值及细胞质量浓度优化

催化反应条件为:250 mL 摇瓶装液量为 20 mL,反应温度为 37℃,底物质量浓度为 80 g/L D,L-丙氨酸。对于 pH 值及细胞质量浓度优化,所用菌株为大肠杆菌 BL21(DE3)-pET20b(+)-pm1。在 pH 值优化实验中,细胞质量浓度 1.5 g/L,用 0.2 mol/L 磷酸钠盐缓冲液及 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液调节初始

pH 值,其梯度为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5。在细胞质量浓度优化实验中,初始 pH 值为前面优化结果,细胞质量浓度梯度为 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 g/L。

1.7 同源酶晶体结构分析及饱和突变、筛选

从 Swiss Model 在线网站得到 pm1 同源性为 88.58% 晶体模型,该晶体模型来源于 *Proteus myxofaciens*^[16]。通过分析该模型活性中心关键氨基酸,选取 4 个位点对其进行饱和突变。突变建库方法为一步法全质粒扩增,所用引物在表 2 中列出。用牙签在每个突变点库中随机挑选大概 100 个单克隆到 48 孔板进行发酵培养及初筛。每孔装液量为 600 μ L 液体 LB,37 $^{\circ}$ C 孔板摇床培养 12 h,之后转接至每孔含有 300 μ L 液体 TB 培养基的 48 孔板进行发酵培养,转接体积分数为 50%,同时加入终浓度 0.08 mmol/L IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 进行诱导,诱导 6 h 后发酵结束,离心(4 200 g,5 min,4 $^{\circ}$ C)弃上清液。

底物浓度为 500 mmol/L L-丙氨酸,溶解到 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液中(pH 值 7.0),将 50 μ L 底物加入到含有细胞的 48 孔板中进行催化反应,37 $^{\circ}$ C,30 min 后离心,停止反应。通过显色法测量上清液中丙酮酸含量,上清液中丙酮酸产量较高的突变菌株为目标菌株。显色测量方法为:取 50 μ L 上清液与 50 μ L 0.1 g/dL 2,4-二硝基苯肼混合,室温放置 5 min,最后加入 1 mL 1.5 mol/L 氢氧化钠溶液,待颜色稳定后吸取 200 μ L 液体,在酶标仪中检测其在 520 nm 下的吸收值。突变、筛选流程如图 2 所示。

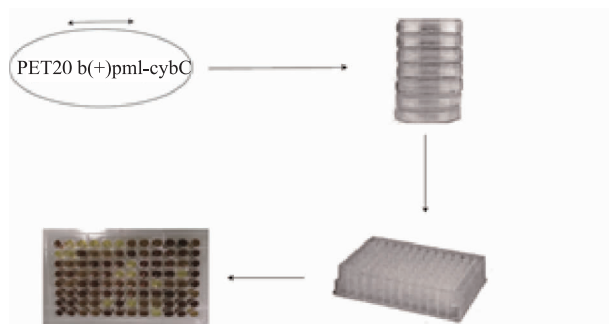


图 2 饱和突变及高通量筛选

Fig. 2 Saturation mutation and high-throughput screening

1.8 膜蛋白提取及其酶学性质分析

用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 值 7.0)使对照组和突变体细胞悬浮,再通过超声将其破碎。将破碎液通过 10 000 g 离心 1 h 使未破碎细胞和上清液分离,取上清液进行超高速离心(100 000 g,1 h),

产生沉淀为细胞膜成分,用磷酸钠盐缓冲液将沉淀溶解。通过 BCA 蛋白质浓度分析试剂盒(TianGen, 北京,中国)测量其蛋白质浓度。在酶学性质测量试验中,底物 L-丙氨酸浓度为 1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150 mmol/L 和 200 mmol/L,蛋白质质量为 1.5 mg,于 37 $^{\circ}$ C 条件下进行,30 min 后通过显色法检测反应液中丙酮酸浓度。 K_m 值和 V_{max} 值通过如下公式(2)进行计算:

$$V = V_{max} \cdot c_s / (K_m + c_s) \quad (2)$$

V 表示反应速率(丙酮酸生成量; μ mol/min), V_{max} 表示最大反应速率, K_m 表示米氏常数(mmol/L), c_s 表示底物 L-丙氨酸浓度。

1.9 丙酮酸、丙氨酸及 FAD 含量分析

采用高效液相色谱法(HPLC)检测丙酮酸含量。取 0.2 mL 离心后的反应上清液,稀释一定倍数后用 0.22 μ m 孔径滤膜过滤,滤液即为待测样品。色谱柱为:Agilent 1260 型高效液相色谱仪,伯乐 Aminex PHX-87H 色谱柱(300 mm $\times$ 7.8 mm,9 μ m),流动相为 5 mmol/L 稀硫酸,进样量 10 μ L,流量为 0.6 mL/min,紫外检测波长 210 nm,柱温 40 $^{\circ}$ C,洗脱时间 15 min。

细胞内辅酶 FAD 浓度通过 FAD 分析试剂盒(Sigma - Aldrich)测定^[18]。将细胞从反应体系中离心取出,用水洗涤一遍,离心后用 FAD 分析试剂缓冲液使之悬浮,14 000 g 离心 10 min,去除不容物质。通过使用高氯酸(8 g/dL)使 FAD 从蛋白质中释放出来。反应体系含 92 μ L FAD 分析缓冲液,4 μ L 荧光过氧化物酶,4 μ L FAD 酶混合物,50 μ L 待测样品。通过加入反应终止试剂终止反应,最后检测其在 570 nm 下的吸光值。

采用临苯二甲醛-氯甲酸苄基甲酯(OPA-FMOC)柱前衍生反相高效液相色谱法来测定样品中的丙氨酸含量。将转化液上清部分稀释合适倍数,用 0.45 μ m 孔径滤膜过滤,滤液即为待测样品。色谱条件为:Agilent 1260 型高效液相色谱仪,依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m),使用流动相 A 和流动相 B,进样量 10 μ L,流量为 1.0 mL/min,紫外检测波长为 338 nm,柱温 40 $^{\circ}$ C,采用梯度洗脱,洗脱时间 38 min,梯度洗脱表见表 3。

2 结果与分析

2.1 表达 cybC 与 pm1

细胞色素 b562 是大肠杆菌有氧呼吸链上的一

表 3 丙氨酸分析梯度洗脱表

Table 3 Gradient elution of alanine analysis

时间/min	A/%	B/%	流量/(mL/min)
0	92	8	1.0
27.5	40	60	1.0
31.5	0	100	1.5
32	0	100	1.5
34	0	100	1.0
35.5	92	8	1.0

种氧化酶。在电子传递链中,它将 2 个 H 原子从 FADH₂ 传递给氧气^[19-20]。本研究,作者在大肠杆菌中共表达 cybC 与 pm1,之后验证表达细胞色素 b562 后对菌株的生长影响,结果见图 3,表达该细胞色素后会降低宿主的生长速率,原因可能是过量表达该细胞色素对宿主细胞膜通透性影响较大。为验证细胞色素 b562 的表达情况,我们将样品按照 1.4 中的方法处理后,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析,其结果见图 4。

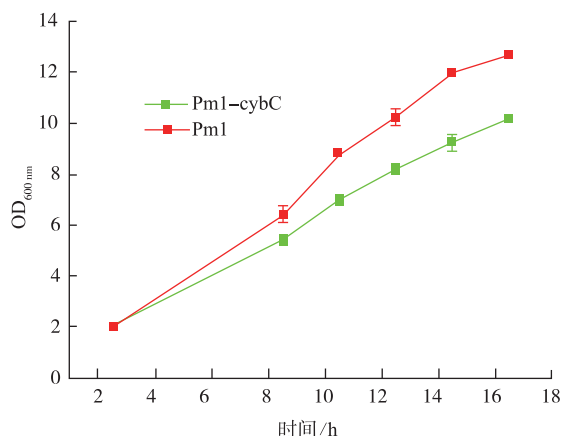
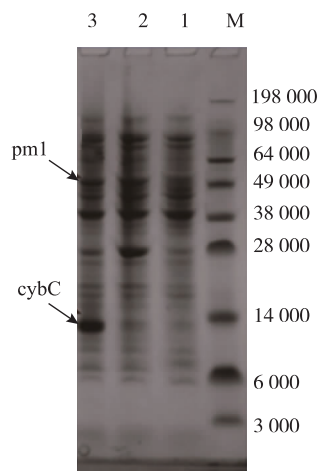


图 3 表达 cybC 对宿主生长的影响

Fig. 3 Effects of cybC expression on the growth of host cells

最后,作者研究表达细胞色素对催化合成丙酮酸的影响。结果见图 5(a)、(b)所示,细胞色素并不会影响最适诱导时间,2 株菌最适诱导时间在 12~14 h 左右,最终丙酮酸产量相差不大。然而,表达细胞色素后,见图 5(a),催化合成丙酮酸的速率较对照菌高,同时胞内 FAD 的含量也较对照菌高。因此作者推测,表达细胞色素 b562 能提高 FAD 合成速率,从而提高丙酮酸合成速率。



1: 大肠杆菌带有空质粒 pET20b (+); 2: 大肠杆菌带有 pET20b(+)-pm1; 3: 大肠杆菌带有 pET20b(+)-pm1-cybC。

图 4 蛋白电泳分析

Fig. 4 Whole-cell SDS-PAGE analysis

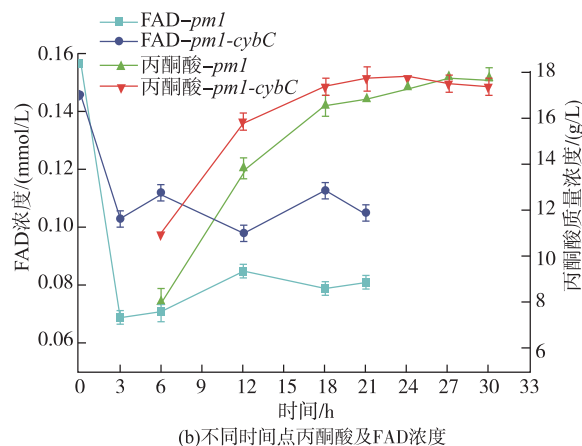
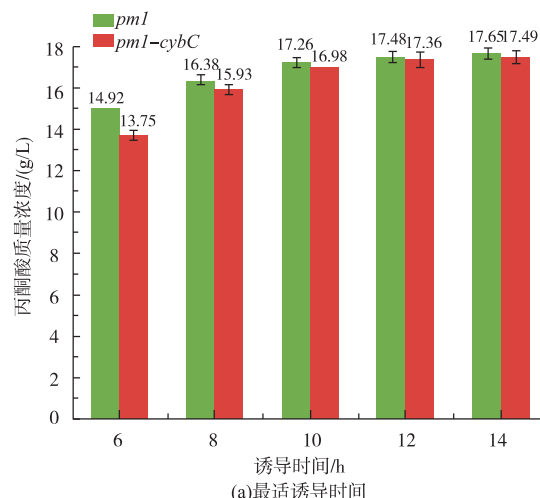


图 5 表达细胞色素对催化合成丙酮酸影响

Fig. 5 Effects of cybC expression on pyruvate production

2.2 最适 pH 值及细胞浓度

pH 值对酶的功能影响较大,为此,作者研究了不同 pH 值对催化反应的影响。如图 6(a)所示,pH 值为 7.0 时,丙酮酸最高产量为 17.10 g/L。过高的 pH 值对丙酮酸积累不利,原因之一是过高 pH 值使

酶的活性损失比较大,导致最终产量降低。同时,我们在催化过程中各时间点取样测量其 pH 值,发现 pH 值基本可以保持稳定,这说明随着催化进行,缓冲液可以维持 pH 值稳定,使酶可以持续发挥催化能力。

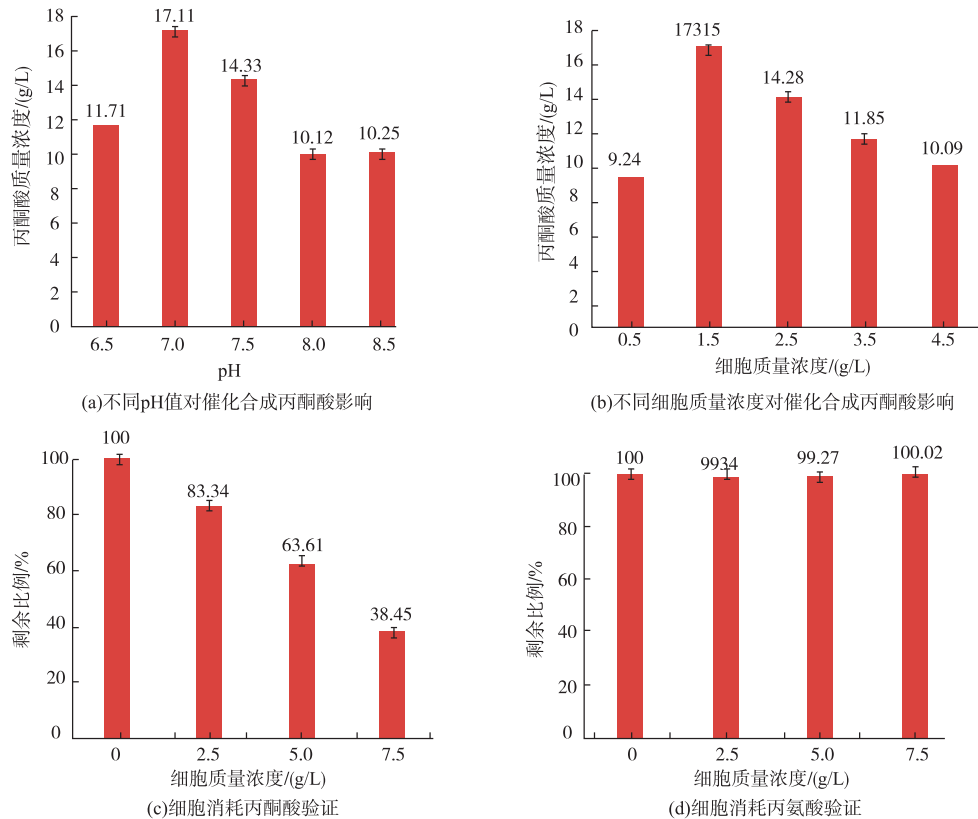
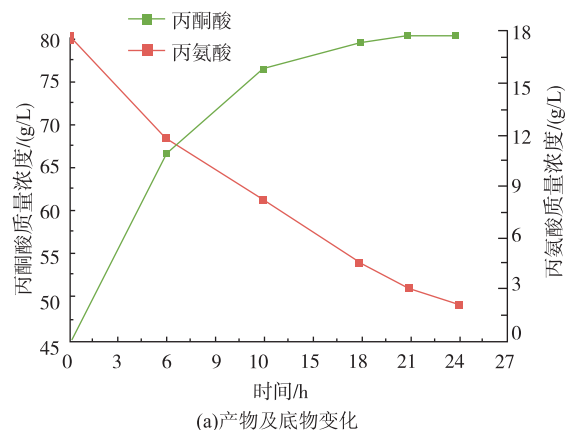


图 6 最适 pH 值及细胞质量浓度

Fig. 6 Optimal pH and cell density

催化体系中酶的量直接由加入的细胞量决定。为此,作者研究了不同细胞量对酶催化的影响。结果如图 6(b)所示,细胞质量浓度为 1.5 g/L 时,产量达到最高为 17.15 g/L,然而细胞质量浓度更高时,产量反而降低。为此,作者进一步设计实验,验证细胞对丙氨酸和丙酮酸的消耗情况,结果见图 6(c)、(d)。该结果表明在催化过程中细胞会消耗一定量的丙酮酸,但几乎不消耗丙氨酸。本实验结果证明了利用大肠杆菌发酵生产丙酮酸时,弱化或消除这类消耗丙酮酸的途径的必要性^[21-22]。因此,作者选择细胞质量浓度为 1.5 g/L 作为催化反应的条件,产量为 17.15 g/L,转化率达 42.75%。同时,作者在催化过程中各时间点取样检测细胞质量浓度、丙酮酸及丙氨酸含量。其结果如图 7 所示,细胞质量浓度在催化过程中会降低,可能是由于在高离子浓度的溶

液中细胞破裂导致的。催化结束,丙氨酸与丙酮酸的总量为 65 g/L,与初始底物 80 g/L 有一定的差值,根据作者所在实验室之前的结论,这部分差值是细胞消耗丙酮酸导致的。



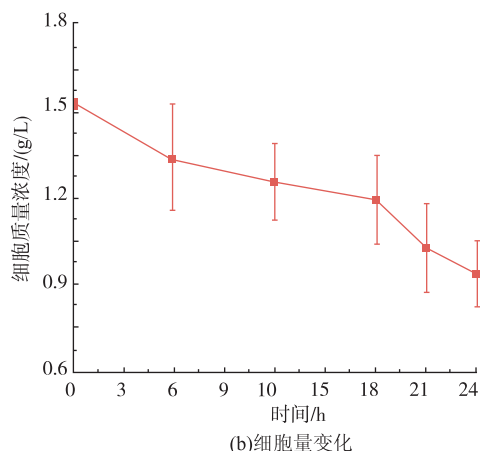


图 7 催化过程中底物、产物及细胞量变化

Fig. 7 Changes of substrate concentration, product concentration and cell density during the biocatalyst process

2.3 pm1 突变体对合成丙酮酸的影响及其酶学性质分析

饱和突变是研究蛋白酶的结构与功能关系的一种非常有效的手段。该技术可以确定每个位点最适合的氨基酸^[23]。然而,选择合适的位点进行饱和突变至关重要。本研究中,作者通过分析同源酶晶体结构,见图 8(a),寻找合适的位点进行饱和突变。如

图 8(b)所示,FAD 位于底物口袋中心,选择周围 4 个关键位点(279、341、418 和 438)作为饱和突变的位点。经过一轮筛选,从 279、418 和 438 位点突变库中各筛选出丙酮酸产量较对照菌有提高的菌株。经过测序验证,它们分别是 L279I、E418A 和 V438I。在 341 位点突变库中,并没有获得较好的突变菌株,这说明谷氨酸是 341 位点最合理的氨基酸。之后作者验证了这 3 株菌催化生产丙酮酸的能力,其结果见图 9,三突变体 L279I/V438I/E418A 丙酮酸产量最大,为 25.58 g/L,相比对照菌 17.69 g/L,提高 44.6%。

最后作者对 L-氨基酸脱氨酶突变体及野生型进行酶学性质检测及分析。如表 4 所示,突变体 E418A 对提高底物亲和性较明显, K_m 值由 (42.75 ± 0.51) mmol/L 降低至 (30.28 ± 0.67) mmol/L。如图 8(c)所示,418 位点位于丙酮酸离开活性中心的路径^[9],将该位点的谷氨酸替换成丙氨酸后,其侧链长度降低,使得丙氨酸更容易离开活性中心。突变体 L279I 和 V438I,其 K_m 值相对于野生型变化不大, K_{cat} 值相比野生型提高 1.75 和 1.60 倍。如图 8(d)所示,279 和 438 位点分别位于 L-氨基酸脱氨酶底物口袋内,该两个位点替换成异亮氨酸后,能增加底物口袋内的疏水性,从而提高其对底物的催化能力。

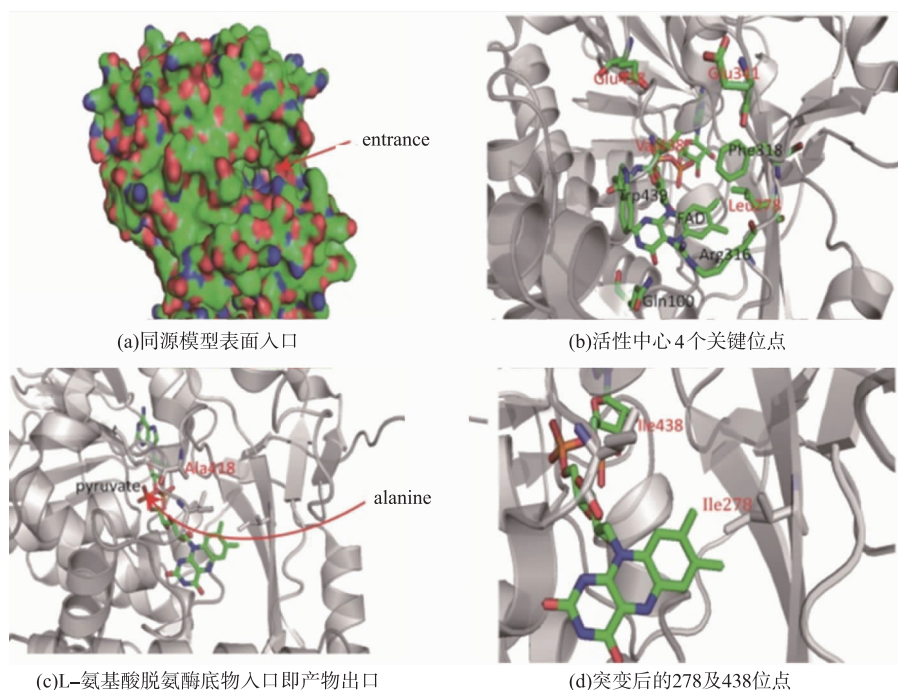


图 8 L-氨基酸脱氨酶同源模型晶体结构及关键氨基酸位点

Fig. 8 L-amino acid deaminase crystal structure and key residues inside the substrate-binding pocket

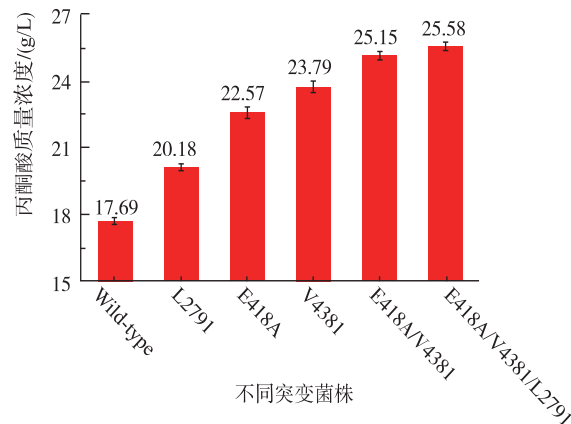


图 9 不同突变菌株催化合成丙酮酸产量

Fig. 9 Pyruvate concentration of different mutant strains

表 4 对照菌及突变菌酶学性质

Table 4 Comparison of kinetic parameters of the wild type pm1 and its mutants

菌株	K_m /(mmol/L)	V_{max} /(mol/min)	K_{cat} /s ⁻¹	(K_{cat}/K_m) /(L/(mmol·s))
Wild-type	42.75±0.51	1.83±0.06	0.52±0.04	0.012 1±0.000 59
E418A	30.28±0.67	2.13±0.11	0.60±0.10	0.019 8±0.002 31
V438I	39.87±0.56	3.21±0.13	0.91±0.06	0.022 8±0.001 27
L279I	40.58±0.73	2.92±0.09	0.83±0.05	0.020 5±0.000 29
E418A/V438I	29.19±0.45	3.47±0.08	0.98±0.09	0.033 6±0.001 88
E418A/V438I/L279I	28.81±0.39	3.82±0.15	1.08±0.04	0.037 5±0.001 34

物抑制能力较弱的突变体对提高丙酮酸产量至关重要。由于在反应过程中细胞会消耗一定量的产物,故通过该筛选方案不能准确的筛选出产物抑制能力较弱的突变体。未来的研究中,期望寻找一种能快速检测底物丙氨酸剩余量的方法,建立更加准确的筛选方案。

3 结 语

作者通过表达 pm1 伴侣蛋白(细胞色素 b562)及应用饱和突变技术对 pm1 进行分子改造这两种策略来提高生物转化法合成丙酮酸的能力。通过表达细胞色素 b562 使催化反应周期减少 6 h 左右,但不利于发酵过程中细胞量的积累,对于工业化应用具有一定的缺点。

分子改造采用的筛选方案为:催化反应一定时间,通过显色法检测丙酮酸含量的高低来衡量突变体的催化能力。该方法能高效检测出催化速率较高的突变体。然而,实际过程中,产物对酶的抑制是一个对丙酮酸最终产量有较大影响的因素,筛选出产

此外,由于细胞在催化过程中会消耗一定量的丙酮酸,不利于产物的积累。因此,在之后的研究中,可以通过基因敲除技术和宿主诱变来弱化细胞对丙酮酸的消耗,期望获得一株消耗丙酮酸较弱的宿主。

参考文献:

- [1] FELL D A, WAGNER A. The small world of metabolism[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(11): 1121-1122.
- [2] KOH-BANERJEE P K, FERREIRA M P, GREENWOOD M, et al. Effects of calcium pyruvate supplementation during training on body composition, exercise capacity, and metabolic responses to exercise[J]. *Nutrition*, 2005, 21(3): 312-319.
- [3] WANG X, PEREZ E, LIU R, et al. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells [J]. *Brain Research*, 2007, 1132(1): 1-9.
- [4] LI Y, CHEN J, LUN S Y. Biotechnological production of pyruvic acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(4): 451-459.
- [5] XU P, QIU J, GAO C, et al. Biotechnological routes to pyruvate production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(3): 169-175.
- [6] LIU L, HOSSAIN G S, SHIN H D, et al. One-step production of alpha-ketoglutaric acid from glutamic acid with an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(1): 97-104.
- [7] HOSSAIN G S, LI J, SHIN H D, et al. Improved production of alpha-ketoglutaric acid (alpha-KG) by a *Bacillus subtilis*

- whole-cell biocatalyst via engineering of L-amino acid deaminase and deletion of the alpha-KG utilization pathway[J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 187: 71-77.
- [8] HOU Y, HOSSAIN G S, LI J, et al. Production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine using an L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*: comparison of enzymatic and whole-cell biotransformation approaches[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, 99(20): 8391-8402.
- [9] LI R, SAKIR H G, LI J, et al. Rational molecular engineering of L-amino acid deaminase for production of α -ketoisovaleric acid from L-valine by *Escherichia coli*[J]. **RSC Advances**, 2017, 7(11): 6615-6621.
- [10] SONG Y, LI J, SHIN H D, et al. One-step biosynthesis of α -ketoisocaproate from L-leucine by an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing an L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris*[J]. **Scientific Reports**, 2015, 5: 12614.
- [11] BAEK J O, SEO J W, KWON O, et al. Expression and characterization of a second L-amino acid deaminase isolated from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2011, 51(2): 129-135.
- [12] FAUST A, NIEFIND K, HUMMEL W, et al. The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2007, 367(1): 234-248.
- [13] PELMONT J, ARLAUD G, ROSSAT A M. L-amino acid oxidases des enveloppes de *Proteus mirabilis*: propriétés générales [J]. **Biochimie**, 1972, 54(10): 1359-1374.
- [14] HOSSAIN G S, SHIN H D, LI J, et al. Transporter engineering and enzyme evolution for pyruvate production from D/L-alanine with a whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis* [J]. **RSC Advances**, 2016, 6(86): 82676-82684.
- [15] JU Y, TONG S, GAO Y, et al. Crystal structure of a membrane-bound L-amino acid deaminase from *Proteus vulgaris*[J]. **Journal of Structural Biology**, 2016, 195(3): 306-315.
- [16] MOTTA P, MOLLA G, POLLEGIONI L, et al. Structure-function relationships in L-amino acid deaminase, a flavoprotein belonging to a novel class of biotechnologically relevant enzymes[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2016, 291(20): 10457-10475.
- [17] HOSSAIN G S, LI J, SHIN H D, et al. Bioconversion of L-glutamic acid to α -ketoglutaric acid by an immobilized whole-cell biocatalyst expressing L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 169: 112-120.
- [18] HOU Y, HOSSAIN G S, LI J, et al. Metabolic engineering of cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD) synthesis and regeneration in *Escherichia coli* for production of α -keto acids[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2017, 114: 1928-1936.
- [19] ITAGAKI E, PALMER G, HAGER L P. Studies on cytochrome b562 of *Escherichia coli*. II. Reconstitution of cytochrome b562 from apoprotein and hemin[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1967, 242(9): 2272-2277.
- [20] DOWNIE J A, COX G B. Sequence of b cytochromes relative to ubiquinone in the electron transport chain of *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1978, 133(2): 477-484.
- [21] AKITA H, NAKASHIMA N, HOSHINO T. Pyruvate production using engineered *Escherichia coli*[J]. **AMB Express**, 2016, 6(1): 94.
- [22] LI Y, CHEN J, LUN S Y, et al. Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 55(6): 680-685.
- [23] CHRONOPOULOU E G, LABROU N E. Site-saturation mutagenesis: a powerful tool for structure-based design of combinatorial mutation libraries[J]. **Current Protocols in Protein Science**, 2011, Chapter 26: Unit 26.6.