



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180503

数字出版日期: 2019-12-19; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20191219.1130.004.html>

合成 4-羟基异亮氨酸的大肠杆菌构建及其催化体系优化

李英滋¹, 张宇¹, 王道安¹, 董解荣¹, 王子申¹, 张成林^{1,2}, 陈宁¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 菱花集团有限公司, 济宁 272073)

摘要: 4-羟基异亮氨酸具有血糖水平依赖的促胰岛素分泌特性, 是治疗糖尿病的潜在新药. 将异亮氨酸羟化酶(isoleucine dioxygenase, IDO) 编码基因 *ido* 于大肠杆菌(*Escherich coli*) 中表达, 获得工程菌株 *E. coli* pET-ido. 以该菌株为研究对象, 建立和优化了其合成 4-羟基异亮氨酸的静息细胞催化体系. 结果表明: 在最佳条件下(静息细胞 27 g/L, L-异亮氨酸 250 mmol/L, α -酮戊二酸 250 mmol/L, FeSO₄ 8 mmol/L, VC 6 mmol/L, 反应温度 35 °C, pH 9.0) 反应 12 h, 4-羟基异亮氨酸产量和转化率分别达到 249.6 mmol/L 和 99.8%, 较优化前均提高了 34.5% 和 7.5%. 这是目前已报道的生物法合成 4-羟基异亮氨酸的最高产量, 为推动该化合物的微生物合成奠定了良好的基础.

关键词: 4-羟基异亮氨酸; 异亮氨酸羟化酶; 大肠杆菌; 静息细胞; 生物催化

中图分类号: Q815 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)03-0009-07

Construction of *Escherich coli* Strain for 4-Hydroxyisoleucine Biosynthesis and Optimization of its Biocatalyzing System

LI Yingzi¹, ZHANG Yu¹, WANG Daoan¹, DONG Jierong¹, WANG Zishen¹,
ZHANG Chenglin^{1,2}, CHEN Ning¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Linghua Group Ltd., Jining 272073, China)

Abstract: 4-Hydroxyisoleucine exhibits a unique glucose-dependent insulinotropic activity, which is a promising candidate for the treatment of diabetes. In this study, the isoleucine dioxygenase (IDO) encoded gene *ido* was overexpressed in *Escherich coli*, generating *E. coli* pET-ido. Then the biocatalysis system of *E. coli* pET-ido resting cells for producing 4-hydroxyisoleucine was developed and the reaction conditions were optimized. Under the optimized conditions (resting cells 27 g/L, L-isoleucine 250 mmol/L, α -ketoglutarate individually 250 mmol/L, FeSO₄ 8 mmol/L, VC 6 mmol/L, temperature 35 °C, pH 9.0), the final production and conversion ratio of 4-hydroxyisoleucine reached 249.6 mmol/L and 99.8% (increased by 34.5% and 7.5%, respectively) in 12 h, which is up till now the the highest reported 4-hydroxyisoleucine production via biological method and could offer a reference for its microbial manufacturing technology.

Key words: 4-hydroxyisoleucine; isoleucine dioxygenase; *Escherichia coli*; resting cells; biocatalysis

4-羟基异亮氨酸为 L-异亮氨酸羟化物, 具有血糖水平依赖的促进胰岛素分泌的特性以及促进脂肪代谢等功能, 对糖尿病具有良好的治疗效果, 具有广阔的应用前景^[1-6]. 目前 4-羟基异亮氨酸的工业化生产主要采用胡芦巴种子提取法, 然而此方法生产效率低(约 0.015%), 致使生产规模小、产量低、成本高,

严重限制了其应用^[7-10]. 此外, 化学合成法因在生产过程中使用产生乙醛等有毒或易爆物, 且存在提取率低等不足, 仍停留在实验室研究阶段^[9-12]. Kodera 等^[9]在苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 中发现了由 *ido* 编码的异亮氨酸羟化酶(isoleucine dioxygenase, IDO), 该酶能够以 L-异亮氨酸、 α -酮戊二酸

收稿日期: 2018-12-24; 修回日期: 2019-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31300069, 31770053); 中国博士后科学基金项目(2017M611170, 2018T110662)

作者简介: 李英滋(1994—), 女, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 张成林, 副教授, zcl@tust.edu.cn

及氧气为底物催化生成 4-羟基异亮氨酸、琥珀酸和二氧化碳(图 1^[9]),为其生物合成提供重要基础。

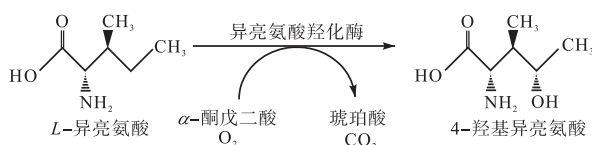


图 1 异亮氨酸羟化酶催化生成 4-羟异亮氨酸的反应示意图

Fig. 1 IDO catalyzing 4-hydroxyisoleucine synthesis

Kivero 等^[12]将异亮氨酸羟化酶编码基因 *ido* 转化至大肠杆菌,并在发酵过程中添加 *L*-异亮氨酸,实现前体物添加法合成 4-羟基异亮氨酸,优化条件下产量为 163.0 mmol/L;但该方法存在 *L*-异亮氨酸被额外消耗及耗糖高等不足. Shi 等^[13-15]利用谷氨酸棒杆菌过表达 *ido*,在优化条件下经 144 h 发酵,最高产量达到 95.7 mmol/L;但该方法发酵周期长,产酸水平较低. 本课题组在前期研究^[16-17]中从苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis* TCCC 11826 中克隆出 *ido* (Accession No. KC884243),利用该基因建立了微生物转化法 4-羟基异亮氨酸合成体系,然而该方法产量较低(36 h 生成 44.6 mmol/L). 此外,在转化过程中底物 *L*-异亮氨酸和 α -酮戊二酸额外消耗严重,致使其转化率偏低(89.3%). 本文针对上述问题,建立了静息细胞法合成 4-羟基异亮氨酸体系,并对催化条件进行优化,实现其高效合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本文所用大肠杆菌 *Escherich coli* BL21 (DE3) 以及质粒 pXMJ-IDO 和 pET-28a 均由本实验室保藏。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰化蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0 ~ 7.5, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min^[18]。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶、连接酶、DNA 聚合酶等分子生物学试剂,宝生物工程(大连)有限公司;PCR 产物回收、质粒提取等试剂盒,北京博大泰克生物基因技术有限公司;4-羟基异亮氨酸、*L*-异亮氨酸及 α -酮戊二酸标准品,美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 *ido* 过表达菌株 *E. coli* pET-*ido* 的构建

以含 *ido* 基因的重组质粒 pXMJ-IDO 为模板,利

用引物 *ido*-A : CCGCATATGATGAAAATGAGTGGCTTTAGCATAG (*Nde* I) 和 *ido*-B : CCGCTCGAGTATTTTTGTCTCCTTATAAGAAAATGTTACTA (*Xho* I),扩增 *ido* 基因,经 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切、回收后连接至经相同酶切的表达载体 pET-28a,然后转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞. 转化子经菌落 PCR 初步鉴定、活化后,提取重组质粒,分别利用 *Nde* I 以及 *Nde* I 和 *Xho* I 进行单、双酶切验证,并由苏州金唯智生物科技有限公司测定质粒中 *ido* 序列. 分别将重组质粒和重组菌株命名为 pET-*ido* 和 *E. coli* pET-*ido*。

1.2.2 重组 IDO 诱导表达及静息细胞的培养和收集

将 *E. coli* pET-*ido* 于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中活化后,接种至 1 L 相同培养基,37 °C、200 r/min 振荡培养至 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时,加入 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L),继续培养 4 h,4 °C、5 000g 离心 30 min,收集菌体. 取少量菌体超声破碎后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测^[18]. 菌体经生理盐水清洗 3 次后,-80 °C 放置 12 h,即为静息细胞. 待催化反应结束后,将反应液 5 000g 离心 30 min,回收菌体并用生理盐水清洗,称量后重复利用。

1.2.3 静息细胞法合成 4-羟基异亮氨酸的建立及条件优化

取静息细胞(终质量浓度为 20 g/L)置于 3 L 反应体系中,37 °C 反应 16 h. 反应体系为: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 200 mmol/L *L*-异亮氨酸和 α -酮戊二酸, 5 mmol/L FeSO₄, 10 mmol/L 维生素 C (VC). 进行反应条件优化时,根据需要改变相应条件. 在单因素实验的基础上,进行正交实验 L₉(3⁴)对催化条件进一步优化。

1.2.4 *L*-异亮氨酸、4-羟基异亮氨酸和 α -酮戊二酸的检测

取反应液 1 mL, 5 000g 离心 1 min 后取上清液,经适当稀释后采用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定 *L*-异亮氨酸和 4-羟基异亮氨酸浓度. 检测条件: 安捷伦 C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m), 采用体积分数 50% 乙腈/50 mmol/L 乙酸钠为流动相梯度洗脱,流量 1 mL/min,检测波长 360 nm,柱温 33 °C^[16]. α -酮戊二酸检测条件: 伯乐 Aminex HPX-87 H 色谱柱 (300 mm \times 7.8 mm, 9 μ m), 流动相 5 mmol/L H₂SO₄, 流量 0.5 mL/min,检测波长 215 nm,柱温 30 °C^[19]. 按式(1)一式(3)计算 3 种物质的浓度 (mmol/L)。

$$c(L\text{-异亮氨酸}) = \frac{S + 410\,019.6}{1\,646\,736.4} \quad (1)$$

$$c(4\text{-羟基异亮氨酸}) = \frac{S + 410\,019.6}{1\,646\,736.4} \quad (2)$$

$$c(\alpha\text{-酮戊二酸}) = \frac{S + 6\,442.6}{299\,805.1} \quad (3)$$

式中: S 为利用高效液相色谱仪测定的 L -异亮氨酸、4-羟基异亮氨酸和 α -酮戊二酸的峰面积。

1.2.5 4-羟基异亮氨酸产量和转化率

4-羟基异亮氨酸产量以反应体系中其浓度计, 按式(4)计算转化率。

$$\text{转化率} = \frac{c(4\text{-羟基异亮氨酸})}{c(L\text{-异亮氨酸})} \times 100\% \quad (4)$$

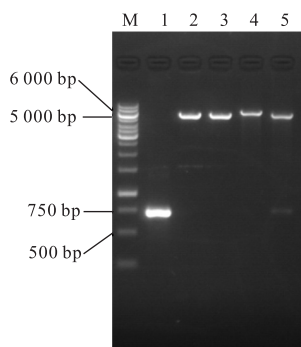
1.3 数据分析

每组实验均设置 3 个平行并重复 3 次, 分别利用软件 SPSS 13.0 和 Origin 8.0 分析和处理实验数据。

2 结果与分析

2.1 *E. coli* pET-ido 的构建

ido 基因 PCR 产物经酶切后连接至表达载体 pET-28a, 经转化、筛选获得转化子。挑取转化单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 2 所示。



M. marker; 1. *ido*; 2—3 分别为 pET-28a 经 *Nde* I 以及 *Nde* I 和 *Xho* I 单、双酶切片段; 4—5 分别为重组质粒 pET-ido 经 *Nde* I 以及 *Nde* I 和 *Xho* I 单、双酶切片段

图 2 *E. coli* pET-ido 菌落 PCR 和重组质粒 pET-ido 酶切验证

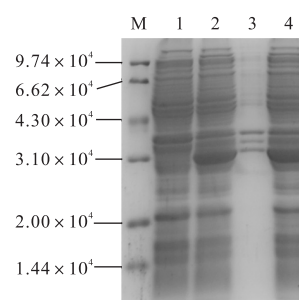
Fig. 2 PCR colony of *E. coli* pET-ido and pET-ido digested by restricted endonuclease

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 出现碱基数约为 750 bp 的条带, 与理论值(738 bp, 含限制性内切酶酶切序列和保护碱基)接近。提取重组质粒, 进行酶切验证, 质粒经单酶切获得碱基数约为 6000 bp 的条带, 与 pET-28a(5369 bp) 和 *ido*(732 bp) 的碱基数之和接近; 质粒经双酶切获得碱基数分别为 5000 bp 和 750 bp 的条带, 分别与 pET-28a 和 *ido* 碱基数接近,

表明 *ido* 过表达重组质粒 pET-ido 和菌株 *E. coli* pET-ido 构建成功。对该质粒中 *ido* 基因测序发现, 其碱基序列未发生突变。

2.2 重组 IDO 的表达

收集经 IPTG 诱导的 *E. coli* pET-ido 菌体细胞, 破碎物经 SDS-PAGE 检测, 结果如图 3 所示。 *E. coli* pET-ido 菌体破碎液、破碎物上清液和沉淀中均出现相对分子质量约为 2.90×10^4 的条带, 与其理论相对分子质量(2.892×10^4 , 包含 6 个组氨酸标签)接近, 而对照菌株则未出现相应条带。这表明重组 IDO 能够于 *E. coli* pET-ido 成功可溶性表达。



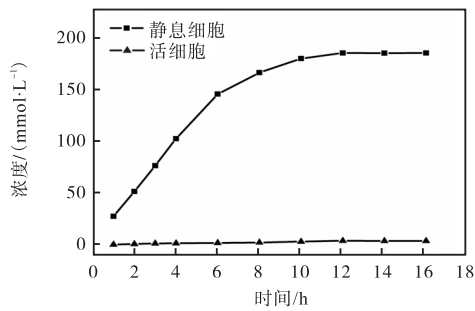
M. marker; 1. 携带 pET-28a 的 *E. coli* BL21(DE3) 全菌破碎液; 2—4 分别为 *E. coli* pET-ido 全菌破碎液、破碎物沉淀和上清液

图 3 重组 IDO 的 SDS-PAGE

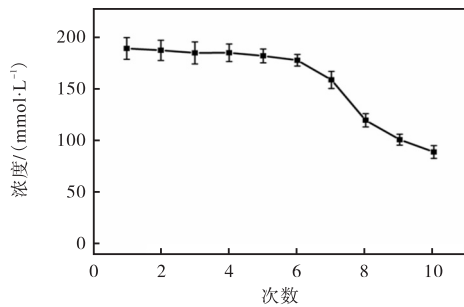
Fig. 3 SDS-PAGE of recombinant IDO

2.3 静息细胞法合成 4-羟基异亮氨酸体系的构建

在工业化生产中, 利用纯酶进行催化合成 4-羟基异亮氨酸成本较高, 采用微生物转化法或全细胞催化法是较为理想的方法^[20-21]。前期构建了大肠杆菌 *E. coli* W3110 转化法合成 4-羟基异亮氨酸, 但其合成量低(36 h 产量为 44.6 mmol/L)^[16]。其原因可能是细胞膜及细胞壁阻碍了 L -异亮氨酸和 α -酮戊二酸输入以及 4-羟基异亮氨酸输出。同时, 还发现在转化过程中有部分 L -异亮氨酸和 α -酮戊二酸额外消耗。静息细胞具有在反应过程中不生长、底物额外消耗量小以及底物和产物透过性强的特性^[21]。以 *E. coli* pET-ido 静息细胞为酶源进行催化反应, 结果如图 4(a) 所示。随催化时间的延长, 静息细胞催化 4-羟基异亮氨酸生成量增加, 12 h 达到最高值 185.6 mmol/L, 此时转化率为 92.8%。而未经冷冻处理的活细胞仅能合成微量 4-羟基异亮氨酸(最高为 3.8 mmol/L)。由异亮氨酸羟化酶催化反应特性可知(图 1), 生成该浓度 4-羟基异亮氨酸需要消耗同等量的 L -异亮氨酸和 α -酮戊二酸。经检测, 静息细胞对其实际消耗量分别为 189.8 mmol/L 和 189.5 mmol/L(表 1), 由此可见二者几乎无额外消耗。



(a) 静息细胞合成 4-羟基异亮氨酸过程曲线



(b) 静息细胞使用次数对 4-羟基异亮氨酸合成的影响

图 4 静息细胞合成 4-羟基异亮氨酸过程曲线及静息细胞使用次数对 4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 4 Production of 4-hydroxyisoleucine with resting cells and effect of recycle of resting cells on 4-hydroxyisoleucine production

表 1 静息细胞合成 4-羟基异亮氨酸的相关参数

Tab.1 Parameters for synthesis of 4-hydroxyisoleucine with resting cells

| 底物/产物 | 浓度/(mmol·L ⁻¹) | | | 转化率/% |
|----------|----------------------------|-------|-------|-------|
| | 初浓度 | 终浓度 | 消耗量 | |
| L-异亮氨酸 | 200.0 | 10.2 | 189.8 | — |
| α-酮戊二酸 | 200.0 | 10.5 | 189.5 | — |
| 4-羟基异亮氨酸 | 0 | 185.6 | — | 92.8 |

注：—表示未检出。

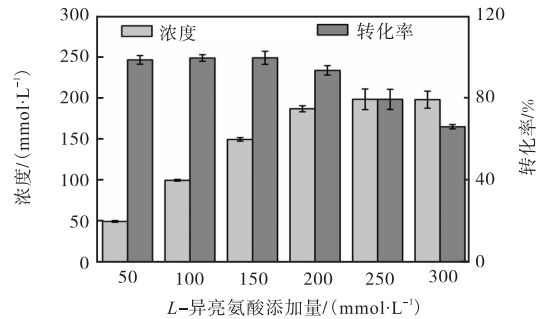
静息细胞重复使用次数对 4-羟基异亮氨酸合成的影响如图 4(b)所示。静息细胞连续使用 5 次后其催化 4-羟基异亮氨酸合成量未见显著降低,第 6 次时略有降低,随后迅速降低。由此可见,利用静息细胞法可将 L-异亮氨酸和 α-酮戊二酸高效地转化为 4-羟基异亮氨酸,且静息细胞可作为酶源被重复使用。

2.4 单因素优化静息细胞法合成 4-羟基异亮氨酸条件

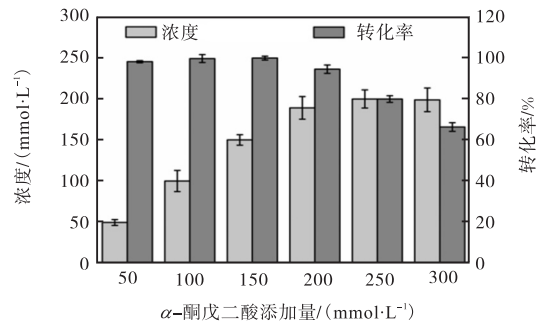
2.4.1 底物浓度对 4-羟基异亮氨酸合成的影响

考察了不同浓度 L-异亮氨酸和 α-酮戊二酸对 4-羟基异亮氨酸合成的影响,结果如图 5 所示,随二者浓度的增加,4-羟基异亮氨酸的合成量和转化率均逐渐提高,250 mmol/L 时,其合成量最高(分别为 196.7 mmol/L 和 198.3 mmol/L),但转化率(分别为

78.7%和 79.3%)较底物浓度为 200 mmol/L 时低。为探究静息细胞法合成 4-羟基异亮氨酸的潜在水平,选择 L-异亮氨酸和 α-酮戊二酸添加量为 250 mmol/L。



(a) L-异亮氨酸



(b) α-酮戊二酸

图 5 L-异亮氨酸和 α-酮戊二酸添加量对 4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 5 Effect of L-isoleucine and α-ketoglutarate concentration on 4-hydroxyisoleucine production

2.4.2 静息细胞添加量对 4-羟基异亮氨酸合成的影响

酶含量直接影响 4-羟基异亮氨酸的合成效率,不同静息细胞添加量对其合成的影响如图 6 所示。

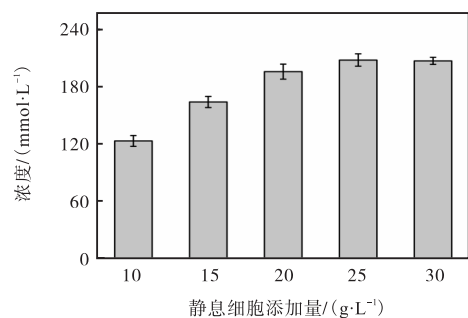


图 6 静息细胞添加量对 4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 6 Effect of resting cells concentration on 4-hydroxyisoleucine production

由图 6 可见:随着静息细胞添加量的增加,4-羟基异亮氨酸合成量提高,当添加量为 25 g/L 时产量和转化率最高,分别为 208.5 mmol/L 和 83.4%。

2.4.3 温度对4-羟基异亮氨酸合成的影响

温度可通过影响异亮氨酸羟化酶活性影响4-羟基异亮氨酸合成效率.如图7所示,4-羟基异亮氨酸生成量随着温度的升高而逐渐增加,35℃达到最高(208.6 mmol/L),随后降低.前期研究结果表明,重组IDO的最适反应温度为35℃^[16],这可能是该温度条件下4-羟基异亮氨酸生成量达到最高的原因.

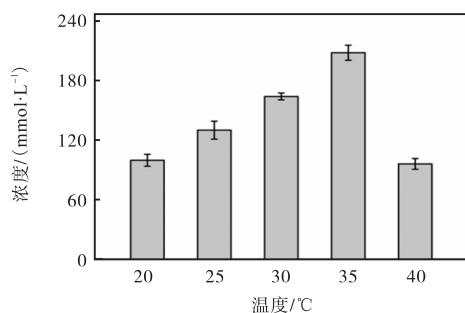


图7 温度对4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 7 Effect of temperature on 4-hydroxyisoleucine production

2.4.4 pH对4-羟基异亮氨酸合成的影响

pH亦可通过改变异亮氨酸羟化酶活性影响4-羟基异亮氨酸合成效率.如图8所示,随pH升高,4-羟基异亮氨酸合成量增加,pH 9.0时最高(216.9 mmol/L).然而,重组IDO的最适反应pH为7.0^[16].检测发现,反应结束后该反应液的pH为6.8~7.5,故推测,其催化反应中由于CO₂的生成,致使反应体系pH降低.

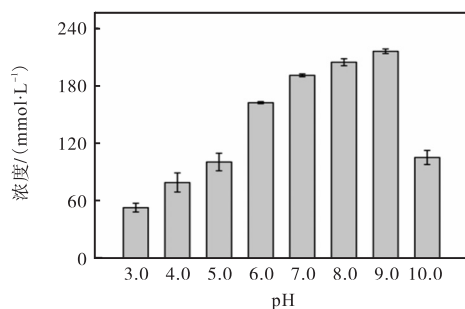


图8 pH对4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 8 Effect of pH on 4-hydroxyisoleucine production

2.4.5 金属离子对4-羟基异亮氨酸合成的影响

异亮氨酸羟化酶属于Fe²⁺和α-酮戊二酸依赖型羟化酶家族^[10, 22],因此Fe²⁺对其活性影响较大.考察了Fe²⁺浓度对4-羟基异亮氨酸合成的影响(图9).由图9可知:不添加Fe²⁺时,无4-羟基异亮氨酸生成;随Fe²⁺浓度提高,4-羟基异亮氨酸合成量先增加后减少,Fe²⁺浓度为10 mmol/L时其浓度最高.

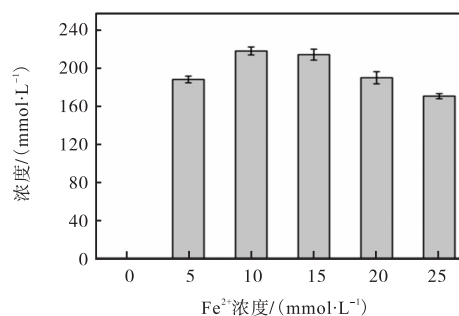


图9 Fe²⁺浓度对4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 9 Effect of Fe²⁺ on 4-hydroxyisoleucine production

Ca²⁺对4-羟基异亮氨酸合成具有明显抑制作用.然而,在一定浓度下Na⁺、K⁺和Mg²⁺对催化反应均具有促进作用,最高分别提高3.76%、4.12%和5.69%.由于其促进作用并不明显,故在后续实验中不添加上述金属离子.

2.4.6 VC对4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fe²⁺容易被氧化为Fe³⁺,从而影响异亮氨酸羟化酶活性,VC作为抗氧化剂可有效防止Fe²⁺氧化^[23-24].考察了VC浓度对4-羟基异亮氨酸合成的影响(图10).由图10可知:不添加VC时,4-羟基异亮氨酸生成量极低,其原因可能是Fe²⁺被氧化使得酶促反应难以进行;VC浓度为6 mmol/L时,4-羟基异亮氨酸浓度最高.

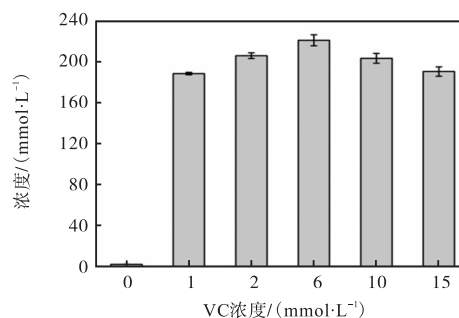


图10 VC浓度对4-羟基异亮氨酸合成的影响

Fig. 10 Effect of VC on 4-hydroxyisoleucine production

2.5 正交实验优化静息细胞法合成4-羟基异亮氨酸条件

由单因素实验可知,pH、静息细胞添加量以及Fe²⁺和VC浓度对4-羟基异亮氨酸的合成影响较大,因此利用正交实验对上述条件进行进一步优化,结果见表2和表3.上述4因素均能显著影响4-羟基异亮氨酸的合成($P < 0.05$),当pH = 9.0、静息细胞添加量为27 g/L、Fe²⁺和VC浓度分别为8 mmol/L和6 mmol/L时,4-羟基异亮氨酸合成量达到最高值242.5 mmol/L.

表2 正交实验结果

Tab. 2 Result of orthogonal experiment

| 序号 | pH | 细胞添加量/(g·L ⁻¹) | Fe ²⁺ 浓度/(mmol·L ⁻¹) | VC浓度/(mmol·L ⁻¹) | 产量/(mmol·L ⁻¹) |
|----|-----|----------------------------|---|------------------------------|----------------------------|
| 1 | 8.5 | 23 | 8 | 4 | 180.8 ± 0.4 |
| 2 | 8.5 | 25 | 10 | 6 | 213.9 ± 0.3 |
| 3 | 8.5 | 27 | 12 | 8 | 232.0 ± 0.4 |
| 4 | 9.0 | 23 | 10 | 8 | 201.1 ± 0.3 |
| 5 | 9.0 | 25 | 12 | 4 | 184.9 ± 0.3 |
| 6 | 9.0 | 27 | 8 | 6 | 242.5 ± 0.6 |
| 7 | 9.5 | 23 | 12 | 6 | 190.0 ± 0.3 |
| 8 | 9.5 | 25 | 8 | 8 | 235.4 ± 0.6 |
| 9 | 9.5 | 27 | 10 | 4 | 201.8 ± 0.6 |

表3 实验结果方差分析

Tab. 3 Variance analysis of the results

| 因素 | 平方和 | 自由度 | 均方 | P值 | 显著性 |
|---------------------|----------|-----|----------|---------|-----|
| pH | 2.63 | 2 | 1.31 | 0.023 0 | 极显著 |
| 细胞添加量 | 5 571.14 | 2 | 2 785.57 | 0.000 1 | 极显著 |
| Fe ²⁺ 浓度 | 1 529.53 | 2 | 764.77 | 0.000 2 | 极显著 |
| VC浓度 | 5 619.18 | 2 | 2 809.59 | 0.000 1 | 极显著 |

2.6 最适条件下4-羟基异亮氨酸的合成及结果比较
利用上述最适条件(静息细胞添加量 27 g/L, L-异亮氨酸 250 mmol/L, α-酮戊二酸浓度 250 mmol/L,

表4 已报道的生物法合成4-羟基异亮氨酸主要指标及与本研究对比

Tab. 4 Comparison of this study with the reported data of biosynthesis of 4-hydroxyisoleucine

| 工艺 | 产量/(mmol·L ⁻¹) | 周期/h | 转化率/% | 宿主菌 | 参考文献 |
|------|----------------------------|------|-------|--------|---------|
| 转化法 | 82.0 | 20 | 82 | 大肠杆菌 | [11] |
| 转化法 | 163.0 | 22 | 88 | 大肠杆菌 | [12] |
| 转化法 | 35.7 | 50 | 89.3 | 大肠杆菌 | [16] |
| 转化法 | 44.6 | 36 | 89.3 | 谷氨酸棒杆菌 | [17] |
| 发酵法 | 65.4~95.7 | 144 | 85~98 | 谷氨酸棒杆菌 | [13-15] |
| 本文方法 | 249.6 | 12 | 99.8 | 大肠杆菌 | — |

3 结 语

为提高4-羟基异亮氨酸合成效率,建立了静息细胞法4-羟基异亮氨酸合成体系,并避免了底物的额外消耗.在此基础上,对催化条件进行优化,获得最佳反应条件:静息细胞 27 g/L, L-异亮氨酸 250 mmol/L, α-酮戊二酸 250 mmol/L, FeSO₄ 8 mmol/L, VC 6 mmol/L, 反应温度 35 °C, pH 9.0. 在此条件下,催化反应 12 h, 4-羟基异亮氨酸生成量和转化率均达到最高值,分别为 249.6 mmol/L 和 99.8%, 较优化前提高 34.5% 和 7.5%.

在催化过程中,静息细胞内异亮氨酸羟化酶的平均催化速率为 0.67 μmol/(min·mg), 低于纯酶的催化速率 1.89 μmol/(min·mg). 其原因可能是:(1)异亮氨酸羟化酶在 35 °C 条件下 4 h 后活性逐渐下降, 10 h 后仅有 50% 的活性. 故推测, 随催化时间延长, 异亮

氨酸羟化酶稳定性越低, 剩余酶活性越少, 其催化效率降低. (2) 催化 4 h 后, 4-羟基异亮氨酸浓度高于 130 mmol/L, 可能对异亮氨酸羟化酶存在反馈抑制作用. 后续研究可针对上述问题对异亮氨酸羟化酶进行改造, 以期获得稳定性更高且解除反馈抑制作用的突变体, 从而缩短催化周期.

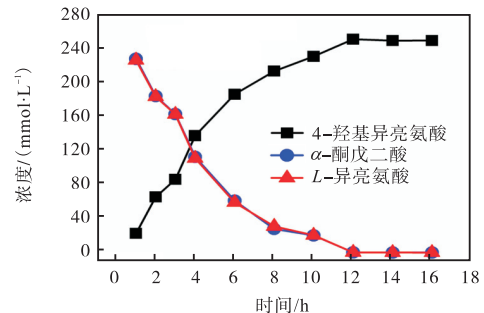


图11 优化条件下4-羟基异亮氨酸生成过程曲线
Fig. 11 Curve of the production process of 4-hydroxyisoleucine under optimized condition

氨酸羟化酶稳定性越低, 剩余酶活性越少, 其催化效率降低. (2) 催化 4 h 后, 4-羟基异亮氨酸浓度高于 130 mmol/L, 可能对异亮氨酸羟化酶存在反馈抑制作用. 后续研究可针对上述问题对异亮氨酸羟化酶进行改造, 以期获得稳定性更高且解除反馈抑制作用的突变体, 从而缩短催化周期.

参考文献:

- [1] Fuller S, Stephens J M. Diosgenin, 4-hydroxyisoleucine, and fiber from *Fenugreek*: Mechanisms of actions and potential effects on metabolic syndrome[J]. *Advances in Nutrition*, 2015, 6(2): 189-197.
- [2] Saxena A, Vikram N K. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: A review[J]. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2004, 10(2): 369-378.

- [3] Singh A B, Tamarkar A K, Narender T, et al. Antihyperglycaemic effect of an unusual amino acid (4-hydroxyisoleucine) in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. *Natural Product Research*, 2010, 24 (3) : 258–265.
- [4] 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.
- [5] Jaiswal N, Maurya C K, Venkateswarlu K, et al. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway [J]. *European Journal of Nutrition*, 2012, 51 (7) : 893–898.
- [6] Maurya C K, Singh R, Jaiswal N, et al. 4-Hydroxyisoleucine ameliorates fatty acid-induced insulin resistance and inflammatory response in skeletal muscle cells [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 395 (1/2) : 51–60.
- [7] Fowden L, Pratt H M, Smith A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum* [J]. *Phytochemistry*, 1973, 12 (7) : 1707–1711.
- [8] Zafar M I, Gao F. 4-Hydroxyisoleucine: A potential new treatment for type 2 diabetes mellitus [J]. *BioDrugs*, 2016, 30 (4) : 255–262.
- [9] 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 Communication*, 2009, 390 (3) : 506–510.
- [10] Ogawa J, Kodera T, Smirnov S V. 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.
- [11] 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 (3) : 719–726.
- [12] Kivero A D, Novikova A E, Smirnov S V. Modification of *E. coli* central metabolism to optimize the biotransformation of *L*-isoleucine into 4-hydroxyisoleucine by enzymatic hydroxylation [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2012, 48 (7) : 639–644.
- [13] Shi F, Niu T, Fang H. 4-Hydroxyisoleucine production of recombinant *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* under optimal corn steep liquor limitation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99 (9) : 3851–3863.
- [14] Shi F, Fang H, Niu T, et al. Overexpression of *ppc* and *lysC* to improve the production of 4-hydroxyisoleucine and its precursor *L*-isoleucine in recombinant *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 87/88 : 79–85.
- [15] Shi F, Zhang M, Li Y, et al. Sufficient NADPH supply and *pknG* deletion improve 4-hydroxyisoleucine production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 115 : 1–8.
- [16] 张成林, 刘远, 薛宁, 等. 苏云金芽孢杆菌重组 *L*-异亮氨酸羟及其在 4-羟基异亮氨酸合成中的应用 [J]. *微生物学报*, 2014, 54 (8) : 889–896.
- [17] 温冰, 张成林, 麻杰, 等. 利用谷氨酸棒杆菌转化法合成 4-羟基异亮氨酸 [J]. *天津科技大学学报*, 2016, 31 (4) : 9–14.
- [18] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 2–137.
- [19] Li Y, Sun L, Jia F, et al. Efficient production of α -ketoglutarate in the *gdh*, deleted *Corynebacterium glutamicum*, by novel double-phase pH and biotin control strategy [J]. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 2016, 39 (6) : 967–976.
- [20] Samsonova N N, Smirnov S V, Novikova A E, et al. Identification of *Escherichia coli* K12 YdcW protein as a γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579 (19) : 4107–4112.
- [21] Kobayashi M, Shimizu S. Nitrile hydrolases [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4 (1) : 95–102.
- [22] Hausinger R P. Fe II/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 39 (1) : 21–68.
- [23] Mcdonough M A, Loenarz C, Chowdhury R, et al. Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20 (6) : 659–672.
- [24] Purpero V, Moran G R. The diverse and pervasive chemistries of the α -ketoacid dependent enzymes [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, 12 (5) : 587–601.