



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150182

利用谷氨酸棒杆菌转化法合成 4-羟基异亮氨酸

温冰, 张成林, 麻杰, 陈鹏杰, 谢希贤, 徐庆阳, 陈宁
(代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 4-羟基异亮氨酸(4-hydroxyisoleucine, 4-HIL)具有葡萄糖依赖的促进胰岛素分泌的活性,在 L-异亮氨酸(L-isoleucine, L-Ile)生产菌株谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) YILW 中过表达来源于苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) TCCC11826 的 L-异亮氨酸羟化酶(L-isoleucine dioxygenase, IDO) 编码基因 *ido*, 以期利用微生物转化法合成 4-HIL, 并研究 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG) 和 Fe^{2+} 添加量对菌株合成 4-HIL 的影响. 结果表明: 构建的 *C. glutamicum* YILW-IDO 菌株能够表达出有活性的 IDO, 并能够利用菌体自身合成的 L-Ile 以及培养基中的 α -酮戊二酸合成 4-HIL. 此外, α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 均能影响 4-HIL 的合成, 在其添加量分别为 40 mmol/L 和 4 mmol/L 条件下, 培养 50 h, 4-HIL 产量达 (35.7 ± 1.0) mmol/L. 本研究可为 4-HIL 及氨基酸衍生物的生物制造提供理论依据.

关键词: 4-羟基异亮氨酸; L-异亮氨酸羟化酶; 谷氨酸棒状杆菌; 微生物转化

中图分类号: Q815 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2016)04-0009-06

Synthesis of 4-hydroxyisoleucine with *Corynebacterium glutamicum* via Biotransformation

WEN Bing, ZHANG Chenglin, MA Jie, CHEN Pengjie,
XIE Xixian, XU Qingyang, CHEN Ning

(National and Local United Engineering Laboratory of Metabolic Control Fermentation Technology,
Tianjin Engineering Laboratory of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: 4-hydroxyisoleucine (4-HIL) possesses glucose-dependent insulinotropic activities. L-isoleucine dioxygenase encoded gene *ido* from *Bacillus thuringiensis* TCCC11826 was cloned and expressed in L-isoleucine produced strain *Corynebacterium glutamicum* YILW to synthesize 4-hydroxyisoleucine via biotransformation. The effect of α -ketoglutarate (α -KG) and Fe^{2+} on 4-HIL synthesis was also studied. *C. glutamicum* YILW-IDO expressed active IDO was constructed, which could directly convert its endogenous L-isoleucine and α -ketoglutarate in the medium into 4-HIL. Moreover, 4-HIL synthesis could be affected by α -KG and Fe^{2+} . After 50 h fermentation, (35.7 ± 1.0) mmol/L 4-HIL was produced by adding 40 mmol/L α -KG and 4 mmol/L Fe^{2+} . This research can lay a theoretical foundation for the microbial manufacture technology of 4-HIL and amino acid derivatives.

Key words: 4-hydroxyisoleucine; L-isoleucine dioxygenase; *Corynebacterium glutamicum*; biotransformation

4-羟基异亮氨酸(4-hydroxyisoleucine, 4-HIL)是一种自然界存在的非蛋白质氨基酸,主要存在于胡芦巴属植物种子中^[1]. 研究表明 4-HIL 具有葡萄糖依赖的促进胰岛素分泌的活性,当葡萄糖浓度高于

8.3 mmol/L 时 4-HIL 能够明显促进胰岛素分泌,且该活性随血糖浓度的升高而增强,但当葡萄糖浓度低于该值时,4-HIL 无此活性. 此外,4-HIL 还具有加速脂肪代谢、降血脂和保护肝功能的作用^[2-6],可见 4-HIL

收稿日期: 2015-10-27; 修回日期: 2016-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31300069); 天津市大学生创新创业训练计划资助项目(201510057063)

作者简介: 温冰(1977—),女,天津人,博士研究生,副研究员; 通信作者: 陈宁,教授,ningch@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2016-05-19; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20160519.1030.006.html>.

具有广泛的应用前景和市场需求。

4-HIL 的合成方法包括提取法、化学合成法和酶法,目前主要采用提取法工业化生产 4-HIL。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%~0.60%)、分离纯化困难、原材料需求量大、成本高等不足^[3,7]。因此利用 *L*-异亮氨酸羟化酶(*L*-isoleucine hydroxylase, IDO) 特异性合成(2S, 3R, 4S)-4-HIL 是较为理想的方法。

Haefelé 等^[8]在胡芦巴种子中发现可将 *L*-异亮氨酸(*L*-isoleucine, *L*-Ile) 转化为(2S, 3R, 4S)-4-HIL 的活性成分,但未见将其分离纯化的报道。Ogawa 等^[1]在苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 中发现了能特异性地催化 *L*-Ile 生成(2S, 3R, 4S)-4-HIL 的 IDO, 为 4-HIL 的生物法合成奠定了基础^[9]。

在前期研究中,本研究室从苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*) TCCC11826 基因组克隆了 IDO 编码基因 *ido*, 其表达产物能够特异性地催化 *L*-Ile 生成(2S, 3R, 4S)-4-HIL, 最适反应温度和 pH 分别为 35 °C 和 7.0, 可见该酶反应条件温和,比较适合用于生物法合成 4-HIL^[9]。序列分析结果表明,该 IDO 含有 His¹-X-Asp-Xn-His² 基序,属于 Fe²⁺和 α -KG 依赖型羟化酶家族。因此前期在酶催化以及利用大肠杆菌(*Escherichia coli*) W3110 进行微生物转化合成 4-HIL 时需加入底物 *L*-Ile 和 α -KG 以及 FeSO₄^[9]。

本文在前期研究基础上以 *L*-Ile 生产菌株谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) YILW 为出发菌株,过表达 *ido* 基因,构建 4-HIL 生产菌株 YILW-IDO,以期利用 YILW-IDO 自身合成的 *L*-Ile 及外源添加 α -KG 和 Fe²⁺实现生物转化法合成 4-HIL。在此基础上研究 α -KG 和 Fe²⁺添加量对重组菌株合成 4-HIL 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、*L*-Ile 生产菌株谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*) YILW (Leu^r+AHV^r+SG^r+Leu-ME^r) 以及质粒 pXMJ19(Cm^r) 和 pMD-*ido* 为模板(*ido* 基因经过密码子优化)均由本实验室保藏。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0,

NaCl 10.0, pH 7.0~7.2, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min.

LBG 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 葡萄糖 5.0, pH 7.0~7.2, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min.

BHIS 培养基(g/L): 脑心浸提物 37.0, 山梨醇 9.1, 葡萄糖 0.5, pH 7.0~7.2, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min.

发酵培养基^[10](g/L): 葡萄糖 80.0, (NH₄)₂SO₄ 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, MnSO₄·H₂O 0.015, KH₂PO₄·3H₂O 1.5, 维生素 B₁ 0.015. 玉米浆 35.0 mL/L, pH 7.0~7.2, 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min.

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶, 宝生物工程(大连)有限公司; PCR 产物回收及质粒提取试剂盒, 北京博大泰克生物基因技术有限公司; (2S, 3R, 4S)-4-HIL, 美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒 pXMJ-*ido* 的构建

以质粒 pMD-*ido* 为模板, 利用引物 HIL-F (5'-GCGAAGCTTAGAAAGGTGTGTTTCACCC-3') 和 HIL-R (5'-GCGGGATCCTTACTTGGTCTCCTTGTA GG-3') 以及 Ex Taq PCR 试剂盒扩增其 *ido* 基因。PCR 条件: 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 30 s、56 °C 30 s、72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 1 个循环, 反应体系为 50 μ L。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并切胶回收。

目的产物回收后经 Hind III 和 BamH I 酶切、电泳、切胶回收后连接至经相同酶切的表达载体 pXMJ19 上并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。经 LB 液体培养基活化后涂布于含氯霉素 (30 μ g/mL) 的 LB 固体培养基。过夜培养后挑取单菌落, 利用引物 HIL-F 和 HIL-R 进行 PCR 验证, 阳性菌株接入含氯霉素 (30 μ g/mL) 的 LB 液体培养基。经 37 °C、220 r/min 振荡培养 24 h 后提取质粒, 利用引物 HIL-F 和 HIL-R 进行 PCR 验证, 并分别利用 Hind III 单酶切以及 Hind III 和 BamH I 双酶切, 酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证。将验证正确的重组质粒命名为 pXMJ-*ido*。

1.2.2 YILW-IDO 的构建

取 5 ng 重组质粒 pXMJ-*ido* 电转化至 YILW 感受态细胞 (2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω , 2 mm 电击杯), 经 BHIS 培养基 37 °C 活化 1 h 后, 取 200 μ L 涂布于含

氯霉素(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 BHIS 固体培养基上,于 32 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 36 h. 挑取单菌落接种至装有 5 mL 含氯霉素(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)BHIS 液体培养基的摇管中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振荡培养 48 h. 离心收集菌株提取其质粒并利用 *Hind* III 单酶切及 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切,酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证. 将验证正确的重组菌株命名为 YILW-IDO.

1.2.3 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)

将 YILW-IDO 种子培养物以 10% 的接种量接种至 LB 液体培养基中,32 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)继续培养 4 h. 根据 *ido* 及 *C. glutamicum* ATCC13032 16S rDNA(内参)基因序列利用 Primer 5.0 软件设计用于 Real-time PCR 引物 IDO-1(5'-GGTAAAGTTAGACAGTTC CATAGCA-3')和 IDO-2(5'-CAAATAGGTGAACAAAGATGGTC-3')以及 16S-F(5'-AGAACCACCGC CTGCTCACC-3')和 16S-R(5'-CCGTCGTCGTAGTT GTACTCCTTG-3')分别采用 Trizol 和 Prime Script TMRT 试剂盒提取总 RNA 并反转录成 cDNA. 然后采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光定量 PCR 试剂盒及 Real-time PCR 仪进行扩增和检测. PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸共 34 s,40 个循环. 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法^[11]分析 *ido* 的转录水平,以未经 IPTG 诱导的 YILW-IDO 为对照.

1.2.4 IDO 活性检测

收集经 IPTG 诱导的菌体用 PBS 缓冲液重悬浮,经超声破碎仪超声破碎(功率 350 W,工作时间 5 s,间隔时间 10 s,5 个循环,于冰上操作)后 5 000 g 离心 5 min. 取上清液 20 μL 至 PBS 缓冲液(含终浓度为 30 mmol/L α -KG、30 mmol/L *L*-Ile、1 mmol/L FeSO_4 、1 mmol/L 维生素 C)中,反应体系为 1 mL,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后加入 10 μL 乙酸终止反应^[12]. 采用高效液相色谱测定 4-HIL 含量,酶活性以每毫克总蛋白每分钟催化生成 4-HIL 的量计算,单位为 nmol/(min·mg).

1.2.5 YILW-IDO 摇瓶发酵

分别将含质粒 pXMJ19 的 *C. glutamicum* YILW (YILW-pXMJ19, 对照组)及重组菌株 YILW-IDO(实验组)经斜面培养基活化后接种至 LB 液体培养基中,于 32 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 15 h,使 $A_{600} = 1.2 \sim 1.6$. 将种子培养物以 10% 的接种量接种至含有

30 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板瓶中,于 32 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时,加入 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L),同时加入 α -KG 和 FeSO_4 (终浓度分别为 30 mmol/L 和 2 mmol/L)继续发酵至 50 h,检测发酵液中 4-HIL 的浓度. 发酵过程中补加 10% 的尿素,维持发酵液 pH 6.7 ~ 7.0.

在 FeSO_4 终浓度为 2 mmol/L 条件下,考察 0、30、35、40、45、50 mmol/L α -KG 对 4-HIL 产量的影响. 在 α -KG 终浓度为 30 mmol/L 条件下,考察 0、1、2、3、4、5、6 mmol/L Fe^{2+} 对 4-HIL 产量的影响. 在 α -KG 终浓度分别为 0、30、35、40、45、50 mmol/L 条件下,考察 1、2、3、4、5、6 mmol/L Fe^{2+} 对 4-HIL 产量的影响,以研究 α -KG 与 Fe^{2+} 的交互作用.

1.2.6 4-HIL 的检测

将 IDO 反应液或发酵液于 8 000 g 离心 5 min 后取上清液,经体积分数为 0.8% 的 2,4-二硝基氟苯衍生后采用高效液相色谱测定 4-HIL 含量,检测条件为:Agilent C18(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm),采用乙腈/醋酸钠二元梯度洗脱,柱温 33 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 360 nm^[13].

1.3 数据分析

每组实验均设 3 个平行并重复 3 次,利用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行分析 and 处理. 采用 SPSS 19.0 统计软件分析 α -KG 与 Fe^{2+} 的交互作用.

2 结果与分析

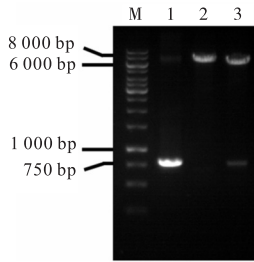
2.1 重组质粒 pXMJ-*ido* 的构建

经筛选挑取阳性菌落活化后提取质粒进行酶切验证,结果如图 1 所示. 经 *Hind* III 单酶切获得约 7 000 bp 的片段,经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切获得约 6 600 bp 及 750 bp 的片段,与重组质粒、pXMJ19 以及 *ido* 分子质量接近(分别为 7 300 bp、6 574 bp 和 723 bp),证明 *ido* 基因已成功连接到表达载体上. 将重组质粒命名为 pXMJ-*ido*.

2.2 YILW-IDO 菌株的构建

提取重组质粒 pXMJ-*ido* 并电转化至 *C. glutamicum* YILW 感受态细胞中,经筛选、活化后提取质粒进行酶切验证,结果如图 2 所示. 经 *Hind* III 单酶切获得约 7 000 bp 的片段,经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切获得约 6 600 bp 及 750 bp 的片段与重组质粒、pXMJ19 以及 *ido* 接近,表明重组菌株构建成功,

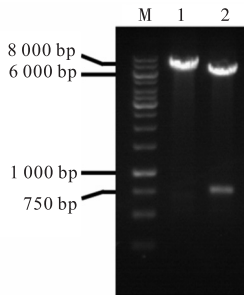
将其命名为 YILW-IDO.



M. Marker; 1. *ido* PCR 扩增图谱; 2. *Hind* III 单酶切; 3. *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切

图 1 *ido* PCR 扩增及 *E. coli* DH5 α 中质粒 pXMJ-*ido* 酶切验证

Fig. 1 *ido* PCR products and identification of recombinated pXMJ-*ido* plasmids in *E. coli* DH5 α digested by restricted endonuclease



M. Marker; 1. *Hind* III 单酶切; 2. *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切

图 2 菌株 YILW-IDO 中质粒 pXMJ-*ido* 酶切验证

Fig. 2 Identification of recombinated pXMJ-*ido* plasmids in YILW-IDO strain digested by restricted endonuclease

2.3 重组菌株 YILW-IDO 中 *ido* 转录水平及 IDO 活性测定

分别提取未经 IPTG 诱导(对照组)及经 IPTG 诱导的 YILW-IDO(实验组)总 RNA 并测定其转录水平. 结果表明, 经诱导后 YILW-IDO 中 *ido* 的相对转录量为 (31.6 ± 0.5) , 表明该基因能够于谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* YILW 中成功转录. 收集经 IPTG 诱导的 YILW-IDO 细胞, 超声破碎并离心后取上清液, 测定 IDO 活性, 以含质粒 pXMJ19 的 *C. glutamicum* YILW 为对照. 结果显示, YILW-IDO 破碎液 IDO 比活力达 (1.1 ± 0.3) nmol/(min·mg), 表明该 *ido* 基因可在 YILW-IDO 中表达出具有活性的酶.

2.4 利用重组菌株 YILW-IDO 转化法合成 4-HIL

分别将 YILW-pXMJ19(对照组)及重组菌株 YILW-IDO(实验组)于含有 30 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板瓶中发酵培养 50 h, 测定其 *L*-Ile 和 4-HIL 浓度, 结果如图 3 所示. YILW-IDO 可积累 4-HIL 达 (13.7 ± 0.4) mmol/L, 同时生成 *L*-Ile $(26.5 \pm$

$0.5)$ mmol/L; 而对照组仅积累 *L*-Ile (39.1 ± 1.2) mmol/L, 未检测到 4-HIL.

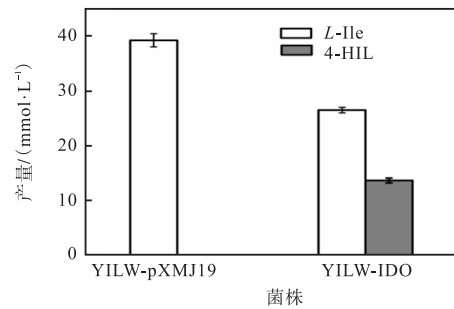


图 3 YILW-IDO 4-HIL 产量

Fig. 3 Production of 4-HIL with YILW-IDO

2.4.1 α -KG 的添加量对 4-HIL 合成的影响

IDO 在催化过程中需底物 α -KG. YILW-IDO 在发酵结束时, 培养基中仍含 (26.5 ± 0.5) mmol/L *L*-Ile, 但 4-HIL 产量仅 (13.7 ± 0.4) mmol/L, 而 YILW-pXMJ19 *L*-Ile 产量 (39.1 ± 1.2) mmol/L, 推测可能因培养基中底物 α -KG 不足使得 YILW-IDO 合成的 *L*-Ile 未反应完全而积累.

因此, 研究了不同 α -KG 的添加量对 4-HIL 产量的影响, 结果如图 4 所示. 当 α -KG 浓度为 40 mmol/L 时, 4-HIL 产量最高, 但仍有少量 *L*-Ile 积累. 随着 α -KG 添加量的增加, 尽管无 *L*-Ile 积累但 4-HIL 产量逐渐降低. 前期研究表明, α -KG 浓度为 40 ~ 60 mmol/L 时, 重组 IDO 活性并未受到抑制. 本实验发现, α -KG 添加量为 45 mmol/L 和 50 mmol/L 时 YILW-IDO 生物量较 α -KG 添加量为 40 mmol/L 时低 9.6% 和 14.2% (结果未显示), 这可能是该条件下 4-HIL 合成量低的原因.

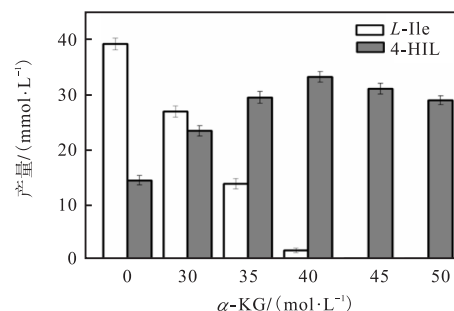


图 4 α -KG 浓度对 4-HIL 产量的影响

Fig. 4 Effects of different concentration of α -KG on 4-HIL production

2.4.2 $FeSO_4$ 的添加量对 4-HIL 合成的影响

IDO 属于 Fe^{2+} 及 α -KG 依赖的羟化酶家族, 因此, 研究了不同 Fe^{2+} 添加量对 4-HIL 产量的影响, 结果如图 5 所示. 随着 Fe^{2+} 添加量的增加 4-HIL 产量

逐渐升高, Fe^{2+} 浓度为 4 mmol/L 时, 4-HIL 产量达到最高, 随后逐渐降低. 前期研究表明, 当 Fe^{2+} 高于 4 mmol/L 时, 重组 IDO 活性降低, 因此 Fe^{2+} 添加量为 5 mmol/L 和 6 mmol/L 时, 可能因 IDO 活性受到抑制而使得 4-HIL 产量降低.

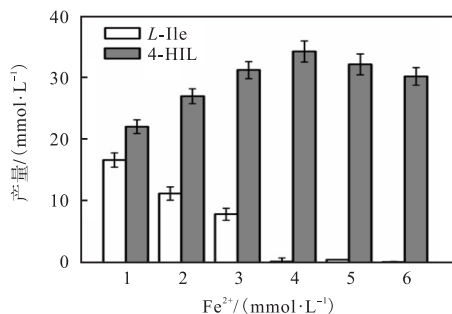


图5 Fe^{2+} 浓度对4-HIL产量的影响

Fig. 5 Effects of different concentration of Fe^{2+} on 4-HIL production

2.4.3 α -KG 和 FeSO_4 添加量对 4-HIL 合成的影响

α -KG 和 FeSO_4 添加量对 4-HIL 合成量的影响及其交互作用实验结果见表 1 和表 2. 结果表明: α -KG 和 FeSO_4 均能显著影响 4-HIL 的合成 ($P < 0.05$), 当 α -KG 添加量一定时, FeSO_4 添加量为 4 mmol/L 条件下 4-HIL 合成量最高; 当 FeSO_4 添加量一定时, α -KG 添加量为 40 mmol/L 条件下 4-HIL 合成量最高; α -KG 和 FeSO_4 添加量分别为 40 mmol/L 和 4 mmol/L 时 4-HIL 达到最高值, 为 (35.7 ± 1.0) mmol/L. 由表 2 可知, α -KG 和 Fe^{2+} 对 4-HIL 合成的影响不具有交互作用 ($P > 0.05$).

表 1 α -KG 和 FeSO_4 添加量对 4-HIL 合成的影响

Tab. 1 Effects of different concentration of FeSO_4 and α -KG on 4-HIL production

| 序号 | α -KG 添加量/ (mmol·L ⁻¹) | FeSO_4 添加量/ (mmol·L ⁻¹) | 4-HIL 合成量/ (mmol·L ⁻¹) |
|----|--|---|---------------------------------------|
| 1 | 35 | 3 | 23.0 ± 1.3 |
| 2 | 35 | 4 | 25.5 ± 1.1 |
| 3 | 35 | 5 | 19.7 ± 0.6 |
| 4 | 40 | 3 | 31.8 ± 1.9 |
| 5 | 40 | 4 | 35.7 ± 1.0 |
| 6 | 40 | 5 | 27.6 ± 1.0 |
| 7 | 45 | 3 | 28.2 ± 0.9 |
| 8 | 45 | 4 | 32.0 ± 0.9 |
| 9 | 45 | 5 | 26.7 ± 1.4 |

表 2 实验结果方差分析

Tab. 2 Variance analysis of the results

| 变异源 | 平方和 | 自由度 | 均方差 | P 值 |
|--------------------------------|-------|-----|--------|---------|
| Fe^{2+} | 178.3 | 2 | 89.14 | 0.000 2 |
| α -KG | 289.5 | 2 | 144.73 | 0.000 1 |
| α -KG* Fe^{2+} | 17.0 | 4 | 4.24 | 0.062 0 |

3 讨论

目前工业化生产 4-HIL 所采用的胡芦巴种子提取法具有收率低、成本高等不足. IDO 的发现使得具有生物学活性的 (2S, 3R, 4S)-4-HIL 高效合成成为可能^[1].

本文在前期研究^[9]的基础上, 以 *L*-Ile 生产菌株 *C. glutamicum* YILW 为出发菌株通过过表达 *ido* 基因能够成功合成 4-HIL. Smirnov 等^[13]以 *E. coli* MG1655 为出发菌株, 通过敲除 α -酮戊二酸脱氢酶编码基因以及异柠檬酸裂解酶编码基因以增加 α -KG 的积累量, 在此基础上过表达 *ido* 并在发酵过程中添加 *L*-Ile, 在优化条件下其转化率为 0.82 mol/mol. 本文利用 *C. glutamicum* YILW-IDO 自身合成的 *L*-Ile 并向培养基中添加 α -KG, 在初步优化条件下其转化率为 0.86 mol/mol.

IDO 属于 α -KG 和 Fe^{2+} 依赖型羟化酶家族. 由 IDO 的酶反应式可知, 1 mol α -KG 和 *L*-Ile 可生成等物质的量的 4-HIL. 摇瓶实验结果表明, 含质粒 pXMJ19 的 YILW 可生成 *L*-Ile (39.1 ± 1.2) mmol/L, 因此在发酵过程中添加 40 mmol/L 的 α -KG 使得 4-HIL 产量达到最高值. 值得注意的是, 尽管发酵过程中不添加 α -KG, 仍可积累 4-HIL (14.3 ± 0.9) mmol/L (图 4), 其原因可能是菌体可利用自身合成的 α -KG 与 *L*-Ile 反应生成 4-HIL. Yi 等^[14]在研究利用脯氨酸羟化酶 (属于 α -KG 和 Fe^{2+} 依赖型羟化酶家族) 合成羟脯氨酸时, 发现菌体可利用自身生成的 α -KG 合成羟脯氨酸.

α -KG 和 Fe^{2+} 依赖型羟化酶家族含 His¹X-Asp/Glu-Xn-His² 基序, 该基序中的 His、Asp/Glu 及 His 络合 Fe^{2+} 后形成活性中心. 本文所利用的 IDO 亦含 His¹X-Asp-Xn-His² 基序, 实验结果表明适量增加 Fe^{2+} 添加量可有效提高 4-HIL 产量.

研究^[4]表明维生素 C 对 IDO 活性亦有一定影响, 但通过研究发现添加不同量的维生素 C 并未对 4-HIL 产量产生影响.

本文结果表明, 来源于 *B. thuringiensis* TCCC 11826 的 *ido* 能够在 *L*-Ile 生产菌株 *C. glutamicum* YILW 中成功表达出有活性的 IDO 并利用其生成的 *L*-Ile 催化生成 4-HIL, 实现 4-HIL 的生物合成. α -KG 和 Fe^{2+} 添加量均影响 4-HIL 的合成, 在 α -KG 和 Fe^{2+} 添加量分别为 40 mmol/L 和 4 mmol/L 条件下, 4-

HIL 产量达 (35.7 ± 1.0) mmol/L. 本研究可为 4-HIL 及其他氨基酸衍生物的生物制造提供理论依据.

参考文献:

- [1] Ogawa J, Kodera T, Smirnov S V, et al. A novel *L*-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(6): 1929–1938.
- [2] 高峰, 蔡琴, 蔡伦, 等. 4-羟基异亮氨酸的研究现状[J]. 医药导报, 2014, 33(10): 1261–1264.
- [3] Narender T, Puri A S, Khaliq T, et al. 4-hydroxyisoleucine: An unusual amino acid as antidyslipidemic and antihyperglycemic agent[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 37(16): 293–296.
- [4] Kodera T, Smirnov S V, Samsonova N N, et al. A novel *L*-isoleucine hydroxylating enzyme, *L*-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 390(3): 506–510.
- [5] Haeri M R, Izaddoost M, Ardekani M R, et al. The effect of fenugreek 4-hydroxyisoleucine on liver function biomarkers and glucose in diabetic and fructose-fed rats[J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(1): 61–64.
- [6] Haeri M R, Limaki H K, White C J, et al. Non-insulin dependent anti-diabetic activity of (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) in streptozotocin-induced type I diabetic rats[J]. Phytomedicine, 2012, 19(7): 571–574.
- [7] Fowden L, Pratt H M, Smith A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*[J]. Phytochemistry, 1973, 12(7): 1707–1711.
- [8] Haefel  C, Bonfils C, Sauvaire Y. Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis[J]. Phytochemistry, 1997, 44(4): 563–566.
- [9] 张成林, 刘远, 薛宁, 等. 苏云金芽胞杆菌重组 *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[J]. 微生物学报, 2014, 54(8): 889–896.
- [10] 张成林, 龙辉, 温冰, 等. 双底物指数流加和双阶段溶氧控制对谷氨酸棒状杆菌生产 *L*-异亮氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(4): 1–6.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [12] Hibi M, Kawashima T, Kodera T, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis* *L*-isoleucine dioxygenase for production of useful amino acids[J]. Applied Environmental Microbiology, 2011, 77(19): 6926–6930.
- [13] Smirnov S V, Kodera T, Samsonova N N, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88: 719–726.
- [14] Yi Y L, Sheng H K, Li Z M, et al. Biosynthesis of trans-4-hydroxyproline by recombinant strains of *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*[J]. BMC Biotechnology, 2014, 14(44): 1–8.

责任编辑: 郎婧